

Instructions for Use

IGF-BP3 ELISA



REF EIA-5049

 96



DRG 

DRG Instruments GmbH, Germany
Frauenbergstraße 18, D-35039 Marburg
Phone: +49 (0)6421-1700 0, Fax: +49 (0)6421-1700 50
Website: www.drg-diagnostics.de
E-mail: drg@drg-diagnostics.de



DRG 

DRG International, Inc., USA
841 Mountain Ave., Springfield, NJ 07081
Phone: (973) 564-7555, Fax: (973) 564-7556
Website: www.drg-international.com
E-mail: corp@drg-international.com

**Please use only the valid version of the Instructions for Use provided with the kit.
Verwenden Sie nur die jeweils gültige, im Testkit enthaltene, Gebrauchsanweisung.
Si prega di usare la versione valida delle istruzioni per l'uso a disposizione con il kit.
Por favor, se usa solo la version valida de la metodico técnico incluido aqui en el kit.
Utilisez seulement la version valide des Instructions d'utilisation fournies avec le kit.**

Table of Contents / Inhaltsverzeichnis / Tabella die Contenuti

1	INTENDED USE.....	3
2	CLINICAL BACKGROUND	3
3	PRINCIPLES OF THE METHOD	3
4	REAGENTS PROVIDED.....	4
5	SUPPLIES NOT PROVIDED	4
6	REAGENT PREPARATION	5
7	STORAGE AND EXPIRATION DATING OF REAGENTS	5
8	SPECIMEN COLLECTION AND PREPARATION.....	5
9	PROCEDURE	5
10	CALCULATION OF RESULTS.....	6
11	TYPICAL DATA.....	6
12	PERFORMANCE AND LIMITATIONS	7
13	INTERNAL QUALITY CONTROL.....	8
14	REFERENCE INTERVALS	8
15	PRECAUTIONS AND WARNINGS	8
1	VERWENDUNGSZWECK.....	9
2	KLINISCHER HINTERGRUND	9
3	GRUNDSÄTZLICHES ZUR DURCHFÜHRUNG	9
4	MITGELIEFERTE REAGENZIEN.....	9
5	ZUSÄTZLICH BENÖTIGTES MATERIAL	10
6	VORBEREITUNG DER REAGENZIEN.....	10
7	AUFBEWAHRUNG UND LAGERUNG DER REAGENZIEN	10
8	PROBENSAMMLUNG UND -VORBEREITUNG	10
9	DURCHFÜHRUNG	11
10	BERECHNUNG DER ERGEBNISSE	12
11	TYPISCHE WERTE	12
12	LEISTUNGSMERKMALE UND GRENZEN DER METHODIK	12
13	INTERNE QUALITÄTSKONTROLLE	13
14	REFERENZ INTERVALLE	13
15	VORSICHTSMASSNAHMEN UND WARNUNGEN	13
1	USO DEL KIT	14
2	INFORMAZIONI CLINICHE	14
3	PRINCIPIO DEL METODO	14
4	REATTIVI FORNITI.....	15
5	REATTIVI NON FORNITI.....	15
6	PREPARAZIONE DEI REATTIVI	16
7	CONSERVAZIONE E SCADENZA DEI REATTIVI	16
8	RACCOLTA E PREPARAZIONE DEI CAMPIONI.....	16
9	METODO DEL DOSAGGIO	16
10	CALCOLO DEI RISULTATI.....	17
11	CARATTERISTICHE TIPICHE.....	17
12	CARATTERISTICHE E LIMITI DEL METODO.....	18
13	CONTROLLO DI QUALITA' INTERNO	19
14	INTERVALLI DI RIFERIMENTO.....	19

15 PRECAUZIONI PER L'USO..... 19

16 BIBLIOGRAPHY / LITERATUR / RIFERIMENTI BIBLIOGRAFICI..... 20

17 SUMMARY OF THE PROTOCOL..... 21

SYMBOLS USED..... 22

1 INTENDED USE

Immunoenzymetric assay for the in vitro quantitative measurement of the human Insulin-like Growth Factor Binding Protein-3 (IGFBP-3) in serum.

2 CLINICAL BACKGROUND

The insulin-like growth factor (IGF) system is the primary regulator of normal body growth and regeneration, affecting cell proliferation, differentiation and apoptosis. In addition, the IGF-system appears to modify insulin sensitivity and long-term glucose metabolism. Finally, numerous epidemiological, experimental and clinical data indicate that the IGF-system is also involved in the development of several common cancers as well as frequent diseases such as atherosclerosis and type 2 diabetes mellitus.

The IGF-system consists of a family of closely related peptides, which includes the two primary growth promoting peptides, IGF-I and IGF-II, 6 specific high-affinity IGF-binding proteins (IGFBP-1 to -6), and a large non-IGF-binding glycoprotein, the "acid labile subunit" (ALS).

IGFBP-3 is the most abundant IGF-binding protein, accounting for as much as 75% or more of the circulating IGF-binding capacity in healthy subjects. IGFBP-3 shares functional properties with IGFBP-5 in that both peptides are able to form high molecular weight ternary complexes of ~150 kilo Dalton with ALS and either IGF-I or -II. However, IGFBP-5 circulates in much lower concentrations than IGFBP-3, and in healthy subjects the ternary complexes carry as much as 90% of IGFBP-3 but only about 50% of IGFBP-5.

Originally, the IGFBPs were thought to serve as IGF-carrier proteins, stabilizing plasma IGF levels and controlling the egress of IGF from the circulation to the extra-vascular compartment. Furthermore, it was assumed that IGFBP-complexed IGF was biologically more or less inactive, being deprived its ability to interact with the IGF-I receptor. However, it soon became apparent that in some experimental settings the IGFBPs stimulated rather than inhibited IGF-I mediated actions, and accordingly, the IGFBPs are now often referred to as modulators of IGF-I bioactivity. In addition, the majority of the IGFBPs, and in particular IGFBP-3, exerts IGF-I and IGF-I receptor independent effects, possible involving interactions with specific receptors located at the cell surface and intracellular. For example, IGFBP-3 is nowadays considered to serve as an anti-cancer molecule, apparently protecting against several common cancers, and effects of IGFBP-3 on insulin signaling in cultured adipocytes have also been suggested.

The turnover of the ternary complexes is very slow, and the plasma concentration of IGFBP-3 remains stable throughout the day, being unaffected by short-term nutritional changes. Thus, the level of IGFBP-3 may be determined by one single measurement. GH is the primary regulator of IGFBP-3 as well as of IGF-I and ALS and therefore, all three peptides increase during the pubertal growth spurt, where after levels gradually decline with increasing age. In children, IGFBP-3 has been shown to correlate with the 24-h integrated GH secretion and in particular in children IGFBP-3 may be helpful in the diagnosis of GH deficiency.

3 PRINCIPLES OF THE METHOD

The IGFBP-3-ELISA is a solid phase Enzyme Amplified Sensitivity Immunoassay performed on microtiterplates.

Standards and samples react with the capture monoclonal antibody (MAb 1) coated on microtiter well and with a monoclonal antibody (MAb 2) labelled with horseradish peroxidase (HRP). After an incubation period allowing the formation of a sandwich: coated MAb 1 – human IGFBP-3– MAb 2 – HRP, the microtiterplate is washed to remove unbound enzyme labelled antibody. Bound enzyme-labelled antibody is measured through a chromogenic reaction. Chromogenic solution (TMB) is added and incubated. The reaction is stopped with the addition of Stop Solution and the microtiterplate is then read at the appropriate wavelength. The amount of substrate turnover is determined colourimetrically by measuring the absorbance, which is proportional to the human IGFBP-3 concentration.

A calibration curve is plotted and IGFBP-3 concentration in samples is determined by interpolation from the calibration curve.

4 REAGENTS PROVIDED

	Reagents	96 tests Kit	Reconstitution
PLATE	Microtiterplate with 96 anti IGFBP-3 (monoclonal antibodies) coated breakable wells	96 wells	Ready for use
Ab HRP CONC	Conjugate: HRP labelled anti-IGFBP-3 (monoclonal antibodies) in citrate buffer with bovine serum albumin and Proclin	1 vial 0.5 mL	Dilute 20 x with conjugate buffer
CONJ BUF	Conjugate Buffer: Tris buffer with bovine serum albumin and thymol	1 vial 10 mL	Ready for use
CAL N	Calibrators - N = 1 to 5 , in phosphate buffer with bovine serum and thymol. See exact values on vial labels. Calibrators are prediluted. ! Use dilution buffer as zero calibrator.	5 vials lyophilized	Add 1 mL distilled water
DIL BUF	Dilution Buffer: Phosphate buffer with bovine albumin, bovine serum and thymol.	1 vial 100 mL	Ready for use
CONTROL N	Controls - N = 1 or 2 in human plasma with thymol. See exact values on vial labels. Controls are prediluted.	2 vials lyophilized	Add 1 mL distilled water
WASH SOLN CONC	Wash Solution (Tris-HCl)	1 vial 10 mL	Dilute 200 x with distilled water (use a magnetic stirrer).
CHROM TMB	Chromogenic TMB Solution (Tetramethylbenzidine)	1 vial 12 mL	Ready for use
STOP SOLN	Stop Solution: HCl 1.0 N	1 vial 12 mL	Ready for use

Note: use the dilution buffer as zero standard.

The calibrators are standardized against the NIBSC/WHO recombinant IGFBP-3, reference reagent coded 93/560.

5 SUPPLIES NOT PROVIDED

The following material is required but not provided in the kit:

1. High quality distilled water
2. Pipettes for delivery of: 50 μ L, 100 μ L and 1 mL (the use of accurate pipettes with disposable plastic tips is recommended)
3. Plastic tubes for dilution of samples
4. Vortex mixer
5. Magnetic stirrer
6. Washer for microtiterplates
7. Microtiterplate reader capable of reading at 450 nm and 650 nm (monochromatic reading)

6 REAGENT PREPARATION

A. Calibrators:

Reconstitute calibrators with 1 mL distilled water.

! Use dilution buffer as zero calibrator

B. Controls:

Reconstitute the controls with 1 mL distilled water.

C Working IGFBP-3-HRP conjugate:

Prepare an adequate volume of conjugate solution by adding for example:

100 µL of the 20 x concentrated IGFBP-3-HRP conjugate to 2 mL of conjugate buffer. Use a vortex to homogenize.

Extemporaneous preparation is recommended.

D Working Wash solution:

Prepare an adequate volume of Working Wash solution by adding 199 volumes of distilled water to 1 volume of Wash Solution (200x). Use a magnetic stirrer to homogenize.

Discard unused Working Wash solution at the end of the day.

7 STORAGE AND EXPIRATION DATING OF REAGENTS

- Before opening or reconstitution, all kit components are stable until the expiry date, indicated on the vial label, if kept at 2 °C to 8 °C.
- Unused strips must be stored, at 2 °C to 8 °C, in a sealed bag containing a desiccant until expiration date.
- After reconstitution, standards and controls are stable for one week at 2 °C to 8 °C. For longer storage periods, aliquots should be made and kept at -20 °C for maximum 3 months. Avoid successive freezing and thawing
- The concentrated Wash Solution is stable at room temperature (18° C - 25 °C) until expiration date.
- The Working IGFBP-3-HRP conjugate is stable for 4 hours at room temperature (18° C - 25 °C), avoid direct sunlight.
- Alterations in physical appearance of kit reagents may indicate instability or deterioration.

8 SPECIMEN COLLECTION AND PREPARATION

- Serum must be kept at 2 °C - 8 °C.
- If the test is not run within 24 hours, storage in aliquots at -20 °C is recommended. Avoid subsequent freeze thaw cycles.
- Prior to use, all samples should be at room temperature (18° C - 25 °C). It is recommended to vortex the samples before use.
- Do not use haemolysed samples.

9 PROCEDURE

9.1 Handling notes

Do not use the kit or components beyond expiry date.

Do not mix materials from different kit lots.

Bring all the reagents to room temperature (18° C - 25 °C) prior to use.

Thoroughly mix all reagents and samples by gentle agitation or swirling.

Perform standards, controls and samples in duplicate. Vertical alignment is recommended.

Use a clean plastic container to prepare the Wash Solution.

In order to avoid cross-contamination, use a clean disposable pipette tip for the addition of each reagent and sample.

For the dispensing of the Chromogenic Solution and the Stop Solution avoid pipettes with metal parts.

High precision pipettes or automated pipetting equipment will improve the precision.

Respect the incubation times.

To avoid drift, the time between pipetting of the first standard and the last sample must be limited to the time mentioned in section 12 paragraph 5 (Time delay).

Prepare a calibration curve for each run, do not use data from previous runs.

Dispense the Chromogenic Solution within 15 minutes following the washing of the microtiter plate.

During incubation with Chromogenic Solution, avoid direct sunlight on the microtiter plate.

Each well of the microplate can only be used once.

9.2 Procedure

1. Label one plain plastic tube for each sample.
2. Dispense 1 mL of Dilution Buffer into each tube.
3. Add 10 µL of sample into these tubes.
4. Vortex pre-diluted samples, reconstituted standards and controls.
5. Select the required number of wells for the run. The unused wells should be resealed in the bag with a desiccant and stored at 2 °C - 8 °C.
6. Secure the wells into the holding frame.
7. Pipette 100 µL of dilution buffer as zero calibrator.
Pipette 100 µL of each calibrator, control and diluted sample into the appropriate wells.
8. Pipette 50 µL of IGFBP-3-HRP conjugate solution into all the wells.
9. Incubate for **2 hours** at room temperature (18° C - 25 °C).
10. Aspirate the liquid from each well.
11. Wash the plate 3 times with 400 µL wash solution and aspirate.
12. Pipette 100 µL of the Chromogenic solution into each well within 15 minutes following the washing step.
13. Incubate the microtiter plate for **30 minutes** at room temperature (18° C - 25 °C), avoid direct sunlight
14. Pipette 100 µL of Stop Solution into each well.
15. Read at 450 nm (reference filter 630 nm or 650 nm) within 1 hour and calculate the results as described in section 10.

10 CALCULATION OF RESULTS

1. Read the plate at 450 nm against a reference filter set at 650 nm (or 630 nm).
2. Calculate the mean of duplicate determinations.
3. Plot the OD values (ordinate) for each calibrator against the corresponding concentration of Hu IGFBP-3 (abscissa) and draw a calibration curve through the calibrator points by connecting the plotted points with straight lines.
4. Read the concentration for each control and sample by interpolation on the calibration curve.
5. Computer assisted data reduction will simplify these calculations. If automatic result processing is used, a 4-parameter logistic function curve fitting is recommended.

11 TYPICAL DATA

The following data are for illustration only and should never be used instead of the real time calibration curve.

IGFBP-3 ELISA		OD units
Calibrator	0 ng/mL	0.028
	460 ng/mL	0.114
	1270 ng/mL	0.311
	3020 ng/mL	0.778
	6710 ng/mL	1.403
	16070 ng/mL	2.588

12 PERFORMANCE AND LIMITATIONS

12.1 Detection Limit

Sixteen zero calibrators were assayed along with a set of other standards. The detection limit, defined as the apparent concentration two standard deviations above the average OD at zero binding, was 10 ng/mL

12.2 Specificity

Some potentially interfering hormones have been tested. At concentrations up to 10 µg/mL, none of the following hormones showed significant interference:

- rhIGF-BP1
- rhIGF-BP2
- rhIGF-BP4
- rhIGF-BP5
- rhIGF-BP6
- rhIGF-I
- rhIGF-II

12.3 Precision

INTRA ASSAY				INTER ASSAY			
Serum	N	<X> ± SD (ng/mL)	CV (%)	Serum	N	<X> ± SD (ng/mL)	CV (%)
A	22	827.3 ± 41.99	5.1	A	10	3074 ± 198.67	6.4
B	24	2081.7 ± 104.4	5.1	B	10	4951 ± 296.4	6

SD : Standard Deviation; CV: Coefficient of variation

12.4 Accuracy

RECOVERY TEST

Sample	Added IGFBP-3 (ng/mL)	Recovered IGFBP-3 (ng/mL)	Recovery (%)
Serum 1	3700	3880	104.8%
	5940	6680	112%
	10680	11700	109.5%
Serum 2	3700	3760	101.6%
	5940	6620	111%
	10680	11620	108.8%

DILUTION TEST

Sample	Dilution	Theoretical Concent. (ng/mL)	Measured Concent. (ng/mL)
Serum A	1/1		6720
	1/2	3360	3510
	1/4	1680	1540
	1/8	840	760
	1/16	420	440
Serum B	1/1		6510
	1/2	3250	3190
	1/4	1620	1410
	1/8	810	710
	1/16	400	440

Serial dilutions were made after the initial dilution with dilution buffer as described in the procedure section 9.2. step 2-3 .

12.5 Time delay between last standard and sample dispensing

As shown hereafter, assay results remain accurate even when a sample is dispensed 30 minutes after the standards have been added to the coated wells.

TIME DELAY		
	0 min	30 min
	(ng/mL)	(ng/mL)
S1	4060	4800
S2	5930	5900

13 INTERNAL QUALITY CONTROL

- If the results obtained for Control 1 and/or Control 2 are not within the range specified on the vial label, the results cannot be used unless a satisfactory explanation for the discrepancy has been given.
- If desirable, each laboratory can make its own pools of control samples, which should be kept frozen in aliquots. Controls which contain azide will interfere with the enzymatic reaction and cannot be used.
- Acceptance criteria for the difference between the duplicate results of the samples should rely on Good Laboratory Practises
- It is recommended that Controls be routinely assayed as unknown samples to measure assay variability. The performance of the assay should be monitored with quality control charts of the controls.
- It is good practise to check visually the curve fit selected by the computer.

14 REFERENCE INTERVALS

These values are given only for guidance; each laboratory should establish its own normal range of values.

Age Group	MALES (ng/mL)			FEMALES (ng/mL)		
	Mean	Range	N	Mean	Range	N
0 - 2 years	2639	1481 - 4481	15	2348	1398 - 3485	12
3 - 5 years	2405	1479 - 3053	12	2752	2059 - 3325	13
6 - 8 years	3186	2174 - 5128	17	3282	2469 - 4495	13
9 - 11 years	3263	2020 - 4705	21	3298	2343 - 4640	11
12 - 14 years	3672	2239 - 5971	19	4241	3000 - 7022	14
15 - 17 years	4031	2710 - 5235	21	4181	2539 - 6607	20
18 - 20 years	3826	2304 - 5537	10	3709	2272 - 6102	9
21 - 30 years	3372	2093 - 4553	11	3766	2704 - 5595	10
31 - 40 years	2704	1190 - 4140	14	3372	2660 - 4533	12
41 -50 years	3886	2318 - 6897	18	3247	2323 - 4046	16
51 - 60 years	3176	2113 - 4625	16	3830	1603 - 5998	15
> 60 years	2827	1155 - 3877	23	3621	1995 - 6505	21

15 PRECAUTIONS AND WARNINGS

Safety

For *in vitro* diagnostic use only.

The human blood components included in this kit have been tested by European approved and/or FDA approved methods and found negative for HBsAg, anti-HCV, anti-HIV-1 and 2. No known method can offer complete assurance that human blood derivatives will not transmit hepatitis, AIDS or other infections. Therefore, handling of reagents, serum or plasma specimens should be in accordance with local safety procedures.

All animal products and derivatives have been collected from healthy animals. Bovine components originate from countries where BSE has not been reported. Nevertheless, components containing animal substances should be treated as potentially infectious.

Avoid any skin contact with all reagents, Stop Solution contains HCl. In case of contact, wash thoroughly with water.

Do not smoke, drink, eat or apply cosmetics in the working area. Do not pipette by mouth. Use protective clothing and disposable gloves.

For more information, see Safety Data Sheet (SDS).

1 VERWENDUNGSZWECK

Ein immunenzymmetrisches Assay für die quantitative in vitro Bestimmung von humanem Insulin-like Growth Factor Binding Protein-3 (IGFBP-3) in Serum.

2 KLINISCHER HINTERGRUND

Informationen hierzu entnehmen Sie bitte der englischen Gebrauchsanweisung.

3 GRUNDSÄTZLICHES ZUR DURCHFÜHRUNG

Der IGFBP-3-ELISA ist ein solid phase-Enzyme Amplified Sensitive Immunoassay im Mikrotiterplattenformat.

Kalibratoren und Proben reagieren mit dem primären monoklonalen Antikörper (MAk 1), mit dem die Wells der Mikrotiterplatte beschichtet sind, und mit einem monoklonalen Antikörper (MAk 2), der mit Meerrettich-Peroxidase (MRP) markiert ist. Nach einer Inkubationsphase bildet sich ein Sandwich-Komplex: MAk 1 - IGFBP-3 - MAk 2 - MRP; nicht gebundene enzymmarkierte Antikörper werden durch Waschen der Mikrotiterplatte entfernt. Gebundene enzymmarkierte Antikörper werden durch eine Farbreaktion gemessen. Chromogene Lösung (TMB – H₂O₂) wird hinzugefügt und inkubiert. Die Reaktion wird durch Hinzufügen einer Stopplösung beendet und die Mikrotiterplatte wird bei adäquater Wellenlänge ausgewertet. Die Menge an Substratumsatz wird kolorimetrisch durch Messung der Absorption bestimmt, die proportional zur IGFBP-3-Konzentration ist.

Es wird eine Kalibrationskurve erstellt und die IGFBP-3-Konzentration in den Proben wird durch Interpolation von der Kalibrationskurve bestimmt.

4 MITGELIEFERTE REAGENZIEN

	Reagenzien	96 Test Kit	Rekonstitution
PLATE	Mikrotiterplatte mit 96 Anti-IGFBP-3 beschichteten, abbrechbaren Wells (monoklonale Antikörper)	96 Wells	gebrauchsfertig
Ab HRP CONC	Enzymkonjugat-Konzentrat: MRP markierte Anti- IGFBP-3 (monoklonale Antikörper) in Zitratpuffer mit Rinderserumalbumin und Thymol	1 Gefäß 0.5 mL	20 x mit Conjugate Buffer verdünnen
CONJ BUF	Konjugatpuffer, TRIS-Puffer mit Rinderserumalbumin und Proclin	1 Gefäß 10 mL	gebrauchsfertig
CAL N	Kalibratoren- N = 1 bis 5 , in Phosphatpuffer mit Rinderserum und Thymol. Genauere Werte – Siehe Fläschchenetikett. Die Kalibratoren sind vorverdünnt. ! Dilution Buffer wird als Null-Kalibrator eingesetzt.	5 Gefäße lyophilisiert	1 mL dest. Wasser zugeben
DIL BUF	Verdünnungspuffer, Phosphatpuffer mit Rindereiweiß, Rinderserum und Thymol.	1 Gefäß 100 mL	gebrauchsfertig
CONTROL N	Kontrollen - N = 1 oder 2 In Humanplasma und Thymol Genauere Werte – Siehe Fläschchenetikett. Die Kontrollen sind vorverdünnt.	2 Gefäße lyophilisiert	1 mL dest. Wasser zugeben
WASH SOLN CONC	Waschlösung Konzentrat (Tris-HCl)	1 Gefäß 10 mL	200 x mit dest. Wasser verdünnen (Magnetrührer benutzen).
CHROM TMB	Substratlösung (Tetramethylbenzidin)	1 Gefäß 12 mL	gebrauchsfertig
STOP SOLN	Stopplösung: HCl 1,0 N	1 Gefäß 12 mL	gebrauchsfertig

Bemerkung: Verdünnungspuffer wird als Null-Standard eingesetzt.

Die Kalibratoren sind standardisiert gegen das NIBSC/WHO Referenzreagenz für rekombinantes IGFBP-3, (Code 93/560).

5 ZUSÄTZLICH BENÖTIGTES MATERIAL

Folgendes Material wird benötigt, aber nicht mit dem Kit mitgeliefert:

1. Hochwertiges destilliertes Wasser
2. Pipetten: 50 µL, 100 µL und 1 mL (Verwendung von Präzisionspipetten mit Einwegplastikspitzen wird empfohlen)
3. Plastikröhrchen zur Probenverdünnung
4. Vortex Mixer
5. Magnetrührer
6. Waschgerät für Mikrotiterplatten
7. Mikrotiterplatten-Lesegerät zur Auswertung bei 450 nm und 650 nm

6 VORBEREITUNG DER REAGENZIEN

A. Kalibratoren:

Rekonstituieren Sie die Kalibratoren mit 1,0 mL dest. Wasser.

! Dilution Buffer wird als Null-Standard eingesetzt.

B. Kontrollen:

Rekonstituieren Sie die Kontrollen mit 1,0 mL dest. Wasser.

Enzymkonjugat-Arbeitslösung

Stellen Sie das benötigte Volumen an Enzymkonjugatlösung her, z.B.: 100 µL des 20x-Enzyme Conjugate + 2,0 mL Conjugate Buffer. Verwenden Sie einen Vortex-Mischer zum gleichmäßigen Durchmischen.

Waschlösung:

Bereiten Sie ein angemessenes Volumen Waschlösung aus einem Anteil Waschlösung (200x) mit 199 Anteilen dest. Wasser zu. Verwenden Sie einen Magnetrührer zum gleichmäßigen Durchmischen. Werfen Sie die nicht benutzte Waschlösung am Ende des Tages weg.

7 AUFBEWAHRUNG UND LAGERUNG DER REAGENZIEN

- Vor dem Öffnen oder der Rekonstitution sind die Reagenzien des Kits bis zum Ablaufdatum (Angaben auf Etikett) bei Lagerung bei 2 °C bis 8 °C stabil.
- Nicht verwendete Mikrotiterstreifen sollten bis zum Verfallsdatum dicht in der Folie verschlossen mit Trockenmittel bei 2 °C bis 8 °C gelagert werden.
- Nach der Rekonstitution sind die Kalibratoren und Kontrollen bei 2 °C bis 8 °C 7 Tage stabil. Aliquots müssen bei längerer Aufbewahrung bei -20 °C eingefroren werden, dann sind Sie 3 Monate haltbar. Vermeiden Sie wiederholtes Einfrieren und Auftauen.
- Die konzentrierte Waschlösung ist bei Raumtemperatur (18 °C - 25 °C) bis zum Verfallsdatum haltbar. Frisch zubereitete Waschlösung sollte am selben Tag benutzt werden.
- Die Enzymkonjugat-Arbeitslösung ist bei Raumtempertur für 4 Stunden stabil. Direktes Sonnenlicht vermeiden.
- Veränderungen im Aussehen der Kitkomponenten können ein Anzeichen für Instabilität oder Zerfall sein.

8 PROBENSAMMLUNG UND -VORBEREITUNG

- Serumproben müssen bei 2 °C - 8 °C aufbewahrt werden.
- Falls der Test nicht innerhalb von 24 Stunden durchgeführt wird, ist die Aufbewahrung bei -20 °C erforderlich. Vermeiden Sie wiederholtes Einfrieren und Auftauen.
- Vor Gebrauch müssen alle Proben Raumtemperatur (18 °C - 25 °C) erreichen. Vortexmischen der Proben wird vor Gebrauch empfohlen.
- Keine hämolysierten Proben verwenden.

9 DURCHFÜHRUNG

9.1 Bemerkungen zur Durchführung

Verwenden Sie den Kit oder dessen Komponenten nicht nach Ablaufdatum.

Vermischen Sie Materialien von unterschiedlichen Kit-Chargen nicht.

Bringen Sie alle Reagenzien vor der Verwendung auf Raumtemperatur (18 °C - 25 °C).

Mischen Sie alle Reagenzien und Proben gründlich durch sanftes Schütteln oder Rühren.

Führen Sie Kalibratoren, Kontrollen und Proben doppelt aus. Vertikale Ausrichtung wird empfohlen.

Verwenden Sie zur Zubereitung der Waschlösung einen reinen Kunststoffbehälter.

Verwenden Sie saubere Einwegpipettenspitzen, um Kreuzkontamination zu vermeiden.

Verwenden Sie zur Pipettierung der Substratlösung und der Stopplösung keine Pipetten mit Metallteilen.

Präzisionspipetten oder ein automatisches Pipettiersystem erhöhen die Präzision.

Achten Sie auf die Einhaltung der Inkubationszeiten.

Zur Vermeidung von Drift muss die Zeit zwischen dem Pipettieren des ersten Kalibrators und der letzten Probe auf die Zeit beschränkt werden, die in Abschnitt 12 Absatz 5 (Zeitverzögerung) erwähnt wird.

Erstellen Sie für jeden Durchlauf eine Kalibrationskurve, verwenden Sie nicht die Daten von früheren Durchläufen.

Pipettieren Sie die chromogene Lösung innerhalb von 15 Minuten nach dem Waschen der Mikrotiterplatte.

Während der Inkubation mit der chromogenen Lösung ist die Mikrotiterplatte vor direktem Sonnenlicht zu schützen.

Jede Vertiefung der Mikrotiterplatte kann nur einmal verwendet werden.

9.2 Durchführung

1. Beschriften Sie für jede Probe ein Plastikröhrchen.
2. Pipettieren Sie 1,0 mL Dilution Buffer in jedes Röhrchen.
3. Geben Sie je 10 µL Probe in das entsprechende Röhrchen.
4. Mischen Sie die vorverdünnten Proben, die aufgelösten Standards und Kontrollen auf einem Vortex-Mischer.
5. Wählen Sie die erforderliche Anzahl der Streifen für den Lauf aus. Nicht verwendete Mikrotiterstreifen sollten wieder dicht in der Folie verschlossen mit Trockenmittel bei 2 °C bis 8 °C gelagert werden.
6. Befestigen Sie die Streifen im Halterahmen.
7. Pipettieren Sie 100 µL Dilution Buffer als Null-Standard.
Pipettieren Sie 100 µL Kalibrator, Kontrolle und verdünnte Probe in die entsprechenden Wells.
8. Pipettieren Sie 50 µL Anti-IGFBP-3-MRP-Konjugat in alle Wells.
9. Inkubieren Sie **2 Stunden** bei Raumtemperatur (18 °C - 25 °C).
10. Saugen Sie die Flüssigkeit aus jedem Well ab.
11. Waschen Sie die Platte 3-mal mit 400 µL Waschlösung und saugen Sie wieder ab.
12. Pipettieren Sie 100 µL der Substratlösung innerhalb von 15 Minuten nach dem Waschvorgang in jedes Well.
13. Inkubieren Sie die Mikrotiterplatte **30 Minuten** bei Raumtemperatur (18 °C - 25 °C); vermeiden Sie direktes Sonnenlicht.
14. Pipettieren Sie 100 µL der Stopplösung in jeden Well.
15. Werten Sie die Absorptionen bei 450 nm (Referenzfilter 630 nm oder 650 nm) innerhalb 1 Stunde aus und berechnen Sie die Resultate wie in Abschnitt 10 beschrieben.

10 BERECHNUNG DER ERGEBNISSE

1. Werten Sie die Platte bei 450 nm gegen einen Referenzfilter auf 650 nm (oder 630 nm) aus.
2. Berechnen Sie den Mittelwert der optischen Dichte (OD) aus den Doppelbestimmungen.
3. Tragen Sie den OD-Wert (Ordinate) für jeden Standard gegen die entsprechende IGFBP-3-Konzentration (Abszisse) auf und zeichnen Sie eine Kalibrationskurve durch die Kalibrationspunkte, indem Sie die eingetragenen Punkte durch gerade Linien verbinden.
4. Berechnen Sie die Konzentration für jede Kontrolle und Probe durch Interpolation aus der Kalibrationskurve.
5. Computergestützte Methoden können ebenfalls zur Erstellung der Kalibrationskurve verwendet werden. Falls die Ergebnisberechnung mit dem Computer durchgeführt wird, empfehlen wir die Berechnung mit einer "4 Parameter"-Kurvenfunktion.

11 TYPISCHE WERTE

Die folgenden Daten dienen nur zu Demonstrationszwecken und können nicht als Ersatz für die Echtzeitstandardkurve verwendet werden.

IGFBP-3 ELISA		OD-Einheiten
Standard	0 ng/mL	0,028
	460 ng/mL	0,114
	1270 ng/mL	0,311
	3020 ng/mL	0,778
	6710 ng/mL	1,403
	16070 ng/mL	2,588

12 LEISTUNGSMERKMALE UND GRENZEN DER METHODIK**12.1 Nachweisgrenze**

Sechzehn Null-Kalibratoren wurden zusammen mit einem Satz anderer Kalibratoren gemessen.

Die Nachweisgrenze, definiert als die scheinbare Konzentration bei zwei Standardabweichungen über dem gemessenen Durchschnittswert bei Nullbindung, entsprach 10 ng/mL.

12.2 Spezifität

Mögliche kreuzreaktive Hormone wurden gemessen. Bis zu einer Konzentration von 10 µg/mL zeigte keines der folgenden Hormone eine nennenswerte Interferenz:

- rhIGF-BP1
- rhIGF-BP2
- rhIGF-BP4
- rhIGF-BP5
- rhIGF-BP6
- rhIGF-I
- rhIGF-II

Angaben zu

12.3 Präzision**12.4 Genauigkeit****12.5 Zeitverzögerung zwischen letzter Kalibrator- und Probenzugabe**

Entnehmen Sie bitte der englischen Gebrauchsanweisung.

13 INTERNE QUALITÄTSKONTROLLE

- Entsprechen die Ist-Werte der Kontrollen nicht den auf den Fläschchen angegebenen Soll-Werten, können die Werte, ohne treffende Erklärung der Abweichungen, nicht weiterverarbeitet werden.
- Falls zusätzliche Kontrollen erwünscht sind, kann jedes Labor seinen eigenen Pool herstellen, der in Aliquots eingefroren werden sollte. Kontrollen mit erhöhten Azidkonzentrationen stören die Enzymreaktion und können nicht verwendet werden.
- Akzeptanzkriterien für die Differenz zwischen den Resultaten der Wiederholungstests anhand der Proben müssen auf Guter Laborpraxis beruhen.
- Es wird empfohlen, Kontrollen im Assay routinemäßig wie unbekannte Proben zu behandeln, um die Assayvarianz zu messen. Die Leistung des Assay muss mit den Qualitätskontrollkarten der Kontrollen überprüft werden.
- Es hat sich bewährt, die durch den Computer ausgewählte Kurvenanpassung visuell zu überprüfen.

14 REFERENZ INTERVALLE

Diese Werte sind nur Richtwerte; jedes Labor muss seinen eigenen Normalwertbereich ermitteln.

Altersgruppe	Männer (ng/mL)			Frauen (ng/mL)		
	Mittelwert	Bereich	N	Mittelwert	Bereich	N
0 - 2 Jahre	2639	1481 - 4481	15	2348	1398 - 3485	12
3 - 5 Jahre	2405	1479 - 3053	12	2752	2059 - 3325	13
6 - 8 Jahre	3186	2174 - 5128	17	3282	2469 - 4495	13
9 - 11 Jahre	3263	2020 - 4705	21	3298	2343 - 4640	11
12 - 14 Jahre	3672	2239 - 5971	19	4241	3000 - 7022	14
15 - 17 Jahre	4031	2710 - 5235	21	4181	2539 - 6607	20
18 - 20 Jahre	3826	2304 - 5537	10	3709	2272 - 6102	9
21 - 30 Jahre	3372	2093 - 4553	11	3766	2704 - 5595	10
31 - 40 Jahre	2704	1190 - 4140	14	3372	2660 - 4533	12
41 - 50 Jahre	3886	2318 - 6897	18	3247	2323 - 4046	16
51 - 60 Jahre	3176	2113 - 4625	16	3830	1603 - 5998	15
> 60 Jahre	2827	1155 - 3877	23	3621	1995 - 6505	21

15 VORSICHTSMASSNAHMEN UND WARNUNGEN**Sicherheit**

Nur für diagnostische Zwecke.

Die menschlichen Blutkomponenten in diesem Kit wurden mit europäischen und in den USA erprobten FDA-Methoden getestet, sie waren negativ für HBsAG, anti-HCV und anti-HIV 1 und 2. Keine bekannte Methode kann jedoch vollkommene Sicherheit darüber liefern, dass menschliche Blutbestandteile nicht Hepatitis, AIDS oder andere Infektionen übertragen. Deshalb sollte der Umgang mit Reagenzien, Serum oder Plasmaproben in Übereinstimmung mit den Sicherheitsbestimmungen erfolgen.

Alle tierischen Produkte und deren Derivate wurden von gesunden Tieren gesammelt. Komponenten von Rindern stammen aus Ländern in denen BSE nicht nachgewiesen wurde.

Trotzdem sollten Komponenten, die tierische Substanzen enthalten, als potenziell infektiös betrachtet werden.

Vermeiden Sie Hautkontakt mit allen Reagenzien. Die Stopplösung enthält HCl. Bei Kontakt gründlich mit Wasser spülen.

Bitte rauchen, trinken, essen Sie nicht in Ihrem Arbeitsbereich, und verwenden Sie keine Kosmetika. Pipettieren Sie nicht mit dem Mund. Verwenden Sie Schutzkleidung und Wegwerfhandschuhe.

Weitere Informationen können Sie dem Sicherheitsdatenblatt (SDB) entnehmen.

1 USO DEL KIT

Kit immunoenzimatico per la determinazione quantitativa *in vitro* della Proteina 3 legante il Fattore di Crescita Insulino-simile (IGFBP-3) umano nel siero.

2 INFORMAZIONI CLINICHE

Il sistema del fattore di crescita insulino-simile (IGF), che interviene nel processo di proliferazione, differenziazione e apoptosi cellulare, è il principale regolatore della normale crescita e rigenerazione organica. Il sistema IGF sembrerebbe inoltre modificare la sensibilità insulinica e il metabolismo del glucosio a lungo termine. Molti dati epidemiologici, sperimentali e clinici indicano come il sistema IGF sia coinvolto anche nello sviluppo di molti comuni tipi di cancro, nonché di patologie frequentemente riscontrabili quali l'aterosclerosi e il diabete mellito di tipo 2.

Il sistema IGF è costituito da una famiglia di peptidi strettamente associati tra loro, quali i due principali peptidi stimolanti la crescita, IGF-I e IGF-II, sei proteine specifiche IGF-leganti ad alta affinità (IGFBP da 1 a 6) e una grossa glicoproteina non-IGF-legante, la subunità acido labile (ALS).

La IGFBP-3, la proteina IGF-legante presente in maggior quantità, rappresenta nei soggetti sani il 75% o più della capacità IGF-legante totale. La IGFBP-3 condivide le sue proprietà funzionali con la IGFBP-5, essendo entrambi peptidi in grado di formare complessi ternari ad elevato peso molecolare di ~150 kilo Dalton con ALS e con IGF-I o IGF-II. Tuttavia, la IGFBP-5 circola in concentrazioni molto ridotte rispetto alla IGFBP-3 e, nei soggetti sani, i complessi ternari portano fino al 90% di IGFBP-3 e soltanto il 50% di IGFBP-5.

Originariamente si pensava che le IGFBP svolgessero il compito di proteine IGF-carrier, stabilizzanti i livelli plasmatici di IGF e con funzioni di controllo del passaggio di IGF dal flusso sanguigno al compartimento extra-vascolare. Si pensava inoltre che l'IGF, nella sua forma complessata IGFBP, fosse più o meno biologicamente inattiva essendo deprivata della sua capacità di interagire con il recettore IGF-I. Tuttavia, risultò ben presto evidente che in alcuni contesti sperimentali, le IGFBP avevano un effetto stimolante, più che inibente, l'azione IGF-I mediata. Pertanto, le IGFBP sono adesso considerate come *modulatori* della bioattività di IGF-1. La maggior parte delle IGFBP, e in special modo la IGFBP-3, produce effetti indipendenti sull'IGF-1 e sul suo recettore, con possibili interazioni con i recettori specifici situati sulla superficie cellulare o nel comparto intracellulare. Attualmente si pensa che la IGFBP-3 possa fungere da molecola anti-cancro, con effetto di protezione contro molte forme comuni di cancro, ed è stato ipotizzato un suo possibile effetto sulla segnalazione di insulina in adipociti in coltura.

Il turnover dei complessi ternari è molto lento e i livelli plasmatici di IGFBP-3 rimangono stabili nell'intero arco della giornata, non influenzati da variazioni nutrizionali a breve termine. I livelli di IGFBP-3 possono pertanto essere determinati sulla base di una singola valutazione. Essendo il GH il principale regolatore di IGFBP-3, IGFBP-1 e ALS, durante lo scatto di crescita puberale si verifica un aumento di tutti e tre i peptidi, il cui livello va successivamente diminuendo con l'avanzare dell'età. In età pediatrica, l'IGFBP-3 si correla con la secrezione di GH integrato nelle 24 ore e, particolarmente nei bambini, può rivelarsi utile nella diagnosi di deficit di GH.

3 PRINCIPIO DEL METODO

IGFBP-3-ELISA è un immunosaggio a sensibilità amplificata a fase solida eseguito su piastre di microtitolazione. I calibratori e i campioni reagiscono con la cattura dell'anticorpo monoclonale (MAb 1) che riveste il pozzetto di microtitolazione e con un anticorpo monoclonale (MAb 2) marcato con horseradish perossidasi (HRP). Dopo un periodo di incubazione che consenta la formazione di un sandwich: MAb 1 di rivestimento – IGFBP-3 umano – MAb 2 – HRP, la piastra di microtitolazione viene lavata per rimuovere l'anticorpo marcato con enzima non legato. L'anticorpo marcato con enzima non legato viene misurato attraverso una reazione cromogenica. Si procede quindi con l'aggiunta della soluzione cromogena (TMB) e successiva incubazione. La reazione viene interrotta con l'aggiunta di Soluzione di arresto; quindi la piastra di microtitolazione viene letta alla lunghezza d'onda adeguata. La quantità di turnover del substrato viene determinata colorimetricamente misurando l'assorbanza che è proporzionale alla concentrazione di IGFBP-3 umano.

Viene tracciata una curva di calibrazione e la concentrazione IGFBP-3 nei campioni viene determinata per interpolazione dalla curva di calibrazione.

4 REATTIVI FORNITI

	Reattivi	Kit da 96 test	Volume di ricostituzione
PLATE	Piastra di microtitolazione con 96 pozzetti separabili, rivestiti anti IGFBP-3 (anticorpi monoclonali)	96 pozzetti	Pronte per l'uso
Ab HRP CONC	Coniugato: marcato HRP anti-IGFBP-3 (Anticorpi monoclonali) in tampone citrato con albumina di siero bovino e Proclin	1 flacone 0,5 mL	Diluire 20 x con tampone del coniugato
CONJ BUF	Tampone del coniugato: tampone TRIS con albumina di siero bovino e timolo	1 flacone 10 mL	Pronto per l'uso
CAL N	Calibratore 1-5, in tampone fosfato con siero bovino e timolo. Le concentrazioni esatte del calibratore sono riportate sulle etichette dei flaconi. I calibratori sono pre-diluiti. ! Usare il tampone di diluizione come calibratore zero.	5 flaconi liofiliz.	Aggiungere 1 mL di acqua distillata
DIL BUF	Tampone di diluizione: tampone fosfato con albumina bovina, siero bovino e timolo.	1 flacone 100 mL	Pronto per l'uso
CONTROL N	Controlli: N = 1 o 2, in plasma umano con timolo Le concentrazioni esatte dei controlli sono riportate sulle etichette dei flaconi. I controlli sono pre-diluiti.	2 flaconi liofiliz.	Aggiungere 1 mL di acqua distillata
WASH SOLN CONC	Tampone di lavaggio (TRIS HCl)	1 flacone 10 mL	Diluire 200 x con acqua distillata (usando un agitatore magnetico)
CHROM TMB	Soluzione Cromogena TMB (tetrametilbenzidina)	1 flacone 12 mL	Pronto per l'uso
STOP SOLN	Soluzione di arresto: HCl 1,0 N	1 flacone 12 mL	Pronto per l'uso

Note: usare il tampone di diluizione come calibratore zero.

I calibratori sono standardizzati rispetto all'IGFBP-3 ricombinante, standard di riferimento NIBSC/WHO, codice 93/560

5 REATTIVI NON FORNITI

Il seguente materiale è richiesto per il dosaggio ma non è fornito nel kit.

1. Acqua distillata di qualità elevata
2. Pipette per dispensare 50 µL, 100 µL e 1 mL (Si raccomanda di utilizzare pipette accurate con puntale in plastica monouso).
3. Provette di plastica per la diluizione dei campioni.
4. Agitatore tipo vortex.
5. Agitatore magnetico.
6. lavatrice per piastra di microtitolazione
7. Lettore piastra di microtitolazione con una potenza di lettura di 450 nm e 650 nm (lettura monocromatica)

6 PREPARAZIONE DEI REATTIVI

A. Calibratore:

Ricostituire i calibratori con 1 mL di acqua distillata.
! Usare il tampone di diluizione come calibratore zero.

B. Controlli:

Ricostituire i controlli con 1 mL di acqua distillata.

C. Soluzione di lavoro del coniugato IGFBP-3-HRP:

Preparare la quantità necessaria di soluzione del coniugato aggiungendo ad esempio:
100 µL del coniugato IGFBP-3-HRP concentrato 20 x a 2 mL di tampone del coniugato. Utilizzare un vortex per omogeneizzare. Si raccomanda la preparazione estemporanea.

D. Soluzione di lavoro del tampone di lavaggio:

Preparare la quantità necessaria di soluzione di lavoro del tampone di lavaggio aggiungendo 199 parti di acqua distillata ad una parte di tampone di lavaggio concentrato (200x). Usare un agitatore magnetico per rendere la soluzione omogenea. La soluzione di lavoro va scartata al termine della giornata.

7 CONSERVAZIONE E SCADENZA DEI REATTIVI

- I reattivi non utilizzati sono stabili a 2 °C - 8 °C fino alla data riportata su ciascuna etichetta.
- Le strisce reattive inutilizzate devono essere conservate a 2 °C - 8 °C, in un contenitore sigillato che contenga un essiccante fino alla data di scadenza.
- Dopo la ricostituzione, i calibratori e i controlli sono stabili 7 giorni a 2 °C - 8 °C. Per periodi di conservazione molto lunghi, preparare e mantenere le aliquote a -20 °C per un massimo di 3 mesi. Evitare ripetuti cicli di congelamento-scongelo dei campioni.
- La soluzione di lavaggio concentrata è stabile a temperatura ambiente (18 °C - 25 °C) fino alla data di scadenza.
- Il coniugato IGFBP-3-HRP una volta pronto è stabile per 4 ore a temperatura ambiente (18 °C - 25 °C). Evitare di esporre a luce diretta.
- Alterazioni dell'aspetto fisico dei reattivi possono indicare una loro instabilità o deterioramento.

8 RACCOLTA E PREPARAZIONE DEI CAMPIONI

Conservare i campioni di siero a 2 °C - 8 °C.

Se non si desidera eseguire il dosaggio entro 24 ore dal prelievo, si raccomanda di conservare i campioni a -20 °C. Evitare ripetuti cicli di congelamento-scongelo dei campioni.

Prima dell'impiego, tutti i campioni devono essere a temperatura ambiente (18 °C - 25 °C). Si raccomanda di vortexare i campioni prima di utilizzarli.

Non usare campioni emolizzati.

9 METODO DEL DOSAGGIO

9.1 Avvertenze generali

Non usare il kit o suoi componenti oltre la data di scadenza.

Non mescolare reattivi di lotti diversi.

Prima dell'uso portare tutti i reattivi a temperatura ambiente (18 °C - 25 °C).

Mescolare delicatamente i campioni per inversione o rotazione.

Eseguire calibratori, controlli e campioni in doppio. Si raccomanda l'allineamento verticale.

Utilizzare un contenitore di plastica pulito per preparare la soluzione di lavaggio.

Per evitare cross-contaminazioni, cambiare il puntale della pipetta ogni volta che si usi un nuovo reattivo o campione.

Per la distribuzione della soluzione cromogena e la Stop Solution evitare pipette con parti metalliche.

L'uso di pipette ben tarate e ripetibili o di sistemi di pipettamento automatici migliora la precisione del dosaggio.

Rispettare i tempi di incubazione.

Per evitare derive, l'intervallo tra il pipettaggio del primo calibratore e l'ultimo campione deve essere limitato ai tempi riportati nella sezione 12.5 (Tempo Trascorso).

Allestire una curva di calibrazione per ogni seduta analitica, in quanto non è possibile utilizzare per un dosaggio curve di calibrazione di sedute analitiche precedenti.

Distribuzione della soluzione cromogena entro 15 minuti dopo il lavaggio della piastra di microtitolazione.

Durante l'incubazione con la soluzione cromogena evitare la luce diretta del sole sulla piastra di microtitolazione.

Ogni pozzetto della micropiastra può essere utilizzato una sola volta.

9.2 Metodo del dosaggio

1. Etichettare una provetta di plastica liscia per ogni campione.
2. In ciascuna provetta, dispensare 1 mL di tampone di diluizione.
3. Aggiungere a queste provette 10 µL di campione.
4. Vortexare i campioni pre-diluiti, i calibratori ricostituiti e i controlli.
5. Selezionare il numero di strisce reagenti necessario per il test. Le strisce reagenti inutilizzate devono essere risigillate nel contenitore con un essiccante e conservate a 2-8 °C.
6. Assicurare le strisce reagenti nel telaio di supporto.
7. Pipettare 100 µL di tampone di diluizione come calibratore zero. Pipettare 100 µL di ogni calibratore, controllo e campione diluito nei pozzetti adeguati.
8. Pipettare 50 µL della soluzione di lavoro del coniugato IGFBP-3-HRP in tutti i pozzetti.
9. Incubare per 2 ore a temperatura ambiente (18 °C - 25 °C).
10. Aspirare il liquido da ogni pozzetto.
11. Lavare la piastra 3 volte con 400 µl di soluzione di lavaggio e aspirare.
12. Pipettare in ogni pozzetto 100 µL di Soluzione Cromogena entro 15 minuti dal termine della fase di lavaggio.
13. Incubare la piastra di microtitolazione per 30 minuti a temperatura ambiente (18 °C - 25 °C); evitare la luce diretta del sole.
14. Pipettare 100 µL di soluzione di arresto in ogni pozzetto.
15. Leggere le assorbanze a 450 nm (filtro di riferimento a 630 nm o 650 nm) entro un'ora e calcolare i risultati come descritto nella sezione 10.

10 CALCOLO DEI RISULTATI

1. Leggere la piastra a 450 nm rispetto a un filtro di riferimento regolato a 650 nm (o 630 nm).
2. Calcolare la media delle determinazioni in duplicato.
3. Costruire la curva di calibrazione ponendo in ordinata le medie dei OD dei replicati degli standard e in ascissa le rispettive concentrazioni di IGFBP-3 umano, collegando i punti tracciati con linee rette.
4. Determinare le concentrazioni e controlli per interpolazione sulla curva di taratura.
5. E' possibile utilizzare un sistema di interpolazione dati automatizzato. Con un sistema automatico di interpolazione dati, utilizzare la curva a 4 parametri.

11 CARATTERISTICHE TIPICHE

I dati che seguono sono esclusivamente a scopo illustrativo e non devono essere in nessun caso utilizzati al posto della curva di taratura "real time".

IGFBP-3-ELISA			Unità OD
Calibratore	0	ng/mL	0,028
	460	ng/mL	0,114
	1270	ng/mL	0,311
	3020	ng/mL	0,778
	6710	ng/mL	1,403
	16070	ng/mL	2,588

12 CARATTERISTICHE E LIMITI DEL METODO

12.1 Sensibilità

Sedici replicati dello standard zero sono stati dosati insieme agli altri standard.

La sensibilità, calcolata come concentrazione apparente di un campione con OD pari alla media più 2 deviazioni standard di 16 replicati dello standard zero, è risultata essere 10 ng/mL.

12.2 Specificità

Sono stati sottoposti al test alcuni ormoni potenzialmente interferenti. Per concentrazioni fino a 10 µg/mL, non è stata evidenziata alcun interferenza significativa per nessuno di essi.

- rhIGF-BP1
- rhIGF-BP2
- rhIGF-BP4
- rhIGF-BP5
- rhIGF-BP6
- rhIGF-I
- rhIGF-II

12.3 Precisione

INTRA SAGGIO				INTER SAGGIO			
Siero	N	<X> ± SD (ng/mL)	CV (%)	Siero	N	<X> ± SD (ng/mL)	CV (%)
A	22	827,3 ± 41,99	5,1	A	10	3074 ± 198,67	6,4
B	24	2081,7 ± 104,4	5,0	B	10	4951 ± 296,4	6

SD : Deviazione Standard; CV: Coefficiente di Variazione

12.4 Accuratezza

TEST DI RECUPERO

Campione	IGFBP-3 aggiunta (ng/mL)	IGFBP-3 recuperata (ng/mL)	Recupero (%)
Siero 1	3700	3880	104,8%
	5940	6680	112%
	10680	11700	109,5%
Siero 2	3700	3760	101,6%
	5940	6620	111%
	10680	11620	108,8%

TEST DI DILUIZIONE

Campione	Diluizione	Concentrazione teorica (ng/mL)	Concentrazione misurata (ng/mL)
Siero A	1/1		6720
	1/2	3360	3510
	1/4	1680	1540
	1/8	840	760
	1/16	420	440
Siero B	1/1		6510
	1/2	3250	3190
	1/4	1620	1410
	1/8	810	710
	1/16	400	440

Le diluizioni in serie sono state effettuate con il tampone di diluizione dopo la diluizione iniziale, come descritto nella sezione 9.2. 2-3 della procedura.

12.5 Tempo trascorso tra l'aggiunta dell'ultimo calibratore e il campione

Come mostrato nella seguente tabella, il dosaggio si mantiene accurato anche quando un campione viene aggiunto nelle provette sensibilizzate 30 minuti dopo l'aggiunta del calibratore.

TEMPO TRASCORSO		
	0 min	30 min
	(ng/mL)	(ng/mL)
S1	4060	4800
S2	5930	5900

13 CONTROLLO DI QUALITA' INTERNO

- Se i risultati ottenuti dosando il Controllo 1 e il Controllo 2 non sono all'interno dei limiti riportati sull'etichetta dei flaconi, non è opportuno utilizzare i risultati ottenuti per i campioni, a meno che non si trovi una giustificazione soddisfacente.
- Ogni laboratorio può preparare un proprio pool di sieri da utilizzare come controllo, da conservare congelato in aliquote. I controlli che contengono azide interferiscono con la reazione enzimatica e quindi non possono essere utilizzati.
- I criteri di accettazione delle differenze tra i risultati in duplicato dei campioni devono basarsi sulla buona prassi di laboratorio.
- Si raccomanda di saggiare i controlli con regolarità come campioni sconosciuti per misurare la variabilità del saggio. La resa del saggio deve essere monitorata con tabelle di controllo qualità dei controlli.
- È buona pratica verificare visivamente il modello di curva selezionato dal computer.

14 INTERVALLI DI RIFERIMENTO

Questi valori sono puramente indicativi, ciascun laboratorio potrà stabilire i propri intervalli normali.

Gruppo di età	MASCHI (ng/mL)			FEMMINE (ng/mL)		
	Media	Intervallo	N	Media	Intervallo	N
0 - 2 anni	2639	1481 - 4481	15	2348	1398 - 3485	12
3 - 5 anni	2405	1479 - 3053	12	2752	2059 - 3325	13
6 - 8 anni	3186	2174 - 5128	17	3282	2469 - 4495	13
9 - 11 anni	3263	2020 - 4705	21	3298	2343 - 4640	11
12 - 14 anni	3672	2239 - 5971	19	4241	3000 - 7022	14
15 - 17 anni	4031	2710 - 5235	21	4181	2539 - 6607	20
18 - 20 anni	3826	2304 - 5537	10	3709	2272 - 6102	9
21 - 30 anni	3372	2093 - 4553	11	3766	2704 - 5595	10
31 - 40 anni	2704	1190 - 4140	14	3372	2660 - 4533	12
41 - 50 anni	3886	2318 - 6897	18	3247	2323 - 4046	16
51 - 60 anni	3176	2113 - 4625	16	3830	1603 - 5998	15
> 60 anni	2827	1155 - 3877	23	3621	1995 - 6505	21

15 PRECAUZIONI PER L'USO**Sicurezza**

Il kit è solo per uso diagnostico in vitro.

I reattivi di origine umana presenti nel kit sono stati dosati con metodi approvati da organismi di controllo europei o da FDA e si sono rivelati negativi per HBs Ag, anti HCV, anti HIV1 e anti HIV2. Non sono disponibili metodi in grado di offrire la certezza assoluta che derivati da sangue umano non possano provocare epatiti, AIDS o trasmettere altre infezioni. Manipolare questi reattivi o i campioni di siero o plasma secondo le procedure di sicurezza vigenti.

Tutti i prodotti di origine animale o loro derivati provengono da animali sani. I componenti di origine bovina provengono da paesi dove non sono stati segnalati casi di BSE. E' comunque necessario considerare i prodotti di origine animale come potenziali fonti di infezioni.

Evitare qualsiasi contatto della cute con tutti i reagenti, la soluzione di arresto contiene HCl. In caso di contatto, lavare abbondantemente con acqua.

Non fumare, bere, mangiare o applicare cosmetici nell'area di lavoro. Non pipettare i reattivi con pipette a bocca. Utilizzare indumenti protettivi e guanti monouso.

Per ulteriori informazioni, consultare la scheda di sicurezza (SDS)
















16 BIBLIOGRAPHY / LITERATUR / RIFERIMENTI BIBLIOGRAFICI

1. LEROITH D., BONDY C., YAKAR S., LIU JL., BUTLER A.
The somatomedin hypothesis : 2001.
Endocr Rev 2001; 22:53-74.
2. POLLAK MN., SCHERNHAMMER ES., HANKINSON SE.
Insulin-like growth factors and neoplasia.
Nat Rev Cancer 2004; 4:505-518.
3. YUEN K., FRYSTYK J., UMPLEBY M., FRYKLUND L., DUNGER D.
Changes in free rather than total insulin-like growth factor-I enhance insulin sensitivity and suppress endogenous peak growth hormone (GH) release following short-term low dose GH administration in young healthy adults.
J Clin Endocrinol Metab 2004; 89:3956-3964.
4. KHANDWALA HM., McCUTCHEON IE., FLYVBJERG A., FRIEND KE.
The effects of insulin-like growth factors on tumorigenesis and neoplastic growth.
Endocr Rev 2000; 21:215-244.
5. RENEHAN AG., ZWAHLEN M., MINDER PC., O'DWYSER ST., SHALET PS., EGGER PM.
Insulin-like growth factor (IGF)-I, IGF binding protein-3, and cancer risk : systematic review and meta-regression analysis.
The Lancet 2004; 363:1346-1353.
6. JUUL A., SCHEIKE T., DAVIDSEN M., GYLLENBORG J., JORGENSEN T.
Low serum insulin-like growth factor I is associated with increased risk of ischemic heart disease : a population-based case-control study.
Circulation 2002; 106:939-944.
7. SANDHU MS., HEALD AH., GIBSON JM., CRUICKSHANK JK., DUNGER DB., WAREHAM NJ.
Circulating concentrations of insulin-like growth factor-I and development of glucose intolerance : a prospective observational study.
The Lancet 2002; 359:1740-1745.
8. VAESSEN N., HEUTINK P., JANSSEN JA., WITTEMAN JC., TESTERS L., HOFMAN A., LAMBERTS SW., OOSTRA BA., POLS HA., VAN DUIJN CM.
A polymorphism in the gene for IGF-I : functional properties and risk for type 2 diabetes and myocardial infarction.
Diabetes 2001; 50:637-642.
9. JUUL A. **Serum levels of insulin-like growth factor-I and its binding proteins in health and disease.**
Growth Horm IGF Res 2003; 13:113-170
10. FIRTH SM., BAXTER RC. **Cellular actions of the insulin-like growth factor binding proteins**
Endocr Rev 2002; 23:824-854.
11. BAXTER RC., MEKA S., FIRTH SM.
Molecular distribution of IGF binding protein-5 in human serum.
J Clin Endocrinol Metab 2002; 87:271-276.
12. RICORT JM.
Insulin-like growth factor binding protein (IGFBP) signaling.
Growth Horm IGF Res 2004; 14:277-286.
13. JONES JI., CLEMMONS DR. **Insulin-like growth factors and their binding proteins : biological actions.**
Endocr Rev 1995; 16:3-34.
14. ALI O., COHEN P., LEE KW.
Epidemiology and biology of insulin-like growth factor binding protein-3 (IGFBP-3) as an anti-cancer molecule.
Horm Metab Res 2003; 35:726-733.
15. CHAN SS., TWIGG SM., FIRTH SM., BAXTER RC.
Insulin-like growth factor binding protein-3 leads to insulin resistance in adipocytes.
J Clin Endocrinol Metab 2005; 90:6588-6595.
16. JUUL A., MAIN K., BLUM WF., LINDHOLM J., RANKE MB., SKAKKEBAEK NE.
The ration between serum levels of insulin-like growth factor (IGF)-I and the IGF binding proteins (IGFBP-1, 2 and 3) decreases with age in healty adults and is increased in acromegalic patients.
Clin Endocrinol (Oxf) 1994; 41:85-93.
17. BLUM WF., ALBERTSSON-WIKLAND K., ROSBERG S., RANKE MB.
Serum levels of insulin-like growth factor I (IGF-I) and IGF binding protein 3 reflect spontaneous growth hormone secretion.
J Clin Endocrinol Metab 1994; 76:1610-1616.
18. FRYSTYK J., IVARSEN P., SKJAERBAEK C., FLYVBJERG A., PEDERSEN EB., ORSKOV H.
Serum-free insulin-like growth factor I correlates with clearance in patients with chronic renal failure.
Kidney Int 1999; 56:2076-2084.
19. FRYSTYK J.
In Endocrinology and Metabolism – Clinics of North America 2005 : Endocrinology of aging, Chapter XI : Aging somatotrophic axis mechanisms and implications of IGFBP adaptation.

17 SUMMARY OF THE PROTOCOL

	CALIBRATORS CONTROLS μL	SAMPLE(S) μL
<u>DILUTION OF SAMPLES</u>		
Dilution buffer	-	1000
Sample	-	10
Shaking	Vortex	
<u>INCUBATION</u>		
Standards (0 to 5), controls	100	-
Diluted Samples,	-	100
Diluted Conjugate	50	50
<p>Incubate for 2 hours at room temperature (18° C - 25 °C). Aspirate the contents of each well. Wash 3 times with 400 μL of Wash Solution and aspirate.</p>		
Chromogenic Solution	100	100
<p>Incubate for 30 min at room temperature (18° C - 25 °C)</p>		
Stop Solution	100	100
<p>Read on a microtiterplate reader and record the absorbance of each well at 450 nm (versus 630 or 650 nm)</p>		

SYMBOLS USED

Symbol	English	Deutsch	Italiano	Español	Français	Português
	European Conformity	CE-Konformitäts-kennzeichnung	Conformità europea	Conformidad europea	Conformité normes européennes	Conformidade Europeia
	Consult instructions for use *	Gebrauchsanweisung beachten *	Consultare le istruzioni per l'uso	Consulte las instrucciones de uso	Consulter les instructions d'utilisation	Consultar as instruções de uso
	<i>In vitro</i> diagnostic medical device *	<i>In-vitro</i> -Diagnostikum *	Diagnostica in vitro	Diagnóstico in vitro	Diagnostic in vitro	Dispositivo médico para diagnóstico in vitro
	Catalogue number *	Katalognummer *	No. di Cat.	No de catálogo	Référence	Número de catálogo
	Batch code *	Chargen-bezeichnung *	Lotto no	Número de lote	No. de lot	Código do lote
	Contains sufficient for <n> tests *	Ausreichend für <n> Prüfungen *	Contenuto sufficiente per "n" saggi	Contenido suficiente para <n> ensayos	Contenu suffisant pour "n" tests	Suficiente para <n> determinações
	Temperature limit *	Temperaturgrenzwerte *	Temperatura di conservazione	Temperatura de conservación	Temperature de conservation	Limites de temperatura
	Use-by date *	Verwendbar bis *	Data di scadenza	Fecha de caducidad	Date limite d'utilisation	Prazo de validade
	Manufacturer *	Hersteller *	Fabbricante	Fabricante	Fabricant	Fabricante
	Distributor *	Vertriebspartner *	Distributore	Distribuidor	Distributeur	Distribuidor
	Date of manufacture *	Herstellungsdatum *	Data di produzione	Fecha de fabricación	Date de production	Data de fabricação
	Biological risks *	Biologische Risiken *	Rischi biologici	Riesgos biológicos	Risques biologiques	Riscos biológicos
	Caution *	Achtung *	Attenzione	Precaución	Attention	Cuidado
	Unique device Identifier *	eindeutige Produktidentifizierung *	Identificativo unico del dispositivo*	Identificación exclusiva del dispositivo *	Identifiant de dispositif unique*	Identificador único do dispositivo *
	For research use only	Nur für Forschungszwecke	Solo a scopo di ricerca	Sólo para uso en investigación	Seulement dans le cadre de recherches	
<i>Content</i>	Content	Inhalt	Contenuto	Contenido	Conditionnement	Conteúdo
<i>Volume/No.</i>	Volume / No.	Volumen/Anzahl	Volume/Quantità	Volumen/Número	Volume/Quantité	Volume / Quantidade