Radioimmunoassay mit beschichteten Röhrchen für die quantitative Bestimmung von

humanem insulinähnlichem Wachstumsfaktor Bindungsprotein 3 (IGFBP-3)

Deutsch

Radioimmunoassay with Coated Tubes for Quantitative Determination of

human Insulin-like Growth Factor Binding Protein 3 (IGFBP-3)

English

Europäische Union / European Union:
für In-vitro-Diagnostik / For In Vitro Diagnostic Use
IVD zum Gebrauch durch Fachpersonal! / IVD for professional use!
Alle anderen Länder / All other countries:
Nur für Forschungszwecke. Nicht für diagnostische Anwendungen geeignet.
For Research Use Only. Not for use in diagnostic procedures.

CE IVD 2-8°C Σ 100 tests

REF **R11**

Exemplary Version, don´t use for assay accomplishment. Exemplarische Version, bitte nicht für Assay Durchführung benutzen.

mediagnost®
Gesellschaft für Forschung und Herstellung von Diagnostika GmbH

: Aspenhaustr. 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

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

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

DIN EN ISO 15223-1

	Expiry date/ Verfallsdatum/ Date de péremption/ Data di scadenza/ Fecha de caducidad/ Data de validade/ Uiterste gebruiksdatum/ Udløbsdato/ Bäst före-datum/ Termin ważności/ Lejárati idő/ Čas exspirácie/ Doba exspirace/ Срок на годност/ Aegumiskuupäev/ Ημερομηνία λήξης/ Data de expirare/ Rok uporabe/ Viimeinen käyttöpäivä
	Consider instructions for use/ Bitte Gebrauchsanweisung beachten/ Consultez la notice d'utilisation/ Consultare le istruzioni per l'uso/ Consulte las instrucciones de uso/ Respeitar as instruções de utilização/ A.u.b de gebruiksaanwijzing volgen/ Se brugsanvisningen/ Läs anvisningarna före användning/ Proszę przeczytać instrukcję obsługi/ Vegye figyelembe a használati utasításban foglaltakat/ Postupujte podľa pokynov na použitie/ Dodržujte návod k použití/ Моля, спазвайте инструкцията за употреба/ Palun järgige kasutusjuhendit/ Λάβετε υπόψη σας τις οδηγίες χρήσης/ Vă rugăm să respectaţi instrucţiunile de utilizare/ Upoštevajte navodila za uporabo!/ Lue käyttöohje huolellisesti!
	In vitro Diagnostic Medical Device (for in vitro diagnostic use)/ In-vitro-Diagnostikum (zur In-vitro-Diagnostik)/ Dispositif médical de diagnostic in vitro (Pour usage diagnostique in vitro)/ Dispositivo medico per diagnostica in vitro (per uso diagnostico in vitro)/ Dispositivo médico de diagnóstico in vitro (para uso diagnóstico in vitro)/ Dispositivo Médico para Diagnóstico in vitro (Para Utilização de Diagnóstico in vitro)/ Medisch hulpmiddel voor diagnostiek in vitro (voor diagnostisch gebruik in vitro)/ Medicinsk udstyr til in vitro-diagnostik (Udelukkende til in vitro diagnostisk anvendelse)/ Medicinteknisk produkt avsedd för in vitro-diagnostik (för in vitro-diagnostiskt bruk)/ Wyrób medyczny do diagnostyki in vitro/ In vitro orvosdiagnosztikai termék (in vitro diagnosztikai használathoz)/ In vitro diagnostický zdravotnícky materiál (určené na diagnostiku „in vitro")/ In vitro diagnostický zdravotnický materiál (určeno pro diagnostiku „in vitro")/ Медицинско устройство за ин-витро диагностика (за ин-витро диагностика)/ in vitro diagnostikaseade (in vitro diagnostika tegemiseks)/ In vitro διαγνωστικό (για διάγνωση in vitro)/ Dispozitiv de diagnosticare in vitro (pentru diagnosticarea in-vitro)/ In vitro diagnostika (o in vitro diagnostiki)/ in vitro-diagnostiikkakäyttö
	Lot-Batch Number/ Charge-Chargennummer/ Lot-Code du lot/ Lotto-Numero di lotto/ Lote-Código de lote/ Lote-Código do Lote/Lot-Partijnumme/ Lot-Batchkode/ Partisatskod/ Numer serii/ Tétel-sarzs szám/ Číslo šarže/ Číslo šarže/ Партиден номер/Partii number/ Παρτίδα-αριθμός παρτίδας/ Lot-număr lot/ Številka serije/ erä
	Manufactured by/ Hergestellt von/ Fabriqué par/ Prodotto da/Fabricado por/ Fabricado por/ Vervaardigd doo/Fabrikation af /Tillverkad av/ Wyprodukowane przez/ Gyártotta / Vyrobené/ Vyrobeno v/ Производител/ Tootja/ Κατασκευάζεται από/ Produs de/ Proizvajalec/ Valmistaja
	Catalogue Number/ Bestellnummer/ Numéro de référence/Numero di riferimento/ Número de referencia/ Número de Referência/ Referentienummer/ Referencenummer /Beställningsnummer/ Numer katalogowy/ Rendelési szám/Katalógové číslo/ Objednací číslo/Каталожен номер/Tellimisnumber/ Αρ. παραγγελίας/Număr comandă/ Številka naročila/ viite tai tilausnumero
	Store at between/ Lagerung bei zwischen/ Conserver à entre/ Conservare a tra/ Conservar a temp. Entre/ Armazenar entre/ Bewaar bij tussen/ Opbevares mellem/ Förvaras vid/ Przechowywać w/ Tárolási tartomány/ Skladujte v rozsahu / Skladujte v rozmezí/ Температурно ограничение/ Säilitada temperatuuridel/ Φύλαξη σε θερμοκρασία/ Depozitare între/ Skladiščenje med/ Säilytys x-y Celsiusasteen lämpötilassa
	Contains sufficient for x tests/ Inhalt ausreichend für x Tests/ Contient suffisant pour x tests/ Contenuto sufficiente per x test/ Contenido suficiente para x pruebas/ Conteúdo suficiente para x testes/ Bevat voldoende voor x bepalingen/ Indeholder tilstrækkeligt til x prøver/ Innehållet räcker till x analyser/ Zawartość na x testów/ Tartalma x teszt elvégzésére elegendő/ Obsahuje materiál pre x testov/ Obsah dostačuje pro x testů/ Съдържание достатъчно за x тестове/ Sisust jätkub x katse jaoks/ Το περιεχόμενο επαρκεί για x δοκιμές/ Conţinut suficient pentru x teste/ Vsebina zadostuje za x preizkusov/ Sisältö riittää x testille
	Radioactive/ radioaktiv/ Radioactif/ Radioattivo/ radioactivo/ radioactief/ radioaktiv/ radioaktiv/ radioaktywny /radioaktív/ rádioaktívne/ radioaktivní/ радиоактивно/ radioaktiivne/ Ραδιενεργό/radioactive/ radioaktivno/ radioaktiivinen
	Incubation time/ Inkubationszeit/ Temps d'incubation/ Tempo d'incubazione/ Tiempo de incubación/ Tempo de incubação/ incubatietijd/Inkubationstid/ inkubationstid/ Czas inkubacji/ Inkubációs idő/ Inkubačná lehota/ Inkubační doba/ Инкубационен период/ Inkubatsiooniaeg/ Χρόνος επώασης/ Timp de incubare/ Inkubacijska doba/ inkubaatioaika
	Incubate at/ Inkubation bei/ Incuber à/ Incubare a/incubar a/Incubar a/ incubatietemperatuur/ Inkubation ved/ inkubation vid/ Inkubacja przy/ Inkubáció hőmérséklete/ Inkubácia pri/ Inkubace při/ Инкубира се при/ Inkubatsioon temperatuuril/ Επώαση στους/ Incubare la/ Inkubacija pri/ inkubaatiolämpötila
	Mix tubes with a Vortex mixer/ Mix Röhrchen mit Vortex Mixer/ Mélanger à l'aide d'un vortex/ Miscelare la provetta con agitatore Vortex/ Tubos de mezcla con mezclador de vórtex/ Misturar os tubos com um agitador Vortex/ buisjes mengen met een Vortex/ Blanderør med Vortex-mixer/ Blanda rören med en vortexblandare/ Miksowanie rurek w mikserze Vortex/ Csövecskék keverése örvénykeverővel/ Premiešať pomocou prístroja Vortex/ Promíchat pomocí přístroje Vortex/ Разбъркване на епруветките с миксер Vortex/ Segada torukesi Vortexi mikseriga/ Αναμίξτε τους σωληνίσκους με αναδευτήρα Vortex/ Amestecaţi eprubetele cu ajutorul unui agitator vortex/ Mešanje cevčic z mešalnikom Vortex/ Sekoita putket Vortex sekoittajalla
	All/ alle/ Tout/ Tutto/ Todo/ tudo/ alle/ alle/ alla/ wszystkie/ minden/ všetko/ všechno/всички/kõik/ όλα/ toate/Vsi/kaikki
	Not/ Nicht/ Non/ Non/ No/ Não/ niet/ Ikke/ inte/ nie/ Nem/ не/ mitte / όχι / Nu /Ne/ ei
	Maximal Binding/ maximale Bindung/ Liaison maximale/ legame max./ Enlace máximo/ Ligação máxima/ maximale binding/ maksimal binding/ maximal bindning/ maksymalne wiązanie/maximális kötés/ Maximálne väzby/ Maximální vazby/ максимално свързване/ maksimaalne sidumine/ Μέγιστη δέσμευση/ legătură maximă/ Maksimalna vez/ Maksimaalinen sidos

Exemplary Version, donot use for assay accomplishment/ Exemplarische Version, bitte nicht für Assay-Durchführung benutzen.

NSB	non specific binding/ nicht spezifische Bindung/ pas de liaison spécifique/ Legame non specific/ Enlace no específico/ ligação não específica/ niet-specifieke binding/ ikke specifisk binding/ icke specifik bindning/ Wiązanie niespecyficzne/ nem specifikus kötés/ nešpecifická väzba/ nespecifická vazba/ неспецифично свързване/ mittespetsiifiline sidumine/ Μη ειδική δέσμευση/ legătură nespecifică/ nespecifična vez/ epä-spesizinen sidos
TC	Total Counts/ Total Counts/ Coups totaux/ Conte totali/ Conteo total/ Total de Contagens/ totaaltellingen/ Samlede tællinger/ totalt antal/ Licznik całkowity/ Teljes szám/ Celkový počet/ Celkový počet/ Общо количество/ Σύνολο αποικιών/ Număr total/ Skupno število/ Kokonaissykäykset
T	Streptavidin-coated Tubes/ Streptavidin-beschichtete Röhrchen/ tubes revêtus de streptavidine/ Provette rivestite di streptavidina/ Tubos recubiertos con estreptavidina/ Tubos revestidos com Streptavidina/ buisjes met streptavidin gecoat/ Streptavidin-coatede rør/ streptavidinbelagda rör/ Rurki z powłoką streptawidynowym/ Streptavidin-bevonatú csövecskék/ Rúrky s vrstvou streptavidínu Trubičky s vrstvou streptavidinu/ Натоварени със стрептавидин епруветки/ Streptavidiiniga kaetud torukesed/ Σωληνίσκοι επικαλυμμένοι με στρεπταβιδίνη/ Eprubete acoperite Streptavidin/ Cevčice, prekrite s streptavidinom/ Streptavidiinilla pinnoitetut putket
Rec in	Reconstitute in/ Rekonstituieren in/ Reconstituer dans/ Ricostituire nel/ Reconstituir en/ Reconstituir em/ reconstitueren in/ Rekonstituér i/ rekonstituera/ Rekonstytuować w/ Helyreállítás/ Znovu pripraviť za/ Znovu připravit za/ Разтваряне в/ Moodustada uuesti/ Ανασυστήστε σε/ Reconstituire în/ Predelava v/ rekonstituoi
SPE	Sample/ Probe/ Echantillon/ campione/ Muestra/ Amostra/ monster/ Prøve/ prov/ Próbka/ Minta/ Vzorka/ Vzorek/ Проба/ Proov/ Δείγμα/ Probă/ Vzorec/ Näyte
2xDB	Dilution Buffer 2x/ Verdünnungspuffer 2x/ Tampon de dilution 2x/ Tampone di diluizione 2x/ Tampón de dilución2x/ / Tampão de diluição 2x / Verdunningsbuffer 2x/ / Fortyndingsbuffer 2x/ Utspädningsbuffert 2x/ Bufor rozcieńczający 2x/ / Hígító puffer 2x/ Riediaci pufor 2x/ Ředicí pufr 2x / Буфер за разреждане 2x/ Lahjenduspuhver 2x/ Ρυθμιστικό διάλυμα αραίωσης 2x/ Tampon de diluare 2x/ Pufer za redčenje 2x/ Laimennuspuskuri 2x
1xDB	Dilution Buffer 1x/ Verdünnungspuffer 1x/ Tampon de dilution 1x/ Tampone di diluizione 1x/ Tampón de dilución 1x/ / Tampão de diluição 1x/ Verdunningsbuffer 1x/ / Fortyndingsbuffer 1x/ Utspädningsbuffert 1x/ Bufor rozcieńczający 1x/ / Hígító puffer 1x/ Riediaci pufor 1x/ Ředicí pufr 1x/ Буфер за разреждане 1x/ Lahjenduspuhver 1x/ Ρυθμιστικό διάλυμα αραίωσης 1x/ Tampon de diluare 1x/ Pufer za redčenje 1x/ Laimennuspuskuri 1x
C	Tracer/ Tracer/ Traceur/ Tracciatore/ Trazador/ Marcador/ tracer/ Tracer/ spårämne/ Indykator/ Nyomjelző/ Indikátor/ Indikátor/ Трейсер/ Kandur/ Ιχνηθέτης/ Indicator/ Sledilna snov/ indikaattori
R	Capture Antibody/ Fang-Antikörper/ Anticorps de capture/ Anticorpo di cattura/ Anticuerpos de captura/ Anticorpo de captura/ vanger-antilichaam/ Fæstet antistof/ fångande antikropp/ Przechwytywanie antyciał/ Elfogó antitest/ Zachytenie protilátky/ Zachycení protilátky/ Захващащо антитяло/ Haarde-antikehad/ Ακινητοποιημένο αντίσωμα/ Captură anticorpi/ Lovilna protitelesa/ sekundäärinen vasta-aine
S	Specific Antibody/ spezifischer Antikörper/ Anticorps spécifique/ Anticorpo specific/ Anticuerpos específicos/ Anticorpo específico/ specifieke antilichaam/ Specifisk antistof/ specifik antikropp/ Określone antyciała/ specifikus antitest/ Špecifická protilátka/ Specifická protilátka/ Специфично антитяло/ eriomased antikehad/ Ειδικό αντίσωμα/ anticorpi specifici/ Specifična protitelesa/ spesifinen vasta-aine
X:X	Dilute / Verdünnen / Diluer / Diluire / Diluir / Diluir/ Verdunnen / Fortyndes / Späd / Rozcieńczanie / Hígítás / Riediť / Ředit / Разреждане / Lahjendada / Αραιώστε / Diluați / Razredčiti / Laimennetaan
F-J	Calibrator X/ Kalibrator X/ calibrateur X/ calibratore X/ calibrador X/ calibrador X/ kalibrator X/ kalibrator X/ kalibrator X/ kalibrator X/ kalibrátor X/ kalibrátor X/ kalibrátor X/ калибратор X/ kalibraator X/ Βαθμονομητής X/ calibrator X/ kalibrator X/ kalibraattori X
M-N	Control X/ Kontrolle X/ Contôle X/ controllo X/ control X/ Controle X/ controle X/ Kontrol X/ Kontroll X/ kontrolne X/ Ellenőrző X/ Kontrolné X/ Kontrolní X/ Контролен X/ Kontroll X/ ελέγχου X/ control X/ Kontrolni X/ Kontrolli X
ASP	Aspirate liquid completly/ Flüssigkeit vollständig absaugen/ Aspirer le liquide complètement/ Aspirare completamente il liquid/ Succionar todo el liquid/ Aspirar completamente o liquid/ vloeistof volledig opzuigen/ / Sug upp all vätska/ Całkowicie odessać ciecz/ Folyadék teljes elszívása/ Kvapalinu úplne odsať/ Kapalinu úplně odsát/ Аспирирайте течността напълно/ Tõmmata vedelik täielikult sisse/ Αναρροφήστε πλήρως το υγρό/ Aspiraţi lichidul complet/ Izsesavanje tekočine v celoti/ ime neste täydellisesti
MEASURE	Count radioactivity of all Tubes/ Radioaktivität aller Röhrchen messen/ Compter l'activité de tous les tubes/ Misurare la radioattività di tutte le provette/ Medir la radioactividad de todos los tubos/ Medir a radioactividade de todos os tubos/ radioactiviteit van alle buisjes meten/ Mål radioaktivitet for alle rør/ Mät radioaktiviteten i alla rör/ Zmierzyć radioaktywność wszystkich rurek/ Minden csövecske radioaktivitásának mérése/ Merať rádioaktivitu všetkých rúrok/ Měřit radioaktivitu všech trubiček/ Измерване на радиоактивността на всички епруветки/ Kõigi torukeste radioaktiivsuse mõõtmine/ Μετρήστε τη ραδιενέργεια όλων των σωληνίσκων/ Măsuraţi radioactivitatea tuturor eprubetelor/ Meritev radioaktivnosti vseh cevčic/ Mittaa kaikkien putkien radioaktivisuus
Literature	Literature/ Literatur/ Bibliographie/ Letterario/ Bibliografía/ Literatura documentação/ literatuur/ Litteratur/ litteratur/ Literatura/ Irodalom/ Literatúra/ Literatura/ Литература// Kirjandus/ Βιβλιογραφία/ Bibliografie/ literatura/ Lähdeluettelo
International Test description	International test description/ internationale Testanleitung/ description internationale de test/ Istruzioni per il test internazionali/ Descripción de ensayo internacional/ Descrição internacional do teste/ internationele testbeschrijving/ internationell testbeskrivning/ Opis testu międzynarodowego/ nemzetközi teszt-útmutató/ Medzinárodný návod k testu/ Mezinárodní návod k testu/ rahvusvaheline katse kirjeldus/ Διεθνείς οδηγίες για εργαστηριακές δοκιμές/ instrucţiuni internaţionale pentru testare/ mednarodna navodila za preizkus/ Kansainvälinen käyttöohje

Exemplary Version, do not use for assay according to Assay Durchführung benutzen.
Exemplarische Version bitte nicht für Assay Durchführung benutzen.

INHALTSVERZEICHNIS / TABLE OF CONTENTS

DEUTSCH - Gebrauchsanweisung 5

1 ZWECKBESTIMMUNG 5

2 EINFÜHRUNG 5

3 TESTPRINZIP 8

4 WARNHINWEISE UND VORSICHTSMAßNAHMEN 9

5 PROBEN 10

6 MATERIALIEN 11

7 TECHNISCHE HINWEISE 12

8 TESTDURCHFÜHRUNG 13

9 QUALITÄTSKONTROLLE 14

10 AUSWERTUNG 14

11 EINSCHRÄNKUNGEN 16

12 REFERENZWERTE 17

13 ASSAY EIGENSCHAFTEN UND VALIDIERUNG 18

14 ASSAY VERGLEICH 20

15 WISSENSCHAFTLICHE ANWENDUNGEN 21

ENGLISH - Instructions for use 23

1 INTENDED USE 23

2 INTRODUCTION 23

3 ASSAY PRINCIPLE 26

4 WARNINGS AND PRECAUTIONS 27

5 SAMPLES 28

6 MATERIALS 29

7 TECHNICAL NOTES 30

8 ASSAY PROCEDURE 31

9 QUALITY CONTROL 32

10 EVALUATION OF RESULTS 32

11 LIMITATIONS OF PROCEDURE 34

12 REFERENCE VALUES 35

13 PERFORMANCE CHARACTERISTICS 36

14 ASSAY COMPARISON 38

15 SCIENTIFIC APPLICATION 39

16 LITERATUR / REFERENCES 41

17 INTERNATIONAL ASSAY DESCRIPTION 42

18 ASSAY PROCEDURE 44

Exemplary Version, don´t use for assay accomplishment. Exemplarische Version, bitte nicht für Assay Durchführung benutzen.

DEUTSCH - Gebrauchsanweisung

IGFBP-3 RIA-CT, R11	100 Bestimmungen mit beschichteten Röhrchen
CE	DE/CA40/00809/34
Testprinzip	Radioimmunoassay
Dauer (Inkubationszeit)	über Nacht (≥ 15h)
Tracer	jodiertes natives humanes IGFBP-3, < 55 kBq
Antikörper	Spezifisches, hochaffines polyklonales Antiserum
Kreuzreaktivität mit IGFBP-1,-2,-4,-5,-6	< 0,3 %
Puffer	2-fach Konzentrat
Kalibrator	5 Einzelkalibratoren: 1 – 81 µg/L, natives humanes Serum
Assay Bereich	0,8 – 24000 µg/L
Kontrolle	2 Kontrollen, gefriergetrocknet – RiliBÄK Konform
Probe	humanes Serum / Plasma
Erforderliches Probenvolumen	10 µL
Probenverdünnung	1:301
Analytische Sensitivität	< 0,8 µg/L
Intra- und Interassay Variation	< 10%
Halbmaximale Verdrängung	< 12 µg/L
Referenzwerte	Blum W.F., Schweizer R. Insulin-Like Growth Factors and Their Binding Proteins. In: Ranke MB (ed.): Diagnostics of Endocrine Function in Children and Adolescents. Basel, Karger, 2003, pp.166-199

1 ZWECKBESTIMMUNG

Der IGFBP-3 RIA-CT R11 soll zur quantitativen Bestimmung von humanem IGFBP-3 in Serum- und Plasmaproben verwendet werden. Die Ergebnisse dieses Tests können in Kombination mit Wachstumsverzögerung und anderen klinischen Symptomen als zusätzliche Information verwendet werden, um Störungen der Wachstumshormon-Achse zu beurteilen.

2 EINFÜHRUNG

Die insulinähnlichen Wachstumsfaktoren (Insulin-like growth factors) IGF-I und IGF-II sind im Blutkreislauf an spezielle Bindungsproteine (IGFBPs) gebunden. Bisher wurden sieben verschiedene Bindungsproteine identifiziert und als IGFBP-1 bis IGFBP-7 klassifiziert (1, 2). Sie werden von verschiedenen Geweben in unterschiedlichem Maße exprimiert und unterliegen spezifischen posttranslationalen Modifikationen wie beispielsweise Glykosylierungen oder Phosphorylierungen. Die wesentliche Funktion der IGFBPs ist es, im Zusammenspiel mit spezifischen Proteasen, die biologische Verfügbarkeit der IGFs zu regulieren.

Im Blut überwiegt IGFBP-3. Es bildet nach der Bindung von IGF-I bzw. IGF-II einen Komplex mit der sogenannten säurelabilen Untereinheit (acid-labile subunit) ALS (3-5) und liegt nahezu vollständig in Form dieses hochmolekularen, ternären Komplexes vor, es finden sich aber auch geringe Mengen freies IGFBP-3 im Blut (6, 7).

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

Neben dem hypophysären Wachstumshormon (WH), auch als Somatropin bezeichnet, gibt es noch andere Faktoren, die die IGFBP-3-Konzentration beeinflussen: Alter, sexuelles Entwicklungsstadium, Ernährung, Hypothyreose, Diabetes mellitus, Leber- und

Exemplary version, don't use for assay accepted/released. Exemplarische Version, bitte nicht für Assay Durchführung benutzen.

Nierenfunktion. IGFBP-3 Werte sind erniedrigt bei Unterernährung (allerdings nicht in dem Maße wie IGF-I), bei Hypothyreose, Diabetes mellitus und Lebererkrankungen (6-8). Erhöhte IGFBP-3 Werte konnten bei Vorliegen einer chronischen Niereninsuffizienz nachgewiesen werden (6, 10, 11).

24-Stunden-Messungen zeigen konstante zirkadiane Konzentrationen (12, 13). Für klinische Belange ist der wichtigste regulierende Faktor das Wachstumshormon. IGFBP-3-Einzelmessungen korrelieren positiv mit dem Logarithmus der spontanen Gesamt-WH-Sekretion (8,14). Bei Patienten mit WH-Mangel sind auch die IGFBP-3 Werte erniedrigt. Nach Gabe von WH über mehrere Tage steigen die IGFBP-3 Konzentrationen langsam in den normalen Bereich (7,8). Die langsame Reaktion auf WH-Konzentrationsänderungen und konstante zirkadiane Werte während täglicher WH-Gabe (13) lassen die Vermutung zu, dass IGFBP-3 den WH-Sekretionsstatus über mehrere Tage widerspiegelt.

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

1. Bei Kleinkindern ist die IGF-I Konzentration sehr gering und erschwert so eine genaue quantitative Messung bei subnormalen Werten.

2. Eine erhebliche Anzahl von kleinwüchsigen Kindern besitzt trotz normaler WH-Sekretion subnormale IGF-I Werte. Dadurch wird die Spezifität und Genauigkeit des IGF-I Tests zur Diagnose von WH-Mangel eingeschränkt.

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

1. Vor der Messung ist kein Extraktionsschritt notwendig. Diese Vereinfachung der Testdurchführung erhöht automatisch die Genauigkeit.

2. Die Referenzwerte bei Kleinkindern sind relativ hoch, so dass die Messung subnormaler Werte verlässlicher wird.

3. Patienten mit WH-Mangel besitzen subnormale IGFBP-3 Werte. Andererseits besitzen die meisten kleinwüchsigen Kinder mit normaler WH-Sekretion auch IGFBP-3 Werte im Referenzbereich (Abb. 1). Auch bei anderen Patienten mit ausgeprägtem Minderwuchs, aber normaler WH-Sekretion, z. B. Ullrich-Turner -Syndrom oder Silver-Russell-Syndrom, sind die IGFBP-3 Serumwerte ebenfalls normal (8). Daher kann durch die Messung von IGFBP-3 sicher ein WH-Mangel erkannt werden (7,18).

Bei kleinwüchsigen Kindern mit WH-Mangel steigen die IGFBP-3 Werte während der Behandlung mit WH stetig bis in den Referenzbereich an und bleiben bei fortgesetzter Therapie auch konstant (Abb. 2). Daher ist die IGFBP-3 Messung im Serum auch geeignet, WH-Therapien zu überwachen (19).

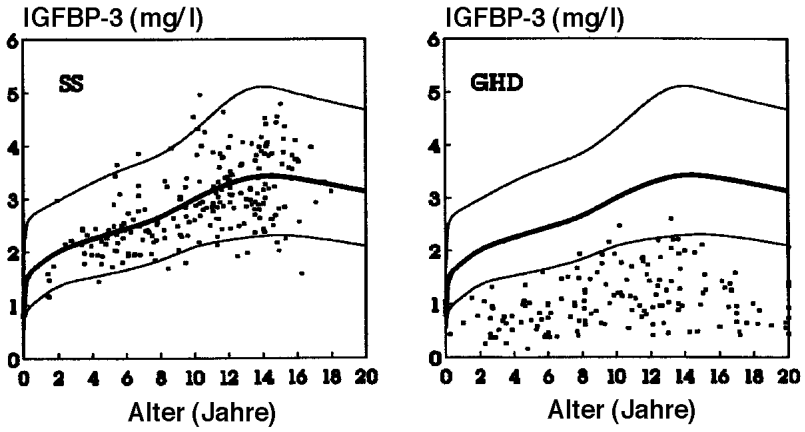

Abb. 1 IGFBP-3 Serumwerte bei kleinwüchsigen Patienten ohne WH-Mangel: angeborene Wachstums- und Entwicklungsverzögerung, vererbte Kleinwüchsigkeit, intra-uterine Wachstumsverzögerung (SS: short stature) sowie bei idiopathischem oder organischem WH-Mangel (GHD: growth hormone deficiency). Der Referenzbereich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

Exemplary Version, do ay accomplishment. Exemplarische Version, bitte nicht für Assay Durchführung benutzen.

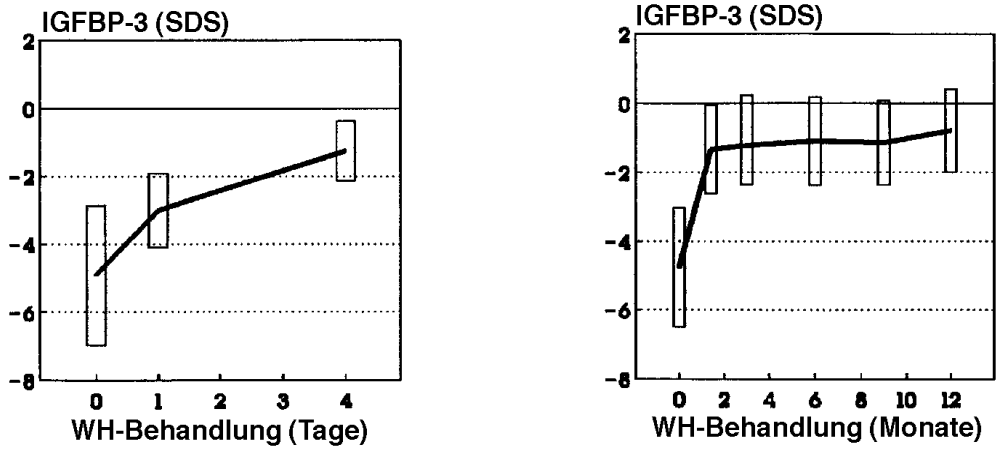

Abb. 2 IGFBP-3 Serumwerte bei Kindern mit WH-Mangel vor und während der Behandlung mit WH. Aufgrund der Altersabhängigkeit wurden die Werte über die Standardabweichungen (SDS: standard deviation score) gemittelt angegeben.

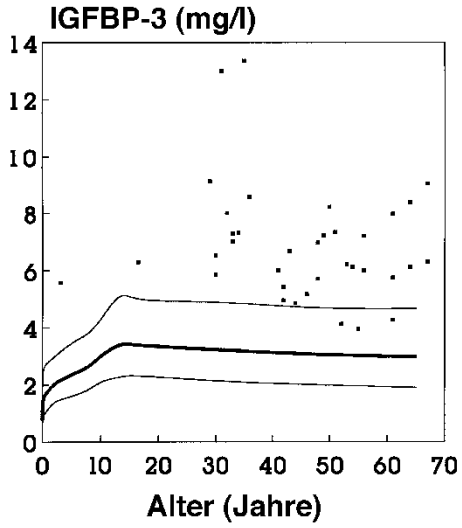

Abb. 3 IGFBP-3 Serumwerte bei Akromegalie. Der Referenz-Bereich ist durch die 5., 50. und 95. Perzentile definiert.

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

Exemplary Version, don't use for assay ac... ...nment. Exemplarische Version, bitte nicht für Assay Durchführung benutzen.

3 TESTPRINZIP

Der Mediagnost R11 ist ein kompetitiver Radioimmunoassay, der auf einem spezifischen, hochaffinen, polyklonalen Antiserum basiert, das durch die Immunisierung von Kaninchen mit in Säugerzellen exprimierten rekombinanten IGFBP-3 gewonnen wurde. Das Antiserum erkennt IGFBP-3 quantitativ auch im ternären Komplex. IGFBP-3 im Kalibrator und in den verdünnten Proben konkurriert mit dem aufgereinigten, radioaktiv markierten 125-Jod-IGFBP-3 des Tracers um die Bindung am limitiert zur Verfügung gestellten Antiserum. Der Assay wird in Streptavidin-beschichteten Röhrchen inkubiert. Ein Fang-Antikörper vermittelt die Bindung zwischen dem spezifischen Antikörper und den Röhrchen, so dass nach der Inkubation ungebundener Tracer leicht ausgewaschen werden kann.

Die Menge des gebundenen Tracers wird über die Messung der Radioaktivität bestimmt, je niedriger das gemessene Signal, desto höher der Gehalt an IGFBP-3 in der Probe. Die Quantifizierung der IGFBP-3 Konzentrationen in den Proben erfolgt durch den Vergleich mit einem Kalibrator, der eine bekannte Menge an nativem humanem IGFBP-3 enthält.

Klinische Validierung

Die klinische Validierung (9) erfolgte durch Bestimmung der IGFBP-3-Spiegel bei einer großen Zahl gesunder Kinder und Erwachsener, minderwüchsiger Kinder ohne Wachstumshormonmangel, Mädchen mit Ullrich-Turner-Syndrom, Kindern mit Silver-Russell-Syndrom, Patienten mit WH-Mangel, Kindern mit familiärem Hochwuchs, Sotos-Syndrom, Patienten mit Akromegalie und Kindern mit Pubertas praecox oder verfrühter Thelarche (Tab. 1; Abb. 1, 2, 3, 5 und 6).

Exemplary Version, don´t use for assay accomplishment. Exemplarische Version, bitte nicht für Assay Durchführung benutzen.

4 WARNHINWEISE UND VORSICHTSMAßNAHMEN

- Nur zur In-vitro-Diagnostik.
- Nur zum Gebrauch durch Fachpersonal
- Vor Gebrauch ist die gesamte Packungsbeilage zu lesen. Der Assay ist strikt nach dem mitgelieferten Testprotokoll durchzuführen, verwenden Sie die gültige Version der Packungsbeilage, die mit dem Kit geliefert wird. Seien Sie sich sicher, dieses vollständig verstanden zu haben.
- Der Erwerb, Besitz, die Verwendung und Entsorgung des Kits unterliegen den Bestimmungen der nationalen Aufsichtsbehörden.
- Mögliche Präzipitate in Puffern sollten vor der Verwendung durch Durchmischung und Erwärmung aufgelöst werden.
- Reagenzien mit unterschiedlichen Lot-Nummern sollten nicht vermischt werden. Verwenden Sie keine abgelaufenen Reagenzien.
- Die Reagenzien enthalten als Konservierungsmittel Na-Azid, allerdings sehr stark verdünnt (0,02 %).
- Sicherheitsdatenblatt auf Anfrage erhältlich.
- Die Proben (Kalibratoren, Kontrollen und Patientenproben) sollten stets als Doppelbestimmung durchgeführt werden. Um optimale Ergebnisse zu erhalten, ist auf genaues Pipettieren und strikte Befolgung des Testprotokolls zu achten.
- Bitte verwenden Sie keine abgelaufenen, offensichtlich beschädigten, mikrobiell kontaminierten oder ausgelaufenen Reagenzien.
- **VORSICHT:** Der R11 enthält Material humanen und/oder tierischen Ursprungs. Das humane Material, das für die Präparation dieses Produktes verwendet wird, ist auf die Präsenz von Antikörpern gegen Humanes Immundefiziens-Virus (HIV I und II), gegen Hepatitis B-Oberflächenantigen und gegen Hepatitis C Virus geprüft und für negativ befunden worden. Da kein Test das Vorhandensein von infektiösen Erregern völlig ausschließen kann, sollten die Reagenzien wie potentiell infektiöses Material gehandhabt werden.

4.1 Radioaktivität

Vor der Bestellung oder dem Gebrauch radioaktiver Produkte ist es notwendig, die Einhaltung der nationalen Bestimmungen oder Gesetze, die deren Anwendung regeln, sicherzustellen. Örtliche Vorschriften der jeweiligen Einrichtung, die Umgang und Verhalten im Radioaktiv-Arbeitsbereich regeln, müssen befolgt werden. Die hier gegebenen Ratschläge ersetzen nicht die lokalen Regeln, Anweisungen oder Ausbildungen der jeweiligen Einrichtung, ebenso wenig die Anordnungen des zuständigen Strahlenschutzbeauftragten. Es ist wichtig, die Richtlinien der guten Laborpraxis zu erfüllen, daneben gilt es die Besonderheiten im Umgang mit dem Radionuklid Jod^{125} zu beachten. Jod^{125} hat eine Halbwertszeit T1/2 von 60 Tagen und emittiert 35,5 keV Gamma-Strahlung, 27 – 32 keV Röntgen-Strahlung und keine Beta-Strahlung. Effektive Abschirmung ist durch Blei möglich, die Halbwertschichtdicke beträgt 0,07 mm Blei, Reduktion auf 10 % ist durch 0,2 mm zu bewerkstelligen. Zur Reduzierung der Strahlendosis sollte die Zeit des Umgangs mit Radioaktivität minimiert werden (Arbeitsschritte vorplanen), sowie die Entfernung zur Strahlenquelle maximiert werden (Verdopplung der Entfernung reduziert die Strahlendosis auf ein Viertel). Unsachgemäßes Öffnen oder Mischen von Gefäßen oder Pipettieren von Lösungen kann zur Bildung von Aerosolen, also Freisetzung von Radioaktivität in Tröpfchenform, führen und muss vermieden werden. Der pH-Wert von Lösungen, die Jod enthalten, sollte nicht im sauren Bereich sein, da dies zur Freisetzung von flüchtigem elementarem Jod führen kann. Zur Reinigung kontaminierter Flächen und Ausrüstung alkalische Natriumthiosulfatlösung mit Papier-, Zellulosewischtüchern verwenden. Einige Jod-Verbindungen können durch Gummihandschuhe diffundieren, deshalb sollten zwei Paar oder Polyethylen- und Gummihandschuhe getragen werden.

4.2 Erste-Hilfe Maßnahmen:

- *Nach Hautkontakt*: Nach Berührung mit der Haut mindestens 15 Minuten mit genügend Wasser abwaschen. Kontaminierte Kleidung und Schuhe wechseln. Arzt rufen.
- *Nach Augenkontakt*: Nach Berührung mit den Augen mindestens 15 Minuten mit genügend Wasser spülen. Ausreichende Spülung durch Spreizung der Augenlider sicherstellen. Arzt rufen.
- *Nach Verschlucken:* Nach Verschlucken, Mund mit Wasser ausspülen, vorausgesetzt die Person ist bei Bewusstsein. Sofort einen Arzt zuziehen.
- Beim Umgang mit radioaktivem und potentiell infektiösem Material müssen folgende Richtlinien befolgt werden:
- Das Material sollte in speziell ausgewiesenen Bereichen gelagert und verwendet werden.
- Essen, Trinken und Rauchen ist in diesem Bereich verboten!
- Niemals mit dem Mund pipettieren!
- Direkter Kontakt mit diesem Material muss vermieden werden! Deshalb Laborkleidung und Einmalhandschuhe tragen.
- Verschüttete Reagenzien müssen sofort aufgewischt und kontaminierte Flächen und Geräte mit einem geeigneten Detergens gereinigt werden.
- Unbenutzte radioaktive Materialien und radioaktiver Abfall müssen entsprechend den Empfehlungen der nationalen Aufsichtsbehörden gelagert werden.

Exemplary Version, don´t use for assay accomplishment. Exemplarische Version, bitte nicht für Assay Durchführung benutzen.

5 PROBEN

5.1 Probenmaterial

Serum und Plasma

Serum und Heparin-/EDTA-/Citrat-Plasma ergeben vergleichbare Werte.

5.2 Probenentnahme

Das Blut zur Probengewinnung mittels standardmäßiger Venenpunktion entnehmen. Hämolytische Reaktionen und ikterische und lipämische Proben sind zu vermeiden.

5.3 Erforderliches Probenvolumen:

10 µL

5.4 Probenstabilität

In fest verschließbaren, geeigneten Probengefäßen

- Lagerung bei 20-25°C: max. 3 Tage
- Lagerung bei -20°C: mind. 2 Jahre
- Frier-/Tau-Zyklen: max. 10

Die Lagerung von Proben über einen Zeitraum von 2 Jahren bei -20°C zeigte keinen Einfluss auf den Messwert. Einfrieren und Auftauen der Proben sollte minimiert werden. 10 Frier-/Tau-Zyklen zeigten keinen Einfluss auf Proben.
IGFBP-3 Konzentrationen bleiben in unverdünnten Proben selbst bei erhöhter Temperatur normaler und diverser klinischer Situationen stabil. Verdünnt hingegen ist die Stabilität der Proben stark herabgesetzt (nötige Vorsichtsmaßnahmen siehe Kapitel Probenverdünnung).

5.5 Interferenz

Wenn die Proben wie empfohlen verdünnt werden, haben weder Triglyceride noch Bilirubin, Hämoglobin oder Biotin bis zu Konzentrationen von 100 g/L, 200 mg /L, 5 g/L bzw. 3 µg/mL einen signifikanten Einfluss auf die Messung von IGFBP-3 in menschlichem Serum.

5.6 Probenverdünnung

- Empfohlene Verdünnung: **1:301** mit Verdünnungspuffer **1xDB**
  Beispiel: **10 µL Probe** werden zu **3 mL** Verdünnungspuffer **1xDB** gegeben (Verdünnung 1 zu 301) und sofort gut gemischt.

- **WICHTIG**: Da IGFBP-3 in verdünnten Lösungen relativ instabil ist, bitte nur **gekühlten, möglichst eiskalten** Verdünnungspuffer **1xDB** verwenden. Die Probe nach Zugabe in den Verdünnungspuffer **1xDB** sofort gut mischen. Die Zeit zwischen Probenverdünnung und Inkubation des Assays bitte möglichst kurz halten, d.h. verdünnte Proben schnellstens weiter bearbeiten.
- Die Verdünnungen der Kontrollen **M** und **N** sollten in gleicher Weise wie die der Proben erfolgen.

Exemplary Version, not use for assay accomplishment. Exemplarische Version, bitte nicht für Assay Durchführung benutzen.

6 MATERIALIEN

6.1 Inhalt der Testpackung

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

2xDB	**Verdünnungspuffer**, 2fach Konzentrat blau gefärbt	**1 x 125 mL**
R	**Fang-Antikörper**, anti-Kaninchen IgG, Biotin-konjugiert, lyophilisiert	**1 x 5,5 mL**
S	**Spezifischer Antikörper,** Kaninchen-anti-hIGFBP-3, lyophilisiert, blau gefärbt	**1 x 5,5 mL**
C	**Tracer: ^{125}I-IGFBP-3,** lyophilisiert, **< 1,5 µCi oder < 55 kBq,** rot gefärbt	**1 x 11 mL**
F - J	**Kalibratoren,** lyophilisiert (natives humanes IGFBP-3), Konzentrationen auf den Etiketten in ng/mL	**5 x 500 µL**
M	**Hohe Kontrolle,** lyophilisiert, (humanes Serum): Konzentration siehe Zertifikat.	**1 x 100 µL**
N	**Niedrige Kontrolle,** lyophilisiert, (humanes Serum): Konzentration siehe Zertifikat.	**1 x 100 µL**
T	**Röhrchen,** beschichtet mit Streptavidin	**100 Röhrchen**
	Packungsbeilage	**1 x**
	Qualitätszertifikat	**1 x**

6.2 Nicht mitgelieferte, benötigte Materialien

- Kaltes entmineralisiertes Wasser oder destilliertes Wasser (Aqua destillata) 125 mL **(A. dest.)**
- Graduierter Messzylinder,
  Pipetten: 10 mL, 500 µL, 100 µL und 10 µL
  50 µL-, 100 µL-, und 500 µL- Multistepp-Pipetten
- Vortex-Mixer
- Schüttler empfohlen
- Absaugeinrichtung empfohlen
- Gammazähler

Exemplary Version, don't use for assay accomplishment. Exemplarische Version, bitte nicht für Assay Durchführung benutzen.

7 TECHNISCHE HINWEISE

7.1 Lagerbedingungen

Nach Erhalt sollte der **Test-Kit** bei **2-8°C** (**rekonstitutierte Reagenzien bei -20°C**) bis zum Verfallsdatum gelagert werden. Wiederholtes Einfrieren und Auftauen ist zu vermeiden.

Die Haltbarkeit der geöffneten Reagenzien entspricht der Tracer **C** Haltbarkeit.

7.2 Vorbereitung der Reagenzien

Es sollte sichergestellt sein, dass die lyophilisierten Materialien vollständig rekonstituiert werden. Hierfür empfiehlt es sich, die Fläschchen mit Lyophilisaten vor dem ersten Öffnen senkrecht gehalten einmal auf eine feste Unterlage aufzustoßen, damit sich die Lyophilisate in unteren Bereich der Fläschchen sammeln. Nach Zugabe des Verdünnungspuffers 1XDB sollten sie eine halbe Stunde bei **20-25°C** stehen und anschließend kräftig mit einem Vortex-Mixer durchmischt werden. Dies gilt vor allem für die Kontrollen **M** und **N!**

Eventuell sichtbare Rückstände auf den beschichteten Röhrchen **T** sind produktionsbedingt unvermeidbar – die Funktion ist nicht beeinträchtigt.

2xDB	**125 mL** auf **250 mL** mit gekühltem A. dest. auffüllen (→Verdünnungspuffer **1xDB**)
C	In **11 mL** Verdünnungspuffer **1xDB** rekonstituieren.
R	In **5.5 mL** Verdünnungspuffer **1xDB** rekonstituieren.
S	In **5.5 mL** Verdünnungspuffer **1xDB** rekonstituieren.
F - J	Jedes Röhrchen in **500 µL** Verdünnungspuffer **1xDB** rekonstituieren.
M und **N**	Jedes Röhrchen in **100 µL** Verdünnungspuffer **1xDB** rekonstituieren. Sicherstellen, dass lyophilisiertes Material vollständig rekonstituiert ist. Verdünnung entsprechend der Probenverdünnung (**z. B. 1:301**)

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

Exemplary Version, don´t use for assay accomplishment. Exemplarische Version, bitte nicht für Assay Durchführung benutzen.

8 TESTDURCHFÜHRUNG

Vorbereitung der Reagenzien:		Rekonstitution:	Verdünnung:
2xDB	**Verdünnungspuffer 2x Konzentrat**	-	Vor Verwendung **1:2 mit** gekühltem **A. dest.** → Verdünnungspuffer **1xDB**
C	**Tracer**	in **11 mL** Verdünnungspuffer **1xDB**	–
R	**Fang-**	in **5,5 mL** Verdünnungspuffer **1xDB**	–
S	**Spezifischer**	in **5,5 mL** Verdünnungspuffer **1xDB**	–
F-J	**Kalibratoren**	in je **500 µL** Verdünnungspuffer **1xDB**	–
M+N	**Kontrollen**	in je **100 µL** Verdünnungspuffer **1xDB**	**1:301** mit kaltem Verdünnungspuffer **1xDB**
Die rekonstituierten Reagenzien sollten ca. 30 min bei **20-25°C** stehen und anschließend kräftig mit einem Vortex-Mixer durch-mischt werden. Dies gilt vor allem für die Kontrollen **M** und **N!**			–
Probe mit kaltem Verdünnungspuffer **1xDB** z. B. **1:301** verdünnen, **sofort mischen** + schnell verarbeiten.			

Testdurchführung in Doppelbestimmung

Nr. der Röhrchen	Inhalt der Röhrchen	1xDB, F-J M, N Proben	R (Fang Antikörper)	S (Spezifischer Antikörper)	C (Tracer)
1 / 2	Gesamtaktivität **TC**	–	–	–	100 µL
3 / 4	Verdünnungspuffer **1xDB** = Unspezifische Bindung **NSB**	150 µL **1xDB**	50 µL	–	100 µL
5 / 6	Verdünnungspuffer **1xDB** = Nullkalibrator **B0**	100 µL **1xDB**	50 µL	50 µL	100 µL
7 - 16	Kalibratoren	100 µL **F-J**	50 µL	50 µL	100 µL
17 / 18	Verdünnte hohe Kontrolle	100 µL **M**	50 µL	50 µL	100 µL
19 / 20	Verdünnte niedrige Kontrolle	100 µL **N**	50 µL	50 µL	100 µL
21 / 22	Verdünnte Probe 1	100 µL	50 µL	50 µL	100 µL
23 / 24	Verdünnte Probe 2	100 µL	50 µL	50 µL	100 µL
etc.					
Farbe nach Zugabe		**Färbung hellblau**	**Färbung hellblau**	**Färbung bläulicher**	**Färbung violett**
Nr.: 1, 2 bis zum Zählen der Aktivität beiseite stellen					
Inkubation, Übernacht bei 20-25°C, mindestens 15 Stunden, unter Schütteln 350 upm ***Alternative ohne Schüttler: die Proben müssen mit dem Vortexer gut gemischt werden. Dann kann ebenfalls über Nacht bei Raumtemperatur (mit geringerer Bindung) oder für 2 Tage (bzw. über das Wochenende) bei 2-8°C inkubiert werden.***					
Flüssigkeit vollständig dekantieren oder absaugen, dabei die Beschichtung der Röhrchen nicht beschädigen.					
Waschen durch Zugabe von je **500 µL** Verdünnungspuffer **1xDB**					
Flüssigkeit vollständig dekantieren oder absaugen (s.o.)					
Aktivität aller Röhrchen mit einem Gammacounter **zählen**.					

Exemplarische Version nicht für Assay Durchführung benutzen.
don't use for assay accomplishment. Exemplarische Version

9 QUALITÄTSKONTROLLE

GLP erfordert, dass mit jeder Kalibrationskurve Kontrollen mitgeführt werden. Um eine ordnungsgemäße Durchführung zu gewährleisten, sollte eine statistisch signifikante Anzahl der Kontrollen untersucht werden, um Mittelwerte und akzeptable Bereiche zu ermitteln.
Alle Kit-Kontrollen müssen innerhalb der zulässigen Bereiche, die auf dem QC-Zertifikat angegeben sind, gefunden werden. Wenn die Kriterien nicht erfüllt sind, ist der Test ungültig und sollte wiederholt werden.

10 AUSWERTUNG

10.1 Erstellung der Kalibrationskurve

Die bereitgestellten Kalibratoren enthalten folgende IGFBP-3-Konzentrationen:

Kalibrator	F	G	H	I	J
ng/mL	1	3	9	27	81

1) Ermittlung des Aktivitäts-Mittelwertes (MW) der Doppelbestimmungen (entspricht der Bindung B).

2) Ermittlung des Aktivitäts-Mittelwertes (MW) der Röhrchen 3 und 4 (unspezifische Bindung NSB). Dieser Wert wird von den Mittelwerten der übrigen Bestimmungen abgezogen (entspricht den korrigierten B-Werten).

3) Der so korrigierte Mittelwert des Nullkalibrators (Röhrchen 5 und 6) ergibt B0.

4) Berechnung der relativen Bindung durch Division der korrigierten B-Werte durch B0: %B/B0 = B/B0 x 100 %.

5) Auftragen von %B/B0 gegen die Konzentrationen der Kalibratoren in halb-logarithmischem oder logit-log Maßstab auf Papier oder Auswertung per Computerprogram.

10.2 Qualitätskriterien

Unspezifische Bindung:	**Spezifische** Bindung:
Qualitätskriterium: **%NSB/TC < 5 %**	Qualitätskriterium: **%B0/TC > 15 %**
Beispiel-Berechnung mit den unteren exemplarischen Daten:	
NSB / TC x 100 %	(B0 - NSB) / TC x 100 %
243,5 cpm / 19563,3 cpm x 100 % = 1,2 % NSB/TC < 5 %	(7792,5 cpm – 243,5 cpm) / 19563,3 cpm x 100 % = 38,6 % B0/TC > 15 %

Exemplary Version, do not use for assay. Exemplarische Version, bitte nicht für Assay Durchführung benutzen.

10.3 Typische Ergebnisse

Die exemplarischen Daten und die Kalibrationskurve in der Abb. 4 können **nicht** für die Berechnung der Testergebnisse genutzt werden!
Für jeden Test muss eine eigene Kalibrationskurve mitgeführt werden.

Beispiel	TC	NSB	B0	F	G	H	I	J
cpm	19563,3	243,5	7792,5	6992,5	5630,4	3696,5	1963,2	1084,6
%B/B0	-	-	-	89,40	71,36	45,74	22,78	11,14
ng/mL	-	-	-	1	3	9	27	81

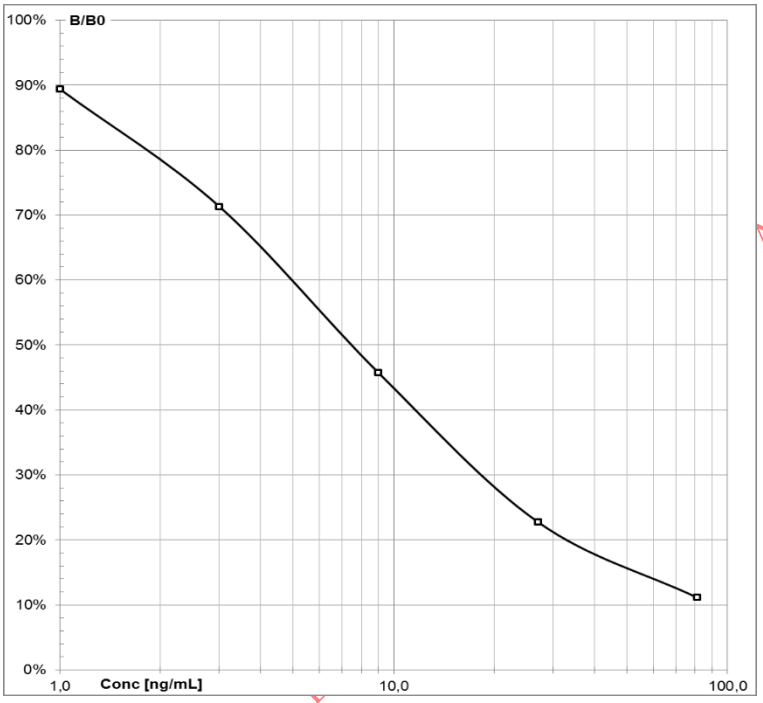

Abb. 4: Exemplarische Kalibrationskurve

10.4 Bestimmung der Probenkonzentration

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

mittlere cpm der **NSB**-Röhrchen: **243,5 cpm**
mittlere cpm des Nullkalibrators **B0:** **7792,5 cpm**
mittlere cpm der **Probe**: **3542,6 cpm**
%B/B0 = (Proben cpm - NSB) / (B0 - NSB) x 100
= (3542,6 - 243,5) / (7792,5 – 243,5) x 100 %
= 0,4370 x 100 %
= 43,70 %

Für einen 43,70 %-Wert auf der y-Achse (Ordinate) ergibt sich 9,699 ng/mL auf der x-Achse (Abszisse). Dieser Konzentrationswert, der graphisch oder mit Hilfe eines Computerprogramms ermittelt wurde, wird mit dem Verdünnungsfaktor (z. B. 301) multipliziert.

Beispiel: 9,699 ng/mL x 301 = 2919 ng/mL bzw. 2,92 mg/L

Assay Durchführung benutzen.
Exemplary Values, don't use for assay accomplishment.

11 EINSCHRÄNKUNGEN

Die diagnostische Sensitivität und Spezifität bei der Anwendung der 5. Perzentile als Grenzwert liegen bei 97 bzw. 94 % (9, Seite 156). Die entsprechenden Vorgaben der nationalen Leitlinien zur Diagnostik des Wachstumshormonmangels müssen berücksichtigt werden (Bspw. 20, S2e-Leitlinie 174/002 oder AHRQ Evaluation and treatment of adult growth hormone deficiency, NGC 008703).

IGFBP-3-Spiegel hängen in erster Linie von der Wachstumshormonsekretion ab. Aber auch eine Reihe anderer Faktoren, wie Erkrankungen und Normvarianten des Wachstums können mit einer Verminderung der Konzentrationen von IGF-I und/oder IGFBP-3 einhergehen. Hierzu gehören u. a. die Hypothyreose, ein Mangel an Sexualhormonen bei Hypogonadismus, die konstitutionelle Verzögerung von Wachstum und Pubertät, eine akute oder chronische Mangelernährung, chronische organische Erkrankungen, schwere Leberfunktionsstörungen, eine Adipositas, ein schlecht eingestellter Diabetes mellitus sowie eine sekundäre Wachstumshormon-Resistenz im Rahmen anderer Erkrankungen (9). IGFBP-3 Spiegel können ebenso 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 auf das IGFBP-3-Muster im Westernblot auswirken und im RIA mit seinem spezifischen polyklonalen Antiserum zu einem erhöhten Ergebnis führen können.

Exemplary Version, don´t use for assay accomplishment. Exemplarische Version, bitte nicht für Assay Durchführung benutzen.

12 REFERENZWERTE

Die IGFBP-3-Spiegel sind bei Kindern stark altersabhängig. Bei Erwachsenen ist dieses Phänomen weniger ausgeprägt. Die Referenzbereiche der verschiedenen Altersgruppen, die log-normal verteilt sind, sind in Tab. 1 durch Perzentilen angegeben und in Abb. 5 und 6 sind diese Werte graphisch dargestellt als 0,1., 5., 50. und 95. Perzentile.
Jedem Labor wird empfohlen, eigene Referenzbereiche für die entsprechende Population zu erstellen.

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

		Perzentilen													
Altersgruppe		**0.1**	1	**5**	10	**20**	30	**40**	50	**60**	70	**80**	90	**95**	99
0-1 Woche		**0.25**	0.33	**0.42**	0.48	**0.57**	0.64	**0.70**	0.77	**0.85**	0.93	**1.05**	1.23	**1.41**	1.81
1-4 Woche		**0.49**	0.62	**0.77**	0.86	**0.99**	1.10	**1.19**	1.29	**1.40**	1.52	**1.68**	1.93	**2.16**	2.68
1-3 Monate		**0.55**	0.70	**0.87**	0.98	**1.13**	1.25	**1.36**	1.48	**1.61**	1.75	**1.94**	2.23	**2.52**	3.14
3-6 Monate		**0.64**	0.80	**0.98**	1.10	**1.25**	1.38	**1.49**	1.61	**1.74**	1.88	**2.07**	2.37	**2.65**	3.24
6-12 Monate		**0.71**	0.88	**1.07**	1.19	**1.35**	1.48	**1.60**	1.72	**1.85**	2.00	**2.19**	2.49	**2.76**	3.36
1-3 Jahre		**1.02**	1.21	**1.41**	1.53	**1.69**	1.82	**1.94**	2.05	**2.17**	2.31	**2.48**	2.74	**2.98**	3.47
3-5 Jahre		**1.08**	1.30	**1.52**	1.66	**1.84**	1.99	**2.12**	2.25	**2.39**	2.55	**2.75**	3.05	**3.33**	3.91
5-7 Jahre		**1.19**	1.42	**1.66**	1.81	**2.01**	2.16	**2.30**	2.44	**2.59**	2.76	**2.97**	3.29	**3.59**	4.2
7-9 J.	Jungen	**1.25**	1.48	**1.73**	1.88	**2.07**	2.22	**2.36**	2.50	**2.65**	2.81	**3.02**	3.33	**3.61**	4.22
	Mädchen	**1.36**	1.61	**1.88**	2.04	**2.25**	2.42	**2.57**	2.72	**2.88**	3.06	**3.28**	3.62	**3.94**	4.58
9-11 J.	Jungen	**1.47**	1.73	**1.99**	2.15	**2.36**	2.52	**2.66**	2.81	**2.96**	3.14	**3.35**	3.67	**3.97**	4.57
	Mädchen	**1.56**	1.90	**2.20**	2.38	**2.62**	2.80	**2.96**	3.13	**3.30**	3.50	**3.75**	4.11	**4.45**	5.16
11-13 J.	Jungen	**1.58**	1.88	**2.19**	2.38	**2.63**	2.82	**3.00**	3.18	**3.37**	3.58	**3.84**	4.25	**4.62**	5.39
	Mädchen	**1.62**	1.90	**2.24**	2.46	**2.74**	2.97	**3.17**	3.38	**3.60**	3.85	**4.17**	4.65	**5.10**	6.02
13-15 J.	Jungen	**1.62**	1.89	**2.24**	2.46	**2.76**	2.99	**3.20**	3.42	**3.65**	3.91	**4.24**	4.75	**5.22**	6.20
	Mädchen	**1.69**	2.03	**2.39**	2.61	**2.91**	3.14	**3.35**	3.56	**3.79**	4.04	**4.36**	4.85	**5.30**	6.24
15-17 J.	Jungen	**1.70**	2.02	**2.36**	2.57	**2.84**	3.05	**3.25**	3.44	**3.65**	3.88	**4.17**	4.61	**5.01**	5.86
	Mädchen	**1.62**	1.93	**2.26**	2.46	**2.73**	2.93	**3.12**	3.31	**3.51**	3.74	**4.02**	4.45	**4.85**	5.67
17-20 J.		**1.58**	1.90	**2.24**	2.45	**2.72**	2.94	**3.13**	3.33	**3.54**	3.78	**4.07**	4.53	**4.95**	5.83
20-30 J.		**1.55**	1.86	**2.20**	2.41	**2.68**	2.90	**3.09**	3.29	**3.50**	3.74	**4.04**	4.50	**4.92**	5.80
30-40 J.		**1.44**	1.75	**2.08**	2.29	**2.56**	2.78	**2.98**	3.18	**3.39**	3.64	**3.95**	4.42	**4.86**	5.78
40-50 J.		**1.38**	1.68	**2.01**	2.21	**2.48**	2.69	**2.88**	3.08	**3.29**	3.53	**3.83**	4.29	**4.72**	5.63
50-60 J.		**1.34**	1.64	**1.96**	2.16	**2.42**	2.63	**2.83**	3.02	**3.23**	3.46	**3.76**	4.22	**4.65**	5.55
60-70 J.		**1.28**	1.58	**1.90**	2.10	**2.37**	2.58	**2.78**	2.98	**3.19**	3.44	**3.75**	4.23	**4.67**	5.62
70-80 J		**1.20**	1.50	**1.81**	2.00	**2.27**	2.47	**2.67**	2.87	**3.08**	3.32	**3.62**	4.09	**4.52**	5.50
> 80 J		**1.13**	1.43	**1.73**	1.92	**2.19**	2.39	**2.59**	2.79	**3.00**	3.23	**3.54**	4.00	**4.44**	5.45

Die Serumkonzentrationen sind in mg/L angegeben

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

Assay accompaniment. Exemplarische Version. Bitte nicht für Assay-Durchführung benutzen.

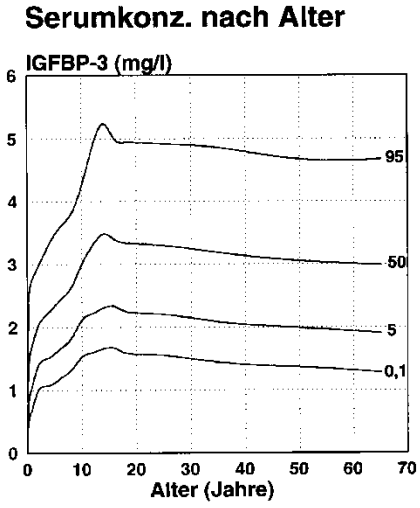

Abb. 5: Altersabhängiger Normalbereich der IGFBP-3-Spiegel (dargestellt als 0,1., 5., 50. und 95. Perzentile)

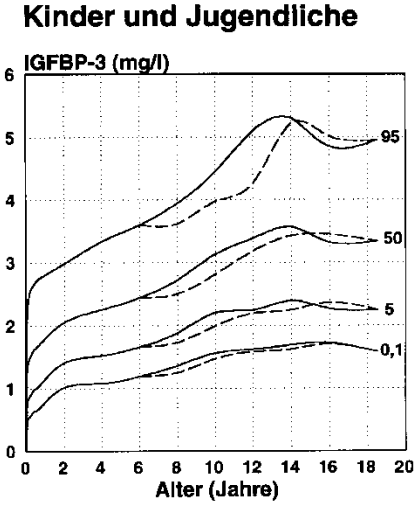

Abb. 6: Normalbereich bei Kindern und Jugendlichen (Mädchen ——, Jungen -------)

Exempl

13 ASSAY EIGENSCHAFTEN UND VALIDIERUNG

13.1 Sensitivität

Die Sensitivität wurde durch 16-fache Messung der B0 in einem Test bestimmt, daraus wurde die 2-fache Standardabweichung berechnet und vom B0-Mittelwert abgezogen. Die Konzentration des resultierenden %B/B0 wurde rekalkuliert und ergab eine analytische Sensitivität von < 0,8 µg/L.

13.2 Spezifität

Die Spezifität des Testsystems wurde durch Untersuchung des Einflusses von homologen Proteinen untersucht, anderen IGFBPs. Es wurde nachgewiesen, dass keines der getesteten IGFBPs signifikant mit den verwendeten Antikörpern interferiert, siehe Tabelle 2.

Tabelle 2 Spezifität. Die Kreuzreaktivität mit homologen IGFBPs. Rekombinante IGFBPs wurden in Verdünnungspuffer zugesetzt und die Signalintensität im Mediagnost IGFBP-3 RIA-CT, R11 gemessen.

	rekombinante IGFBP [ng/mL]	IGFBP-3 [ng/mL] gemessen	Kreuzreaktivität [%]
IGFBP-1	1000	1,128	0,11
IGFBP-2	1000	0	0
IGFBP-4	1000	0	0
IGFBP-5	330	0,88	0,27
IGFBP-6	1000	0,022	0,00

13.3 Präzision

Intra-Assay-Varianz

Vier Proben wurden fünf Mal im gleichen Assay gemessen. Der Variationskoeffizient (VK) beträgt immer deutlich < 10 % (Bereich hier: 1,49 – 4,36%), siehe Tabelle 3.

Tabelle 3 Intra-Assay Variation

	IGFBP-3 [ng/mL]					Mittelwert [ng/mL]	Standard-abweichung [ng/mL]	VK [%]	Anzahl [n]
Probe 1	3921	3988	3921	3855	3844	3906	58,35	1,49	5
Probe 2	1307	1250	1198	1268	1285	1262	41,32	3,28	5
Probe 3	2993	2837	2965	2693	2965	2891	125,97	4,36	5
Probe 4	4541	4515	4255	4292	4342	4389	130,91	2,98	5

Inter-Assay-Varianz

Sechs Serum Proben wurden in unabhängigen Tests mit verschiedenen Kit-Lots im Zeitraum von drei Jahren gemessen. Der Variationskoeffizient betrug immer < 10 % (Bereich hier: 4,59 – 6,66%). Die beispielhaften Ergebnisse sind in der Tabelle 4 dargestellt.

Tabelle 4 Inter-Assay Variation. Sechs Proben wurden wiederholt in mehreren Kit-Lots während den letzten drei Jahren gemessen.

		Probe 1	Probe 2	Probe 3	Probe 4	Probe 5	Probe 6
Mittelwert	[ng/mL]	1690,83	1628,50	3350,48	3512,23	3097,57	3071,89
Standard-abweichung	[ng/mL]	111,72	108,40	185,04	161,37	147,82	151,90
VK	[%]	6,61	6,66	5,52	4,59	4,77	4,94
Anzahl	[n]	68	70	47	35	23	22

Exemplarische Version, bitte nicht für Assay Durchführung benutzen.

13.4 Linearität

Die Linearität des R11 wurde mit Verdünnungsreihen von verschiedenen Serumproben und Messung der IGFBP-3-Konzentration getestet. Ergebnisse siehe Abbildung 8.
Proben können in einem breiten Verdünnungsbereich entsprechend den Anforderungen der experimentellen Einstellung eingesetzt werden.
Wir empfehlen eine Verdünnung von 1:301 (0,00332).

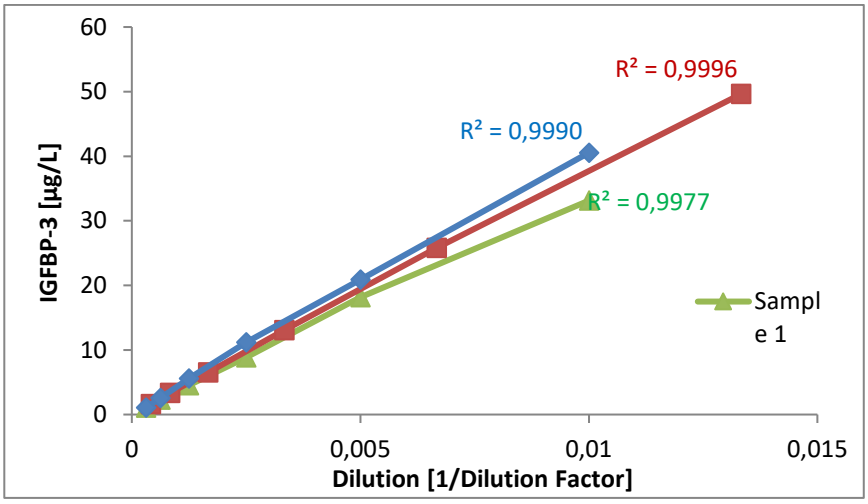

Abb. 8 Linearität der Probenverdünnung. Drei Proben mit unterschiedlichen Konzentrationen an IGFBP-3 wurden verdünnt und die IGFBP-3 Konzentrationen in den jeweiligen Verdünnungen bestimmt.

13.5 Interferenz

Die Beurteilung des Einflusses von hämolytischen, ikterischen und lipämischen Proben erfolgte durch ein künstliches System. Exemplarisch wurden fünf humane Serumproben mit Triglyceriden (bis zu 100 g/L), Bilirubin (bis zu 200 mg/L) und Hämoglobin (bis zu 5 g/L) angereichert und IGFBP-3 in den angereicherten und nicht angereicherten Proben gemessen. Die Untersuchung der Biotin-Interferenz wurde mit drei Serumproben durchgeführt, die mit unterschiedlichen Konzentrationen von Biotin bis zu 3000 ng/ml angereichert wurden. Es wurde kein signifikanter Einfluss dieser potenziell störenden Substanzen festgestellt (Tabelle 5). Dies kann jedoch von der individuellen Probe abhängen, weshalb hämolytische, ikterische und lipämische Proben vermieden werden sollten.

Tabelle 5 IGFBP-3-Messungen in künstlich angereicherten Proben. Dargestellt ist die relative Wiederfindung von IGFBP-3 im Vergleich zur nicht angereicherten Probe.

	Triglyceride 100 mg/mL	Bilirubin 200 µg/mL	Hämoglobin 1 mg/mL	Hämoglobin 5 mg/mL	Biotin 3000 ng/mL
Serum 1	104	90	83	-	111
Serum 2	97	88	108	-	111
Serum 3	79	89	129	105	103
Serum 4	93	97	137	109	-
Serum 5	-	100	128	103	-

13.6 Richtigkeit / Assay Kalibrierung

Als der Assay entwickelt und charakterisiert wurde, stand kein internationales Kalibratormaterial zur Verfügung. So wurde das Serum gesunder Blutspender gepoolt und die IGFBP-3-Konzentration gemessen. Diese ursprüngliche Kalibrierung wurde für die Evaluation von Referenzwerten verwendet (Blum et al. 1990).
Aufgrund der Instabilität des Analyten und der unterschiedlichen Glykosylierung ist bis heute (2016) kein gültiges Referenzmaterial für immunologische Assays verfügbar.

Exemplarische Version, bitte nicht für Assay Durchführung benutzen.
for assay accomplishment. Exemplary Version, do

Die Mittel, um die Richtigkeit und Spezifität des Mediagnost IGFBP-3 RIA-CT, R11 zu überprüfen sind direkte Vergleiche mit anderen Testsystemen sowie Ergebnisse externer Qualitätsbewertungsprogramme. Beide Ansätze wurden und werden verwendet, um die Validität des Mediagnost IGFBP-3 RIA-CT nachzuweisen.

13.7 Externe Qualitätsbewertung

Mediagnost und einige Mediagnost-Kunden nehmen an der EQA (External Quality Control) des Referenzinstituts für Bioanalytik teil. In Abbildung 9 sind die Ergebnisse der Ringversuche von 2010 bis 2016 dargestellt. Die mittleren Abweichungen der methodenspezifischen Zielwerte betragen 3,25 % / 4,88 % und der methodenunabhängigen Gesamtmittelwerte -10,39 % / -6,90 % für die Proben A und B.

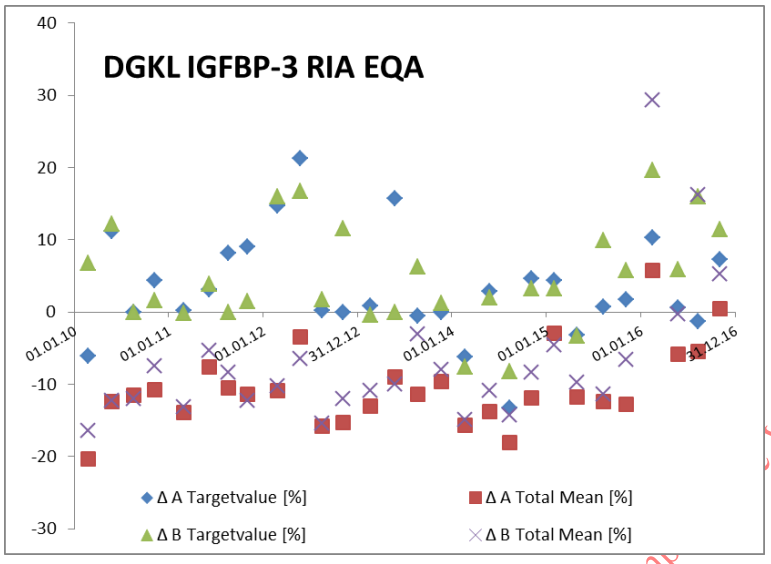

Abb. 9 EQA-Ergebnisse. In jedem Quartal des Jahres wird IGFBP-3 in zwei Proben gemessen, die von einer unabhängigen Institution zur Verfügung gestellt werden, die auch die Testergebnisse analysiert. Hier werden die relativen Abweichungen der methodenspezifischen Zielwerte (Targetvalue) und der methodenunabhängigen Gesamtmittelwerte (Total Mean) in % für die Proben A bzw. B angegeben.

14 ASSAY VERGLEICH

Der Mediagnost R11 wurde mit den Immunoassays zweier Wettbewerber und mit einem hauseigenen Testsystem einer Universitätsklinik verglichen.

Der Vergleich der R11 Messwerte mit den Werten der anderen Teste mittels linearer Regression ergab folgende Regressionsgleichungen:

$y = 1{,}0851x - 0{,}5397;\ R^2 = 0{,}9662;\ n = 87$
$y = 1{,}1931x + 0{,}0156;\ R^2 = 0{,}9275;\ n = 57$
$y = 0{,}8615x + 282{,}17;\ R^2 = 0{,}7151;\ n = 59$

Die Daten zeigen, dass der Mediagnost IGFBP-3 RIA-CT, R11 gut mit anderen IGFBP-3 Tests korreliert.

Exemplary Version, do not use for assay accomplishment
Version, bitte nicht für Assay Durchführung benutzen.

Gebrauchsinformation für wissenschaftliche Anwendungen

15 WISSENSCHAFTLICHE ANWENDUNGEN

15.1 Proben

Für wissenschaftliche Anwendungen sind folgende Proben geeignet:
Serum, Plasma, Muttermilch, Follikelflüssigkeit, Seminalplasma, Urin und Zerebrospinal Flüssigkeit.

Serum und Plasmaproben sollten entsprechend der zu erwartenden Werte mit Verdünnungspuffer **1xDB** 1:100 bis 1:400 verdünnt werden. Normalerweise ist eine **Verdünnung von 1:301** ausreichend.

Wichtig: Bitte nur gekühlten, möglichst eiskalten Verdünnungspuffer 1xDB verwenden. Die Proben nach Zugabe in Verdünnungspuffer **1xDB sofort gut mischen**. Verdünnte Proben sollten so schnell, wie möglich weiter verwendet werden.

In den anderen oben gelisteten humanen Flüssigkeiten können die IGFBP-3-Werte stark variieren, die optimale Verdünnung muss vom Kunden herausgefunden werden.

15.2 Alternatives Pipettieren der Antikörper-Reagenzien R und S

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

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

15.3 Kreuzreaktivität mit tierischen Proben

Die Kreuzreaktivitäten von mehreren handelsüblichen tierischen Seren wurden in diesem Assay getestet.

In den Seren der folgenden Arten wurde **KEIN SIGNAL** detektiert:

Ratte, Maus, Meerschweinchen, Kaninchen, Schwein, Schaf, Ziege, Rind, Pferd, Esel, Hund, Katze und Huhn.

Exemplary Version, don´t use for assay accomplishment. Exemplarische Version, bitte nicht für Assay Durchführung benutzen.

ENGLISH - Instructions for use

TABLE OF CONTENTS

ENGLISH - Instructions for use 23
1 INTENDED USE 23
2 INTRODUCTION 23
3 ASSAY PRINCIPLE 26
4 WARNINGS AND PRECAUTIONS 27
5 SAMPLES 28
6 MATERIALS 29
7 TECHNICAL NOTES 30
8 ASSAY PROCEDURE 31
9 QUALITY CONTROL 32
10 EVALUATION OF RESULTS 32
11 LIMITATIONS OF PROCEDURE 34
12 REFERENCE VALUES 35
13 PERFORMANCE CHARACTERISTICS 36
14 ASSAY COMPARISON 38
15 SCIENTIFIC APPLICATION 39
16 LITERATUR / REFERENCES 41
17 INTERNATIONAL ASSAY DESCRIPTION 42
18 ASSAY PROCEDURE 44

Exemplary Version, don´t use for assay accomplishment. Exemplarische Version, bitte nicht für Assay Durchführung benutzen.

ENGLISH - Instructions for use

IGFBP-3 RIA CT, R11	100 Determinations with coated tubes
CE	DE/CA40/00809/34
Principle of the test	Radioimmunoassay
Duration (incubation period)	overnight (≥ 15h)
Tracer	iodinated native human IGFBP-3, < 55 kBq
Antibodies	specific, high-affinity polyclonal antiserum
Cross reactivity with IGFBP-1,-2,-4,-5,-6	< 0.3%
Buffer	2fold concentrate
Calibrator	5 single Calibrators: 1 – 81 µg/L, native human Serum
Assay Range	0.8 – 24000 µg/L
Control	2 controls, freeze-dried – RilibäK conform
Sample	human serum / plasma
Required sample volume	10 µL
Sample dilution	1:301
Analytical sensitivity	< 0.8 µg/L
Intra- and Interassay Variance	< 10%
Half Maximal displacement	< 12 µg/L
Reference values	Blum W.F., Schweizer R. Insulin-Like Growth Factors and Their Binding Proteins. In: Ranke MB (ed.): Diagnostics of Endocrine Function in Children and Adolescents. Basel, Karger, 2003, pp.166-199.

1 INTENDED USE

The radioimmunoassay R11 is intended to be used for the quantitative measurement of IGFBP-3 in human serum and plasma specimens.

In combination with growth retardation and other clinical symptoms the results of this test system can be used as supplementary data to assess disturbances of the growth hormone axis.

2 INTRODUCTION

Insulin-like growth factors IGF-I and IGF-II are bound to specific binding proteins (IGFBPs) in the circulation. Until now at least seven binding proteins have been identified and classified as IGFBP-1 to IGFBP-7 (1, 2). These binding proteins are expressed by different kinds of tissues and show specific posttranslational modifications like glycosylation or phosphorylation. Their main function is – together with specific proteases - the regulation of the IGF bioavailability.

The most frequent IGFBP in blood is IGFBP-3. Most IGFBP-3 in the circulation is bound in a ternary complex formed by IGF-I or IGF-II, IGFBP-3 and the so called acid-labile subunit ALS (3-5). Most of the IGFBP-3 in blood 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 radioimmunoassays for IGFBP-3, able to detect IGFBP-3 within the ternary complex, provided new in-sights into its regulation (6-9). Based on these findings serum IGFBP-3 has proved to be an additional useful test in the repertoire of diagnostic tools for evaluation of growth disorders (7, 8).

In addition to the pituitary Growth Hormone (GH) also known as Somatropin, several other factors influence IGFBP-3 levels: age including sexual development, nutrition, hypothyroidism, diabetes mellitus, liver function and kidney function. IGFBP-3 levels are decreased by

Exemplary Version, not for assay accomplishment. Exemplarische Version, bitte nicht für Assay Durchführung benutzen.

malnutrition, although less than IGF-I, in hypothyroidism, in diabetes mellitus and in hepatic failure (6-8), but are increased in chronic renal failure (6, 10, 11).

Measurements over 24 hours revealed constant circadian levels (12, 13). For clinical practice, the most important regulatory factor is GH. Single IGFBP-3 measurements correlate significantly with the logarithm of the integrated spontaneous GH secretion (8, 14). In patients with GH deficiency, IGFBP-3 levels are subnormal and increase gradually to within the reference 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.

IGF-I serum levels have been widely used in screening for GH deficiency or acromegaly. However, several limitations are obvious:

1. The reference range of IGF-I is low in young children making discrimination of subnormal levels difficult at that age.

2. A considerable number of children of small stature have, despite normal GH secretion, IGF-I levels in the subnormal range. Therefore, the specificity and consequently the accuracy of the test for diagnosis of GH deficiency are limited.

The major advantages of IGFBP-3 over IGF-I are:

1. No extraction step is required prior to measurement thus improving test accuracy by simplifying the assay procedure.

2. The reference range in young children is comparatively high making the detection of subnormal levels more reliable.

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

As well 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.

The separation of these two groups is easy. A single measurement of the IGFBP-3 concentration is sufficient for the diagnosis of GH deficiency with high accuracy (7, 18).

In small statured children IGFBP-3 levels rise to reference range within several days of GH administration and remain normal during continuous GH treatment (Fig. 2). Therefore, serum IGFBP-3 measurements are also suited for evaluating the potential of a patient to respond to GH and for GH therapy monitoring (19).

Exemplary assay accomplishment. Exemplarische Version, bitte nicht für Assay Durchführung benutzen.

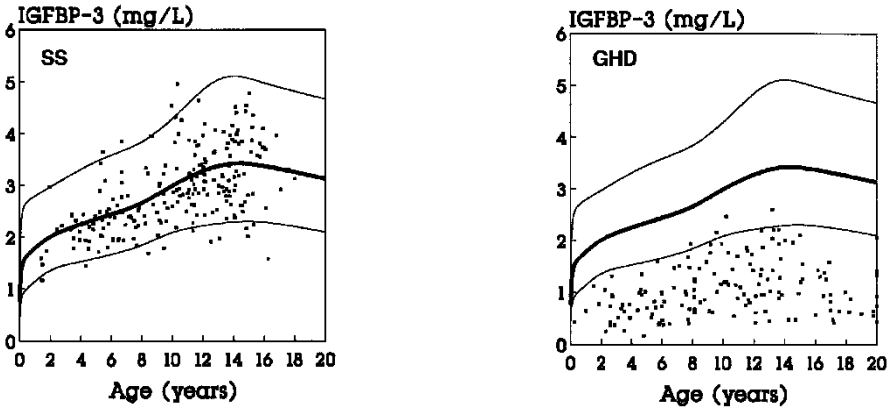

Figure 1 Serum IGFBP-3 levels in patients with short stature without GH deficiency (SS): constitutional delay of growth and adolescence, familial short stature or intra-uterine growth retardation and in idiopathic or organic GH deficiency (GHD). The reference range is given by the 5th, 50th and 95th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

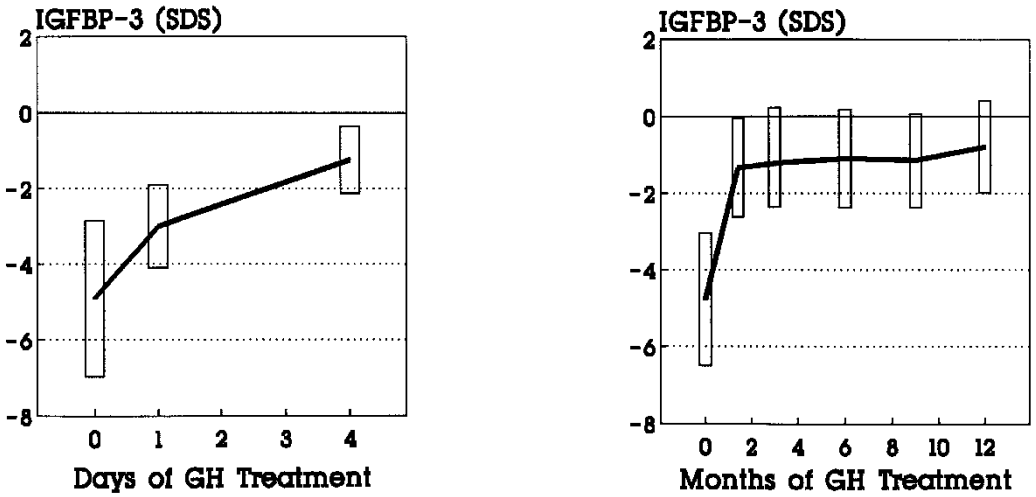

Figure 2 IGFBP-3 levels in GH deficient children before and during GH treatment. Because of the age-dependence, values are given as the mean of standard deviation scores (SDS).

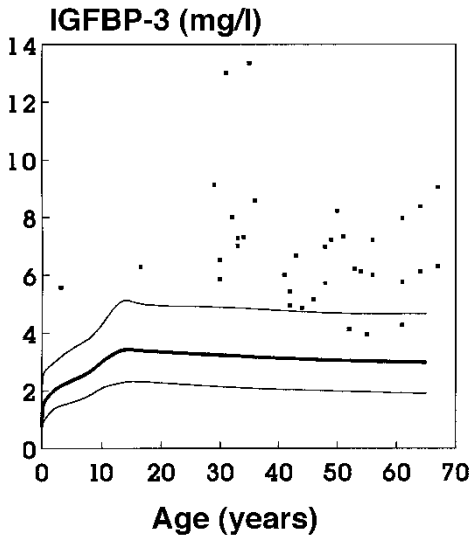

Figure 3 Serum IGFBP-3 levels in acromegaly. The reference range is given by the 5th, 50th and 95th percentile.

In normal tall children and adolescents without excessive GH secretion or in patients with Sotos syndrome, 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, IGFBP-3 is also a useful parameter for the detection of excessive GH secretion and monitoring therapy efficacy (19). In precocious puberty, IGFBP-3 levels are clearly increased by chronological age, whereas patients with premature thelarche have IGFBP-3 levels in the upper reference range (15).

Exemplary version, not to be for assay
n, bitte nicht für Assay
nführung benutzen.

3 ASSAY PRINCIPLE

The Mediagnost R11 is a competitive radioimmunoassay, based on a specific, highly affine, polyclonal antiserum, resulting from an immunization of rabbits with recombinant IGFBP-3 expressed in mammalian cells. The antiserum is able to detect IGFBP-3 quantitative within the ternary complex. The test is competitive which means that the IGFBP-3 in the unknown sample and the calibrators competes with the radioactively labelled (I^{125}) IGFBP-3 of the tracer for binding to the limited antiserum. The assay is incubated in Streptavidin-coated tubes. The capture antibody mediates the binding between the specific antibody and the tubes, making it easy to wash out the unbound tracer after the incubation.

The amount of the bound tracer is determined by measuring the radioactivity, the lower the measured signal, the higher is the IGFBP-3 content in the sample or calibrator. The IGFBP-3 concentrations in the samples are quantified by comparison with a calibrator containing a known amount of native human IGFBP-3.

Clinical Validation

Clinical validation (9) was achieved by determination of 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. 1, Figures 1, 2, 3, 5 and 6).

Exemplary Version, don´t use for assay accomplishment. Exemplarische Version, bitte nicht für Assay Durchführung benutzen.

4 WARNINGS AND PRECAUTIONS

- For In Vitro Diagnostic Use.
- For professional use only.
- Before starting the assay, read the instructions completely and carefully, follow strictly the test protocol. Use the valid version of the package insert provided with the kit. Be sure that everything has been understood.
- The acquisition, possession and use of the kit are subject to the regulations of the national nuclear regulatory authorities.
- Disposal of containers and unused contents should be done in accordance with federal and local regulatory requirements.
- Precipitates in buffers should be dissolved before use by thorough mixing and warming.
- Do not mix reagents of different lots. Do not use expired reagents.
- Reagents contain sodium azide as preservative, however, highly diluted (0.02%).
- Safety Data Sheet available on request.
- Samples (calibrators, controls and patient samples) should be assayed in duplicate. For optimal results, accurate pipetting and adherence to the test-protocol are recommended.
- Do not use obvious damaged or microbial contaminated or spilled material.
- **Caution:** This kit contains material of human and/or animal origin. Source human sera for the preparation of this kit were tested 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 methods can offer total assurance of the absence of infectious agents; therefore all components and patient´s specimens should be treated as potentially infectious.

4.1 Radioactivity

Before ordering or using radioactive materials, it is necessary to take the appropriate actions to ensure compliance with national regulations governing their use. Local rules in each establishment, which define actions and behavior in the radioactivity working areas, should also be adhered to. The advice given here does not replace any local rules, instructions or training in the establishment, or advice from the radiation protection advisers. It is important to follow the code of good laboratory practice in addition to the specific precautions relating to the radionuclide Iodine-125 used.

Iodine-125 has a radioactive half-life T1/2 of 60 days and emits 35.5 keV gamma radiation, 27 – 32 keV x-rays and no beta radiation. Shielding is effective done by lead, first half value layer is 0.07 mm lead, reduction to 10% is made by 0.2 mm. To reduce the radiation dose time spent handling radioactivity should be minimized (plan ahead), and distance from source of radiation should be maximized (doubling the distance from the source quarters the radiation dose).

Formation of aerosols, e.g. by improper opening and mixing of vials or pipetting of solutions which may cause minute droplets of radioactivity become airborne, is a hazard and should be avoided.

Solutions containing Iodine should not be made acidic, because this might lead to the formation of volatile elemental Iodine. As some iodo-compounds can penetrate rubber gloves, it is advisable to wear two pairs of gloves, or polyethylene gloves over rubber.

For cleaning of contaminated areas or equipment, the Iodine-125 should be rendered chemically stable by using alkaline sodium thiosulphate solution together with paper or cellulose tissue.

4.2 General First Aid Procedures:

- *Skin contact:* Wash affected area thoroughly with water at least 15 minutes. Discard contaminated cloths and shoes. See a physician.
- *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. See a physician.
- *Ingestion:* If swallowed, wash out mouth thoroughly with water, provided that the person is conscious. Immediately see a physician.
- The handling of radioactive and potentially infectious material must comply with the following guidelines:
- The material should be stored and used in a special designated area.
- Do not eat, drink or smoke in these areas.
- Never pipette the materials with the mouth.
- Avoid direct contact with these materials by wearing laboratory coats and disposable gloves.
- Spilled material must be wiped off immediately. Clean contaminated areas and equipment with a suitable detergent.
- Unused radioactive material and radioactive waste should be disposed according to the recommendations of the national regulatory authorities.

Exemplary Version, don't use for assay accomplishment. Exemplarische Version, bitte nicht für Assay Durchführung benutzen.

5 SAMPLES

5.1 Sample Type

Serum and Plasma

Serum and Heparin-/EDTA-/Citrate-Plasma yield comparable values.

5.2 Specimen collections

Use standard venipuncture for the blood sampling. Haemolytic reactions and icteric or lipaemic samples are to be avoided.

5.3 Required sample volume

10 µL

5.4 Sample stability

In firmly closable sample vials

- Storage at 20-25°C: max. 3 days
- Storage at -20° C: min. 2 years
- Freeze-/thaw-cycles: max. 10

The storage of samples over a period of 2 years at -20°C showed no significant influence on the reading. Freezing and thawing of samples should be minimized. 10 Freezing-/thawing-cycles showed no significant effect on samples.

IGFBP-3 levels remain stable up to elevated temperatures in normal and in many clinical situations, if undiluted. If diluted, however, stability is extremely decreased (see chapter 5.6 for necessary precautions).

5.5 Interference

If the samples are diluted as recommended, either triglycerides, bilirubin, haemoglobin nor biotin up to concentrations of 100 g/L, 200 mg/L, 5 g/L and 3 µg/mL respectively exert a significant influence on the measurement of IGFBP-3 in human serum.

5.6 Sample dilution

- **Recommended** Dilution: **1:301** with Dilution Buffer **1xDB**
  Example: **10 µL** sample added to **3 mL** Dilution Buffer **1xDB** (301 dilution factor) and mixed immediately.
- **Important:** Because IGFBP-3 is not stable in diluted solutions, please use only **chilled, preferably ice-cold** Dilution Buffer **1xDB**. Mix immediately after addition of the samples into Dilution Buffer **1xDB.** The time interval between the sample dilution and incubation should be as short as possible, i.e. the diluted samples should be processed fast as can.
- Dilution of Controls **M** and **N** according to dilution of samples.

Exemplary Version, don't use for assay accomplishment. Exemplarische Version, bitte nicht für Assay Durchführung benutzen.

6 MATERIALS

6.1 Reagents provided

The reagents and coated tubes listed below are sufficient for 100 determinations including the calibration curve.

2xDB	**Dilution Buffer**, 2-fold concentrated blue coloured	**1 x 125 mL**
R	**Capture Antibody,** anti-rabbit IgG, biotin-conjugated lyophilized	**1 x 5.5 mL**
S	**Specific Antibody,** rabbit-anti-hIGFBP-3, lyophilized, blue coloured	**1 x 5.5 mL**
C	**Tracer: ^{125}I-IGFBP-3**, lyophilized, **< 1.5 µCi or < 55 kBq**, red coloured	**1 x 11 mL**
F - J	**Calibrators,** lyophilized (native human IGFBP-3), Concentrations given on vial-labels	**5 x 500 µL**
M	**High Control,** lyophilized (human serum): Concentration see certificate	**1 x 100 µL**
N	**Low Control,** lyophilized (human serum): Concentration see certificate	**1 x 100 µL**
T	**Tubes** coated with streptavidin	**100 tubes**
	Instructions for use	**1 x**
	Quality Certificate	**1 x**

6.2 Reagents required, but not provided

- Cold demineralised water or distilled water (Aqua destillata) **(A. dest.), 125 mL**
- Graduated cylinder, Pipettes: 10 mL, 500 µL, 100 µL and 10 µL; 50 µL, 100 µL and 500 µL repeating pipettes (Multi Step) are recommended.
- Vortex mixer
- Shaking device is recommended
- Device for aspiration of liquid supernatant is recommended
- Gamma counter

Exemplary Version, don´t use for assay accomplishment. Exemplarische Version, bitte nicht für Assay Durchführung benutzen.

7 TECHNICAL NOTES

7.1 Storage Conditions

Store the kit at **2-8°C** after receipt until its expiry date. The lyophilized reagents should be stored at **-20 °C after reconstitution**. Avoid repeated thawing and freezing.

The shelf-life of the **reagents after opening** is in accordance with the Tracer **C** shelf life.

7.2 Reagent Preparation

Ensure that lyophilized materials are completely dissolved on reconstitution. It is recommended to touch the tubes with lyophilized material once on a solid base before first opening in order to accumulate the material at the bottom of the tubes. After addition of the Dilution Buffer **1xDB** it is recommended to keep the reconstituted reagents at **20-25°C** for half an hour and then to mix the vigorously with a Vortex mixer. This is important in particular for the Controls **M** and **N.**

Possible residues on the coated tubes **T** are unavoidable for production reasons - the function is not impaired.

2xDB	125 mL fill up to **250 mL** with cold A. dest. (→ Dilution Buffer **1xDB**)
C	Reconstitute with **11 mL** Dilution Buffer **1xDB**
R	Reconstitute with **5.5 mL** Dilution Buffer **1xDB**
S	Reconstitute with **5.5 mL** Dilution Buffer **1xDB**
F - J	Reconstitute with **500 µL** Dilution Buffer **1xDB** each.
M and N	Reconstitute with **100 µL** Dilution Buffer **1xDB** each. Ensure that lyophilized materials are completely dissolved on reconstitution. Dilution according to sample dilution with Dilution Buffer **1xDB (e.g. 1:301)**

Samples (calibrators, controls and patient specimen) should be **determined in duplicate**. For optimal results, accurate pipetting and adherence to the protocol are recommended.

Exemplary Version, don´t use for assay accomplishment. Exemplarische Version, bitte nicht für Assay Durchführung benutzen.

8 ASSAY PROCEDURE

Reagent preparation:		Reconstitution:	Dilution:
2xDB	**Dilution Buffer**	-	Before use **1:2** with cold **A. dest.** → Dilution Buffer **1xDB**
C	**Tracer**	in **11 mL** Dilution Buffer **1xDB**	–
R	**Capture Antibody**	in **5.5 mL** Dilution Buffer **1xDB**	–
S	**Specific Antibody**	in **5.5 mL** Dilution Buffer **1xDB**	–
F-J	**Calibrators**	in **500 µL** Dilution Buffer **1xDB**	–
M+N	**Controls**	in **100 µL** Dilution Buffer **1xDB**	**1:301** with ice-cold Dilution Buffer **1xDB**
Keep the reconstituted reagents at **20-25°C** for approx. **30 min** and then mix vigorously with a Vortex mixer. This is important in particular for the Controls **M** and **N.**			–
Dilute Samples with ice-cold Dilution Buffer (**1xDB**) e.g. **1:301, mix directly** + process fast as can.			

Assay procedure for double determination

Nr. of Tubes	Contents of Tubes	1xDB, F-J M, N Samples	R (Capture Antibody)	S (Specific Antibody)	C (Tracer)
1 / 2	Total Counts **TC**	–	–	–	100 µL
3 / 4	Dilution Buffer **1xDB** = Non-specific binding **NSB**	150 µL **1xDB**	50 µL	–	100 µL
5 / 6	Dilution buffer **1xDB** = Zero Calibrator **B0**	100 µL **1xDB**	50 µL	50 µL	100 µL
7 - 16	Calibrators	100 µL **F-J**	50 µL	50 µL	100 µL
17 / 18	Diluted high Control	100 µL **M**	50 µL	50 µL	100 µL
19 / 20	Diluted low Control	100 µL **N**	50 µL	50 µL	100 µL
21 / 22	Diluted Sample 1	100 µL	50 µL	50 µL	100 µL
23 / 24	Diluted Sample 2	100 µL	50 µL	50 µL	100 µL
etc.					
Coloration after addition		**coloration light blue**	**coloration light blue**	**coloration deeper blue**	**coloration violet**

Nr. 1, 2 remove until counting the activity.
Incubation, overnight at 20-25°C, at least 15 hours on a shaking device at 350 rpm. ***Alternative pipetting without shaking device, the tubes must be mixed thoroughly by a vortex mixer. Then incubate also overnight at room temperature (with reduced binding), or for 2 days (e.g. over the weekend) at 2-8°C***
Decant or aspirate the liquid completely. Take care that the coating of the tubes remains intact.
Add **500 µL** of Dilution Buffer **1xDB** to the tubes
Decant or aspirate the liquid completely (see above)
Count the **activity** of all tubes with a Gamma Counter.

Exemplary Assay Durchführung benutzen. Exemplarische Version, bitte
n't use for assay accomplishment.

9 QUALITY CONTROL

GLP requires that controls must 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.
All 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.

10 EVALUATION OF RESULTS

10.1 Establishing of the Calibration Curve

The calibrators provided contain the following concentrations of IGFBP-3:

Calibrator	F	G	H	I	J
ng/mL	1	3	9	27	81

1) Calculate the average counts (AC) of each pair of tubes. This gives the values for B.

2) Subtract the average counts (AC) of NSB tubes (3 and 4) from the mean counts of the calibrators, controls and patient samples. This gives the corrected values for B.

3) The corrected value from tubes 5 and 6 (Dilution Buffer **1xDB**) is B0.

4) Calculate the percent bound %B/B0 by dividing the corrected B-values by B0: %B/B0 = B/B0 x 100%.

5) Plot %B/B0 versus the calibrator concentrations on either semi-logarithmic or logit-log paper or evaluate by using a computer program.

10.2 Quality Criteria

Non-specific Binding:	**specific** Binding:
Quality Criteria: **%NSB/TC < 5%**	Quality Criteria: **%B0/TC > 15%**
Example of calculation with the exemplary data see below:	
NSB / TC x 100%	(B0 - NSB) / TC x 100%
243.5 cpm / 19563.3 cpm x 100% = 1.2% NSB/TC < 5%	(7792.5 cpm – 243.5 cpm) / 19563.3 cpm x 100% = 38.6% B0/TC > 15%

Exemplary Version, don´t use for assay accomplish... mplarische Version, bitte nicht für Assay Durchführung benutzen.

10.3 Example of Typical Calibration Curve

The exemplary data and the calibration curve in Figure 4 **cannot** be used for the calculation of the test results. You have to establish a calibration curve for each test you conduct.

Example	TC	NSB	B0	F	G	H	I	J
cpm	19563.3	243.5	7792.5	6992.5	5630.4	3696.5	1963.2	1084.6
%B/B0	-	-	-	89.40	71.36	45.74	22.78	11.14
ng/mL	-	-	-	1	3	9	27	81

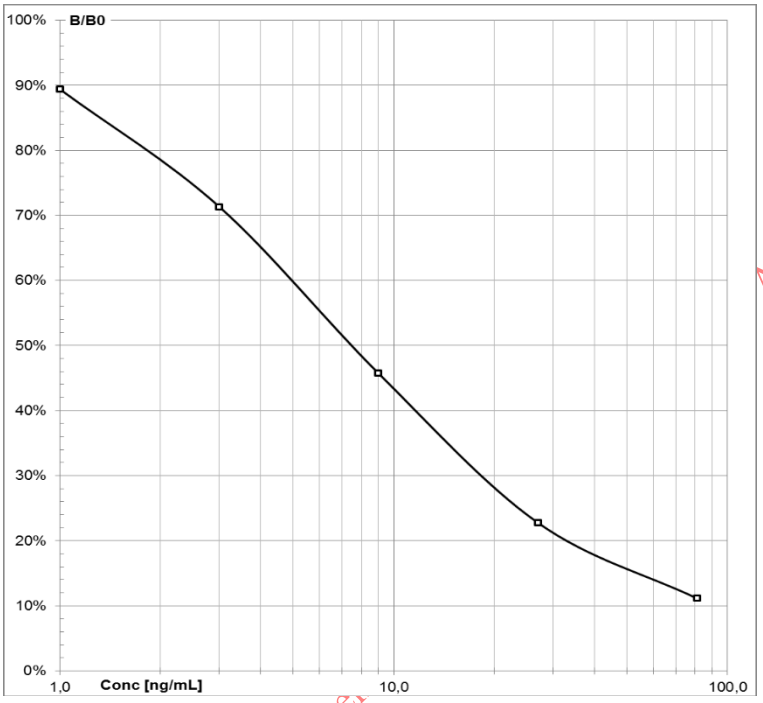

Figure 4: Examplary Calibration Curve

10.4 Evaluation of sample concentrations

Read the concentration value (abscissa) corresponding to the %B/B0 of the sample as in the example given below:

Average counts of **NSB** **243.5 cpm**
Average counts of zero Calibrator **B0** **7792.5 cpm**
Average counts of **Sample**: **3542.6 cpm**
%**B/B0** = (**sample counts** - **NSB**) / (**B0** - **NSB**) **x 100**
= **(3542.6 – 243.5) / (7792.5 – 243.5) x 100%**
= 0.4370 x 100%
= 43.70%

A 43.70%-value on the y-axis (ordinate) results in 9.699 ng/mL on the x-axis (abscissa). Multiply the concentration value determined graphically or by the aid of a computer program with the dilution factor (e.g.: 301)

Example: 9.699 ng/mL x 301 = 2919 ng/mL or 2.92 mg/L respectively.

Assay Durchführung benutzen.
Exemplary Version, don't use for assay accomplishment. Exe.

11 LIMITATIONS OF PROCEDURE

Diagnostic sensitivity and specificity are 97 and 94% respectively, if the 5th percentile is used as cut-off value (9, page 156). Generally, requirements of national guidelines regarding diagnostics of growth hormone deficiency shall be taken into account (For example: 20, S2e-Leitlinie 174/002 or AHRQ Evaluation and treatment of adult growth hormone deficiency, NGC 008703).

IGFBP-3 levels are strongly dependent on GH secretion. However, a number of factors influence the plasma concentration of IGF-I and/or IGFBP-3 and should be taken into account for appropriate interpretation. Decreased plasma levels were observed in case of hypothyroidism, hypogonadism with deficiency of sex hormones, constitutionally delayed growth and puberty, acute or chronic malnourishment, hepatic dysfunction, obesity, inadequately adjusted diabetes mellitus and secondary growth hormone resistance (9). IGFBP-3 plasma concentration 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-3 patterns seen in Western ligand blotting and might result in the RIA with its specific polyclonal antisera in higher determination.

Exemplary Version, don´t use for assay accomplishment. Exemplarische Version, bitte nicht für AssayDurchführung benutzen.

12 REFERENCE VALUES

IGFBP-3 levels are strongly age-dependent in children, less so in adults. The reference ranges in various age-groups which were log-normally distributed are given in Table 1 by the percentiles. A graphic presentation is shown in Figures 5 and 6.
It is recommended for each laboratory to establish its own reference range.

Tab. 1 Serum levels of 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.

Age group		Percentiles													
		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**	5.50
> 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**	5.45

Serum levels are given as mg/L

Determined with IGFBP-3 RIA (Blum et al. 1990)
The values above 70 years are extrapolated

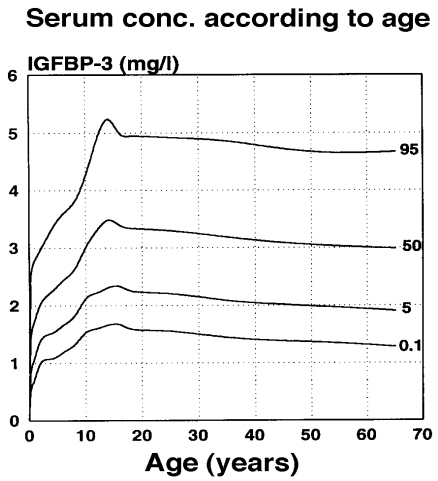

Fig. 5: Age-dependant normal values of IGFBP-3 (presented as 0.1., 5., 50., and 95. percentile)

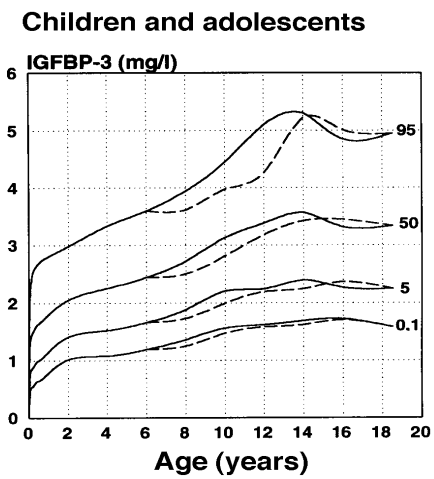

Fig. 6: Normal values of children and adolescents (girls —— boys - - - -)

Exemplary Versi
v accomplishment. Exemplarische Version, bitte nicht zur Assay-Durchführung benutzen.

13 PERFORMANCE CHARACTERISTICS

13.1 Sensitivity

Sensitivity was assessed by measuring the B0 16 times in one assay; 2-fold standard deviation was calculated and subtracted from mean B0. The concentration of the resulting %B/B0 was recalculated. The results show analytical sensitivity of < 0.8 µg/L in the R11.

13.2 Specificity

Specificity of the test system was evaluated by investigating the influence of homologue proteins: other IGFBPs. It was shown that none of the tested IGFBPs interfered significantly with the antibodies used (Table 2).

Tab. 2 Specificity: Cross-reactivity with homologous IGFBPs. Recombinant IGFBPs were added in dilution buffer and the signal intensity was measured in the Mediagnost IGFBP-3 RIA-CT, R11.

	recombinant IGFBP [ng/mL]	measured IGFBP-3 [ng/mL]	Cross Reactivity [%]
IGFBP-1	1000	1.128	0.11
IGFBP-2	1000	0	0
IGFBP-4	1000	0	0
IGFBP-5	330	0.88	0.27
IGFBP-6	1000	0.022	0.00

13.3 Precision

Intra-Assay Variance

Four samples have been measured 5 times in the same assay. The results are shown in Table 3. The measured coefficient of variation (CV) for the exemplarily shown four samples is clearly < 10% (range: 1,49 – 4,36%).

Tab. 3 Intra-Assay Variation

	IGFBP-3 [ng/mL]					Mean [ng/mL]	Standard-deviation [ng/mL]	CV [%]	Number [n]
Sample 1	3921	3988	3921	3855	3844	3906	58.35	1.49	5
Sample 2	1307	1250	1198	1268	1285	1262	41.32	3.28	5
Sample 3	2993	2837	2965	2693	2965	2891	125.97	4.36	5
Sample 4	4541	4515	4255	4292	4342	4389	130.91	2.98	5

Inter-Assay Variance

Serum samples were measured in independent assays. The coefficient of variation was in either case < 10%. (range here: 4,59 – 6,66%) Results are shown in detail in Table 4.

Tab. 4 Inter-Assay Variation. Six samples have been tested in a period of three years for several times in different lots.

		Sample 1	Sample 2	Sample 3	Sample 4	Sample 5	Sample 6
Mean	[ng/mL]	1690.83	1628.50	3350.48	3512.23	3097.57	3071.89
Standard Deviation	[ng/mL]	111.72	108.40	185.04	161.37	147.82	151.90
CV	[%]	6.61	6.66	5.52	4.59	4.77	4.94
Number	[n]	68	70	47	35	23	22

Exemplary Version, don't use for assay. Exemplarische Version, bitte nicht für Assay Durchführung benutzen.

13.4 Linearity

Linearity of the R11 was tested by serial dilution of different serum samples and measurement of the IGFBP-3 concentration. Results are shown in Figure 8. Samples can be diluted in a broad range according the requirements of the experimental setting. We recommend a dilution of 1:301 (0.00332).

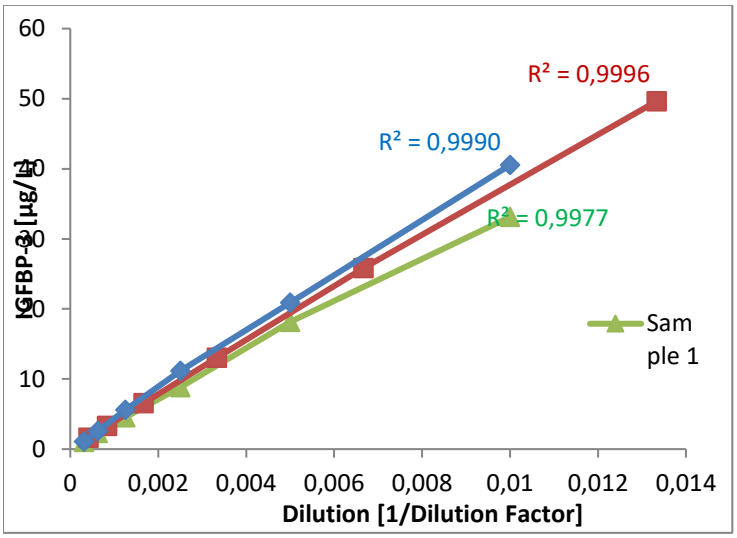

Figure 8 Linearity of sample dilution. Three samples with different amount of IGFBP-3 were diluted and IGFBP-3 concentration was measured.

13.5 Interference

Assessment of the influence of hemolytic, icteric and lipaemic samples was done by an artificial system. Exemplarily, five human serum samples were enriched with triglycerides (up to 100 g/L), bilirubin (up to 200 mg/L) and hemoglobin (up to 5 g/L) and IGFBP-3 was measured in the enriched and not enriched samples. Testing of biotin interference was done with three serum samples enriched with different concentrations of biotin up to 3000 ng/mL. No significant influence of these potentially interfering substances was detected (Table 5). But this might depend on the individual sample and thus hemolytic, icteric and lipaemic samples should be avoided.

Tab 5 IGFBP-3 measurements in artificially enriched samples. Shown is the relative recovery of IGFBP-3 in comparison to the non-enriched sample

	Triglyceride 100 mg/mL	Bilirubin 200 µg/mL	Hemoglobin 1 mg/mL	Hemoglobin 5 mg/mL	Biotin 3000 ng/mL
Serum 1	104	90	83	-	111
Serum 2	97	88	108	-	111
Serum 3	79	89	129	105	103
Serum 4	93	97	137	109	-
Serum 5	-	100	128	103	-

13.6 Trueness/ Assay Calibration

As the assay was developed and characterized no international calibration material was available. Thus, serum of healthy blood donors was pooled and IGFBP-3 concentration measured. This original calibration was used for the evaluation of reference values (Blum et al. 1990). Because of analyte instability and differential glycosylation, a valid reference material for immunological assay is still not available (2016).

Means to prove the trueness and the specificity of the Mediagnost IGFBP-3 RIA-CT, R11 are the comparison with other test systems as well as the results of external quality assessment

Exemplary version, don't for assay accomplishment. Exemplarische Version, bitte nicht für Assay Durchführung benutzen.

schemes. Both approaches were used to prove the validity of the Mediagnost IGFBP-3 RIA-CT.

13.7 External Quality Assesment

Mediagnost and some of Mediagnost customers take part in the External Quality Control (EQA) of the Reference Institute of Bioanalytics. In Figure 9 the results of the EQA from 2010 to 2016 are shown. The mean deviations of the method-specific target value are 3.25% / 4.88% and for the total, method-independent target value -10.39% / -6.90% for sample A and B, respectively.

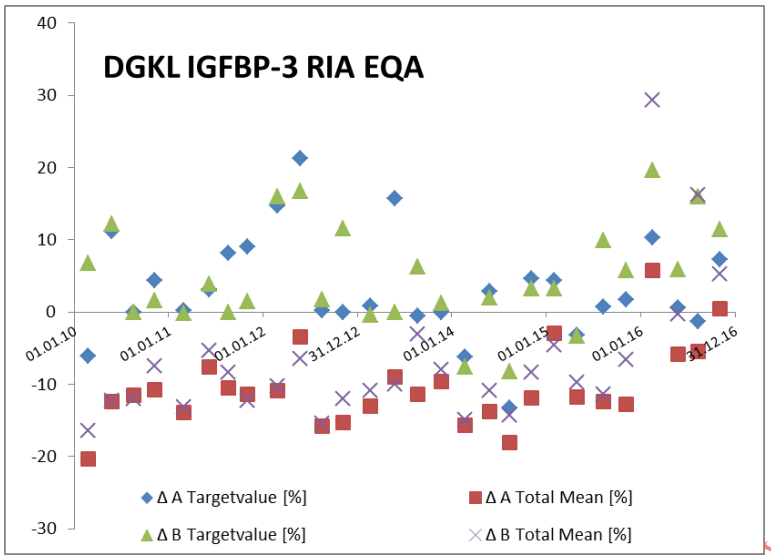

Figure 9 Results of EQA. In each quarter of the year IGFBP-3 is measured in two samples provided by an independent institution, which also analyses the test results. Here the relative deviations of the method-specific target values and the method independent total mean values are shown for the samples A and B in %.

14 ASSAY COMPARISON

Mediagnost R11 was compared with immunoassays of two competitors and an in-house test system of a university hospital.
The comparison of the measured values from R11 and the other assays by linear regression results in below regression equations:

$y = 1.0851x - 0.5397;\ R^2 = 0.9662;\ n = 87$
$y = 1.1931x + 0.0156;\ R^2 = 0.9275;\ n = 57$
$y = 0.8615x + 282.17;\ R^2 = 0.7151;\ n = 59$

These data prove that Mediagnost IGFBP-3 RIA-CT, R11, correlates well with the other IGFBP-3 assays.

Exemplary Version, don't use for assay accomplishment. Exemplarische Version, bitte nicht für Assay Durchführung benutzen.

Information for use for scientific application

15 SCIENTIFIC APPLICATION

15.1 Samples

Following matrices are suitable for scientific applications:
Serum, plasma, breast milk, follicular fluid, seminal plasma, urine and cerebrospinal fluid.

The recommended **dilution of serum and plasma samples** in Dilution Buffer **1xDB: 1:301.** Depending on the expected IGFBP-3 values the dilution can vary from 1:100 to1:400

Important: Use only chilled ice-cold Dilution Buffer 1xDB. And **mix immediately** after addition of the samples into Dilution Buffer **1xDB**. Diluted samples should be processed fast as can.

In the other human liquids listed above, the IGFBP-3 values can vary considerably; the optimum dilution must be determined by the customer.

15.2 Alternative Pipetting of the Antibodies Reagents R and S

Mix the reconstituted **Reagents R** (**Capture Antibody) and S (Spec. Antibody)** externally (1:1), add 100 µL of this mix beginning with the tube 3.

With this variant a determination of the non-specific binding **NSB** is no longer possible; please take the lack of the NSB into account when planning the assay protocol and when evaluating the test.

15.3 Cross reactions with animal samples

Several commercially available animal sera have been used as samples in this assay.

NO signal was detected in any serum sample of the following species:

Rat, mouse, guinea pig, rabbit, pig, sheep, goat, bovine, horse, donkey, dog, cat and chicken.

Exemplary Version, don´t use for assay accomplishment. Exemplarische Version, bitte nicht für Assay Durchführung benutzen.

Exemplary Version, don´t use for assay accomplishment. Exemplarische Version, bitte nicht für Assay Durchführung benutzen.

16 LITERATUR / REFERENCES

Literature

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. E.M., Y. Oh., R.G. Rosenfeld (1997). Generation and characterization of an IGFBP-7 antibody: identification of 31kD IGFBP-7 in human biological fluids and Hs578T. J Clin Endocrinol Metab. 82:1301–1303
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-on 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): Radioimmunassay 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, Universität 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 resistence 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-indepen-dent binding protein for insulin-like growth factors in human plasma. J Clin Endocrinol Metab 65:432-440
13) Jorgensen JOL, Blum WF, Moller N, Ranke MB, Christiansen JS (1990) Circadian patterns of serum insulin-like growth factor (IGF)-II and IGF-binding protein 3 in growth hormone deficient patients and age- and sex-matched normal subjects. Acta Endocrinol (Copenh.) 123:257-262
14) Blum WF, Albertsson-Wikland K, Rosberg S, Jorgensen JOL, Ranke MB (1990) Insulin-like growth factor binding protein 3 (IGFBP-3) reflects spontaneous growth hormone (GH) secretion. Horm Res 33 (Suppl 3): 3(Abstract)
15) Blum WF, Ranke MB (1990) Insulin-like growth factor-binding proteins (IGFBPs) with special reference to IGFBP-3. Acta Paediatr Scand (Suppl) 367:55-62
16) Giudice LC, Farrell EM, Pham H, Lamson G, Rosenfeld RG (1990) Insulin-like growth factor binding proteins in maternal serum throughout gestation and in the puerperium: effects of a pregnancy-associated serum protease activity. J Clin Endocrinol Metab 71:806 816
17) Hossenlopp P, Segovia B, Lassarre C, Roghani M, Bredon M, Binoux M (1990) Evidence of enzymatic degradation of insulin-like growth factor-binding proteins in the 150k complex during pregnancy. J Clin Endocrinol Metab 71:797-805
18) Ranke MB, Schweizer R, Elmlinger MW, Weber K, Binder G, Schwarze CP, Wollmann HA (2000) Significance of Basal IGF-I, IGFBP-3 and IGFBP-2 Measurements in the diagnostics of short stature in children. Horm Res 2000;54:60-68
19) Ranke MB, Schweizer R, Elmlinger MW, Weber K, Binder G, Schwarze CP, Wollmann HA (2001) Relevance of IGF-I, IGFBP-3, and IGFBP-2 Measurements during GH treatment of GH-deficient and non-GH-deficient children and adolescents. Horm Res 2001; 55:115-124
20) S2e Leitlinie 174/002 Aktualisierte Leitlinie. Diagnostk des Wachstumshomonmangels im Kindes- und Jugendalter. Stand 24.07.2014.AWMF online – AWMF.org

Exemplary version, not for assay accomplishment. Exemplarische Version, nicht für Assay Durchführung benutzen.

17 INTERNATIONAL ASSAY DESCRIPTION

International Test description

2xDB	-	**1:2 A. dest. → 1xDB**
C	**Rec in 11 mL 1xDB**	-
R	**Rec in 5.5 mL 1xDB**	-
S	**Rec in 5.5 mL 1xDB**	-
F - J	**Rec in 500 µL 1xDB**	-
M, N	**Rec in 100 µL 1xDB**	
	30 min °C 20-25 °C ↔	
	SPE & M & N 1:301 1xDB ↔	

T		1xDB	F-J	M, N	SPE	R	S	C
1 / 2	**TC**	-	-	-	-	-	-	100 µL
3 / 4	**NSB**	150 µL	-	-	-	50 µL	-	100 µL
5 / 6	**B0**	100 µL	-	-	-	50 µL	50 µL	100 µL
7 / 8	**F**	-	100 µL	-	-	50 µL	50 µL	100 µL
9 / 10	**G**	-	100 µL	-	-	50 µL	50 µL	100 µL
11 / 12	**H**	-	100 µL	-	-	50 µL	50 µL	100 µL
13 / 14	**I**	-	100 µL	-	-	50 µL	50 µL	100 µL
15 / 16	**J**	-	100 µL	-	-	50 µL	50 µL	100 µL
17 / 18	**M**	-	-	100 µL	-	50 µL	50 µL	100 µL
19 / 20	**N**	-	-	100 µL	-	50 µL	50 µL	100 µL
21 /22	**SPE**	-	-	-	100 µL	50 µL	50 µL	100 µL

≥ 15 h °C 20-25 °C ALL NOT TC
ASP ALL NOT TC
500 µL 1xDB ALL NOT TC
ASP ALL NOT TC
MEASURE

Exemplary Version, don[illegible]e for assay accomplishment. Exemplarische Version, bitte nu[illegible]ssay Durchführung benutzen.

Exemplary Version, don´t use for assay accomplishment. Exemplarische Version, bitte nicht für Assay Durchführung benutzen.

18 ASSAY PROCEDURE

Reagent preparation:		Reconstitution:	Dilution:
2xDB	**Dilution Buffer**	-	Before use **1:2** with cold **A. dest.** → Dilution Buffer **1xDB**
C	**Tracer**	in **11 mL** Dilution Buffer **1xDB**	–
R	**Capture Antibody**	in **5.5 mL** Dilution Buffer **1xDB**	–
S	**Specific Antibody**	in **5.5 mL** Dilution Buffer **1xDB**	–
F-J	**Calibrators**	in **500 µL** Dilution Buffer **1xDB**	–
M+N	**Controls**	in **100 µL** Dilution Buffer **1xDB**	**1:301** with ice-cold Dilution Buffer **1xDB**
Keep the reconstituted reagents at **20-25°C** for approx. **30 min** and then mix vigorously with a Vortex mixer. This is important in particular for the Controls **M** and **N.**			–
Dilute Samples with ice-cold Dilution buffer (**1xDB**) e.g. **1:301, mix directly** + process fast as can.			

Assay procedure for double determination

Nr. of Tubes	Contents of Tubes	1xDB, F-J M, N Samples	R (Capture Antibody)	S (Specific Antibody)	C (Tracer)
1 / 2	Total Counts **TC**	–	–	–	100 µL
3 / 4	Dilution Buffer **1xDB** = Non-specific binding **NSB**	150 µL **1xDB**	50 µL	–	100 µL
5 / 6	Dilution buffer **1xDB** = Zero Calibrator **B0**	100 µL **1xDB**	50 µL	50 µL	100 µL
7 - 16	Calibrators	100 µL **F-J**	50 µL	50 µL	100 µL
17 / 18	Diluted high Control	100 µL **M**	50 µL	50 µL	100 µL
19 / 20	Diluted low Control	100 µL **N**	50 µL	50 µL	100 µL
21 / 22	Diluted Sample 1	100 µL	50 µL	50 µL	100 µL
23 / 24	Diluted Sample 2	100 µL	50 µL	50 µL	100 µL
etc.					
Coloration after addition		**coloration light blue**	**coloration light blue**	**coloration deeper blue**	**coloration violet**

Nr. 1, 2 remove until counting the activity.
Incubation, overnight at 20-25°C, at least 15 hours on a shaking device at 350 rpm. ***Alternative pipetting without shaking device, the tubes must be mixed thoroughly by a vortex mixer. Then incubate also overnight at room temperature (with reduced binding), or for 2 days (e.g. over the weekend) at 2-8°C***
Decant or aspirate the liquid completely. Take care that the coating of the tubes remains intact.
Add **500 µL** of Dilution buffer **1xDB** to the tubes
Decant or aspirate the liquid completely (see above)
Count the **activity** of all tubes with a Gamma Counter.

A copy of the page 31

Exemplarische Version, bitte nicht für Assay Durchführung benutzen.