

IGFBP-2 ELISA

Enzymimmunoassay für die quantitative Bestimmung von

Insulin-like Growth Factor Bindungsprotein 2

Deutsch

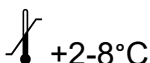
Enzyme Immunoassay for Quantitative Determination of

Insulin-like Growth Factor Binding Protein 2

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.



96 wells



REF E05



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 • <http://www.mediagnost.de>

	Expiry date/ Verfallsdatum/ Date de péremption/ Data di scadenza/ Fecha de caducidad/ Data de validade/ Uiterste gebruiksdatum/ Udløbsdato/ Bäst före-datum/ Termin ważności/ Lejárati idő/ Čas expirácie/ Doba expirace/ Срок на годност/ 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-diagnostikkakäyttö
	Lot-Batch Number/ Charge-Chargennummer/ Lot-Code du lot/ Lotto-Numero di lotto/ Lote-Código de lote/ Lote-Código do Lote/Lot-Partijnummer/ Lot-Batchcode/ 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 rozmezí/ Температурно ограничение/ Säilidata 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
	Keep away from sunlight/ Nicht dem Sonnenlicht aussetzen/ Conserver à l'abri de la lumière/ Conservare al riparo della luce solare/ No exponer a la luz solar/ Proteger da luz solar/ Niet aan zonlicht blootstellen/ Må ikke udsættes for sollys/ Utsätt inte för solljus/ Nie wystawiać na słońce/ Napfénytől távol tartandó/ Nevystavovať slnečnému svetlu/ Nevystavovat slunečnímu světlu/ Да се предпазва от слънчева светлина/ Kaitsta otsese päikesekiirguse eest/ Κρατήστε το μακριά από την ηλιακή ακτινοβολία/ Tineți departe de lumina soarelui/ Ne izpostavljajte sončni svetlobi/ suoja auringonvalolta
	Incubation time/ Inkubationszeit/ Temps d'incubation/ Tempo d'incubazione/ Tiempo de incubación/ Tempo de incubação/ incubatietijd/ Inkubationstid/ inkubationstid/ Czas inkubacji/ Inkubációs idő/ Inkubačná lehota/ Inkubační doba/ Инкубационен период/ Inkubatsiooniaeg/ Χρόνος επώασης/ Timp de incubare/ Inkubacijska doba/ inkubaatioaika
	Incubate at/ Inkubation bei/ Incuber à/ Incubare a/ incubar a/ Incubar a/ incubatietemperatuur/ Inkubation ved/ inkubation vid/ Inkubacja przy/ Inkubáció hőmérséklete/ Inkubácia pri/ Inkubace při/ Инкубира се при/ Inkubatsioon temperatuuril/ Επώαση στους/ Incubare la/ Inkubacija pri/ Inkubaatiolämpötila
	Shaking/ Schütteln/ Mélanger/ Agitare/ Agitar/ Agitação/ Schudden/ Ryster/ Skaka/ Wstrząsanie/ Rázás/ Pretrepat/ Protřepat/ Разклащане/ Raputada/ Ανακινήστε/ Vibrare/ Stresite/ Sekoita
	Reconstitute in/ Rekonstituieren in/ Reconstituer dans/ Ricostituire nel/ Reconstituir en/ Reconstituir em/ Reconstituieren in/ Rekonstituér i/ Rekonstituera/ Rekonstituować w/ Helyreállítás/ Znovu připravit za/ Znovu připravit za/ Разтваряне в/ Moodustada uuesti/ Ανασυστήστε σε/ Reconstituire în/ Predelava v/ Rekonstitui
	Sample/ Probe/ Echantillon/ Campione/ Muestra/ Amostra/ Monster/ Provel/ prov/ Próbká/ Minta/ Vzorka/ Vzorek/ Проба/ Proov/ Δείγμα/ Probă/ Vzorec/ Näyte
	Mikrotiterplate/ Mikrotiterplatte/ plaque de microtitrage/ Piastra di microtitolazione/ Placa de microtitulación/ Placa de Microtitulação/ Microtiterplaat/ Mikrotiterplade/ mikrotiterplatta/ microtiterplaat/ Płytká microtiter/ Mikrotiter lap/ Mikrotitračná podložka/ Mikrotitrační podložka/ Микротитърна плака/ Mikrotiterplaat/ Τρυβλίο μικροτιτλοδότησης/ Microplacă/ Mikrotitrská plošča/ Mikrotitrauslevy

DET	Antibody-Enzyme Conjugate/ Antikörper-Enzym Konjugat/ Anticorps conjuguée-conjugué enzymatique/ Coniugato di anticorpo-enzima/ Conjugado de anticuerpos-enzimas/ Conjugado Anticorpo-Enzima/ Antilichaam-- enzymconjugaat/ Antistoffer-enzym-konjugat/ Antikropp-enzymkonjugat (antikropp-enzym, konjugat)/ Koniugat antyciał-enzymów/ Antitest-enzim páros/ Protílatkový-enzymatický konjugát/ Protílatkový-enzymatický konjugát/ Антитяло-ензим конюгат/ Antikehad-ensüümi konjugaat/ Σύμπλοκο αντισώματος-ενζύμου/ Compuși din anticorpi-enzime/ Antitelesa in konjugat encima/ Vasta-aaine-entsymi konjugaatti
DIL	Dilution Buffer/ Verdünnungspuffer/ Tampon de dilution/ Tampone di diluizione/ Tampón de dilución/ / Tampão de diluição / Verdunningsbuffer/ / Fortyndingsbuffer/ Utspädningsbuffert / Bufor rozcieńczający/ / Hígító puffer/ Riediaci pufor/ Ředící pufr / Бүфер за разреждане/ Lahjenduspuhver/ Ρυθμιστικό διάλυμα αραιώσης / Tampon de diluare/ Pufer za redčenje/ Laimennuspuskuri
X:X	Dilute / Verdünnen / Diluer / Diluire / Diluir / Diluir / Verdunnen / Fortyndes / Späd / Rozcieńczanie / Hígítás / Riedit' / Ředit / Разреждане / Lahjendada / Αραιώστε / Diluați / Razredčiti / Laimennetaan
CAL A-E	Calibrator X/ Kalibrator X/ calibreteur X/ calibratore X/ calibrador X/ calibrador X/ kalibrator X/ kalibrator X/ kalibrator X/ kalibrator X/ kalibrátor X/ kalibrátor X/ kalibrátor X/ kalibrátor X/ калибратор X/ kalibraator X/ Βαθμονομητής X/ calibrator X/ kalibrator X/ kalibraattori X
CTR1 / CTR2	Control X/ Kontrolle X/ Contôle X/ controllo X/ control X/ Controle X/ controle X/ Kontrol X/ Kontroll X/ kontrolne X/ Ellenőrző X/ Kontrolné X/ Kontrolní X/ Контролен X/ Kontroll X/ ελέγχου X/ control X/ Kontrolni X/ Kontrolli X
WB	Washing Buffer Concentrate/ Waschpufferkonzentrat/ Tampon de lavage conc./ Tampone di lavaggio concentrato/ Tampón de lavado concentrado/ Tampão de Lavagem Concentrado/ wasbuffer, geconcentreerd/ Vaskebufferkoncentrat/ Vaskebufferkoncentrat/ tvättbuffertkoncentrat/ Bufor płukania koncentrat/ Mosópuffer koncentrátum/ Koncentrát vymývacieho pufru/ Концентрат на промивен бұфер/ Pesupuhvri kontsentraat/ Συμπύκνωμα ρυθμιστικού διαλύματος έκπλυσης/ Concentrat pentru tamponul de spălare/ Koncentrat izpiralnega pufru/ Pesuliuositiiviste
WB 1:20	Washing Buffer/ Waschpuffer/ Tampon de lavage/ Tampone di lavaggio/ Tampón de lavado/Tampão de Lavagem/ wasbuffer/ Vaskebuffer/ tvättbuffert/ Bufor płukania/ Mosópuffer/ Vymývací pufer/ Vymývací pufr/ Промивен бұфер/ Pesupuhver/ Ρυθμιστικό διάλυμα έκπλυσης/ Tampon pentru spălare /Izpiralni pufer/ Pesuliuos
S	Substrate/ Substrat/ Substrat/ Substrato/ Substrato/ Substrato/ substraat/ Substrat/ Substrat/ Substrat/ Szubsztrátum/ Substrát/ Substrát/ Субстрат Substraat/ Υπόστρωμα/ Substrat/ Substrat/ Substraattiliuos
STP	Stop Solution/ Stopplösung/ Stop Solution/ Soluzione di stop/ Stop Solución/ Solução Stop/ stopoplossing/ Stopopløsning/ Stopplösning/ Stop roztwór/ Megállító oldat/ Roztok na ukončenie/ Roztok pro ukončení/ Стопирас разтвор/ Stopp-lahus/ Διάλυμα διακοπής/ Soluție de oprire/ Stop raztopina/ Pysäytysliuos
TAPE	Cover Plate with sealing tape/ Platte abkleben/ Recouvrir la microplaque avec bande adhésive/ Coprire la piastra con nastro adesivo/ Cubrir la placa con una cinta adhesiva/ Cobrir a Placa com fita adesiva/ plaatje met tape afdekken/ Afdækningsplade med tape/ maskera platta/ Odkleić płytkę/ Tányér leragasztása/ Oblepiť podložku lepiacou páskou/ Olepit podložku lepící páskou/ Пластика с лентой за запечатване/ Katta plaat isoleerikleplindiga/ Κολλήστε το πλακίδιο με κολλητική ταινία/ Aoperitiä placa cu o bandă adezivă/ Prelepti plosčco/ Peitää mikrotitrauslevyn oheisella teipillä
MEASURE	Measure plate within 30 min at 450 nm (Referencefilter ≥590 nm)/ Ausmessung innerhalb von 30 min bei 450 nm (Referenzfilter ≥ 590 nm)/ Mesure lábsorbance en l'espace de 30 min à 450 nm avec ≥590 nm longueur d'onde pour référence/ Misurazione entro 30 min. a 450 nm (filtro di riferimento ≥ 590 nm)/ Medición de la placa dentro de los siguientes 30 min a 450 nm (filtro de referencia ≥ 590nm)/ Medir a placa dentro de 30 min a 450 nm (Filtro de referência ≥ 590 nm)/ Binnen 30 minuten bij 450 nm meten (referentiefilter ≥ 590 nm)./ Mål plade i løbet af 30 min ved 450 nm (referencefilter ≥590 nm)/ Mät inom 30 min vid 450 nm (referensfilter ≥ 590 nm)./ Pomiar w ciągu 30 min przy 450 nm (filtr odniesienia ≥ 590 nm)/ Ki mérése 30 percen belül 450 nm-nél (referenciaszűrő ≥ 590 nm)/ Merať 30 minút pri 450 nm (Referenčný filter ≥590 nm)/ Měřit 30 minut při 450 nm (Referenční filtr ≥ 590 nm)/ Отчитане в рамките на 30 min при 450 nm (референтен филтър ≥ 590 nm)/ Mõõtmise 30 min jooksul 450 nm korral (võrdlusfilter ≥ 590 nm)/ Μέτρηση εντός 30 min στα 450 nm (φίλτρο αναφοράς ≥ 590 nm)/ Măsurare în decurs de 30 min la 450 nm (filtru de referință ≥ 590 nm)/ Izmerite ploščico v 30 min pri 450 nm (referenčni filter ≥590nm)/ Mittaa 30 minuutin aikana 450 nm:ssä (referenssi suodatin ≥ 590 nm)
Literature	Literature/ Literatur/ Bibliographie/ Letterario/ Bibliografia/ Literatura documentaço/ literatuur/ Litteratur/ litteratur/ Literatura/rodalom/ Literatúra/ Literatura/ Литература/ Kirjandus/ Βιβλιογραφία/ Bibliografie/ literatura/ Lähdeluettelo
International Test description	International test description/ internationale Testanleitung/ description internationale de test/ Istruzioni per il test internazionali/ Descripción de ensayo internacional/ Descrição internacional do teste/ internationale testbeskrivning/ internationell testbeskrivning/ Opis testu międzynarodowego/ nemzetközi teszt-útmutató/ Medzinárodný návod k testu/ Mezinárodní návod k testu/ rahvusvaheline katse kirjeldus/ Διεθνείς οδηγίες για εργαστηριακές δοκιμές/ instructiuni internaționale pentru testare/ mednarodna navodila za preizkus/ Kansainvälinen käyttöohje
End	in all required wells/ in allen benötigten Vertiefungen/ dans tous les godets requis/ in tutti i pozzetti richiesti/ en todos los pozos requeridos/ em todos os tubos necessários/ in alle nodige putjes/ i alle nødvendige brønde/ i alla nödvändiga brunnar/ we wszystkich potrzebnych wgłębieniach/ minden szükséges forrásban/ vo všetkých potrebných miestach/ ve všech potřebných místech/ във всички необходими ямки/ kõigis vajalikes süvendites/ σε όλες τις απαραίτητες κοιλότητες/ în toate cavitățile necesare/ v vseh zahtevanih vdolbinah/ kaikiin tarvittaviin mikrotitrauslevyn syvennyksii

INHALTSVERZEICHNIS / TABLE OF CONTENTS

DEUTSCH - IGFBP-2 ELISA E05 Gebrauchsanweisung	5
1 ZWECKBESTIMMUNG	5
2 EINFÜHRUNG.....	5
3 TESTPRINZIP	6
4 WARNHINWEISE UND VORSICHTSMAßNAHMEN.....	7
5 PROBEN	8
6 MATERIALIEN	9
7 TECHNISCHE HINWEISE.....	10
8 TESTDURCHFÜHRUNG.....	11
9 QUALITÄTSKONTROLLE	12
10 AUSWERTUNG	12
11 INTERPRETATION DER ERGEBNISSE	13
12 EINSCHRÄNKUNGEN.....	14
13 REFERENZWERTE	14
14 ASSAY EIGENSCHAFTEN UND VALIDIERUNG.....	16
15 WISSENSCHAFTLICHE ANWENDUNGEN	18
 ENGLISH - IGFBP-2 ELISA E05 INSTRUCTIONS FOR USE	 20
1 INTENDED USE	20
2 INTRODUCTION	20
3 PRINCIPLE	21
4 WARNINGS AND PRECAUTIONS.....	22
5 SAMPLES	23
6 MATERIALS.....	24
7 TECHNICAL NOTES.....	25
8 ASSAY PROCEDURE	26
9 QUALITY CONTROL	27
10 EVALUATION OF RESULTS.....	27
11 INTERPRETATION OF RESULTS.....	28
12 LIMITATIONS OF PROCEDURE	28
13 REFERENCE VALUES	29
14 PERFORMANCE CHARACTERISTICS	31
15 SCIENTIFIC APPLICATION	33
16 LITERATUR/ LITERATURE.....	34
17 INTERNATIONAL ASSAY DESCRIPTION.....	35
18 ASSAY PROCEDURE	36

DEUTSCH - IGFBP-2 ELISA E05 Gebrauchsanweisung

IGFBP-2 ELISA E05	96 Bestimmungen
CE	DE/CA40/00809/13/1
Testprinzip	Enzymimmunoassay
Dauer (Inkubationszeit)	1,75 h
Antikörper	Spezifische monoklonale Antikörper und polyklonale hochaffine Antisera, gebrauchsfertig
Puffer	Gebrauchsfertig und 20fach konzentriert
Kalibratoren	Einzel-Kalibratoren mit 2; 10; 20; 40 und 80 ng/ml rekombinant hIGFBP-2 , lyophilisiert
Kalibration	Kalibriert mit rekombinantem hIGFBP-2
Assay Bereich	0,2 ng/mL – 1680 ng/mL
Kontrolle	2 Kontrollen, lyophilisiert
Probe	Serum und EDTA-Plasma
Erforderliches Probenvolumen	15 µL
Proben Verdünnung	1:21
Analytische Sensitivität	ø 0,2 ng/mL
Intra- / Interassay Variation	ø ≤ 10 %
Referenz Werte	Referenzwerte für Personen zwischen 1.5 bis >70 Jahre wurden für diesen Assay evaluiert

1 ZWECKBESTIMMUNG

Messung von humanem IGFBP-2 in menschlichem Serum, EDTA Plasma.

2 EINFÜHRUNG

Insulin-ähnliche Wachstumsfaktoren (IGFs) regulieren die Proliferation, Differenzierung, Apoptose, Zelladhäsion und den Metabolismus in verschiedensten Geweben und Zelltypen. Das unter Wachstumshormon (WH)-Einfluss vorwiegend in der Leber gebildete IGF-I steuert als Hormon das Längenwachstum der Knochen und die geschlechtliche Reifung. IGF-II ist vorwiegend ein Wachstumsfaktor embryonaler Gewebe (11-13).

Die IGF-Wirkungen über den IGF-Typ-I Rezeptor werden durch die IGF-Bindeproteine (IGFBP-1 bis -6) unterschiedlich moduliert (14). IGFBP-2 ist nach IGFBP-3 das zweithäufigste IGFBP im menschlichen Blut. IGFs, v.a. tumortypische pro-IGF-Formen und Hormone regulieren die Expression des IGFBP-2, WH wirkt dabei inhibierend. Auf Zellebene scheint IGFBP-2 über einen IGF-unabhängigen Mechanismus IGFBP-2 die Proliferation und Dissemination solider Tumore zu fördern (15,16).

IGFBP-2 ist ein unglykosyliertes Polypeptid von 31,3 kDa, das binäre IGF-Komplexe bildet und keine zirkadiane Rhythmik aufweist. Seine Konzentration im Blut steigt beim Fasten, nach Traumata und größeren Operationen, am stärksten aber bei malignen Erkrankungen an. Bei verschiedenen Tumorarten (5-10) steigt das IGFBP-2 streng mit dem Grad der Progression an und geht in Remission auf normale Werte zurück. Unter WH-Therapie z.B. bei Minderwuchs (4) und bei WH-Abusus (Doping) nimmt die IGFBP-2-Konzentration ab. Bei Trisomie 18 ist IGFBP-2 im maternalen Serum erniedrigt und IGFBP-1 erhöht; daher ist das IGFBP-2 / IGFBP-1 Verhältnis hierfür ein Marker (17). Niedrige IGFBP-2 Serumwerte wurden in einer Studie als aussagekräftiger Indikator für einen guten physikalisch-funktionalen Körperzustand (positiv: Muskelstärke bzw. Knochendichte; negativ: Fettmasse), bei älteren Männern gefunden (20).

Der IGFBP-2 Enzymimmunoassay-Kit ist für die quantitative Messung der IGFBP-2 Konzentration in humanem Serum in wissenschaftlichen und diagnostischen Untersuchungen einsetzbar.

Weit über dem Referenzbereich (Tabelle 6+7) liegende Messwerte des IGFBP-2 können in Abhängigkeit vom Grad der Malignität einen metastasierenden Tumor anzeigen. IGFBP-2 kann auch als zusätzlicher Parameter beim Monitoring einer Tumorthherapie (z.B. Chemotherapie) und als Indikator für eine Trisomie 18 (17) im maternalen Blut gemessen werden.

Klinische Bedeutung

- Die IGFBP-2 Konzentration ist im Blut altersabhängig (3).
- Ergänzender Parameter in der Wachstumsdiagnostik (IGFBP-2/IGFBP-3 Verhältnis), IGFBP-2 ist ein Inhibitor der Wachstumshormonwirkung (3,4).
- Progressions-abhängiger Tumormarker bei Leukämien (5), astrozytischen Hirntumoren (6,7), Prostata- (8), Nebennierenrinden-(9)-, hepatozellulären (10) und anderen Karzinomen.
- Anti-Aging Parameter: IGFBP-2 als physiologischer Funktionalitätsmarker (20).

3 TESTPRINZIP

Der Mediagnost ELISA für IGFBP-2 E05 ist ein sogenannter Sandwich-Assay unter Verwendung eines spezifischen und hochaffinen Antiserums sowie eines spezifischen monoklonalen Antikörpers. Der an die Mikrotiterplatte gekoppelte erste Antikörper bindet das IGFBP-2 aus der Probe. Im nachfolgenden Schritt bindet am derart immobilisierten IGFBP-2 der zweite spezifische anti-IGFBP-2-Antikörper. Dieser ist biotinyliert und liegt als Mischung mit einem Streptavidin-Peroxidase-Enzymkonjugat vor. In der anschließenden Substratreaktion führt eine spezifische enzymatische Reaktion zu einem Farbumschlag. Die Intensität der daraus resultierenden Färbung ist proportional zum IGFBP-2-Gehalt der Proben.

Er erkennt quantitativ IGFBP-2 und wird von erhöhten IGF-I bzw. IGF-II Werten nicht beeinflusst. Verwandte Moleküle wie z.B. IGFBP-3 zeigen keine Kreuzreaktion im Test.

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 GmbH kann nicht für einen eventuellen Verlust oder Schaden haftbar gemacht werden, der durch Nichtbeachtung der Instruktionen entsteht, soweit keine gesetzliche Regelung anderes besagt. Ein Sicherheitsdatenblatt ist auf Anforderung verfügbar.

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: **Kontrollen CTR1 und CTR2**

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 CAL A-E, DET, DIL, WB

enthalten als Konservierungsmittel eine Mischung aus **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+	BEI KONTAKT MIT DEN AUGEN: einige Minuten lang behutsam mit Wasser spülen.
P338	Vorhandene Kontaktlinsen nach Möglichkeit entfernen. Weiter spülen.

Stopplösung STP

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/ Schutzkleidung/ Augenschutz/ Gesichtsschutz tragen.
P301+P330+	BEI VERSCHLUCKEN: Mund ausspülen.
P331	KEIN Erbrechen herbeiführen.
P305+P351+	BEI KONTAKT MIT DEN AUGEN: einige Minuten lang behutsam mit Wasser spülen.
P338	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, EDTA-Plasma

5.2 Probenentnahme

Das Blut zur Probengewinnung mittels standardmäßiger Venenpunktion entnehmen. Blutproben können zu beliebiger Tageszeit abgenommen werden. Das Blut zur Serumgewinnung mittels standardmäßiger Venenpunktion entnehmen. Vollblut sollte idealerweise nach etwa 2 Stunden abgesert und spätestens nach 12 Stunden verarbeitet und bis zur Messung bei -20°C gelagert werden. Hämolytische Reaktionen sind zu vermeiden.

5.3 Erforderliches Probenvolumen: 15 µL

5.4 Probenstabilität

In fest verschlossenen, geeigneten Probengefäßen

- Lagerung bei 20-25°C max. 24 Stunden
- Lagerung bei -20°C min. 2 Jahre

Die Proben dürfen nicht öfter als zehnmal eingefroren/aufgetaut werden.

5.5 Interferenz

Triglyceride, Bilirubin und Hämoglobin in der Probe stören nicht bis zu einer Konzentration von, **100 mg/mL, 200 µg/mL, 1 mg/mL**. Der Einsatz hämolytischer, lipämischer oder ikterischer Proben sollte trotzdem zuvor vom Anwender validiert werden.

5.6 Probenverdünnung

- Verdünnung: **1:21** mit **Verdünnungspuffer DIL**
- Beispiel: **15 µL** Probe werden zu 300 µL **Verdünnungspuffer DIL** gegeben (Verdünnungsfaktor **21**). Nach dem Mischen von dieser Lösung 2 x 100 µL im Assay eingesetzt.
- Gegebenenfalls kann, je nach erwarteten **IGFBP-2-Werten**, stärker in **Verdünnungspuffer DIL** verdünnt werden. Die Serumproben **müssen** jedoch vor der Messung 1:10 – 1:30 mit **Verdünnungspuffer DIL** verdünnt werden. Ein Extraktionsschritt ist nicht erforderlich.

6 MATERIALIEN

6.1 Inhalt der Testpackung

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

MTP	Mikrotiterplatte , gebrauchsfertig, beschichtet mit Maus-anti-IGFBP-2-Antikörper. Die Vertiefungen sind einzeln abbrechbar.	(8x12) Vertiefungen
CAL A-E	Kalibratoren , lyophilisiert (humanes rek.IGFBP-2), die Konzentrationen sind auf dem Qualitätszertifikat angegeben.	5 x 750 µL
CTR1	Kontrolle 1 , lyophilisiert, (humanes Serum), die Konzentration ist auf dem Qualitätszertifikat in ng/mL angegeben.	1 x 100 µL
CTR2	Kontrolle 2 , lyophilisiert, (humanes Serum), die Konzentration ist auf dem Qualitätszertifikat in ng/mL angegeben.	1 x 100 µL
DET	Antikörper-POD-konjugat , gebrauchsfertig, Kaninchen-anti-hIGFBP-2-Antikörper biotinyliert + Streptavidin Peroxidase-Konjugat	1 x 12 mL
DIL	Verdünnungspuffer , gebrauchsfertig	1 x 50 mL
WB	Waschpuffer , 20fach konzentrierte Lösung	1 x 50 mL
S	Substrat , gebrauchsfertig, Meerrettich-Peroxidase (POD)-Substrat, stabilisiertes Tetramethylbenzidin.	1 x 12 mL
STP	Stopplösung , gebrauchsfertig, 0,2 M Schwefelsäure.	1 x 12 mL
-	Abdeckfolie für die Mikrotiterplatte	2 x
	Packungsbeilage	1 x
-	Qualitätszertifikat	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. 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 und Kontrollen) sollten bei -20°C aufbewahrt werden. Zur weiteren Verwendung schnell aber schonend Auftauen (keine Temperaturerhöhung über Raumtemperatur und kein übermäßiges Vortexen).

Wiederholte Gefrier-/Auftauzyklen sind zu vermeiden. Der 1:20 gebrauchsfertig verdünnte Waschpuffer **WB** ist 4 Wochen bei +2 - 8°C haltbar.

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 und Kontrollen 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 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 (Leerwert, Kalibratoren **A - E**, 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 - E**, Kontrollen **CTR1 und CTR2** und die jeweiligen Proben möglichst schnell pipettiert werden z.B. in 15 Minuten). Das Antikörper-POD-Konjugat **DET** 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 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 fuselndem 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 fuselndem Zellstoff gründlich entfernt werden.

8 TESTDURCHFÜHRUNG

Reagenzpräparation:		Rekonstitution:	Verdünnung:
CAL A-E	Kalibratoren	in 750 µL Verdünnungspuffer DIL	-
CTR1	Kontrolle 1	in 100 µL Verdünnungspuffer DIL	1:21 mit DIL
CTR2	Kontrolle 2	in 100 µL Verdünnungspuffer DIL	1:21 mit DIL
WB	Waschpuffer konzentrat	-	1:20 mit Aqua dest. → WB 1:20
Proben mit Verdünnungspuffer DIL 1:21 verdünnen, sofort mischen, inkubieren. Davon 100 µL pro Bestimmung einsetzen.			
Vor der Testdurchführung alle Reagenzien auf Raumtemperatur (+20-25°C) bringen.			
Testdurchführung in Doppelbestimmung:			
Pipettieren	Reagenzien		Position
100 µL	Verdünnungspuffer DIL (Leerwert)		A1/A2
100 µL	Kalibrator A (2 ng/mL)		B1/B2
100 µL	Kalibrator B (10 ng/mL)		C1/C2
100 µL	Kalibrator C (20 ng/mL)		D1/D2
100 µL	Kalibrator D (40 ng/mL)		E1/E2
100 µL	Kalibrator E (80 ng/mL)		F1/F2
100 µL	Kontrolle CTR1 (1:21 verdünnt)		G1/G2
100 µL	Kontrolle CTR2 (1:21 verdünnt)		H1/H2
100 µL	Probe SPE (1:21 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 Waschpuffer WB 1:20 / Vertiefung waschen.		In jede Vertiefung
100 µL	Antikörper-POD-Konjugat DET		In jede Vertiefung
Mit Klebefolie die Vertiefungen dicht abdecken.			
Inkubation: 30 Minuten bei +20-25°C, 350 rpm			
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
Substrat S Inkubation: 15 Minuten im Dunklen bei +20 - 25°C			
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. 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 IGFBP-2 -Konzentrationen:

Kalibratoren	A	B	C	D	E
ng/mL	2	10	20	40	80

- 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 und Kontrollen 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) Aus der Kalibrationskurve erhält man derart die IGFBP-2-Konzentration der verdünnten Kontrollen CTR1 & CTR2 bzw. der verdünnten Proben (mit der individuellen Verdünnung, allgemein für Serum- und Plasma empfohlen 1:21). Die Multiplikation des jeweiligen berechneten IGFBP-2-Gehaltes mit dem entsprechenden Verdünnungsfaktor ergibt dann die IGFBP-2-Konzentration der unverdünnten Ausgangslösungen.

10.2 Beispielhafte Kalibrationskurve

Die hier beispielhaft gezeigte Kalibrationskurve (Abbildung 1) darf **nicht für die Auswertung** Ihres Testes genutzt werden. Für jeden Test ist eine eigene Kalibrationskurve anzufertigen.

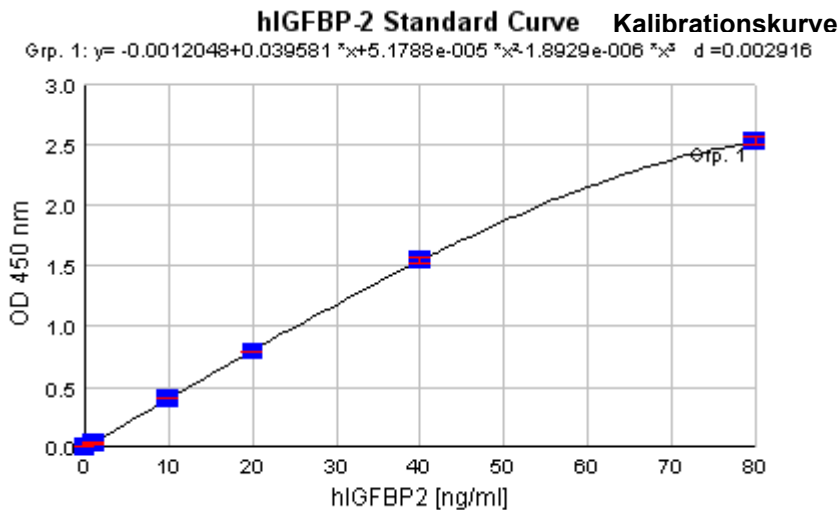


Abb. 1. Typische Kalibrationskurve mit einem Polynom 3. Grades zur Berechnung der Kalibrationskurve

Beispielhafte Berechnung der IGFBP-2 – Konzentration einer unverdünnten Probe:

Gemessene Extinktion der Probe: 0,37

Gemessene Extinktion des Nullwertes: 0,06

Aus der Differenz der Proben Extinktion und der Extinktion des Leerwertes (0,31) **berechnet Ihr Auswertungsprogramm** mit der entsprechenden Kurvenanpassung (hier: Polynom 3. Grades) die IGFBP-2 Konzentration der verdünnten Probe durch Auflösen der Gleichung aus Abb. 1 nach x. In diesem Fall ergibt sich eine IGFBP-2 Konzentration in der verdünnten Probe von

$$0,31 = -0,0012048 + 0,039581x + 5,1788 \cdot 10^{-5} \cdot x^2 - 1,8929 \cdot 10^{-6} \cdot x^3$$
$$7,93 = x$$

und unter Berücksichtigung des Verdünnungsfaktors (**1:21**) somit eine IGFBP-2 Konzentration in der unverdünnten Probe von

$$7,93 \cdot 21 = 166,55 \text{ ng/mL}$$

Damit enthält die Probe 166,55 ng/mL IGFBP-2.

11 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 der Test-spezifischen Referenzwerte und den Resultaten anderer diagnostischer Untersuchungen interpretiert werden. Darüber hinaus empfehlen wir, dass jedes Labor seine eigenen Referenz-Bereiche ermittelt.

12 EINSCHRÄNKUNGEN

Abweichungen von den Referenzbereichen sind vor allem zu erwarten bei Hypothyreose, größeren Operationen, Polytrauma, Diabetes mellitus (wegen Insulintherapie), Fasten und bei malignen Erkrankungen.

Der Mediagnost IGFBP-2 ELISA E05 basiert auf einer Kombination aus monoklonalem Fänger- und polyklonalen Detektionsantikörper. Grundsätzlich es kann das Ergebnis von immunologischen Testsystemen durch z.B. heterophile Antikörper oder Rheumafaktoren in der Probe beeinflusst werden. Über das Assay Design werden diese Einflüsse minimiert, können jedoch nicht vollständig ausgeschlossen werden.

13 REFERENZWERTE

Die IGFBP-2 Konzentrationen sind im Serum abhängig vom Body Mass Index (BMI; Tabelle 1) sowie vom Alter (Tabelle 2). Zur Erhebung von Referenzwerten erfolgte die Bestimmung der IGFBP-2-Spiegel im Serum bei über 400 gesunden Kindern und Erwachsenen (siehe Tabelle und Abbildung 2); (3).

Tabelle 1: BMI abhängige Referenzwerte, Erwachsene zwischen 20 und 80 Jahren

BMI		Mittelwert		Perzentilen		
[kg/m ²]	n	IGFBP-2 [ng/mL]	SA	5.	50.	95.
15	12	612	110	431	612	793
17,5	14	568	126	361	568	775
20	76	509	144	271	509	746
22,5	124	449	162	182	449	716
25	101	398	165	127	398	670
27,5	52	348	147	106	348	590
30	25	315	118	120	315	510
32,5	15	282	90	135	282	430
35	4	251	80	119	251	383
37,5	4	220	71	104	220	336

SA=Standardabweichung n=Anzahl

Tabelle 2: IGFBP-2 Serum Werte (in ng/mL) von > 400 gesunden Personen. Der Normal-Bereich der jeweiligen Altersgruppe wird durch die 5., 50. und 95. Perzentilen gegeben.

Altersabhängiger Normalbereich von IGFBP-2 Serumkonzentrationen

Alter (Jahre)	5. Perzentile	50. Perzentile	95. Perzentile
1	408	545	728
2	359	500	696
3	317	460	668
4	277	421	640
5	243	388	617
6	217	361	602
7	194	336	583
8	173	312	562
9	154	289	542
10	138	268	522
11	123	249	503
12	111	232	486
13	101	219	477
14	94	212	470
15	89	207	465
16	86	207	460
17	84	214	466
18	84	223	483
19	84	232	500
25	99	280	580
35	110	381	686
45	130	403	702
55	140	410	715
65	151	418	727
75	153	427	740
80	156	430	744

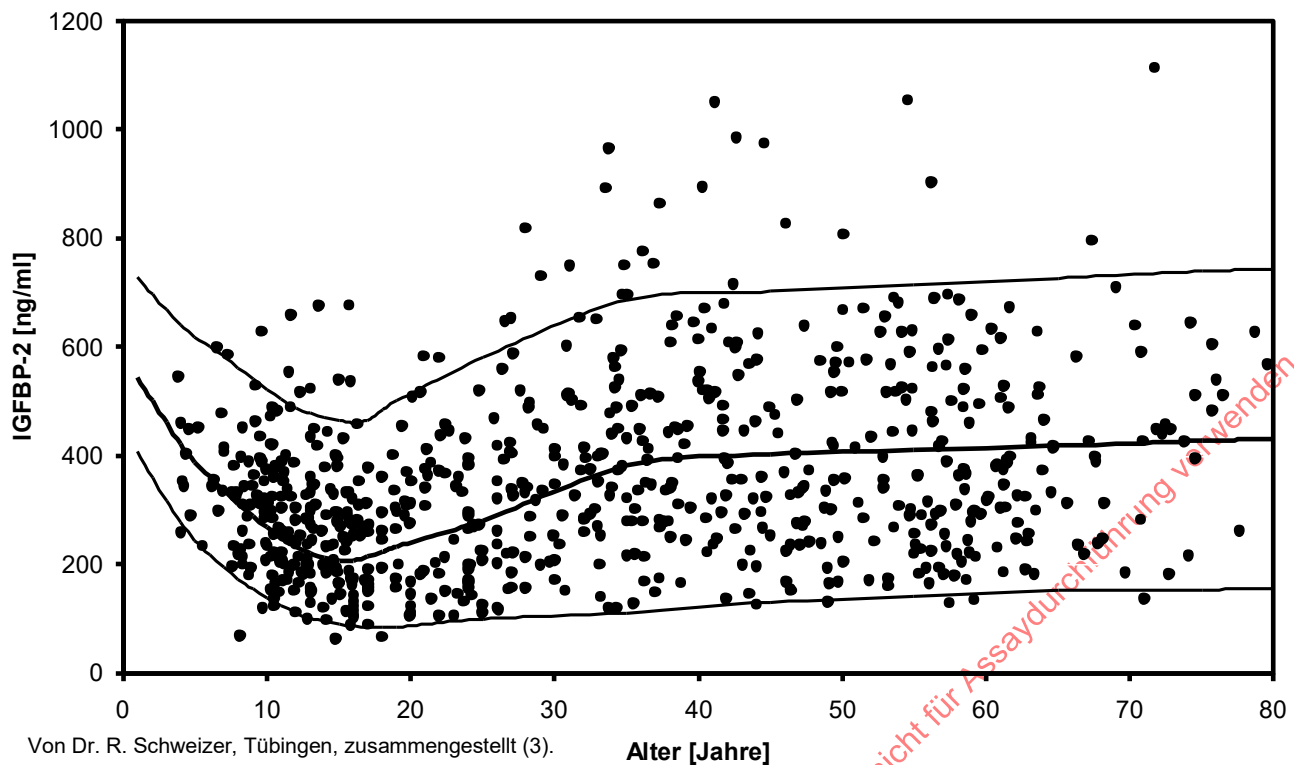


Abb. 2: IGFBP-2 Serumkonzentrationen (in ng/mL) von > 400 gesunden Personen in Abhängigkeit vom Alter. Der Normalbereich ist durch die 5., 50., und 95., Perzentile angegeben.

14 ASSAY EIGENSCHAFTEN UND VALIDIERUNG

14.1 Sensitivity

Die analytische Sensitivität wurde durch Messen des Leerwertes und der Berechnung der theoretischen Konzentration des Leerwertes + 2 SA bestimmt. Die analytische Sensitivität des ELISA E05 beträgt 0,2 ng/mL.

14.2 Spezifität

Keine messbare Kreuzreaktivität mit IGFBP-1 und IGFBP-3. Der Verdünnungspuffer **DIL** wurde mit rekombinanten Proteinen angereichert, die mit IGFBP-2 verwandt sind und die Kreuzreaktivität des Assays mit IGFBP-1 und IGFBP-3 untersucht. Weder 100 ng/mL IGFBP-1 noch 20 µg/mL IGFBP-3, führten zu einem Signal, das sich signifikant vom Leerwert unterscheidet.

14.3 Präzision

Die Inter- und Intra-Assay Variationskoeffizienten liegen beide deutlich unter 10 %.

Intra-Assay Variabilität

Zwei Proben wurden zwölfmal im gleichen Assay gemessen. Die Ergebnisse sind in Tabelle 3 gezeigt. Der gemessene Variationskoeffizient (VK) beträgt durchschnittlich 5,6 %.

Tabelle 3: Intra-Assay-Varianz

Probe 1 ng/mL	322	375	298	305	318	311	320	325	302	301	305	317	6,48 % VK
Probe 2 ng/mL	612	609	616	648	594	597	620	613	617	611	636	698	4,49 % VK

VK= Variationskoeffizient

14.4 Inter-Assay Variabilität

Serumproben wurden in unabhängigen Tests gemessen. Beispielhafte Ergebnisse sind in Tabelle 4 gezeigt.

Tabelle 4: Inter-Assay-Varianz

Probe 1 (ng/mL)	137	159	152	8 % VK
Probe 2 (ng/mL)	672	697	688	2 % VK
Probe 3 (ng/mL)	928	929	956	2 % VK

VK= Variationskoeffizient

14.5 Linearität

Der Mediagnost IGFBP-2 ELISA E05 ist über einen sehr weiten Bereich verdünnungsecht. Die Linearität von Seren Verdünnungen ist in Tabelle 5 dargestellt.

Tabelle 5: Linearität der Probenverdünnung

Verdünnung	Serum 1 (ng/mL)	Serum 2 (ng/mL)
1:10	938	582
1:20	1061	673
1:40	1055	719
1:80	1004	691
1:160	952	668

14.6 Wiederfindung

Rekombinantes IGFBP-2 wurde in drei verschiedenen Konzentrationen zu Humanserum gegeben. Die IGFBP-2-Konzentration wurde gemessen, die mittlere relative Wiederfindung im Vergleich zu Puffer betrug 108,7 %. Einige beispielhafte Daten sind in Tabelle 6 gezeigt.

Tabelle 6: Wiederfindung vom rekombinanten IGFBP-2

IGFBP-2 [ng/mL]	+1000 ng/mL	+500 ng/mL	+100 ng/mL	Mittelwert [ng/mL]
% Recovery	100,00	112,00	114,00	108,67

14.7 Interferenz

Die Interferenz physiologisch auftretender Substanzen, Bilirubin, Triglyzeride, Hämoglobin wurde durch Zugabe unterschiedlicher Mengen dieser Substanzen zu Serumproben getestet. In Tabelle 7 ist die relative Wiederfindung im Vergleich zum Serum ohne Zusätze für die maximal zugegebene Menge der potentiell interferierenden Substanz dargestellt.

Tabelle 7: %-Wiederfindung im Vergleich zum Normalserum

Bilirubin		Triglycerides		Hämoglobin	
[µg/mL]	%	[mg/mL]	%	[mg/mL]	%
25	95,07	12,5	100,79	0,125	99
50	92,80	25	101,01	0,25	105
100	93,83	50	103,65	0,5	100
200	88,15	100	101,34	1	100

Gebrauchsinformation für wissenschaftliche Anwendungen

15 WISSENSCHAFTLICHE ANWENDUNGEN

IGFBP-2 findet sich in unterschiedlichen Konzentrationen in verschiedenen Körperflüssigkeiten ebenso wie in Zellkulturmedien vieler Zelllinien.

15.1 Geeignete Proben für Forschungszwecke

Serum, EDTA-Plasma, Zerebrospinal Flüssigkeit, Amnionflüssigkeit, Muttermilch, Zellkulturüberstand und Saliva. Die IGFBP-2 Konzentrationen in anderen humanen Körperflüssigkeiten als Serum oder Plasma und in Kulturüberständen können stark von den Blutwerten abweichen, daher muss die optimale Verdünnung im Einzelfall vom Anwender ausgetestet werden.

Erwartungswerte von IGFBP-2 in anderen humanen Körperflüssigkeiten als Serum oder Plasma und in Zellkulturüberständen sind in Tabelle 8 beispielhaft dargestellt.

Tabelle 8: Beispielhafte Werte von IGFBP-2 in humanen Körperflüssigkeiten und in Zellkulturüberständen

Probenmaterial	Erwartungswert [ng/mL]
Serum	[100 - 1000]
Liquor	[100 - 300]
Amnionflüssigkeit	[200 - 10000]
Samenflüssigkeit	[5000 - 15000]
Muttermilch	[1500-3000]
Zellkulturüberstand	[5 - 300]

Tabelle 9: Linearität der Probenverdünnung.

Verdünnung	Liquor (ng/mL)	Amnionflüssigkeit (ng/mL)
1:10	426	nicht bestimmt
1:20	428	460
1:40	379	483
1:80	318	431
1:160	426	415

Tabelle 10: Ergebnisse von Wiederfindungstest in Saliva

Rekombinant IGFBP-2: 38,2 [ng/mL] % Wiederfindung		
Saliva + DIL	2,02	na
Saliva + rek. IGFBP-2	35,7	89
Saliva + rek. IGFBP-2	37,36	93
Saliva + rek. IGFBP-2	35,67	89
Saliva + rek. IGFBP-2	36,17	90

15.2 Kreuzreaktivität

Das Testsystem ist spezifisch für humanes IGFBP-2. Bei handelsüblichen Seren von Hunden, Pferden, Eseln, Katzen und Ziegen wurde ein geringer Grad an Kreuzreaktionen festgestellt. In Schweine-, Rinder, Kaninchen, Mäuse, Hühner, Ratten, Meerschweinchen- und Schafseren wurde keine Kreuzreaktivität gemessen.

ENGLISH - IGFBP-2 ELISA E05 INSTRUCTIONS FOR USE

TABLE OF CONTENTS

ENGLISH - IGFBP-2 ELISA E05 INSTRUCTIONS FOR USE	20
1 INTENDED USE	20
2 INTRODUCTION	20
3 PRINCIPLE	21
4 WARNINGS AND PRECAUTIONS	22
5 SAMPLES	23
6 MATERIALS	24
7 TECHNICAL NOTES	25
8 ASSAY PROCEDURE	26
9 QUALITY CONTROL	27
10 EVALUATION OF RESULTS	27
11 INTERPRETATION OF RESULTS	28
12 LIMITATIONS OF PROCEDURE	28
13 REFERENCE VALUES	29
14 PERFORMANCE CHARACTERISTICS	31
15 SCIENTIFIC APPLICATION	33
16 LITERATUR/ LITERATURE	34
17 INTERNATIONAL ASSAY DESCRIPTION	35
18 ASSAY PROCEDURE	36

ENGLISH - IGFBP-2 ELISA E05 INSTRUCTIONS FOR USE

IGFBP-2 ELISA E05	96 Determinations
CE	DE/CA40/00809/13/1
Principle of the test	Enzyme Immunoassay
Duration (incubation period)	1,75 h
Antibodies	specific, monoclonal antibody and high-affinity polyclonal antiserum, ready for use
Buffer	Ready for use and 20fold conc.
Calibrator	Single Calibrators with 2; 10; 20; 40 und 80 ng/mL IGFBP-2 rec. hIGFBP-2 , lyophilised
Calibration	Calibrated against recombinant IGFBP-2
Assay Range	0.2 ng/mL – 1680 ng/mL
Control	2 Controls, lyophilised
Sample	Serum und EDTA-Plasma
Required sample volume	15 µL
Sample dilution	1:21
Analytical sensitivity	ø 0.2 ng/mL
Intra- / Interassay Variance	ø ≤ 10 %
Reference values	Normal values for healthy individuals (1.5 to > 70 years) were evaluated for this assay.

1 INTENDED USE

Measurement of human IGFBP-2 in human serum, EDTA-plasma.

2 INTRODUCTION

Insulin-like growth factors (IGFs) regulate the proliferation, differentiation, apoptosis, cell adhesion and metabolism in various tissues and cell types. The IGF-I, which is produced mainly in liver under the influence of growth hormone (GH), regulates as hormone the linear growth of the bones and the process of sexual maturity, while IGF-II is mainly a growth factor of fetal tissue (11-13). The biological actions of IGF over the IGF-Type-I receptor are modulated variably through the IGF binding proteins (IGFBP-1 to-6) (14). IGFBP-2 is, after IGFBP-3, the second most frequent IGFBP in the human blood. IGFs, especially tumor typical pro-IGF-forms and hormones regulate the expression of IGFBP-2, GH effect is thereby inhibiting. At cellular level IGFBP-2 seems to stimulate the proliferation and dissemination of solid tumors via an IGF-independent mechanism (15,16).

IGFBP-2 is a unglycosylated polypeptide of 31.3 kDa, which forms binary IGF-complexes and shows no circadian rhythm in the circulation. The serum concentration of IGFBP-2 increases in fasting, after major surgery and after trauma, but the increasing of the concentration is most intensive in malignant diseases. The correlation of the IGFBP-2 level to the degree of progression is a striking feature in various tumor types as is the normalization of the IGFBP-serum levels after remission (5-10). During the GH-therapy, e.g. in short stature and in GH-abuse (doping) the IGFBP-2 level decreases. In Trisomy 18 IGFBP-2 in maternal serum is decreased and IGFBP-1 is increased; therefore the ratio IGFBP-2 /IGFBP-1 is a marker for this chromosome abnormality (17).

Clinical Implications

The IGFBP-2 concentration is age-dependent in blood (3).

Supplementary parameter to IGFBP-3 in the diagnosis of growth disorders (IGFBP-2/IGFBP-3 ratio), IGFBP-2 is an inhibitor of growth hormone action (3,4).

Progression-dependent tumor marker in leukaemia (5), astrocytic CNS tumors (6,7), prostate- (8), suprarenal cortex- (9)-, hepatocellular (10) and other carcinomas.

Anti-aging parameter: IGFBP-2 as a marker of physiological functionality (20).

3 PRINCIPLE

The Mediagnost ELISA for IGFBP-2 E05 is a so-called Sandwich-Assay using two specific and high affinity antibodies. The IGFBP-2 in the samples binds to the first antibody coated on the microtiter plate. In the following step the second specific anti-IGFBP-2-Antibody binds in turn to the immobilised IGFBP-2. The second antibody is biotinylated and will be applied in a mixture with a Streptavidin-Peroxidase-Enzyme Conjugate. In the closing substrate reaction the turn of the colour will be catalysed quantitatively depending on the IGFBP-2-level of the samples.

It recognizes IGFBP-2 quantitatively and is not influenced by increased IGF-I or IGF-II values. Related molecules such as IGFBP-3 do not show any cross-reactions in the test.

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

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 obviously 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. Material Safety Data Sheet is available on request.

Human Serum

Following components contain human serum: **Control CTR1 and CTR 2**

Source human serum for the control sera 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 CAL A-E, DET, EC, DIL, WB

Contain as preservative a mixture of **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' 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 STP

The Stop Solution contains 0.2 M acid sulphuric 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 EDTA-Plasma

5.2 Specimen collection

The blood sample for serum preparation should be gained according to standardized venipuncture procedure. Hemolytic reactions have to be avoided. The blood has to be allowed to clot and after complete clotting, serum is separated by centrifugation.

Whole blood should ideally be separated after about 2 hours and processed after 12 hours at the latest and stored at -20 ° C until the measurement.

Blood samples may be taken at any time of the day. Haemolytic reactions are to be avoided.

5.3 Required sample volume: 15 µL

5.4 Sample stability

In firmly closed sample vials:

- Storage at RT max. 24 hours
- Storage at -20°C min. 2 years

Samples are not allowed to have more than 10 freeze/thaw cycles.

5.5 Interference

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

5.6 Sample dilution

- Dilution: **1:21** with Dilution Buffer **DIL**
- Example: 15 µL sample are added to 300 µL Dilution Buffer **DIL** (dilution factor 21). After mixing this solution, 2 x 100 µL are used in the assay.
- The serum samples must be diluted 1:10 – 1:30 with Dilution Buffer **DIL** prior to measurement, depending on the expected IGFBP-2 values. In general, a dilution of 1:21 is suitable (and thus the minimum required sample volume for a duplicate determination is 15 µL serum). An extraction step is not required.

6 MATERIALS

6.1 Materials provided

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

MTP	Microtiter plate , ready for use, coated with mouse-anti-hlGFBP-2-antibody. Wells are separately breakable.	(8x12) wells
CAL A-E	Calibrators , lyophilized, (rec. hlGFBP-2), concentrations are given on vial labels and on quality certificate.	5 x 750 µL
CTR1	Control 1 , lyophilized, (human serum), concentration is given on quality certificate in ng/mL.	1 x 100 µL
CTR2	Control 2 , lyophilized, (human serum), concentration is given on quality certificate in ng/mL.	1 x 100 µL
DET	Antibody-HRP-Conjugate , rabbit-anti-hlGFBP-2-antibody biotinylated + streptavidin horseradish peroxidase conjugate ready for use.	1 x 12 mL
DIL	Dilution Buffer , ready for use	1 x 50 mL
WB	Washing Buffer , 20-fold concentrated solution	1 x 50 mL
S	Substrate , ready for use, horseradish-peroxidase-(HRP) substrate, stabilised Tetramethylbenzidine.	1 x 12 mL
STP	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 Certificate	1 x

6.2 Materials required, but not provided

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

7 TECHNICAL NOTES

Storage Conditions

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

Storage Life

The shelf life of the components **after initial opening** is warranted for **4 weeks**, store the unused strips and microtiter wells **airtight** together with the desiccant at 2-8°C in the clip-lock bag, use in the frame provided. The **reconstituted components** Calibrators **A-E** and Control **CTR1** and **CTR 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 **WB** is 4 weeks stable at 2-8°C

Preparation of reagents

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

Reconstitution

The Calibrators **A – E** and Control **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 Control **CTR1** and **CTR2** with the Dilution Buffer **DIL** in the same ratio (1:21) as the sample. The required volume of Washing Buffer **WB** is prepared by 1:20 dilution of the provided 20-fold concentrate with Aqua dest.

Assay Procedure

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

Manual washing should be used. Washing Buffer may be dispensed via a multistepper device, a multichannel pipette, or a squirt bottle. Decant contents into a biohazard bin, then blot plate on absorbent tissue. Wash the plate by adding 300µL Washing Buffer WB/well, then decant and blot on absorbent tissue. Repeat this step 4 more times for total of 5 washes.

8 ASSAY PROCEDURE

Preparation of reagents		Reconstitution:	Dilution
CAL A-E	Calibrators	in 750 µL Dilution Buffer DIL	-
CTR1	Control 1	in 100 µL Dilution Buffer DIL	1:21 with Dilution Buffer DIL
CTR2	Control 2	in 100 µL Dilution Buffer DIL	1:21 with Dilution Buffer DIL
WB	Washing Buffer Conc.	-	1:20 with Aqua dest. → WB 1:20
Dilute samples 1:21 in Dilution Buffer DIL, mix immediately, Use 100 µL for each well in the assay.			
Before assay procedure bring all reagents to room temperature +20-25°C.			
Assay procedure in double determination			
Pipette	Reagents		Position
100 µL	Dilution Buffer DIL (Blank)		A1/A2
100 µL	Calibrator A (2 ng/mL)		B1/B2
100 µL	Calibrator B (10 ng/mL)		C1/C2
100 µL	Calibrator C (20 ng/mL)		D1/D2
100 µL	Calibrator D (40 ng/mL)		E1/E2
100 µL	Calibrator E (80 ng/mL)		F1/F2
100 µL	Control CTR1 (1:21 diluted)		G1/G2
100 µL	Control CTR2 (1:21 diluted)		H1/H2
100 µL	Sample SPE (1:21 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			
5x 300 µL	Decant the contents of the wells and wash 5 x with 300 µL each Washing Buffer WB 1:20 / well		In each well
100 µL	Antibody-HRP-Conjugate DET		In each well
Cover the wells with the sealing tape.			
Incubation: 30 Minutes at +20-25°C, 350 rpm			
5x 300 µL	Decant the contents of the wells and wash 5 x with 300 µL each Washing Buffer WB 1:20 / well		In each well
100 µL	Substrate S		In each well
Incubation: 15 Minutes in the Dark at +20-25°C			
100 µL	Stop Solution STP		In each well
Measure the absorbance within 30 min at 450 nm with ≥ 590 nm as reference wavelength.			

9 QUALITY CONTROL

Good laboratory practice requires that controls are included in each assay. 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.

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

Calibrators are provided in the following IGFBP-2 concentrations

Calibrator	A	B	C	D	E
ng/mL	2	10	20	40	80

- 1) Calculate the **mean absorbance** value for the blank from the duplicated determination (well A1/A2).
- 2) Subtract the mean absorbance of the blank from the mean absorbances of all samples, controls and calibrators.
- 3) Plot the calibrator concentrations on the x-axis versus the mean value of the absorbance of the calibrators on the y-axis.
- 4) 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 **four parametric logistic (4-PL) curve fit** should be used for recalculation of IGFBP-2 concentrations.
- 5) The IGFBP-2 concentrations of the diluted samples or the diluted control CTR1 & CTR2 in ng/mL is calculated in this way, the IGFBP-2 concentration of the **undiluted sample** and of CTR1 & CTR2 is calculated **by multiplication** with the respective dilution factor.

10.2 Example of a typical calibration curve

The exemplary shown calibration curve in Fig.1 **cannot be used** for calculation of your test results. You have to establish a calibration curve for each test you conduct!

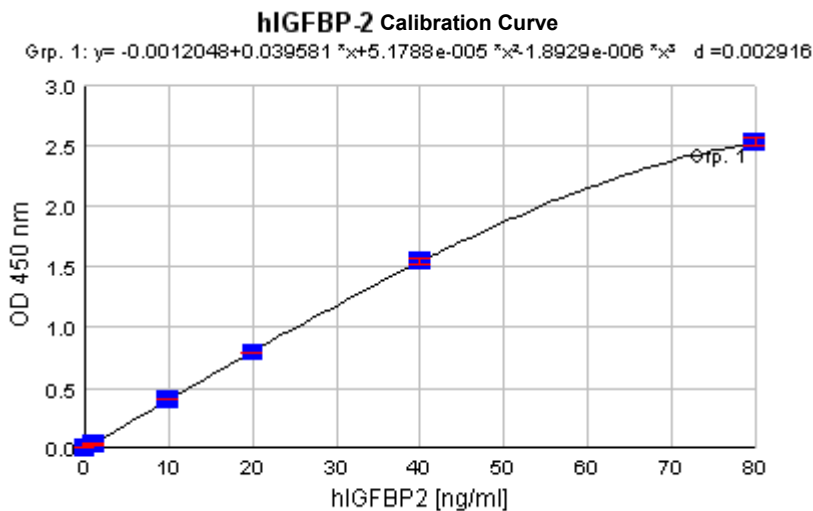


Fig 1. Exemplary Calibration Curve with a polynomial 3rd degree as curve fit

Exemplary calculation of the IGFBP-2 concentration of undiluted sample:

Measured extinction of your sample	0.37
Measured extinction of the blank	0.06

Your **measurement programm** will calculate the IGFBP-2 concentration of the diluted sample automatically by using the difference (0.31) of sample and blank for the calculation. You only have to determine the most suitable curve fit (here: polynomial 3rd degree).

In this exemplary case the following equation is solved by the programm to calculate the IGFBP-2 concentration in the sample:

$$0.31 = -0.0012048 + 0.039581x + 5.1788 \cdot 10^{-5} \cdot x^2 - 1.8929 \cdot 10^{-6} \cdot x^3$$

$$7.93 = x$$

if the dilution factor (**1:21**) is taken into account the IGFBP-2 concentration of the undiluted sample is $7.93 \cdot 21 = 166.55 \text{ ng/mL}$

11 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.

12 LIMITATIONS OF PROCEDURE

Deviation from the reference range can be expected especially in hypothyroidism, after major surgery, in polytrauma, in Diabetes mellitus (due to insulin therapy), in fasting and in malignant diseases.

The Mediagnost IGFBP-2 ELISA is based on mono- and polyclonal antibodies. Generally the result of any immunological test system can be influenced by heterophilic antibodies, anti-species antibodies or rheumatic factors. The assay design reduces these potential influences to a minimum but they cannot be excluded in any case.

13 REFERENCE VALUES

The IGFBP-2 concentration in serum is depended on Body Mass Index (BMI; Table 1) and on age (Table 2). For data collection of these reference values IGFBP-2 levels were determined in serum of over 400 normal children and adults (see table 2 figure 2); (3).

Table 1: BMI dependent reference values, adults between 20 and 80 years

BMI		mean		percentiles		
[kg/m ²]	n	IGFBP-2 [ng/mL]	SD	5.	50.	95.
15	12	612	110	431	612	793
17.5	14	568	126	361	568	775
20	76	509	144	271	509	746
22.5	124	449	162	182	449	716
25	101	398	165	127	398	670
27.5	52	348	147	106	348	590
30	25	315	118	120	315	510
32.5	15	282	90	135	282	430
35	4	251	80	119	251	383
37.5	4	220	71	104	220	336

SD = Standard Deviation, n=number

Table 2: IGFBP-2 serum levels (in ng/mL) of > 400 healthy individuals. The normal range is given by the 5., 50. and 95. percentile for age classes.

Age-dependent normal range of serum IGFBP-2

age (years)	5. percentile (ng/mL)	50. percentile (ng/mL)	95. percentile (ng/mL)
1	408	545	728
2	359	500	696
3	317	460	668
4	277	421	640
5	243	388	617
6	217	361	602
7	194	336	583
8	173	312	562
9	154	289	542
10	138	268	522
11	123	249	503
12	111	232	486
13	101	219	477
14	94	212	470
15	89	207	465
16	86	207	460
17	84	214	466
18	84	223	483
19	84	232	500
25	99	280	580
35	110	381	686
45	130	403	702
55	140	410	715
65	151	418	727
75	153	427	740
80	156	430	744

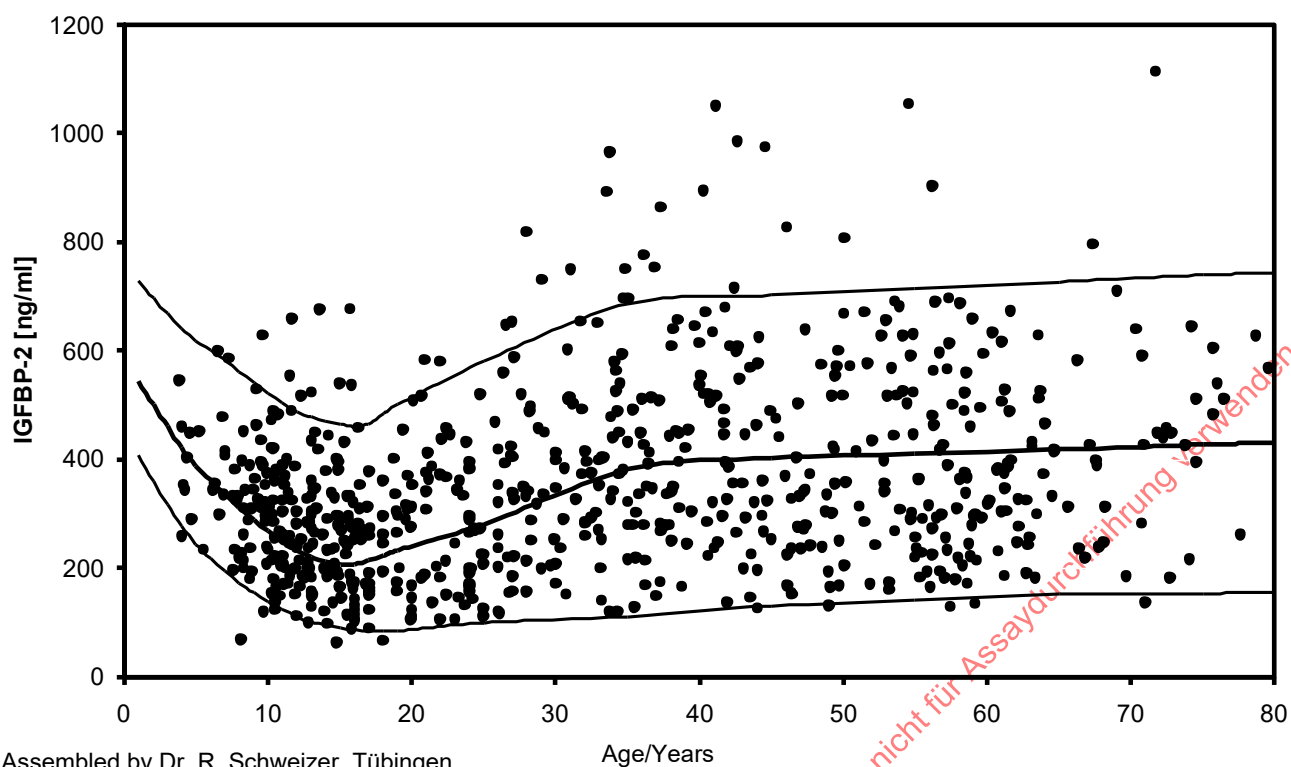


Fig. 2: IGFBP-2 serum levels (in ng/mL) of > 400 healthy individuals. The normal range is given by the 5th, 50th and 95th percentile.

14 PERFORMANCE CHARACTERISTICS

14.1 Sensitivity

Sensitivity was assed by measuring the blank and calculating the theoretical concentration of the blank + 2SD. The analytical sensitivity of the E05 is 0.2 ng/mL.

14.2 Specificity

The specificity of this ELISA was investigated. Neither 100 ng/mL IGFBP-1 nor 20 µg/mL IGFBP-3 containing samples resulted in a signal significantly different of the blank.

14.3 Precision

Intra-Assay Variance

The inter- and intra assay coefficients of variability are below 10%. Exemplary determinations are shown in table 3 and 4.

Table 3: Intra-Assay-Variation

Sample 1 ng/mL	322	375	298	305	318	311	320	325	302	301	305	317	6.48% CV
Sample 2 ng/mL	612	609	616	648	594	597	620	613	617	611	636	698	4.49% CV

CV: Coefficient of Variation

14.4 Inter-Assay

Serum samples were measured in independent assays. Exemplary results are shown in Table 4.

Table 4: Inter-Assay-Variation

Sample 1 (ng/mL)	137	159	152	8% CV
Sample 2 (ng/mL)	672	697	688	2% CV
Sample 3 (ng/mL)	928	929	956	2% CV

CV: Coefficient of Variation

14.5 Linearity

The Mediagnost IGFBP-2 ELISA E05 can be diluted over a very wide range. The linearity of serum dilutions is shown in table 5.

Table 5: Linearity of the sample dilution

Dilution	Serum 1 (ng/mL)	Serum 2 (ng/mL)
1:10	938	582
1:20	1061	673
1:40	1055	719
1:80	1004	691
1:160	952	668

14.6 Recovery

Recombinant IGFBP-2 was added in three different concentrations to human serum. The IGFBP-2 concentration was measured and the mean relative recovery in comparison to buffer was 108%. Some exemplary data are shown in table 6.

Table 6: Recovery of recombinant human IGFBP-2 in Serum

IGFBP-2 [ng/mL]	+1000 ng/mL	+500 ng/mL	+100 ng/mL	Mean [ng/mL]
% Recovery	100,00	112,00	114,00	108,67

14.7 Interference

Interference of bilirubin, triglycerides and hemoglobin was tested by adding different amounts of these substances to human serum containing IGFBP-2. For comparison the same amount of buffer without any substance was also added to the serum. Table 7 demonstrates that neither bilirubin nor triglycerides exert any influence on the measurement of IGFBP-2 in human serum.

Table 7: Interference

Bilirubin		Triglycerides		Hemoglobin	
[µg/mL]	%	[mg/mL]	%	[mg/mL]	%
25	95.07	12.5	100.79	0.125	99
50	92.80	25	101.01	0.25	105
100	93.83	50	103.65	0.5	100
200	88.15	100	101.34	1	100

Instructions for use for scientific application

15 SCIENTIFIC APPLICATION

IGFBP-2 is present in different concentrations in various body fluids and in conditioned cell culture media of many cell lines.

15.1 Samples suitable for scientific application

Cerebrospinal fluid, breast milk, amniotic fluid, saliva and in cell culture medium.

Table 8: Linearity of the sample dilution.

Dilution	Cerebrospinal fluid (ng/mL)	Amniotic fluid (ng/mL)
1:10	426	Not determined
1:20	428	460
1:40	379	483
1:80	318	431
1:160	426	415

Table 9: Expected values of IGFBP-2 in body fluids of human origin and in cell culture supernatants:

Sample	Expected Value [ng/mL]
Serum	[100 - 1000]
Cerebrospinal fluid	[100 - 300]
Amniotic fluid	[200 - 10000]
Seminal plasma	[5000 - 15000]
Breast milk	[1500 - 3000]
Cell culture supernatants	[5 - 300]

Table 10: Results of saliva-sample matrix tests:.

Recombinant IGFBP-2: 38,2 [ng/mL] % Recovery		
Saliva + DIL	2.02	n.a.
Saliva + rec. IGFBP-2	35.7	89
Saliva + rec. IGFBP-2	37.36	93
Saliva + rec. IGFBP-2	35.67	89
Saliva + rec. IGFBP-2	36.17	90

15.2 Cross reactions with animal samples

This assay is specific for human IGFBP-2, low degree of cross reactions was found with commercial dog, horse, donkey, cat and goat sera. No cross-reactivity was found with pig, bovine, rabbit, mouse, chicken, rat, guinea pig, sheep sera.

16 LITERATUR/ LITERATURE

Literature

1. Elmlinger MW, Wimmer K, Biemer E, Blum WF, Ranke MB, Dannecker GE, (1996) Insulin-like growth factor binding protein 2 is differentially expressed in leukaemic T-and B-cell lines. *Growth Regulation* 6, 152-157
2. Hoeflich A, Nedbal S, Blum WF, Erhard M, Lahm H, Brem G, Kolb HJ, Wanke R, Wolf E. (2001) Growth inhibition in giant growth hormone transgenic mice by overexpression of insulin-like growth factor-binding protein-2. *Endocrinology* 142:1889-98
3. 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. *Hormone Research* 54: 60-68
4. 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. *Hormone Research* 55: 115-124
5. Crofton PM, Ahmed SF, Wade JC, Elmlinger MW, Ranke MB, Kelnar CJH, Wallace WHB (1999) Effects of a third intensification block of chemotherapy on bone and collagen turnover, insulin-like growth factor I, its binding proteins and short-term growth in children with acute lymphoblastic leukemia. *European Journal of Cancer* 35: 960-967
6. Muller HL, Oh Y, Lehnbecher T, Blum WF, Rosenfeld RG.(1994) Insulin-like growth factor-binding protein-2 concentrations in cerebrospinal fluid and serum of children with malignant solid tumors or acute leukemia. *J Clin Endocrinol Metab.* 79: 428-34
7. Martin W Elmlinger, Martin H Deininger, Burkhardt S Schuett, Richard Meyermann, Frank Duffner, Ernst H Grote, and Michael B Ranke (2001) In vivo expression of the insulin-like growth factor binding protein-2 in human gliomas increases with the tumor grade. *Endocrinology* 142: 1652-1658
8. Cohen P, Peehl DM, Stamey TA, Wilson KF, Clemmons DR, Rosenfeld RG (1993) Elevated levels of insulin-like growth factor-binding protein-2 in the serum of prostate cancer patients. *J Clin Endocrinol Metab.* 76: 1031-1035
9. Boulle N, Baudin E, Gicquel C, Logie A, Bertherat J, Penfornis A, Bertagna X, Luton JP, Schlumberger M, Le Bouc Y. (2001) Evaluation of plasma insulin-like growth factor binding protein-2 as a marker for adrenocortical tumors. *Eur J Endocrinol.* 144: 29-36
10. Ranke MB, Maier KP, Schweizer R, Stadler B, Schleicher s, Elmlinger MW, Flehmig B (2003), Pilot study of elevated levels of insulin-like growth factor-binding protein-2 as indicators of hepatocellular carcinoma. *Horm Res* 60:174-180
11. Rosenfeld RG, Roberts CT Jr. (eds.) (1999) *The IGF system: Contemporary Endocrinology Series*; Humana Press
12. Jones JI, Clemmons DR. (1995) Insulin-like growth factors and their binding proteins: biological actions. *Endocr Rev.* 16: 3-34
13. Chard T (1994) Insulin-like growth factors and their binding proteins in normal and abnormal fetal growth. *Growth Reg* 4: 91-100
14. Ranke MB, Elmlinger MW (1997) Functional role of insulin-like growth factor binding proteins. *Hormone Research* 48 (suppl 4): 9-15
15. Elmlinger MW, Bell M, Schütt, BS, Langkamp M, Kutoh E, Ranke MB (2001) Transactivation of the IGFBP-2 promoter in human tumor cell lines. *Molecular and Cellular Endocrinology* 175: 211-218
16. Hoeflich A, Reisinger R, Lahm H, Kiess W, Blum WF, Kolb HJ, Weber MM, Wolf E. (2001) Insulin-like growth factor-binding protein 2 in tumorigenesis: protector or promoter? *Cancer Res.*15: 8601-8610
17. Miell JP, Langford KS, Jones JS, Noble P, Westwood M, White A, Nicolaides KH. (1997) 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.*82: 287-292
18. Elmlinger MW., Regine Grund, Michael Buck, Hartmut A Wollmann, Norman Feist, Matthias M. Weber, Christian C. Speer and Michael B. Ranke (1999). Limited proteolysis of the insulin-like growth factor binding protein (IGFBP)-2 by a specific serine protease activity in early breast milk. *Pediatric Research* 46: 76-81
19. Elmlinger MW, Michael S Sanatani, Mathias Bell, Günther E Dannecker, Michael B Ranke (1998) Elevated insulin-like growth factor (IGF) binding protein (IGFBP)-2 and IGFBP-4 expression of leukemic T-cells is affected by autocrine/paracrine IGF-II action but not by IGF type I receptor expression. *European Journal of Endocrinology* 138: 337-343
20. van den Beld, Blum W, Pols H, Grobbee D, Lamberts S (2003) Serum insulin-like growth factor binding protein-2 levels as an indicator of functional ability in elderly men. *European Journal of Endocrinology* 148: 627-634

17 INTERNATIONAL ASSAY DESCRIPTION

International Assay Description

CAL A-E	Rec in 750 µL DIL	-
CTR1	Rec in 100 µL DIL	1:21 DIL
CTR2	Rec in 100 µL DIL	1:21 DIL
WB 20x	-	1:20 A. dest. → WB 1:20
SPE	-	1:21 DIL
°C +20-25°C ; max 350 rpm		
100 µL	DIL	A1/A2
100 µL	CAL A (2 ng/mL)	B1/B2
100 µL	CAL B (10 ng/mL)	C1/C2
100 µL	CAL C (20 ng/mL)	D1/D2
100 µL	CAL D (40 ng/mL)	E1/E2
100 µL	CAL E (80 ng/mL)	F1/F2
100 µL	CTR1 1:21 DIL	G1/H1
100 µL	CTR1 1:21 DIL	H1/H2
100 µL	SPE 1:21 DIL	
TAPE		
1 h °C +20-25°C 350 rpm		
5x 300 µL	5x WB 1:20	
100 µL	DET	
TAPE		
0.5 h °C +20-25°C 350 rpm		
5x 300 µL	5x WB 1:20	
100 µL	S	
15 min °C +20-25°C		
STP		
MEASURE		

18 ASSAY PROCEDURE

Preparation of reagents		Reconstitution:	Dilution
CAL A-E	Calibrators	in 750 µL Dilution Buffer DIL	-
CTR1	Control 1	in 100 µL Dilution Buffer DIL	1:21 with Dilution Buffer DIL
CTR2	Control 2	in 100 µL Dilution Buffer DIL	1:21 with Dilution Buffer DIL
WB	Washing Buffer Conc.	-	1:20 with Aqua dest. → WB 1:20
Dilute samples 1:21 in Dilution Buffer DIL, mix immediately, Use 100 µL for each well in the assay.			
Before assay procedure bring all reagents to room temperature +20-25°C.			
Assay procedure in double determination			
Pipette	Reagents		Position
100 µL	Dilution Buffer DIL (Blank)		A1/A2
100 µL	Calibrator A (2 ng/mL)		B1/B2
100 µL	Calibrator B (10 ng/mL)		C1/C2
100 µL	Calibrator C (20 ng/mL)		D1/D2
100 µL	Calibrator D (40 ng/mL)		E1/E2
100 µL	Calibrator E (80 ng/mL)		F1/F2
100 µL	Control CTR1 (1:21 diluted)		G1/G2
100 µL	Control CTR2 (1:21 diluted)		H1/H2
100 µL	Sample SPE (1:21 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			
5x 300 µL	Decant the contents of the wells and wash 5 x with 300 µL each Washing Buffer WB 1:20 / well		In each well
100 µL	Antibody-POD-Conjugate DET		In each well
Cover the wells with the sealing tape.			
Incubation: 30 Minutes at +20-25°C, 350 rpm			
5x 300 µL	Decant the contents of the wells and wash 5 x with 300 µL each Washing Buffer WB 1:20 / well		In each well
100 µL	Substrate S		In each well
Incubation: 15 Minutes in the Dark at +20-25°C			
100 µL	Stop Solution STP		In each well
Measure the absorbance within 30 min at 450 nm with ≥ 590 nm as reference wavelength.			

Copy of the page 26