

# IGFBP-1 - ELISA

Enzymimmunoassay für die quantitative Bestimmung von  
**humanem Insulin-like Growth Factor  
Bindungsprotein - 1**

Deutsch

Enzyme Immunoassay for Quantitative Determination of  
**human Insulin-like Growth Factor  
Binding Protein - 1**

English

Europäische Union / European Union\*  
**für In-vitro-Diagnostik / for in-vitro diagnostic**  
Nur zum Gebrauch durch Fachpersonal! / Only for professional use!  
Rest of the world and USA\*\*: for research use only!



DE/CA40/00809/23



REF **E01**



Gesellschaft für Forschung und Herstellung von Diagnostika GmbH

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

EN/ DE/ FR/ IT/ ES/ PT/ NL/ DK/ SE/ PL/ HU/ SK/ CZ/ BG/ EE/ GR/ RO/ SL/ FI  
**Symbols/ Symbole /Symboles/ Simboli/ Símbolos/ Símbolos/ Symbolen/ Symboler/ Symboler/ Symbole/ Szimbólumok/ Symboly/ Symboly/ Символи/ Sümbolid/ Σύμβολα/ Simboluri/ Simboli/ Symbolit**  
 according to DIN EN 980 and EDMA recommendations Standard News 6 2001



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/ Αεγμίσκουπαέβ/ 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/ 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 orvosdiagnostikai termék (in vitro diagnosztikai használathoz)/ In vitro diagnostický zdravotnický materiál (určené na diagnostiku „in vitro“)/ In vitro diagnostický zdravotnický 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-Batch Number/ Charge-Chargennummer/ Lot-Code du lot/ Lotto-Numero di lotto/ Lote-Código de lote/ Lote-Código do Lote/Lot-Partijnummer/ Lot-Batchkode/ Partisatskod/ Numer serii/ Tétel-sarzs szám/ Číslo šarže/ Číslo šarže/ Партиден номер/Partii – 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/ Referencennummer/ Bestellningsnummer/ Numer katalogowy/ Rendelési szám/Katalógové číslo/ Objednací číslo/Каталожен 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/ Armazemar entre/ Bewaar bij tussen/ Opbevares mellem/ Förvaras vid/ Przechowywać w/ Tárolási tartomány/ Skladujte v rozsahu / Skladujte v rozmezi/ Температурно ограничение/ Säilätada 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/ Nevystavovat slnečnému svetlu/ Nevystavovat slnečnému svetlu/ Да се предпазва от слънчева светлина/ Kaitsta otsese päikesekiirguse eest/ Κρατήστε το μακριά από την ηλιακή ακτινοβολία/ Τηνετή departe de lumina soarelui/ Ne izpostavljajte sončni svetlobi/ suojaa 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



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 μικροπιλοδότησης/ Microplacă/ Mikrotitrská plošča/ Mikrotitrauslevy



Reconstitute in/ Rekonstituieren in/ Reconstituer dans/ Ricostituire nel/ Reconstituir en/ Reconstituir em/ reconstituieren in/ Rekonstituier i/ rekonstituera/ Rekonstytuować w/ Helyeállítás/ Znovu pripraviť za/ Znovu připravit za/ Разтваряне в/ Moodustada uuesti / Ανασυστήστε σε/ Reconstituire în/ Predelava v/ rekonstitui



Sample/ Probe /Echantillon/ campione/ Muestra/ Amostra/ monster/ Prøve/ prov/ Próbka/ Minta/ Vzorka/ Vzorek/ Проба/ Proov/ Δείγμα/ Probă/ Vzorec/ Näyte



Dilute in Buffer X/ Verdünnen in Puffer X/ Diluer dans le tampon X/ Diluire nel tampone X/ Diluir en tampón X/ Diluir no Tampão X/ verdunnen in buffer X/ Fortyndes i buffer X/ spädi i buffert X/ Rozcieńczenie w buforze X/ Hígítás X pufferben/ Riedit' v pufri X/ Ředit v pufru X/ Разреждане в буфер X/ Lahjendada puhvris X/ Αραιώστε σε ρυθμιστικό διάλυμα X/ Diluați în tamponul X/ Razredčiti v pufru X/ laimennetaan x puskuriin



AK Antibody and Enzyme Conjugate/ Antikörper und Enzym Konjugat/ anticorps conjugué et conjugué enzymatique/ Coniugato di anticorpo ed enzima/ Conjugado de anticuerpos y enzimas/ Conjugado Anticorpo-Enzima/ antilichaam-

<b>CONJ</b>	EK	en enzymconjugaat/ Antistoffer og enzym-konjugat/ antikropps- och enzymkonjugat (antikropp och enzym, konjugat)/ Koniugat antycia! i enzymów/ Antitest és enzim páros/ Prtilátkový a enzymatický konjugát/ Prtilátkový a enzymatický konjugát/ Антитяло и ензим конюгат/ Antikehad ja ensüümi konjugaat/ Σύμπλοκο αντισώματος-ενζύμου/ Compuși din anticorpi și enzime/ Antitelesa in konjugat encima/ Vasta-aine ja entsymi konjugaatti
<b>CAL X</b>	A-G	Standard X/ Standard X/ Etalon X/ Standard X/ Estándar X/ Standard X/ standaard X/ Standard X/ standard X/ Standard X/ Standard X/ Štandard X/ Standard X/ Стандарт X/ Standard X/ Πρότυπο X/ Standard X/ Standardni X/ Kalibraattori X
<b>Control</b>	KS1/ KS2	Control Serum / Kontrollserum/ Contôle sérique/ Siero di controllo/ Suero de control/ Soro de Controllo/ controleserum/ Kontrolserum/ Kontrollserum/ Serum kontrolne/ Ellenőrző szérum/ Kontrolné sérum/ Kontrolní sérum/ Контролен серум/ Kontrollseerum/ Ορός ελέγχου/Ser de control/ Kontrolni serum/ Kontrolli seerumi
<b>WASHBUF</b> <b>20x</b>	WP	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/ Mosópufer koncentrátum/ Koncentrát vmyývacieho pufru/ Концентрат на промивен буфер/ Pesupuhvri kontsentraat/ Συμπύκνωμα ρυθμιστικού διαλύματος έκπλυσης/ Concentrat pentru tamponul de spălare/ Koncentrat izpiralnega pufru/ Pesuliuositiivist
<b>WASHBUF</b>		Washing Buffer / Waschpuffer/ Tampon de lavage/ Tampone di lavaggio/ Tampón de lavado/Tampão de Lavagem/ wasbuffer/ Vaskebuffer/ tvättbuffert/ Bufor płukania/ Mosópufer/ Vymývací pufer/ Vymývací pufr/ Промивен буфер/ Pesupuhver/ Ρυθμιστικό διάλυμα έκπλυσης/ Tampon pentru spălare /Izpiralni pufer/ Pesuliuos
<b>SUBST</b> <b>TMB</b>	S	Substrate/ Substrat/ Substrat/ Substrato/ Substrato/ Substrato/ substraat/ Substrat/ Substrat/ Substrat/ Substrat/ Szubsztrátum/ Substrát/ Substrát/ Субстрат Substraat/ Υπόστρωμα/ Substrat/ Substrat/ Substraattiliuos
<b>H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub></b>	SL	Stop Solution/ Stopp Lösung/ Stop Solution/ Soluzione di stop/ Stop Solución/ Solução Stop/ stopoplossing/ Stopopløsning/ Stopplösning/ Stop roztwór/ Megállító oldat/ Roztok na ukončenie/ Roztok pro ukončení/ Стопират разтвор/ Stopp-lahus/ Διάλυμα διακοπής/ Soluție de oprire/ Stop raztopina/ Pysäytysliuos
<b>TAPE</b>		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 plytkę/ Tányér leragsztása/ Oblepiť podložku lepiacou páskou/ Olepit podložku lepící páskou/ Плака с лента за запечатване/ Katta plaat isoleerikleepindiga/ Κολλήστε το πλακίδιο με κολλητική ταινία/ Aoperiți placa cu o bandă adezivă/ Prelepiti ploščo/ Peitã mikrotitrauslevyn oheisella teipillä
<b>MEASURE</b>		Measure plate within 30 min at 450 nm (Referencefilter ≥590nm)/Ausmessung innerhalb von 30 min bei 450 nm (Referenzfilter ≥ 590 nm)./ Mesure l'absorbance en l'espace de 30 min à 450 nm avec ≥590nm 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 ≥590nm)/ Binnen 30 minuten bij 450 nm meten (referentiefilter ≥ 590 nm)./ Mål plade i løbet af 30 min ved 450 nm (referencefilter ≥590nm)/ 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/Měřit 30 minut při 450 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)
<b>Literatur</b>		Literature/ Literatur/ Bibliographie/ Letterario/ Bibliografía/ Literatura documentação/ literatuur/ Litteratur/ litteratur/ Literatura/ Irodalom/ Literatúra/ Literatura/ Литература// Kirjandus/ Βιβλιογραφία/ Bibliografie/ literatura/ Lähdeluettelo
<b>International</b> <b>Test</b> <b>description</b>		International test description/ internationale Testanleitung/ description internationale de test/ Istruzioni per il test internazionali/ 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
<b>End</b>		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 /kaikkiin tarvittaviin mikrotitrauslevyn syvennyksiin

**Vor Gebrauch ist die gesamte Packungsbeilage zu lesen!**

**Read entire protocol before use!**

**Packungsbeilage  
 Deutsch**

TECHNISCHE EIGENSCHAFTEN und EINSATZMÖGLICHKEITEN	5
EINFÜHRUNG	5
EINSATZMÖGLICHKEITEN	6
Assay Eigenschaften und Validierung	6
Proben: Eignung, Vorbereitung und Lagerung	7
MATERIALIEN	9
Inhalt der Testpackung	9
Zusätzlich benötigte Materialien	9
TECHNISCHE HINWEISE	9
WARNHINWEISE UND VORSICHTSMAßNAHMEN	11
TESTDURCHFÜHRUNG	12
AUSWERTUNG	13
Berechnung der Standardkurve	13
ERWARTUNGSWERTE	13

**Package Insert  
 English**

TECHNICAL FEATURES+APPLICATIONS	15
INTRODUCTION	15
INTENDED USE	16
PERFORMANCE CHARACTERISTICS AND VALIDATION	16
SPECIMEN COLLECTION, PREPARATION AND STORAGE	17
REAGENTS PROVIDED	18
MATERIALS REQUIRED BUT NOT PROVIDED	19
TECHNICAL NOTES	19
WARNINGS AND PRECAUTIONS	21
ASSAY PROCEDURE	22
CALCULATION OF RESULTS	23
Establishing the Standard Curve	23
EXPECTATION VALUES	23
LITREATURE / LITERATUR	24
KURZANLEITUNG – MEDIAGNOST IGFBP-1 -ELISA E01	25
SUMMARY – MEDIAGNOST IGFBP-1 ELISA E01	27
<u>REF</u> E01 International Test Description	28

\* please ask for package inserts in your national language  
 \*\* please ask for special package insert

# PACKUNGSBEILAGE DEUTSCH

## TECHNISCHE EIGENSCHAFTEN und EINSATZMÖGLICHKEITEN

- ◆ Quantitativer Nachweis von IGFBP-1 in humanem Serum und in anderen Körperflüssigkeiten z.B. Amnionflüssigkeit, Muttermilch, Urin, Speichel usw. sowie in Zellkulturmedium
- ◆ **extrem hohe analytische Sensitivität von 0,02 ng/ml**
- ◆ Inter-Assay Varianz von 7,4% und Intra-Assay Varianz von 6,8%
- ◆ Ergebnisse in nur **1,75 h** Inkubationszeit

## EINFÜHRUNG

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

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

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

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

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

Die Bedeutung von IGFBP-1 als diagnostischer Parameter wurde in den letzten Jahren auf unterschiedlichen Gebieten untersucht. Dabei zeigte sich, dass die IGFBP-1 Konzentration insbesondere in den folgenden Bereichen diagnostisch genutzt werden kann:

## - **Energiemetabolismus**

Aufgrund der Beeinflussung der IGFBP-1 Konzentration in humanem Serum durch Insulin, stellt IGFBP-1 einen möglichen Marker für die Entwicklung einer Insulin-Resistenz dar.

Im Rahmen einer 23 Probanden umfassenden Studie konnten Maddux et al zeigen, dass IGFBP-1 Konzentrationen sehr gut mit der Glucose-Aufnahme Rate korrelieren. Bei den nicht diabetischen Probanden korrelierten die IGFBP-1 Serumkonzentrationen besser mit der Insulin Aktivität, gemessen im euglykämischen Clamp Versuch, als der HOMA Index [13].

## - **Schwangerschaftsdiagnostik**

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

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

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

## **EINSATZMÖGLICHKEITEN**

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

### **Assay Eigenschaften und Validierung**

Die Standards des ELISA E01 bestehen aus **nativem humanem IGFBP-1** in Konzentrationen von **0, 0.1, 0.5, 1, 2, 4 und 8 ng/ml**.

Die **analytische Sensitivität** des ELISA E01 beträgt **0,02 ng/ml** (zweifache Standardabweichung des Null-Standards in 22facher Bestimmung).

Die Bestimmung von IGFBP-1 mit dem ELISA E01 ist über einen **weiten Bereich verdünnungsecht**, die Linearität von Serumverdünnungen ist hervorragend (s. Tab. 1).

**Tabelle 1:** Verdünnungslinearität (hier: typische Ergebnisse zweier verschiedener Seren)

Verdünnung:	Probe 1 (rekalkuliert, ng/ml)	Verdünnung:	Probe 2 (rekalkuliert, ng/ml)
1:2,5	14,38	1:2,5	16,81
1:5	14,22	1:5	15,51
1:10	13,42	1:10	16,22
1:20	13,81	1:20	14,45
1:40	13,11	1:40	15,12
1 :80	12,52	1 :80	13,43
1 :160	14,65	1 :160	15,95
<b>MW / 1SA / VK%</b>	<b>13,73 / 0,76 / 5,53</b>	<b>MW / 1SA / VK%</b>	<b>15,36 / 1,14 / 7,44</b>

MW = Mittelwert, SA = Standardabweichung, VK = Variationskoeffizient

Die **Wiederfindung** von nativem IGFBP-1 in verschiedenen Probenmatrizes sowie deren endogener Gehalt ist in Tabelle 4 aufgeführt.

Es wurde eine vernachlässigbar geringe **Kreuzreaktivität** gegen rekombinantes IGFBP-2 und IGFBP-3 gemessen, bei Einsatz von je 500 ng/ml wurden **weniger als 0,0015 %** quantifiziert.

Die **Inter-** und **Intra-Assay** Variationskoeffizienten sind **kleiner als 7,4% bzw. 6,8%**. Beispielpflichtige Bestimmungen sind in Tabelle 2 und Tabelle 3 dargestellt.

**Tabelle 2 :** Inter-Assay-Varianz (n=9)

	Mittelwert (ng/ml)	Standardabweichung (ng/ml)	Variations-Koeffizient (%)
<b>Probe 1</b>	2,31	0,12	5,23
<b>Probe 2</b>	18,41	1,36	7,36
<b>Probe 3</b>	32,79	2,22	6,75

**Tabelle 3:** Intra-Assay-Varianz (n=20)

	Mittelwert (ng/ml)	Standardabweichung (ng/ml)	Variations-Koeffizient (%)
<b>Probe 1</b>	1,45	0,08	5,87
<b>Probe 2</b>	20,64	1,29	6,23
<b>Probe 3</b>	162,99	11,09	6,81

Der Vergleich der IGFBP-1 Konzentrationsbestimmungen von 35 Seren gesunder Erwachsener mit dem Mediagnost IGFBP-1 ELISA EO1 und einem kommerziell erhältlichen ELISA zeigte eine sehr gute Übereinstimmung der absoluten Konzentrationen mit **sehr hoher Korrelation**:  $y = 1,15x + 0,12$ ;  $r^2 = 0,94$ , der Vergleich mit einem weiteren kommerziellen ELISA ergab, bei ebenfalls **sehr hoher Korrelation** der Messwerte:  $y = 3,33x + 3,0$ ;  $r^2 = 0,90$ , Messwerte bei etwa einem Drittel der jeweiligen Konzentrationen.

### Proben: Eignung, Vorbereitung und Lagerung

Uneingeschränkt geeignet sind Serumproben, EDTA- und Heparin-Plasmaproben und andere biologische Flüssigkeiten z.B. Amnionflüssigkeit. Werte in Citrat -Plasma sind um ca. 15% erniedrigt. Eine spezielle externe Probenvorbereitung ist nicht nötig. Leichte Hämolyse der Proben stört die Bestimmung nicht.

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 (3x) haben in unseren Versuchen jedoch auf die messbare IGFBP-1 Konzentration keine Auswirkungen gehabt.

Für die meisten Untersuchungen (z.B. Serum- oder Plasmaproben bei denen keine Extremwerte zu erwarten sind, s. Tab. 4 für weitere Details) sollten **Verdünnungen von 1:16 in Verdünnungspuffer VP geeignet** sein. Damit ergibt sich ein Assay-Bereich von 0 bis 128 ng/ml.

Vorschlag Verdünnungsprotokoll:

**300 µl Verdünnungspuffer VP** in PE-/PP-Gefäße vorlegen (bei größeren Serien empfiehlt sich hierfür die Verwendung eines Multi-Steppers), dazu **20 µl Serum- oder Plasma** pipettieren (Proben sind **1:16 verdünnt**) und jeweils sofort mischen.

Nach dem Mischen bitte innerhalb von 1 Stunde von dieser Lösung **50 µl pro Bestimmung** im Assay einsetzen.

Gegebenenfalls kann natürlich, je nach erwarteten IGFBP-1-Werten, geringer (mindestens jedoch 1:2,5) oder stärker in **Verdünnungspuffer VP** verdünnt werden. Die IGFBP-1 Konzentrationen in anderen humanen Körperflüssigkeiten und in Kulturüberständen können stark von den Serumwerten abweichen. Beispielhafte Messwerte sowie die jeweils empfohlenen Verdünnungen sind in Tab. 4 aufgeführt.

**Tabelle 4:** Probenmatrizes, Wiederfindung und Verdünnungsempfehlung

Test-Proben	Konzentration IGFBP-1 (ng/ml)	Wiederfindung von zugesetztem nativem IGFBP-1	empfohlene Verdünnung als Probe E01
Amnionflüssigkeit	8.140,0 16.450,0	n.b.	Individuell verschieden mind.1:5000 – 1:25000
Muttermilch	5,12 20,2	91% (bei 1:10 Verd.) n.b.	1:10
Urin	0,07	89,8% (bei 1:2,5 Verd.)	1:2,5
Speichel	< 0,02 ng/ml	62,5% (bei 1:2,5 Verd.)	mind. 1:2,5
Bronchiallavage	< 0,02 ng/ml	100% (bei 1:2,5 Verd.)	1:2,5
Sputum	< 0,02 ng/ml	100% (bei 1:20 Verd.)	1:20
Serumpool	0,57	105,1%(bei 1:16 Verd.)	1:16 (allgem. Empfehlung)
Schwangerenserum	n.b.	n.b.	1:25
Zellkulturmedium	individuell verschieden	94,5% (bei 1:5 Verd.)	individuell verschieden, mind. 1:5

n.b.= nicht bestimmt

## MATERIALIEN

### Inhalt der Testpackung

1)	MTP	<b>Mikrotiterplatte</b> , gebrauchsfertig, Mikrotiterplatte mit 96 Vertiefungen, die in 12 abnehmbare Streifen à 8 Vertiefungen (einzeln abbrechbar) aufgeteilt ist. Die Platte ist mit einem Antikörper gegen humanes IGFBP-1 beschichtet.
2)	CAL	<b>Standards A-G, 500 µl</b> , lyophilisiert, enthalten natives humanes IGFBP-1. Die Standardkurve deckt einen Bereich von <b>0 bis 8 ng/ml</b> (0; 0,1; 0,5; 1; 2; 4 und 8 ng/ml) IGFBP-1 ab, die einzelnen Standards werden in <b>je 500 µl Verdünnungspuffer</b> rekonstituiert. Für den Assay werden jeweils <b>50 µl pro Vertiefung</b> eingesetzt.
3)	DILU VP	<b>Verdünnungspuffer VP, 125 ml, gebrauchsfertig</b> , bitte zur Verdünnung der Standards und den Proben verwenden
4)	CONTROL	<b>Kontrollseren KS1 and KS2, 250 µl</b> , lyophilisiert, enthalten humanes Serum und müssen in je <b>250 µl Verdünnungspuffer VP</b> rekonstituiert werden. Die IGFBP-1 Soll-Konzentrationen und die Schwankungsbereiche sind auf dem Etikett angegeben. Sie sollten im Assay in den gleichen Verdünnungen wie die jeweiligen Proben eingesetzt werden, bitte 50 µl pro Vertiefung einsetzen.
5)	Ab	<b>Antikörperkonjugat AK, 6 ml</b> , enthält biotinylierten anti-human IGFBP-1 Antikörper, gebrauchsfertige Lösung, bitte 50 µl pro Vertiefung einsetzen.
6)	CONJ	<b>Enzymkonjugat EK, 12 ml</b> , gebrauchsfertig, enthält POD (Meerrettich-Peroxidase)-markiertes Streptavidin, gebrauchsfertige Lösung bitte 100 µl pro Vertiefung einsetzen.
7)	WASHBUF 20x	<b>Waschpuffer WP, 50 ml</b> , 20-fach konzentrierte Lösung, bitte <b>vor Gebrauch 1:20 mit A.dest.</b> oder entmineralisiertem Wasser verdünnen (z.B. den gesamten Flascheninhalt von 50 ml im Standzylinder auf 1000 ml auffüllen). Achtung: endverdünnt ist der Waschpuffer nur 4 Wochen haltbar, bitte nur nach Bedarf ansetzen.
8)	SUBST	<b>Substrat S, 12 ml</b> , gebrauchsfertig, Meerrettich-Peroxidase-(POD)-Substrat, stabilisiertes H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> -Tetramethylbenzidin
9)	H <sub>2</sub> SO <sub>4</sub>	<b>Stopplösung SL, 12 ml</b> , gebrauchsfertig, 0,2 M Schwefelsäure
10)		<b>Abdeckfolie</b> für Mikrotiterplatten, 2 Stück, selbstklebend

### Zusätzlich benötigte Materialien

Destilliertes oder entmineralisiertes Wasser zum Verdünnen des Waschpuffers WP

Mikropipetten und Mehrkanal-Pipetten mit auswechselbaren Einmalspitzen

Vortex-Mischgerät

Mikrotiterplattenwasher (empfohlen)

Photometer für Mikrotiterplatten ("ELISA-Reader"), Filter bei 450 und ≥590 nm.

Polyethylen PE/ Polypropylen PP Röhrchen zum Verdünnen der Proben

### TECHNISCHE HINWEISE

Reagenzien mit unterschiedlichen Lot-Nummern sollten nicht vermischt werden. Alle Reagenzien sind ungeöffnet, lichtgeschützt und bei 2° - 8°C gelagert mindestens haltbar bis zum Verfallsdatum (s. Etikett).

Bei sachgemäßer Handhabung ist die **Haltbarkeit der Reagenzien nach Öffnung** nicht beeinträchtigt. **Wiederholtes Einfrieren und Auftauen ist zu vermeiden.** Wenn mehrere unabhängige Messungen über eine längere Periode mit einem Kit geplant sind, wird vorherige Aliquotierung der Komponenten in passende Volumina empfohlen.

Alle Komponenten des Kits müssen **vor Gebrauch auf Raumtemperatur** gebracht werden, die evtl. in manchen Puffern vorhandenen Präzipitate müssen vor Gebrauch durch Mischen und Erwärmen wieder gelöst werden.

**Inkubation bei Raumtemperatur bedeutet: Inkubation bei 20 - 25°C.**

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.

Die mögliche Gefährdung durch den Umgang mit zumindest potentiell infektiösem Material muss beachtet werden.

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

Manuelles Waschen ist eine gute Alternativoption. 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 fusselndem Zellstoff gründlich entfernt werden.

### **Standards und Kontrollen**

Die Standards **A – G** und Kontrollseren **KS1 & KS2** werden mit dem im Kit enthaltenen Probenpuffer **VP** 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.

**Die rekonstituierten Komponenten** sollten bei -20°C (oder kälter) aufbewahrt werden, dies verlängert die Haltbarkeit auf mind. 3 Monate. Wiederholtes Einfrieren und Auftauen sollte vermieden werden. 3 Einfrier-/Auftauzyklen haben keinen messbaren Einfluss auf den Test. Wenn mehrere unabhängige IGFBP-1-Messungen über eine längere Periode mit einem Kit geplant sind, wird vorherige Aliquotierung der Komponenten in passende Volumina empfohlen.

### **Waschpuffer**

Der 1:20 gebrauchsfertig verdünnte **Waschpuffer WP** ist max. 4 Wochen bei 4°C haltbar, bitte nur nach Bedarf ansetzen.

### **Testplatte**

Nicht verwendete Streifen der Testplatten sind zusammen mit dem Trockenkissen luftdicht in dem wiederverschließbaren Klipbeutel bei 2° - 8°C zu lagern. Die Haltbarkeit ist bei sachgerechter Lagerung nicht eingeschränkt.

### **Substrat**

Die Substratlösung S, stabilisiertes H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>-Tetramethylbenzidin, ist lichtempfindlich – Aufbewahrung und Inkubation bitte vor Licht geschützt.

## WARNHINWEISE UND VORSICHTSMAßNAHMEN

Der Mediagnost Kit ist nur zur In-vitro-Diagnostik und nicht zur inneren Anwendung bei Mensch 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.

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.

Die gemessenen Extinktionen sind u.a. stark abhängig von der Temperatur, aber die berechneten Werte werden durch die Temperatur nicht beeinflusst.

Bitte benutzen Sie separate Pipettenspitzen für jede Probe, Kontrolle und Reagenz um Kreuzkontaminationen zu vermeiden. Bitte verwenden Sie Behältnisse nur für jeweils einzelne Reagenzien. Gießen Sie die Reagenzien nicht zurück in die Originalgefäße. Mischen Sie den Inhalt der jeweiligen Vertiefungen der Mikrotiterplatten gründlich. Verwenden Sie die Mikrotiterplattenvertiefungen nur jeweils einmal. Lassen Sie keine Vertiefung während des Assay-Vorgangs völlig austrocknen, sondern fügen Sie die jeweils folgenden Reagenzien sofort nach dem Abschluss des Waschvorganges dazu.

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

### Menschliches Serum:

In folgenden Komponenten enthalten: **KS1 & KS2**

Die humanen Materialien, die für die Präparation der Kontrollseren verwendet wurden, sind durch von der US-amerikanischen Arzneimittelzulassungsbehörde FDA empfohlene Nachweisverfahren auf die Präsenz von Antikörpern gegen Humanes Immundefizienz-Virus (HIV I und II), gegen Hepatitis B-Oberflächenantigen und gegen Hepatitis C Virus geprüft und für negativ befunden worden. Da kein Test das Vorhandensein von infektiösen Erregern völlig ausschließen kann, sollten die Reagenzien gemäß den Vorgaben der Biosicherheitsstufe 2 gehandhabt werden.

### 2-Methyl-4-Isothiazolin-3-one

als Konservierungsmittel <0.01% in folgenden Komponenten enthalten: **AK, EK, VP**

R34	Verursacht Verätzungen
R43	Kann bei Hautkontakt zur Sensibilisierung führen
S26	Im Falle von Augenkontakt sofort mit viel Wasser spülen und Arzt aufsuchen
S36/37	Bei der Arbeit geeignete Schutzkleidung und -handschuhe tragen
S45	Bei Unfall oder Unwohlsein sofort Arzt zuziehen

### 5-Chloro-2-Methyl-2H-Isothiazolin-3-one and 2-methyl-2H-Isothiazol-3-one

als Konservierungsmittel <0.01% in folgenden Komponenten enthalten: **AK, EK, VP, WP**

R36/38	Reizend für Augen und Haut
R43	Kann bei Hautkontakt zur Sensibilisierung führen
S26	Im Falle von Augenkontakt sofort mit viel Wasser spülen und Arzt aufsuchen
S28.1	Im Falle von Hautkontakt sofort mit viel Wasser waschen

### Substratlösung (S)

Das TMB-Substrat (S) enthält 3,3',5,5' Tetramethylbenzidin.

R20/21/R22	Gesundheitsschädlich bei Inhalation, Berührung mit der Haut und beim Verschlucken
R36/37/38	Reizend/ Irritierend für Augen, Haut und Atmungssystem
S26	Im Falle von Augenkontakt sofort mit viel Wasser spülen und Arzt aufsuchen
S36/37	Geeignete Schutzhandschuhe und Schutzkleidung tragen

### Stopplösung (SL)

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

R36/38	Reizt die Augen und die Haut
S26	Im Falle von Augenkontakt sofort mit viel Wasser spülen und einen Arzt aufsuchen
S36/37	Geeignete Schutzhandschuhe und Schutzkleidung tragen

### Erste-Hilfe Maßnahmen:

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

*Nach Augenkontakt:* Nach Berührung mit den Augen während mindestens 15 Minuten 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.

## TESTDURCHFÜHRUNG

Bei der **Testdurchführung** sollten Standards **A-G**, Kontrollseren **KS1 & KS2** und die jeweiligen Proben möglichst schnell pipettiert werden (z.B. in 15 Minuten). Das Enzym-Konjugat **EK**, die Substratlösung **S** sowie die Stopplösung **SL** sollten jeweils in derselben Reihenfolge und in demselben Zeitintervall auf die Platte zugegeben werden. Dies verhindert Variationen in der Konzentrationsbestimmung durch unterschiedliche Inkubationszeiten.

Die Messungen (Standards, Kontrollen und Proben) sollten stets in Doppelbestimmung durchgeführt werden. Um optimale Ergebnisse zu erhalten, ist auf genaues Pipettieren und strikte Befolgung des Testprotokolls zu achten.

**WICHTIG:** Die Vertiefungen **A1 und A2** bitte bis zur Substrat Zugabe, Schritt 8, **frei lassen**

- 1) In alle **Vertiefungen außer A1/A2**, die benutzt werden sollen, **50 µl Antikörperkonjugat AK** pipettieren.
- 2) in die Positionen B1/2 je **50 µl Standard A (0 ng/ml)**,  
in die Positionen C1/2 je **50 µl Standard B (0,1 ng/ml)**,  
in die Positionen D1/2 je **50 µl Standard C (0,5 ng/ml)**,  
in die Positionen E1/2 je **50 µl Standard D (1 ng/ml)**,  
in die Positionen F1/2 je **50 µl Standard E (2 ng/ml)**,  
in die Positionen G1/2 je **50 µl Standard F (4 ng/ml)**,  
in die Positionen H1/2 je **50 µl Standard G (8 ng/ml)**.

Zur Kontrolle der korrekten Durchführung des Tests können je **50 µl** der **1:16** in Verdünnungspuffer **VP** (oder entsprechend der jeweiligen Verdünnung der Proben) verdünnten **Kontrolle KS1** in die Positionen A3/4 gegeben werden und **Kontrolle KS2** in B3/B4.

In die restlichen Vertiefungen können je **50 µl der verdünnten Proben** (i.Allg. **1:16** in Verdünnungspuffer **VP** verdünnt, die Verdünnungen bitte sofort nach Probenzugabe mischen und innerhalb von 60 Minuten verwenden) pipettiert werden.

- 3) Die Vertiefungen der Platte werden mit Klebefolie dicht abgedeckt und **1 Stunde** bei **Raumtemperatur** inkubiert.
- 4) Nach Ablauf der Inkubationszeit werden die Lösungen abgesaugt und die Platte mit **300 µl Waschpuffer WP** / Vertiefung **fünfmal** gewaschen.
- 5) Nach dem letzten Waschschrift werden **100 µl Enzymkonjugat EK** in jede Vertiefung pipettiert, **außer A1/A2**.
- 6) Die Vertiefungen der Platte werden mit Klebefolie dicht abgedeckt und **30 min** bei **Raumtemperatur** inkubiert.
- 7) Nach Abschluss dieser Inkubation wird die Platte wie in Schritt 4) beschrieben 5x gewaschen.
- 8) In jede Vertiefung werden **100 µl der Substratlösung S** pipettiert, **auch in A1/A2**.
- 9) Die Platte wird **15 Minuten im Dunkeln** bei **Raumtemperatur** inkubiert.
- 10) Nach Ablauf der Inkubationszeit wird in jede Vertiefung, **auch in A1/A2**, **100 µl Stopplösung SL** pipettiert.
- 11) Die Ausmessung der Farbreaktion erfolgt **innerhalb von 30 Minuten bei 450 nm (Referenzfilter ≥590 nm)**.

## AUSWERTUNG

### Berechnung der Standardkurve

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

Die bereitgestellten Standards enthalten folgende hIGFBP-1 Konzentrationen:

Standard	A	B	C	D	E	F	G
ng/ml	0	0.1	0.5	1	2	4	8

- 1) Ermittlung des **Mittelwerts** der optischen Dichte des Leerwertes aus den Doppelbestimmungen (Vertiefung A1/A2).
- 2) Von den Mittelwerten der optischen Dichte der Standardkonzentrationen und der Proben wird der mittlere Leerwert abgezogen.
- 3) Die Standardkonzentrationen (x-Achse) werden gegen die gemessene optische Dichte (y-Achse) aufgetragen.
- 4) Die Berechnung der Standardkurve 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** der jeweiligen für die Proben berechneten Konzentration mit dem entsprechenden **Verdünnungsfaktor** der Proben ergibt die **Endkonzentration in ng/ml**.

## ERWARTUNGSWERTE

Die IGFBP-1 Konzentrationen in humanen Serumproben von 69 gesunden Probanden wurde mit dem Mediagnost E01 Kit gemessen. Es zeigten sich leichte geschlechtsspezifische Differenzen. Dabei lag die Konzentration aller Proben im Bereich von 0,23 ng/ml bis 17,94 ng/ml (s. Tabelle 5).

**Tabelle 5:** Erwartungswerte in Serum gesunder Erwachsener

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



## PACKAGE INSERT ENGLISH

### TECHNICAL FEATURES+APPLICATIONS

- ◆ **Quantitative determination of IGFBP-1** in serum and in other body fluids, like e.g. amniotic fluid, milk, urine or saliva etc. and in cell culture media.
- ◆ extremely high **analytical sensitivity of 0.02 ng/ml**
- ◆ Inter-Assay variation of 7,4% and Intra-Assay variation of 6,8%
- ◆ results available in **only 1.75 h incubation time**

### INTRODUCTION

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

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

In pregnancy IGFBP-1 maternal serum concentration increases significantly with maximal values in the second trimester or 22-23 week of gestation (75.8 ng/ml) [5] and decreases slowly until term. IGFBP-1 concentration are not only increased in maternal but also in foetal serum and with extremely high concentrations in amnion fluid. Here concentration can reach more than the 1000-fold of serum values [7]. Long-term changes of serum IGFBP-1 concentration can also be found in amnion fluid: IGFBP-1 level of the child decreases after birth until it reaches the low steady-state level of puberty and adulthood [8, 9].

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

Relevance of serum and amnion IGFBP-1 in diagnostics has been investigated in several areas. A diagnostic value was assigned for trisomy 18, intrauterine growth retardation, endometrial tumors and pre-eclampsia [14].

Thoroughly investigated was the diagnostic value in insulin resistance and pre-term rupture of the membrane and especially in the second field a significant diagnostic value could be demonstrated.

- **Energy metabolism**

Based on the influence of Insulin on IGFBP-1 serum concentrations IGFBP-1 is said to be a possible marker for insulin resistance. Because measurement of IGFBP-1 is much easier facilitated than Glucose – uptake rate this would simplify diagnosis of insulin resistance.

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

- **Pregnancy**

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

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

## **INTENDED USE**

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

## **PERFORMANCE CHARACTERISTICS AND VALIDATION**

The Mediagnost ELISA for IGFBP-1 E01 is a so-called Sandwich-Assay. It utilizes two specific and high affinity antibodies for this protein. The IGFBP-1 in the sample binds to the immobilized first antibody on the microtiter plate. In the following step, the biotinylated and Streptavidin-Peroxidase conjugated second specific anti-IGFBP-1-Antibody binds in turn to the immobilised IGFBP-1. Finally, the bound peroxidase catalyses the substrate reaction resulting in a colored product. Therefore colour intensity is highly specific and quantitatively depending on the IGFBP-1-level of the samples.

The standards of the ELISA E01 are **native human IGFBP-1** in concentrations of **0; 0.1; 0.5; 1; 2; 4 and 8 ng/ml**.

The **analytical sensitivity** of the ELISA E01 yields **0.02 ng/ml** (equal to **2 pg per well**; 2 SD of zero standard in 22fold determination).

The determination of IGFBP-1 with Mediagnost ELISA E01 is over a very wide range authentic in dilution. The **linearity of serum dilutions** is over a wide range **excellent** (table 1).

**Table 1:** Linearity of Dilution (typical results of 2 different sera)

Dilution:	sample 1 (re-calculated, ng/ml)	Dilution:	sample 2 (re-calculated, ng/ml)
1:2.5	14.38	1:2.5	16.81
1:5	14.22	1:5	15.51
1:10	13.42	1:10	16.22
1:20	13.81	1:20	14.45
1:40	13.11	1:40	15.12
1 :80	12.52	1 :80	13.43
1 :160	14.65	1 :160	15.95
<b>AV / 1SD / CV%</b>	<b>13.73 / 0.76 / 5.53</b>	<b>AV / 1SD / CV%</b>	<b>15.36 / 1.14 / 7.44</b>

AV = average value, SD = standard deviation, CV = coefficient of variation

The **recovery** of native IGFBP-1 in different sample matrices is listed in table 4 (page 13).

The measured **cross reactivity** for recombinant IGFBP-2 as well as IGFBP-3 was found to be negligible, measured in 500 ng/ml each, **less than 0.0015%** were quantitated.

The **Inter-** and **Intra-Assay** coefficients of variation were found less than **7.4% and 6.8%**. Exemplary determinations are shown in table 2 and table 3.

**Table 2: Inter-Assay-Variation**

	Average Value (ng/ml)	Standard Deviation (ng/ml)	Coefficient of Variation (%)
<b>Sample 1</b>	2.31	0.12	5.23
<b>Sample 2</b>	18.41	1.36	7.36
<b>Sample 3</b>	32.79	2.22	6.75

**Table 3: Intra-Assay-Variation**

	Average Value (ng/ml)	Standard Deviation (ng/ml)	Coefficient of Variation (%)
<b>Sample 1</b>	1.45	0.08	5.87
<b>Sample 2</b>	20.64	1.29	6.23
<b>Sample 3</b>	162.99	11.09	6.81

The comparison of IGFBP-1 determinations of 35 sera from healthy adults with the Mediagnost ELISA E01 and another commercially available ELISA yields a very good accordance of absolute concentrations by a **very high correlation**:  $y = 1.15x + 0.12$ ;  $r^2 = 0.94$ , the comparison with a further commercial ELISA yields, at a likewise **very high correlation**:  $y = 3.33x + 3.0$ ;  $r^2 = 0.90$ , measured values of approx. one third of the respective concentrations.

## SPECIMEN COLLECTION, PREPARATION AND STORAGE

Serum samples, EDTA- and Heparin-Plasma samples are suitable. A special external sample preparation prior to assay is not required. Results in Citrate-Plasma are about 15% reduced. Slight hemolysis of the samples doesn't disturb the determination.

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 IGFBP-1 levels were found to be unaffected by few cycles(3x) in our experiments.

In most determinations (e.g. Serum- or Plasma samples and no extreme values expected, see table 4 for further details) the dilution of **1:16 with Dilution Buffer VP is suitable**, the respective covered range would be 0 to 128 ng/ml.

Suggestion for dilution protocol:

Pipette 300 µl **Dilution Buffer VP** in PE-/PP-Tubes (application of a multi-stepper is recommended in larger series), add **20 µl Serum- or Plasma** (dilution 1:16) and mix each tube **immediately**. After mixing use **50 µl** of this solution within 1 hour **per determination** in the assay.

Where required, depending on the expected IGFBP-1-values, the dilution with Dilution Buffer VP can be higher or lower (at least however 1:2.5). The IGFBP-1 concentrations maybe completely different in body fluids of human origin other than serum or in cell culture supernatants. Examples as well as dilution recommendations are given in table 4.

**Table 4:** Sample matrices, recovery and dilution recommendation

Samples	Concentration IGFBP-1 (ng/ml)	Recovery of added IGFBP-1	Recommended Dilution as Sample in E01
Amniotic Fluid	8,140.0 16,450.0	n.d.	individually different at least 1:5000 up to 1:25000
Mother Milk	5.12 20.2	91% (at 1:10 dil.) n.d.	1:10
Urine	0.07	89.8% (at 1:2.5 dil.)	1:2.5
Saliva	< 0.02 ng/ml	62.5% (at 1:2.5 dil.)	at least 1:2.5
Bronchial Lavage	< 0.02 ng/ml	100% (at 1:2.5 dil.)	1:2.5
Sputum	< 0.02 ng/ml	100% (at 1:20 dil.)	1:20
Serum pool	0.57	105.1% (at 1:16 dil.)	1:16 (general recommendation)
Pregnancy sera	n.d.	n.d.	1:25
Cell Culture Media	individually different	94.5% (at 1:5 dil.)	individually different at least 1:5

n.d.= not determined

**REAGENTS PROVIDED**

1)	<b>MTP</b>	<b>Microtiter plate</b> , ready for use: Microtiter plate with 96 wells, divided up in 12 strips with 8 wells separately breakable, coated with anti-human IGFBP-1 Antibody, packed in a laminate bag.
2)	<b>CAL</b>	<b>Standards A-G</b> , lyophilised, contain native human IGFBP-1. Standard values are between 0 – 8 ng/ml (0; 0.1; 0.5; 1; 2; 4 and 8 ng/ml) IGFBP-1, Standards are <b>reconstituted with 500 µl Dilution Buffer VP each</b> . Use 50 µl pro well in the assay.
3)	<b>BUF</b>	<b>Dilution Buffer VP, 125 ml</b> , ready for use, please use for dilution of samples, control and standards.
4)	<b>Control</b>	<b>Control Sera KS1 and KS2, 250 µl</b> , lyophilised, contain human Serum and should be <b>reconstituted in 250 µl Dilution Buffer VP each</b> . The IGFBP-1 target values and the respective ranges are given on the vial label. The dilutions should be according to the dilution of the respected samples. Use 50 µl pro well in the assay.
5)	<b>Ab</b>	<b>Antibody Conjugate AK, 6 ml</b> , contains biotinylated anti-human IGFBP-1 Antibody. Ready for use. Use 50 µl pro well in the assay.
6)	<b>CONJ</b>	<b>Enzyme Conjugate EK, 12 ml</b> , contains HRP (Horseradish-Peroxidase)-labeled Streptavidin. Ready for use. Use 100 µl pro well in the assay.
7)	<b>WASHBUF 20x</b>	<b>Washing Buffer (WP), 50 ml</b> , 20 X concentrated solution. Dilute 1:20 with Aqua dest. Attention: After dilution the Washing Buffer is only 4 weeks stable, dilute only according to requirements.
8)	<b>SUBST</b>	<b>Substrate (S), 12 ml</b> , ready for use, horseradish-peroxidase-(HRP)-substrate, stabilised H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> Tetramethylbencidine. Use 100 µl pro well in the assay
9)	<b>H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub></b>	<b>Stopping Solution (SL), 12 ml</b> , ready for use, 0.2 M sulphuric acid, Caution acid! Use 100 µl pro well in the assay
10)		Sealing tape for covering of the microtiter plate, 2 x, adhesive.

## **MATERIALS REQUIRED BUT NOT PROVIDED**

Precision pipettes and multichannel pipettes with disposable plastic tips

Distilled or deionized water for dilution of the Washing Buffer (WP)

Vortex-mixer

Microtiter plate washer (recommended)

Micro plate reader ("ELISA-Reader") with filter for 450 and  $\geq 590$  nm

Polyethylen PE/Polypropylen PP tubes for dilution of samples

## **TECHNICAL NOTES**

The assay has to be conducted strictly according the test protocol herein.

Reagents with different lot numbers cannot be mixed. The microtiterplate and reagents are stable until the indicated expiry, if stored unopened and protected from sunlight at 2 – 8°C.

The shelf life of the components after opening is not affected, if used appropriately.

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.

### **Incubation at room temperature means: 20-25°C**

Proper washing is of basic importance for a secure, reliable and precise performance of the test. Incomplete washing is common and will adversely affect the test outcome. Possible consequences may be uncontrolled unspecific variations of measured optical densities, potentially leading to false results calculations of the examined samples. Effects like high background values or high variations may indicate washing problems.

All washing must be performed with the provided washing buffer diluted to usage concentration. Washing volume per washing cycle and well must be 300  $\mu$ l at least.

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

When using an automatic microtitre 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 dynamically swinging out the microtitre 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.

### **Standards and Controls**

For the reconstitution of the lyophilised components (Standards A - G and Control Sera KS1 & KS2) the kit **Dilution Buffer VP** has to be used. 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.

The reconstituted standards and controls can be stored for 3 months at  $-20^{\circ}\text{C}$ . Repeated freeze/thaw cycles have to be avoided. When using the standards anew, please thaw them rapidly but gently (no temperature rise over the room temperature and no powerful vortexing), 3 of these freezing-thawing cycles showed no influence on the assay.

In case you plan to perform multiple independent determinations over a longer period with one kit, you should aliquot the components prior to freezing into suitable smaller volumes.

### **Washing Buffer**

The required volume of washing buffer is prepared by 1:20 dilution of the provided 20-fold concentrate with deionised water. The diluted Washing Buffer is stable for max. 4 weeks at  $2-8^{\circ}\text{C}$ .

### **Substrate Solution**

The **Substrate Solution S**, stabilised  $\text{H}_2\text{O}_2$ -Tetramethylbenzidine, is photosensitive – store and incubate in the dark.

### **Microtiterplate**

Store the once unused microtiter strips and wells together with the desiccant in the tightly closed clip lock bag at  $2-8^{\circ}\text{C}$  use in the frame provided. The labelled expiry is not influenced in case of proper storage.

## WARNINGS AND PRECAUTIONS

### For in-vitro diagnostic use only. For professional use only.

Before starting the assay, read the instructions completely and carefully. Use the valid version of the package insert provided with the kit. Be sure that everything is understood. The Mediagnost GmbH is not liable for any loss or harm caused by non-observance of the instructions, as far as no law withstands.

**Temperature WILL affect the absorbance** readings of the assay. However, values for the patient samples will not be affected.

Do not use expired reagents.

Use separate pipette tips for each sample, control and reagent to avoid cross contamination. Use reservoirs only for single reagents. This especially applies to the substrate reservoirs. Using a reservoir for dispensing a substrate solution that had previously been used for the conjugate solution may turn solution colored. Do not pour reagents back into vials as reagent contamination may occur. Mix the contents of the microplate wells thoroughly to ensure good test results. Do not reuse microwells. Do not let wells dry during assay; add reagents immediately after completing the rinsing steps.

Caution: This kit contains material of human and/or animal origin.

### Human Serum

Contained in following components: **Control Serum KS1 and KS2.**

The sources of human sera were tested by FDA recommended methods and found non-reactive for Hepatitis-B surface antigen (HBsAg), Hepatitis C virus (HCV), and Human Immunodeficiency Virus 1 and 2 (HIV) antibodies. No known test methods can offer total assurance of the absence of infectious agents; therefore all components and patient's specimens should be treated as potentially infectious.

### Stop solution contains 0.2 M Sulfuric Acid (H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>)

R36/38 Irritating to eyes and skin  
S26 In case of contact with eyes, rinse immediately with plenty of water and seek medical advice  
S28.1 After contact with skin, wash immediately with plenty of water  
S36/37 Wear suitable protective clothing and gloves

### 2-Methyl-4-Isothiazolin-3-one

contained in following components: **AK, EK, VP**

< 0.01% 2-Methyl-4-isothiazolin-3-one Solution

R34 Irritating to eyes and skin  
R43 Sensibilisation through skin contact possible  
S26 In case of contact with eyes, rinse immediately with plenty of water and seek medical advice  
S36/37 Wear suitable protective clothing and gloves  
S45 In case of accident or if you feel unwell seek medical advice

### 5-chloro-2-methyl 2H isothiazol-3-one and 2-methyl-2H-Isothiazol-3-one

contained in following components: **AK, EK, VP, WP**

< 0.01% (w/w) 5-chloro-2-methyl 2H isothiazol-3-one and 2-methyl-2H-Isothiazol-3-one Solution

R36/38 Irritating to eyes and skin  
R43 Sensibilisation through skin contact possible  
S26 In case of contact with eyes, rinse immediately with plenty of water and seek medical advice  
S28.1 After contact with skin, wash immediately with plenty of water

### General first aid procedures:

Skin contact: Wash affected area thoroughly with water. Discard 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: If swallowed, wash out mouth thoroughly with water. Immediately see a physician.

Do not eat, drink or smoke in these areas.

Never pipette the materials with the mouth.

Spilled material must be wiped off immediately and should become disinfected. Clean contaminated areas and equipment with a suitable detergent.

## ASSAY PROCEDURE

NOTES: All determinations (Standards, Control Sera and samples) should be assayed in duplicate. For optimal results, accurate pipetting and adherence to the protocol are recommended.

When performing the assay, the Standards, Control Sera and the samples should be pipette as fast as possible (e.g. <15 minutes). To avoid distortions due to differences in incubation times, the **Enzyme Conjugate EK**, the **Substrate Solution S** as well as the **Stop Solution SL** should be added to the plate in the same order and in the same time interval each, respectively.

IMPORTANT: Please leave the wells A1/A2 until addition of the **Substrate Solution**, step 8, empty.

1) Please pipette in all needed wells, **except A1/A2**, **50 µl Antibody Conjugate AK**.

2) Pipette in positions B1/2 **50 µl** each **Standard A (0 ng/ml)**,  
pipette in positions C1/2 **50 µl** each **Standard B (0.1 ng/ml)**,  
pipette in positions D1/2 **50 µl** each **Standard C (0.5ng/ml)**,  
pipette in positions E1/2 **50 µl** each **Standard D (1 ng/ml)**,  
pipette in positions F1/2 **50 µl** each **Standard E (2 ng/ml)**,  
pipette in positions G1/2 **50 µl** each **Standard F (4 ng/ml)**,  
pipette in positions H1/2 **50 µl** each **Standard G (8 ng/ml)**.

To control the correct accomplishment, **50 µl** of the **1:16** (or in respective dilution rate of the sample) in Dilution Buffer **VP** diluted **Control Sera KS1** and **KS2** can be pipetted in positions A3/4 and B3/4.

Pipette **50 µl each** of the **diluted samples** (generally 1:16 diluted in Dilution Buffer **VP**, please mix the dilutions immediately after sample addition and use within 60 minutes) in the rest of the wells, according to requirements.

3) Cover the wells with the sealing tape and incubate the plate for **1 hour** at **room temperature**

4) After incubation aspirate the contents of the wells and wash the wells **5 times** with **300 µl Washing Buffer WP**.

5) Following the last washing step, pipette **100 µl Enzyme Conjugate EK** in each well, **except A1/A2**.

6) Cover the wells with the sealing tape and incubate **30 min** at **room temperature**

7) After incubation wash the wells 5 times with **Washing Buffer WP** as described in step 4)

8) Pipette **100 µl of the TMB-Substrate solution S** in each well, **also in A1/A2**.

9) Incubate the plate for **15 Minutes in the dark** at **room temperature**.

10)After incubation pipette **100 µl Stop Solution SL** in each well, **also in A1/A2**.

11)Measure the absorbance **within 30 minutes at 450 nm (Reference filter ≥590 nm)**.

## CALCULATION OF RESULTS

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 Standard G should be above 1.00.

Samples, which yield higher absorbance values than **Standard G**, are beyond the standard curve, for reliable determinations such samples should be retested at a higher dilution.

### Establishing the Standard Curve

The standards provided contain the following concentration of native hIGFBP-1:

Standard	A	B	C	D	E	F	G
ng/ml	0	0.1	0.5	1	2	4	8

- 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 values.
- 3) Plot the standard concentrations on the x-axis versus the mean value of the absorbances of the standards on the y-axis.
- 4) Recommendation: Calculation of the standard 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 **concentration in ng/ml** of the samples can be calculated **by multiplication** with the respective dilution factor.

## EXPECTATION VALUES

Concentrations of IGFBP-1 in human sera of 69 healthy adult donors were determined with the Mediagnost ELISA E01. Slight gender dependent differences were found, the concentrations of all samples varied from minimal 0.23 ng/ml to maximal 17.94 ng/ml (see table 5).

**Table 5:** Expectation values in sera of healthy adults (measured values in ng/ml)

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

## LITREATURE / LITERATUR

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

# KURZANLEITUNG – MEDIAGNOST IGFBP-1 -ELISA E01

Rekonstitution/ Verdünnung von Reagenzien		
Standards A-G	Rekonstitution in Verdünnungspuffer VP	je 500 µl
Kontrollseren KS1 und KS2	Rekonstitution in Verdünnungspuffer VP	je 250 µl
Waschpuffer WP	verdünnen in A. dest. (z.B. die gesamte Menge von 50 ml im Standzylinder auf 1000 ml auffüllen)	1:20
Probenverdünnung + Kontrollserum KS1 und KS2: 1:16 in Verdünnungspuffer VP Davon 50 µl pro Bestimmung einsetzen		
Vor der Testdurchführung alle Reagenzien auf Raumtemperatur bringen.		

## Testdurchführung Doppelbestimmung (Vorschlag):

Pipettieren	Reagenzien	Position
<b>WICHTIG: Bitte die Positionen A1 / A2 bis zur Zugabe von Substrat leer lassen!</b>		
50 µl	Antikörper Konjugat AK	In alle Vertiefungen außer A1/A2
50 µl	Standard A (0 ng/ml)	B1 und B2
50 µl	Standard B (0,1 ng/ml)	C1 und C2
50 µl	Standard C (0,5 ng/ml)	D1 und D2
50 µl	Standard D (1 ng/ml)	E1 und E2
50 µl	Standard E (2 ng/ml)	F1 und F2
50 µl	Standard F (4 ng/ml)	G1 und G2
50 µl	Standard G (8 ng/ml)	H1 und H2
50 µl	1:16 verdünntes Kontrollserum KS1	A3 und A4
50 µl	1:16 verdünntes Kontrollserum KS2	B3 und B4
50 µl	1:16 verdünnte Proben	in die Vertiefungen nach Bedarf
Mit Klebefolie die Vertiefungen dicht abdecken		

## Inkubation: 1 h bei RT, ohne Schütteln

5x 300 µl	Absaugen und die Platte 5x mit je 300 µl Waschpuffer WP / Vertiefung waschen.	In jede Vertiefung
100 µl	Enzym Konjugat EK	In jede Vertiefung, außer A1/A2

## Inkubation: 30 min bei RT, ohne Schütteln

5x 300 µl	Absaugen und die Platte 5x mit je 300 µl Waschpuffer WP / Vertiefung waschen	In jede Vertiefung
100 µl	Substrat S	In jede Vertiefung

## Inkubation: 15 min im Dunklen bei RT

100 µl	Stopplösung SL	In jede Vertiefung
Ausmessung innerhalb von 30 min bei 450 nm (≥590 nm Referenz)		



## SUMMARY – MEDIAGNOST IGFBP-1 ELISA E01

Reconstitution / Dilution of Reagents		
Standards A-G	Reconstitution in 500 µl <b>Dilution Buffer VP</b>	
Control Sera KS1 and KS2	Reconstitution in 250 µl <b>Dilution Buffer VP</b>	
Wash Buffer WP	dilute in <b>A. dest.</b> (e.g. total volume of 50 ml in a graduated flask and fill up to 1000 ml)	<b>1:20</b>
Dilute Sample and <b>Control Sera KS1 and KS2</b> 1:16 with <b>Dilution Buffer DB</b>		
Before beginning the test procedure bring all reagents to room temperature.		

### Assay Procedure for Double Determinations:

Pipette	Reagent	Position
<b>IMPORTANT: Leave the position A1 / A2 empty until addition of Substrate!</b>		
50 µl	Antibody Conjugate <b>AK</b>	In all wells except A1 / A2
50 µl	Standard <b>A (0 ng/ml)</b>	B1 and B2
50 µl	Standard <b>B (0.1 ng/ml)</b>	C1 and C2
50 µl	Standard <b>C (0.5 ng/ml)</b>	D1 and D2
50 µl	Standard <b>D (1 ng/ml)</b>	E1 and E2
50 µl	Standard <b>E (2 ng/ml)</b>	F1 and F2
50 µl	Standard <b>F (4 ng/ml)</b>	G1 and G2
50 µl	Standard <b>G (8 ng/ml)</b>	H1 and H2
50 µl	1:16 diluted Control Serum <b>KS1</b>	A3 and A4
50 µl	1:16 diluted Control Serum <b>KS2</b>	B3 and B4
50 µl	1:16 diluted Samples	following wells
Cover the wells with the sealing tape.		

### Incubation: 1 h at RT, without shaking

5x 300 µl	Aspirate the contents of the wells and wash <b>5x</b> with <b>300 µl Wash Buffer WP</b>	each well
100 µl	Enzyme Conjugate <b>EK</b>	each well, except A1/A2

### Incubation: 30 min at RT, without shaking

5x 300 µl	Aspirate the contents of the wells and wash <b>5x</b> with <b>300 µl Wash Buffer WP</b>	each well
100 µl	Substrate <b>S</b>	each well

### Incubation: 15 min in the dark RT

100 µl	Stop Solution <b>SL</b>	each well
Measure the absorbance within <b>30 min</b> at <b>450 nm</b> with <b>≥ 590 nm</b> as reference wavelength.		

REF E01



## International Test Description

<b>CAL</b> A-G	A -G	<b>Rec in</b> 500 µl VP	500 µl
<b>Control</b>	KS1, KS2	<b>Rec in</b> 250 µl VP	250 µl
<b>WASHBUF</b> 20x	WP		1:20 <b>DILU</b> A. dest.

<b>SPE</b> + <b>Control</b> 1:16 <b>DILU</b> VP	50 µl
<b>°C</b> 20-25 °C	

50 µl	<b>AK</b>	B1/2 → End
50 µl	<b>CAL</b> A (0 ng/ml)	B1/2
50 µl	<b>CAL</b> B (0.1 ng/ml)	C1/2
50 µl	<b>CAL</b> C (0.5 ng/ml)	D1/2
50 µl	<b>CAL</b> D (1 ng/ml)	E1/2
50 µl	<b>CAL</b> E (2 ng/ml)	F1/2
50 µl	<b>CAL</b> F (4 ng/ml)	G1/2
50 µl	<b>CAL</b> G (8 ng/ml)	H1/2
50 µl	<b>CONTROL</b> KS1 1:16 ↔	A3/4
50 µl	<b>CONTROL</b> KS2 1:16 ↔	B3/4
50 µl	<b>SPE</b> 1:16 <b>DILU</b> VP (20 µl <b>SPE</b> +300 µl VP) ↔	
<b>TAPE</b>		

 1 h **°C** 20-25

5x 300 µl	5x <b>WASHBUF</b> WP	
100 µl	<b>CONJ</b> EK	B1/2→ End
<b>TAPE</b>		

 0.5 h **°C** 20-25

5x 300 µl	5x <b>WASHBUF</b> WP	
100 µl	<b>SUBST</b> <b>TMB</b> S	A1/2→ End

 0.25 h **°C** 20-25 

100 µl	<b>H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub></b> SL	A1/2→ End
<b>MEASURE</b>		