

# IGFBP-1 ELISA

Enzymimmunoassay für die quantitative Bestimmung von

## humanem insulinähnlichem Wachstumsfaktor Bindungsprotein 1 (IGFBP-1)

Deutsch

Enzyme Immunoassay for Quantitative Determination of

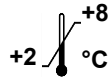
## human Insulin-like Growth Factor Binding Protein 1 (IGFBP-1)

English

**Europäische Union / European Union,**  
für In-vitro-Diagnostik / For In Vitro Diagnostic Use  
IVD zum Gebrauch durch Fachpersonal! / IVD for professional use!

### **Alle anderen Länder / All other countries:**

Nur für Forschungszwecke. Nicht für diagnostische Anwendungen geeignet.  
For Research Use Only. Not for use in diagnostic procedures.



**REF E01**


















Gesellschaft für Forschung und Herstellung von Diagnostika GmbH

 : Aspenhastr. 25 • D-72770 Reutlingen / Germany  
Telefon: + 49 - (0) 7121 51484-0 • Fax: + 49 - (0) 7121 51484-10  
E-Mail: [contact@mediagnost.de](mailto:contact@mediagnost.de) • <http://www.mediagnost.de>

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

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

DIN EN ISO 15223-1

	Expiry date/ Verfallsdatum/ Date de péremption/ Data di scadenza/ Fecha de caducidad/ Data de validade/ Uiterste gebruiksdatum/ Udløbsdato/ Bäst före-datum/ Termin ważności/ Lejárati idő/ Čas expirácie/ Doba expirace/ Срок годности/ Aegumiskuupäev/ Ημερομηνία λήξης/ Data de expirare/ Rok uporabe/ Viimeinen käyttöpäivä
	Consider instructions for use/ Bitte Gebrauchsanweisung beachten/ Consultez la notice d'utilisation/ Consultare le istruzioni per l'uso/ Consulte las instrucciones de uso/ Respeitar as instruções de utilização/ A.u.b de gebruiksaanwijzing volgen/ Se brugsanvisningen/ Läs anvisningarna före användning/ Proszę przeczytać instrukcję obsługi/ Vegye figyelembe a használati utasításban foglaltakat/ Postupujte podľa pokynov na použitie/ Dodržujte návod k použití/ Моля, спазвайте инструкцията за употреба/ Palun järgige kasutusjuhendi/ Λάβετε υπόψη σας τις οδηγίες χρήσης/ Vă rugăm să respectați instrucțiunile de utilizare/ Upošteвайте navodila za uporabo/ Lue käyttöohje huolellisesti!
	In vitro Diagnostic Medical Device (for in vitro diagnostic use)/ In-vitro-Diagnostikum (zur In-vitro-Diagnostik)/ Dispositif médical de diagnostic in vitro (Pour usage diagnostique in vitro)/ Dispositivo medico per diagnostica in vitro (per uso diagnostico in vitro)/ Dispositivo médico de diagnóstico in vitro (para uso diagnóstico in vitro)/ Dispositivo Médico para Diagnóstico in vitro (Para Utilização de Diagnóstico in vitro)/ Medisch hulpmiddel voor diagnostiek in vitro (voor diagnostisch gebruik in vitro)/ Medicinsk udstyr til in vitro-diagnostik (Udelukkende til in vitro diagnostisk anvendelse)/ Medicinteknisk produkt avsedd för in vitro-diagnostik (för in vitro-diagnostiskt bruk)/ Wyrób medyczny do diagnostyki in vitro/ In vitro orvosdiagnosztikai termék (in vitro diagnosztikai használathoz)/ In vitro diagnostický zdravotnícký materiál (určené na diagnostiku „in vitro“)/ In vitro diagnostický zdravotnícký materiál (určeno pro diagnostiku „in vitro“)/ Медицинско устройство за ин-витро диагностика (за ин-витро диагностика)/ in vitro diagnostikaseade (in vitro diagnostika tegemiseks)/ In vitro διαγνωστικό (για διάγνωση in vitro)/ Dispozitiv de diagnosticare in vitro (pentru diagnosticarea in vitro)/ In vitro diagnostika (o in vitro diagnostiki)/ in vitro-diagnostikkäyttö
	Lot-Batch Number/ Charge-Chargennummer/ Lot-Code du lot/ Lotto-Numero di lotto/ Lote-Código de lote/ Lote-Código do Lote/Lot-Partijnummer/ Lot-Batchkode/ Partisatskod/ Numer serii/ Tétel-szám/ Číslo šarže/ Číslo šarže/ Партиден номер/Partii number/ Παρτίδα-αριθμός παρτίδας/ Lot-număr lot/ Številka serije/ Erä
	Manufactured by/ Hergestellt von/ Fabriqué par/ Prodotto da/ Fabricado por/ Fabricado por/ Vervaardigd door/ Fabrikation af/ Tillverkad av/ Wyprodukowane przez/ Gyártotta/ Vyrobené/ Vyrobeno v/ Производител/ Tootja/ Κατασκευάζεται από/ Produs de/ Proizvajalec/ Valmistaja
	Catalogue Number/ Bestellnummer/ Numéro de référence/ Numero di riferimento/ Número de referencia/ Número de Referência/ Referentienummer/ Referencenummer/ Beställningsnummer/ Numer katalogowy/ Rendelési szám/ Katalógové číslo/ Objednací číslo/ Καταλογος αριθμός/ Tellimisnumber/ Αρ. παραγγελίας/Număr comandă/ Številka naročila/ Viite tai tilausnumero
	Store at between/ Lagerung bei zwischen/ Conserver à entre/ Conservare a tra/ Conservar a temp. entre/ Armazemar entre/ Bewaar bij tussen/ Opbevaars mellen/ Förvaras vid/ Przechowywać w/ Tárolási tartomány/ Skladujte v rozsahu / Skladujte v rozmezi/ Температурно ограничение/ Säilítada temperatuuridel/ Φύλαξη σε θερμοκρασία/ Depozitare între/ Skladiščenje med/ Säilytys x-y Celsiusasteen lämpötilassa
	Contains sufficient for x tests/ Inhalt ausreichend für x Tests/ Contient suffisant pour x tests/ Contenuto sufficiente per x test/ Contenido suficiente para x pruebas/ Conteúdo suficiente para x testes/ Bevat voldoende voor x bepalingen/ Indeholder tilstrækkeligt til x prøver/ Innehållet räcker till x analyser/ Zawartość na x testów/ Tartalma x teszt elvégzésére elegendő/ Obsahuje materiál pre x testov/ Obsah dostačuje pro x testů/ Съдържание достатъчно за x тестове/ Sisust jätkub x katse jaoks/ Το περιεχόμενο επαρκεί για x δοκιμές/ Conținut suficient pentru x teste/ Vsebina zadostuje za x preizkusov/ Sisältö riittää x testille
	Incubation time/ Inkubationszeit/ Temps d'incubation/ Tempo d'incubazione/ Tiempo de incubación/ Tempo de incubação/ incubatietijd/ Inkubationstid/ inkubationstid/ Czas inkubacji/ Inkubációs idő/ Inkubačná lehota/ Inkubační doba/ Инкубационен период/ Inkubatsiooniaeg/ Χρόνος επώασης/ Timp de incubare/ Inkubacijska doba/ inkubaatioaika
	Incubate at/ Inkubation bei/ Incuber à/ Incubare a/ incubar a/ Incubar a/ incubatietemperatuur/ Inkubation ved/ inkubation vid/ Inkubacja przy/ Inkubáció hőmérséklete/ Inkubácia pri/ Inkubace při/ Инкубира се при/ Inkubatsioon temperatuuril/ Επώαση στους/ Incubare la/ Inkubacija pri/ Inkubaatiolämpötila
	Shaking/ Schütten/ Mélanger/ Agitare/ Agitar/ Agitação/ Schudden/ Ryster/ Skaka/ Wstrząsanie/ Rázás/ Pretrepat/ Protřepat/ Разклащане/ Raputada/ Ανακινήστε/ Vibrare/ Stresite/ Sekoita
	Reconstitute in/ Rekonstituieren in/ Reconstituer dans/ Ricostituire ne/ Reconstituir en/ Reconstituir em/ Rekonstituieren in/ Rekonstituier i/ Rekonstituera/ Rekonstytuować w/ Helyreállítás/ Znovu pripravit' za/ Znovu připravit za/ Разтваряне в/ Moodustada uuesti/ Ανασυστήστε σε/ Reconstituire în/ Predelava v/ Rekonstituoii
	Sample/ Probe/ Echantillon/ Campione/ Muestra/ Amostra/ Monster/ Prøve/ prov/ Próbka/ Minta/ Vzorka/ Vzorek/ Проба/ Proov/ Δείγμα/ Probă/ Vzorec/ Näyte
	Mikrotiterplate/ Mikrotiterplatte/ plaque de microtitrage/ Piastra di microtitolazione/ Placa de microtitulación/ Placa de Microtitulação/ Mikrotiterplaat/ Mikrotiterplade/ mikrotiterplatta/ mikrotiterplaat/ Płytko microtiter/ Mikrotiter lap/ Mikrotitračná podložka/ Mikrotitrační podložka/ Микротитърна плака/ Mikrotiiterplaat/ Τρυβλίο μικροτιτλοδότησης/ Microplacă/ Mikrotitrská plošča/ Mikrotitruslevy
	Dilution Buffer/ Verdünnungspuffer/ Tampon de dilution/ Tampone di diluizione/ Tampón de dilución/ / Tampão de diluição / Verdunningsbuffer/ / Fortyndingsbuffer/ Utspädningsbuffert / Bufor rozcieńczający/ / Hígító puffer/ Riediaci pufo/ Ředící pufr / Буфер за разреждане/ Lahjenduspuhver/ Ρυθμιστικό διάλυμα αραιώσης / Tampon de diluare/ Pufer za redčenje/ Laimennuspuskuri



# INHALTSVERZEICHNIS / TABLE OF CONTENTS

<b>DEUTSCH - Gebrauchsanweisung</b> .....	<b>5</b>
<b>1 ZWECKBESTIMMUNG</b> .....	<b>5</b>
<b>2 EINFÜHRUNG</b> .....	<b>5</b>
<b>3 TESTPRINZIP</b> .....	<b>6</b>
<b>4 WARNHINWEISE UND VORSICHTSMAßNAHMEN</b> .....	<b>7</b>
<b>5 PROBEN</b> .....	<b>8</b>
<b>6 MATERIALIEN</b> .....	<b>9</b>
<b>7 TECHNISCHE HINWEISE</b> .....	<b>10</b>
<b>8 TESTDURCHFÜHRUNG</b> .....	<b>11</b>
<b>9 QUALITÄTSKONTROLLE</b> .....	<b>12</b>
<b>10 AUSWERTUNG</b> .....	<b>12</b>
<b>11 EINSCHRÄNKUNGEN</b> .....	<b>13</b>
<b>12 REFERENZWERTE</b> .....	<b>13</b>
<b>13 ASSAY EIGENSCHAFTEN UND VALIDIERUNG</b> .....	<b>14</b>
<b>14 VERGLEICHSTUDIEN</b> .....	<b>16</b>
<b>15 WISSENSCHAFTLICHE ANWENDUNGEN</b> .....	<b>17</b>
<b>ENGLISH - Instructions for use</b> .....	<b>19</b>
<b>1 INTENDED USE</b> .....	<b>19</b>
<b>2 INTRODUCTION</b> .....	<b>19</b>
<b>3 ASSAY PRINCIPLE</b> .....	<b>20</b>
<b>4 WARNINGS AND PRECAUTIONS</b> .....	<b>21</b>
<b>5 SAMPLES</b> .....	<b>22</b>
<b>6 MATERIALS</b> .....	<b>23</b>
<b>7 TECHNICAL NOTES</b> .....	<b>24</b>
<b>8 ASSAY PROCEDURE</b> .....	<b>25</b>
<b>9 QUALITY CONTROL</b> .....	<b>26</b>
<b>10 EVALUATION OF RESULTS</b> .....	<b>26</b>
<b>11 LIMITATION OF PROCEDURE</b> .....	<b>27</b>
<b>12 REFERENCE VALUES</b> .....	<b>27</b>
<b>13 PERFORMANCE CHARACTERISTICS</b> .....	<b>28</b>
<b>14 ASSAY COMPARISON</b> .....	<b>30</b>
<b>15 SCIENTIFIC APPLICATION</b> .....	<b>31</b>
<b>16 LITREATURE / LITERATUR</b> .....	<b>32</b>
<b>17 INTERNATIONAL ASSAY PROCEDURE</b> .....	<b>35</b>
<b>18 ASSAY PROCEDURE</b> .....	<b>36</b>

# DEUTSCH - Gebrauchsanweisung

<b>IGFBP-1 ELISA E01</b>	<b>96 Bestimmungen</b>
<b>CE</b>	DE/CA40/00809/23
Testprinzip	Enzyme-linked Immunoassay
Dauer (Inkubationszeit)	1,75 h
Antikörper	spezifische, monoklonale Antikörper
Kreuzreaktivität mit IGFBP-2/-3	< 0,1%
Puffer	Gebrauchsfertig und 20-fach Konzentrat
Kalibratoren	7 Einzelkalibratoren: 0 - 8 ng/mL, gefriergetrocknet, natives humanes IGFBP-1
Assaybereich	0 – 128 ng/mL
Kontrolle	2 Kontrollen, gefriergetrocknet
Proben	humanes Serum / Plasma
Erforderliches Probenvolumen	20 µL
Probenverdünnung	≥ 1:16
Analytische Sensitivität	< 0,1 ng/mL
Intra- / Interassay Varianz	∅ < 10%

## 1 ZWECKBESTIMMUNG

Quantitative Messung von humanem insulinähnlichem Wachstumsfaktor Bindungsprotein 1 (IGFBP-1) in menschlichem Serum oder Plasma.

## 2 EINFÜHRUNG

Die Insulin-Like Growth Factors-I und -II sind in Geweben und Körperflüssigkeiten an spezifische Bindungsproteine gebunden. Bis heute können 7 Bindungsproteine (IGFBP-1 bis 7) und mehrere IGFBP verwandte Proteine unterschieden werden. Durch sie bzw. ihre proteolytische Spaltung wird die biologische Verfügbarkeit der IGFs reguliert. Sowohl die aus der Spaltung resultierenden Fragmente als auch die Bindungsproteine an sich zeigen verschiedene IGF-unabhängige Wirkungen bspw. auf die Migration und Proliferation von Zellen.

IGFBP-1 (Plazenta Protein 12) ist aus 234 Aminosäuren aufgebaut, besitzt eine Molekularmasse von ca. 25 kD und das Gen ist auf dem Chromosom 7 lokalisiert [1, 2]. Die Bildung von IGFBP-1 erfolgt hauptsächlich in der fötalen und adulten Leber sowie dem dezidualen Endometrium und variiert in der Intensität während des Menstruationszyklus mit einer maximalen Expression in der späten sekretorischen Phase [3, 4]. Des Weiteren zeigt die IGFBP-1 Konzentration in humanem Serum **diurnale Schwankungen** (um den Faktor 10), welche eine Reaktion auf veränderte Insulin Konzentrationen darstellen [5]. Posttranslational kann IGFBP-1 durch Phosphorylierung an den Serin-Resten 101, 119 und 169 modifiziert werden. Phosphoryliertes IGFBP-1 zeigt eine höhere Affinität zu IGF-I und ist die überwiegende Form im adulten Menschen. IGFBP-1, welches vom Endometrium sekretiert wird, weist gegenüber dem IGFBP-1 aus der Leber einen deutlich geringeren Phosphorylierungsgrad auf [6].

Mit Beginn der Schwangerschaft steigt die IGFBP-1 Konzentration im Serum der Mutter deutlich an und erreicht in 22.-23. Gestationswoche ein Maximum (2. Trimester: 75,8 ng/ml [5]), zum Ende der Schwangerschaft sinkt die IGFBP-1 Konzentration im maternalen Serum wieder ab. Dabei ist auffällig, dass die IGFBP-1 Konzentration in der Amnionflüssigkeit um den Faktor 1000 höher liegt als im Serum. Der zyklische Konzentrationsverlauf tritt in der Amnionflüssigkeit jedoch ebenso auf wie im Serum [7].

Der Konzentrationsverlauf im Serum der Mutter findet sich ebenso im Serum des Fötus wieder. Der hohe IGFBP-1 Spiegel bei Geburt fällt auf den niedrigen steady-state Level der Pubertät und des Erwachsenenalters [8, 9].

Die IGFBP-1 Konzentration in humanem Serum wird wesentlich durch den Ernährungsstatus und dabei über Veränderungen des Insulin-Levels bestimmt. Sinkende IGFBP-1 Serum Konzentrationen treten bei Fasten und Diabetes, steigende bei intensiver sportlicher Betätigung auf [10-12].

Die Bedeutung von IGFBP-1 als diagnostischer Parameter wurde in den letzten Jahren auf unterschiedlichen Gebieten untersucht. Dabei zeigte sich, dass die IGFBP-1 Konzentration insbesondere in den folgenden Bereichen von diagnostischem Wert sein könnte:

### **Energiemetabolismus**

Die IGFBP-1 Konzentration im humanen Serum wird durch Insulin beeinflusst, daher kann IGFBP-1 einen möglichen Marker für die Entwicklung einer Insulin-Resistenz darstellen.

Im Rahmen einer 23 Probanden umfassenden Studie konnten Maddux et al zeigen, dass IGFBP-1 Konzentration sehr gut mit der Glucose-Aufnahme Rate korreliert. Dabei zeigte sich, dass bei den nicht diabetischen Probanden die IGFBP-1 Serumkonzentrationen besser mit der Insulin Aktivität korrelieren als der HOMA Index [13].

### **Schwangerschaftsdiagnostik**

Im Rahmen der Schwangerschaftsdiagnostik konnten verschiedene mögliche diagnostische Anwendungen für IGFBP-1 gezeigt werden. Dabei wurde insbesondere die Bedeutung von IGFBP-1 als Marker für Fruchtblasenrisse sowie für intrauterine Wachstumsstörungen nachgewiesen. Des Weiteren gibt es Hinweise für die Eignung als diagnostischer Marker im maternalen Serum für Trisomie 18, dabei jedoch scheint das Verhältnis von IGFBP-1 zu IGFBP-2 von besonderer Aussagekraft zu sein [14].

Ein eindeutiger Unterschied konnte in der IGFBP-1 Serum-Konzentration zwischen gesunden Schwangeren und diabetischen bzw. präeklampsischen Schwangeren bestimmt werden (102,8 vs. 203,71 bzw. 281,09 ng/ml) [15].

Auch bei der Evaluation von IGFBP-1 als Marker für Fruchtblasenrisse konnte eine hohe Sensitivität (75%) und Spezifität (97%) für die IGFBP-1 Konzentration in Sekreten von Vagina und Gebärmutter gezeigt werden. Dabei wurde im Falle einer intakten Fruchtblase eine IGFBP-1 Konzentration von < 90 ng/ml gemessen, innerhalb von acht Stunden nach spontanem oder induziertem Riss der Fruchtblase betragen die IGFBP-1 Konzentrationen im Median 1900 ng/ml. In der Studie von Rutanen wurden Werte von > 100 ng/ml als positiver Nachweis von Amnionflüssigkeit interpretiert [16]. Ein positiver prädiktiven Wert von 97% macht deutlich, dass IGFBP-1 ein geeigneter Marker für den vorzeitigen Fruchtblasenriss (Premature rupture of fetal membranes) sein kann [17].

## **3 TESTPRINZIP**

Der Mediagnost **IGFBP-1 ELISA E01** ist ein sogenannter Sandwich-Assay unter Verwendung zweier spezifischer und hochaffiner Antikörper. Der an die Mikrotiterplatte gekoppelte erste Antikörper bindet das IGFBP-1 aus der Probe. Im nachfolgenden Schritt bindet am derart immobilisierten IGFBP-1 der zweite spezifische anti-IGFBP-1-Antikörper. Dieser ist biotinyliert und ermöglicht die Bindung eines Streptavidin-Peroxidase-Enzymkonjugats.

Die folgende enzymatische Reaktion resultiert in einer Blaufärbung des Substrats, deren Intensität ist abhängig vom IGFBP-1 Gehalt der Probe. Nach dem Stoppen der Reaktion wird die Farbintensität (dann gelb) durch die Messung der Absorption quantifiziert und mittels einer Kalibrationskurve in die IGFBP-1 Konzentration umgerechnet.

## 4 WARNHINWEISE UND VORSICHTSMAßNAHMEN

Der Mediagnost 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. Mediagnost 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: **CTR1, CTR2, CAL A-G**

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.

Die unten angegebenen Sicherheitssätze beziehen sich auf die unverdünnten Substanzen und dienen der allgemeinen Information.

### Reagenzien DET, EC, DIL, WB

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/ Schutzkleidung/ 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 S

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 STP

Die Stopplösung enthält 0,2 M Schwefelsäure (H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>)

- H290 Kann gegenüber Metallen korrosiv sein.
- H314 Verursacht schwere Verätzung der Haut und schwere Augenschäden.
- P280 Schutzhandschuhe/ Schutzkleidung/ 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

Neben Serum können auch EDTA- und Heparin-Plasma verwendet werden.

### 5.2 Probenentnahme

Das Blut zur Probengewinnung mittels standardmäßiger Venenpunktion entnehmen. Hämolytische Reaktionen sind zu vermeiden. Bei der Probengewinnung sind diurnale Schwankungen insbesondere der Einfluss der Nahrungsaufnahme zu berücksichtigen [5].

### 5.3 Erforderliches Probenvolumen: 20 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. 3

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. 3 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:  $\geq 1:16$  mit Verdünnungspuffer **DIL**
- Beispiel: **20 µL Probe** werden zu **300 µL** Verdünnungspuffer **DIL** gegeben (Verdünnungsfaktor 1:16). **Nach dem Mischen innerhalb von 1 Stunde von dieser Verdünnung 50 µL pro Bestimmung** im Assay einsetzen.



## 6 MATERIALIEN

### 6.1 Inhalt der Testpackung

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

<b>MTP</b>	<b>Mikrotiterplatte</b> , gebrauchsfertig, beschichtet mit Maus-anti-hIGFBP-1-Antikörper. Die Vertiefungen sind einzeln abbrechbar.	<b>(8x12) Vertiefungen</b>
<b>A-G</b>	<b>Kalibratoren</b> , lyophilisiert (humanes IGFBP-1), Konzentrationen sind auf den Etiketten und auf dem <b>QC-Zertifikat</b> angegeben.	<b>7 x 500 µL</b>
<b>CTR 1</b>	<b>Kontrolle 1</b> , lyophilisiert, (humanes Serum), die Konzentration ist auf dem <b>QC-Zertifikat</b> angegeben.	<b>1x 250 µL</b>
<b>CTR 2</b>	<b>Kontrolle 2</b> , lyophilisiert, (humanes Serum), die Konzentration ist auf dem <b>QC-Zertifikat</b> angegeben.	<b>1x 250 µL</b>
<b>DET</b>	<b>Antikörperkonjugat</b> , gebrauchsfertig, Mouse-anti-hIGFBP-1-Antikörper biotinyliert.	<b>1 x 6 mL</b>
<b>EC</b>	<b>Enzymkonjugat (POD)</b> , gebrauchsfertig, Streptavidin-Peroxidase-Konjugat.	<b>1 x 12 mL</b>
<b>DIL</b>	<b>Verdünnungspuffer</b> , gebrauchsfertig. <b>Bitte vor Gebrauch Schütteln!</b>	<b>1 x 125 mL</b>
<b>WB</b>	<b>Waschpuffer</b> , 20fach konzentrierte Lösung	<b>1 x 50 mL</b>
<b>S</b>	<b>Substrat</b> , gebrauchsfertig, Meerrettich-Peroxidase (POD)-Substrat, stabilisiertes Tetramethylbenzidin.	<b>1 x 12 mL</b>
<b>STP</b>	<b>Stopplösung</b> , gebrauchsfertig, 0,2 M Schwefelsäure.	<b>1 x 12 mL</b>
-	<b>Abdeckfolie</b> für die <b>Mikrotiterplatte</b>	<b>2 x</b>
	<b>Packungsbeilage</b>	<b>1 x</b>
-	<b>Qualitätskontrollzertifikat (QC-Zertifikat)</b>	<b>1 x</b>

### 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  $\geq 590$  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 – G** und Kontrollseren **CTR1 und CTR2**) 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 **WB** ist nur 4 Wochen haltbar bei 2 - 8°C.

### Vorbereitung der Reagenzien

Alle Komponenten des Kits müssen **vor Gebrauch auf Raumtemperatur** 20°C - 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 – G** und Kontrollen **CTR1 und CTR2** werden mit dem im Kit enthaltenen Verdünnungspuffer **DIL** 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 **CTR1 und CTR2** im gleichen Verhältnis wie die Proben mit dem Verdünnungspuffer **DIL** verdünnt.

Das benötigte Volumen des Waschpuffers **WB** 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 **S**, stabilisiertes Tetramethylbenzidin, ist lichtempfindlich–Aufbewahrung und Inkubation bitte vor Licht geschützt.

### Testdurchführung

Die Messungen (Kalibratoren **A-G**, Kontrollen **CTR1 und CTR2** 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-G**, Kontrollen **CTR1 und CTR2** und die jeweiligen Proben möglichst schnell pipettiert werden z.B. in 15 Minuten). Das Antikörperkonjugat **DET**, Enzymkonjugat **EC** sowie nachfolgend das Substrat **S** und die Stopplösung **STP** 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 Kalibrator A Konzentrationen 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 Mikrotiterplattengeometrie und den Parametern der Waschspezifikation angepasst werden. Es ist zu beachten, dass die Dispensier- und Absaugkapillaren des Gerätes nicht die Oberfläche der Vertiefungen der Mikrotiterplatte beschädigen. Die verbleibende Restflüssigkeit nach jedem Absaugen muss minimiert werden. Nach Ende des gesamten Waschvorganges sollte die Menge der verbleibenden Restflüssigkeit überprüft und ggfs. verringert werden durch mehrmaliges Ausklopfen der Mikrotiterplatte auf nicht fesselndem 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 schwingvolles Ausschwenken der Mikrotiterplatte über einem Becken entfernt werden. Falls Absaugvorrichtungen eingesetzt werden, ist darauf zu achten, dass die Oberflächen der Vertiefungen der Mikrotiterplatte nicht beschädigt werden. Nach jedem einzelnen Waschzyklus sollte die verbleibende Restflüssigkeit durch Ausklopfen der Mikrotiterplatte auf nicht fesselndem Zellstoff gründlich entfernt werden.

## 8 TESTDURCHFÜHRUNG

Reagenzpräparation:		Rekonstitution:	Verdünnung:
A-G	Kalibratoren	in 500 µL Verdünnungspuffer DIL	-
CTR1	Kontrolle 1	in 250 µL Verdünnungspuffer DIL	≥ 1:16 mit DIL
CTR2	Kontrolle 2	in 250 µL Verdünnungspuffer DIL	≥ 1:16 mit DIL
WB	Waschpuffer 20x Konzentrat	-	1:20 mit Aqua dest. → WB 1:20
Proben mit Verdünnungspuffer DIL ≥ 1:16 verdünnen			
Vor der Testdurchführung alle Reagenzien auf Raumtemperatur (20-25°C) bringen.			
<b>Testdurchführung in Doppelbestimmung:</b>			
Pipettieren	Reagenzien	Position	
50 µL	Antikörperkonjugat DET	in <u>alle</u> benötigten Vertiefungen pipettieren	
50 µL	Kalibrator A (0 ng/mL)	A1/A2	
50 µL	Kalibrator B (0,1 ng/mL)	B1/B2	
50 µL	Kalibrator C (0,5 ng/mL)	C1/C2	
50 µL	Kalibrator D (1 ng/mL)	D1/D2	
50 µL	Kalibrator E (2 ng/mL)	E1/E2	
50 µL	Kalibrator F (4 ng/mL)	F1/F2	
50 µL	Kalibrator G (8 ng/mL)	G1/G2	
50 µL	Kontrolle CTR1 (≥ 1:16 verdünnt)	H1/H2	
50 µL	Kontrolle CTR2 (≥ 1:16 verdünnt)	A3/A4	
50 µL	Probe SPE (≥ 1:16 verdünnt)	in die restlichen Vertiefungen nach Bedarf pipettieren	
Mit Klebefolie die Vertiefungen dicht abdecken.			
<b>Proben-Inkubation mit Schütteln: 1 h bei 20°C - 25°C, 350 rpm</b>			
5x 300 µL	Absaugen und die Platte 5x mit je 300 µL Waschpuffer WB 1:20 / Vertiefung waschen.	In jede Vertiefung	
100 µL	Enzymkonjugat EC	In jede Vertiefung	
Mit Klebefolie die Vertiefungen dicht abdecken.			
<b>Inkubation mit Schütteln: 30 min bei 20°C - 25°C, 350 rpm</b>			
5x 300 µL	Absaugen und die Platte 5x mit je 300 µL Waschpuffer WB 1:20 / Vertiefung waschen.	In jede Vertiefung	
100 µL	Substrat S	In jede Vertiefung	
<b>Substrat S Inkubation: 15 Minuten im Dunklen bei 20°C - 25°C</b>			
100 µL	Stopplösung STP	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-Kontrolle muss 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 Kalibrators A **0,25** Einheiten nicht überschreiten, Kalibrator **G** sollte dagegen Extinktionen über **1,0** Einheiten erreichen. Proben, die höhere Extinktionen als der Kalibrator **G** 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-1-Konzentrationen:

Kalibrator	A	B	C	D	E	F	G
ng/ml	0	0,1	0,5	1	2	4	8
OD (450-620 nm)	0,012	0,043	0,189	0,381	0,771	1,596	2,748

- 1) Die Kalibrator-Konzentrationen (x-Achse) werden gegen die gemessene optische Dichte (y-Achse) aufgetragen.
- 2) 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.
- 3) Die **Multiplikation** des jeweiligen für die Proben berechneten **IGFBP-1-Gehaltes** mit dem entsprechenden **Verdünnungsfaktor** der Proben und Kontrollen ergibt die **IGFBP-1-Konzentration in ng/mL**.

### 10.2 Beispiel einer typischen Kalibrationskurve

Die exemplarischen Daten und die Kalibrationskurve in der Abbildung 1 können **nicht** für die Berechnung der Testergebnisse genutzt werden! Für jeden Test muss eine eigene Kalibrationskurve mitgeführt werden.

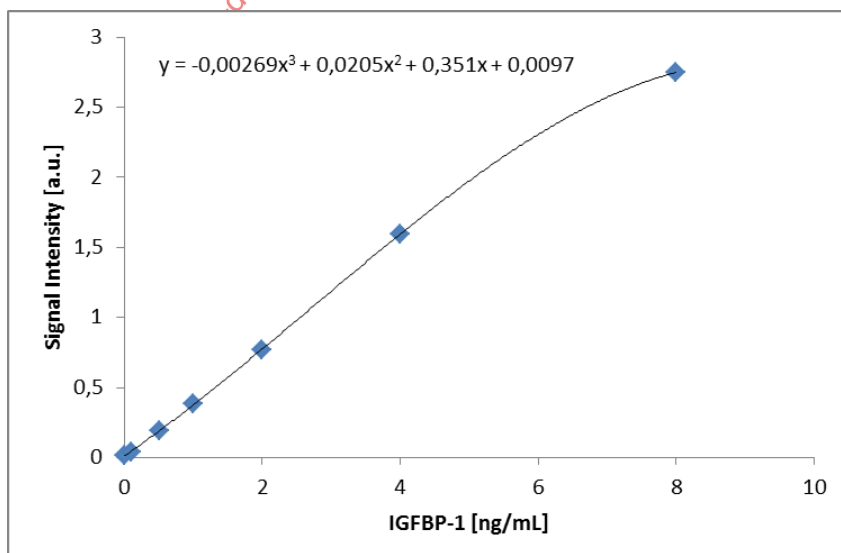


Abb. 1: Exemplarische Kalibrationskurve

### 10.3 Beispielhafte Berechnung der IGFBP-1-Konzentration

Probenverdünnung: 1:16

Gemessene Extinktion der Probe: 0,199

Ihr **Auswertungsprogramm** mit der entsprechenden Kurvenanpassung (hier: Polynom 3. Grades) die IGFBP-1-Konzentration der verdünnten Probe durch Auflösen der Gleichung aus Abb. 1 nach x. In diesem Fall ergibt sich eine IGFBP-1-Konzentration in der verdünnten Probe von:

$$y = -0,00269x^3 + 0,0205x^2 + 0,351x + 0,0097$$

$$0,199 = -0,00269x^3 + 0,0205x^2 + 0,351x + 0,0097$$

$$x = 0,5235$$

und unter Berücksichtigung des Verdünnungsfaktors (**1:16**) somit eine IGFBP-1-Konzentration in der unverdünnten Probe von:  $0,5235 \text{ ng/mL} \times 16 = 8,376 \text{ ng/mL}$

### 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

Der Mediagnost IGFBP-1 ELISA E01 basiert auf monoklonalen Maus-Antikörpern. Im Allgemeinen kann diese Technik durch heterophile Antikörper oder humane anti-Maus Antikörper in der Probe beeinflusst werden. Der Einfluss dieser Antikörper wird durch das Assay-Design reduziert, aber kann nicht vollständig ausgeschlossen werden. Des Weiteren sind bei der Interpretation der Ergebnisse die diagnostische Sensitivität und Spezifität der IGFBP-1 Konzentration zu berücksichtigen. Auch ist bei der Anwendung des Tests die Inkubationszeit zu berücksichtigen, dieser Test kann nicht als Schnelltest eingesetzt werden.

## 12 REFERENZWERTE

Die IGFBP-1 Konzentration in humanen Serumproben von 69 gesunden Probanden wurde mit dem Mediagnost E01 Kit gemessen. Es zeigten sich leichte geschlechtsspezifische Differenzen. Dabei lag die Konzentration aller Proben im Bereich von 0,23 ng/ml bis 17,94 ng/ml (s. Tabelle 1).

**Tabelle 1 IGFBP-1 Erwartungswerte in Serum gesunder Erwachsener.**

Geschlecht	Anzahl der Proben	Mittelwert [ng/ml]	Median [ng/ml]	Min. – Max.: [ng/ml]
weiblich	33	4,79	4,24	0,23 - 16,07
männlich	36	5,22	2,71	0,42 - 17,94
gesamt	69	5,01	2,77	0,23 - 17,94

## 13 ASSAY EIGENSCHAFTEN UND VALIDIERUNG

### 13.1 Sensitivität

Die **analytische Sensitivität** wurde durch Messung des Nullkalibrators (CAL-A) bestimmt. Dazu wurde die Signalintensität von CAL-A + 2SD anhand der Kalibrationskurve in eine IGFBP-1 Konzentration umgerechnet. In drei verschiedenen Assays wurden analytische Sensitivitäten von 0,03 bis 0,08 ng/mL mit einem Mittelwert von 0,055 ng/mL gemessen.

### 13.2 Spezifität

Das IGF/IGFBP-System besteht aus mehreren verwandten und homologen Proteinen. Um die Spezifität des Testsystems zu prüfen, wurde die Kreuzreaktivität des Mediagnost E01 IGFBP-1 ELISA zu den zwei IGFBPs, die am häufigsten im zirkulierenden Blut auftreten, getestet. Tabelle 2 fasst die Ergebnisse zusammen.

**Tabelle 2** Kreuzreaktivität gegenüber verwandten IGFBPs. 500 ng des angegebenen IGFBP wurden zu 1 mL Verdünnungspuffer DIL gegeben und als Probe gemessen. Dargestellt ist die gemessene Konzentration und die relative Kreuzreaktivität.

	[ng/ml]	Relative Kreuzreaktivität [%]
IGFBP-2	0,0071	0,00142
IGFBP-3	0,0033	0,00066

### 13.3 Präzision

#### Intra-Assay-Varianz

Serumproben wurden bis zu 20-mal in demselben Assay gemessen. Der mittlere gemessene Variationskoeffizient (VK) der gemessenen Werte betrug 6,52 % (n = 6). Beispielhafte Daten sind in Tabelle 3 gezeigt.

**Tabelle 3** Intra-Assay-Variation.

	Probe 1	Probe 2	Probe 3
Mittelwert [ng/mL]	4,25	12,21	55,17
SA [ng/mL]	0,24	0,75	2,38
VK [%]	5,59	6,11	4,32
Anzahl [n]	20	20	20

SA: Standardabweichung, VK= Variationskoeffizient,

#### Inter-Assay-Varianz

Serumproben wurden in unabhängigen Assays gemessen. Im Durchschnitt betrug der Variationskoeffizient 6,05% (SA 0,46). Beispielhafte Ergebnisse sind in Tabelle 4 gezeigt.

**Tabelle 4** Inter-Assay Variation

	Probe 1	Probe 2	Probe 3	Probe 4	Probe 5	Probe 6
Mittelwert [ng/mL]	12,50	8,52	6,42	18,62	4,43	9,01
SA [ng/mL]	0,17	0,24	0,25	0,52	0,18	0,18
VK [%]	1,33	2,80	3,90	2,80	4,11	2,05
Anzahl [n]	5	5	5	5	5	5

SA: Standardabweichung, VK= Variationskoeffizient,

### 13.4 Linearität

Die Linearität der Probenverdünnung ist in Abbildung 2 gezeigt. Exemplarisch wurden drei Serumproben 1:5 bis 1:512 verdünnt und die IGFBP-1-Konzentration in jeder Verdünnung gemessen. Die Messwerte wurden mittels linearer Regression analysiert und zeigten eine gute Linearität mit einem Bestimmtheitsmaß von > 0,98 für jede der Proben.

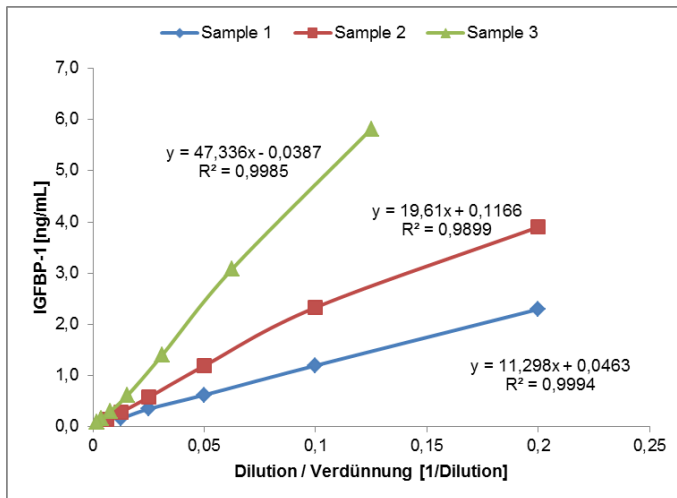


Abbildung 2 Linearität der Probenverdünnung

### 13.5 Wiederfindung und Richtigkeit

Natives IGFBP-1 (4,5 ng/mL) wurde zu zwei Humansenen gegeben und im Vergleich zu der gleichen Menge an IGFBP-1 in Puffer quantifiziert. Die durchschnittliche Wiederfindung betrug 82%. Des Weiteren wurde die Wiederfindung von rekombinantem IGFBP-1 in angereicherten Proben (45 ng/mL) im Vergleich zu angereichertem Puffer bestimmt. Dabei betrug die Wiederfindung im Mittel 94%.

### 13.6 Rückführbarkeit/ Assay Kalibration

Eine IGFBP-1 Referenzpräparation ist nicht verfügbar. Der Mediagnost IGFBP-1 ELISA E01 wurde gegen gereinigtes, natives humanes IGFBP-1 kalibriert (vgl. Wiederfindung). Die Rückführbarkeit / Chargenkonstanz wird durch ein Panel an verschiedenen Serumproben sichergestellt.

### 13.7 Interferenz

Interferenz von Hämoglobin, Bilirubin und Triglyceride wurde durch Zugabe der angegebenen Menge dieser Substanzen zu humanem Serum getestet. Zum Vergleich wurde die gleiche Menge an Puffer ohne Substanz auch dem Serum zugesetzt, und die relative Wiederfindung berechnet. Tabelle 5 zeigt, dass im Durchschnitt weder Hämoglobin, Bilirubin noch Triglyceride einen signifikanten Einfluss auf die Messung von IGFBP-1 im Humanserum ausüben. Aber generell sollte der Einsatz von hämolytischen, ikterischen oder lipämischen Proben vermieden werden.

**Tabelle 5** Interferenz von Hämoglobin, Bilirubin und Triglyceriden bei der IGFBP-1-Messung in Humanserum. Gezeigt wird die relative Wiederfindung von IGFBP-1, gemessen in einer Humanserumprobe nach Zugabe der angegebenen Menge an möglicherweise interferierenden Substanzen im Vergleich zu Serumproben in die nur Puffer zugegeben wurde.

Wiederfindung	Triglyceride	Bilirubin	Hämoglobin
[%]	100 mg/mL	100 µg/mL	5 mg/mL
Probe 1	142	72	122
Probe 2	125	46	119
Probe 3	82	113	97
Im Mittel	116	77	113

## 14 VERGLEICHSTUDIEN

Mediagnost IGFBP-1 E01 wurde mit zwei anderen kommerziell erhältlichen Assays verglichen. Die Beziehung zwischen den Testsystemen und dem Mediagnost Test wurde mittels Passing-Bablok Regression sowie linearer Regression analysiert. Die Ergebnisse sind in Tabelle 6 dargestellt.

**Tabelle 6 Testvergleich**

	Probenzahl [n]	Passing Bablok Regression	Lineare Regression Regressionskoeffizient
Mitbewerber A	36	$y = -0,99 + 0,23x$ (RSD 2,97)	0,89
Mitbewerber B	34	$y = 0,1 + 1,17x$ (RSD 0,84)	0,84

RSD = Reststandardabweichung

Die Analyse zeigt, dass der Mediagnost Test zu beiden Tests der Mitbewerber eine gute Korrelation aufweist. Im Hinblick auf die gemessenen Konzentrationen besteht insbesondere zum Mitbewerber A ein signifikanter Unterschied. Dies deutet auf Unterschiede in der Kalibration der Testsysteme bzw. unterschiedliche Bindungseigenschaften der Antikörper hin.

Exemplary Version-do not use for assay accomplishment / Exemplarische Version -nicht für Assaydurchführung verwenden



# Gebrauchsinformation für wissenschaftliche Anwendungen

## 15 WISSENSCHAFTLICHE ANWENDUNGEN

Der Mediagnost IGFBP-1 ELISA E01 ist geeignet um IGFBP-1 in humanem Serum und Plasma sowie in weiteren Körperflüssigkeiten, wie z.B. Amnionflüssigkeit, Muttermilch, Speichel oder Urin nachzuweisen. In Zellkulturmedien kann mit ihm ebenfalls die Konzentration von IGFBP-1 bestimmt werden.

### 15.1 Geeignete Proben für Forschungszwecke

**Serum, Plasma, Urin, Liquor, Speichel, Bronchiallavage, Sputum, Amnionflüssigkeit, Zellkulturüberstand** verschiedener humaner **Zelllinien**.

Die IGFBP-1 Konzentrationen in diesen Probenmatrices können stark schwanken, daher muss die optimale Verdünnung im Einzelfall vom Anwender ausgetestet werden.

Gegebenenfalls kann natürlich, je nach erwarteten IGFBP-1-Werten, geringer oder stärker in **Verdünnungspuffer DIL** verdünnt werden. Die IGFBP-1 Konzentrationen in anderen humanen Körperflüssigkeiten und in Kulturüberständen können stark von den Serumwerten abweichen. Beispielhafte Messwerte sowie die jeweils empfohlenen Verdünnungen sind in der Tabelle 7 dargestellt.

**Tabelle 7** Ergebnisse der Matrix-Tests Gereinigtes natives IGFBP-1 wurde zu den jeweils verdünnten Proben gegeben. Die so angereicherten Proben wurden ohne weitere Verdünnung gemessen. Dargestellt ist die relative Wiederfindung vom zugesetzten IGFBP-1 des in angereichertem Verdünnungspuffer gemessenen Wertes.

Proben	Erwartete IGFBP-1 [ng/ml]	Wiederfindung IGFBP-1 [%]	Empfohlene Verdünnung
Amnionflüssigkeit	8140 - 16450	n.b.	≥ 1:5000 bis zu 1:25000
Muttermilch	5,12	96	1:10
Urin	0,07	90	1:2,5
Speichel	< 0,02	63	≥ 1:2,5
Bronchiallavage	< 0,02	100	1:2,5
Sputum	< 0,02	100	1:20
Zellkulturmedium	---	94	≥ 1:5

n.b.= nicht bestimmt

### 15.2 Kreuzreaktion

Die Kreuzreaktivitäten von mehreren handelsüblichen tierischen Seren wurden in diesem Assay getestet. In den Seren der folgenden Arten wurde **KEIN SIGNAL** detektiert: Ratte, Maus, Meerschweinchen, Kaninchen, Schwein, Schaf, Ziege, Rind, Pferd, Hund, Katze, Huhn oder Esel.

# ENGLISH - Instructions for use

## TABLE OF CONTENTS

ENGLISH - Instructions for use .....	19
1 INTENDED USE.....	19
2 INTRODUCTION.....	19
3 ASSAY PRINCIPLE.....	20
4 WARNINGS AND PRECAUTIONS.....	21
5 SAMPLES .....	22
6 MATERIALS .....	23
7 TECHNICAL NOTES .....	24
8 ASSAY PROCEDURE .....	25
9 QUALITY CONTROL.....	26
10 EVALUATION OF RESULTS .....	26
11 LIMITATION OF PROCEDURE.....	27
12 REFERENCE VALUES.....	27
13 PERFORMANCE CHARACTERISTICS.....	28
14 ASSAY COMPARISON .....	30
15 SCIENTIFIC APPLICATION .....	31
16 LITREATURE / LITERATUR.....	32
17 INTERNATIONAL ASSAY PROCEDURE.....	35
18 ASSAY PROCEDURE.....	36

Exemplary Version-do not use for assay accomplishment / Exemplarische Version nicht für Assaydurchführung verwenden

## ENGLISH - Instructions for use

<b>IGFBP-1 ELISA, E01</b>	<b>96 Determinations</b>
<b>CE</b>	DE/CA40/00809/23
Principle of the test	Enzyme-linked Immunoassay
Duration (incubation period)	1.75 h
Antibodies	specific, monoclonal antibodies
Buffer	Ready for use and 20fold concentrate
Calibrators	7 single calibrators: 0 - 8 ng/mL, lyophilized, native human IGFBP-1
Assay Range	0 – 128 ng/mL
Control	2 controls, lyophilised
Sample	human serum / plasma
Required sample volume	20 µL
Sample dilution	≥ 1:16
Analytical sensitivity	< 0.1 ng/mL
Intra- / Inter-Assay Variance	Ø < 10%

### 1 INTENDED USE

This enzyme immunoassay kit is suited for measuring IGFBP-1 in human serum and plasma.

### 2 INTRODUCTION

The Insulin-like Growth Factors I and – II are free in body fluids and tissues but are bound to specific binding proteins. Until today seven different binding proteins (IGFBP-1 to –7) can be differentiated additionally several IGFBP-related proteins have also been detected. Bioavailability of IGF is regulated by these IGFBPs or their proteolytic cleavage which reduces affinity to IGF. The IGFBPs as well as their proteolytic fragments can also exert IGF-independent effects, like influencing cell migration or proliferation.

IGFBP-1 (Placental Protein 12) consists of 234 amino acids and has a molecular weight of approximately 25kDa. The coding DNA region is located on chromosome 7 [1, 2]. IGFBP-1 is mainly synthesized by foetal and adult liver tissue and decidual endometrium. Intensity of Expression varies enduring menstruation with a maximal expression in the late secretory phase [3, 4]. Further IGFBP-1 expression seems to be regulated by Insulin concentration, with Insulin inhibiting the expression. Insulin regulation results in diurnal fluctuations of up to factor 10 [5]. IGFBP-1 is posttranslational modified by phosphorylation of serine residues 101, 119 and 169. Phosphorylation has physiological relevance as it increases affinity of IGFBP-1 to IGF. In adult humans phosphorylated IGFBP-1 of the liver is the predominant form in circulation. IGFBP-1 produced by endometrial tissue is significantly less phosphorylated than the liver originated form [6].

In pregnancy IGFBP-1 maternal serum concentration increases significantly with maximal values in the second trimester or 22-23 week of gestation (75.8 ng/ml) [5] and decreases slowly until term. IGFBP-1 concentration is not only increased in maternal but also in foetal serum, extremely high concentrations are found in amniotic fluid. Here concentration can reach more than the 1000-fold of serum values [7]. Long-term changes of serum IGFBP-1 concentration

can also be found in amniotic fluid. After birth the IGFBP-1 level of the child decreases until it reaches the low steady-state level of puberty and adulthood [8, 9].

Short term IGFBP-1 serum concentration is strongly influenced by nutrition level and therewith by insulin. Decreasing IGFBP-1 levels can be found enduring fasting or in diabetes; IGFBP-1 levels increase in case of intensive exercises [10-12].

Relevance of serum and amnion IGFBP-1 in diagnostics has been investigated in several areas and a potential diagnostic value was shown for:

### **Energy metabolism**

Based on the influence of Insulin on IGFBP-1 serum concentrations IGFBP-1 is said to be a possible marker for insulin resistance.

In a small study Maddux et al were able to demonstrate with 23 non-diabetic patients, that IGFBP-1 serum concentration correlated very well with Glucose-uptake rate, even better than the HOMA index does [13].

### **Pregnancy**

In pregnancy IGFBP-1 concentrations could be used for different applications. Specially, a potential diagnostic value was shown for membrane rupture and intra uterine growth disturbances. There are also data that IGFBP-1 in maternal serum might be a marker for trisomy 18, but here the IGFBP-1/IGFBP-2 ratio seems to be of value [14]

A significant difference in IGFBP-1 serum concentration was detected between healthy pregnant and diabetic and pre-eclamptic women (102,8 vs. 203,71 or 281,09 ng/ml respectively) [15].

Also, the evaluation of IGFBP-1 as marker for membrane rupture showed a high specificity (97%) and sensitivity (75%) of IGFBP-1 in vaginal/cervical secrets. In case of intact membrane IGFBP-1 concentration was < 90ng/ml in the secretion. Enduring 8 hours after spontaneous or induced membrane rupture IGFBP-1 values increased significantly with a median concentration of 1900 ng/ml. In this study IGFBP-1 concentrations of >100 ng/ml were set as threshold for detection of amnion fluid and therewith diagnosis of membrane rupture [16]. A positive predictive value of 97% indicates that IGFBP-1 is a suitable marker for premature membrane rupture [17].

## **3 ASSAY PRINCIPLE**

The Mediagnost ELISA for IGFBP-1 E01 is a so-called Sandwich-Assay. It utilizes two specific antibodies of high affinity. First the IGFBP-1 in the sample binds to the immobilized antibody on the microtiter plate. In the following step, the anti-IGFBP-1-Antibody binds in turn to the immobilised IGFBP-1. This is biotinylated and allows the binding of a streptavidin-peroxidase enzyme conjugate.

Subsequently, the peroxidase catalyzes an enzymatic reaction resulting in a blue coloration. The intensity of the blue color depends on the IGFBP-1 content of the sample. After the reaction has stopped by the addition of stop solution the color intensity (then yellow) is quantified by measuring the absorption and converted into the IGFBP-1 concentration using a calibration curve.

## 4 WARNINGS AND PRECAUTIONS

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

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

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: **Controls CTR1 / CTR2, Calibrators A-G**

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.

H- and P statements refer to undiluted substances and are for information purpose.

#### Reagents DET, EC, DIL, WB

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 (S)

The TMB-Substrate (S) contains 3,3',5,5' Tetramethylbenzidine (<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 (STP)

The Stop solution contains 0.2 M acid sulphur acid (H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>)

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

Beside serum also EDTA- and Heparin Plasma can be used

### 5.2 Specimen collection

Use standard venipuncture for the blood sampling. Haemolytic reactions have to be avoided. For blood sampling diurnal variations specially influenced by nutrition should be considered [5].

### 5.3 Required sample volume: 20 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. 3

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

### 5.5 Interference

Triglyceride, bilirubin and hemoglobin in the sample do not interfere to a concentration of 100 mg/mL, 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:  $\geq 1:16$  with Dilution Buffer **DIL**
- Pipette **300 µL** Dilution Buffer **DIL** (red colored) in PE-/PP-Tubes (application of a multi-stepper is recommended in larger series), add **20 µL Serum- or Plasma** (dilution factor 16). After mixing use **50 µL** diluted solution **within 1 hour per determination** in the assay.

## 6 MATERIALS

### 6.1 Materials provided

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

<b>MTP</b>	<b>Microtiter plate</b> , ready for use, coated with mouse IGFBP-1-antibody. Wells are separately breakable.	<b>(8x12) wells</b>
<b>A-G</b>	<b>Calibrators</b> , lyophilized, (native human IGFBP-1), concentrations are given on vial labels and on the QC-certificate.	<b>7 x 500 µL</b>
<b>CTR1</b>	<b>Control 1</b> , lyophilised, (human serum), concentration is given on the QC-certificate.	<b>1 x 250 µL</b>
<b>CTR2</b>	<b>Control 2</b> , lyophilised, (human serum), concentration is given on the QC-certificate.	<b>1 x 250 µL</b>
<b>DET</b>	<b>Antibody Conjugate</b> , ready for use, contains mouse biotinylated anti-hIGFBP-1 antibody.	<b>1 x 6 mL</b>
<b>EC</b>	<b>Enzyme Conjugate</b> , contains HRP (Horseradish-Peroxidase)-labeled Streptavidin.	<b>1 x 12 mL</b>
<b>DIL</b>	<b>Dilution Buffer</b> , ready for use, <b>Please shake before use!</b>	<b>1x 125 mL</b>
<b>WB</b>	<b>Washing Buffer</b> , 20-fold concentrated solution	<b>1 x 50 mL</b>
<b>S</b>	<b>Substrate</b> , ready for use, horseradish-peroxidase-(HRP) substrate, stabilised Tetramethylbenzidine.	<b>1 x 12 mL</b>
<b>STP</b>	<b>Stop Solution</b> , ready for use, 0.2 M sulphuric acid.	<b>1 x 12 mL</b>
-	<b>Sealing Tape</b> , for covering the <b>microtiter plate</b> .	<b>2 x</b>
	<b>Instructions for use</b>	<b>1 x</b>
--	<b>Quality Control Certificate</b>	<b>1 x</b>

### 6.2 Materials required, but not provided

- Distilled (Aqua destillata) or deionized water for dilution of the Washing Buffer **WB (A. dest.)**, 950 mL.
- Precision pipettes and multichannel pipettes with disposable plastic tips
- Polyethylene PE/Polypropylene PP tubes for dilution of samples
- Vortex-mixer
- Microtiter plate shaker (350 rpm)
- Microtiter plate washer (recommended)
- Micro plate reader ("ELISA-Reader") with filter for 450 and  $\geq 590$  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-G** and Controls **CTR1** and **CTR2** must be stored at -20°C. For further use, thaw quickly but gently (avoid temperature increase above room temperature and avoid excessive vortexing). Up to 3 of the freeze-thaw cycles did not influence the assay. The 1:20 diluted Washing Buffer **WB** is stable for **4 weeks** at **2-8°C**

### Preparation of reagents

Bring all reagents to room temperature (20°C - 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 – G** and Controls **CTR1** and **CTR2** are reconstituted with the Dilution Buffer **DIL**. It is recommended to keep reconstituted reagents at room temperature for 15 minutes and then to mix them thoroughly but gently (no foam should result) with a Vortex mixer.

### Dilution

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

### Assay Procedure

When performing the assay, Calibrators **A-G**, Control **CTR1** and **CTR2** and the samples should be pipette as fast as possible (e.g. <15 minutes). To avoid distortions due to differences in incubation times, Antibody Conjugate **DET**, Enzyme Conjugate **EC** as well as the succeeding Substrate **S** should be added to the plate in the same order and in the same time interval as the samples. Stop Solution **STP** should be added to the plate in the same order as Substrate **S**.

All determinations (Calibrators **A-G**, Controls **CTR1** and **CTR2** and samples) should be assayed in duplicate. For optimal results, accurate pipetting and adherence to the protocol are recommended.

### Incubation

**Incubation at room temperature means: Incubation at 20 - 25°C.** The Substrate **S**, stabilised Tetramethylbencidine, is photosensitive—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 **WB** 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
<b>A-G</b>	<b>Calibrators</b>	in <b>500 µL</b> Dilution Buffer <b>DIL</b>	-
<b>CTR1</b>	<b>Control 1</b>	in <b>250 µL</b> Dilution Buffer <b>DIL</b>	<b>≥ 1:16</b> with <b>DIL</b>
<b>CTR2</b>	<b>Control 2</b>	in <b>250 µL</b> Dilution Buffer <b>DIL</b>	<b>≥ 1:16</b> with <b>DIL</b>
<b>WB</b>	<b>Washing Buffer 20x Concentrate</b>	-	<b>1:20</b> with <b>Aqua dest.</b> → <b>WB 1:20</b>
<b>Sample dilution:</b> with Dilution Buffer <b>DIL ≥ 1:16</b>			
Before assay procedure bring all reagents to room temperature <b>20-25°C</b> .			
<b>Assay Procedure in Double Determination:</b>			
Pipette	Reagents	Position	
50 µL	Antibody Conjugate <b>DET</b>	Pipette in <b>all</b> required number of wells	
50 µL	Calibrator <b>A (0 ng/mL)</b>	A1/A2	
50 µL	Calibrator <b>B (0.1 ng/mL)</b>	B1/B2	
50 µL	Calibrator <b>C (0.5 ng/mL)</b>	C1/C2	
50 µL	Calibrator <b>D (1 ng/mL)</b>	D1/D2	
50 µL	Calibrator <b>E (2 ng/mL)</b>	E1/E2	
50 µL	Calibrator <b>F (4 ng/mL)</b>	F1/F2	
50 µL	Calibrator <b>G (8 ng/mL)</b>	G1/G2	
50 µL	Control <b>CTR1 (≥ 1:16</b> diluted)	H1/G2	
50 µL	Control <b>CTR2 (≥ 1:16</b> diluted)	A3/A4	
50 µL	Sample <b>SPE (≥ 1:16</b> diluted)	in the rest of the wells according the requirements	
Cover the wells with the sealing tape.			
<b>Sample Incubation with Shaking: 1 h at 20°C - 25°C, 350 rpm</b>			
5 x 300 µL	Aspirate the contents of the wells and <b>wash</b> 5 x with 300 µL each Washing Buffer <b>WB 1:20</b> / well	In each well	
100 µL	Enzyme Conjugate <b>EC</b>	In each well	
Cover the wells with the sealing tape.			
<b>Incubation with Shaking: 30 Minutes at 20°C - 25°C, 350 rpm</b>			
5 x 300 µL	Aspirate the contents of the wells and <b>wash</b> 5 x with 300 µL each Washing Buffer <b>WB 1:20</b> / well	In each well	
100 µL	Substrate <b>S</b>	In each well	
<b>Incubation: 15 Minutes in the Dark at 20°C - 25°C</b>			
100 µL	Stop Solution <b>STP</b>	In each well	
Measure the absorbance within <b>30 min</b> at <b>450 nm</b> with <b>≥ 590 nm</b> 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 Calibrator A should be below 0.25, and the absorbance of Calibrator G should be above 1.00. Samples, which yield higher absorbance values than Calibrator G, 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-1

Calibrator	A	B	C	D	E	F	G
ng/ml	0	0.1	0.5	1	2	4	8
OD (450-620 nm)	0.012	0.043	0.189	0.381	0.771	1.596	2.748

- 1) Plot the calibrator concentrations on the x-axis versus the mean value of the absorbance of the calibrators on the y-axis.
- 2) 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).
- 3) The IGFBP-1 concentration in ng/mL of the samples and controls 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. The exemplary shown calibration curve in Figure 1 **cannot** be used for calculation of your test results. You have to establish a calibration curve for each test you conduct!

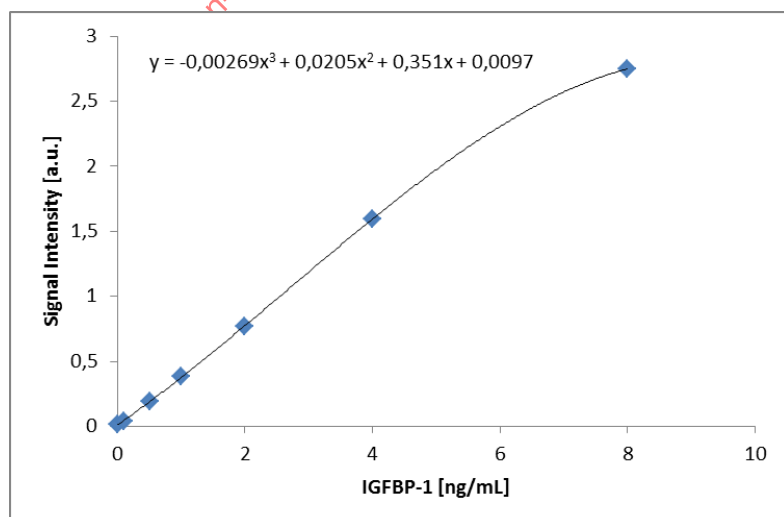


Figure 1 Exemplary calibration curve

### 10.3 Exemplary calculation of IGFBP-1 concentrations

Sample dilution: 1:16

Measured extinction of your sample: 0.199

Your **measurement program** will calculate the IGFBP-1 concentration of the diluted sample automatically. You only have to determine the most suitable curve fit (here: polynomial 3<sup>rd</sup> degree). In this exemplary case the following equation is solved by the program to calculate the IGFBP-1 concentration in the sample:

$$y = -0.00269x^3 + 0.0205x^2 + 0,351x + 0.0097$$

$$0.199 = -0.00269x^3 + 0.0205x^2 + 0.351x + 0.0097$$

$$x = 0.5235$$

If the dilution factor (**1:16**) is taken into account the IGFBP-1 concentration of the undiluted sample is  $0.5235 \text{ ng/mL} \times 16 = 8.376 \text{ ng/mL}$

### 10.4 Interpretation of results

The test results should not be the only base for therapeutic decisions. The results should be interpreted in regard to anamnesis, further clinical observations and results of other diagnostic investigations. Further, it is recommended to establish reference and cut-off values corresponding to the relevant group of patients for each laboratory.

## 11 LIMITATION OF PROCEDURE

The Mediagnost IGFBP-1 ELISA, E01 is based on murine antibodies. Generally, this technique is sensible to heterophilic antibodies as well as to human anti mouse antibodies in the sample. The influence of these antibodies is reduced by assay design, but cannot be excluded completely. Further, for interpretation of IGFBP-1 concentrations diagnostic sensitivity and specificity must be taken into account. Also test duration has to be considered, this test system is not suitable for point-of care.

## 12 REFERENCE VALUES

Concentrations of IGFBP-1 in human sera of 69 healthy adult donors were determined with the Mediagnost ELISA E01. Slight gender dependent differences were found, the concentrations of all samples varied from minimal 0.23 ng/ml to maximal 17.94 ng/ml (see table 1).

**Table 1 IGFBP-1** Expectation values in sera of healthy adults (measured values in **ng/ml**)

Gender	No. of Samples	Average value	Median	Min. – Max.:
female	33	4.79	4.24	0.23 – 16.07
male	36	5.22	2.71	0.42 – 17.94
total	69	5.01	2,77	0.23 – 17.94

## 13 PERFORMANCE CHARACTERISTICS

### 13.1 Sensitivity

The analytical sensitivity was determined by measuring the null calibration (CAL-A) and calculating the corresponding concentration of the signal intensity of the CAL-A + 2SD. In three different assays analytical sensitivities from 0.03 to 0.08 ng/mL were measured with an average value of 0.055 ng/mL

### 13.2 Specificity

The IGF/IGFBP-System consists of several related and homologous proteins. Thus, the crossreactivity of the Mediagnost E01 IGFBP-1 ELISA to other IGFBPs was tested exemplarily with the two IGFBPs most abundant in circulation. Table 2 summarizes the results.

**Table 2 Cross reactivity** to related IGFBPs. 500 ng of the indicated IGFBP were added to 1mL dilution buffer and measured as a sample. Shown is the concentration measured and the relative cross reactivity.

	Concentration [ng/ml]	relative cross reactivity [%]
IGFBP-2	0.0071	0.00142
IGFBP-3	0.0033	0.00066

### 13.3 Reproducibility and Precision

#### Intra-Assay-Variation

Serum samples were measured up to 20 times in the same assay and the coefficient was calculated based on the recalculated IGFBP-1 concentration. Exemplary data are shown in Table 3. The mean measured coefficient of variation (CV) is 6.52% (n =6).

**Table 3** Intra-Assay Variation

	Sample 1	Sample 2	Sample 3
Mean [ng/mL]	4.25	12.21	55.17
SD [ng/mL]	0.24	0.75	2.38
CV [%]	5.59	6.11	4.32
Number [n]	20	20	20

#### Inter-Assay Variance

Serum samples were measured in independent assays. On average the coefficient of variation was 6.05% (SD 0.46). Exemplary results are shown in table 4.

**Table 4:** Inter-Assay Variation

	Sample 1	Sample 2	Sample 3	Sample 4	Sample 5	Sample 6
Mean [ng/mL]	12.50	8.52	6.42	18.62	4.43	9.01
SD [ng/mL]	0.17	0.24	0.25	0.52	0.18	0.18
CV [%]	1.33	2.80	3.90	2.80	4.11	2.05
Number [n]	5	5	5	5	5	5

### 13.4 Linearity

The linearity of sample dilution is shown in Figure 1. Exemplarily three serum samples were diluted 1:5 up to 1:512 and the IGFBP-1 concentration was measured within each dilution. The results were analysed by linear regression analysis and revealed coefficients of determination of >0.98 for each of the samples.

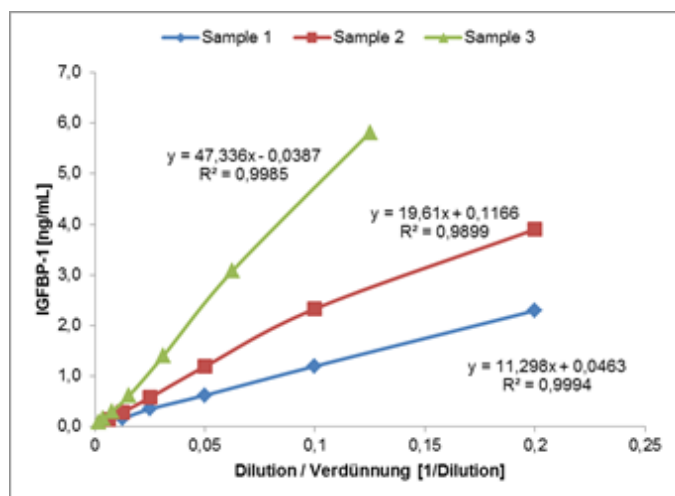


Figure 2 Linearity of the sample dilution

### 13.5 Recovery

Native IGFBP-1 (4.5 ng/mL) was added to human serum and quantified in comparison to the same amount of IGFBP-1 in buffer. The mean recovery detected was 82%. Also, the IGFBP-1 content of samples enriched with recombinant IGFBP-1 was measured and recovery calculated in comparison to enriched buffer (45 ng/mL) with a mean recovery of 94%.

### 13.6 Trueness / Assay calibration

There is no IGFBP-1 reference preparation available. Mediagnost IGFBP-1 ELISA E01 was calibrated against purified, native human IGFBP-1. Traceability / lot-to-lot consistency is accomplished by a panel of different serum samples.

### 13.7 Interference

Interference of haemoglobin, bilirubin and triglycerides was tested by adding the indicated amount of these substances to human serum containing IGFBP-1. For comparison the same amount of buffer without any substance was also added to the serum and the relative recovery rate was calculated. Table 5 shows that on average neither haemoglobin, bilirubin nor triglycerides exert significant influence on the measurement of IGFBP-1 in human serum. But generally, measurement of IGFBP-1 in haemolytic, icteric or lipaemic samples should be avoided.

**Table 5** Interference of haemoglobin, bilirubin and triglycerides on IGFBP-1 measurement in human serum. Shown is the relative recovery of IGFBP-1 measured in human serum samples after adding the indicated amount of possibly interfering substances in comparison to serum samples only buffer was added to.

Recovery [%]	Triglyceride 100 mg/mL	Bilirubin 100 µg/mL	Haemoglobin 5 mg/mL
Sample 1	142	72	122
Sample 2	125	46	119
Sample 3	82	113	97
Mean	116	77	113

## 14 ASSAY COMPARISON

Mediagnost IGFBP-1 E01 was compared with two competitor assays. The correlation of these test systems and the Mediagnost assay was evaluated by Passing-Bablok regression and linear regression. The results are shown in Table 6.

**Table 6 Assay comparison**

	Sample [n]	Passing Bablok Regression	Linear Regression coefficient of regression
<b>Competitor A</b>	36	$y = -0.99 + 0.3x$ (RSD 2.97)	0.89
<b>Competitor B</b>	34	$y = 0.1 + 1.17x$ (RSD 0.84)	0.84

RSD= residual standard deviation

The analysis reveals that the Mediagnost test correlates well with both of the competitive tests. But regarding the absolute concentrations measured, there is a significant difference especially in comparison to competitor A. This indicates differences in calibration or binding properties of the antibodies used.

Exemplary Version-do not use for assay accomplishment / Exemplarische Version -nicht für Assaydurchführung verwenden

# Instruction for scientific application

## 15 SCIENTIFIC APPLICATION

This enzyme immunoassay kit is suited for measuring IGFBP-1 in human serum or Heparin and EDTA plasma or in other body fluids, for example amnion fluid, mother's milk, urine or saliva, as for scientific purposes. It is also suited to quantitate IGFBP-1 in cell culture media.

### 15.1 Samples suitable for scientific application

Where required, depending on the expected IGFBP-1-values, the dilution with Dilution Buffer DIL can be higher or lower (at least however 1:2.5). The IGFBP-1 concentration may be completely variable in different body fluids. Examples as well as dilution recommendations are given in table 7.

**Table 7** Results of matrix tests. Purified native IGFBP-1 was added to the respectively diluted samples. Enriched samples were measured without further dilution. Shown is the relative recovery of added IGFBP-1 of the value measured in enriched Dilution Buffer.

Samples	Expected IGFBP-1 [ng/ml]	Recovery IGFBP-1 [%]	Recommended Dilution
Amniotic Fluid	8.140 - 16.450	n.d.	≥1:5000 up to 1:25000
Mother's milk	5.12	96	1:10
Urine	0.07	90	1:2.5
Saliva	< 0.02	63	≥1:2.5
Bronchial Lavage	< 0.02	100	1:2.5
Sputum	< 0.02	100	1:20
Cell Culture Media	---	94	≥1:5

n.d.= not determined

### 15.2 Species cross reactivity

Serum of the cited species was diluted and used as sample in this assay system.

**No signal** was detected in serum of the following species:

Rat, mouse, guinea pig, rabbit, pig, sheep, goat, cattle, horse, dog, cat, chicken or donkey.

## 16 LITREATURE / LITERATUR

### Literature

1. Rechler, M.M., *Insulin-like growth factor binding proteins*. Vitam Horm, 1993. **47**: p. 1-114.
2. Allander, S.V., et al., *Structure and chromosomal localization of human insulin-like growth factor-binding protein genes*. Growth Regul, 1993. **3**(1): p. 3-5.
3. Rutanen, E.M., et al., *Synthesis of placental protein 12 by human decidua*. Endocrinology, 1985. **116**(4): p. 1304-9.
4. Julkunen, M., et al., *Identification by hybridization histochemistry of human endometrial cells expressing mRNAs encoding a uterine beta-lactoglobulin homologue and insulin-like growth factor-binding protein-1*. Mol Endocrinol, 1990. **4**(5): p. 700-7.
5. Khosravi, J., et al., *Immunoassay of serine-phosphorylated isoform of insulin-like growth factor (IGF) binding protein (IGFBP)-1*. Clin Biochem, 2007. **40**(1-2): p. 86-93.
6. Westwood, M., *Role of insulin-like growth factor binding protein 1 in human pregnancy*. Rev Reprod, 1999. **4**(3): p. 160-7.
7. Rutanen, E.M., H. Bohn, and M. SeVPala, *Radioimmunoassay of placental protein 12: levels in amniotic fluid, cord blood, and serum of healthy adults, pregnant women, and patients with trophoblastic disease*. Am J Obstet Gynecol, 1982. **144**(4): p. 460-3.
8. Drop, S.L., et al., *Immunoassay of a somatomedin-binding protein from human amniotic fluid: levels in fetal, neonatal, and adult sera*. J Clin Endocrinol Metab, 1984. **59**(5): p. 908-15.
9. Hall, K., G. Lundin, and G. Pova, *Serum levels of the low molecular weight form of insulin-like growth factor binding protein in healthy subjects and patients with growth hormone deficiency, acromegaly and anorexia nervosa*. Acta Endocrinol (Copenh), 1988. **118**(3): p. 321-6.
10. Busby, W.H., D.K. Snyder, and D.R. Clemmons, *Radioimmunoassay of a 26,000-dalton plasma insulin-like growth factor-binding protein: control by nutritional variables*. J Clin Endocrinol Metab, 1988. **67**(6): p. 1225-30.
11. Brismar, K., et al., *Insulin regulates the 35 kDa IGF binding protein in patients with diabetes mellitus*. J Endocrinol Invest, 1988. **11**(8): p. 599-602.
12. Suikkari, A.M., et al., *Prolonged exercise increases serum insulin-like growth factor-binding protein concentrations*. J Clin Endocrinol Metab, 1989. **68**(1): p. 141-4.
13. Maddux, B.A., et al., *IGF-binding protein-1 levels are related to insulin-mediated glucose disposal and are a potential serum marker of insulin resistance*. Diabetes Care, 2006. **29**(7): p. 1535-7.
14. Miell, J.P., et al., *The maternal insulin-like growth factor (IGF) and IGF-binding protein response to trisomic pregnancy during the first trimester: a possible diagnostic tool for trisomy 18 pregnancies*. J Clin Endocrinol Metab, 1997. **82**(1): p. 287-92.
15. Than, G.N., et al., *Levels of placenta-specific tissue protein 12 (VP12) in serum during normal pregnancy and in patients with trophoblastic tumour*. Arch Gynecol, 1983. **234**(1): p. 39-46.
16. Rutanen, E.M., F. Pekonen, and T. Karkkainen, *Measurement of insulin-like growth factor binding protein-1 in cervical/vaginal secretions: comparison with the ROM-check Membrane Immunoassay in the diagnosis of ruptured fetal membranes*. Clin Chim Acta, 1993. **214**(1): p. 73-81.
17. Martinez de Tejada, B., et al., *Can we improve the diagnosis of rupture of membranes? The value of insulin-like growth factor binding protein-1*. Bjog, 2006. **113**(9): p. 1096-9.



Page is intentionally blank

Exemplary Version-do not use for assay accomplishment / Exemplarische Version -nicht für Assaydurchführung verwenden

Page is intentionally blank

Exemplary Version-do not use for assay accomplishment / Exemplarische Version -nicht für Assaydurchführung verwenden

# 17 INTERNATIONAL ASSAY PROCEDURE

## International Test Deskription

CAL A-G		Rec in 500 µL DIL	-
CTR1		Rec in 250 µL DIL	≥ 1:16 DIL
CTR2		Rec in 250 µL DIL	≥ 1:16 DIL
WB	20x	-	1:20 A. dest. → WB 1:20
-	SPE		≥ 1:16 DIL
-	°C 20°C -25 °C		
50 µL	DET		A1/A2 - End
50 µL	CAL A	(0 ng/mL)	A1/A2
50 µL	CAL B	(0.1 ng/mL)	B1/A2
50 µL	CAL C	(0.5 ng/mL)	C1/C2
50 µL	CAL D	(1 ng/mL)	D1/D2
50 µL	CAL E	(2 ng/mL)	E1/E2
50 µL	CAL F	(4 ng/mL)	F1/F2
50 µL	CAL G	(8 ng/mL)	G1/G2
50 µL	CTR1	≥1:16 DIL ↔	H1/H2
50 µL	CTR2	≥1:16 DIL ↔	A3/A4
50 µL	SPE	≥1:16 DIL ↔	
TAPE			
🕒 1 h °C 20°C - 25°C ↔ 350 rpm			
5x 300 µL	5x WB 1:20		
100 µL	EC		A1/A2→ End
TAPE			
🕒 0.5 h °C 20°C - 25°C ↔ 350 rpm			
5x 300 µL	5x WB 1:20		
100 µL	S		A1/A2→ End
🕒 0.25 h °C 20°C - 25°C 🌟			
100 µL	STP		A1/A2→ End
MEASURE			

18 ASSAY PROCEDURE

Preparation of reagents		Reconstitution:	Dilution
<b>A-G</b>	<b>Calibrators</b>	in <b>500 µL</b> Dilution Buffer <b>DIL</b>	-
<b>CTR1</b>	<b>Control 1</b>	in <b>250 µL</b> Dilution Buffer <b>DIL</b>	≥ <b>1:16</b> with <b>DIL</b>
<b>CTR2</b>	<b>Control 2</b>	in <b>250 µL</b> Dilution Buffer <b>DIL</b>	≥ <b>1:16</b> with <b>DIL</b>
<b>WB</b>	<b>Washing Buffer 20x Concentrate</b>	-	<b>1:20</b> with <b>Aqua dest.</b> → <b>WB 1:20</b>
<b>Sample dilution:</b> with Dilution Buffer <b>DIL</b> ≥ <b>1:16</b>			
Before assay procedure bring all reagents to room temperature <b>20-25°C</b> .			
<b>Assay Procedure in Double Determination:</b>			
Pipette	Reagents	Position	
50 µL	Antibody Conjugate <b>DET</b>	Pipette in <b>all</b> required number of wells	
50 µL	Calibrator <b>A (0 ng/mL)</b>	A1/A2	
50 µL	Calibrator <b>B (0.1 ng/mL)</b>	B1/B2	
50 µL	Calibrator <b>C (0.5 ng/mL)</b>	C1/C2	
50 µL	Calibrator <b>D (1 ng/mL)</b>	D1/D2	
50 µL	Calibrator <b>E (2 ng/mL)</b>	E1/E2	
50 µL	Calibrator <b>F (4 ng/mL)</b>	F1/F2	
50 µL	Calibrator <b>G (8 ng/mL)</b>	G1/G2	
50 µL	Control <b>CTR1</b> (≥ 1:16 diluted)	H1/G2	
50 µL	Control <b>CTR2</b> (≥ 1:16 diluted)	A3/A4	
50 µL	Sample <b>SPE</b> (≥1:16 diluted)	in the rest of the wells according the requirements	
Cover the wells with the sealing tape.			
<b>Sample Incubation with Shaking: 1 h at 20°C - 25°C, 350 rpm</b>			
5 x 300 µL	Aspirate the contents of the wells and <b>wash</b> 5 x with 300 µL each Washing Buffer <b>WB 1:20</b> / well	In each well	
100 µL	Enzyme Conjugate <b>EC</b>	In each well	
Cover the wells with the sealing tape.			
<b>Incubation with Shaking: 30 Minutes at 20°C - 25°C, 350 rpm</b>			
5 x 300 µL	Aspirate the contents of the wells and <b>wash</b> 5 x with 300 µL each Washing Buffer <b>WB 1:20</b> / well	In each well	
100 µL	Substrate <b>S</b>	In each well	
<b>Incubation: 15 Minutes in the Dark at 20°C - 25°C</b>			
100 µL	Stop Solution <b>STP</b>	In each well	
Measure the absorbance within <b>30 min</b> at <b>450 nm</b> with ≥ 590 nm as reference wavelength.			