

IGF-I ELISA

Inmunoensayo Enzimático para la Determinación Cuantitativa de
**Factor de crecimiento semejante a la Insulina Humana
tipo 1 (IGF-I)**
(con bloqueo de IGFBP)

Español

Enzyme Immunoassay for Quantitative Determination of
Human Insulin-like Growth Factor I (IGF-I)
(IGFBP-blocked)

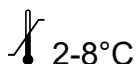
English

Unión Europea/ European Union

Para uso en Diagnóstico In Vitro/ For In Vitro Diagnostic Use
¡ IVD para uso profesional! / IVD for professional use!

Resto del mundo/ Rest of the world:

Sólo para uso en investigación. No apto para uso en procedimientos de diagnóstico /
For Research Use Only. Not for use in diagnostic procedures.



REF **E20**



Gesellschaft für Forschung und Herstellung von Diagnostika GmbH



:Aspenhastr. 25 • D-72770 Reutlingen / Germany















Phone / Teléfono: + 49 - (0) 7121 51484-0 • Fax: + 49 - (0) 7121 51484-10

E-mail/ Correo electrónico: contact@mediagnost.de • <http://www.mediagnost.de>

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

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

DIN EN ISO 15223-1

	Expiry date/ Verfallsdatum/ Date de péremption/ Data di scadenza/ Fecha de caducidad/ Data de validade/ Uiterste gebruiksdatum/ Udløbsdato/ Bäst före-datum/ Termin ważności/ Lejárati idő/ Čas expirácie/ Doba expirace/ Срок на годност/ Αεγυμίσκυυρπæv/ Ημερομηνία λήξης/ Data de expirare/ Rok uporabe/ Viimeinen käyttöpäivä
	Consider instructions for use/ Bitte Gebrauchsanweisung beachten/ Consultez la notice d'utilisation/ Consultare le istruzioni per l'uso/ Consulte las instrucciones de uso/ Respeitar as instruções de utilização/ A.u.b de gebruiksaanwijzing volgen/ Se brugsanvisningen/ Läs anvisningarna före användning/ Proszę przeczytać instrukcję obsługi/ Vegye figyelembe a használati utasításban foglaltakat/ Postupujte podľa pokynov na použitie/ Dodržujte návod k použití/ Моля, спазвайте инструкцията за употреба/ Palun järgige kasutusjuhendit/ Λάβετε υπόψη σας τις οδηγίες χρήσης/ Vă rugăm să respectați instrucțiunile de utilizare/ Upoštečajte navodila za uporabo/ Lue käyttöohje huolellisesti!
	In vitro Diagnostic Medical Device (for in vitro diagnostic use)/ In-vitro-Diagnostikum (zur In-vitro-Diagnostik)/ Dispositif médical de diagnostic in vitro (Pour usage diagnostique in vitro)/ Dispositivo medico per diagnostica in vitro (per uso diagnostico in vitro)/ Dispositivo médico de diagnóstico in vitro (para uso diagnóstico in vitro)/ Dispositivo Médico para Diagnóstico in vitro (Para Utilização de Diagnóstico in vitro)/ Medisch hulpmiddel voor diagnostiek in vitro (voor diagnostisch gebruik in vitro)/ Medicinsk udstyr til in vitro-diagnostik (Udelukkende til in vitro diagnostisk anvendelse)/ Medicinteknisk produkt avsedd för in vitro-diagnostik (för in vitro-diagnostiskt bruk)/ Wyrób medyczny do diagnostyki in vitro/ In vitro orvosdiagnosztikai termék (in vitro diagnosztikai használathoz)/ In vitro diagnostický zdravotnícký materiál (určené na diagnostiku „in vitro“)/ In vitro diagnostický zdravotnícký materiál (určeno pro diagnostiku „in vitro“)/ Медицинско устройство за ин-витро диагностика (за ин-витро диагностика) in vitro diagnostikaseade (in vitro diagnostika tegemiseks)/ In vitro διαγνωστικό (για διάγνωση in vitro)/ Dispozitiv de diagnosticare in vitro (pentru diagnosticarea in vitro)/ In vitro diagnostika (o in vitro diagnostiki)/ in vitro-diagnostiikkakäyttö
	Lot-Batch Number/ Charge-Chargennummer/ Lot-Code du lot/ Lotto-Numero di lotto/ Lote-Código de lote/ Lote-Código do Lote/Lot-Partijnummer/ Lot-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/ Τοοτjα/ Κατασκευάζεται από/ Produs de/ Proizvajalec/ Valmistaja
	Catalogue Number/ Bestellnummer/ Numéro de référence/ Numero di riferimento/ Número de referencia/ Número de Referência/ Referentienummer/ Referencenummer/ Bestellningsnummer/ Numer katalogowy/ Rendelési szám/ Katalógové číslo/ Objednací číslo/ Καταложен 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/ Armazena 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/ Ineholder tilstrækkeligt til x prøver/ Innehållet räcker till x analyser/ Zawartość na x testów/ Tartalma x teszt elvégzésére elegendő/ Obsahuje materiál pre x testov/ Obsah dostahuje pro x testů/ Съдържа достатъчно за x тестове/ Sisust jätkub x katse jaoks/ Το περιεχόμενο επαρκεί για x δοκιμές/ Conținut suficient pentru x teste/ Vsebina zadostuje za x preizkusov/ Sisältö riittää x testille
	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
	Shaking/ Schütteln/ Mélanger/ Agitare/ Agitar/ Agitação/ Schudden/ Ryster/ Skaka/ Wstrząsanie/ Rázás/ Pretrepāt/ Protřepāt/ Разклащане/ Raputada/ Ανακινήστε/ Vibrare/ Stresite/ Sekoita
	Mikrotiterplate/ Mikrotiterplatte/ plaque de microtitrage/ Piastra di microtitolazione/ Placa de microtitulaci6n/ Placa de Microtitulaç6o/ Microtiterplaat/ Mikrotiterplade/ mikrotiterplatta/ microtiterplaat/ Płytko microtiter/ Mikrotiter lap/ Mikrotitračná podložka/ Mikrotitrační podložka/ Микротитърна плака/ Mikrotiiterplaat/ Τρυβλίο μικροπιλοδότησης/ Microplacă/ Mikrotitrská plošča/ Mikrotitrauslevy
	Reconstitute in/ Rekonstituieren in/ Reconstituer dans/ Ricostituire nel/ Reconstituir en/ Reconstituir em/ Reconstituieren in/ Rekonstituér i/ Rekonstituera/ Rekonstytuować w/ Helyreállítás/ Znovu pripraviť za/ Znovu připravit za/ Разтваряне в/ Moodustada uuesti/ Ανασυστήστε σε/ Reconstituire în/ Predelava v/ Rekonstituoi
	Sample/ Probe/ Echantillon/ Campione/ Muestra/ Amostra/ Monster/ Prøve/ prov/ Próbka/ Minta/ Vzorka/ Vzorek/ Проба/ Proov/ Δείγμα/ Probă/ Vzorec/ Näyte

DET	Antibody Conjugate/ Antikörperkonjugat/ Anticorps conjuguée/ Coniugato di anticorpo/ Conjugado de anticuerpos/ Conjugado anticorpo/ Antilihaamconjugaat/ Antistoffer-konjugat/ Antikroppskonjugat/ Koniugat antycial/ Antitest páros/ Protilátkový konjugát/ Protílátkový konjugát/ Антиляло конюгат/ Antikehad konjugaat/ Σύμπλοκο αντισώματος/ Compuși din anticorpi/ Antitelesa konjugat/ Vasta-aine konjugaatti
EC	Enzyme Conjugate/ Enzymkonjugat/ Conjugué enzymatique/ Coniugato di enzima/ Conjugado de enzimas/ Conjugado Enzima/ Enzymconjugaat/ Enzym-konjugat/ Enzymkonjugat/ Koniugat enzymów/ Enzim páros/ Enzymatický konjugát/ Enzymatický konjugát/ ензим конюгат/ Ensüümi konjugaat/ Σύμπλοκο –ενζύμου/ Compuși din enzime/ Encima konjugat/ Entsymi konjugaatti
SB	Sample Buffer/ Probenpuffer/ Tampon d'échantillon/ Buffer campione/ Tampón de muestra/ Tampão de amostra/ Monsterbuffer/ Prøvebuffer/ Provbuffert/ Bufor próbki/ Mintapuffer/ Pufr na vzorky/ Vzorkovací pufr/ Примерен буфер/ Proovipuhver/ Ρυθμιστικό διάλυμα δείγματος/ Tampon de probă/ Vzorčni puffer/ Näytempuskuri
X:X	Dilute / Verdünnen / Diluer / Diluire / Diluir / Diluir / Verdunnen / Fortyndes / Späd / Rozciefczanie / Hígítás / Riedit / Ředit / Разреждане / Lahjendada / Αραιώστε / Diluați / Razredčiti / Laimennetaan
CAL	Calibrator X/ Kalibrator X/ calibreteur X/ calibretoire X/ calibrador X/ calibrador 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
CTR1 / CTR2	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
WB	Washing Buffer Concentrate/ Waschpufferkonzentrat/ Tampon de lavage conc./ Tampone di lavaggio concentrato/ Tampón de lavado concentrado/ Tampão de Lavagem Concentrado/ wasbuffer, geconcentreerd/ Vaskebufferkoncentrat/ Vaskebufferkoncentrat/ tvättbuffertkoncentrat/ Bufor płukania koncentrat/ Mosópufer koncentrátum/ Koncentrát vymývacieho pufru/ Концентрат на промивен буфер/ Pesuruhvi kotsentraat/ Συμπύκνωμα ρυθμιστικού διαλύματος έκπλυσης/ Concentrat pentru tamponul de spălare/ Koncentrat izpiralnega pufra/ Pesuliuositiivist
WB 1:20	Washing Buffer/ Waschpuffer/ Tampon de lavage/ Tampone di lavaggio/ Tampón de lavado/Tampão de Lavagem/ wasbuffer/ Vaskebuffer/ tvättbuffert/ Bufor płukania/ Mosópufer/ Vymývací pufr/ Vymývací pufr/ Промивен буфер/ Pesuruhver/ Ρυθμιστικό διάλυμα έκπλυσης/ Tampon pentru spălare /Izpiralni pufer/ Pesuliuos
S	Substrate/ Substrat/ Substrat/ Substrato/ Substrato/ Substrato/ substraat/ Substrat/ Substrat/ Substrat/ Szubsztrátum/ Substrát/ Substrát/ Субстрат Substraat/ Υπόστρωμα/ Substrat/ Substrat/ Substraattiliuos
STP	Stop Solution/ Stopplösung/ Stop Solution/ Soluzione di stop/ Stop Solución/ Solução Stop/ stopoplossing/ Stopopløsning/ Stopplösning/ Stop roztwór/ Megállító oldat/ Roztok na ukončenie/ Roztok pro ukončeni/ Стопират разтвор/ Stopp-lahus/ Διάλυμα διακοπής/ Soluție de oprire/ Stop raztopina/ Pysäytysliuos
TAPE	Cover Plate with cover foil/ Platte abkleben/ Recouvrir la microplaque avec bande adhésive/ Coprire la piastra con nastro adesivo/ Cubrir la placa con una cinta adhesiva/ Cobrir a Placa com fita adesiva/ plaatje met tape afdekken/ Afdækningsplade med tape/ maskera platta/ Odkleić płytke/ Tányér leragasztása/ Oblepiti podložku lepiacou páskou/ Olepit podložku lepící páskou/ Плака с лента за запечатване/ Katta plaat isoleerkeelplindiga/ Κολλήστε το πλακίδιο με κολλητική ταινία/ Aoperiti placa cu o bandă adezivă/ Prelepiți ploščo/ Peitä mikrotitrauslevy oheisella teipillä
MEASURE	Measure plate within 30 min at 450 nm (Referencefilter ≥590 nm)/ Ausmessung innerhalb von 30 min bei 450 nm (Referenzfilter ≥ 590 nm)/ Measure lábsorbance en l'espacede 30 min à 450 nm avec ≥590 nm longueur d'onde pour référence/ Misurazione entro 30 min. a 450 nm (filtro di riferimento ≥ 590 nm)/ Medición de la placa dentro de los siguientes 30 min a 450 nm (filtro de referencia ≥ 590nm)/ Medir a placa dentro de 30 min a 450 nm (Filtro de referéncia ≥ 590 nm)/ Binnen 30 minuten bij 450 nm meten (referentiefilter ≥ 590 nm)./ Mål plade i løbet af 30 min ved nm (referencefilter ≥590 nm)/ Mät inom 30 min vid 450 nm (referensfilter ≥ 590 nm)./ Pomiar w ciągu 30 min przy 450 nm (filtr odniesienia ≥ 590 nm)/ Ki mérés 30 percen belül 450 nm-nél (referenciaszűrő ≥ 590 nm)/ Merať 30 minút pri 450 nm (Referenčných filtrov ≥590 nm)/ Měřit 30 minut při 450 nm (Referenční filtr ≥ 590 nm)/ Отчитане в рамките на 30 min при 450 nm (референтен филтър ≥ 590 nm)/ Měřtmine 30 min jooksul 450 nm korral (võrdlusfilter ≥ 590 nm)/ Μέτρηση εντός 30 min στα 450 nm (φίλτρο αναφοράς ≥ 590 nm)/ Măsurare în decurs de 30 min la 450 nm (filtru de referință ≥ 590 nm)/ Izmerite ploščico v 30 min pri 450 nm (referenčni filter ≥590nm)/ Mittaa 30 minuutin aikana 450 nm:ssä (referenssi suodatin ≥ 590 nm)
Literature	Literature/ Literatur/ Bibliographie/ Letterario/ Bibliografia/ 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/ internationale testbeskriving/ internationell testbeskrivning/ Opis testu międzynarodowego/ nemzetközi teszt-útmutató/ Medzinárodný návod k testu/ Mezinárodní návod k testu/ rahvusvaheline katse kirjeldus/ Διεθνείς οδηγίες για εργαστηριακές δοκιμές/ instrucțiuni internaționale pentru testare/ mednarodna navodila za preizkus/ Kansainvälinen käyttöohje
End	in all required wells/ in allen benötigten Vertiefungen/ dans tous les godets requis/ in tutti i pozzetti richiesti/ en todos los pozos requeridos/ em todos os tubos necessários/ in alle nodige putjes/ i alle nødvendige brønde/ i alla nödvändiga brunnar/ we wszystkich potrzebnych wgłębieniach/ minden szükséges forrásban/ vo všetkých potrebných miestach/ ve všech potřebných místech/ във всички необходими ямки/ kõigis vajalikes süvendites/ σε όλες τις απαραίτητες κοιλότητες/ în toate cavitățile necesare/ v vseh zahtevanih vdolbinah/ kaikkiin tarvittaviin mikrotitrauslevyn syvennyksiin

TABLE OF CONTENTS / EL ÍNDICE

ENGLISH - Instructions for use	5
1 INTENDED USE	5
2 INTRODUCTION	5
3 PRINCIPLE	7
4 WARNINGS AND PRECAUTIONS	8
5 SAMPLES	9
6 MATERIALS	10
7 TECHNICAL NOTES	11
8 ASSAY PROCEDURE	12
9 QUALITY CONTROL	13
10 EVALUATION OF RESULTS	13
11 LIMITATIONS OF PROCEDURE	15
12 REFERENCE VALUES	15
13 PERFORMANCE CHARACTERISTICS	17
14 ASSAY COMPARISON	20
15 SCIENTIFIC APPLICATION	21
ESPAÑOL - Instrucciones de uso	23
1 USO PREVISTO	23
2 INTRODUCCIÓN	23
3 PRINCIPIO	25
4 PELIGROS Y PRECAUCIONES	26
5 MUESTRAS	27
6 MATERIALES	28
7 NOTAS TÉCNICAS	29
8 PROCEDIMIENTO DEL ENSAYO	30
9 CONTROL DE CALIDAD	31
10 EVALUACIÓN DE RESULTADOS	31
11 LIMITACIONES DEL PROCEDIMIENTO	33
12 VALORES DE REFERENCIA	34
13 CARACTERÍSTICAS DEL ENSAYO	36
14 COMPARACIÓN DEL ENSAYO	38
15 USO CIENTÍFICO	39
16 LITERATUR / REFERENCES	40
17 INTERNATIONALE ASSAY DESCRIPTION	41
18 PROCEDIMIENTO DEL ENSAYO	42

ENGLISH - Instructions for use

IGF-I ELISA E20	96 Determinations
CE	DE/CA40/00809/20
Principle of the test	Enzyme-linked Immunoassay
Duration (incubation period)	1.75 h
Antibodies	specific, monoclonal antibody and high-affinity polyclonal antiserum
Cross reactivity with IGF-II, Insulin, C-Peptide	< 0.1%
Buffers	Ready for use and 20fold concentrate
Calibrators	5 single Calibrators: 2 -50 ng/mL, recombinant human IGF-I
Reference material	International Standard WHO/NIBSC 02/254
Assay Range	0.09 – 1050 ng/mL
Controls	2 Controls, freeze-dried
Samples	human serum / plasma
Required sample volume	10 µL
Sample dilution	1:21
Analytical sensitivity	ø 0.09 µg/L
Intra- / Interassay Variance	ø < 10 %
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 ELISA E20 is intended to be used for the measurement of human IGF-I in serum and plasma samples. 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 II play a pivotal role in regulating the proliferation, differentiation and specific functions of many cell types (1-3). IGF-I is identical with Somatomedin C (Sm-C) (4) and has a molecular weight of 7649 Dalton (5). Its major regulators are growth hormone (GH) and nutrition (6), although its production in specific tissues is affected by a multitude of tropic hormones and other peptide growth factors. In contrast to many other peptide hormones, IGFs are avidly bound to specific binding proteins (IGFBP). The seven classes of IGFBPs which are known at present (7,8,22) either bind IGF-I and IGF-II with similar affinities or show a preference for IGF-II (9,10).

A major problem of IGF-I measurement results from the interference of IGFBPs in the assay. Direct determinations in untreated serum samples (11) give false values because of the extremely slow dissociation of the IGF-I/IGFBP-3 complexes during the assay incubation. Depending on the ratio IGF-I to IGFBP the following errors may occur (see also Figure 1):

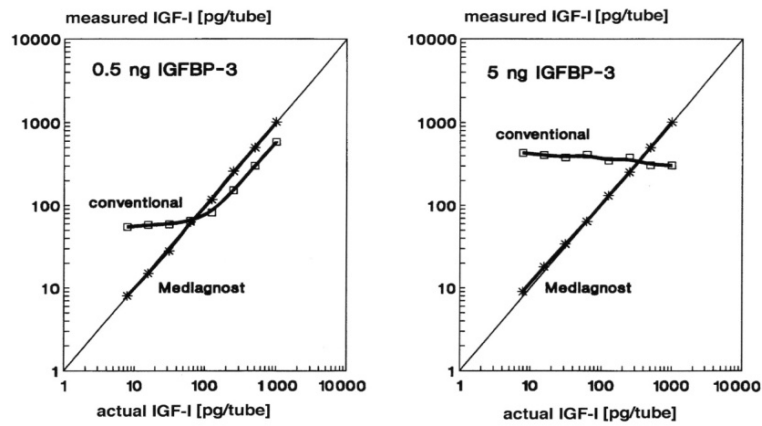


Fig 1. Interference of IGFBP in IGF-I measurements. Known concentrations of IGF-I were assayed in the presence of 0.5 ng (left) or 5 ng (right) hIGFBP-3 by a conventional (□) and by the IGFBP-blocked RIA (*).

Therefore, various techniques were applied to physically separate IGF-I from its binding proteins before measurement, including (a) size exclusion chromatography under acidic conditions, (b) solid-phase extraction and (c) acid-ethanol extraction (2,12,13). These techniques, however, are either inconvenient or time-consuming or give incomplete and not-reproducible recoveries. The most widely used method is the acid-ethanol extraction (13,14) with a recovery of only 70-80 % of IGFBP-bound IGF-I as a result of co-precipitation. The absolute results of such an extraction are therefore false low (15). The extraction removes the IGFBPs only insufficiently and leads to reduction in sensitivity of the assay due to pre-dilution of the samples by the extraction procedure. Furthermore, the remaining IGFBP may still interfere in the assay. In addition, the acid-ethanol extraction is ineffective in specimens other than serum or plasma (e.g. cell culture media), in which determination of IGF-I is already difficult enough due to the fact that IGFBPs are frequently present at large excess. To avoid these difficulties, an uncomplicated assay was developed, in which special sample preparation is not required before measurement.

Clinical Significance

There are apart from GH, a number of variables that influence serum IGF-I. Decreased levels are found in states of malnutrition/ malabsorption, hypothyroidism, liver disease, untreated diabetes mellitus, chronic inflammatory disease (1,6), malignant disease or polytrauma. High levels, on the other hand, are likely to be present in precocious puberty or obesity. Crucially important to the correct interpretation of IGF-I measurement is the relationship between age and IGF-I levels (see Table 2 and Fig.: 4-6).

Due to its GH-dependence, determination of serum IGF-I was shown to be a useful tool in diagnosis of growth disorders, especially with regard to GH deficiency (GHD) or acromegaly (6,16-19,23,24). The major advantage of IGF-I determination compared to GH determination is its stable circadian concentration; therefore a single measurement is sufficient. Hence IGF-I determination should be the first in a series of laboratory test. Clearly normal levels would then rule out disturbances of the GH-IGF-I-axis. Low levels, i.e. close to or below the age-related 5th percentile would indicate the necessity of further diagnostic efforts. Subnormal levels of IGF-I would be evidence for reduced GH secretion, if other causes of low serum IGF-I (e.g. malnutrition or impaired liver function) can be ruled out. For differentiation of healthy short children without GH deficiency and children with "classical" GH deficiency, the 0.1st percentile proved to be an appropriate cut-off point, especially after the age of eight. However, IGF-I levels of short children not suffering from GHD may nevertheless lay between the 0.1st and 5th percentile (19). In contrast, acromegaly is characterized by pathologically elevated IGF-I levels, which apparently reflect the severity of the disease better than GH-levels (17,18,20).

3 PRINCIPLE

The Mediagnost ELISA for IGF-I E20 is a so-called Sandwich-Assay. It utilizes two specific and high affinity antibodies for this protein. The IGF-I in the sample binds to the immobilized first antibody on the microtiter plate, the biotinylated and Streptavidin-Peroxidase conjugated second specific anti-IGF-I-Antibody binds in turn to the immobilized IGF-I. In the closing substrate reaction, the turn of the colour will be high specific catalysed, quantitatively depending on the IGF-I-level of the samples.

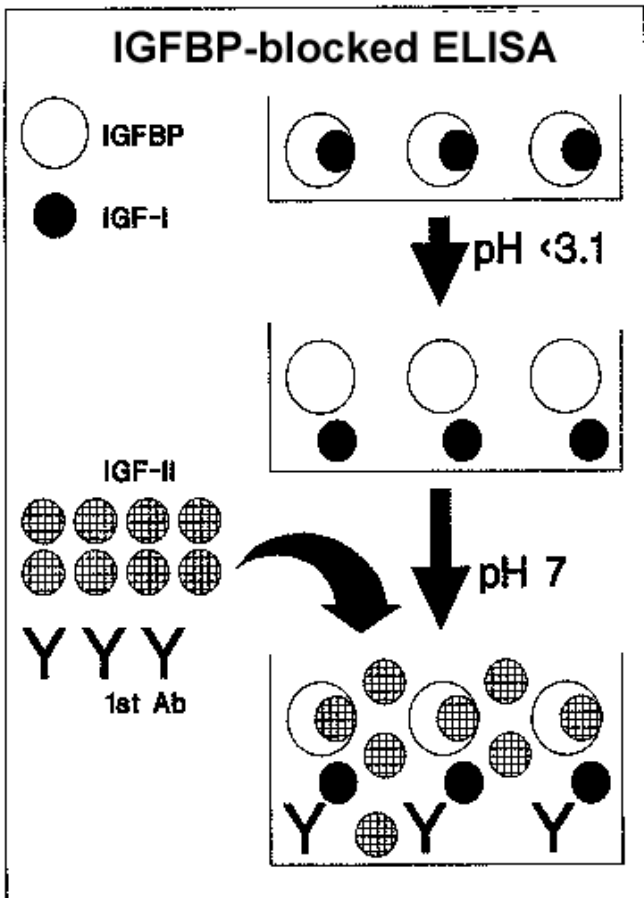


Fig. 2 Principle of the IGFBP blocked IGF-I ELISA

In order to dissociate IGF-I from the IGFBPs, the samples must be diluted in an acidic buffer (**Sample Buffer SB**) (Figure 2). The diluted samples are then pipetted into the wells, by this the pH-value will be neutralized. After neutralization of the samples, the excess IGF-II occupies the IGF-binding sites of the binding proteins, thus allowing the measurement of resulting free IGF-I. With this method, the IGFBPs are not removed, but their function and therefore their interference in the assay is neutralized.

Due to the extremely low cross-reactivity of the IGF-I antibody with IGF-II, the excess of IGF-II does not disturb the interaction with IGF-I.

The test runs like a conventional ELISA using a Streptavidin-Peroxidase-Enzyme Conjugate.

4 WARNINGS AND PRECAUTIONS

For In Vitro Diagnostic Use only. For Professional use only.

The Mediagnost kit is suitable only for in vitro diagnostics and not for internal use in humans and animals. Follow strictly the test protocol. Use the valid version of the package insert provided with the kit. Be sure that everything has been understood. Mediagnost will not be held responsible for any loss or damage (except as required by statute) howsoever caused, arising out of noncompliance with the instructions provided.

Caution: This kit contains material of human and/or animal origin. Therefore, all components and patient's specimens should be treated as potentially infectious.

Do not use obvious damaged or microbial contaminated or spilled material.

Appropriate precautions and good laboratory practices must be used in the storage, handling and disposal of the kit reagents. The disposal of the kit components must be made according to the local regulations.

Human Serum

Following components contain human serum: **Controls CTR1 and CTR2**

Source human serum for the Controls provided in this kit was tested and found non-reactive for Hepatitis-B surface antigen (HBsAg), Hepatitis C virus (HCV), and Human Immunodeficiency Virus 1 and 2 (HIV). No known methods can offer total security of the absence of infectious agents; therefore all components and patient's specimens should be treated as potentially infectious.

Components

All components of the product that contain hazardous substances in declarable concentrations in accordance with European Regulation 1272/2008 are listed below:

Antibody Conjugate DET / Enzyme Conjugate EC

The buffers contain the hazardous ingredients listed below, based on this the following labeling of the two mixtures results:

Hazard pictograms (CLP):



GHS07

Signal word (CLP):

Warning

Hazardous components:

2-methylisothiazol-3(2H)-one (< 0,06 %)
reaction mass of 5-chloro-2-methyl-2H-isothiazol-3-one and 2-methyl-2H-isothiazol-3-one (3:1) (< 0,015 %)

Hazard statements (CLP):

H317 - May cause an allergic skin reaction.

Safety instructions (CLP):

P280 - Wear protective gloves/protective clothing/eye protection/face protection/hearingprotection.

P272 - Contaminated work clothing should not be allowed out of the workplace.

P261 - Avoid breathing dust/fume/gas/mist/vapours/spray.

P333+P313 - If skin irritation or rash occurs: Get medical advice/attention.

P302+P352 - IF ON SKIN: Wash with plenty of Water.

P501 - Dispose of contents/container in accordance with national disposal regulations.

Washing Buffer WB / Sample Buffer SB

The buffers contain a mixture of 5-chloro-2-methyl-4-isothiazolin-3-one and 2-methyl-4-isothiazolin-3-one (< 0.015 %) as a preservative.

EUH208

Contains reaction mass of 5-chloro-2-methyl-2H-isothiazol-3-one and 2-methyl-2H-isothiazol-3-one (3:1).
May produce an allergic reaction.

EUH210

Safety data sheet available on request.

Stop Solution STP

The stop solution contains 0.2 M sulphuric acid.

EUH210

Safety data sheet available on request.

4.1 Protective equipment and first aid measures

After contact with skin:

Take off immediately all contaminated clothing. Rinse skin with water or shower. In case of skin reactions, consult a physician.

After contact with eyes:

Rinse cautiously with water for several minutes. Remove contact lenses, if present and easy to do. Continue rinsing. In case of eye irritation consult an ophthalmologist.

After ingestion:

Call a doctor if you feel unwell.

Avoid contact with the ingredients. Detailed information on personal protective equipment and first aid measures can be found in the safety data sheet for IGF-I ELISA E20. This can be accessed electronically via the Mediagnost GmbH website at www.mediagnost.de or will be made available on request via contact@mediagnost.de.

5 SAMPLES

5.1 Sample type

Serum and Plasma

Serum and Heparin/EDTA Plasma yield comparable values. The IGF-I levels are reduced in citrate plasma samples, because of the relatively high amount of anticoagulant.

5.2 Specimen collection

Use standard venipuncture for the blood sampling. Haemolytic reactions 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. 24 hours
- Storage at -20° C: min. 2 years
- Freeze-thaw cycles max. 3

The storage of samples over a period of 2 years at -20°C, showed no influence on the reading. Freezing and thawing of samples should be minimized. 3 Freezing-Thawing showed no effect on samples.

5.5 Interference

Triglyceride, bilirubin and hemoglobin in the sample do not interfere to a concentration of 100 mg/mL and 200 µg/mL or 1 mg/mL. However, the use of hemolytic, lipemic or icteric samples should be validated by the user.

5.6 Sample dilution

- Dilution: **1:21** with Sample Buffer **SB**
- Pipette **200 µL Sample Buffer SB** in PE-/PP-Tube (application of a multi-stepper is recommended in larger series); add **10 µL sample** (dilution 1:21). After mixing use 2 x 20 µL of this dilution in the assay.
- Attention: serum and plasma samples must be diluted at least 1:10 in **Sample Buffer SB** in order to achieve sufficient acidification of the samples.
- Depending on the expected IGF-I values the samples can be diluted higher in **Sample Buffer SB**.
- Sample stability after dilution of the sample: maximum 2 hours at 20-25°C.

6 MATERIALS

6.1 Materials provided

The reagents listed below are sufficient for 96 wells including the Kalibrator curve.

MTP	Microtiter plate , ready for use, coated with mouse-anti-hIGF-I-antibody. Wells are separately breakable.	(8x12) wells
CAL A-E	Calibrators A – E , lyophilized, (recombinant human hIGF-I), concentrations are given on vial labels and on lot certificate.	5 x 500 µL
CTR1	Control Serum 1 , lyophilised, (human serum), concentration is given on lot certificate.	1 x 500 µL
CTR2	Control Serum 2 , lyophilised, (human serum), concentration is given on lot certificate.	1 x 500 µL
DET	Antibody Conjugate , ready for use, contains goat biotinylated anti-hIGF-I antibody.	1 x 9 mL
EC	Enzyme Conjugate , ready for use, contains HRP (Horseradish-Peroxidase)-labelled Streptavidin.	1 x 12 mL
SB	Sample Buffer , ready for use.	1 x 25 mL
WB	Washing Buffer , 20-fold concentrated solution	1 x 50 mL
S	Substrate , ready for use, horseradish-peroxidase-(HRP) substrate, stabilised Tetramethylbencidine.	1 x 12 mL
STP	Stop Solution , ready for use, 0.2 M sulphuric acid.	1 x 12 mL
CF	Cover Foil , for covering the microtiter plate .	2 x
CERT	Lot Certificate	1 x

6.2 Materials required, but not provided

- Distilled (Aqua destillata) or deionized water for dilution of the Washing Buffer **WB (A. dest.)**, **950 mL**.
- Precision pipettes and multichannel pipettes with disposable plastic tips
- Polyethylene PE/Polypropylene PP tubes for dilution of samples
- Vortex-mixer
- Microtiter plate shaker (350 rpm)
- Microtiter plate washer (recommended)
- Micro plate reader ("ELISA-Reader") with filter for 450 and ≥ 590 nm

7 TECHNICAL NOTES

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.

Storage Life

The shelf life of the components **after initial opening** is warranted for **4 weeks**, store the unused strips and microtiter wells **airtight** together with the desiccant at 2-8°C in the clip-lock bag, use in the frame provided. The **reconstituted components**: Calibrators **A-E** and Controls **CTR1** and **CTR2** must be stored at -20°C (max. 4 weeks). For further use, thaw quickly but gently (avoid temperature increase above room temperature and avoid excessive vortexing). Up to 3 of the freeze-thaw cycles did not influence the assay. The 1:20 diluted Washing Buffer **WB** is 4 weeks stable at 2-8°C

Preparation of reagents

Bring all reagents to room temperature (20 - 25°C) before use. Possible precipitations in the buffers have to be resolved before usage by mixing and / or warming. Reagents with different lot numbers cannot be mixed.

Reconstitution

The Calibrators **A – E** and Controls **CTR1** and **CTR2** are reconstituted with the Sample Buffer **SB**. It is recommended to keep reconstituted reagents at room temperature for 15 minutes and then to mix them thoroughly but gently (no foam should result) with a Vortex mixer.

Dilution

After reconstitution dilute the Controls **CTR1** and **CTR2** with the Sample Buffer **SB** in the same ratio (1:21) as the sample. The required volume of Washing Buffer **WB** is prepared by 1:20 dilution of the provided 20fold concentrate with Aqua dest.

Assay Procedure

When performing the assay, Blank, Calibrators **A-E**, Controls **CTR1** and **CTR2** and the samples should be pipette as fast as possible (e.g. <15 minutes). To avoid distortions due to differences in incubation times, Antibody Conjugate **DET** and the Enzyme Conjugate **EC** as well as the succeeding Substrate **S** should be added to the plate in the same order and in the same time interval as the samples. Stop Solution **STP** should be added to the plate in the same order as Substrate **S**. All determinations (Blank, Calibrators **A-E**, Controls **CTR1** and **CTR2** and samples) should be assayed in duplicate. For optimal results, accurate pipetting and adherence to the protocol are recommended.

Incubation

Incubation at room temperature means: Incubation at 20 - 25°C. The Substrate **S**, stabilised Tetramethylbencidine, is photosensitive—storage and incubation in the dark.

Shaking

The incubation steps should be performed at mean rotation frequency of a microtiter plate shaker. We recommend 350 rpm. Depending on the design of the shaker, the shaking frequency should be adjusted. Insufficient shaking may lead to inadequate mixing of the solutions and thereby to low optical densities, high variations and/ or false values, excessive shaking may result in high optical densities and/ or false values.

Washing

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

All washing must be performed with the provided Washing Buffer **WB** diluted to usage concentration. Washing volume per washing cycle and well must be 300 µL at least.

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

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

8 ASSAY PROCEDURE

Preparation of reagents		Reconstitution:	Dilution
CAL A-E	Calibrators	in 500 µL Sample Buffer SB	-
CTR1	Control 1	in 500 µL Sample Buffer SB	1:21 with Sample Buffer SB
CTR2	Control 2	in 500 µL Sample Buffer SB	1:21 with Sample Buffer SB
WB	Washing Buffer conc.		1:20 with Aqua dest. → WB 1:20
Samples + Controls CTR1 and CTR2: dilute 1:21 in Sample Buffer SB, mix immediately, incubate max. 2h. Use 20 µl for each well in the assay.			
Before assay procedure bring all reagents to room temperature (20-25°C).			
Assay procedure in double determination			
Pipette	Reagents	Position	
80 µL	Antibody Conjugate DET	in all wells used	
20 µL	Sample Buffer SB (Blank)	A1/A2	
20 µL	Calibrator A (2 ng/mL)	B1/B2	
20 µL	Calibrator B (5 ng/mL)	C1/C2	
20 µL	Calibrator C (15 ng/mL)	D1/D2	
20 µL	Calibrator D (30 ng/mL)	E1/E2	
20 µL	Calibrator E (50 ng/mL)	F1/F2	
20 µL	Control CTR1 (1:21 diluted)	G1/G2	
20 µL	Control CTR2 (1:21 diluted)	H1/H2	
20 µL	Sample SPE (1:21 diluted)	in the rest of the wells according the requirements	
Cover the wells with the cover foil.			
Sample Incubation: 1 h at 20-25°C, 350 rpm			
5x 300 µL	Aspirate the contents of the wells and wash 5 x with 300 µL each Washing Buffer WB 1:20 /well	In each well	
100 µL	Enzyme Conjugate EC	In each well	
Cover the wells with the cover foil.			
Incubation: 30 Minutes at 20-25°C, 350 rpm			
5x 300 µL	Aspirate the contents of the wells and wash 5 x with 300 µL each Washing Buffer WB 1:20 / well	In each well	
100 µL	Substrate S	In each well	
Incubation: 15 Minutes in the Dark at 20-25°C			
100 µL	Stop Solution STP	In each well	
Measure the absorbance within 30 min at 450 nm with ≥ 590 nm as reference wavelength.			

9 QUALITY CONTROL

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

9.1 Quality criteria

For the evaluation of the assay it is required that the absorbance values of the blank should be below 0.25, and the absorbance of Calibrator E should be above 1.00.

Samples, which yield higher absorbance values than **Calibrator E**, should be re-tested with a higher dilution.

10 EVALUATION OF RESULTS

IGF-I levels are highly age-dependent in children, less so in adults until the age of about 60. The normal ranges in various age groups, which are log-normally distributed, are given in Table 2 by percentiles. Between 8 and 19 years of age, values are given for boys and girls separately, because the pubertal peak usually occurs approximately 2 years earlier in girls. A graphic presentation is shown in Figures 4, 5 and 6. A major problem for the interpretation of IGF-I values arises from the fact that short stature is often due to developmental delay rather than any metabolic or endocrine disorder (constitutional delay of growth and adolescence). The sharp rise in IGF-I levels during puberty may therefore cause some uncertainty as to whether or not it would be appropriate to relate measured values to chronological age. It is recommended to take the pubertal stage into account (Table 1) to get a more complete picture of this situation.

10.1 Establishing of the Calibrator curve

The International Standard for hIGF-I, WHO NIBSC Code 02/254 was used as calibrator material and the following IGF-I concentrations are used.

Calibrator	A	B	C	D	E
ng/mL	2	5	15	30	50
nmol/L	0.26	0.66	1.96	3.92	6.54

- 1) Calculate the **mean absorbance** value for the blank from the duplicated determination (well A1/A2).
- 2) Subtract the mean absorbance of the blank from the mean absorbances of all samples, controls and calibrators.
- 3) Plot the Calibrator concentrations on the x-axis versus the mean value of the absorbance of the Calibrators on the y-axis.
- 4) Recommendation: Calculation of the Calibrator curve should be done by using a computer program, because the curve is in general (without respective transformation) not ideally described by linear regression. **A higher-grade polynomial, or four parametric logistic (4-PL) curve fit or non-linear regression** are usually suitable for the evaluation (as might be spline or point-to-point alignment in individual cases).
- 5) The IGF-I concentration in ng/mL of the samples can be calculated by **multiplication** with the respective **dilution factor**.

10.2 Example of a typical Calibrator curve

The following data is for demonstration only and cannot be used in place of data generation at the time of assay.

	Blank	A	B	C	D	E
ng/mL	0.0	2	5	15	30	50
OD _(450-620 nm)	0.00	0.088	0.299	0.985	1.727	2.543

The exemplary shown Calibrator curve in Figure 3 **cannot** be used for calculation of your test results. You have to establish a calibration curve for each test you conduct!

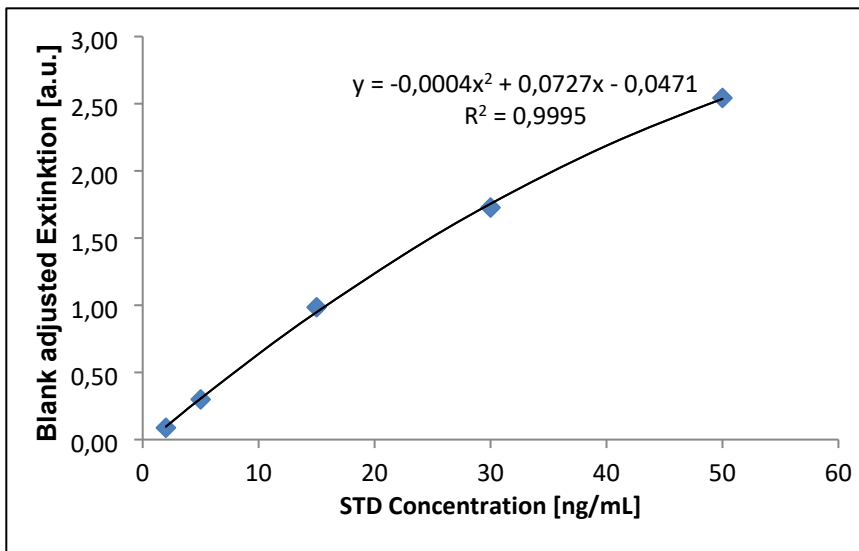


Fig. 3 Exemplary calibration curve

10.3 Exemplary calculation of IGF-I concentrations

Sample dilution: 1:21

Measured extinction of the blank	0.0165
Measured extinction of your sample	0.2695

Your measurement program will calculate the IGF-I concentration of the diluted sample automatically by using the difference of sample and blank for the calculation. You only have to determine the most suitable curve fit.

In this exemplary case the following equation is solved by the program to calculate the IGF-I concentration in the sample:

$$0.253 = -0.0004x^2 + 0.0727x - 0.0471$$

$$4.57 = x$$

If the dilution factor (**1:21**) is taken into account the **IGF-I** concentration of the undiluted sample is

$$4.57 \text{ ng/mL} \times 21 = 96 \text{ ng/mL}$$

10.4 Interpretation of results

The test results should not be the only base for therapeutic decisions. The results should be interpreted in regard to anamnesis, further clinical observations and results of other diagnostic investigations. Further, it is recommended to establish reference and cut-off values corresponding to the relevant group of patients for each laboratory. Please consider the international and national guidelines for diagnosis and treatment of growth hormone deficiency / acromegaly.

11 LIMITATIONS OF PROCEDURE

IGF-I levels depend to a great degree on GH secretion. Diminished IGF-I values, however, do not prove GH deficiency, because a number of other factors can influence the plasma concentration of IGF-I and must therefore be taken into account in order to make a correct interpretation. IGF-I levels decrease during fasting (more than 1 day), as a result of malnutrition, malabsorption, cachexia, impaired hepatic function, or in hypothyroidism and untreated diabetes mellitus. They may also be low in chronic inflammatory disease and malignancies. IGF-I levels are high in states of accelerated sexual development. In clinical situations with hyperprolactinemia or in patients with craniopharyngioma, normal levels may be observed despite GH deficiency. In late pregnancy, IGF-I levels are moderately elevated.

The Mediagnost IGF-I ELISA is based on mono- and polyclonal antibodies. Generally the result of any immunological test system can be influenced by heterophilic antibodies, anti-species antibodies or rheumatic factors. The assay design reduces these potential influences to a minimum but they cannot be excluded in any case.

12 REFERENCE VALUES

IGF-I levels are highly age-dependent in children, less so in adults until the age of about 60. The normal ranges in various age groups, which are log-normally distributed, are given in Table 2 by percentiles. These values are given only for guidance; each laboratory should establish its own reference of values for the diagnostic evaluation of patient results.

Between 8 and 19 years of age, values are given for boys and girls separately, because the pubertal peak usually occurs approximately 2 years earlier in girls. A graphic presentation is shown in Figures 4, 5 and 6. A major problem for the interpretation of IGF-I values arises from the fact that short stature is often due to developmental delay rather than any metabolic or endocrine disorder (constitutional delay of growth and adolescence). The sharp rise in IGF-I levels during puberty may therefore cause some uncertainty as to whether or not it would be appropriate to relate measured values to chronological age. It is recommended to take the pubertal stage into account (Table 1) get a more complete picture of this situation.

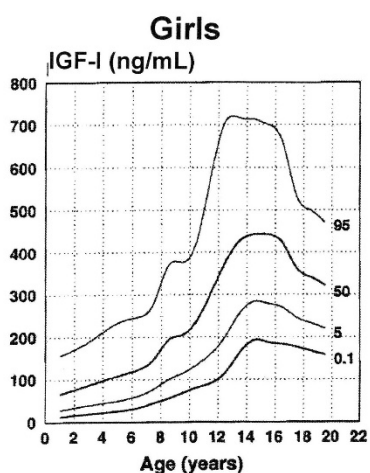


Fig. 4.: Age-dependent reference range of serum IGF-I levels in girls.

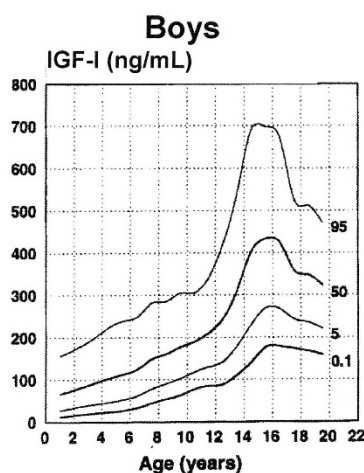


Fig. 5.: Age-dependent reference range of serum IGF-I levels in boys.

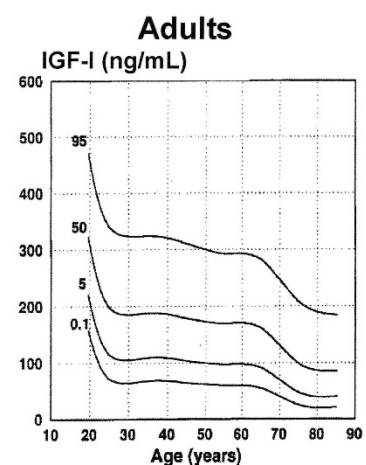


Fig. 6.: Age-dependent reference range of serum IGF-I levels in adults.

Table 1 Normal range of serum IGF-I levels given in ng/mL at different pubertal stages according to Tanner. Because no significant difference between boys and girls is observed, both sexes are combined. Only children and adolescents between 7 and 17 years of age are included.

Pubertal Stage	Percentile			
	0.1th	5th	50th	95th
1	61	105	186	330
2	85	156	298	568
3	113	196	352	631
4	171	268	431	693
5	165	263	431	706

Table 2 Serum levels of IGF-I in healthy subjects at various ages. Individuals between 8 and 19 years of age were classified according to gender, as the pubertal peak occurs almost 2 years earlier in girls than in boys.

Age	Percentile													
	0.1	1	5	10	20	30	40	50	60	70	80	90	95	99
0-2 y.	13	20	28	34	43	50	58	66	75	87	102	128	156	220
2-4 y.	20	29	40	48	59	68	77	87	98	111	129	159	189	260
4-6 y.	26	36	50	59	73	85	96	108	122	138	160	196	233	320
6-7 y.	34	46	62	72	87	99	111	124	138	155	176	212	248	332
7-8 y.	45	60	78	90	107	121	134	148	163	181	205	243	281	364
8-9 y. boys	54	71	90	102	119	133	146	160	175	192	214	250	284	362
8-9 y. girls	55	75	99	115	137	156	174	193	214	239	271	324	376	496
9-10 y. boys	63	82	102	115	133	148	162	176	191	209	232	269	304	379
9-10 y. girls	68	89	114	130	152	170	187	205	224	247	276	323	369	469
10-11 y. boys	77	96	117	130	148	162	176	189	203	220	241	274	305	370
10-11 y. girls	81	106	134	153	178	199	219	239	261	287	321	374	426	539
11-12 y. boys	85	106	129	144	163	179	194	209	225	244	267	304	339	413
11-12 y. girls	91	123	160	185	220	248	276	305	337	374	424	503	581	758
12-13 y. boys	88	112	141	159	184	204	223	243	264	289	321	371	419	525
12-13 y. girls	116	155	201	231	274	309	342	377	415	460	519	614	707	914
13-14 y. boys	111	143	179	203	235	261	286	311	339	371	412	477	540	677
13-14 y. girls	163	207	256	287	329	364	395	428	463	504	556	637	716	884
14-15 y. boys	140	182	229	260	303	337	370	404	441	484	539	625	691	896
14-15 y. girls	193	236	284	314	353	385	414	443	474	510	556	628	713	832
15-16 y. boys	176	221	269	299	340	372	402	433	466	504	552	626	697	849
15-16 y. girls	187	231	279	309	350	382	412	442	474	512	559	632	700	845
16-17 y. boys	178	221	267	296	335	366	395	424	455	491	537	607	673	814
16-17 y. girls	183	225	270	298	336	366	394	422	452	486	530	597	660	792
17-18 y. boys	173	207	243	265	294	317	337	358	380	405	436	484	527	618
17-18 y. girls	176	210	246	268	297	320	341	362	384	409	441	488	533	624
18-19 y. boys	167	201	235	256	285	307	327	347	368	393	423	469	512	600
18-19 y. girls	167	199	233	254	281	302	322	341	362	385	414	458	499	583
19-20 y.	158	189	220	240	265	285	304	322	341	363	391	433	471	550
20-30 y.	72	92	115	130	150	167	182	198	215	235	261	302	340	425
30-40 y.	68	87	109	123	142	158	173	188	204	223	248	287	324	404
40-50 y.	64	82	103	116	135	150	164	178	194	212	235	272	310	385
50-60 y.	60	77	97	110	127	142	155	169	184	201	224	260	292	369
60-70 y.	55	72	91	103	120	134	147	161	176	193	215	251	282	362
70-80 y.	25	35	47	55	67	78	88	98	110	124	142	173	207	276
>80 y.	21	30	40	47	58	67	76	85	95	108	125	153	184	245

Serum concentrations are given in ng/ml.

Reference values have been evaluated by Prof Blum by a radioimmunoassay identical to Mediagnost IGF-R20. Thus, the age and sex specific reference values published in Diagnostics of Endocrine Function in Children and Adolescents (Edited by Prof Ranke. ISBN-3-335-00496-5) can be applied to all Mediagnost IGF-I assays. Generally, a standard deviation score of +/- 2 SDS is acknowledged as pathological and should initiate further investigations regarding clinical symptoms.

13 PERFORMANCE CHARACTERISTICS

13.1 Sensitivity

Sensitivity was assessed by measuring the blank and calculating the theoretical concentration of the blank + 2SD. The analytical sensitivity of the Mediagnost E20 is 0.091 ng/mL as mean, in 19 independent determinations values from 0.03 ng/mL to 0.2 ng/mL were found.

13.2 Specificity

The measurements of E20 cross reactivity with IGF-II, Insulin and C-Peptide. These IGF-related proteins were added to assay buffer in the indicated concentration and the solution was applied as sample without any further dilution. The concentration measured within the blank without any protein was 0.78 µg/L. Thus, neither IGF-II nor Insulin or C-Peptide are measured by the Mediagnost E20 ELISA (see table 3).

Table 3 Specificity. Cross reactivity of the test system with different IGF-I related proteins.

added C-Peptide [µg/L]	measured IGF-I [µg/L]	added Insulin [µg/L]	measured IGF-I [µg/L]	added IGF-II [µg/L]	measured IGF-I [µg/L]
500	0.73	100	0.78	1250	0.77
100	0.78	10	0.77	750	0.73
10	0.77	1	0.76	250	0.77
0	0.78	0	0.78	0	0.78

13.3 Precision

Intra-Assay Variance

Three samples have been measured severalfold in the same assay. The results are shown in Table 4. The measured coefficient of variation (CV) is 5.81% on average.

Table 4 Intra-Assay variability

	Number of determinations	Mean value (ng/mL)	Standard deviation (ng/mL)	VC (%)
Sample 1	18	144.8	9.63	6.65
Sample 2	18	140.79	7.15	5.08
Sample 3	18	138.02	7.86	5.69

Inter-Assay and Lot-to-Lot Variance

Serum samples were measured in independent assays. Exemplary results are shown in table 5. Further, five samples were also tested repeatedly four years in eight different lots. The variability on average is 8.57% (6.8 – 10.5%).

Table 5 Inter-Assay variability

	Number of determinations	Mean value [ng/mL]	Standard deviation [ng/mL]	VC [%]
Sample 1	8	81	5.34	6.56
Sample 2	16	192	12.38	6.43
Sample 3	17	498	27.52	5.53

13.4 Linearity

Linearity was tested by dilution of native sera with different IGF-I contents (Sample 1-3). The amount of measured IGF-I was recalculated and is shown in Figure 7.

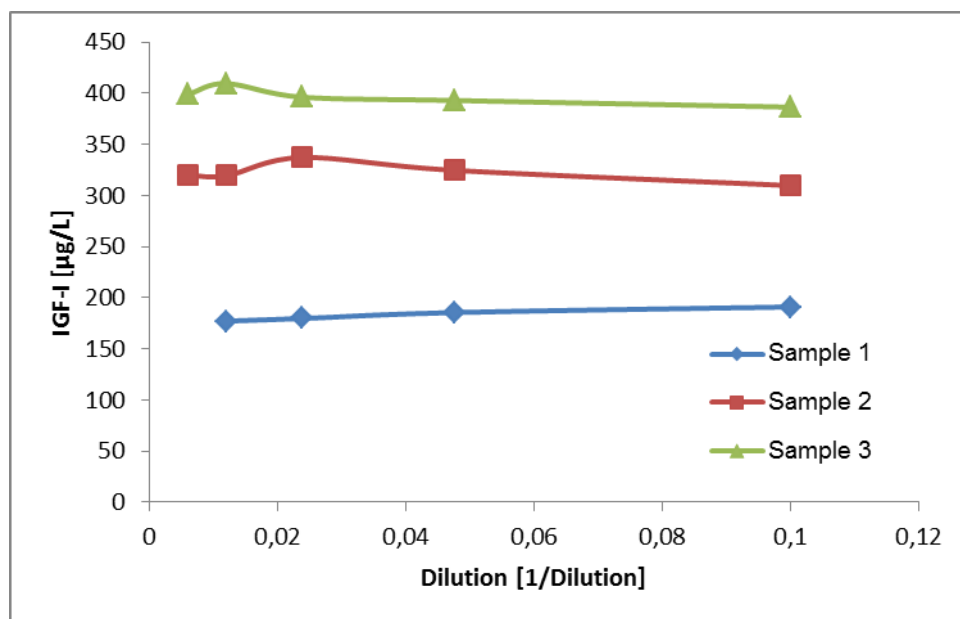


Fig. 7 Linearity, recalculated IGF-I concentrations of differentially diluted samples. The minimal dilution is 1:10, the recommended dilution is 1:21.

13.5 Recovery and Accuracy

Recombinant IGF-I was added in different amounts to human serum. The IGF-I content of the so enriched samples was measured and recovery in comparison to enriched buffer calculated. Results are shown in Table 6.

Table 6 Recovery of recombinant IGF-I in human serum

IGF-I [µg/L]	Sample 1	Sample 2	Sample 3	Sample 4
Sample	138	172	133	180
+ IGF-I 200	287	372	-	-
+ IGF-I 400	-	-	539	591
% Recovery	85	100	101	102

13.6 Trueness / Assay Calibration

Recombinant IGF-I produced by E. coli and of >98% purity (SDS-PAGE, Silverstain) is used as calibrator within the assay. The traceability of this recombinant calibration material to the international reference material of the WHO 02/254 has been proven. Results are published by Burns C et al. in Growth Horm IGF Res. 2009 Oct;19(5):457-62. Epub 2009 Mar 20. Mediagnost E20 ELISA is coded by 14c.

The reference material includes **8.5 µg/ampoule** IGF-I measured by amino acid analysis and HPLC. Mediagnost E20 immunoassay (assay No. 14c) measures **11.55 µg/ampoule**. The mean of all tested immunoassays is 11.61 µg/ampoule.

Thus, Mediagnost results are comparable to other immunological tests for measurement of IGF-I and can easily be transformed to WHO 02/254 by a factor of **0.735**.

13.7 Interference

Interference of bilirubin and triglycerides was tested by adding different amounts of these substances to human serum containing IGF-I. For comparison the same amount of buffer without any substance was also added to the serum. Table 7 demonstrates that neither bilirubin nor triglycerides exert any influence on the measurement of IGF-I in human serum.

Table 7 Interference of physiologic substances on IGF-I measurement. Human serum samples were enriched with different amounts of triglycerides, bilirubin or hemoglobin and the recovery of IGF-I was measured. Here the relative recovery in [%] of not enriched samples is shown.

	Triglyceride 100 mg/mL	Bilirubin 200 µg/mL	Hemoglobin 10 mg/ml
Serum 1	93	90	97
Serum 2	100	101	110
Serum 3	120	120	104

Influence of binding proteins on IGF-I measurement was exemplarily elucidated with IGFBP-3.

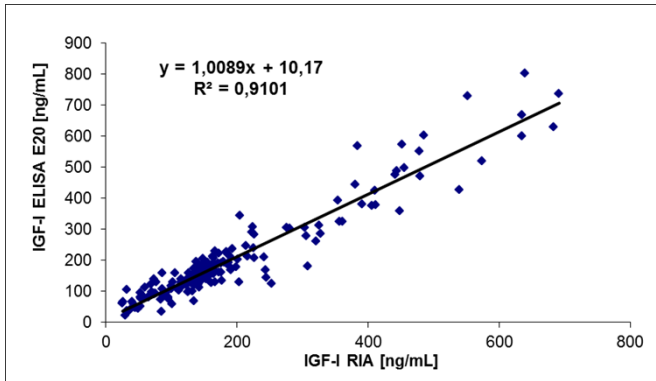
Different amounts of IGF-I and 3 or 6 mg/L of IGFBP-3 were added to sample buffer (pH 2) and phosphate based saline buffer (pH 7.4). After a short incubation of 15 minutes at room temperature these samples were diluted and applied to the Mediagnost E20 as described in the package insert. In case of sample buffer IGFBP-3 up to 6 mg/L did not interfere with IGF-I measurement. But without acidification of the sample a strong interference of IGFBP-3 with IGF-I measurement was detected (Table 8).

Table 8 Interference of IGFBP-3 with IGF-I measurement

IGFBP-3	Sample Buffer		
	50 µg/L IGF-I	100 µg/L IGF-I	300 µg/L IGF-I
-	46.38	116.14	358.1
3 mg/L	47.33	115.83	384.15
6 mg/L	52.32	123.38	355.41
IGFBP-3	Phosphate buffered Saline		
	50 µg/L IGF-I	100 µg/L IGF-I	300 µg/L IGF-I
-	34.2	90.23	349.04
3 mg/L	7.4	12.16	152.14
6 mg/L	7.2	10.12	48.15

14 ASSAY COMPARISON

Mediagnost E20 IGF-I was compared with the Mediagnost R20 IGF-I. 196 serum samples were measured in both assays and an excellent coefficient of correlation was shown with $r = 0.95$. Additionally, the Mediagnost IGF-I ELISA E20 was compared with an Enzyme-Immunoassay of other commercially available IGF-I test and a correlation of $R^2 > 0.9$ was shown.



Mediagnost ELISA E20

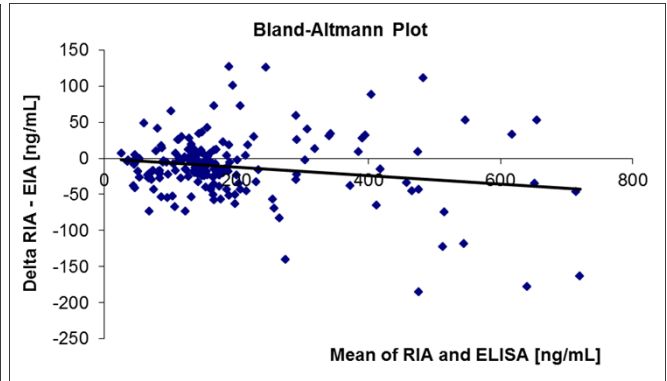


Fig. 8 Assay Comparison Mediagnost RIA R20 and

Instructions for use for scientific application

15 SCIENTIFIC APPLICATION

IGF-I is present in low concentrations in various body fluids and in conditioned cell culture media of many cell lines. However, the determination of IGF-I in these specimens is particularly difficult due to the presence of IGFBPs usually in excessive amounts. The IGFBP-blocked IGF-I ELISA avoids these problems and allows the simple, correct and sensitive IGF-I determination in numerous samples with minimal expenditure of time.

15.1 Samples suitable for scientific application

Serum, plasma, cerebrospinal and urine samples, as well as in cell culture media. The IGF-I levels can vary considerable, the optimal dilution must be found out by the customer. Recombinant IGF-I could be measured in **1:2 in Sample Puffer SB diluted urine, cerebrospinal fluid and in cell culture media**, if species cross reactivity was taken into account (FCS supplemented media).

Measurement of IGF-I in cell lysates is possible. A suitable lysis buffer might be: 10 mM Tris/ 5 mM EDTA/ 50 mM NaCl/ 30 mM Sodium Pyrophosphate/ 50mM Sodium Fluoride/ 100 µM Sodium Orthovanadate/ 1 mM PMSF/ 1% Triton X-100.

But the amount of intracellular IGF-I is also crucial: if it is too low (0.09 ng/mL or 0.9 ng/mL in case of 1:10 dilution), the sensitivity of the assay might not be sufficient.

The measurement must be validated for each different tissue as well as for each different cell line. If there is no IGFBP expression in the respective tissue or cell line, the dilution might be skipped and the cell lysate can be used as sample. For method validation we recommend to use recombinant IGF-I and the lysis buffer as well as some cell lysate for recovery experiments. A reference publication measuring IGF-II in cell lysate and cell culture supernatant is available: Mohlin S, Hamidian A, Pålman in NEOPLASIA, 2013, Volume 15 No 3.

15.2 Cross reactions with animal samples

Several commercially available animal sera have been used as samples in this assay and therewith it is proven, that the test can be used as heterologous assay for IGF-I measurement in serum samples of primates, cattle, pig, sheep, horse, donkey, goat, dog, cat, rabbit and guinea pig. For the determination of IGF-I in chicken, rat and mouse sera is this kit not usable.

Species specific calibration has to be done by the user.

To determine exact species-specific IGF-I concentrations, the test system must be calibrated respectively: for example, using bovine IGF-I in a known concentration.

ESPAÑOL - Instrucciones de uso

EL ÍNDICE

ESPAÑOL - Instrucciones de uso	23
1 USO PREVISTO.....	23
2 INTRODUCCIÓN.....	23
3 PRINCIPIO	25
4 PELIGROS Y PRECAUCIONES.....	26
5 MUESTRAS.....	27
6 MATERIALES	28
7 NOTAS TÉCNICAS.....	29
8 PROCEDIMIENTO DEL ENSAYO.....	30
9 CONTROL DE CALIDAD.....	31
10 EVALUACIÓN DE RESULTADOS	31
11 LIMITACIONES DEL PROCEDIMIENTO	33
12 VALORES DE REFERENCIA.....	34
13 CARACTERÍSTICAS DEL ENSAYO.....	36
14 COMPARACIÓN DEL ENSAYO.....	38
15 USO CIENTÍFICO.....	39
16 LITERATUR / REFERENCES.....	40
17 INTERNATIONALE ASSAY DESCRIPTION	41
18 PROCEDIMIENTO DEL ENSAYO	42

ESPAÑOL - Instrucciones de uso

IGF-I ELISA E20	96 Determinaciones
CE	DE/CA40/00809/20
Principio del test	Inmunoensayo enzimático
Duración (periodo de incubación)	1,75 h
Anticuerpos	Anticuerpo monoclonal específico y antisuero policlonal de alta afinidad
Reactividad cruzada con IGF-II, Insulina, Péptido C	< 0,1%
Tampón	Listo para usar. Concentrado 20 veces
Calibrador	5 estándares individuales: 2 -50 ng/mL, IGF-I recombinante humana
Material de Referencia	Estándar Internacional WHO/NIBSC 02/254
Rango del ensayo	0,09 – 1050 ng/mL
Control	2 sueros control, liofilizados
Muestra	Suero/ Plasma humanos
Volumen de muestra requerido	10 µL
Dilución de la muestra	1:21
Sensibilidad analítica	ø 0,09 µg/L
Variación Intra- / Interensayo	ø < 10 %
Valores de Referencia	Blum W.F., Schweizer R. "Insulin-Like Growth Factors and Their Binding Proteins". In: Ranke MB (ed): <i>Diagnostics of Endocrine Function in Children and Adolescents</i> . Basel, Karger, 2003, pp.166-199.

1 USO PREVISTO

El ELISA E20 está destinado a la medida de IGF-I humana en muestras de suero y plasma. En combinación con el crecimiento retardado y otros síntomas clínicos, los resultados de este test pueden usarse como dato complementario para evaluar alteraciones en el eje de la hormona del crecimiento.

2 INTRODUCCIÓN

Los factores de crecimiento tipo Insulina (IGF) I y II desempeñan un papel fundamental en la regulación de la proliferación, diferenciación y funciones específicas de muchos tipos de células (1-3). El IGF-I es idéntico a la Somatomedina C (Sm-C) (4) y tiene un peso molecular de 7649 Dalton (5). Sus principales reguladores son la hormona del crecimiento (GH) y la nutrición (6), aunque su producción en tejidos específicos está afectada por multitud de hormonas trópicas y otros factores peptídicos de crecimiento. A diferencia de muchas otras hormonas peptídicas, los IGFs están ávidamente fijados a proteínas de unión específicas (IGFBP). Las siete clases de IGFBPs que se conocen hasta la fecha (7, 8, 22) o bien se unen al IGF-I y al IGF-II con afinidades similares o muestran una preferencia por el IGF-II (9,10). Uno de los principales problemas de la medición del IGF-I es la interferencia de las IGFBPs en el ensayo. Las determinaciones directas en muestras de suero no tratadas (11) dan resultados erróneos debido a la disociación extremadamente lenta de los complejos IGF-I/IGFBP-3 durante la fase de incubación. Dependiendo de la relación IGF-I / IGFBP, se pueden producir los siguientes errores (véase ejemplo de la Figura 1):

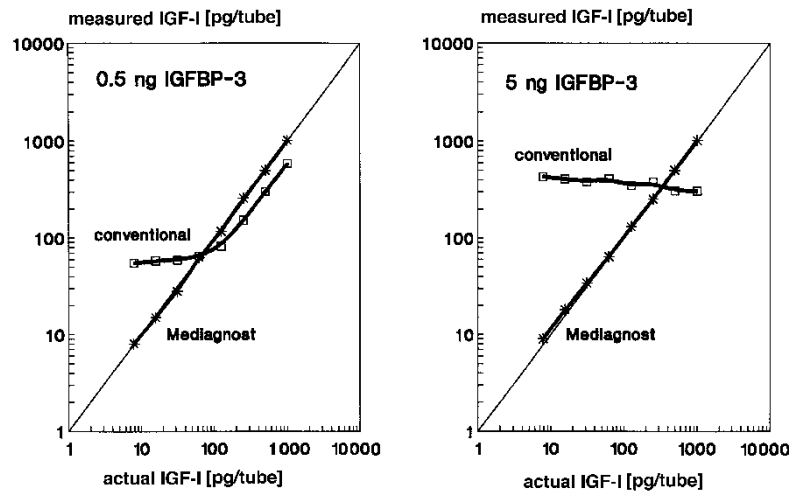


Fig. 1. Interferencia de la IGFBP en la medición del IGF-I. Se midieron concentraciones conocidas de IGF-I en presencia de 0,5 ng (izquierda) o 5 ng (derecha) de hIGFBP-3 utilizando un ensayo convencional (□) y un ensayo con bloqueo de IGFBP(*).

Por lo tanto, se aplicaron diversas técnicas para separar físicamente la IGF-I de sus proteínas de unión antes de efectuar la medición, incluyendo (a) la cromatografía de exclusión por tamaño en condiciones de acidez, (b) la extracción en fase sólida, y (c) la extracción en etanol ácido (2,12,13). Sin embargo, estas técnicas o bien no son convenientes o requieren inversión de tiempo o producen recuperaciones incompletas y no reproducibles. El método más ampliamente utilizado es la extracción de etanol ácido (13,14) con una recuperación de sólo el 70-80 % del IGF-I unido a IGFBP resultante de la co-precipitación. Por lo tanto, los resultados absolutos de este tipo de extracciones son falsos valores bajos (15). La extracción no elimina las IGFBPs de forma completa, lo que conlleva una reducción de la sensibilidad del ensayo asociada a la predilución de las muestras mediante el procedimiento de extracción. Además, las IGFBPs restantes pueden seguir interfiriendo en el ensayo. Adicionalmente, la extracción con etanol ácido no es efectiva en aquellas muestras que no sean de suero o plasma (p.ej. cultivos celulares), en las que la determinación de la IGF-I es bastante difícil debido al hecho de que suele haber un gran exceso de IGFBPs.

Para evitar estas complicaciones, se desarrolló un ensayo de fácil aplicación, que no requiere realizar una preparación especial de la muestra antes de efectuar la medición.

Significado clínico

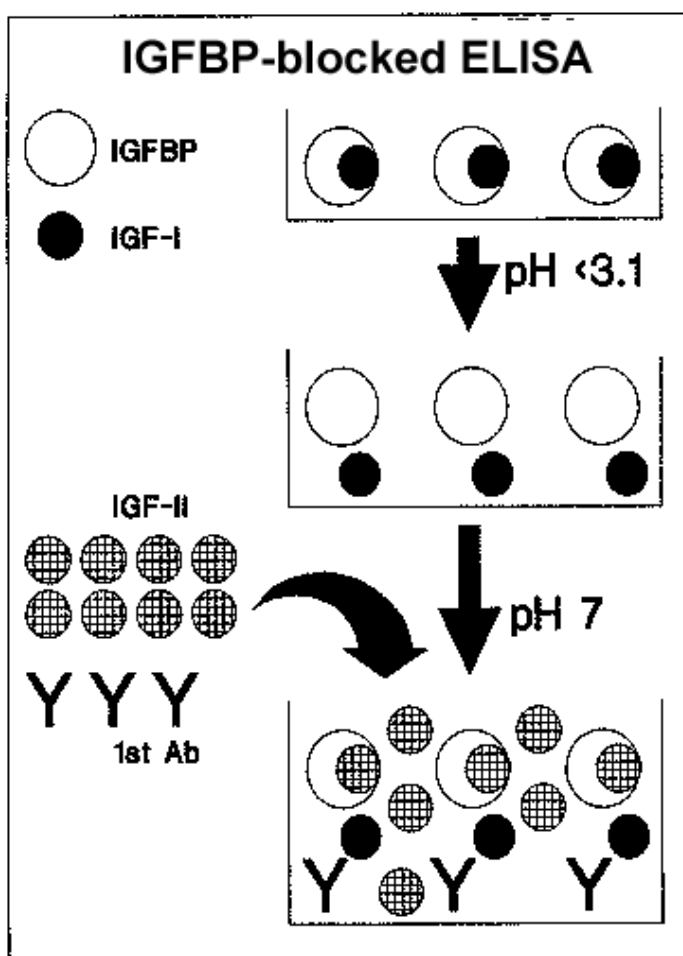
Aparte de la GH, hay otras variables que influyen sobre los niveles de IGF-I en suero. Se detectan niveles bajos de IGF-I en suero en estados de malnutrición o mala absorción, hipotiroidismo, enfermedad hepática, diabetes mellitus no tratada, enfermedad inflamatoria crónica (1,6), enfermedades malignas o politraumatismos. Por otro lado, los niveles altos suelen estar presentes en los casos de pubertad precoz u obesidad. Para interpretar correctamente las mediciones de IGF-I es crucial tener en cuenta la relación existente entre los niveles de IGF-I y la edad (ver Tabla 2 y Fig.: 4-6).

Debido a su dependencia con respecto a la GH, la determinación del nivel de IGF-I en suero ha demostrado ser una herramienta útil en el diagnóstico de los trastornos del crecimiento, especialmente en lo que respecta a las deficiencias de GH (GHD) o acromegalia (6,16-19, 23,24). La principal ventaja de la determinación del IGF-I en comparación con la determinación de la GH es que posee una concentración circadiana estable, lo que permite hacer una sola medición. Por lo tanto, la determinación del IGF-I debería ser la primera medida en una serie de análisis de laboratorio. Los niveles evidentemente normales permitirían excluir cualquier alteración del eje GH-IGF-I. Los niveles bajos, es decir, próximos o inferiores al percentil 5 teniendo en cuenta la edad del individuo, indicarían la necesidad de seguir investigando para emitir un diagnóstico. Los niveles de IGF-I por debajo de la normalidad serían una prueba de una deficiencia en la secreción de GH, siempre y cuando se pudieran excluir otras causas que explicasen este bajo nivel de IGF-I en suero (p.e. malnutrición o

alteración de la función hepática). Para distinguir entre niños sanos de estatura baja sin deficiencia de GH y niños con deficiencia de GH "clásica", el percentil 0,1 demostró ser un punto de corte apropiado, especialmente después de los ocho años. De todos modos, los niveles de IGF-I de los niños de baja estatura que no padecen GHD pueden oscilar entre el percentil 0,1 y el percentil 5 (19). Sin embargo, la acromegalia se caracteriza por niveles de IGF-I patológicamente elevados, que aparentemente reflejan la gravedad de la enfermedad mejor que los niveles de GH (17,18, 20).

3 PRINCIPIO

El kit de ELISA de Mediagnost para la determinación de IGF-I E20 se denomina también "ensayo tipo sándwich". Utiliza dos anticuerpos específicos de elevada afinidad por esta proteína. El IGF-I presente en la muestra se une al primer anticuerpo inmovilizado en la placa y el segundo anticuerpo anti-IGF-I específico, biotinilado se une al IGF-I inmovilizado, posteriormente el conjugado streptavidina-peroxidasa-enzima se unirá a él. Tiene lugar una



reacción colorimétrica catalizada por la enzima con una elevada especificidad por sustrato próximo que permite valorar cuantitativamente los niveles de IGF-I presentes en las muestras

Con objeto de disociar el IGF-I de las IGFBPs, las muestras deben diluirse en tampón ácido (**Tampón SB**) (Figura 2). Las muestras diluidas se pipeteen entonces en los pocillos, neutralizándose a este valor de pH. Tras la neutralización de las muestras, el exceso de IGF-II ocupa los sitios de unión a IGF de las proteínas de unión, permitiendo así la cuantificación del IGF-I sobrante. Con este método no se requiere la extracción de IGFBPs, neutralizándose sin embargo su función y su interferencia en el ensayo. Debido a la extremadamente baja reacción cruzada de los anticuerpos anti IGF-I con el IGF-II, el exceso de IGF-II no altera la interacción del anticuerpo específico con el IGF-I. El ensayo discurre como un ELISA convencional utilizando un conjugado del enzima peroxidasa con estreptavidina.

Fig. 2. Principio del ELISA de IGF-I con bloqueo de la IGFBP.

4 PELIGROS Y PRECAUCIONES

Para uso exclusivo en el diagnóstico in vitro. Utilizar únicamente por profesionales.

El kit de Mediagnost es apto solamente para diagnóstico in vitro y no para uso interno en humanos o animales. Antes de comenzar con el ensayo, leer detenidamente el contenido completo del manual de instrucciones. Utilizar la versión del manual que se incluye con el kit. Asegurarse de que se entienden todos los pasos. Mediagnost no se hace responsable de ninguna pérdida o daño (excepto según lo requerido por la ley), independientemente de la causa, causado por el incumplimiento de las instrucciones proporcionadas.

Advertencia: Este kit contiene material de origen humano y/o animal. Todos los componentes y muestras de pacientes deben ser tratados como potencialmente infecciosos.

No utilice material dañado o microbiano contaminado o derramado.

Se deben utilizar precauciones adecuadas y buenas prácticas de laboratorio en el almacenamiento, manipulación y eliminación de los reactivos del kit. La eliminación de los componentes del kit debe hacerse de acuerdo con la normativa local.

Suero Humano:

Los siguientes componentes contienen suero humano: **Control CTR1 y CTR2.**

La fuente de suero humano para el suero control proporcionado en este kit ha sido testados con resultados negativos para el HbsAg, para el Virus de la hepatitis C (HCV) y para el Virus de la Inmunodeficiencia Humana 1 y 2 (HIV). Sin embargo no se conoce ningún test que garantice la ausencia de estos agentes virales. Así pues todos los componentes y muestras de los pacientes deben manipularse como potencialmente infecciosos.

Componentes

A continuación se enumeran todos los componentes del producto que contienen sustancias peligrosas en concentraciones declarables de acuerdo con el Reglamento Europeo 1272/2008:

Conjugado del Anticuerpo DET / Conjugado de la Enzima EC

Los tampones contienen los ingredientes peligrosos enumerados a continuación, en base a los cuales resulta el siguiente etiquetado de las dos mezclas:

Pictogramas de peligro (CLP):



GHS07

Palabra de advertencia (CLP):

Atención

Componentes peligrosos:

2-metil-4-isotiazolin-3-ona (< 0,06 %)

Masa de reacción de 5-cloro-2-metil-4-isotiazolin-3-ona y 2-metil-4-isotiazolin-3-ona (3:1) (< 0,015 %)

Indicaciones de peligro (CLP):

H317 - Puede provocar una reacción alérgica en la piel.

Consejos de prudencia (CLP):

P280 - Llevar guantes/prendas/gafas/máscara de protección.

P272 - Las prendas de trabajo contaminadas no podrán sacarse del lugar de trabajo.

P261 - Evitar respirar el polvo/el humo/el gas/la niebla/los vapores/el aerosol.

P333+P313 - En caso de irritación o erupción cutánea: Consultar a un médico.

P302+P352 - EN CASO DE CONTACTO CON LA PIEL: Lavar con abundante agua y jabón.

P501 - Eliminar el contenido/el recipiente de acuerdo con la normativa nacional.

Tampón de lavado WB / Tampón de Muestra SB

El tampón contiene una mezcla de 5-cloro-2-metil-4-isotiazolin-3-ona y 2-metil-4-isotiazolin-3-ona (< 0,015 %) como conservante.

EUH208

Contiene masa de reacción de de 5-cloro-2-metil-4-isotiazolin-3-ona y 2-metil-4-isotiazolin-3-ona (3:1). Puede provocar reacciones alérgicas.

EUH210

Puede solicitarse la ficha de datos de seguridad.

Solución de parada STB

La solución de parada contiene ácido sulfúrico 0,2 M.

EUH210

Puede solicitarse la ficha de datos de seguridad.

4.1 Equipo de protección y primeros auxilios

Tras contacto con la piel:

Quitarse inmediatamente toda la ropa contaminada. Lavar la piel con agua o ducharse. En caso de reacción cutánea, consultar a un médico.

Tras el contacto visual:

Aclarar suavemente con agua durante unos minutos. Si es posible, quítese las lentillas. Seguir aclarando. En caso de irritación ocular, consultar a un oftalmólogo.

Tras la ingestión:

Llame al médico si se encuentra mal.

Evitar el contacto con los ingredientes. Encontrará información detallada sobre el equipo de protección personal y las medidas de primeros auxilios en la ficha de datos de seguridad de IGF-I ELISA E20. Se puede acceder a ella electrónicamente a través de la página web de Mediagnost GmbH en www.mediagnost.de o se puede solicitar a través de contact@mediagnost.de.

5 MUESTRAS

5.1 Tipo de muestra

Suero y plasma.

Las muestras de suero y las de plasma-EDTA o plasma-Heparina dan resultados comparables. Los niveles de IGF-I están reducidos en muestras de plasma-citrato, por la cantidad de anticoagulante relativamente alta.

5.2 Recogida de muestra

Para la recolección de la muestra, utilice el procedimiento estándar de punción venosa. Evite reacciones hemolíticas.

5.3 Volumen de muestra requerido: 10 µL.

5.4 Estabilidad de la muestra

En viales cerrados herméticamente:

- Almacenamiento a 20-25°C: máx. 24 horas.
- Almacenamiento a -20°C: mín. 2 años.
- Ciclos congelación/descongelación: máx. 3

El almacenamiento de muestras durante un periodo de 2 años a -20°C no influyó en la lectura. La congelación y descongelación de muestras debe minimizarse al máximo. 3 ciclos de congelación-descongelación no tuvo efecto en las muestras.

5.5 Interferencia

Los triglicéridos, la bilirrubina y la hemoglobina presentes en la muestra no interfieren a concentraciones de 100 mg/mL y 200 µg/mL o 1 mg/mL, respectivamente. Sin embargo, las muestras hemolíticas, lipémicas o ictericas deben ser validadas por el usuario.

5.6 Dilución de la muestra

- Dilución: **1:21** con el Tampón de Muestra **SB**
- Pipetear **200 µL** de Tampón de Muestra **SB** en un tupo PE/PP (se recomienda el uso de una pipeta multicanal cuando se vayan a testar múltiples muestras).; añadir **10 µL de muestra** (para dilución 1:21). Mezclar bien. Utilizar 20 µL (por duplicado) de esta dilución en el ensayo.
- Advertencia: las muestras de suero o plasma deben diluirse al menos 1:10 en el Tampón de Muestra **SB**.
- Dependiendo de los valores de IGF-I esperados, las muestras pueden diluirse más en el Tampón de Muestra **SB**.
- La estabilidad de la muestra tras la dilución es de un máximo de 2 horas a 20-25°C.

6 MATERIALES

6.1 Materiales suministrados

Los reactivos descritos a continuación son suficientes para realizar el ensayo en 96 muestras, incluidos los puntos para la curva Calibrator.

MTP	Microplaca , lista para usar. Pocillos recubiertos de anticuerpo anti-IGF-I humana, producido en ratón.	(8x12) pocillos divisibles
CAL A-E	Calibradores A – E , liofilizados, (IGF-I humana recombinante). Las concentraciones vienen en las etiquetas de cada vial y el certificado de calidad.	5 x 500 µL
CTR1	Control 1 , liofilizado, (suero humano). La concentración viene en el certificado de calidad.	1 x 500 µL
CTR2	Control 2 , liofilizado, (suero humano). La concentración viene en el certificado de calidad.	1 x 500 µL
DET	Conjugado del Anticuerpo , listo para usar. Contiene el anticuerpo anti IGF-I humana, producido en cabra, biotinilado	1 x 9 mL
EC	Conjugado de la Enzima , listo para usar. Contiene Estreptavidina marcada con Peroxidasa de rábano (HRP).	1 x 12 mL
SB	Tampón de Muestra , listo para usar.	1 x 25 mL
WB	Tampón de Lavado , Solución Concentrada 20 X.	1 x 50 mL
S	Substrato , listo para usar, substrato de la peroxidasa de rábano (HRP), estabilizado con Tetrametilbencidina.	1 x 12 mL
STP	Solución de Parada , lista para usar. Acido sulfúrico 0,2 M.	1 x 12 mL
CF	Tapa selladora , para cubrir la microplaca .	2 x
CERT	Certificado de Calidad	1 x

6.2 Materiales requeridos, pero no suministrados

- Agua destilada o desionizada para la dilución del Tampón de Lavado **WB (A.dest.)**, **950 mL**.
- Pipetas de precisión y pipetas multicanal con puntas de plástico desechables.
- Tubos de polietileno PE/polipropileno PP para la dilución de las muestras.
- Vórtex.
- Agitador de microplacas (350 rpm).
- Lavador de microplacas (recomendado).
- Lector de microplacas (lector de ELISA) con filtro para 450 y ≥ 590 nm.

7 NOTAS TÉCNICAS

Condiciones de Almacenamiento

Almacenar el kit a 2-8°C tras su recepción y hasta la fecha de caducidad. Los reactivos liofilizados deben almacenarse a -20°C tras su reconstitución. Evite congelaciones y descongelaciones repetidas.

Periodo de conservación

La vida media de los componentes **tras la apertura inicial** está garantizada durante **4 semanas**. Guardar las tiras y los pocillos sin usar en la bolsa con **cierre hermético** proporcionada y junto al desecante a 2-8°C. Los **componentes reconstituidos** (Calibradores **A-E** y Sueros Control **CTR1** y **CTR2** deben almacenarse a -20°C (máx. 4 semanas). Para uso posterior, descongele rápidamente pero con suavidad (evite incrementos de temperatura por encima de la temperatura ambiente y vortex excesivo). Hasta 3 ciclos de congelación-descongelación no afectaron el resultado del ensayo. El Tampón de Lavado **WB** diluido 1:20 es estable durante 4 semanas a 2-8°C.

Preparación de reactivos

Deje que todos los reactivos alcancen la temperatura ambiente (20 - 25°C) antes de su uso. Si se observan precipitados en los tampones, deben disolverse mezclándolos o calentándolos antes de su uso. No mezclar reactivos con diferente número de lote.

Reconstitución

Los Calibradores **A – E** y los Controles **CTR1** y **CTR2** se reconstituyen con el Tampón de Muestra **SB**. Se recomienda mantener los reactivos reconstituidos a temperatura ambiente durante 15 minutos y luego mezclarlos bien, pero con suavidad (para evitar la formación de espuma) con un vortex.

Dilución

Tras la reconstitución, diluir los Controles **CTR1** y **CTR2** con el Tampón de Muestra **SB** en la misma proporción (1:21) que para las muestras. El volumen requerido de Tampón de Lavado **WB** se prepara mediante dilución 1:20 del concentrado 20X proporcionado en el kit con Agua destilada.

Procedimiento del Ensayo

Cuando se realice el ensayo, el Blanco, los Calibradores **A-E**, los Controles **CTR1** y **CTR2** y las muestras deben pipetarse lo más rápido posible (<15 minutos). Para evitar distorsiones debido a las diferencias en los tiempos de incubación, el Conjugado del Anticuerpo **DET** y el Conjugado de la Enzima **EC** así como el Substrato **S** deben añadirse a la placa en el mismo orden y en el mismo intervalo de tiempo que las muestras. La Solución de Parada **STP** debe añadirse a la placa en el mismo orden que el Substrato **S**. Todas las determinaciones (Blanco, Calibradores **A-E**, Controles **CTR1** y **CTR2** y muestras) deben realizarse por duplicado. Para resultados óptimos, se recomienda un pipeteo preciso y seguir el protocolo adjunto.

Incubación

Incubación a temperatura ambiente quiere decir: Incubación a 20 - 25°C. El Substrato **S**, Tetrametilbencidina estabilizada, es fotosensible por lo que el almacenamiento y la incubación debe hacerse en oscuridad.

Agitación

Las etapas de incubación deben realizarse a la frecuencia de rotación media de un agitador de placas. Se recomienda 350 rpm. Dependiendo del diseño del agitador, la frecuencia de agitación debe ajustarse. Una agitación insuficiente puede llevar a una mezcla inadecuada de las soluciones y por lo tanto a densidades ópticas bajas, variaciones altas y/o valores falsos; una excesiva agitación puede resultar en densidades ópticas altas y/o valores falsos.

Lavados

Un lavado correcto es de **importancia** básica para una realización del test segura, consistente y precisa. Un lavado incompleto afectará de forma adversa al resultado del test. Sus posibles consecuencias pueden ser variaciones inespecíficas incontroladas de las densidades ópticas medidas, llevando a un cálculo potencialmente falso de los resultados de las muestras examinadas. Efectos como un valor alto de fondo o variaciones altas pueden indicar problemas durante los lavados.

Todos los lavados deben realizarse con el Tampón de Lavado **WB** proporcionado en el kit, diluido a la concentración de uso. El volumen utilizado en cada ciclo de lavado debe ser, al menos, de 300 µL.

Cuando se use un **lavador automático** de microplacas, se deben seguir cuidadosamente las instrucciones de uso. Deben realizarse los ajustes del dispositivo necesarios, como los relativos a la geometría de la placa y los parámetros de lavado indicados. El colector de dispensación y aspiración no debe rayar la superficie del pocillo. Deben realizarse los ajustes necesarios para que el volumen del fluido restante en cada paso de aspiración se minimice. Para ello, tras la última aspiración de cada ciclo de lavado, el posible líquido restante puede descartarse por inversión de la placa y golpeándola suavemente sobre papel absorbente.

El **lavado manual** es una opción alternativa adecuada. El Tampón de Lavado puede añadirse con un dispositivo multidispensador, una pipeta multicanal o una botella con atomizador. El líquido puede eliminarse con un balanceo dinámico de la placa sobre una pila. Si se usan dispositivos de aspiración, debe controlarse que no rayen la superficie del pocillo. Tras cada paso individual de lavado, el líquido restante puede descartarse por inversión de la placa y golpeándola suavemente sobre papel absorbente.

8 PROCEDIMIENTO DEL ENSAYO

Preparación de reactivos		Reconstitución:	Dilución
CAL A-E	Calibradores	en 500 µL de Tampón de Muestra SB	-
CTR1	Control 1	en 500 µL de Tampón de Muestra SB	1:21 con Tampón de Muestra SB
CTR2	Control 2	en 500 µL de Tampón de Muestra SB	1:21 con Tampón de Muestra SB
WB	Tampón de Lavado	-	1:20 con Agua dest. → WB 1:20
Muestra + Control CTR1 y CTR2: diluir 1:21 en Tampón de Muestra SB, mezclar inmediatamente, incubatar máx. 2h. Usar 20 µl por pocillo en el ensayo.			
Antes de comenzar el ensayo, atemperar todos los reactivos a temperatura ambiente (20°C - 25°C).			
Procedimiento del ensayo en duplicados			
Pipetear	Reactivos	Posición	
80 µL	Conjugado del Anticuerpo DET	en todos los pocillos	
20 µL	Tampón de Muestra SB (Blanco)	A1/A2	
20 µL	Calibrador A (2 ng/mL)	B1/B2	
20 µL	Calibrador B (5 ng/mL)	C1/C2	
20 µL	Calibrador C (15 ng/mL)	D1/D2	
20 µL	Calibrador D (30 ng/mL)	E1/E2	
20 µL	Calibrador E (50 ng/mL)	F1/F2	
20 µL	Control CTR1 (diluído 1:21)	G1/G2	
20 µL	Control CTR2 (diluído 1:21)	H1/H2	
20 µL	Muestras SPE (diluídas 1:21)	en el resto de pocillos, según los requerimientos	
Cubrir los pocillos con una tapa selladora.			
Incubación de las Muestras: 1 h a 20°C - 25°C, 350 rpm			
5x 300 µL	Aspirar el contenido de los pocillos y lavar 5 x con 300 µL con Tampón de Lavado WB 1:20/ pocillo cada	En cada pocillo	
100 µL	Conjugado de la Enzima EC	En cada pocillo	
Cubrir los pocillos con una tapa selladora.			
Incubación: 30 Minutos a 20°C -25°C, 350 rpm			
5x 300 µL	Aspirar el contenido de los pocillos y lavar 5 x con 300 µL con Tampón de Lavado WB 1:20/ pocillo cada	En cada pocillo	
100 µL	Substrato S	En cada pocillo	
Incubación: 15 Minutos en Oscuridad a 20°C - 25°C			
100 µL	Solución de Parada STP	En cada pocillo	
Medir la Absorbancia en los siguientes 30 min a 450 nm con ≥ 590 nm como longitud de onda de referencia.			

9 CONTROL DE CALIDAD

Las buenas prácticas de laboratorio requieren que se incluyan controles en cada ensayo. Para establecer valores medios y rangos aceptables y asegurar una apropiada realización del ensayo, se deben testar un número estadísticamente significativo de controles. Los resultados del test sólo serán válidos si el test se ha realizado siguiendo las instrucciones. Además, el usuario debe cumplir estrictamente las normas de las Buenas Prácticas de Laboratorio (GLP) u otras leyes aplicables locales o estatales. Todos los Calibradores y controles del kit deben encontrarse dentro de los rangos aceptables, tal y como se indica en Certificado de Calidad. Si no se alcanzan los criterios establecidos, el experimento no será válido y deberá repetirse. Cada laboratorio debe utilizar muestras conocidas como controles adicionales.

9.1 Criterios de Calidad

Para la evaluación del ensayo se requiere que los valores de absorbancia del blanco estén por debajo de 0,25 y la absorbancia del Calibrador E esté por encima de 1,00. Las muestras cuyos valores de absorbancia sean mayores que el del **Calibrador E** deberán ser testadas de nuevo con una dilución mayor.

10 EVALUACIÓN DE RESULTADOS

Los niveles de IGF-I son altamente dependientes de la edad en los niños y menos en los adultos, hasta la edad aproximada de 60 años. Los rangos normales en varios grupos de edad, con una distribución logarítmica normal, se dan en la Tabla 2 (percentiles). Entre los 8 y los 19 años de edad, los valores para hombres y mujeres se dan de forma separada, porque el pico en la pubertad ocurre normalmente 2 años antes en las mujeres (se muestra una representación gráfica en las Figuras 4, 5 y 6). Un problema importante para la interpretación de los valores de IGF-I se deriva del hecho de que la baja estatura se debe a menudo a un retraso del desarrollo más que a cualquier trastorno metabólico o endocrino (retraso constitucional de crecimiento y adolescencia). El fuerte aumento de los niveles de IGF-I durante la pubertad puede, por lo tanto, causar cierta incertidumbre sobre si sería apropiado o no relacionar los valores medidos con la edad cronológica. Se recomienda tener en cuenta la etapa puberal (Tabla 1) para obtener una imagen más completa de esta situación.

10.1 Realización de la curva Calibrador

El Estándar Internacional para el hIGF-I, WHO NIBSC Código 02/254, se usó como material Calibrador. Las concentraciones de hIGF-I recombinante de los Calibradores que se suministran son las siguientes:

Calibrador	A	B	C	D	E
ng/mL	2	5	15	30	50
nmol/L	0,26	0,66	1,96	3,92	6,54

- 1) Calcular la **absorbancia media** para el blanco a partir de los valores obtenidos en los respectivos duplicados (pocillos A1/A2).
- 2) Restar la absorbancia media del blanco a los valores medios de absorbancia de todas las muestras y los Calibradores.
- 3) Representar en un gráfico los valores de concentración para los Calibradores en el eje X frente a los valores de absorbancia media de los Calibradores en el eje Y.
- 4) Recomendación: El cálculo de la curva Calibrador debería hacerse usando un programa informático, porque en general la curva (sin su respectiva transformación) no estará bien caracterizada con una regresión lineal. **Una polinomial de grado superior, o un ajuste logístico de cuatro parámetros (4-PL) o una regresión no lineal** son generalmente adecuados para la evaluación (como podría ser una *spline* o una alineación punto a punto, en casos individuales).
- 5) La concentración de IGF-I de las muestras (en ng/mL) puede calcularse **multiplicando** el valor obtenido por el respectivo **factor de dilución**.

10.2 Ejemplo de una curva Calibrador típica

Los datos siguientes son exclusivamente para una demostración práctica y no pueden usarse en lugar de los datos generados durante el ensayo.

	Blanco	A	B	C	D	E
ng/mL	0.0	2	5	15	30	50
OD _(450-620 nm)	0,00	0,088	0,299	0,985	1,727	2,543

El ejemplo de curva Calibrador que muestra la Figura 3 **no puede usarse** para el cálculo de los resultados del test que se realice en el momento. ¡ Se debe establecer una curva Calibrador por cada test que se realice!

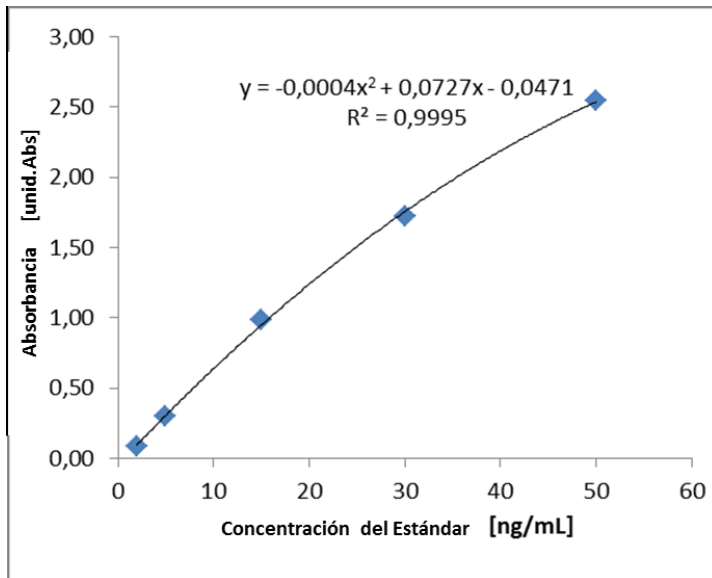


Fig. 3. Ejemplo de curva Calibrador

10.3 Ejemplo de cálculo de concentraciones de IGF-I

Dilución de la muestra: 1:21

Medida de Absorbancia del Blanco 0,0165
Medida de Absorbancia de la Muestra 0,2695

El programa de medición calculará automáticamente la concentración de IGF-I de la muestra diluida, utilizando como referencia la diferencia entre la muestra y el blanco. Después, sólo hay que determinar el ajuste de curva más adecuado.

En este ejemplo, la ecuación que el programa resuelve para calcular la concentración de IGF-I en la muestra es:

$$0.253 = -0.0004x^2 + 0.0727x - 0.0471$$
$$4.57 = x$$

Si se tiene en cuenta el factor de dilución (1:21), la concentración de IGF-I de la muestra sin diluir es :

$$4.57 \text{ ng/mL} \times 21 = 96 \text{ ng/mL}$$

10.4 Interpretación de resultados

Los resultados del test no deberían ser la única base para tomar decisiones terapéuticas. Los resultados deben interpretarse con respecto a la anamnesis, observaciones clínicas adicionales y resultados de otras investigaciones diagnósticas. Además, se recomienda establecer valores de referencia y de corte correspondientes al grupo de pacientes relevante para cada laboratorio. Tenga en cuenta las directrices internacionales y nacionales para el diagnóstico y tratamiento de la deficiencia de hormona del crecimiento / acromegalia.

11 LIMITACIONES DEL PROCEDIMIENTO

Los niveles de IGF-I dependen en gran medida de la secreción de la Hormona del Crecimiento (GH). Valores disminuidos de IGF-I, sin embargo, no prueban deficiencia en GH, ya que la concentración en plasma de IGF-I puede verse influenciada por un gran número de otros factores y, por tanto, deben tenerse en cuenta a la hora de interpretar correctamente los resultados. Los niveles de IGF-I disminuyen durante el ayuno (si se produce durante más de 1 día), como resultado de la malnutrición, malabsorción, caquexia, función hepática dañada, o en hipotiroidismo y diabetes mellitus no tratada. También pueden encontrarse valores bajos de IGF-I en enfermedad inflamatoria crónica y tumores malignos. Valores altos de IGF-I se encuentran en estados de desarrollo sexual acelerado. En situaciones clínicas con hiperprolactinemia o en pacientes con craneofaringioma, se pueden observar niveles normales de IGF-I a pesar de la deficiencia de GH. En el último periodo de la gestación, los niveles de IGF-I son moderadamente elevados.

El ELISA para IGF-I de Mediagnost se basa en anticuerpos monoclonales y policlonales. Generalmente, el resultado de cualquier sistema de pruebas inmunológicas puede verse influenciado por anticuerpos heterofílicos, anticuerpos anti-especies o factores reumatoides. El diseño del ensayo reduce estas influencias potenciales al mínimo, pero en ningún caso pueden excluirse.

12 VALORES DE REFERENCIA

Los niveles de IGF-I son altamente dependientes de la edad en los niños y menos en los adultos, hasta la edad aproximada de 60 años. Los rangos normales en varios grupos de edad, con una distribución logarítmica normal, se dan en la Tabla 2 (percentiles). Entre los 8 y los 19 años de edad, los valores para hombres y mujeres se dan de forma separada, porque el pico en la pubertad ocurre normalmente 2 años antes en las mujeres (se muestra una representación gráfica en las Figuras 4, 5 y 6). Un problema importante para la interpretación de los valores de IGF-I se deriva del hecho de que la baja estatura se debe a menudo a un retraso del desarrollo más que a cualquier trastorno metabólico o endocrino (retraso constitucional de crecimiento y adolescencia). El fuerte aumento de los niveles de IGF-I durante la pubertad puede, por lo tanto, causar cierta incertidumbre sobre si sería apropiado o no relacionar los valores medidos con la edad cronológica. Se recomienda tener en cuenta la etapa puberal (Tabla 1) para obtener una imagen más completa de esta situación.

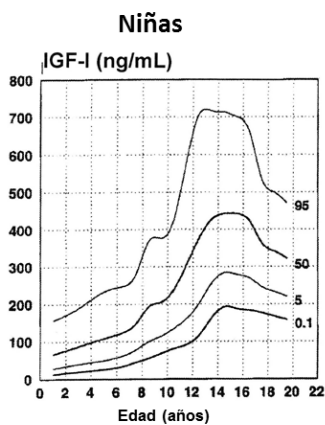


Fig. 4.: Intervalo de referencia dependiente de la edad de niveles séricos de IGF-I en niñas.

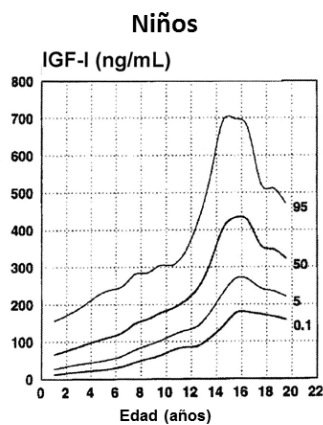


Fig. 5.: Intervalo de referencia dependiente de la edad de niveles séricos de IGF-I en niños.

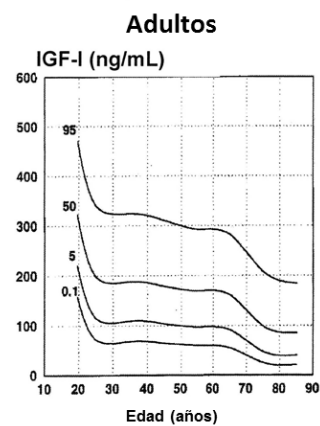


Fig. 6.: Intervalo de referencia dependiente de la edad de niveles séricos de IGF-I en adultos.

Tabla 1. Intervalo normal de niveles séricos de IGF-I en ng/mL a diferentes estados puberales según Tanner. Dado que no se observan diferencias significativas entre niños y niñas, ambos sexos se han combinado. Solamente se han incluido niños y adolescents entre los 7 y 17 años de edad.

Estado Puberal	Percentil			
	0.1	5	50	95
1	61	105	186	330
2	85	156	298	568
3	113	196	352	631
4	171	268	431	693
5	165	263	431	706

Tabla 2. Niveles séricos de IGF-I en sujetos sanos a diferentes edades. Individuos entre los 8 y 19 años de edad se clasifican según su género, ya que el pico puberal se da casi 2 años antes en niñas que en niños.

Edad (años)	Percentil													
	0.1	1	5	10	20	30	40	50	60	70	80	90	95	99
0-2	13	20	28	34	43	50	58	66	75	87	102	128	156	220
2-4	20	29	40	48	59	68	77	87	98	111	129	159	189	260
4-6	26	36	50	59	73	85	96	108	122	138	160	196	233	320
6-7	34	46	62	72	87	99	111	124	138	155	176	212	248	332
7-8	45	60	78	90	107	121	134	148	163	181	205	243	281	364
8-9	niños 54	71	90	102	119	133	146	160	175	192	214	250	284	362
	niñas 55	75	99	115	137	156	174	193	214	239	271	324	376	496
9-10	niños 63	82	102	115	133	148	162	176	191	209	232	269	304	379
	niñas 68	89	114	130	152	170	187	205	224	247	276	323	369	469
10-11	niños 77	96	117	130	148	162	176	189	203	220	241	274	305	370
	niñas 81	106	134	153	178	199	219	239	261	287	321	374	426	539
11-12	niños 85	106	129	144	163	179	194	209	225	244	267	304	339	413
	niñas 91	123	160	185	220	248	276	305	337	374	424	503	581	758
12-13	niños 88	112	141	159	184	204	223	243	264	289	321	371	419	525
	niñas 116	155	201	231	274	309	342	377	415	460	519	614	707	914
13-14	niños 111	143	179	203	235	261	286	311	339	371	412	477	540	677
	niñas 163	207	256	287	329	364	395	428	463	504	556	637	716	884
14-15	niños 140	182	229	260	303	337	370	404	441	484	539	625	691	896
	niñas 193	236	284	314	353	385	414	443	474	510	556	628	713	832
15-16	niños 176	221	269	299	340	372	402	433	466	504	552	626	697	849
	niñas 187	231	279	309	350	382	412	442	474	512	559	632	700	845
16-17	niños 178	221	267	296	335	366	395	424	455	491	537	607	673	814
	niñas 183	225	270	298	336	366	394	422	452	486	530	597	660	792
17-18	niños 173	207	243	265	294	317	337	358	380	405	436	484	527	618
	niñas 176	210	246	268	297	320	341	362	384	409	441	488	533	624
18-19	niños 167	201	235	256	285	307	327	347	368	393	423	469	512	600
	niñas 167	199	233	254	281	302	322	341	362	385	414	458	499	583
19-20	158	189	220	240	265	285	304	322	341	363	391	433	471	550
20-30	72	92	115	130	150	167	182	198	215	235	261	302	340	425
30-40	68	87	109	123	142	158	173	188	204	223	248	287	324	404
40-50	64	82	103	116	135	150	164	178	194	212	235	272	310	385
50-60	60	77	97	110	127	142	155	169	184	201	224	260	292	369
60-70	55	72	91	103	120	134	147	161	176	193	215	251	282	362
70-80	25	35	47	55	67	78	88	98	110	124	142	173	207	276
>80	21	30	40	47	58	67	76	85	95	108	125	153	184	245

Concentraciones séricas en ng/ml.

Los valores de referencia han sido evaluados por el Prof. Blum, mediante un radioinmunoensayo idéntico al kit de Mediagnost IGF-R20. Así, los valores de referencia específicos de edad y sexo publicados en *Diagnostics of Endocrine Function in Children and Adolescents* (Editado por Prof. Ranke. ISBN-3-335-00496-5) pueden aplicarse a todos los ensayos para IGF-I de Mediagnost. Generalmente, una desviación de +/- 2 Desviaciones Estándar (SD) es admitida como patológica y se deberían iniciar investigaciones adicionales atendiendo a los síntomas clínicos.

13 CARACTERÍSTICAS DEL ENSAYO

13.1 Sensibilidad

La sensibilidad se evaluó midiendo el blanco y calculando la concentración teórica del blanco + 2 SD. La sensibilidad analítica del kit E20 de Mediagnost es 0.091 ng/mL, valor medio de 19 determinaciones independientes cuyos valores estuvieron comprendidos entre 0,03 ng/mL y 0,2 ng/mL.

13.2 Especificidad

Reactividad cruzada de E20 con IGF-II, insulina y péptido C: estas proteínas relacionadas con IGF-I se añadieron al tampón del ensayo en la concentración indicada (Tabla 3) y la solución fue evaluada como muestra sin dilución adicional. La concentración medida para el blanco, sin otra proteína, fue de 0,78 µg/L. Por tanto, ni IGF-II, ni insulina ni péptido C son detectados por el ELISA E20 de Mediagnost (ver tabla 3).

Tabla 3. Especificidad. Reacción cruzada del sistema con diferentes proteínas relacionadas con IGF-I.

Péptido C añadido [µg/L]	IGF-I medido [µg/L]	Insulina añadida [µg/L]	IGF-I medido [µg/L]	IGF-II añadido [µg/L]	IGF-I medido [µg/L]
500	0,73	100	0,78	1250	0,77
100	0,78	10	0,77	750	0,73
10	0,77	1	0,76	250	0,77
0	0,78	0	0,78	0	0,78

13.3 Precisión

Variación Intra-Ensayo

Se midieron tres muestras de 6 a 18 veces en el mismo ensayo. Los resultados se muestran en la Tabla 4. El coeficiente de variación (CV) fue de media 5,81%.

Tabla 4. Variabilidad Intra-ensayo.

	Número de determinaciones	Valor medio (ng/mL)	Desviación Estándar (ng/mL)	CV (%)
Muestra 1	18	144,8	9,63	6,65
Muestra 2	18	140,79	7,15	5,08
Muestra 3	18	138,02	7,86	5,69

Variación Inter-Ensayo y Lote-a-Lote

Se midieron muestras de suero en ensayos independientes. En la Tabla 5 se muestran los resultados obtenidos. Además, cinco muestras se testaron repetidamente durante cuatro años con ocho lotes diferentes. La variabilidad fue de media 8,57% (6,8-10,5%).

Tabla 5. Variabilidad Inter-ensayo.

	Número de determinaciones	Valor medio (ng/mL)	Desviación Estándar (ng/mL)	CV (%)
Muestra 1	8	81	5,34	6,56
Muestra 2	16	192	12,38	6,43
Muestra 3	17	498	27,52	5,53

13.4 Linealidad

La linealidad se testó mediante dilución de suero nativo con diferentes concentraciones de IGF-I (Muestras 1-3). La cantidad de IGF-I medida se recalculó y se muestra en la Figura 7.

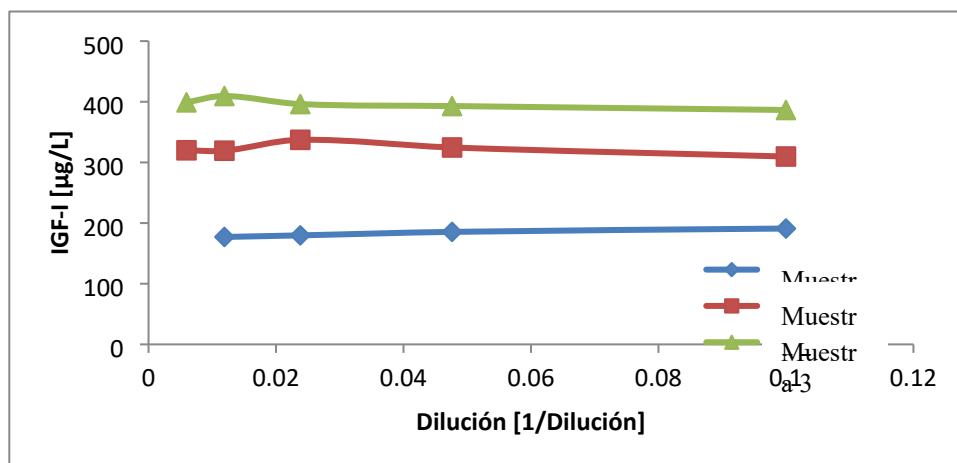


Fig. 7. Linealidad. Concentraciones de IGF-I recalculadas de muestras con diluciones distintas. La dilución mínima es 1:10, la dilución recomendada es 1:21

13.5 Recuperación y Precisión

Se añadieron diferentes cantidades de IGF-I recombinante a suero humano. Se midió el contenido de IGF-I de las muestras así enriquecidas y se calculó la recuperación en comparación con el tampón enriquecido. Los resultados se muestran en la Tabla 6.

Tabla 6. Recuperación de IGF-I recombinante en suero humano.

IGF-I [µg/L]	Muestra 1	Muestra 2	Muestra 3	Muestra 4
Muestra	138	172	133	180
+ IGF-I 200	287	372	-	-
+ IGF-I 400	-	-	539	591
% Recuperación	85	100	101	102

13.6 Veracidad / Calibración del Ensayo

Como calibrador del ensayo se usó IGF-I recombinante producida en E.Coli y con una pureza >98% (SDS-PAGE, tinción de plata). La trazabilidad de este material de calibración recombinante fue probada con respecto al material de referencia de la WHO 02/254. Los resultados están publicados por Burns C. *et al.* en Growth Horm IGF Res. 2009 Oct;19(5):457-62. Epub 2009 Mar 20. El ELISA E20 de Mediagnost está codificado como 14c.

El material de referencia incluye **8,5 µg/ampolla** de IGF-I, medida mediante análisis de aminoácidos y HPLC. El inmunoensayo E20 de Mediagnost (ensayo n°. 14c) mide **11,55 µg/ampolla**. La media de todos los inmunoensayos testados es 11,61 µg/ampolla.

Por tanto, los resultados de Mediagnost son comparables a otros tests inmunológicos para la medida de IGF-I y puede transformarse fácilmente a WHO 02/254 mediante un factor de **0,735**.

13.7 Interferencia

Se testó la interferencia de bilirrubina y triglicéridos, añadiendo cantidades diferentes de estas sustancias a suero humano que contenía IGF-I. Para la comparación, la misma cantidad de tampón libre de sustancias se añadió también al suero. La Tabla 7 demuestra que ni la bilirrubina ni los triglicéridos ejercen influencia en la medida de IGF-I en suero humano.

Tabla 7. Interferencia de sustancias fisiológicas en la medida de IGF-I. Se enriquecieron muestras de suero humano con diferentes cantidades de triglicéridos, bilirrubina o hemoglobina y se midió la recuperación de IGF-I. Se muestra la recuperación relativa (%) de las muestras no enriquecidas.

	Triglicéridos 100 mg/mL	Bilirrubina 200 µg/mL	Hemoglobina 10 mg/ml
Suero 1	93	90	97
Suero 2	100	101	110
Suero 3	120	120	104

La influencia de proteínas de unión en la medida de IGF-I se ha ejemplificado con la IGFBP-3. Se añadieron diferentes cantidades de IGF-I y 3 o 6 mg/mL de IGFBP-3 al tampón de muestra (pH=2) y a tampón salino basado en fosfato (PBS) (pH=7,4). Tras una incubación de 15 minutos a temperatura ambiente, estas muestras se diluyeron y testaron con el kit E20 de Mediagnost, tal y como se describe en el manual de uso. Con el tampón de muestra, IGFBP-3 hasta 6 mg/mL no interfirió con la medida de IGF-I, pero sin acidificación de la muestra se detectó una fuerte interferencia de IGFBP-3 con la medida de IGF-I (Tabla 8).

Tabla 8. Interferencia de IGFBP-3 con la medida de IGF-I.

IGFBP-3	Tampón de muestra		
	50 µg/L IGF-I	100 µg/L IGF-I	300 µg/L IGF-I
-	46,38	116,14	358,1
3 mg/L	47,33	115,83	384,15
6 mg/L	52,32	123,38	355,41
IGFBP-3	PBS		
	50 µg/L IGF-I	100 µg/L IGF-I	300 µg/L IGF-I
-	34,2	90,23	349,04
3 mg/L	7,4	12,16	152,14
6 mg/L	7,2	10,12	48,15

14 COMPARACIÓN DEL ENSAYO

Se comparó el ensayo para IGF-I E20 de Mediagnost con el ensayo R20 de Mediagnost. Se midieron 196 muestras de suero en ambos ensayos, mostrando un excelente coeficiente de correlación ($r = 0,95$). Además, el ELISA E20 para IGF-I de Mediagnost se comparó con otro Inmunoensayo Enzimático disponible comercialmente, obteniéndose una correlación de $R^2 > 0,9$.

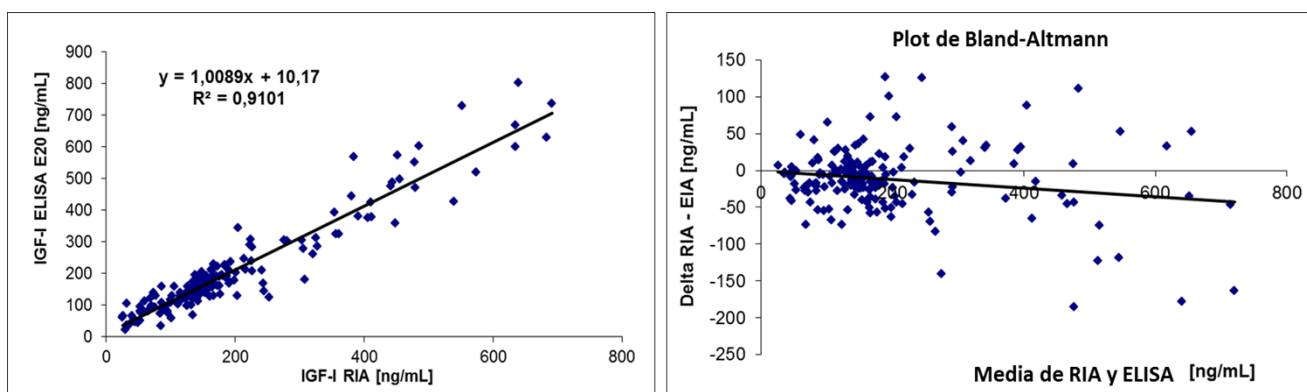


Fig. 8. Comparación de los ensayos de Mediagnost RIA IGF-R20 y ELISA E20.

Instrucciones de uso para aplicación científica

15 USO CIENTÍFICO

IGF-I se encuentra presente en bajas concentraciones en varios fluidos corporales y en medio de cultivo condicionado de muchas líneas celulares. Sin embargo, la determinación de IGF-I en estos especímenes es particularmente difícil debido a la presencia de IGFBPs, normalmente en cantidades excesivas. El ELISA IGF-I con bloqueo de IGFBP evita estos problemas y permite una determinación simple, correcta y sensible de IGF-I en numerosas muestras y con un gasto mínimo de tiempo.

15.1 Muestras adecuadas para uso científico

Suero, plasma, líquido cefalorraquídeo y orina, así como medio de cultivos celulares. Los niveles de IGF-I pueden variar considerablemente, por lo que el usuario debe encontrar la dilución adecuada de las muestras para realizar su ensayo. IGF-I recombinante podría medirse en **orina, líquido cefalorraquídeo y medio de cultivo celular, diluidos en proporción 1:2 en el Tampón de Muestra SB**. Para el medio de cultivo celular, debe tenerse en cuenta la reactividad cruzada (medio suplementado con suero de ternera fetal, FCS).

Puede medirse IGF-I en lisados celulares. Un tampón de lisis adecuado podría ser: 10 mM Tris/ 5 mM EDTA/ 50 mM NaCl/ 30 mM Pirofosfato de Sodio/ 50 mM Fluoruro de Sodio/ 100 µM Ortovanadato de Sodio/ 1 mM PMSF/ 1% Triton X-100.

La cantidad de IGF-I intracelular también es crucial: si es demasiado baja (0,09 ng/mL o 0,9 ng/mL e el caso de una dilución 1:10), la sensibilidad del ensayo puede no ser suficiente.

La medida debe validarse para cada tejido o línea celular diferente. Si no hay expresión de IGFBP en el tejido o línea celular, se puede usar como muestra el lisado celular sin diluir. Para el método de validación, se recomienda el uso de IGF-I recombinante y el tampón de lisis así como algo de lisado celular para experimentos de recuperación. Hay disponible una publicación como referencia de la medida de IGF-II en lisados celulares y sobrenadante de cultivos: Mohlin S, Hamidian A, Pählman in NEOPLASIA, 2013, Volume 15 No 3.

15.2 Reactividad cruzada con muestras animales

Se han usado varios sueros animales disponibles comercialmente como muestras en este ensayo y se ha demostrado que el test puede utilizarse como ensayo heterólogo para la medición de IGF-I en muestras de suero de primates, ganado, cerdo, oveja, caballo, burro, cabra, perro, gato, conejo y cobayo. Este kit no puede usarse para la determinación de IGF-I en pollo, rata y ratón.

El usuario debe hacer calibraciones específicas para cada especie.

Para determinar las concentraciones exactas especie-específicas de IGF-I, el sistema del test debe calibrarse respectivamente: por ejemplo, usando una concentración conocida de IGF-I bovina.









16 LITERATUR / REFERENCES

Literature

- 1) Baxter RC. 1986 The somatomedins: insulin-like growth factors. *Adv Clin Chem.*25:49-115
- 2) Daughaday WH, Rotwein P. 1989 Insulin-like growth factors I and II. Peptide, messenger ribonucleic acid and gene structures, serum, and tissue concentrations. *Endocr Rev.* 10:68-91
- 3) Spencer EM (Ed.) 1991 *Modern Concepts of Insulin-Like Growth Factors.* New York: Elsevier.
- 4) Klapper DG, Svoboda ME, Van Wyk JJ. 1983 Sequence analysis of somatomedin-C: confirmation of identity with insulin-like growth factor-I. *Endocrinology.* 112:2215-2217.
- 5) Rinderknecht E, Humbel RE. 1978 The amino acid sequence of human insulin-like growth factor I and its structural homology with proinsulin. *J Biol Chem.* 253:2769-2276.
- 6) Clemmons DR, Van Wyk JJ. 1984 Factors controlling blood concentration of somatomedin C. *Clin Endocrinol Metab.* 13:113-143.
- 7) Ballard J, Baxter R, Binoux M, et al. 1989 On the nomenclature of the IGF binding proteins. *Acta Endocrinol (Copenh).* 121:751-752.
- 8) Drop SLS. 1992 Report on the nomenclature of the IGF binding proteins. *J. Clin Endocrinol Metab.* 74:1215-1216.
- 9) Martin JL, Baxter RC. 1986 Insulin-like growth factor binding protein from human plasma. Purification and characterization. *J Biol Chem.* 261:8754-8760.
- 10) Binkert C, Landwehr J, Mary JL, Schwander J, Heinrich G. 1989 Cloning, sequence analysis and expression of a cDNA encoding a novel insulin-like growth factor binding protein (IGFBP-2). *EMBO J.* 8:2497-2502.
- 11) Furlanetto RW, Underwood LE, Van Wyk JJ, D'Ercole AJ. 1977 Estimation of somatomedin-C levels in normals and patients with pituitary disease by radioimmunoassay. *J. Clin Invest.* 60:648-657.
- 12) Daughaday WH, Kapadia M, Mariz I. 1987 Serum somatomedin binding proteins: physiologic significance and interference in radioligand assay. *J Lab Clin Med.* 109:355-363.
- 13) Breier BH, Gallaher BW, Gluckman PD. 1991 Radioimmunoassay for insulin-like growth factor-I: solutions to some potential problems and pitfalls. *J Endocrinol.* 128:347-357.
- 14) Daughaday WH, Mariz IK, Blethen SL. 1980 Inhibition of access of bound somatomedin to membrane receptor and immunobinding sites: a comparison of radioreceptor and radioimmunoassay of somatomedin in native and acid-ethanol-extracted serum. *J Clin Endocrinol Metab.* 51:781-788.
- 15) Ranke MB (ed.): *Diagnostics of Endocrine Function in Children and Adolescents*, Basel, Karger, 2003, pp 166-199
- 16) Rosenfeld RG, Wilson DM, Lee PDK, Hintz RL. 1986 Insulin-like growth factors I and II in evaluation of growth retardation. *J Pediatr.* 109:428-433.
- 17) Clemmons DR, Van-Wyk JJ, Ridgway EC, Kliman B, Kjellberg RN, Underwood LE. 1979 Evaluation of acromegaly by radioimmunoassay of somatomedin-C. *N.Engl J Med.* 301:1138-1142
- 18) Zapf J, Walter H, Froesch ER. 1981 Radioimmunological determination of insulin-like growth factors I and II in normal subjects and in patients with growth disorders and extrapancreatic tumor hypoglycemia. *J Clin Invest.* 68:1321-1330.
- 19) Blum WF. 1992 Insulin-like growth factors and their binding proteins. In: Ranke MB, ed. *Functional Endocrinologic Diagnostics in Children and Adolescence.* Mannheim: J + J Verlag; 102-117.
- 20) Rieu M, Girard F, Bricaire H, Binoux M. 1982 The importance of insulin-like growth factor (somatomedin) measurements in the diagnosis and surveillance of acromegaly. *J Clin Endocrinol Metab.* 55:147-153.
- 21) Blum WF, Ranke MB, Bierich JR. 1988 A specific radioimmunoassay for insulin-like growth factor II: the interference of IGF binding proteins can be blocked by excess IGF-I. *Acta Endocrinol (Copenh).*118:374-380.
- 22) Wilson EM, Oh Y, Rosenfeld RG (1997) Generation and characterization of an IGFBP-7 antibody: Identification of 31 kD IGFBP-7 in human biological fluids and Hs578T human breast cancer conditioned media. *J Clin Endocrinol Metab* Vol 82, 4:1301-1303
- 23) Ranke MB, Schweizer R, Elmlinger MW, Weber K, Binder G, Schwarze CP, Wollmann HA (2000) Significance of basal IGF-I, IGFBP-3 and IGFBP-2 measurements in the diagnostics of short stature in children. *Horm Res* 54:60-68
- 24) Ranke MB, Schweizer R, Elmlinger MW, Weber K, Binder G, Schwarze CP, Wollmann HA (2001) Relevance of IGF-I, IGFBP-3 and IGFBP-2 measurements during GH treatment of GH-deficient and non-GH-deficient children and adolescents. *Horm Res* 55:155-124
- 25) Address NIBSC: Blance Lane, South Mimms, Potters Bar, Hertford EN 6 3 QG, Great Britain
- 26) Burns C, Rigsby P, Moore M, Rafferty B. (2009) The first International Standard for Insulin-like Growth Factor-1 (IGF-1) for immunoassay: Preparation and calibration in an international collaborative study. *Growth Hormone & IGF Research* (2009)
- 27) Blum WH, Breier BH (1994) Radioimmunoassays for IGFs and IGFBPs. *Growth Regulation* 4 (Suppl. 1):11-19
- 28) Ranke MB, Osterziel KJ, Schweitzer R, Schuett B., Weber K., Röbbel P, Vornwald A, Blumenstock G, Elmlinger MB (2003) Reference Levels of Insulin-Like-Growth Factor I in the Serum of Healthy Adults: Comparison of Four Immunoassays. *Clin Chem Lab Med* Vol 41(10):1329-1334

17 INTERNATIONALE ASSAY DESCRIPTION

International Test Description

CAL A-E	Rec in 500 µL SB	-
CTR1	Rec in 500 µL SB	1:21 SB
CTR2	Rec in 500 µL SB	1:21 SB
WB 20x	-	1:20 A. dest. → WB 1:20
SPE		1:21 SB
-	°C 20-25°C,   max. 2 h	
80 µl	DET	A1 - End
20 µl	SB	A1/A2
20 µL	CAL A (2 ng/ml)	B1/B2
20 µL	CAL B (5 ng/ml)	C1/C2
20 µL	CAL C (15 ng/ml)	D1/D2
20 µL	CAL D (30 ng/ml)	E1/E2
20 µL	CAL E (50 ng/ml)	F1/F2
20 µL	CTR1 1:21 SB	G1/G2
20 µL	CTR2 1:21 SB	H1/H2
20 µL	SPE 1:21 SB	
TAPE		
 1 h °C 20-25°C  350 rpm		
5x 300 µL	5x WB 1:20	
100 µL	EC	
TAPE		
 0.5 h °C 20-25°C  350 rpm		
5x 300 µL	5x WB 1:20	
100 µL	S	
 15 min °C 20-25°C 		
STP		
MEASURE		

18 PROCEDIMIENTO DEL ENSAYO

Preparación de reactivos		Reconstitución:	Dilución
CAL A-E	Calibradores	en 500 µL de Tampón de Muestra SB	-
CTR1	Control 1	en 500 µL de Tampón de Muestra SB	1:21 con Tampón de Muestra SB
CTR2	Control 2	en 500 µL de Tampón de Muestra SB	1:21 con Tampón de Muestra SB
WB	Tampón de Lavado	-	1:20 con Agua dest. → WB 1:20
Muestra + Control CTR1 y CTR2: diluir 1:21 en Tampón de Muestra SB, mezclar inmediatamente, incubatar máx. 2h. Usar 20 µl por pocillo en el ensayo.			
Antes de comenzar el ensayo, atemperar todos los reactivos a temperatura ambiente (20°C - 25°C).			
Procedimiento del ensayo en duplicados			
Pipetear	Reactivos	Posición	
80 µL	Conjugado del Anticuerpo DET	en todos los pocillos	
20 µL	Tampón de Muestra SB (Blanco)	A1/A2	
20 µL	Calibrador A (2 ng/mL)	B1/B2	
20 µL	Calibrador B (5 ng/mL)	C1/C2	
20 µL	Calibrador C (15 ng/mL)	D1/D2	
20 µL	Calibrador D (30 ng/mL)	E1/E2	
20 µL	Calibrador E (50 ng/mL)	F1/F2	
20 µL	Control CTR1 (diluído 1:21)	G1/G2	
20 µL	Control CTR2 (diluído 1:21)	H1/H2	
20 µL	Muestras SPE (diluídas 1:21)	en el resto de pocillos, según los requerimientos	
Cubrir los pocillos con una tapa selladora.			
Incubación de las Muestras: 1 h a 20°C - 25°C, 350 rpm			
5x 300 µL	Aspirar el contenido de los pocillos y lavar 5 x con 300 µL con Tampón de Lavado WB 1:20/ pocillo cada vez	En cada pocillo	
100 µL	Conjugado de la Enzima EC	En cada pocillo	
Cubrir los pocillos con una tapa selladora.			
Incubación: 30 Minutos a 20°C -25°C, 350 rpm			
5x 300 µL	Aspirar el contenido de los pocillos y lavar 5 x con 300 µL con Tampón de Lavado WB 1:20/ pocillo cada vez	En cada pocillo	
100 µL	Substrato S	En cada pocillo	
Incubación: 15 Minutos en Oscuridad a 20°C - 25°C			
100 µL	Solución de Parada STP	En cada pocillo	
Medir la Absorbancia en los siguientes 30 min a 450 nm con ≥ 590 nm como longitud de onda de referencia.			