

IGF-II ELISA

Enzymimmunoassay für die quantitative Bestimmung von

humanem insulinähnlichem Wachstumsfaktor-II (IGF-II)

(IGFBP-blockiert)
Deutsch

Enzyme Immunoassay for Quantitative Determination of

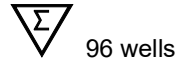
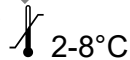
human Insulin-like Growth Factor-II (IGF-II)

(IGFBP-blocked)
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 **E30**



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/ Αεγυμίσκουπάρειν/ Ημερομηνία λήξης/ Data de expirare/ Rok uporabe/ Viimeinen käyttöpäivä
	Consider instructions for use/ Bitte Gebrauchsanweisung beachten/ Consultez la notice d'utilisation/ Consultare le istruzioni per l'uso/ Consulte las instrucciones de uso/ Respeitar as instruções de utilização/ A.u.b de gebruiksaanwijzing volgen/ Se brugsanvisningen/ Läs anvisningarna före användning/ Proszę przeczytać instrukcję obsługi/ Vegye figyelembe a használati utasításban foglaltakat/ Postupujte podľa pokynov na použitie/ Dodržujte návod k použití/ Моля, спазвайте инструкцията за употреба/ Palun järgige kasutusjuhendit/ Λάβετε υπόψη σας τις οδηγίες χρήσης/ Vá rugám sã respectați instrucțiunile de utilizare/ Upoštevaajte navodila za uporabo/ Lue käyttöohje huolellisesti!
IVD	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 orvosi diagnosztikai termék (in vitro diagnosztikai használathoz)/ In vitro diagnostický zdravotnícký materiál (určené na diagnostiku „in vitro“)/ In vitro diagnostický zdravotnícký materiál (určeno pro diagnostiku „in vitro“)/ Медицинско устройство за ин-витро диагностика (за ин-витро диагностика)/ In vitro diagnostikaseade (in vitro diagnostika tegemiseks)/ In vitro διαγνωστικό (για διάγνωση in vitro)/ Dispozitiv de diagnosticare in vitro (pentru diagnosticarea in-vitro)/ In vitro diagnostika (o in vitro diagnostiki)/ in vitro-diagnostiikkakäyttö
LOT	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-sarzs szám/ Číslo šarže/ Číslo šarže/ Партиден номер/Partii number/ Παρτίδα-αριθμός παρτίδας/ Lot-numär lot/ Številka serije/ Erä
	Manufactured by/ Hergestellt von/ Fabriqué par/ Prodotto da/ Fabricado por/ Fabricado por/ Vervaardigd doo/ Fabrikation af/ Tillverkad av/ Wyprodukowane przez/ Gyártotta/ Vyrobené/ Vyrobeno v/ Производител/ Tootja/ Κατασκευάζεται από/ Produs de/ Proizvajalec/ Valmistaja
REF	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/ Καταλογην номер/ Tellimisnumber/ Αρ. παραγγελίας/Număr comandă/ Številka naročila/ Viite tai tilausnumero
	Store at between/ Lagerung bei zwischen/ Conserver à entre/ Conservare a tra/ Conservar a temp. entre/ Armazenar entre/ Bewaar bij tussen/ Opbevaars mellem/ Förvaras vid/ Przechowywać w/ Tárolási tartomány/ Skladujte v rozsahu / Skladujte v rozmezí/ Температурно ограничение/ Säilittä temperatuuridel/ Φύλαξη σε θερμοκρασία/ Depozitare între/ Skladiščenje med/ Säilytys x-y Celsiusasteen lämpötilassa
	Contains sufficient for x tests/ Inhalt ausreichend für x Tests/ Contient suffisant pour x tests/ Contenuto sufficiente per x test/ Contenido suficiente para x pruebas/ Conteúdo suficiente para x testes/ Bevat voldoende voor x bepalingen/ Ineholder tilstrækkeligt til x prøver/ Innehållet räcker till x analyser/ Zawartość na x testów/ Tartalma x teszt elvégzésére elegendő/ Obsahuje materiál pre x testov/ Obsah 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 preizkusev/ 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
°C	Incubate at/ Inkubation bei/ Incuber à/ Incubare a/ incubar a/ Incubar a/ incubatietemperatuur/ Inkubation ved/ inkubation vid/ Inkubacja przy/ Inkubáció hőmérséklete/ Inkubácia pri/ Inkubace při/ Инкубира се при/ Inkubatsioon temperatuuril/ Επώαση στους/ Incubare la/ Inkubacija pri/ Inkubaatiolämpötila
	Shaking/ Schütteln/ Mélanger/ Agitare/ Agitar/ Agitação/ Schudden/ Ryster/ Skaka/ Wstrząsanie/ Rázás/ Pretrepāt/ Profēpāt/ Разклатяване/ Raputada/ Ανακινήστε/ Vibrare/ Stresite/ Sekoita
MTP	Mikrotiterplate/ Mikrotiterplatte/ plaque de microtitrage/ Piastra di microtitolazione/ Placa de microtitulación/ Placa de Microtitulação/ Microtiterplaat/ Mikrotiterplade/ mikrotiterplatta/ microtiterplaat/ Płytko microtiter/ Mikrotiter lap/ Mikrotitračná podložka/ Mikrotitrační podložka/ Микротитърна плака/ Mikrotiterplaat/ Τρυβλίο μικροτιτλοδότησης/ Microplacă/ Mikrotitrská plošča/ Mikrotittrauslevy
Rec in	Reconstitute in/ Rekonstituieren in/ Reconstituer dans/ Ricostituire nel/ Reconstituir en/ Reconstituier em/ Reconstituieren in/ Rekonstituér i/ Rekonstituera/ Rekonstituować w/ Helyreállítás/ Znovu pripravit za/ Znovu připravit za/ Разтваряне в/ Moodustada uuesti/ Ανασυστήστε σε/ Reconstituire în/ Predelava v/ Rekonstituoi
SPE	Sample/ Probe/ Echantillon/ Campione/ Muestra/ Amostra/ Monster/ Prøve/ prov/ Próbka/ Minta/ Vzorka/ Vzorek/ Проба/ Proov/ Δείγμα/ Probá/ Vzorec/ Näyte
DET	Antibody Conjugate/ Antikörperkonjugat/ Anticorps conjuguée/ Coniugato di anticorpo/ Conjugado de anticuerpos/ Conjugado anticorpo/ Antilichaamconjugaat/ Antistoffer-konjugat/ Antikroppskonjugat/ Koniugat antycial/ Antitest páros/ Protílátkový konjugát/ Protílátkový konjugát/ Антицяло конюгат/ Antikehad konjugaat/ Σύμπλοκο αντισώματος/ Compuși din anticorpi/ Antitelesa konjugat/ Vasta-aine konjugaatti

EC	Enzyme Conjugate/ Enzymkonjugat/ Conjugué enzymatique/ Coniugato di enzima/ Conjugado de enzimas/ Conjugado Enzima/ Enzymkonjugaat/ Enzym-konjugat/ Enzymkonjugat/ Koniugat enzymów/ Enzim páros/ Enzymatický konjugát/ Enzymatický konjugát/ ензим конюгат/ Ensüümi konjugaat/ Σύμπλοκο –ενζύμου/ Compuși din enzime/ Encima konjugat/ Entsými konjugaatti
SB	Sample Buffer/ Probenpuffer/ Tampon d'échantillon/ Buffer campione/ Tampón de muestra/ Tampão de amostra/ Monsterbuffer/ Prøvebuffer/ Provbuffers/ Bufor próbki/ Mintapuffer/ Pufir na vzorky/ Vzorkovací pufir/ Примерен буфер/ Proovipuhver/ Ρυθμιστικό διάλυμα δείγματος/ Tampon de probă/ Vzorčni puffer/ Näytepuskuri
X:X	Dilute / Verdünnen / Diluer / Diluire / Diluir / Diluir / Verdunnen / Fortyndes / Späd / Rozcieńczanie / Hígítás / Riedit / Ředit / Разреждане / Lahjendada / Αραιώστε / Diluați / Razredčiti / Laimennetaan
CAL	Calibrator X/ Kalibrator X/ calibrateur X/ calibratore X/ calibrador X/ calibrador X/ kalibrator X/ kalibrator X/ kalibrator X/ kalibrator X/ kalibrátor X/ kalibrátor X/ калибратор X/ калибратор X/ kalibraator 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 koncentrárum/ Koncentrát vymývacieho pufra/ Концентрат на промивен буфер/ Pesurpuhvi kontsentraat/ Συμπύκνωμα ρυθμιστικού διαλύματος έκπλυσης/ Concentrat pentru tamponul de spălare/ Koncentrat izpiralnega pufra/ 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 pufir/ Vymývací pufir/ Промивен буфер/ Pesurpuhver/ Ρυθμιστικό διάλυμα έκπλυσης/ Tampon pentru spălare/ Izpiralni pufir/ Pesuliuos
S	Substrate/ Substrat/ Substrat/ Substrato/ Substrato/ Substrato/ Substrat/ Substrat/ Substrat/ Substrat/ Substrat/ Substrat/ Substrat/ Substrat/ Szubsztrátum/ Substrát/ Substrát/ Субстрат Substraat/ Υπόστρωμα/ Substrat/ Substrat/ Substraattiliuos
STP	Stop Solution/ Stopplösung/ Stop Solution/ Soluzione di stop/ Stop Solución/ Solução Stop/ stopoplossing/ Stopopløsning/ Stopplösning/ Stop roztwór/ Megállító oldat/ Roztok na ukončenie/ Roztok pro ukončeni/ Стопираш разтвор/ Stopp-lahus/ Διάλυμα διακοπής/ Solutje de oprire/ Stop roztwór/ Pysätysliuos
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 płytke/ Tányér leragasztása/ Oblepiti podložku lepiaćou páskou/ Olepiti podložku lepící páskou/ Плака с лента за запечатване/ Katta plaat isoleerklleppindiga/ Κολλήστε το πλακίδιο με κολλητική ταινία/ Aoperiti placa cu o bandă adezivă/ Prelepiti ploščo/ Peitä mikrotitrauslevy oheisella teipillä
MEASURE	Measure plate within 30 min at 450 nm (Referencefilter ≥590 nm)/ Ausmessung innerhalb von 30 min bei 450 nm (Referenzfilter ≥ 590 nm)/ Measure lábsorbance en l'espce 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 referéncia ≥ 590 nm)/ Binnen 30 minuten bij 450 nm meten (referentiefilter ≥ 590 nm)/ Mál plade i løbet af 30 min ved nm (referencefilter ≥590 nm)/ Mät inom 30 min vid 450 nm (referensfilter ≥ 590 nm)/ Pomiar w ciągu 30 min przy 450 nm (filtr odniesienia ≥ 590 nm)/ Ki mérés 30 percen belül 450 nm-nél (referenciaszűrő ≥ 590 nm)/ Merať 30 minút pri 450 nm (Referenčných filtrov ≥590 nm)/ Měřit 30 minut při 450 nm (Referenční filtr ≥ 590 nm)/ Отчитане в рамките на 30 min при 450 nm (референтен филтър ≥ 590 nm)/ 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/ Bibliografía/ Literatura documentação/ literatuur/ Litteratur/ litteratur/ Literatura/ Irodalom/ Literatura/ Literatura/ Литература// Kirjandus/ Βιβλιογραφία/ Bibliografie/ literatura/ Lähdeluettelo
International Test description	International test description/ internationale Testanleitung/ description internationale de test/ Istruzioni per il test internazionale/ Descripción de ensayo internacional/ Descrição internacional do teste/ internationale testbeschrijving/ internationell testbeskrivning/ Opis testu międzynarodowego/ nemzetközi teszt-útmutató/ Medzinárodný návod k testu/ Mezinárodní návod k testu/ rahvusvaheline katse kirjeldus/ Διεθνείς οδηγίες για εργαστηριακές δοκιμές/ instrucțiuni internaționale pentru testare/ mednarodna navodila za preizkus/ Kansainvälinen käyttöohje
End	in all required wells/ in allen benötigten Vertiefungen/ dans tous les godets requis/ in tutti i pozzetti richiesti/ en todos los pozos requeridos/ em todos os tubos necessários/ in alle nodige putjes/ i alle nødvendige brønde/ i alla nödvändiga brunnar/ we wszystkich potrzebnych wgłębieniach/ minden szükséges forrásban/ vo všetkých potrebných miestach/ ve všech potřebných místech/ във всички необходими ямки/ kõigis vajalikes süvendites/ σε όλες τις απαραίτητες κοιλότητες/ în toate cavitățile necesare/ v vseh zahtevanih vdolbinah/ kaikkien tarvittaviin mikrotitrauslevyn syvennyksiin

INHALTSVERZEICHNIS / TABLE OF CONTENTS

DEUTSCH	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	15
15	VERGLEICHSTUDIEN	16
16	WISSENSCHAFTLICHE ANWENDUNGEN	18
ENGLISH	Instructions for use	20
17	LITERATUR / REFERENCES	34
18	INTERNATIONAL ASSAY DESCRIPTION	35
19	ASSAY PROCEDURE	36

DEUTSCH Gebrauchsanweisung

IGF-II ELISA E30	96 Bestimmungen
CE	DE/CA40/00809/26/1
Testprinzip	Enzymimmunoassay ELISA
Dauer (Inkubationszeit)	3 h
Antikörper-Konjugat	gebrauchsfertig
Enzymkonjugat	gebrauchsfertig
Puffer	gebrauchsfertig und 20fach Konzentrat
Substrat	gebrauchsfertig
Kalibratoren	5 Einzelkalibratoren: 0,45 - 9 ng/mL, gefriergetrocknet, humanes rekombinantes IGF-II
Referenzmaterial	Kalibriert am Internationalen Standard der WHO NIBSC 96/358
Assay Range	0,06 – 3636 ng/mL
Kontrolle	2 Kontrollen, gefriergetrocknet
Proben	humanes Serum / Plasma
Erforderliches Probenvolumen	10 µL
Probenverdünnung	1:404
Analytische Sensitivität	Ø 0,06 ng/mL
Durchschnittliche Intra- and Interassay Varianz	Ø < 10%
Referenzwerte	Blum W.F. Schweizer R., et.al.1990 Insulin-Like Growth Factors and Their Binding Proteins. In: Ranke MB, Mullins P.E. (ed.): Diagnostics of Endocrine Function in Children and Adolescents. Basel, Karger, 2003, pp.166-199

1 ZWECKBESTIMMUNG

Quantitative Messung von humanem insulinähnlichem Wachstumsfaktor II (IGF-II) in menschlichem Serum und Plasma für diagnostische und wissenschaftliche Zwecke.

2 EINFÜHRUNG

Die Insulin-like growth factors (IGF)-I und-II spielen eine Schlüsselrolle bei der Regulation von Proliferation und Differenzierung verschiedener Gewebe (1-3). IGF-II ist mit Somatomedin C (Inspektion-c) (4) identisch und hat ein Molekulargewicht von 7469 Dalton (5). Die wichtigsten Einflussfaktoren auf die IGF-II Expression im gesunden Menschen sind das Wachstumshormon (WH) und die Ernährung. Aber die IGF-II Synthese in spezifischen Geweben wird durch eine Vielzahl von Hormonen und anderer Peptid-Wachstumsfaktoren beeinflusst. Im Gegensatz zu vielen anderen Peptidhormonen sind IGFs mit hoher Affinität an spezifische Bindungsproteine (IGFBP) gebunden, neben den IGFBP 1-6 noch die IGFBP-related Proteins (7, 8). Sie binden entweder IGF-I und IGF-II mit ähnlicher Affinität oder weisen eine Präferenz für IGF-II auf (9,10). Die direkte Bestimmung von IGF-II in unbehandelten Serumproben (11) führt zu falschen Ergebnissen, da auf Grund der extrem langsamen Dissoziation des IGF/IGFBP Komplexes während der Assay-Inkubationszeit nur ein Teil des vorhandenen IGF-II an die Antikörper bindet und damit detektiert werden kann.

Daher wurden verschiedene Verfahren entwickelt, um vor der eigentlichen Messung IGF-II von seinen Bindungsproteinen abzutrennen: (a) Ausschlusschromatographie unter sauren Bedingungen, (b) Festphasenextraktion und (c) Säure-Alkohol-Extraktion (2,12,13). Diese Methoden sind jedoch entweder umständlich und zeitaufwendig oder führen zu unvollständiger und vor allem nicht reproduzierbarer Wiederfindung.

Der vorliegende Assay ist einfach und schnell durchzuführen und weist keine Abhängigkeit von der IGFBP-Konzentration auf. Er basiert auf der hohen Spezifität der Antikörper für IGF-II. Diese ermöglicht es, durch die Ansäuerung der Probe natives IGF-II aus dem Bindungsproteinkomplex zu lösen und die freiwerdenden Bindungsproteine mit IGF-I zu komplexieren, so dass das IGF-II aus der Probe frei in der Lösung vorliegt (15, 21, 23).

Indikation

Wissenschaftliche Untersuchungen im Rahmen neonataler Hypertrophie oder Hypotrophie (IGF-II ist ein fetaler Wachstumsfaktor) und Malignomerkrankungen (IGF-II ist ein onkogener Wachstumsfaktor). Altersabhängige Referenzwerte sind in Tabelle 1 dargestellt.

IGF-II scheint zur Differentialdiagnostik bei verschiedenen malignen Erkrankungen geeignet zu sein. Beispielsweise kann an Hand von IGF-II zwischen adrenocorticalen Tumoren und Adenomen differenziert werden. Auch beim Prostatakarzinom kann durch die Messung von IGF-II im Serum das Tumorstaging sowie die Differenzierung zwischen Karzinom und Hyperplasie verbessert werden (24,25). Neuere Ergebnisse aus der Neurologie zeigen, dass das IGF-System auch bei der Entwicklung vom Morbus Alzheimer und Parkinson von Bedeutung ist (26).

3 TESTPRINZIP

Der Mediagnost **IGF-II ELISA, E30**, ist ein sogenannter Sandwich-Assay unter Verwendung zweier spezifischer und hochaffiner Antikörper. IGF-II-IGFBP Komplexe werden durch die Verdünnung im sauren Puffer dissoziiert und dann die IGFBPs durch IGF-I Überschuss blockiert. Dies erlaubt die problemlose Messung des nun freien Gesamt-IGF-II. Bei diesem Verfahren werden also nicht die IGFBP-Moleküle per se entfernt, sondern lediglich deren Funktion, und damit ihre Interferenz im Assay, neutralisiert. Wegen der extrem niedrigen Kreuzreaktivität des IGF-II-Antikörpers mit IGF-I stört der hohe Überschuss an IGF-I die spezifische Interaktion mit IGF-II nicht.

Der an die Mikrotiterplatte gekoppelte erste Antikörper bindet IGF-II aus der Probe, welches im nachfolgenden Schritt vom Biotin-konjugierten anti-IGF-II-Antikörper erkannt wird. Danach bindet ein Streptavidin-Peroxidase-Enzymkonjugat hochspezifisch an Biotin. In der abschließenden Substratreaktion wird hochspezifisch der Farbumschlag katalysiert, quantitativ abhängig vom IGF-II-Gehalt der Proben.

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 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 DET, EC, SB, WB, A-E

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+	BEI KONTAKT MIT DEN AUGEN: einige Minuten lang behutsam mit Wasser spülen.
P338	Vorhandene Kontaktlinsen nach Möglichkeit entfernen. Weiter spülen.

Stopplösung SL

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.

Erste-Hilfe Maßnahmen:

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

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

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

5 PROBEN

5.1 Probenmaterial

Serum und Plasma

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

Eine eventuelle Verdünnung der Probe durch das Antikoagulans muss berücksichtigt werden.

5.2 Probenentnahme

Das Blut zur Probengewinnung mittels standardmäßiger Venenpunktion entnehmen.

Hämolytische Reaktionen sind zu vermeiden.

5.3 Erforderliches Probenvolumen: 10 µL

5.4 Probenstabilität

Generell sollten Proben so schnell wie möglich nach der Abnahme gekühlt werden. Falls zwischen Abnahme und Bestimmung ein längerer Zeitraum liegt, sollten die unverdünnten Proben bei -20°C oder kälter in fest verschließbaren Plastikgefäßen aufbewahrt werden. Wiederholtes Einfrieren und Auftauen von Serum/Plasma sollte prinzipiell vermieden werden (gegebenenfalls subaliquotieren) einige Zyklen haben in unseren Versuchen jedoch auf die messbare IGF-II Konzentration keine Auswirkungen gehabt.

5.5 Interferenz

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

5.6 Probenverdünnung

- Verdünnung: **1:404** mit Probenpuffer **SB**.
- **Einstufig:** **2015 µL Probenpuffer SB** in PE/PP-Gefäß vorlegen, dazu **5 µL** Probe zugeben, Endverdünnung von **(1:404)**. Nach dem Mischen die verdünnten Proben bei Raumtemperatur (20-25°C) min. 15 Minuten (max. 2 h) inkubieren. Im Assay von dieser Lösung 50 µL pro Bestimmung einsetzen.
- **Zweistufig:** Da die Pipettiergenauigkeit durch die Verwendung von 10 µL Probe steigen kann, ist alternativ eine 2-stufige Verdünnung möglich: **10 µL Probe** werden zu **1 mL** Probepuffer **SB** gegeben (Verdünnungsfaktor 101). In ein weiteres PE-/PP-Gefäß **150 µL** Probenpuffer **SB** vorlegen und **50 µL** von der gut durchmischten ersten Verdünnung geben (Verdünnungsfaktor 4). Mindestens 15 Minuten (max. 2 h) inkubieren. Nach dem Mischen von dieser Lösung mit einer Endverdünnung von (1:404), 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.

MTP	Mikrotiterplatte , gebrauchsfertig, beschichtet mit Maus-anti-hIGF-II-Antikörper. Die Vertiefungen sind einzeln abbrechbar.	(8x12) Vertiefungen
CAL A-E	Kalibratoren , lyophilisiert (humanes rek. IGF-II), die Konzentrationen sind auf den Etiketten und auf dem QC-Zertifikat angegeben.	5 x 500 µL
CTR1	Kontrolle 1 , lyophilisiert, (humanes Serum), die Konzentration ist auf dem QC-Zertifikat angegeben.	1x 250 µL
CTR2	Kontrolle 2 , lyophilisiert, (humanes Serum), die Konzentration ist auf dem QC-Zertifikat angegeben.	1x 250 µL
DET	Antikörper-Konjugat , gebrauchsfertig, Ziegen-anti-hIGF-II-Antikörper biotinyliert.	1 x 6 mL
EC	Enzymkonjugat , gebrauchsfertig, POD (Meerrettich-Peroxidase) markiertes Streptavidin.	1 x 12 mL
SB	Probenpuffer , gebrauchsfertig. Bitte vor Gebrauch Schütteln!	1 x 125 mL
WB	Waschpuffer WB , 20fach konzentrierte Lösung	1 x 50 mL
S	Substrat S , gebrauchsfertig, Meerrettich-Peroxidase (POD)-Substrat, stabilisiertes Tetramethylbenzidin.	1 x 12 mL
STP	Stopplösung STP , gebrauchsfertig, 0,2 M Schwefelsäure.	1 x 12 mL
-	Abdeckfolie für die Mikrotiterplatte	2 x
	Packungsbeilage	1 x
-	Qualitätskontrollzertifikat (QC-Zertifikat)	1 x

6.2 Nicht mitgelieferte, benötigte Materialien

- Entmineralisiertes Wasser oder destilliertes Wasser (Aqua destillata) (**A. dest.**), 950 mL für die Verdünnung vom Waschpuffer-Konzentrat **WB**.
- 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 **A – E** und Kontrollen **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 4 Wochen haltbar bei 2 - 8°C.

Vorbereitung der Reagenzien

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

Rekonstitution

Die Kalibratoren **A – E** und Kontrollen **CTR1 und CTR2** werden mit dem im Kit enthaltenen Probenpuffer **SB** 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 (1:404) wie die Proben mit dem Probenpuffer **SB** 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-Konjugat **DET** und 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 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 Geräte-Einstellungen 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 schwungvolles Ausschwenken der Mikrotiterplatte über einem Becken entfernt werden. Falls Absaugvorrichtungen eingesetzt werden, ist darauf zu achten, dass die Oberflächen der Vertiefungen der Mikrotiterplatte nicht beschädigt werden. Nach jedem einzelnen Waschzyklus sollte die verbleibende Restflüssigkeit durch Ausklopfen der Mikrotiterplatte auf nicht fuselndem Zellstoff gründlich entfernt werden.

8 TESTDURCHFÜHRUNG

Reagenzpräparation:		Rekonstitution:	Verdünnung:
CAL A-E	Kalibratoren	In 500 µL Probenpuffer SB	-
CTR1	Kontrolle 1	in 250 µL Probenpuffer SB	1:404 mit Probenpuffer SB
CTR2	Kontrolle 2	in 250 µL Probenpuffer SB	1:404 mit Probenpuffer SB
WB	Waschpuffer Konz.	-	1:20 mit Aqua dest. → WB 1:20
Proben <u>SPE</u> und Kontrollen (CTR1, CTR2) jeweils mit Probenpuffer SB 1:404 verdünnen , sofort mischen. Mind. 15 min., max. 120 min bei Raumtemperatur (20-25°C) inkubieren. Davon je 50 µL pro Bestimmung einsetzen.			
Vor der Testdurchführung alle Reagenzien auf Raumtemperatur (20-25°C) bringen.			
Testdurchführung in Doppelbestimmung:			
Pipettieren	Reagenzien	Position	
50 µL	Antikörper-Konjugat DET	in alle benötigten Vertiefungen pipettieren	
50 µL	Probenpuffer SB (Leerwert)	A1/A2	
50 µL	Kalibrator A (0,45 ng/mL)	B1/B2	
50 µL	Kalibrator B (1,5 ng/mL)	C1/C2	
50 µL	Kalibrator C (3 ng/mL)	D1/D2	
50 µL	Kalibrator D (5,63 ng/mL)	E1/E2	
50 µL	Kalibrator E (9 ng/mL)	F1/F2	
50 µL	Kontrolle CTR1 (1:404 verdünnt)	G1/G2	
50 µL	Kontrolle CTR2 (1:404 verdünnt)	H1/H2	
50 µL	Probe SPE (1:404 verdünnt)	in die restlichen Vertiefungen nach Bedarf pipettieren	
Mit Klebefolie die Vertiefungen dicht abdecken.			
Inkubation: 2 h bei 20-25°C, 350 rpm			
5x 300 µL	Absaugen und die Platte 5x mit je 300 µL Waschpuffer WB WB 1:20 / Vertiefung waschen.	In jede Vertiefung	
100 µL	Enzymkonjugat EC		
Mit Klebefolie die Vertiefungen dicht abdecken.			
Inkubation: 30 min 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: 30 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. 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 Leerwertes 0,25 Einheiten nicht überschreiten, Kalibrator E sollte dagegen Extinktionen über 1,0 Einheiten erreichen. Proben, die höhere Extinktionen als der Kalibrator E erzielen, liegen außerhalb der Kalibrationskurve, zur sicheren Bestimmung sollten diese Proben in einer zweiten Testdurchführung bei höherer Verdünnung nochmals bestimmt werden.

10 AUSWERTUNG

10.1 Erstellung der Kalibrationskurve

Die bereitgestellten Kalibratoren enthalten folgende human IGF-II-Konzentrationen:

Kalibrator	CAL A	CAL B	CAL C	CAL D	CAL E
ng/mL	0,45	1,5	3	5,63	9

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

10.2 Beispiel einer typische 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.

	Leerwert	CAL A	CAL B	CAL C	CAL D	CAL E
ng/mL	0	0,45	1,5	3	5,63	9
OD (450-620 nm)	0,0329	0,127	0,4195	0,8595	1,3695	1,855

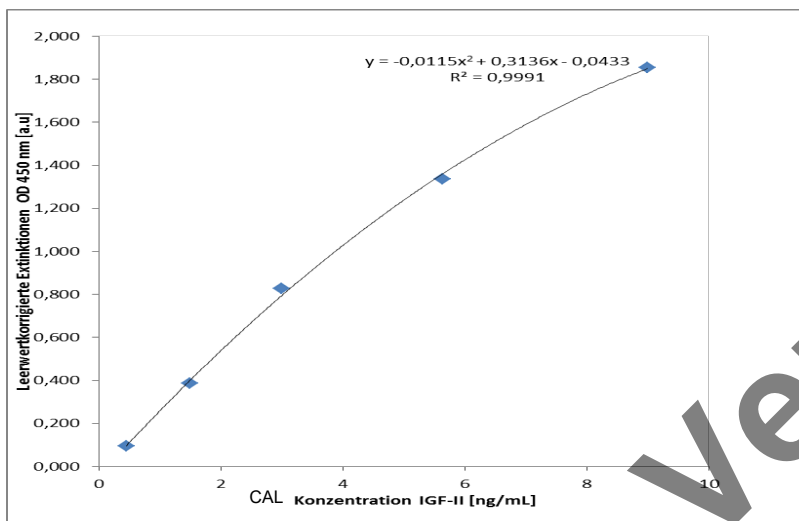


Abbildung 1 Exemplarische Kalibrationskurve

10.3 Beispielhafte Berechnung der IGF-II-Konzentration

Probenverdünnung: 1:404

Gemessene Extinktion der Probe: 0,449

Gemessene Extinktion des Leerwertes: 0,0329

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

$$0,4161 = -0,0115x^2 + 0,3136x - 0,0433$$
$$X = 1,49 \text{ ng/mL}$$

und unter Berücksichtigung des Verdünnungsfaktors (**404**) somit eine IGF-II Konzentration in der unverdünnten Probe von

$$1,49 \text{ ng/mL} \times 404 = 601,96 \text{ ng/mL} = 0,602 \text{ mg/L}$$

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

12 EINSCHRÄNKUNGEN

Der Mediagnost IGF-II ELISA E30 basiert auf spezifischen Antikörpern. Im Allgemeinen kann diese Technik durch heterophile Antikörper in der Probe beeinflusst werden. Der Einfluss der heterophilen Antikörper wird durch das Assay-Design reduziert, aber kann nicht vollständig ausgeschlossen werden.

13 REFERENZWERTE

Tabelle 1 IGF-II Serumkonzentrationen in ng/mL von gesunden Personen verschiedenen Alters

Perzentile			
Alters Gruppe	5.	50.	95.
Neugeborene	158	284	516
1-4 Wochen	350	486	673
1-6 Monate	348	551	871
6-12 Monate	388	582	876
1-3 Jahre	384	596	926
3-5 Jahre	397	617	920
5-7 Jahre	419	638	973
7-9 Jahre	433	656	997
9-11 Jahre	442	662	994
11-13 Jahre	448	671	1006
13-15 Jahre	455	679	1014
15-17 Jahre	452	686	1042
20-30 Jahre	436	679	1058
30-40 Jahre	442	680	1049
40-50 Jahre	407	650	1039
50-60 Jahre	396	644	1049
60-70 Jahre	373	611	1000

* Die Messungen wurden nach einer Säure-Alkohol-Extraktion durchgeführt und die Messwerte wurden entsprechend der Wiederfindungsrate korrigiert (Korrekturfaktor 1,2).

(Blum W., Schweizer R.: Insulin-like growth factors and their binding proteins; in Ranke MB (ed): Diagnostics of endocrine function in children and adolescents. Basel, Karger, 2003, pp 166-199 (22).

14 ASSAY EIGENSCHAFTEN UND VALIDIERUNG

14.1 Sensitivität

Die Sensitivität wurde durch Messen des Leerwerts und durch Berechnung der theoretischen Konzentration der zweifachen Standardabweichung des Leerwerts evaluiert. Die mittlere analytische Sensitivität des E30 beträgt 0,06 ng/mL (Bereich 0,01 bis 0,223, n = 7).

14.2 Spezifität

IGF-I, ein zu IGF-II homologes Molekül, wurde in drei verschiedenen Konzentrationen (250, 750, 1250 ng/mL) verdünnt und mit dem IGF-II-ELISA getestet. Keine der Proben ergab ein signifikantes Signal.

14.3 Präzision

Intra- / Inter-Assay-Varianz

Die Inter- und Intra-Assay-Variationskoeffizienten betragen im Mittel < 10%.

Beispielhafte Bestimmungen sind in den Tabellen 2 und 3 dargestellt.

Tabelle 2 Intra-Assay-Variation

	Number [n]	Mean value [ng/mL]	Standard deviation [ng/mL]	Variation Coefficient [%]
Sample 1	16	666	20	3.07
Sample 2	16	875	58	6.61
Sample 3	20	621	26	4.17
Sample 4	19	670	41	6.13
Sample 5	20	795	42	5.29

Tabelle 3 Inter-Assay-Variation innerhalb einer Charge, gemessen innerhalb von 10 Monaten.

	Number [n]	Mean value [ng/mL]	Standard deviation [ng/mL]	Variation Coefficient [%]
Sample 1	18	1019	86.4	8.49
Sample 2	18	692	55.4	8.00
Sample 3	18	570	41.2	7.28

14.4 Linearität

Die Linearität wurde durch Verdünnung von drei verschiedenen Serum-Proben mit bekannter IGF-II-Konzentration nachgewiesen. Die IGF-II-Konzentration der verdünnten Probe (1:100 – 1:800) wurde gemessen und mit der Konzentration des Zielwertes verglichen. Die linearen Regressionsanalysen sind in der Abbildung 2 dargestellt.

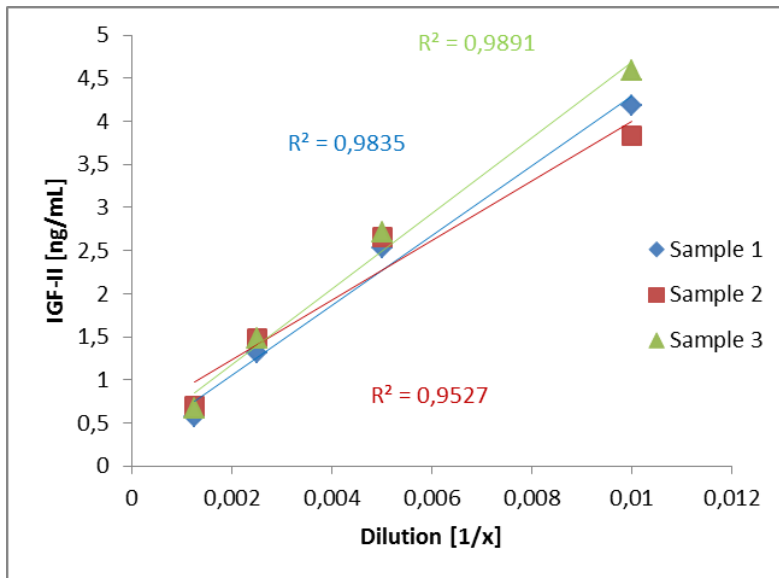


Abbildung 2 Linearität. Dargestellt sind die gemessenen Konzentrationen in verschiedenen Verdünnungen von drei Serumproben.

14.5 Interferenz

Die Interferenz physiologisch auftretender Substanzen wurde durch Zugabe unterschiedlicher Mengen dieser Substanzen zu IGF-II haltigen Serum-Proben getestet.

Zum Vergleich wurde die gleiche Menge an Puffer ohne Substanzen dem Serum zugesetzt.

Tabelle 4 zeigt, dass weder Triglyceride, Bilirubin noch Hämoglobin einen Einfluss auf die Messung des IGF-II in menschlichem Serum haben.

Tabelle 4 Interferenz. Serumproben wurden mit den angegebenen Mengen der potentiell störenden Substanzen angereichert. Die Wiederfindung (%) im Vergleich zu den nicht-angereicherten Proben wurde berechnet, um den Einfluss von Triglyceriden, Bilirubin und Hämoglobin auf die IGF-II-Messungen zu beurteilen.

	Triglyceride 100 mg/mL	Bilirubin 200 µg/mL	Hämoglobin 1 mg/mL
Wiederfindung	%	%	%
Probe 1	97	103	102
Probe 2	95	95	91
Probe 3	90	111	119

15 VERGLEICHSTUDIEN

Das Testsystem wurde mit einem unabhängigen In-House-Assay verglichen, der vom Universitätskinderklinikum Tübingen für die klinische Routine verwendet wurde. Es wurde ein guter Korrelationskoeffizient bestimmt ($R^2=0,8$). Die Bablok-Regressionsanalyse ergab eine Regressionslinie, die durch $y = 18 + 1,3x$ (RSD 87) beschrieben wird. Der systematische Fehler ist vernachlässigbar und die proportionale Abweichung von 30 % ist wahrscheinlich auf die Verwendung unterschiedlicher Antikörper und Kalibrierungsmaterialien zurückzuführen.

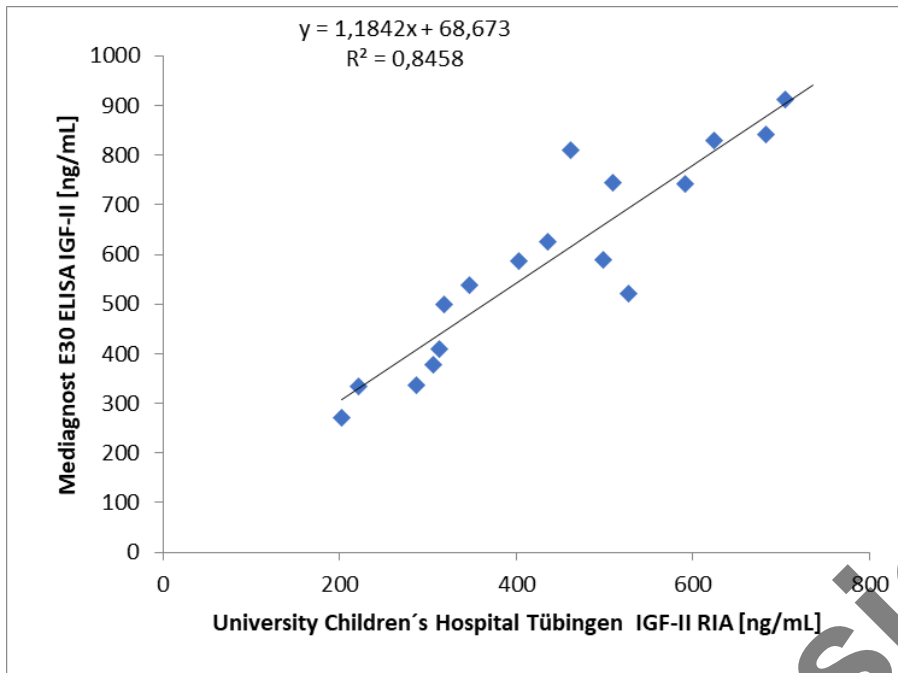


Abbildung 3 Assay-Vergleich mit einem Inhouse-Assay des Universitätskinderkrankenhauses Tübingen (n = 18)

Example Version

Gebrauchsinformation für wissenschaftliche Anwendungen

16 WISSENSCHAFTLICHE ANWENDUNGEN

IGF-II findet sich in sehr niedrigen Konzentrationen in verschiedenen Körperflüssigkeiten ebenso wie in Zellkulturmedien vieler Zelllinien.

16.1 Proben

Geeignet sind Serumproben sowie Heparin-, EDTA- und Citrat-Plasmaproben. Eine eventuelle Verdünnung der Probe durch das Antikoagulans muss berücksichtigt werden. Eine spezielle externe Probenvorbereitung ist nicht nötig.

Darüber hinaus sind als Proben geeignet: **Urin**, **Speichel** (geringer Gehalt, mind. 1:10 verdünnt) **Liquor** (CSF; mind. 1:10 verdünnt) und **Zellkulturmedium** (mit 5% FCS, mind. 1:5 verdünnt). Die IGF-II Konzentrationen in anderen humanen Körperflüssigkeiten und in Kulturüberständen können stark von den Serumwerten abweichen.

Tabelle 5 Ergebnisse von Proben-Matrix Tests. 4 ng/mL IGF-II wurde zugefügt in die entsprechend verdünnten Proben. Die angereicherten Proben wurden ohne weitere Verdünnung gemessen. Angezeigt ist die relative Wiederfindung vom zugesetzten IGF-II im angereicherten Probenpuffer.

	Native IGF-II Konzentration [ng/mL]	IGF-II [ng/mL]	Wiederfindung %
Liquor cerebrospinalis	2,86	4,39	31,1
1:2	3,2	5,51	57,8
1:5	3,84	6,78	73,5
1:10	3,03	6,48	86,3
Urin	0,36	4,5	103,5
1:2	0,35	4,92	92,9
1:5	0,35	5,17	98,0
1:10	0,35	5,06	95,7
Speichel	0,38	3,06	67,0
1:2	0,35	3,99	74,0
1:5	0,24	4,1	78,5
1:10	0,34	4,32	80,9
Zellkulturüberstand	0,38	3,06	67,0
1:2	0,35	3,99	91,0
1:5	0,24	4,1	96,5
1:10	0,34	4,32	99,5
Zellkulturüberstand 5%FKS	0,4	3,62	80,5
1:2	0,4	3,53	78,3
1:5	0,7	5,55	121,3
1:10	0,5	5,74	131,0

16.2 Kreuzreaktivität mit tierischen Proben

Es wurde nachgewiesen, dass der Test als heterologer Assay für IGF-II-Messung in Serumproben von Rindern und Schweinen eingesetzt werden kann. Artsspezifische Kalibrierung muss durch den Benutzer durchgeführt werden.

ENGLISH	Instructions for use.....	20
1	INTENDED USE.....	20
2	INTRODUCTION.....	20
3	ASSAY 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.....	29
12	LIMITATION OF PROCEDURE.....	29
13	REFERENCE VALUES.....	29
14	PERFORMANCE CHARACTERISTICS.....	30
15	COMPARISON WITH OTHER ASSAYS.....	31
16	SCIENTIFIC APPLICATION.....	33
17	LITERATUR / REFERENCES.....	34
18	INTERNATIONAL ASSAY DESCRIPTION.....	35
19	ASSAY PROCEDURE.....	36

ENGLISH**Instructions for use**

IGF-II ELISA	96 Determinations
CE	DE/CA40/00809/26
Principle of the test	Enzyme Immunoassay
Duration (incubation period)	3 h
Antibody Conjugate	ready for use
Enzyme Conjugate	ready for use
Buffer	ready for use and 20fold concentrate
Substrate	ready for use
Calibrators	5 single Calibrators: 0.45 - 9 ng/mL, lyophilized, human recombinant IGF-II
Reference material	Calibrated against the International Standard WHO/NIBSC 96/538
Assay Range	0.06 – 3636 ng/mL
Control	2 Controls, lyophilised
Sample	human serum / plasma
Required sample volume	10 µL
Sample dilution	1:404
Analytical sensitivity	Ø 0.06 ng/mL
average Intra- / Inter-Assay Variance	Ø < 10%
Reference Values	Blum W.F et.al.1990 Insulin-Like Growth Factors and Their Binding Proteins. In: Ranke MB, Mullins P.E.(ed): Diagnostics of Endocrine Function in Children and Adolescents. Basel, Karger, 2011, pp.157-181

1 INTENDED USE

This enzyme immunoassay kit is suited for measuring IGF-II, human Insulin-like Growth Factor-II, in human serum and plasma for diagnostic and scientific purposes.

2 INTRODUCTION

The insulin-like growth factors (IGF)-I and -II play a pivotal role in the regulation of proliferation and differentiation of several tissue types (1-3). IGF-I also called Somatomedin C (4) has a molecular weight of 7.469 kDa (5). Its expression is mainly regulated by Growth Hormone and nutrition (6). But several hormones and peptide factors are known to influence IGF-II synthesis in different tissues. Bioavailability of the IGFs is regulated by specific binding proteins (IGFBP). Beside the high affinity Insulin-like Growth Factor Binding Proteins 1-6, IGFs are also bound by IGFBP-related Proteins (7, 8, 22). These binding proteins bind IGF-I and IGF-II with the same affinity or prefer IGF-II (9, 10). Direct measurement of IGFs in serum samples without pretreatment results in false values because of the extremely slow dissociation of the IGF/IGFBP complexes during the assay incubation only a part of the IGF-II in the specimen can bind to the antibodies and be detected.

Therefore, various techniques were applied to physically separate IGF-II from its binding proteins before measurement, including (a) size exclusion chromatography under acidic conditions, (b) solid-phase extraction and (c) acid-ethanol extraction (2, 12, 13) These

techniques, however, are either inconvenient or time-consuming or give incomplete and not-reproducible recoveries.

This assay is easy, fast and results do not depend on the binding protein concentration of the sample. It is based on the high specificity of the employed antibodies for IGF-II. There is virtually no cross-reactivity with IGF-I. This allows the separation of IGF-II from the binding proteins by acidification and blocking of the free binding proteins with IGF-I. Thus, the endogenous IGF-II is free in solution (15, 21, 23).

Indication

Scientific studies in the context of neonatal hypertrophy or hypotrophy (IGF-II is a fetal growth factor) and malignancy (IGF-II is an oncogenic growth factor). Age-related reference values are shown in Table 1. IGF-II appears to be suitable for differential diagnosis in various malignant diseases. For example, IGF-II can be used to differentiate between adrenocortical tumors and adenomas. In prostate cancer, too, tumor staging and the differentiation between carcinoma and hyperplasia can be improved by measuring IGF-II in serum (24, 25). Recent results from neurology show that the IGF system is also important in the development of Alzheimer's and Parkinson's disease (26).

3 ASSAY PRINCIPLE

The Mediagnost ELISA for IGF-II E30 is a so-called Sandwich-Assay. It utilizes two specific and high affinity antibodies for this protein. The first antibody, immobilized on the microtiter plate, and the added second biotinylated antibody are binding the IGF-II in the sample. The Streptavidin-Peroxidase Enzyme Conjugate subsequently binds to the complex. In the closing substrate reaction, the turn of the colour will be high specific catalysed, quantitatively depending on the IGF-II-level of the samples.

IGF-II-IGFBP complex is dissociated by dilution in an acidic buffer. IGFBPs are blocked by IGF-I excess, thus allowing the measurement of free IGF-II. With this method, the IGFBPs are not removed, but their function and therefore their interference in the assay is neutralized.

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

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**

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 DET, EC, SB, A-E, 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 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 Plasma

Serum and Heparin/ EDTA/ Citrate Plasma yield comparable values.
Possible dilution of the sample by the anticoagulant must be considered.

5.2 Specimen collection

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

5.3 Required sample volume: 10 µL

5.4 Sample stability

Samples should be handled as recommended in general: as fast as possible and chilled as soon as possible. In case there will be a longer period between the sample withdrawal and determination store the undiluted samples frozen -20°C or below in tightly closable plastic tubes. Avoid on principal repeated freeze-thaw cycles of serum/plasma (if required, please subaliquote) although IGF-II levels were found to be unaffected by few cycles in our experiments.

5.5 Interference

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

5.6 Sample dilution


Suggestion for dilution protocol:

- Dilution: **1:404** with Sample Buffer **SB**.
- **1-step dilution:**
Please pipette **2015 µL** Sample Buffer **SB** in PE/PP-Tubes (application of a multi-stepper is recommended in larger series); subsequently **add 5 µL** sample (dilution 1:404). Incubate at least for 15 Minutes, max. 2 h, use 50 µL in Assay
- **2-step dilution:**
Because the pipetting accuracy can rise by the use of 10 µL sample, a 2-step dilution is alternatively possible, for this place **1000 µL** Sample Buffer **SB** in in PE/PP-Tubes, add **10 µL sample** (samples are 1:101 diluted), mix from this solution **50 µL** with **150 µL** Sample Buffer **SB** (samples are 1:404 diluted). Incubate at least for 15 Minutes, max. 2 h, use 50 µL in Assay.

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-hIGF-II antibody. Wells are separately breakable.	(8x12) wells
CAL A-E	Calibrators , lyophilized, (recombinant human IGF-II), concentrations are given on vial labels and on the QC-certificate.	5 x 500 µL
CTR1	Control 1 , lyophilised, (human serum), concentration is given on the QC-certificate.	1 x 250 µL
CTR2	Control 2 , lyophilised, (human serum), concentration is given on the QC-certificate.	1 x 250 µL
DET	Antibody Conjugate , ready for use, contains coat anti-hIGF-II antibody.	1 x 6 mL
EC	Enzyme Conjugate , ready for use, contains horseradish-peroxidase conjugate to streptavidin,	1 x 12 mL
SB	Sample Buffer , ready for use, Please shake before use!	1 x 125 mL
WB	Washing Buffer , 20-fold concentrated solution	1 x 50 mL
S	Substrate , ready for use, horseradish-peroxidase-substrate, stabilised Tetramethylbencidine.	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 Control Certificate	1 x

6.2 Material is required, but not provided

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

7 TECHNICAL NOTES

Storage Conditions

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

Storage Life

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

Preparation of reagents

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

Reconstitution

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

Dilution

After reconstitution dilute the Controls **CTR1** and **CTR2** with the Sample Buffer **SB** in the same ratio (1:404) as the sample. The required volume of Washing Buffer **WB** is prepared by 1:20 dilution of the provided 20fold concentrate with Aqua dest.

Assay Procedure

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

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

Incubation

Incubation at room temperature means: Incubation at 20 - 25°C. The Substrate **S**, stabilised Tetramethylbencidine, is photosensitive—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
CAL A-E	Calibrators	in 500 µL Sample Buffer SB	-
CTR1	Control 1	in 250 µL Sample Buffer SB	1:404 with Sample Buffer SB
CTR2	Control 2	in 250 µL Sample Buffer SB	1:404 with Sample Buffer SB
WB	Washing Buffer conc.	-	1:20 with Aqua dest. → WB 1:20

Sample **SPE and Control (CTR1, CTR2) dilution:** each with Sample Buffer **SB 1:404**, mix immediately, incubate at least for 15 Minutes, max. 2 h. Use **50 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
50 µL	Antibody Conjugate DET	Pipette in all required number of wells
50 µL	Sample Buffer SB as Blank	A1/A2
50 µL	Calibrator A (0.45 ng/mL)	B1/B2
50 µL	Calibrator B (1.5 ng/mL)	C1/C2
50 µL	Calibrator C (3 ng/mL)	D1/D2
50 µL	Calibrator D (5.63 ng/mL)	E1/E2
50 µL	Calibrator E (9 ng/mL)	F1/F2
50 µL	Control CTR1 (1:404 diluted)	G1/G2
50 µL	Control CTR2 (1:404 diluted)	H1/G2
50 µL	Sample SPE (1:404 diluted)	in the rest of the wells according the requirements
Cover the wells with the sealing tape.		
Sample Incubation: 2 h at 20-25°C, 350 rpm		
5 x 300 µL	Aspirate the contents of the wells and wash 5 x with 300 µL each Washing Buffer WB 1:20 / well	In each well
100 µL	Enzyme Conjugate EC	In each well
Cover the wells with the sealing tape.		
Incubation: 30 Minutes at 20-25°C, 350 rpm		
5 x 300 µL	Aspirate the contents of the wells and wash 5 x with 300 µL each Washing Buffer WB 1:20 /well	In each well
100 µL	Substrate S	In each well
Substrate S Incubation: 30 Minutes in the Dark at 20-25°C		
100 µL	Stop Solution STP	In each well
Measure the absorbance within 30 Minutes at 450 nm with ≥ 590 nm as reference wavelength.		

9 QUALITY CONTROL

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

9.1 Quality criteria

For the evaluation of the assay it is required that the absorbance values of the blank should be below **0.25**, and the absorbance of Calibrator **E** should be above **1.00**. Samples, which yield higher absorbance values than Calibrator **E**, should be re-tested with a higher dilution.

10 EVALUATION OF RESULTS

10.1 Establishing of the standard curve

The Calibrators provided contain the following concentrations of recombinant human IGF-II

Calibrator	CAL A	CAL B	CAL C	CAL D	CAL E
ng/mL	0.45	1.5	3	5.63	9

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

10.2 Example of a typical calibration curve

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

	Blank	CAL A	CAL B	CAL C	CAL D	CAL E
ng/mL	0	0.45	1.5	3	5.63	9
OD (450-620 nm)	0.0329	0.127	0.4195	0.8595	1.3695	1.855

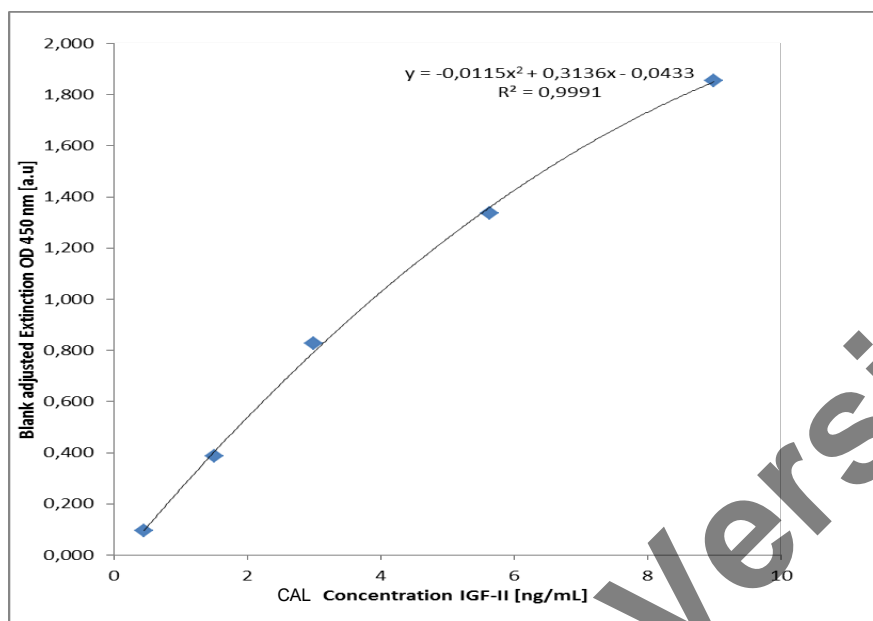


Figure 1 Exemplary standard curve

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

Exemplary calculation of IGF-II concentrations

Sample dilution: 1:404

Measured extinction of your sample	0.449
Measured extinction of the blank	0.0329

Your measurement program will calculate the IGF-II concentration of the diluted sample automatically by using the difference of sample and blank for the calculation. You only have to determine the most suitable curve fit (here: polynomial 2nd degree).

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

$$y = -0.0115x^2 + 0.3136x - 0.0433$$

$$0.4161 = -0.0115x^2 + 0.3136x - 0.0433$$

$$x = 1.49 \text{ ng/mL}$$

If the dilution factor (**1:404**) is taken into account the IGF-II concentration of the undiluted sample is

$$1.49 \text{ ng/mL} \times 404 = 601.96 \text{ ng/mL} = 0.602 \text{ mg/L}$$

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 LIMITATION OF PROCEDURE

The Mediagnost IGF-II ELISA, E30, is based on specific antibodies. Generally, this technique is sensible to heterophilic antibodies in the sample. The influence of heterophilic antibodies is reduced by assay design, but cannot be excluded completely.

13 REFERENCE VALUES

Table 1 Serum levels of IGF-II in ng/mL in healthy persons at various ages*

Percentile			
Age group	5th	50th	95th
Newborns	158	284	516
1-4 weeks	350	486	673
1-6 months	348	551	871
6-12 months	388	582	876
1-3 years	384	596	926
3-5 years	397	617	920
5-7 years	419	638	973
7-9 years	433	656	997
9-11 years	442	662	994
11-13 years	448	671	1006
13-15 years	455	679	1014
15-17 years	452	686	1042
20-30 years	436	679	1058
30-40 years	442	680	1049
40-50 years	407	650	1039
50-60 years	396	644	1049
60-70 years	373	611	1000

*Measurement was performed after acid-ethanol extraction, and values were corrected for recovery (correction factor 1.2). Blum W., Schweizer R.: Insulin-like growth factors and their binding proteins; in Ranke MB (ed): Diagnostics of endocrine function in children and adolescents. Basel, Karger, 2003, pp 166-199 (22).

14 PERFORMANCE CHARACTERISTICS

14.1 Sensitivity

Sensitivity was assessed by measuring the blank and calculating the theoretical concentration of the 2fold standard deviation of the blank. The mean analytical sensitivity of the E30 is 0.06 ng/mL (Range 0.01 to 0.223, n = 7)

14.2 Specificity

IGF-I, a homologous molecule to IGF-II, was diluted in three different concentrations (250, 750, 1250 ng/mL) and tested with the IGF-II ELISA. None of the samples gave a significant signal.

14.3 Reproducibility and Precision

The Inter- and Intra-Assay variation coefficients are in mean <10%. Exemplary determinations are represented in the Table 2 and 3.

Table 2 Inter-Assay- Variation within one lot measured within 10 months.

	Number [n]	Mean value [ng/mL]	Standard deviation [ng/mL]	Variation Coefficient [%]
Sample 1	18	1019	86.4	8.49
Sample 2	18	692	55.4	8.00
Sample 3	18	570	41.2	7.28

Table 3 Intra-Assay Variation

	Number [n]	Mean value [ng/mL]	Standard deviation [ng/mL]	Variation Coefficient [%]
Sample 1	16	666	20	3.07
Sample 2	16	875	58	6.61
Sample 3	20	621	26	4.17
Sample 4	19	670	41	6.13
Sample 5	20	795	42	5.29

14.4 Linearity

Three serum samples were measured in different dilutions. Standard assay dilution is 1:404. Here sample dilutions of 1:100 – 1:800 were used. Figure 2 demonstrates the linearity of sample dilution. These dilutions cover a concentration range of 4.5 to 0.6 ng/mL.

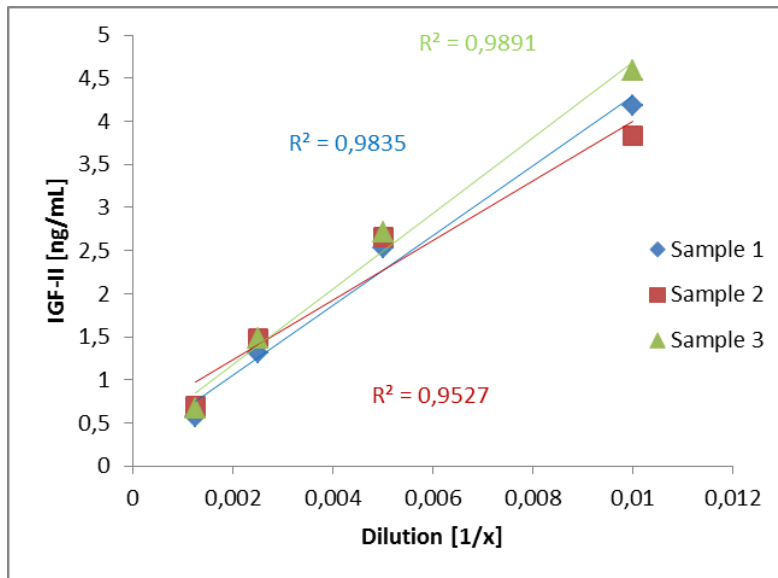


Figure 2 Linearity. Shown are the measured concentrations in different dilutions of three serum samples.

14.5 Interference

Interference of haemoglobin, bilirubin and triglycerides was tested by adding different amounts of these substances to human serum containing IGF-II. For comparison the same amount of buffer without any substance was also added to the serum. Table 4 demonstrates that there is no significant influence of these substances on the measurement of IGF-II in human serum.

Table 4 Interference. Serum samples were enriched with the respective amount of a potentially interfering substance. The recovery (%) in comparison to the non-enriched sample was calculated to assess the influence of haemoglobin, bilirubin and triglycerides on IGF-II measurement.

	Triglyceride 100 mg/mL	Bilirubin 100 µg/mL	Hemoglobin 1 mg/mL
Recovery	%	%	%
Sample 1	97	103	102
Sample 2	95	95	91
Sample 3	90	111	119

15 COMPARISON WITH OTHER ASSAYS

The test system was compared with an independent in-house assay, used for clinical routine by the University Children's Hospital Tübingen. A good coefficient of determination was measured ($R^2=0.8$). Passing Bablok regression analysis revealed a regression line described by $y = 18 + 1.3x$ (RSD 87). The systematic error is negligible and the proportional bias of 30% is probably resulting from usage of different antibodies and calibration material.

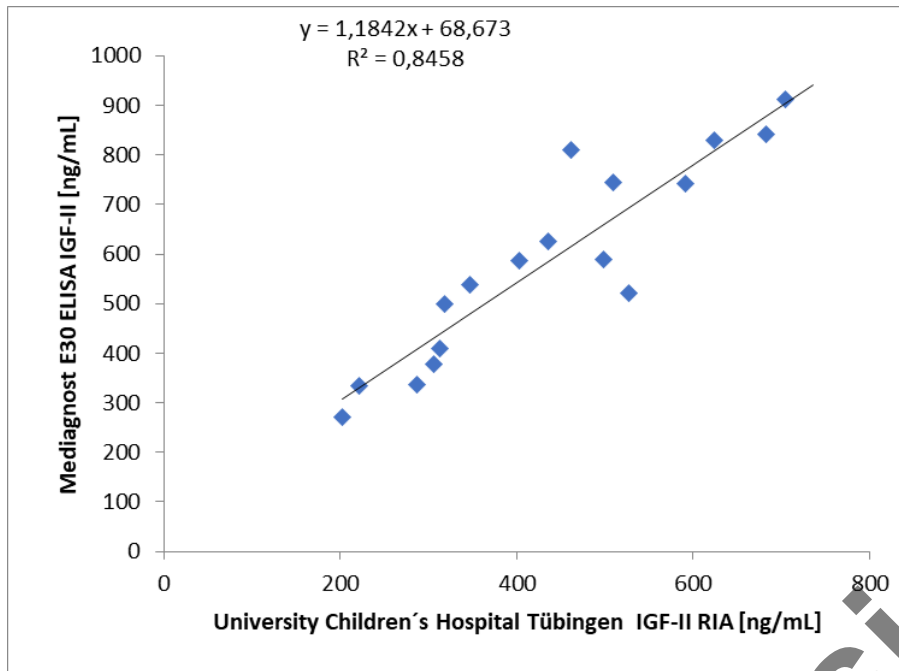


Figure 3 Assay Comparison with an in-house assay of the University Children's Hospital Tübingen (n = 18)

Example Version

Information for use for scientific application

16 SCIENTIFIC APPLICATION

IGF-II is present in low concentrations in various body fluids and in conditioned cell culture media of many cell lines.

16.1 Samples

Serum samples as well as Heparin-, EDTA- and Citrate-Plasma samples are suited. Possible dilution of the sample by the anticoagulant must be considered.

Furthermore, suitable samples are: urine, saliva (low concentration, at least 1:10 dilution), cerebrospinal fluid (at least 1:10 dilution) and cell culture medium (incl. 5% FCS, at least 1:5 dilution). IGF-II concentration in other body fluids or cell culture supernatants can deviate strongly from the serum values.

Table 5 Results of sample matrix tests 4 ng/mL IGF-II was added to the respectively diluted samples. Enriched samples were measured without further dilution. Shown is the relative recovery of added IGF-II of the value measured in enriched assay buffer.

	IGF-II in the native sample [ng/mL]	IGF-II in the enriched sample [ng/mL]	Recovery [%]
Cerebrospinal fluid			
undiluted	2.86	4.39	31.1
1:2	3.2	5.51	57.8
1:5	3.84	6.78	73.5
1:10	3.03	6.48	86.3
Urine			
undiluted	0.36	4.5	103.5
1:2	0.35	4.92	92.9
1:5	0.35	5.17	98.0
1:10	0.35	5.06	95.7
Saliva			
undiluted	0.38	3.06	67.0
1:2	0.35	3.99	74.0
1:5	0.24	4.1	78.5
1:10	0.34	4.32	80.9
Cell Culture Medium			
undiluted	0.38	3.06	67.0
1:2	0.35	3.99	91.0
1:5	0.24	4.1	96.5
1:10	0.34	4.32	99.5
Cell Culture Medium			
undiluted	0.4	3.62	80.5
1:2	0.4	3.53	78.3
1:5	0.7	5.55	121.3
1:10	0.5	5.74	131.0

16.2 Cross reactions with animal samples












It has been shown that the test can be used as a heterologous assay for IGF-II measurement in serum samples from bovine and pigs. Species-specific calibration must be carried out by the user.

17 LITERATUR / REFERENCES

- 1) Baxter RC. 1986 The somatomedins:insulin-like growth factors. *Adv Clin Chem.*25:49-115
- 2) Daughaday WH, Rotwein P. 1989 Insulin-like growth factors I and II. Peptide, messenger ribonucleic acid and gene structures, serum, and tissue concentrations. *Endocr Rev.* 10:68-91
- 3) Spencer EM (Ed.) 1991 *Modern Concepts of Insulin-Like Growth Factors.* New York: Elsevier.
- 4) Klapper DG, Svoboda ME, Van Wyk JJ. 1983 Sequence analysis of somatomedin-C: confirmation of identity with insulin-like growth factor-I. *Endocrinology* 112:2215-2217.
- 5) Rinderknecht E, Humbel RE. 1978 The amino acid sequence of human insulin-like growth factor I and its structural homology with proinsulin. *J Biol Chem.* 253:2769-2276.
- 6) Clemmons DR, Van Wyk JJ. 1984 Factors controlling blood concentration of somatomedin C. *Clin Endocrinol Metab.* 13:113-143.
- 7) Ballard J, Baxter R, Binoux M, et al. 1989 On the nomenclature of the IGF binding proteins. *Acta Endocrinol (Copenh).* 121:751-752.
- 8) Drop SLS. 1992 Report on the nomenclature of the IGF binding proteins. *J. Clin Endocrinol Metab.* 74:1215-1216.
- 9) Martin JL, Baxter RC. 1986 Insulin-like growth factor binding protein from human plasma. Purification and characterization. *J Biol Chem.* 261:8754-8760.
- 10) Binkert C, Landwehr J, Mary JL, Schwander J, Heinrich G. 1989 Cloning, sequence analysis and expression of a cDNA encoding a novel insulin-like growth factor binding protein (IGFBP-2). *EMBO J.* 8:2497-2502.
- 11) Furlanetto RW, Underwood LE, Van Wyk JJ, D'Ercole AJ. 1977 Estimation of somatomedin-C levels in normals and patients with pituitary disease by radioimmunoassay. *J. Clin Invest.* 60:648-657.
- 12) Daughaday WH, Kapadia M, Mariz I. 1987 Serum somatomedin binding proteins: physiologic significance and interference in radioligand assay. *J Lab Clin Med.* 109:355-363.
- 13) Breier BH, Gallaher BW, Gluckman PD. 1991 Radioimmunoassay for insulin-like growth factor-I: solutions to some potential problems and pitfalls. *J Endocrinol.* 128:347-357.
- 14) Daughaday WH, Mariz IK, Blethen SL. 1980 Inhibition of access of bound somatomedin to membrane receptor and immunobinding sites: a comparison of radioreceptor and radioimmunoassay of somatomedin in native and acid-ethanol-extracted serum. *J Clin Endocrinol Metab.* 51:781-788.
- 15) Blum WF, Gallaher B, Ranke MB. 1992 An IGFBP-blocked IGF-I RIA that measures what it pretends to measure: IGF-I. 74th Annual Meeting of the American Endocrine Society. 293.
- 16) Rosenfeld RG, Wilson DM, Lee PDK, Hirtz RL. 1986 Insulin-like growth factors I and II in evaluation of growth retardation. *J Pediatr.* 109:428-433.
- 17) Clemmons DR, Van-Wyk JJ, Ridgway EC, Kliman B, Kjellberg RN, Underwood LE. 1979 Evaluation of acromegaly by radioimmunoassay of somatomedin-C. *N.Engl J Med.* 301:1138-1142
- 18) Zapf J, Walter H, Froesch ER. 1981 Radioimmunological determination of insulin-like growth factors I and II in normal subjects and in patients with growth disorders and extrapancreatic tumor hypoglycemia. *J Clin Invest.* 68:1321-1330.
- 19) Blum WF. 1992 Insulin-like growth factors and their binding proteins. In: Ranke MB, ed. *Functional Endocrinologic Diagnostics in Children and Adolescence.* Mannheim: J + J Verlag; 102-117.
- 20) Rieu M, Girard F, Bricaire H, Binoux M. 1982 The importance of insulin-like growth factor (somatomedin) measurements in the diagnosis and surveillance of acromegaly. *J Clin Endocrinol Metab.* 55:147-153.
- 21) Blum WF, Ranke MB, Bierich JR. 1988 A specific radioimmunoassay for insulin-like growth factor II: the interference of IGF binding proteins can be blocked by excess IGF-I. *Acta Endocrinol (Copenh).*118:374-380.
- 22) Blum W., Schweizer R.: Insulin-like growth factors and their binding proteins; in Ranke MB (ed): *Diagnostics of endocrine function in children and adolescents.* Basel, Karger, 2003, pp 166-199.
- 24) Blum WH, Breier BH (1994) Radioimmunoassays for IGFs and IGFBPs. *Growth Regulation* 4 (Suppl. 1):11-19
- 25) Trojan L, Bode C, Weiss C, Mayer D, Grobholz R, Alken P, Michel MS: IGF-II serum levels increase discrimination between benign prostatic hyperplasia and prostate cancer and improve the predictive value of PSA in clinical staging. *Eur Urol* (2006), 49(2):286-292
- 26) Soon PS, Gill AJ, Benn DE, Clarkson A, Robinson BG, McDonald KC, Sidhu SB: Microarray gene expression and immunohistochemistry analyses of adrenocortical tumors identify IGF2 and Ki-67 as useful in differentiating carcinomas from adenomas. *Endocr Relat Cancer* (2009), 16(2):573-583
- 27) Freude S et al: Neuronal IGF-1 resistance reduces Abeta accumulation and protects against premature death in a model of Alzheimer's disease. *FASEB J* (2009) Jun1 Epub ahead of print.

18 INTERNATIONAL ASSAY DESCRIPTION

International Test Description

CAL A-E	Rec in 500 µL SB	-
CTR1	Rec in 250 µL SB	1:404 SB
CTR2	Rec in 250 µL SB	1:404 SB
WB 20x	-	1:20 A. dest. → WB 1:20
SPE	-	1:404 SB ↔
 20-25°C  15 min		
50 µL	DET	A1 - End
50 µL	SB	A1/A2
50 µL	CAL A (0.45 ng/mL)	B1/B2
50 µL	CAL B (1.5 ng/mL)	C1/C2
50 µL	CAL C (3 ng/mL)	D1/D2
50 µL	CAL D (5.63 ng/mL)	E1/E2
50 µL	CAL E (9 ng/mL)	F1/F2
50 µL	CTR1 1:404 SB	G1/G2
50 µL	CTR2 1:404 SB	H1/H2
50 µL	SPE 1:404 SB	
TAPE		
 2 h  20-25°C  350 rpm		
5x 300 µL	5x WB 1:20	
100 µL	EC	
TAPE		
 0.5 h  20-25°C  350 rpm		
5x 300 µL	5x WB 1:20	
100 µL	S	
 0.5 h  20-25°C 		
STP		
MEASURE		

19 ASSAY PROCEDURE

Preparation of reagents		Reconstitution:	Dilution
CAL A-E	Calibrators	in 500 µL Sample Buffer SB	-
CTR1	Control 1	in 250 µL Sample Buffer SB	1:404 with Sample Buffer SB
CTR2	Control 2	in 250 µL Sample Buffer SB	1:404 with Sample Buffer SB
WB	Washing Buffer conc.	-	1:20 with Aqua dest. → WB 1:20

Sample and Control dilution: each with Sample Buffer **SB 1:404**, mix immediately, incubate at least for 15 Minutes, max. 2 h. Use **50 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
50 µL	Antibody Conjugate DET	Pipette in all required number of wells
50 µL	Sample Buffer SB as Blank	A1/A2
50 µL	Calibrator A (0.45 ng/mL)	B1/B2
50 µL	Calibrator B (1.5 ng/mL)	C1/C2
50 µL	Calibrator C (3 ng/mL)	D1/D2
50 µL	Calibrator D (5.63 ng/mL)	E1/E2
50 µL	Calibrator E (9 ng/mL)	F1/F2
50 µL	Control CTR1 (1:404 diluted)	G1/G2
50 µL	Control CTR2 (1:404 diluted)	H1/G2
50 µL	Sample SPE (1:404 diluted)	in the rest of the wells according the requirements
Cover the wells with the sealing tape.		
Sample Incubation: 2 h at 20-25°C, 350 rpm		
5 x 300 µL	Aspirate the contents of the wells and wash 5 x with 300 µL each Washing Buffer WB 1:20 /well	In each well
100 µL	Enzyme Conjugate EC	In each well
Cover the wells with the sealing tape.		
Incubation: 30 Minutes at 20-25°C, 350 rpm		
5 x 300 µL	Aspirate the contents of the wells and wash 5 x with 300 µL each Washing Buffer WB 1:20 /well	In each well
100 µL	Substrate S	In each well
Substrate S Incubation: 30 Minutes in the Dark at 20-25°C		
100 µL	Stop Solution STP	In each well
	Measure the absorbance within 30 Minutes at 450 nm with ≥ 590 nm as reference wavelength.	

(Copy of Page 26)