

Product information

Information about other products is available at: www.demeditec.com



IGFBP-3 ELISA



DEE003A



96



Demeditec Diagnostics GmbH
Lise-Meitner-Strasse 2
24145 Kiel – Germany
www.demeditec.com

Inhalt / Content

1	ZWECKBESTIMMUNG	3
2	EINFÜHRUNG	3
3	TESTPRINZIP	5
4	WARNHINWEISE UND VORSICHTSMAßNAHMEN	6
5	PROBEN	7
6	MATERIALIEN	8
7	TECHNISCHE HINWEISE	9
8	TESTDURCHFÜHRUNG	11
9	QUALITÄTSKONTROLLE.....	12
10	AUSWERTUNG	12
11	EINSCHRÄNKUNGEN.....	14
12	REFERENZWERTE	14
13	ASSAY EIGENSCHAFTEN UND VALIDIERUNG	16
14	VERGLEICHSTUDIEN	18
1	INTENDED USE.....	20
2	INTRODUCTION.....	20
3	ASSAY PRINCIPLE	22
4	WARNINGS AND PRECAUTIONS.....	22
5	SAMPLES	24
6	MATERIALS	25
7	TECHNICAL NOTES.....	26
8	ASSAY PROCEDURE	27
9	QUALITY CONTROL	28
10	EVALUATION OF RESULTS.....	28
11	LIMITATION OF PROCEDURE	30
12	REFERENCE VALUES	31
13	PERFORMANCE CHARACTERISTICS	32
14	COMPARISON WITH OTHER ASSAYS	34
15	LITERATUR / REFERENCES.....	35

DEUTSCH Gebrauchsanweisung

IGFBP-3 ELISA DEE003A	96 Bestimmungen
Testprinzip	Sandwich ELISA
Dauer (Inkubationszeit)	2,5 h
Antikörper-POD-Konjugat	gebrauchsfertig
Puffer & Substrat	gebrauchsfertig
Kalibratoren	5 Einzelkalibratoren: 0,4 - 30 ng/mL, gefriergetrocknet, humanes IGFBP-3
Assay Range	0,03 – 15150 ng/mL
Kontrolle	2 Kontrollen, gefriergetrocknet
Proben	humanes Serum / Plasma
Erforderliches Probenvolumen	10 µL
Probenverdünnung	1:505
Analytische Sensitivität	0,03 ng/mL
Durchschnittliche Intra- / Interassay Varianz	1,9% / 5,7%
Referenzwerte	Blum W.F et.al.1990 Insulin-Like Growth Factors and Their Binding Proteins. In: Ranke MB, Mullins P.E.(ed): Diagnostics of Endocrine Function in Children and Adolescents. Basel, Karger, 2011, pp.157-181

1 ZWECKBESTIMMUNG

Quantitative Messung von humanem insulinähnlichem Wachstumsfaktor Bindungsprotein 3 (IGFBP-3) in menschlichem Serum oder EDTA- und Heparin-Plasma für diagnostische und wissenschaftliche Zwecke.

2 EINFÜHRUNG

Insulin-like growth factors (IGF)-I und -II sind im Blutkreislauf an spezielle Bindungsproteine (IGFBPs) gebunden. Bisher wurden sechs verschiedene Bindungsproteine anhand ihrer Aminosäuresequenz identifiziert und als IGFBP-1, IGFBP-2, ..., IGFBP-6 klassifiziert (1). Im Blut überwiegt IGFBP-3, das hauptsächlich zur Regulierung der IGF-I und -II Konzentrationen dient. Im Gegensatz zu den anderen Bindungsproteinen hat IGFBP-3 die Eigenschaft, neben IGF-I bzw. -II noch eine säurelabile Untereinheit (acid-labile subunit, ALS) zu binden (3-5). IGFBP-3 liegt fast vollständig in Form dieses hochmolekularen ternären Komplexes vor, es finden sich aber auch geringe Mengen freies IGFBP-3 im Blut (6,7).

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

Jedoch wird die IGFBP-3 Konzentration nicht nur vom Wachstumshormon, sondern auch von weiteren Faktoren beeinflusst: Alter und sexuelles Entwicklungsstadium, Ernährung, Hypothyreose, Diabetes mellitus, Leber- und Nierenfunktion. IGFBP-3 Werte sind erniedrigt bei Unterernährung, bei Hypothyreose, Diabetes mellitus und Lebererkrankungen (6-8). Bei Vorliegen einer chronischen Niereninsuffizienz liegen jedoch erhöhte Konzentrationen vor (6,10,11). 24-Stunden-Messungen zeigen keine zirkadianen Schwankungen (12,13). Für klinische Belange ist der wichtigste regulierende Faktor das Wachstumshormon. IGFBP-3-Einzelmessungen korrelieren positiv mit dem Logarithmus der spontanen Gesamt-WH-Sekretion (8,14). Bei Patienten mit WH-Mangel sind auch die IGFBP-3 Werte erniedrigt. Mehrere Tage nach Beginn einer WH Therapie steigt die IGFBP-3 Konzentration langsam bis in den normalen Bereich an (7,8). Die langsame Reaktion auf WH-Konzentrationsänderungen und konstante zirkadiane Werte während täglicher WH-Gabe (13) lassen die Vermutung zu, dass IGFBP-3 den WH-Sekretionsstatus über mehrere Tage widerspiegelt.

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

1. Vor der Messung ist kein Extraktionsschritt notwendig. Diese Vereinfachung der Testdurchführung erhöht automatisch die Genauigkeit.
2. Die Normalwerte bei Kleinkindern sind relativ hoch, sodass die Messung subnormaler Werte verlässlicher wird.
3. Patienten mit WH-Mangel besitzen subnormale IGFBP-3 Werte. Andererseits besitzen die meisten kleinwüchsigen Kinder mit normaler WH-Sekretion auch IGFBP-3 Werte im Normalbereich (Abb. 1). Beide Gruppen sind durch die Messung der IGFBP-3 Konzentration also leicht zu unterscheiden. Bei kleinwüchsigen Kindern steigen die IGFBP-3 Werte während kontinuierlicher WH-Behandlung stetig bis in den Normalbereich an und bleiben bei fortgesetzter Therapie auch konstant (Abb. 2). Daher ist die IGFBP-3 Messung im Serum auch geeignet, WH-Therapien zu überwachen (19). Bei anderen Patienten mit ausgeprägtem Minderwuchs aber normaler WH-Sekretion, z. B. Turner-Syndrom oder Silver-Russell-Syndrom, sind die IGFBP-3 Serumwerte ebenfalls normal (8).

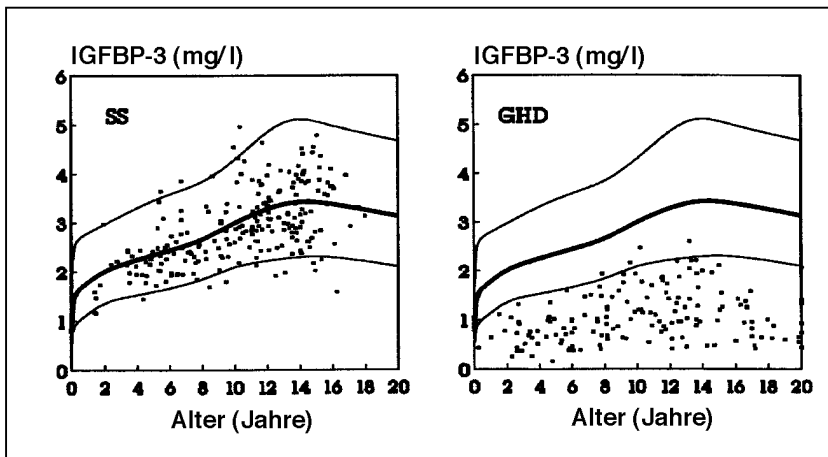


Abb. 1: IGFBP-3 Serumwerte bei kleinwüchsigen Patienten ohne WH-Mangel: angeborene Wachstums- und Entwicklungsverzögerung, vererbte Kleinwüchsigkeit, intra-uterine Wachstumsverzögerung (SS: short stature) sowie bei idiopathischem oder organischem WH-Mangel (GHD: growth hormone deficiency). Der Normalbereich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

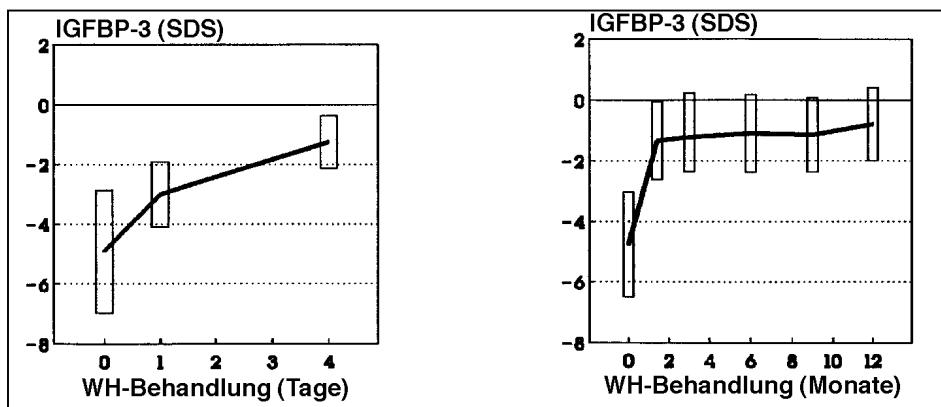


Abb. 2: IGFBP-3 Serumwerte bei Kindern mit WH-Mangel vor und während der Behandlung mit WH. Aufgrund der Altersabhängigkeit wurden die Werte über die Standardabweichungen (SDS: Standard Deviation Score) gemittelt angegeben.

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

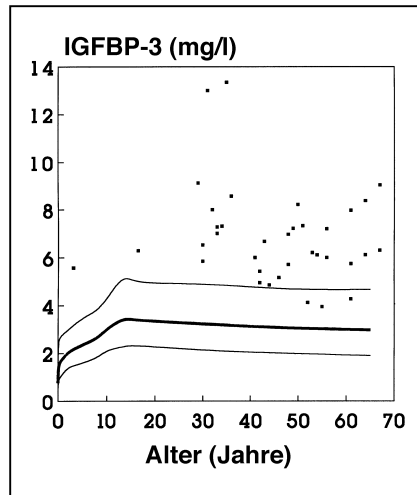


Abb. 3: IGFBP-3 Serumwerte bei Akromegalie. Der Normalbereich ist durch die 5., 50. und 95. Perzentile definiert.

3 TESTPRINZIP

Der **IGFBP-3 ELISA** ist ein so genannter Sandwich-Assay unter Verwendung zweier spezifischer und hochaffiner Antikörper. Der an die Mikrotiterplatte gekoppelte erste Antikörper bindet das IGFBP-3 aus der Probe. Im nachfolgenden Schritt bindet am derart gebundenen IGFBP-3 ein Komplex aus Biotin-konjugiertem anti-IGFBP-3 Fab-Antikörper und Streptavidin-Peroxidase. In der abschließenden Reaktion katalysiert die gebundene Peroxidase die Umsetzung des Substrats. Diese enzymatische Reaktion führt zu einer, quantitativ vom IGFBP-3-Gehalt der Proben abhängigen, Blaufärbung. Die Reaktion wird durch die Zugabe der Stopplösung beendet und die Farbintensität durch die Messung der Absorption bestimmt.

4 WARNHINWEISE UND VORSICHTSMAßNAHMEN

Der Kit ist nur zur In-vitro-Diagnostik und nicht zur inneren Anwendung bei Menschen und Tier geeignet. Dieses Produkt darf nur exakt wie in der mitgelieferten Anleitung beschrieben eingesetzt werden. Demeditec kann nicht für einen eventuellen Verlust oder Schaden haftbar gemacht werden, der durch Nichtbeachtung der Instruktionen entsteht, soweit keine gesetzliche Regelung anderes besagt.

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

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

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

Menschliches Serum:

in folgenden Komponenten enthalten: **CONTROL 1 LYO**, **CONTROL 2 LYO**, **CAL A – E LYO**

Das humane Material, das für die Präparation dieses Produktes verwendet wird, wurde mit negativem Ergebnis auf Humanen Immundefizienz-Virus (HIV I und II), Hepatitis B-Oberflächenantigen und Hepatitis C Virus getestet. Da kein Test das Vorhandensein von infektiösen Erregern völlig ausschließen kann, sollten die Reagenzien wie potentiell infektiöses Material gehandhabt werden.

Reagenzien **ENZ CONJ**, **DIL**, **WASH SOLN** **20x**

enthalten als Konservierungsmittel **5-chloro-2-methyl-4-isothiazolin-3-one** und **2-methyl-4-isothiazolin-3-one** (<0,015%)

- H317 Kann allergische Hautreaktionen verursachen.
- P280 Schutzhandschuhe/ Schutzbekleidung/ Augenschutz/ Gesichtsschutz tragen.
- P272 Kontaminierte Arbeitskleidung nicht außerhalb des Arbeitsplatzes tragen.
- P261 Einatmen von Dampf vermeiden.
- P333+P313 Bei Hautreizung oder –ausschlag: Ärztlichen Rat einholen/ ärztliche Hilfe hinzuziehen.
- P302+P352 BEI KONTAKT MIT DER HAUT: Mit viel Wasser und Seife waschen.
- P501 Entsorgung des Inhalts/des Behälters gemäß den örtlichen/ regionalen/ nationalen/ internationalen Vorschriften.

Substrat **SUB** **TMB**

Das TMB-Substrat (S) enthält 3,3',5,5' Tetramethylbenzidin (<0.05%)

- H315 Verursacht Hautreizungen.
- H319 Verursacht schwere Augenreizung.
- H335 Kann Atemwege reizen.
- P261 Einatmen von Staub/ Rauch/ Gas/ Nebel/ Dampf/ Aerosol vermeiden.
- P305+P351+ P338 BEI KONTAKT MIT DEN AUGEN: einige Minuten lang behutsam mit Wasser spülen. Vorhandene Kontaktlinsen nach Möglichkeit entfernen. Weiter spülen.

Stopplösung **STOP** **SOLN**

Die Stopplösung enthält 0,2 M Schwefelsäure (H₂SO₄)

- H290 Kann gegenüber Metallen korrosiv sein.
- H314 Verursacht schwere Verätzung der Haut und schwere Augenschäden.
- P280 Schutzhandschuhe/ Schutzbekleidung/ Augenschutz/ Gesichtsschutz tragen.
- P301+P330+ P331 BEI VERSCHLUCKEN: Mund ausspülen. KEIN Erbrechen herbeiführen.
- P305+P351+ P338 BEI KONTAKT MIT DEN AUGEN: einige Minuten lang behutsam mit Wasser spülen. Vorhandene Kontaktlinsen nach Möglichkeit entfernen. Weiter spülen.
- P309+P310 BEI Exposition oder Unwohlsein: Sofort GIFTINFORMATIONSZENTRUM oder Arzt anrufen.

4.1 Erste-Hilfe Maßnahmen:

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

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

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

5 PROBEN

5.1 Probenmaterial

Serum und Plasma

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

5.2 Probenentnahme

Das Blut zur Probengewinnung mittels standardmäßiger Venenpunktion entnehmen. Hämolytische Reaktionen sind zu vermeiden.

5.3 Erforderliches Probenvolumen: 10 µL

5.4 Probenstabilität

In fest verschließbaren, geeigneten Probengefäßen

- Lagerung bei 20-25°C 3 Tage
- Lagerung bei -20°C mind. 2 Jahre
- Gefrier-Auftau-Zyklen max. 10

Die Lagerung von Proben über einen Zeitraum von 2 Jahren bei -20°C zeigte keinen Einfluss auf den Messwert. Einfrieren und Auftauen der Proben sollte minimiert werden. 10 Frier-Tauzyklen zeigten keinen Einfluss auf die Proben.

5.5 Interferenz

Triglyceride, Bilirubin oder **Hämoglobin** in der Probe stören bis zu einer Konzentration von **100 mg/mL, 100 µg/mL** bzw. **5 mg/mL** nicht. Der Einsatz hämolytischer, lipämischer oder ikterischer Proben sollte trotzdem zuvor vom Anwender validiert werden.

5.6 Probenverdünnung

- Verdünnung: **1:505** mit Probenpuffer
- Beispiel: **10 µL Probe** werden zu **1 mL** Probepuffer (rot gefärbt) gegeben (Verdünnungsfaktor 101). In ein weiteres PE-/PP-Gefäß **400 µL** Probenpuffer vorlegen und **100 µL** von der gut durchmischten **ersten Verdünnung** geben (Verdünnungsfaktor 5). **Nach dem Mischen innerhalb von 1 Stunde von dieser Lösung mit einer Endverdünnung von (1:505), 50 µL pro Bestimmung** im Assay einsetzen.
- Die verdünnte Probe ist für maximal eine Stunde stabil bei 20-25°C.

6 MATERIALIEN

6.1 Inhalt der Testpackung

Die im Kit gelieferten Reagenzien sind ausreichend für 96 Tests einschließlich der Kalibrationskurve.

	Mikrotiterplatte , gebrauchsfertig, beschichtet mit Kaninchen-anti-hIGFBP-3-Antikörper. Die Vertiefungen sind einzeln abbrechbar.	(8x12) Vertiefungen
	Kalibratoren , lyophilisiert (humanes IGFBP-3), Konzentrationen sind auf den Etiketten und auf dem QC-Zertifikat angegeben.	5 x 1 mL
	Kontrolle 1 , lyophilisiert, (humanes Serum), die Konzentration ist auf dem QC-Zertifikat angegeben.	1x 250 µL
	Kontrolle 2 , lyophilisiert, (humanes Serum), die Konzentration ist auf dem QC-Zertifikat angegeben.	1x 250 µL
	Antikörper-POD-Konjugat , gebrauchsfertig, Kaninchen-anti-hIGFBP-3-Antikörper biotinyliert und POD (Meerrettich-Peroxidase) markiertes Streptavidin	1 x 12 mL
	Probenpuffer , rotgefärbt, gebrauchsfertig. Bitte vor Gebrauch Schütteln!	1 x 120 mL
	Verdünnungspuffer , gebrauchsfertig. Bitte vor Gebrauch Schütteln!	1 x 30 mL
	Waschpuffer , 20fach konzentrierte Lösung	1 x 50 mL
	Substrat , gebrauchsfertig, Meerrettich-Peroxidase (POD)-Substrat, stabilisiertes H ₂ O ₂ -Tetramethylbenzidin.	1 x 12 mL
	Stopplösung , gebrauchsfertig, 0,2 M Schwefelsäure.	1 x 12 mL
-	Abdeckfolie für die Mikrotiterplatte	2 x
	Packungsbeilage	1 x
-	Qualitätskontrollzertifikat (QC-Zertifikat)	1 x

6.2 Nicht mitgelieferte, benötigte Materialien

- Entmineralisiertes Wasser oder destilliertes Wasser (Aqua destillata) (**A. dest.**), 950 mL.
- Mikropipetten und Mehrkanal-Pipetten mit auswechselbaren Einmalspitzen
- Einmalröhrchen aus Polyethylen PE/ Polypropylen PP Röhrchen zum Verdünnen der Proben
- Vortex-Mixer
- Mikrotiterplattenschüttler (350 rpm)
- Mikrotiterplattenwasher (empfohlen)
- Photometer für Mikrotiterplatten ("ELISA-Reader"), Filter bei 450 und ≥ 590 nm.

7 TECHNISCHE HINWEISE

Lagerbedingungen

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

Haltbarkeit

Die Haltbarkeit der Reagenzien **nach Öffnung** beträgt 4 Wochen bei 2 - 8°C. Nicht verwendete Streifen **der Testplatte** sind zusammen mit dem Trockenkissen **luftdicht** in dem wiederverschließbaren Klippbeutel bei 2° - 8°C zu lagern. Die Streifen bitte nur in dem mitgelieferten Rahmen verwenden. **Rekonstituierte Komponenten** (Kalibratoren **A – E** und Kontrollen **1 und 2**) sollten bei -20°C aufbewahrt werden. Zur weiteren Verwendung schnell aber schonend Auftauen (keine Temperaturerhöhung über Raumtemperatur und kein übermäßiges Vortexen), bis zu 3 dieser Einfrier-Auftauzyklen zeigten keinen Einfluss auf den Test. Der 1:20 gebrauchsfertig verdünnte Waschpuffer ist nur 4 Wochen haltbar bei 2 - 8°C.

Vorbereitung der Reagenzien

Alle Komponenten des Kits müssen **vor Gebrauch auf Raumtemperatur** 20 - 25°C gebracht werden, die evtl. in manchen Puffern vorhandenen Präzipitate müssen vor Gebrauch durch Mischen und Erwärmen wieder gelöst werden. Reagenzien aus Kits mit unterschiedlichen Chargen-Nummern sollten nicht vermischt werden.

Rekonstitution

Die Kalibratoren **A – E** und Kontrollen **1 und 2** werden mit dem im Kit enthaltenen Probenpuffer rekonstituiert. Es empfiehlt sich zum Rekonstituieren die Reagenzien 15 Minuten bei Raumtemperatur stehen zu lassen und sie anschließend kräftig mit einem Vortex-Mixer zu mischen. Schaumbildung sollte jedoch vermieden werden.

Verdünnung

Nach der Rekonstitution werden die Kontrollen **1 und 2** im gleichen Verhältnis (1:505) wie die Proben mit dem Probenpuffer verdünnt.

Das benötigte Volumen des Waschpuffers wird vorbereitet, indem das 20fach Konzentrat im Verhältnis 1:20 mit Aqua dest. verdünnt wird.

Inkubation

Inkubation bei Raumtemperatur bedeutet: **Inkubation bei 20 - 25°C**. Das Substrat, stabilisiertes H₂O₂-Tetramethylbenzidin, ist lichtempfindlich–Aufbewahrung und Inkubation bitte vor Licht geschützt.

Testdurchführung

Die Messungen (Leerwert, Kalibratoren **A-E**, Kontrollen **1 und 2** und Proben) sollten stets in Doppelbestimmung durchgeführt werden. Um optimale Ergebnisse zu erhalten, ist auf genaues Pipettieren und strikte Befolgung des Testprotokolls zu achten. Bei der Testdurchführung sollten Kalibratoren **A-E**, Kontrollen **1 und 2** und die jeweiligen Proben möglichst schnell pipettiert werden z.B. in 15 Minuten). Das Antikörper-POD-Konjugat sowie nachfolgend das Substrat und die Stopplösung sollten in der gleichen Reihenfolge und in dem gleichen Zeitintervall auf die Platte zugegeben werden. Dies verhindert Variationen in der Konzentrationsbestimmung durch unterschiedliche Inkubationszeiten.

Schütteln

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

Waschen

Korrektes Waschen ist von grundlegender Bedeutung für den sicheren, richtigen und präzisen Ablauf des Testes. Ungenügendes Waschen ist eine häufige Ursache für nicht valide Testdurchführungen. Mögliche Folgen sind unkontrollierte unspezifische Variationen der gemessenen optischen Dichten, die zu falschen Ergebnisberechnungen der Proben führen können. Mögliche Hinweise darauf sind z.B. hohe Leerwerte und variabel streuende Messwerte. Zum Waschen muss der mitgelieferte und auf Gebrauchskonzentration verdünnte Waschpuffer verwendet werden. Das Waschvolumen pro Waschzyklus und Vertiefung muss mindestens 300 µL betragen.

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

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

8 TESTDURCHFÜHRUNG**Vorbereitung der Reagenzien**

Reagenzpräparation:	Rekonstitution:	Verdünnung:
Kalibratoren CAL A – E LYO	in 1 mL Probenpuffer SAM DIL	-
Kontrolle 1 CONTROL 1 LYO	in 250 µL Probenpuffer SAM DIL	1:505 mit Probenpuffer SAM DIL
Kontrolle 2 CONTROL 2 LYO	in 250 µL Probenpuffer SAM DIL	1:505 mit Probenpuffer SAM DIL
Waschpuffer konzentrat WASH SOLN 20x	-	1:20 mit Aqua dest.
Proben mit Probenpuffer SAM DIL 1:505 verdünnen		
Vor der Testdurchführung alle Reagenzien auf Raumtemperatur (20-25°C) bringen.		
Testdurchführung in Doppelbestimmung:		
Pipettieren	Reagenzien	Position
50 µL	Verdünnungspuffer DIL	in alle benötigten Vertiefungen pipettieren
50 µL	Probenpuffer SAM DIL (Leerwert)	A1/A2
50 µL	Kalibrator A (0,4 ng/mL)	B1/B2
50 µL	Kalibrator B (2 ng/mL)	C1/C2
50 µL	Kalibrator C (6 ng/mL)	D1/D2
50 µL	Kalibrator D (15 ng/mL)	E1/E2
50 µL	Kalibrator E (30 ng/mL)	F1/F2
50 µL	Kontrolle 1 (1:505 verdünnt)	G1/G2
50 µL	Kontrolle 2 (1:505 verdünnt)	H1/H2
50 µL	Probe (1:505 verdünnt)	in die restlichen Vertiefungen nach Bedarf pipettieren
Mit Klebefolie die Vertiefungen dicht abdecken.		
Proben-Inkubation: 1 h bei 20-25°C, 350 rpm		
5x 300 µL	Absaugen und die Platte 5x mit je 300 µL verdünntem Waschpuffer / Vertiefung waschen.	In jede Vertiefung
100 µL	Antikörper-POD-Konjugat ENZ CONJ	In jede Vertiefung
Mit Klebefolie die Vertiefungen dicht abdecken.		
Inkubation: 1 h bei 20-25°C, 350 rpm		
5x 300 µL	Absaugen und die Platte 5x mit je 300 µL verdünntem Waschpuffer / Vertiefung waschen.	In jede Vertiefung
100 µL	Substrat SUB TMB	In jede Vertiefung
Substrat S Inkubation: 30 Minuten im Dunklen bei 20-25°C		
100 µL	Stopplösung STOP SOLN	In jede Vertiefung
Messung der Absorption innerhalb von 30 min bei 450 nm (Referenzfilter ≥ 590 nm).		

9 QUALITÄTSKONTROLLE

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

9.1 Qualitätskriterien

Zur Auswertung des Testes sollte gewährleistet sein, dass die Extinktionen des **Leerwertes** 0,25 Einheiten nicht überschreiten, **Kalibrator E** sollte dagegen Extinktionen über 1,0 Einheiten erreichen. Proben, die höhere Extinktionen als der Kalibrator E erzielen, liegen außerhalb der Kalibrationskurve, zur sicheren Bestimmung sollten diese Proben in einer zweiten Testdurchführung bei höherer Verdünnung nochmals bestimmt werden.

10 AUSWERTUNG

10.1 Erstellung der Kalibrationskurve

Die bereitgestellten Kalibratoren enthalten folgende human IGFBP-3-Konzentrationen:

Kalibrator	A	B	C	D	E
ng/mL	0,4	2	6	15	30

- 1) Ermittlung des **Mittelwertes** der optischen Dichte des Leerwertes aus den Doppelbestimmungen (Vertiefung A1/A2).
- 2) Von den Mittelwerten der optischen Dichte der Kalibratorkonzentrationen und der Proben wird der mittlere Leerwert abgezogen.
- 3) Die Kalibratorkonzentrationen (x-Achse) werden gegen die gemessene optische Dichte (y-Achse) aufgetragen.
- 4) Die Berechnung der Kalibrationskurve sollte durch ein statistisches Programm erfolgen, da die Kurve i. Allg. nicht ideal durch eine lineare Regression beschrieben wird. **Ein höhergradiges Polynom, 4-Parameter-Anpassungen** oder **nicht-lineare Regression** sind zur Auswertung geeignet, in manchen Fällen kann eine Spline oder Punkt-zu-Punkt Anpassung angebracht sein.
- 5) Die **Multiplikation** des jeweiligen für die Proben berechneten IGFBP-3-Gehaltes mit dem entsprechenden **Verdünnungsfaktor** der Proben ergibt die **IGFBP-3-Konzentration in ng/mL** (oder pg/mL, je nach gewählter Einheit der Kalibratoren).

10.2 Beispiel einer typischen Kalibrationskurve

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

	Leerwert	A	B	C	D	E
ng/mL	0,0	0,4	2	6	15	30
OD (450-620 nm)	0,204	0,254	0,453	0,911	1,706	2,390

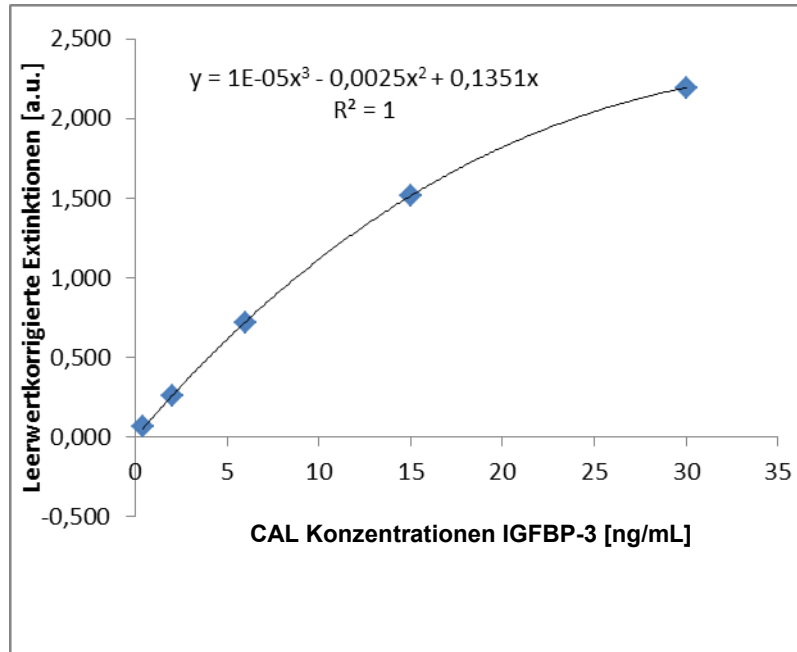


Abb. 4: Exemplarische Kalibrationskurve

10.3 Beispielhafte Berechnung der IGFBP-3-Konzentration

Probenverdünnung: 1:505

Gemessene Extinktion der Probe: 0,975

Gemessene Extinktion des Leerwertes: 0,204

Aus der Differenz der Proben-Extinktion und der Extinktion des Leerwertes (0,204) **berechnet Ihr Auswertungsprogramm** mit der entsprechenden Kurvenanpassung (hier: Polynom x. Grades) die IGFBP-3-Konzentration der verdünnten Probe durch Auflösen der Gleichung aus Abb. 4 nach x. In diesem Fall ergibt sich eine IGFBP-3-Konzentration in der verdünnten Probe von

$$0,771 = 1E-05x^3 - 0,0025x^2 + 0,1351x$$

$$6,617 = x$$

und unter Berücksichtigung des Verdünnungsfaktors (**1:505**) somit eine IGFBP-3-Konzentration in der unverdünnten Probe von

$$6,617 \text{ ng/mL} \times 505 = 3342 \text{ ng/mL} = 3,342 \text{ mg/L}$$

10.4 Interpretation der Ergebnisse

Das Testergebnis allein sollte nicht der einzige Grund für therapeutische Entscheidungen sein. Die Ergebnisse sollten in Bezug auf die Anamnese, weitere klinische Beobachtungen und den Resultaten anderer diagnostischer Untersuchungen interpretiert werden. Darüber hinaus empfehlen wir, dass jedes Labor seine eigenen Referenz-Bereiche ermittelt.

11 EINSCHRÄNKUNGEN

IGFBP-3-Spiegel hängen in erster Linie von der Wachstumshormonsekretion ab. Aber auch eine Reihe anderer Faktoren beeinflusst die IGFBP-3 Plasmakonzentration und sie müssen deshalb zur korrekten Interpretation in die Betrachtung mit einbezogen werden. IGFBP-3 Spiegel nehmen während des Fastens (mehr als 1 Tag), bei Malnutrition, Malabsorption, Kachexie, eingeschränkter Leberfunktion, Hypothyreose und Diabetes mellitus ab. Zudem können sie bei chronisch-entzündlichen und malignen Erkrankungen erniedrigt sein. Erhöhte Werte treten bei eingeschränkter Nierenfunktion und vorzeitiger Pubertät auf. In klinischen Situationen, die mit Hyperprolaktinämie einhergehen oder bei Patienten mit Kraniopharyngeom können gelegentlich trotz bestehenden Wachstumshormonmangels normale IGFBP-3-Werte auftreten.

In einigen physiologischen (z.B. Schwangerschaft) oder pathologischen Situationen kann IGFBP-3 durch spezifische Proteasen zu niedermolekularen Fragmenten abgebaut werden (16,17), die sich zwar auf das IGFBP-3-Muster im Western-blot auswirken, das Ergebnis des ELISA aber kaum beeinflussen..

Der IGFBP-3 ELISA basiert auf polyklonalen Kaninchen-Antikörpern. Im Allgemeinen kann diese Technik durch heterophile Antikörper in der Probe beeinflusst werden. Der Einfluss der heterophilen Antikörper wird durch das Assay-Design reduziert, aber kann nicht vollständig ausgeschlossen werden.

12 REFERENZWERTE

Die IGFBP-3-Spiegel sind bei Kindern stark altersabhängig. Bei Erwachsenen ist dieses Phänomen weniger ausgeprägt. Die Normalbereiche der verschiedenen Altersgruppen, die log-normal verteilt sind, sind in Tabelle 1 durch Perzentilen angegeben. In Abb.5 und 6 sind diese Werte graphisch dargestellt. Es wird empfohlen, für jedes Labor eigene Normalbereiche aufzustellen.

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

Altersgruppe	Perzentilen														
	0.1	1	5	10	20	30	40	50	60	70	80	90	95	99	
0-1 Woche	0.25	0.33	0.42	0.48	0.57	0.64	0.70	0.77	0.85	0.93	1.05	1.23	1.41	1.81	
1-4 Woche	0.49	0.62	0.77	0.86	0.99	1.10	1.19	1.29	1.40	1.52	1.68	1.93	2.16	2.68	
1-3 Monate	0.55	0.70	0.87	0.98	1.13	1.25	1.36	1.48	1.61	1.75	1.94	2.23	2.52	3.14	
3-6 Monate	0.64	0.80	0.98	1.10	1.25	1.38	1.49	1.61	1.74	1.88	2.07	2.37	2.65	3.24	
6-12 Monate	0.71	0.88	1.07	1.19	1.35	1.48	1.60	1.72	1.85	2.00	2.19	2.49	2.76	3.36	
1-3 Jahre	1.02	1.21	1.41	1.53	1.69	1.82	1.94	2.05	2.17	2.31	2.48	2.74	2.98	3.47	
3-5 Jahre	1.08	1.30	1.52	1.66	1.84	1.99	2.12	2.25	2.39	2.55	2.75	3.05	3.33	3.91	
5-7 Jahre	1.19	1.42	1.66	1.81	2.01	2.16	2.30	2.44	2.59	2.76	2.97	3.29	3.59	4.2	
7-9 J.	Jungen /	1.25	1.48	1.73	1.88	2.07	2.22	2.36	2.50	2.65	2.81	3.02	3.33	3.61	4.22
	Mädchen	1.36	1.61	1.88	2.04	2.25	2.42	2.57	2.72	2.88	3.06	3.28	3.62	3.94	4.58
9-11 J.	Jungen /	1.47	1.73	1.99	2.15	2.36	2.52	2.66	2.81	2.96	3.14	3.35	3.67	3.97	4.57
	Mädchen	1.56	1.90	2.20	2.38	2.62	2.80	2.96	3.13	3.30	3.50	3.75	4.11	4.45	5.16
11-13 J.	Jungen /	1.58	1.88	2.19	2.38	2.63	2.82	3.00	3.18	3.37	3.58	3.84	4.25	4.62	5.39
	Mädchen	1.62	1.90	2.24	2.46	2.74	2.97	3.17	3.38	3.60	3.85	4.17	4.65	5.10	6.02
13-15 J.	Jungen /	1.62	1.89	2.24	2.46	2.76	2.99	3.20	3.42	3.65	3.91	4.24	4.75	5.22	6.20
	Mädchen	1.69	2.03	2.39	2.61	2.91	3.14	3.35	3.56	3.79	4.04	4.36	4.85	5.30	6.24
15-17 J.	Jungen /	1.70	2.02	2.36	2.57	2.84	3.05	3.25	3.44	3.65	3.88	4.17	4.61	5.01	5.86
	Mädchen	1.62	1.93	2.26	2.46	2.73	2.93	3.12	3.31	3.51	3.74	4.02	4.45	4.85	5.67
17-20 J.		1.58	1.90	2.24	2.45	2.72	2.94	3.13	3.33	3.54	3.78	4.07	4.53	4.95	5.83
20-30 J.		1.55	1.86	2.20	2.41	2.68	2.90	3.09	3.29	3.50	3.74	4.04	4.50	4.92	5.80
30-40 J.		1.44	1.75	2.08	2.29	2.56	2.78	2.98	3.18	3.39	3.64	3.95	4.42	4.86	5.78
40-50 J.		1.38	1.68	2.01	2.21	2.48	2.69	2.88	3.08	3.29	3.53	3.83	4.29	4.72	5.63
50-60 J.		1.34	1.64	1.96	2.16	2.42	2.63	2.83	3.02	3.23	3.46	3.76	4.22	4.65	5.55
60-70 J.		1.28	1.58	1.90	2.10	2.37	2.58	2.78	2.98	3.19	3.44	3.75	4.23	4.67	5.62
70-80 J.		1.20	1.50	1.81	2.00	2.27	2.47	2.67	2.87	3.08	3.32	3.62	4.09	4.52	5.44
> 80 J.		1.13	1.43	1.73	1.92	2.19	2.39	2.59	2.79	3.00	3.23	3.54	4.00	4.44	5.36

Die Serumkonzentrationen sind in mg/L angegeben

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

Serumkonz. nach Alter

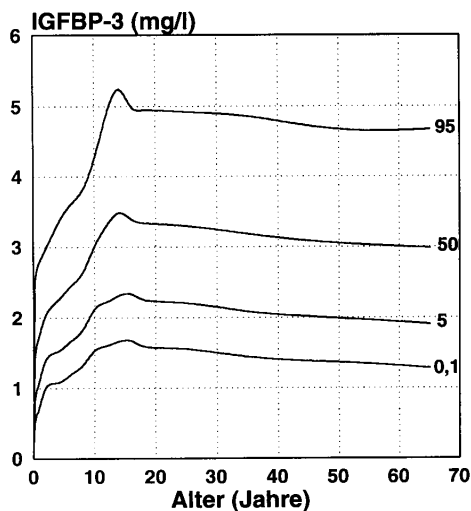


Abb. 5: Altersabhängiger Normalbereich der IGFBP-3-Spiegel (dargestellt als 0,1., 5., 50. und 95. Perzentile)

Kinder und Jugendliche

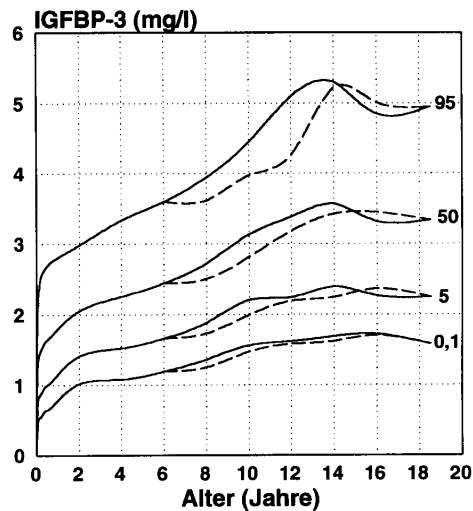


Abb. 6: Normalbereich bei Kindern und Jugendlichen (Mädchen —, Jungen - - -)

13 ASSAY EIGENSCHAFTEN UND VALIDIERUNG

13.1 Sensitivität

Die Sensitivität wurde durch Messen des Leerwertes und durch Berechnung der theoretischen Konzentration der zweifachen Standardabweichung des Leerwertes evaluiert. Die analytische Sensitivität des DEE003A beträgt 0,03 ng/ml. Nach ICH Q2 R1 (CPMP/ICH/381/95) wird die untere Nachweisgrenze (LOQ) durch die rückberechnete IGFBP-3-Konzentration der 10fachen Standardabweichung des Leerwertes wiedergegeben, die damit 0,15 ng/mL beträgt.

13.2 Spezifität

Zur Bestimmung der Kreuzreaktivität mit homologen Proteinen wurden IGFBP-1,-2,-4,-5 und -6 in einer Konzentration von 200 ng/mL in Testpuffer verdünnt und als Probe eingesetzt. Die maximale relative Kreuzreaktivität betrug $\leq 0,125\%$.

13.3 Präzision

Intra-Assay-Varianz

Zur Bestimmung der Intra-Assay Variabilität wurde eine Probe 10-mal im gleichen Test eingesetzt. Die Ergebnisse sind in der Tabelle 2 dargestellt. Der Variationskoeffizient (VK) ist im Durchschnitt 1,9%. Beispielhafte Bestimmungen werden in der Tabelle 2 gezeigt.

Tab. 2: Intra-Assay-Variation. Drei beispielhafte Serum-Proben wurden verdünnt und 10-mal in einem Assay gemessen.

	Probe 1	Probe 2	Probe3
Mittelwert [ng/mL]	3630	3789	3016
SA [ng/mL]	70,83	83,75	46,71
%VK	1,95	2,21	1,55
n	10	10	10

Inter-Assay-Varianz

Zur Bestimmung der Inter-Assay Variabilität wurden Serumproben an unterschiedlichen Tagen in unabhängigen Tests gemessen. Im Durchschnitt betrug der Variationskoeffizient 5,7%. Die Ergebnisse sind im Detail in der Tabelle 3 gezeigt.

Tab. 3: Inter-Assay-Variation. Serum-Proben wurden wie empfohlen verdünnt und IGFBP-3-Konzentration in verschiedenen unabhängigen Tests gemessen.

	Probe 1	Probe 2	Probe 3	Probe 4	Probe 5	Probe 6	Probe 7	Probe 8
Mittelwert [ng/mL]	2886	3525	3229	3219	4025	3293	3889	4328
SA [ng/mL]	193	178	140	237	171	177	199	322
%VK	6,68	5,05	4,34	7,36	4,25	5,38	5,12	7,44
n	4	10	9	7	10	10	7	10

13.4 Linearität

Die Linearität wurde durch Verdünnung von drei verschiedenen Serum-Proben mit bekannter IGFBP-3-Konzentration nachgewiesen. Die IGFBP-3-Konzentration der verdünnten Probe wurde gemessen und mit der Konzentration des Zielwertes verglichen. Die linearen Regressionsanalysen sind in der Abbildung 7 dargestellt. Keine der IGFBP-3-Konzentrationen der eingesetzten Verdünnungen (1:125 - 1:2000) ist stärker als 20 % von dem erwarteten Wert abgewichen ($\leq -17\%$).

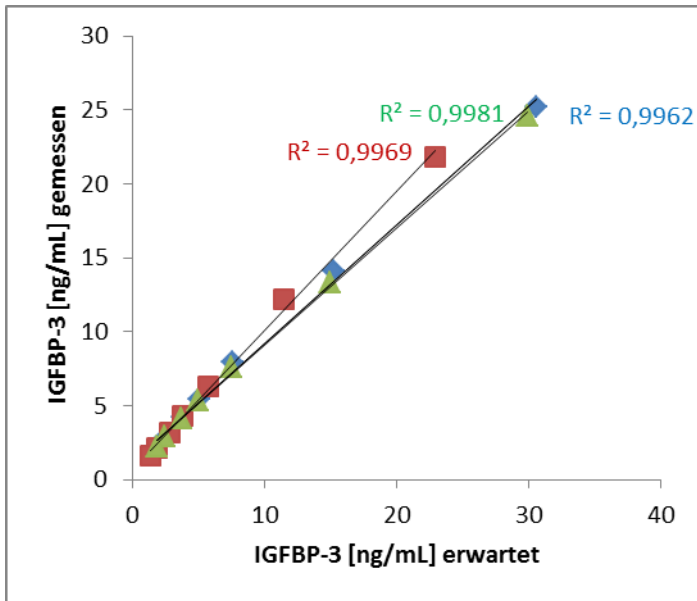


Abb. 7 Linearität. Dargestellt sind die gemessenen Konzentrationen in verschiedenen Verdünnungen von drei Serumproben.

13.5 Wiederfindung und Richtigkeit

Serum und Plasma-Proben wurden mit rekombinantem IGFBP-3 angereichert und die Wiederfindung wurde mit der gleichen Menge an IGFBP-3 angereichertem Puffer verglichen. Die nativen Proben hatten eine IGFBP-3-Konzentration von 2684 bis 3667 ng/mL, die relative Wiederfindung lag zwischen 109 bis 118 %. Die Ergebnisse werden in der Tabelle 4 gezeigt.

Tab.4 Wiederfindung [%] von rekombinantem IGFBP-3 in nativen Serum-/ Plasma-Proben im Vergleich zu rekombinantem IGFBP-3 im Puffer.

IGFBP-3		Probe [ng/mL]	Probe angereichert [ng/mL]	Zielwert [ng/mL]	Wiederfindung [%]
Probe 1	Plasma	3641	5107	4324	118
Probe 2	Plasma	3667	4778	4350	110
Probe 3	Serum	2869	3778	3552	106
Probe 4	Serum	2684	3677	3367	109

13.6 Interferenz

Die Interferenz physiologisch auftretender Substanzen wurde durch Zugabe unterschiedlicher Mengen dieser Substanzen zu Serum-Proben getestet. In Tabelle 5 ist die relative Wiederfindung vom IGFBP-3 im Vergleich zum Serum ohne Zusätze für die maximal zugegebene Menge der potentiell interferierenden Substanz dargestellt.

Keine der untersuchten Substanzen beeinflusst das Ergebnis des Testes signifikant.

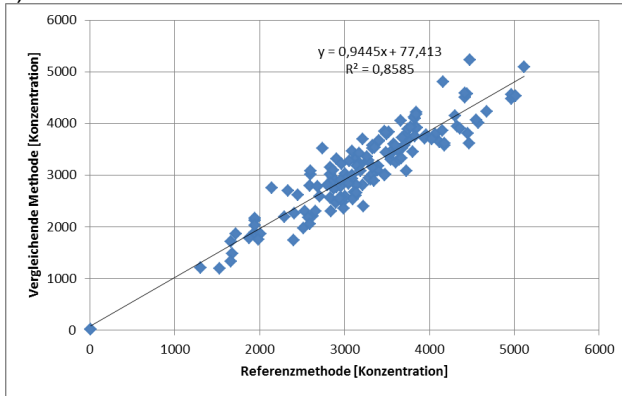
Tab. 5: [%]-Wiederfindung im Vergleich zum nativen Serum

	Triglyzeride 100 mg/mL	Bilirubin 100 µg/mL	Hämoglobin 5 mg/mL
Probe 1	89	93	81
Probe 2	87	91	106
Probe 3	88	96	93

14 VERGLEICHSTUDIEN

Der IGFBP-3 ELISA wurde mit dem RIA-Testsystem verglichen. Insgesamt 150 verschiedene Proben mit IGFBP-3-Konzentrationen von 10 – 5118 ng/mL wurden verwendet. Die Ergebnisse sind graphisch in Abbildung 8 dargestellt. Die relative Abweichung vom RIA beträgt durchschnittlich 9,00% (0,18 bis 28,29 %).

a)



b)

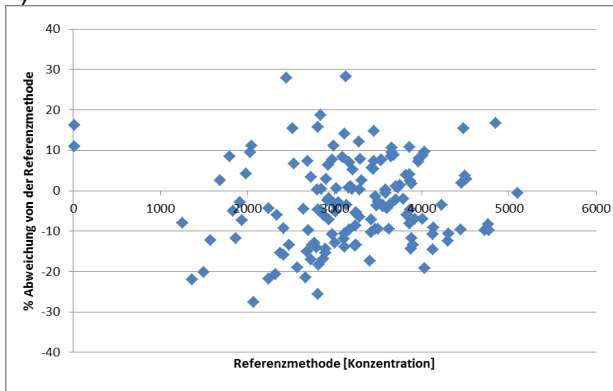


Abb. 8: Ein Vergleich des RIA mit dem IGFBP-3 ELISA. Die IGFBP-3-Konzentration wurde in 150 Proben mit beiden Assays gemessen. In Abbildung a) ist die Ergebnisanalyse mittels linearer Regression und in Abbildung b) durch Bland-Altman Plot dargestellt.

Weitere Daten aus der externen Qualitätskontrolle der DGKL/ RfB (Deutschland) werden in der Tabelle 6 gezeigt. Die Abweichung vom methodenspezifischen Mittelwert beträgt durchschnittlich -17%, die vom methodenübergreifenden Mittelwert -19%. Die Abweichung liegt damit innerhalb der Annahmekriterien der DGKL/ RfB ($\leq 30\%$).

Tab. 6 Externe Qualitätsbewertungsschema DGKL / RfB Deutschland retrospektive Analyse von 2013/2014 Proben.

DGKL EQA		Mittelwert	HP1/14	HP4/13	HP3/13	HP2/13	HP1/13
Messwert [ng/mL]	Probe A	-	3608	3778	3163	3222	3144
Zielwert [ng/mL]	Probe A	-	3377	3723	3532	3740	3889
Mittelwert [ng/mL]	Probe A	-	3948	3899	3825	3826	3922
Δ A Zielwert [%]	Probe A	-15.76	6.83	1.47	-10.46	-13.85	-19.16
Δ A Total Mean [%]	Probe A	-17.82	-8.62	-3.11	-17.32	-15.79	-19.84
DGKL EQA		Mittelwert	HP1/14	HP4/13	HP3/13	HP2/13	HP1/13
Messwert [ng/mL]	Probe B	-	3101	3588	3243	3098	3149
Zielwert [ng/mL]	Probe B	-	3422	4008	3360	4170	3618
Mittelwert [ng/mL]	Probe B	-	3941	3864	3846	3857	3873
Δ B Zielwert [%]	Probe B	-18.84	-9.38	-10.47	-3.47	-25.71	-12.97
Δ B Zielwert [%]	Probe B	-19.19	-21.32	-7.14	-15.67	-19.68	-18.70

ENGLISH**Instructions for use**

IGFBP-3 ELISA	96 Determinations
Principle of the test	Sandwich ELISA
Duration (incubation period)	2.5 h
Antibody-HRP-Conjugate	ready for use
Buffer and Substrate	ready for use
Calibrators	5 single Calibrators: 0.4 - 30 ng/mL, lyophilized, human IGFBP-3
Assay Range	0.03 – 15150 ng/mL
Control	2 controls, lyophilised
Sample	human serum / plasma
Required sample volume	10 µL
Sample dilution	1:505
Analytical sensitivity	0.03 ng/mL
average Intra- / Inter-Assay Variance	1.9% / 5.7%
Reference Values	Blum W.F et.al.1990 Insulin-Like Growth Factors and Their Binding Proteins. In: Ranke MB, Mullins P.E.(ed): Diagnostics of Endocrine Function in Children and Adolescents. Basel, Karger, 2011, pp.157-181

1 INTENDED USE

This enzyme immunoassay kit is suited for measuring IGFBP-3 in human serum, EDTA and Heparin-plasma for diagnostic and scientific purposes.

2 INTRODUCTION

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

The development of a specific immunoassays for IGFBP-3, which detects IGFBP-3 in the ternary complex, provided new in-sights into IGFP-3 regulation (6-9). On the basis of these findings serum IGFBP-3 has been proven to be an additional useful test in the repertoire of diagnostic tools for evaluation of growth disorders (7,8).

Several factors besides GH influence IGFBP-3 levels: age including sexual development, nutrition, hypothyroidism, diabetes mellitus, liver function and kidney function. IGFBP-3 levels are decreased by malnutrition, although less than IGF-I, in hypothyroidism, in diabetes mellitus and in hepatic failure (6-8), but are increased in chronic renal failure (6,10,11). Measurement over 24 hours revealed no circadian rhythm (12,13). For clinical practice, the most important regulatory factor is GH. Single IGFBP-3 measurements correlate significantly with the logarithm of the integrated spontaneous GH secretion (8,14). In patients with GH deficiency, IGFBP-3 levels are subnormal and increase gradually to within the normal range after several days of GH administration (7,8). The slow response to GH and constant circadian levels during chronic daily application of GH (13) suggest that IGFBP-3 reflects the GH secretory state over days.

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

1. No extraction step is required prior to measurement thus improving test accuracy by simplifying the assay procedure.
2. The normal range in young children is comparatively high making the detection of subnormal levels more reliable.
3. Patients with GH deficiency have subnormal IGFBP-3 levels. In contrast, most of the small statured children with normal GH secretion have levels within the normal range (Figure 1). The separation of these two groups is easy. In small statured children IGFBP-3 levels rise to normal range within several days of GH administration and remain normal during continuous GH treatment (Figure 2). Therefore, serum IGFBP-3 measurements are also suited for evaluating the potential of a patient to respond to GH and for GH therapy monitoring (19). In other patients of severe short stature, e.g. Ullrich-Turner syndrome or Silver-Russell syndrome, IGFBP-3 levels were found normal (8) reflecting normal GH secretion.

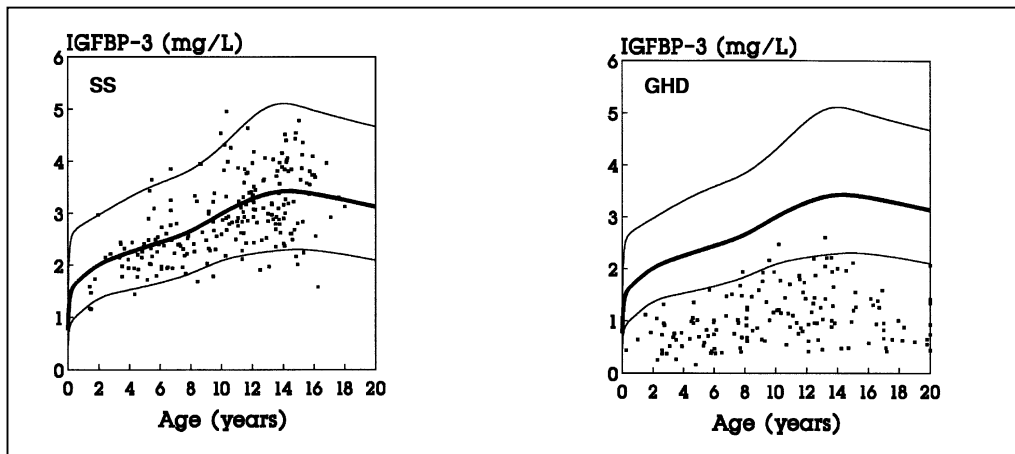


Fig. 1: Serum IGFBP-3 levels in patients with short stature without GH deficiency (SS: constitutional delay of growth and adolescence, familial short stature, intra-uterine growth retardation) and in idiopathic or organic GH deficiency (GHD). The normal range is given by the 5th, 50th and 95th percentile.

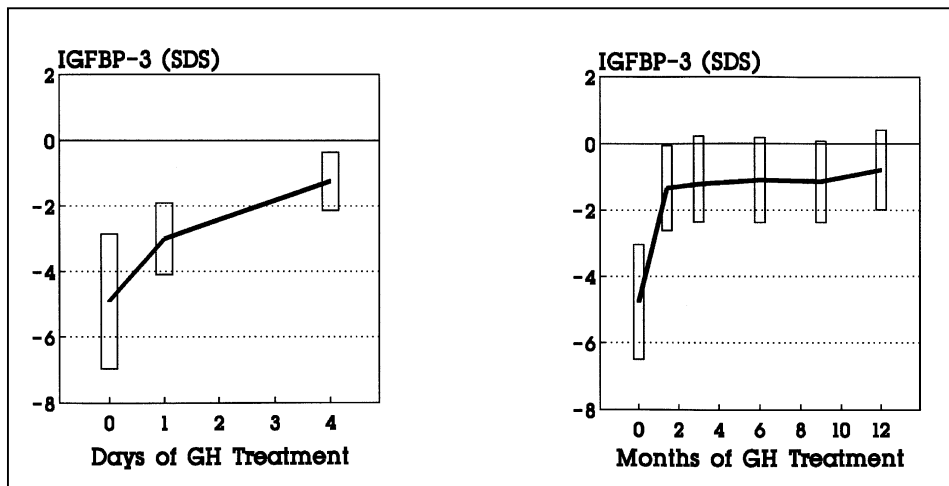


Fig. 2: IGFBP-3 levels in GH deficient children before and during GH treatment. Because of the age-dependence, values are given as the mean of standard deviation scores (SDS).

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

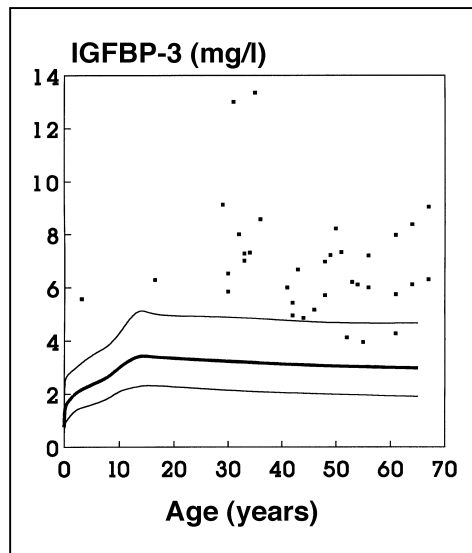


Fig. 3: Serum IGFBP-3 levels in acromegaly. The normal range is given by the 5th, 50th and 95th percentile.

3 ASSAY PRINCIPLE

The ELISA for IGFBP-3 is a so-called Sandwich-Assay. It utilizes two specific antibodies of high affinity. First the IGFBP-3 in the sample binds to the immobilized antibody on the microtiter plate. In the following step, the complex of biotinylated anti-IGFBP-3-Antibody and Streptavidin-Peroxidase binds in turn to the immobilised IGFBP-3. Subsequently, the peroxidase catalyzes an enzymatic reaction resulting in a blue coloration. The intensity of the blue color depends on the IGFBP-3 content of the sample. The reaction is stopped by the addition of stop solution and color intensity is quantified by measuring the absorption.

4 WARNINGS AND PRECAUTIONS

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

The Demeditec 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. Demeditec 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.

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

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

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: **CONTROL 1 LYO**, **CONTROL 2 LYO**, **CAL A - E LYO**

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.

Reagents ENZ CONJ, DIL, WASH SOLN 20x

Contain as preservative **5-chloro-2-methyl-4-isothiazolin-3-one and 2-methyl-4-isothiazolin-3-one** (<0.015%)

H317	May cause an allergic skin reaction.
P280	Wear protective gloves/ protective clothing/ eye protection/ face protection.
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 soap and water.
P501	Dispose of contents/ container in accordance with local/ regional/ national/ international regulations.

Substrate SUB TMB

The TMB-Substrate (S) contains 3,3',5,5' Tetramethylbencidine (<0.05%)

H315	Causes skin irritation.
H319	Causes serious eye irritation.
H335	May cause respiratory irritation.
P261	Avoid breathing dust/ fume/ gas/ mist/ vapours/ spray.
P305+P351+	IF IN EYES: Rinse cautiously with water for several minutes.
P338	Remove contact lenses, if present and easy to do. Continue rinsing.

Stop Solution STOP SOLN

The Stop solution contains 0.2 M acid sulphur acid (H₂SO₄)

H290	May be corrosive to metals.
H314	Causes severe skin burns and eye damage.
P280	Wear protective gloves/ protective clothing/ eye protection/ face protection.
P301+P330+	IF SWALLOWED: rinse mouth.
P331	Do NOT induce vomiting.
P305+P351+	IF IN EYES: Rinse cautiously with water for several minutes.
P338	Remove contact lenses, if present and easy to do. Continue rinsing.
P309+P310	IF exposed or if you feel unwell: Immediately call a POISON CENTER or doctor/physician.

4.1 General first aid procedures:

Skin contact: Wash affected area rinse immediately with plenty of water at least 15 minutes. Remove contaminated cloths and shoes.

Eye contact: In case of contact with eyes, rinse immediately with plenty of water at least 15 minutes. In order to assure an effectual rinsing spread the eyelids.

Ingestion: After swallowing the product, if the affected person is conscious, rinse out the mouth with plenty of water: seek medical advice immediately.

5 SAMPLES

5.1 Sample type

Serum and Plasma

Serum and Heparin/EDTA Plasma yield comparable values.

5.2 Specimen collection

Use standard venipuncture for the blood sampling. Haemolytic reactions have to be avoided.

5.3 Required sample volume: 10 µL

5.4 Sample stability

In firmly closable sample vials

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

The storage of samples over a period of 2 years at -20°C, showed no influence on the reading. Freezing and thawing of samples should be minimized. 10 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, 100 µg/mL or 5 mg/mL, respectively. However, the use of haemolytic, lipemic or icteric samples should be validated by the user.


5.6 Sample dilution

- Dilution: **1:505** with Sample Buffer
- Pipette **1 ml Sample Buffer** (red colored) in PE-/PP-Tubes (application of a multi-stepper is recommended in larger series), add **10 µL Serum-** or **Plasma** (dilution factor 101). Add **400 µL** Sample Buffer in another PE-/PP-tube and **100 µL** of the thoroughly mixed first dilution (dilution factor 5). After mixing use **50 µL** of this 1:505 diluted solution **within 1 hour per determination** in the assay.
- Sample stability after dilution of the sample: maximum 1 hour at 20-25°C.

6 MATERIALS

6.1 Materials provided

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

SORB MT	Microtiter plate , ready for use, coated with rabbit-anti-hIGFBP-3-antibody. Wells are separately breakable.	(8x12) wells
CAL A - E LYO	Calibrators , lyophilized, (human IGFBP-3), concentrations are given on vial labels and on the QC-certificate.	5 x 1 mL
CONTROL 1 LYO	Control 1 , lyophilised, (human serum), concentration is given on the QC-certificate.	1 x 250 µL
CONTROL 2 LYO	Control 2 , lyophilised, (human serum), concentration is given on the QC-certificate.	1 x 250 µL
ENZ CONJ	Antibody-HRP-Conjugate , ready for use, contains rabbit biotinylated anti-hIGFBP-3 antibody.	1 x 12 mL
SAM DIL	Sample Buffer , red color, ready for use, Please shake before use!	1 x 120 mL
DIL	Dilution Buffer , ready for use, Please shake before use!	1x 30 mL
WASH SOLN 20x	Washing Buffer , 20-fold concentrated solution	1 x 50 mL
SUB TMB	Substrate , ready for use, horseradish-peroxidase-(HRP) substrate, stabilised H ₂ O ₂ Tetramethylbencidine.	1 x 12 mL
STOP SOLN	Stop Solution , ready for use, 0.2 M sulphuric acid.	1 x 12 mL
-	Sealing Tape , for covering the microtiter plate .	2 x
	Instructions for use	1 x
--	Quality Control Certificate	1 x

6.2 Materials required, but not provided

- Distilled (Aqua destillata) or deionized water for dilution of the Washing Buffer (**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** at 2 - 8°C. 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 **1** and **2** 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 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 **1 and 2** are reconstituted with the Sample Buffer. 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 **1 and 2** with the Sample Buffer in the same ratio (1:505) as the sample.

The required volume of Washing Buffer 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 **1 and 2** and the samples should be pipette as fast as possible (e.g. <15 minutes). To avoid distortions due to differences in incubation times, Antibody-HRP-Conjugate as well as the succeeding Substrate should be added to the plate in the same order and in the same time interval as the samples. Stop Solution should be added to the plate in the same order as Substrate.

All determinations (Blank, Calibrators **A-E**, Controls **1 and 2** 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, stabilised Tetramethylbendidine, is photosensitive—store and incubation in the dark.

Shaking

The incubation steps should be performed at mean rotation frequency of a particularly suitable microtiter plate shaker. We are recommending 350 rpm. Due to certain technical differences deviations may occur, in case the rotation frequency must 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 diluted to usage concentration. Washing volume per washing cycle and well must be 300 µL at least.

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

When using an **automatic 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
Calibrators CAL A – E LYO	in 1 mL Sample Buffer SAM DIL	-
Control 1 CONTROL 1 LYO	in 250 µL Sample Buffer SAM DIL	1:505 with Sample Buffer SAM DIL
Control 2 CONTROL 2 LYO	in 250 µL Sample Buffer SAM DIL	1:505 with Sample Buffer SAM DIL
Washing Buffer WASH SOLN 20x Conc.	-	1:20 with Aqua dest.
Sample dilution: with Sample Buffer SAM DIL 1:505		
Before assay procedure bring all reagents to room temperature 20-25°C.		
Assay Procedure in Double Determination:		
Pipette	Reagents	Position
50 µL	Dilution Buffer DIL	Pipette in all required number of wells
50 µL	Sample Buffer SAM DIL as Blank	A1/A2
50 µL	Calibrator A (0.4 ng/mL)	B1/B2
50 µL	Calibrator B (2 ng/mL)	C1/C2
50 µL	Calibrator C (6 ng/mL)	D1/D2
50 µL	Calibrator D (15 ng/mL)	E1/E2
50 µL	Calibrator E (30 ng/mL)	F1/F2
50 µL	Control 1 (1:505 diluted)	G1/G2
50 µL	Control 2 (1:505 diluted)	H1/G2
50 µL	Sample (1:505 diluted)	in the rest of the wells according the requirements
Cover the wells with the sealing tape.		
Sample Incubation: 1 h at 20-25°C, 350 rpm		
5 x 300 µL	Aspirate the contents of the wells and wash 5 x with 300 µL each diluted Washing Buffer / well	In each well
100 µL	Antibody-POD-Conjugate ENZ CONJ	In each well
Cover the wells with the sealing tape.		
Incubation: 1 hour at 20-25°C, 350 rpm		
5 x 300 µL	Aspirate the contents of the wells and wash 5 x with 300 µL each diluted Washing Buffer / well	In each well
100 µL	Substrate SUB TMB	In each well
Incubation: 30 Minutes in the Dark at 20-25°C		
100 µL	Stop Solution STOP SOLN	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

10.1 Establishing of the Calibration Curve

The Calibrators provided contain the following concentrations of hIGFBP-3

Calibrator	A	B	C	D	E
ng/mL	0.4	2	6	15	30

- 1) Calculate the **mean absorbance** value for the blank from the duplicated determination (well A1/A2).
- 2) Subtract the mean absorbance of the blank from the mean absorbances of all other samples 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 calibration 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 IGFBP-3 concentration in ng/mL (or pg/mL, according the chosen unit for the calibrators) of the samples can be calculated by **multiplication** with the respective **dilution factor**.

10.2 Example of a Typical Calibration 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	0.4	2	6	15	30
OD _(450-620 nm)	0.204	0.254	0.453	0.911	1.706	2.390

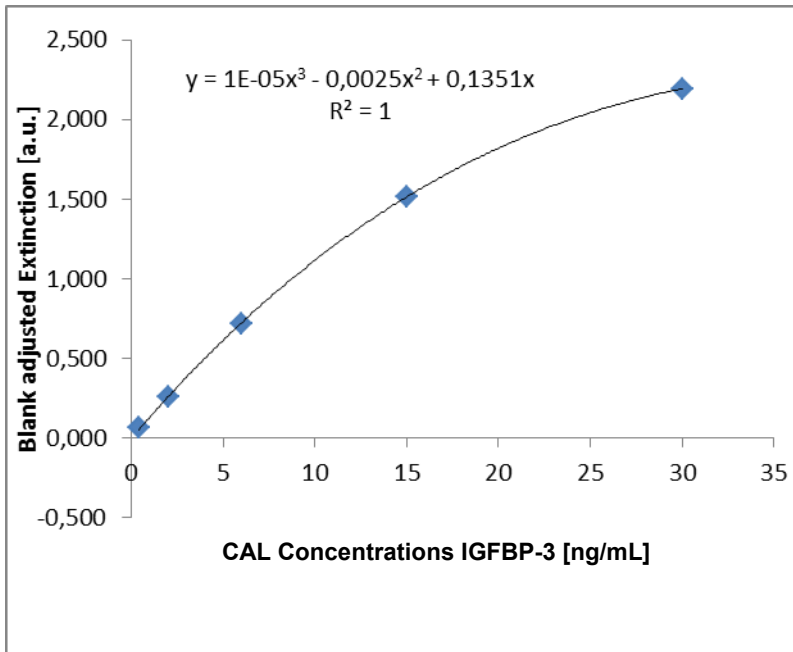


Fig. 4: Exemplary calibration curve

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

10.3 Exemplary calculation of IGFBP-3 concentrations

Sample dilution: 1:505

Measured extinction of your sample 0.975
 Measured extinction of the blank 0.204

Your measurement program will calculate the IGFBP-3 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 (here: polynomial x^3 rd degree).

In this exemplary case the following equation is solved by the program to calculate the IGFBP-3 concentration in the sample:

$$0.771 = 1E-05x^3 - 0.0025x^2 + 0.1351x$$

$$6.617 = x$$

If the dilution factor (**1:505**) is taken into account the IGFBP-3 concentration of the undiluted sample is $6.617 \text{ ng/mL} \times 505 = 3342 \text{ ng/mL} = 3.342 \text{ mg/L}$

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.

11 LIMITATION OF PROCEDURE

IGFBP-3 levels are strongly dependent on GH secretion. However, a number of factors influence its plasma concentration and should be taken into account for appropriate interpretation. Plasma levels decrease during fasting (more than 1 day), in malnutrition, malabsorption, cachexia, impaired hepatic function, hypothyroidism, and diabetes mellitus. They may also be decreased in chronic inflammatory disease and malignancy. Levels are increased in states of impaired renal function and precocious puberty. In clinical situations with hyperprolactinemia or in patients with craniopharyngioma, normal levels may be observed despite GH deficiency.

In certain physiological (e.g. pregnancy) and pathological states, IGFBP-3 may be degraded to smaller molecular size compounds (16,17) by specific proteases which affect IGFBP patterns seen in Western ligand blotting, but in general only have little influence on the outcome of ELISA determinations.

The IGFBP-3 ELISA, is based on polyclonal rabbit antibodies. Generally, this technique is sensible to heterophilic antibodies in the sample. The influence of heterophilic antibodies is reduced by assay design, but cannot be excluded completely.

12 REFERENCE VALUES

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

Tab. 1: Serum levels of IGFBP-3 in healthy subjects at various ages. Individuals between 7 and 17 years of age were classified according to gender, as the pubertal peak occurs almost 2 years earlier in girls than in boys.

Age group	Percentiles														
	0.1	1	5	10	20	30	40	50	60	70	80	90	95	99	
0-1 week	0.25	0.33	0.42	0.48	0.57	0.64	0.70	0.77	0.85	0.93	1.05	1.23	1.41	1.81	
1-4 weeks	0.49	0.62	0.77	0.86	0.99	1.10	1.19	1.29	1.40	1.52	1.68	1.93	2.16	2.68	
1-3 months	0.55	0.70	0.87	0.98	1.13	1.25	1.36	1.48	1.61	1.75	1.94	2.23	2.52	3.14	
3-6 months	0.64	0.80	0.98	1.10	1.25	1.38	1.49	1.61	1.74	1.88	2.07	2.37	2.65	3.24	
6-12 months	0.71	0.88	1.07	1.19	1.35	1.48	1.60	1.72	1.85	2.00	2.19	2.49	2.76	3.36	
1-3 years	1.02	1.21	1.41	1.53	1.69	1.82	1.94	2.05	2.17	2.31	2.48	2.74	2.98	3.47	
3-5 years	1.08	1.30	1.52	1.66	1.84	1.99	2.12	2.25	2.39	2.55	2.75	3.05	3.33	3.91	
5-7 years	1.19	1.42	1.66	1.81	2.01	2.16	2.30	2.44	2.59	2.76	2.97	3.29	3.59	4.2	
7-9 y.	boys	1.25	1.48	1.73	1.88	2.07	2.22	2.36	2.50	2.65	2.81	3.02	3.33	3.61	4.22
	girls	1.36	1.61	1.88	2.04	2.25	2.42	2.57	2.72	2.88	3.06	3.28	3.62	3.94	4.58
9-11 y.	boys	1.47	1.73	1.99	2.15	2.36	2.52	2.66	2.81	2.96	3.14	3.35	3.67	3.97	4.57
	girls	1.56	1.90	2.20	2.38	2.62	2.80	2.96	3.13	3.30	3.50	3.75	4.11	4.45	5.16
11-13 y.	boys	1.58	1.88	2.19	2.38	2.63	2.82	3.00	3.18	3.37	3.58	3.84	4.25	4.62	5.39
	girls	1.62	1.90	2.24	2.46	2.74	2.97	3.17	3.38	3.60	3.85	4.17	4.65	5.10	6.02
13-15 y.	boys	1.62	1.89	2.24	2.46	2.76	2.99	3.20	3.42	3.65	3.91	4.24	4.75	5.22	6.20
	girls	1.69	2.03	2.39	2.61	2.91	3.14	3.35	3.56	3.79	4.04	4.36	4.85	5.30	6.24
15-17 y.	boys	1.70	2.02	2.36	2.57	2.84	3.05	3.25	3.44	3.65	3.88	4.17	4.61	5.01	5.86
	girls	1.62	1.93	2.26	2.46	2.73	2.93	3.12	3.31	3.51	3.74	4.02	4.45	4.85	5.67
17-20 y.	1.58	1.90	2.24	2.45	2.72	2.94	3.13	3.33	3.54	3.78	4.07	4.53	4.95	5.83	
20-30 y.	1.55	1.86	2.20	2.41	2.68	2.90	3.09	3.29	3.50	3.74	4.04	4.50	4.92	5.80	
30-40 y.	1.44	1.75	2.08	2.29	2.56	2.78	2.98	3.18	3.39	3.64	3.95	4.42	4.86	5.78	
40-50 y.	1.38	1.68	2.01	2.21	2.48	2.69	2.88	3.08	3.29	3.53	3.83	4.29	4.72	5.63	
50-60 y.	1.34	1.64	1.96	2.16	2.42	2.63	2.83	3.02	3.23	3.46	3.76	4.22	4.65	5.55	
60-70 y.	1.28	1.58	1.90	2.10	2.37	2.58	2.78	2.98	3.19	3.44	3.75	4.23	4.67	5.62	
70-80 y.	1.20	1.50	1.81	2.00	2.27	2.47	2.67	2.87	3.08	3.32	3.62	4.09	4.52	5.44	
> 80 y.	1.13	1.43	1.73	1.92	2.19	2.39	2.59	2.79	3.00	3.23	3.54	4.00	4.44	5.36	

Serum levels are given as mg/L
y. = years

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

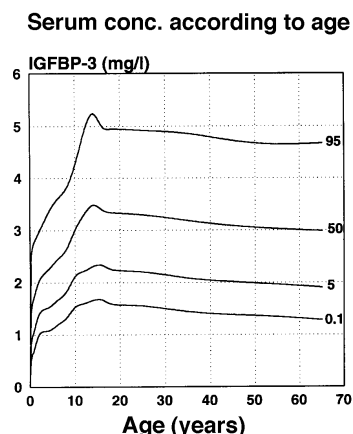


Fig. 5: Age-dependant normal values of IGFBP-3 (presented as 0.1., 5., 50., and 95. percentile)

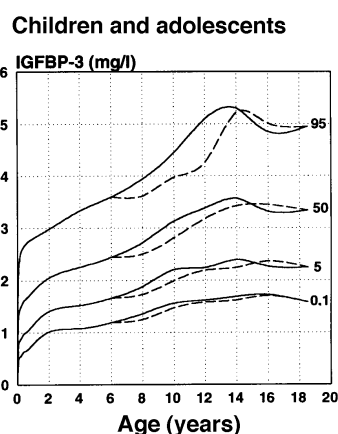


Fig.6: Normal values of children and adolescents (girls — boys - - -)

13 PERFORMANCE CHARACTERISTICS

13.1 Sensitivity

Sensitivity was assessed by measuring the blank and calculating the theoretical concentration of the 2fold standard deviation of the blank. The analytical sensitivity of the DEE003A is 0.03 ng/mL. According ICH Q2 R1 (CPMP/ICH/381/95) the limit of quantification (LoQ) is reflected by the recalculated IGFBP-3 concentration of the 10fold standard deviation of the blank, which therewith is 0.15 ng/mL.

13.2 Specificity

The cross-reactivity of the antibodies used for IGFBP-3 ELISA to homologous proteins was evaluated by diluting IGFBP-1, -2,-4,-5 and -6 in assay buffer to a concentration of 200 ng/mL and subsequent measurement of IGFBP-3. The relative cross-reactivities were $\leq 0.125\%$.

13.3 Reproducibility and Precision

Intra-Assay-Variation

One sample has been measured 10 times in the same assay. The results are shown in table 2. The measured coefficient of variation (CV) is on average 1.9%

Tab. 2: Intra-Assay-Variation. Three exemplary serum samples were diluted and measured 10 times within one assay.

	Sample 1	Sample 2	Sample 3
Mean [ng/mL]	3630	3789	3016
SD	70.83	83.75	46.71
%CV	1.95	2.21	1.55
n	10	10	10

Inter-assay-Variation

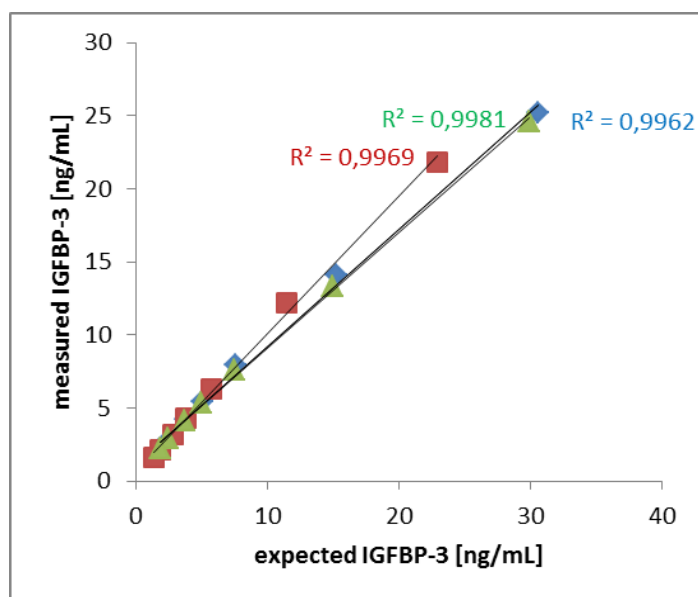
Serum samples were measured in independent assays on different days. On average the coefficient of variation was 5.7%. Results are shown in detail in table 3.

Tab. 3: Inter-Assay-Variation. Serum samples were diluted as recommended (1:505) and IGFBP-3 concentration was measured in different independent assays.

	Sample 1	Sample 2	Sample 3	Sample 4	Sample 5	Sample 6	Sample 7	Sample 8
Mean [ng/mL]	2886	3525	3229	3219	4025	3293	3889	4328
SD	193	178	140	237	171	177	199	322
%CV	6.68	5.05	4.34	7.36	4.25	5.38	5.12	7.44
n	4	10	9	7	10	10	7	10

13.4 Linearity

Linearity was proven by dilution of three different serum samples with known IGFBP-3 concentration. The IGFBP-3 concentration of the diluted sample was measured and compared with the concentration expected. Results of linear regression analysis are shown in Figure 7. None of IGFBP-3 concentrations of the dilutions (1:125 to 1:2000) deviated more than 20% of the expected value (\leq -



17%).

Fig. 7: Linearity. Shown are the measured concentrations in different dilutions of three serum samples.

13.5 Recovery

Serum and plasma samples were enriched with recombinant IGFBP-3 and the recovery was calculated in comparison to buffer enriched with the same amount of IGFBP-3. The native samples used had an IGFBP-3 concentration of 2684 to 3667 ng/mL and the relative recovery was 109 – 118%. Results are shown in Table 4.

Tab. 4: Recovery [%] of recombinant IGFBP-3 in native serum/plasma samples in comparison to recombinant IGFBP-3 in buffer.

IGFBP-3		Sample [ng/mL]	Sample enriched [ng/mL]	Target value [ng/mL]	Recovery [%]
Sample 1	Plasma	3641	5107	4324	118
Sample 2	Plasma	3667	4778	4350	110
Sample 3	Serum	2869	3778	3552	106
Sample 4	Serum	2684	3677	3367	109

13.6 Interference

Interference of physiological appearing substance with the IGFBP-3 measurement was investigated. Serum samples have been enriched with different concentrations of possibly interfering substances and the amount of IGFBP-3 was measured and compared with the IGFBP-3 concentration in the same sample without any enrichment. In Table 5 the relative results are shown. None of the tested substances interfered significantly with IGFBP-3 measurement.

Tab. 5: Recovery [%] in comparison to the native serum.

	Triglyceride 100 mg/mL	Bilirubin 100 µg/mL	Hemoglobin 5 mg/mL
Sample 1	89	93	81
Sample 2	87	91	106
Sample 3	88	96	93

14 COMPARISON WITH OTHER ASSAYS

The IGFBP-3 ELISA DEE003A was compared with the RIA test system. In total 150 different samples with IGFBP-3 concentrations of 10 – 5118 ng/mL were used. The results are shown graphically in Figure 8. The relative deviation of RIA is on average 9.00% (0.18-28.29%).

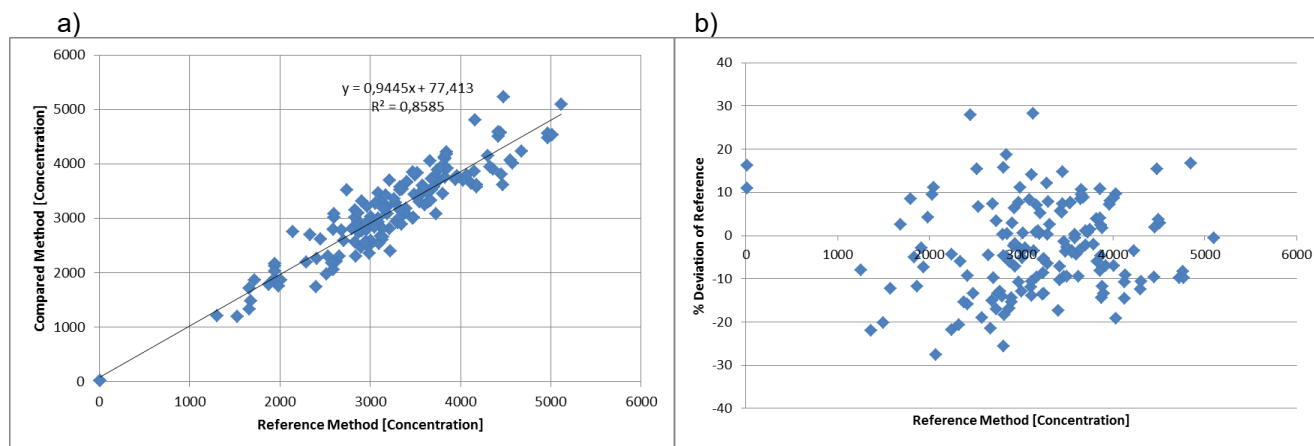


Fig. 8: Comparison of RIA to IGFBP-3 ELISA with Fab Detection Antibody. IGFBP-3 concentration was measured in 150 samples with both assays. Here results are analysed by linear regression analysis (a) and Bland-Altman plot (b).

Further, data resulting from the external quality assessment provided by DGKL/ RfB (Germany) are shown (Table 6). Here the deviation of the concentrations measured by IGFBP-3 ELISA from the method-specific and method-independent target value is shown. The deviation of the Method-specific target value is -17% and the deviation of the method-independent target value is -19% on average, which is within the acceptance criteria of the DGKL/RfB ($\leq 30\%$).

Tab. 6: External Quality Assessment Scheme:

DGKL/RfB Germany retrospective analysis of 2013/2014 samples.

DGKL EQA		Mean	HP1/14	HP4/13	HP3/13	HP2/13	HP1/13
Measured Value [ng/mL]	Probe A	-	3608	3778	3163	3222	3144
Target Value [ng/mL]	Probe A	-	3377	3723	3532	3740	3889
Total Mean[ng/mL]	Probe A	-	3948	3899	3825	3826	3922
Δ A Targetvalue [%]	Probe A	-15.76	6.83	1.47	-10.46	-13.85	-19.16
Δ A Total Mean [%]	Probe A	-17.82	-8.62	-3.11	-17.32	-15.79	-19.84
DGKL EQA		Mean	HP1/14	HP4/13	HP3/13	HP2/13	HP1/13
Measured Value [ng/mL]	Probe B	-	3101	3588	3243	3098	3149
Target Value [ng/mL]	Probe B	-	3422	4008	3360	4170	3618
Total Mean [ng/mL]	Probe B	-	3941	3864	3846	3857	3873
Δ B Targetvalue [%]	Probe B	-18.84	-9.38	-10.47	-3.47	-25.71	-12.97
Δ B Total Mean [%]	Probe B	-19.19	-21.32	-7.14	-15.67	-19.68	-18.70

15 LITERATUR / REFERENCES

- 1) Ballard J, Baxter R, Binoux M, Clemmons D, Drop S, Hall K, Hintz R, Rechler M, Rutanen E, Schwander J (1989) On the nomenclature of the IGF binding proteins. *Acta Endocrinol (Copenh)* 121:751-752
- 2) Wilson EM, Oh Y, Rosenfeld RG (1997) Generation and characterization of an IGFBP-7 antibody: Identification of 31 kD IGFBP-7 in human biological fluids and Hs578T human breast cancer conditioned media. *J Clin Endocrinol Metab* Vol 82, 4:1301-1303
- 3) Baxter RC (1988) Characterization of the acid-labile subunit of the growth hormone-dependent insulin-like growth factor binding protein complex. *J Clin Endocrinol Metab* 67:265-272
- 4) Baxter RC, Martin JL (1989) Structure of the Mr 140,000 growth hormone dependent insulin-like growth factor binding protein complex: determination by reconstitution and affinity-labeling. *Proc Natl Acad Sci USA* 86:6898-6902
- 5) Holman SR, Baxter RC (1996) Insulin-like growth factor-binding protein-3: factors affecting binary and ternary complex formation. *Growth Regulation* 6: 42-47.
- 6) Baxter RC, Martin J (1986): Radioimmunoassay of growth hormone-dependent insulin-like growth factor binding protein in human plasma. *J Clin Invest* 78:1504-1512
- 7) Blum WF, Ranke MB, Kietzmann K, Gauggel E, Zeissel HJ, Bierich JR (1990) A specific radioimmunoassay for the growth hormone (GH)-dependent somatomedin-binding protein: its use for diagnosis of GH deficiency. *J Clin Endocrinol Metab* 70:1292-1298
- 8) Blum WF, Ranke MB (1990) Use of insulin-like growth factor binding protein 3 for the evaluation of growth disorders. *Horm Res* 34 (Suppl):31-37
- 9) Blum WF (1993) Insulin-like growth factor-binding protein 3: Entwicklung eines Radioimmunoassays und Untersuchungen zur klinischen Bedeutung. Habilitationsschrift, Tübingen.
- 10) Lee PDK, Hintz RL, Sperry JB, Baxter RC, Powell DR (1989) IGF-binding proteins in growth-retarded children with chronic renal failure. *Pediatr Res* 26:308-315
- 11) Blum WF, Ranke MB, Kietzmann K, Tönshoff B, Mehls O (1989) Excess of IGF-binding proteins in chronic renal failure: evidence for relative GH resistance and inhibition of somatomedin activity. In: Drop SLS, Hintz RL (eds) *Insulin-like Growth Factor Binding Proteins*. Excerpta Medica, Amsterdam, pp 93-101
- 12) Baxter RC, Cowell CT (1987) Diurnal rhythm of growth hormone-independent binding protein for insulin-like growth factors in human plasma. *J Clin Endocrinol Metab* 65:432-440
- 13) Jorgensen JOL, Blum WF, Moller N, Ranke MB, Christiansen JS (1990) Circadian patterns of serum insulin-like growth factor (IGF)-II and IGF-binding protein 3 in growth hormone deficient patients and age- and sex-matched normal subjects. *Acta Endocrinol (Copenh.)* 123:257-262
- 14) Blum WF, Albertsson-Wikland K, Rosberg S, Jorgensen JOL, Ranke MB (1990) Insulin-like growth factor binding protein 3 (IGFBP-3) reflects spontaneous growth hormone (GH) secretion. *Horm Res* 33 (Suppl 3): 3 (Abstract)
- 15) Blum WF, Ranke MB (1990) Insulin-like growth factor-binding proteins (IGFBPs) with special reference to IGFBP-3. *Acta Paediatr Scand (Suppl)* 367:55-62
- 16) Giudice LC, Farrell EM, Pham H, Lamson G, Rosenfeld RG (1990) Insulin-like growth factor binding proteins in maternal serum throughout gestation and in the puerperium: effects of a pregnancy-associated serum protease activity. *J Clin Endocrinol Metab* 71:806-816
- 17) Hossenlopp P, Segovia B, Lassarre C, Roghani M, Bredon M, Binoux M (1990) Evidence of enzymatic degradation of insulin-like growth factor-binding proteins in the 150k complex during pregnancy. *J Clin Endocrinol Metab* 71:797-805
- 18) Ranke MB, Schweizer R, Elmlinger MW, Weber K, Binder G, Schwarze CP, Wollmann HA (2000) Significance of Basal IGF-I, IGFBP-3 and IGFBP-2 Measurements in the diagnostics of short stature in children. *Horm Res* 2000;54:60-68
- 19) Ranke MB, Schweizer R, Elmlinger MW, Weber K, Binder G, Schwarze CP, Wollmann HA (2001) Relevance of IGF-I, IGFBP-3, and IGFBP-2 Measurements during GH treatment of GH-deficient and non-GH-deficient children and adolescents. *Horm Res* 2001;55:115-124
- 20) Langkamp M, Weber K., Kirschner M., Pridzun L., Ranke M.B. Validation of Functional insulin-Like Growth Factor Binding Protein-3 measurement by a Ligand Immunoassay. *Clin Lab*. 11+12/2010, 56; 535-542

SYMBOLS USED WITH DEMEDITEC ASSAYS

Symbol	English	Deutsch	Française	Espanol	Italiano
	European Conformity	CE-Konformitäts-kennzeichnung	Conforme aux normes européennes	Conformidad europea	Conformità europea
	Consult instructions for use	Gebrauchsanweisung beachten	Consulter les instructions d'utilisation	Consulte las Instrucciones	Consultare le istruzioni per l'uso
	In vitro diagnostic device	In-vitro-Diagnostikum	utilisation Diagnostic in vitro	Diagnóstico in vitro	Per uso Diagnostica in vitro
	For research use only	Nur für Forschungszwecke	Seulement dans le cadre de recherches	Sólo para uso en investigación	Solo a scopo di ricerca
	Catalogue number	Katalog-Nr.	Référence	Número de catálogo	No. di catalogo
	Lot. No. / Batch code	Chargen-Nr.	No. de lot	Número de lote	Lotto no
	Contains sufficient for <n> tests/	Ausreichend für "n" Ansätze	Contenu suffisant pour "n" tests	Contenido suficiente para <n> ensayos	Contenuto sufficiente per "n" saggi
	Note warnings and precautions	Warnhinweise und Vorsichtsmaßnahmen beachten	Avertissements et mesures de précaution font attention	Tiene en cuenta advertencias y precauciones	Annoti avvisi e le precauzioni
	Storage Temperature	Lagerungstemperatur	Température de conservation	Temperatura de conservacion	Temperatura di conservazione
	Expiration Date	Mindesthaltbarkeitsdatum	Date limite d'utilisation	Fecha de caducidad	Data di scadenza
	Legal Manufacturer	Hersteller	Fabricant	Fabricante	Fabbricante
<i>Distributed by</i>	Distributed by	Vertrieb durch	Distribution par	Distribución por	Distribuzione da parte di
	Version	Version	Version	Versión	Versione
	Single-use	Einmalverwendung	À usage unique	Uso único	Uso una volta