

IGFBP-2 - ELISA

Enzymimmunoassay für die quantitative Bestimmung von

Insulin-like Growth Factor Bindungsprotein-2

Deutsch

Enzymeimmunoassay for quantitative Determination of

Insulin-like Growth Factor Binding Protein-2

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/CA40/00809/13



IVD



REF

E05



mediagnost®

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>

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

SYMBOLS/ SYMBOLE /SYMBOLIS/ SIMBOLI/ SÍMBOLOS/ SÍMBOLOS/ SYMBOLEN/ SYMBOLER/ SYMBOLER/ SYMBOLE/ SZIMBÓLUMOK/ SYMBOLY/ SYMBOLY/ СИМВОЛИ/ SÜMBOLID/ ΣΥΜΒΟΛΑ/ 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/ Aegumiskuupäev/ Ημερομηνία λήξης/ Data de expirare/ Rok uporabe/ Viimeinen käyttöpäivä



Consider instructions for use/ Bitte Gebrauchsanweisung beachten/ Consultez la notice d'utilisation/ Consultare le istruzioni per l'uso/ Consulte las instrucciones de uso/ Respeitar as instruções de utilização./ A.u.b de gebruiksaanwijzing volgen/ Se brugsanvisningen/ Läs anvisningarna före användning/ Proszę przeczytać instrukcję obsługi/ Vegge 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 használatához)/ 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-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/ Télét-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 Referència/ Referentienummer/ Referencennummer/ Beställningsnummer/ Numer katalogowy/ Rendelési szám/Katalógové číslo/ Objednací číslo/Каталожен номер/Tellimisnumber/ Ap. 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/ Opbevares mellem/ Förvaras vid/ Przechowywać w/ Tárolási tartomány/ Skladujte v rozsahu / Skladujte v rozmezí/ Температурно ограничение/ Säilitada temperatuuridel/ Φύλαξη σε θερμοκρασία/ Depozitare între/ Skladištenje 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/ Utsatt inte för solljus/ Nie wystawiać na słońce/ Napfénytől távol tartandó/ Nevystavovat slnečnému svetlu/ Nevystavovat slunečnímu světlu/ Да се предпазва от слънчева светлина/ Kaitsta otsese päikesekiirguse eest/ Κρατήστε το μακριά από την ηλιακή ακτινοβολία/ Țineți 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/ Plytka microtiter/ Mikrotiter lap/ Mikrotitračná podložka/ Mikrotitrační podložka/ Микротитърна плака/ Mikrotiterplaat/ Τρυβλίο μικροτιτλοδότησης/ Microplacă/ Mikrotitraska plošča/ Mikrotitrauslevy



Reconstitute in/ Rekonstituieren in/ Reconstituer dans/ Ricostituire nel/ Reconstituir en/ Reconstituir em/ reconstitueren in/ Rekonstituér i/ rekonstituera/ Rekonstituować w/ Helyreállítás/ Znovu připravit za/ Znovu připravit za/ Разтваряне в/ Moodustada uuesti / Ανασυστήστε σε/ Reconstituire în/ Predelava v/ rekonstituoi



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

Ab CONJ	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/ antilichaamen enzymconjugaat/ Antistoffer og enzym-konjugat/ antikropps- och enzymkonjugat (antikropp och enzym, konjugat)/ Koniugat antyciał i enzymów/ Antitest és enzim páros/ Protilátkový a enzymatický konjugát/ Protilátkový a enzymatický konjugát/ Антитяло и энзим конюгат/ Antikehad ja ensüümi konjugaat/ Σύμπλοκο αντι σώματος-ενζύμου/ Compuși din anticorpi și enzime/ Antitelesa in konjugat encima/ Vasta-aine ja entsymi konjugaatti
DILU X	VP	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/ späd i buffert X/ Rozcieńczanie 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/ Iaimennetaan x puskuriin
CAL X	A-E	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
Control	KS	Control Serum / Kontrollserum/ Contôle sérique/ Siero di controllo/ Suero de control/ Soro de Control/ controleserum/ Kontrolserum/ Kontrollserum/ Serum kontrolne/ Ellenőrző szérum/ Kontrolné sérum/ Kontrolní sérum/ Контролен серум/ Kontrollseerum/ Ορός ελέγχου/Ser de control/ Kontrolni serum/ Kontrolli seerumi
WASHBUF 20x	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/ Mosópuffer koncentrátum/ Koncentrát vymývacieho pufru/ Концентрат на промивен буфер/ Pesupuhvi kontsentraat/ Συμπύκνωμα ρυθμιστικού διαλύματος έκπλυσης/ Concentrat pentru tamponul de spălare/ Koncentrat izpiralnega pufru/ Pesuliuositiiviste
WASHBUF		Washing Buffer / Waschpuffer/ Tampon de lavage/ Tampone di lavaggio/ Tampón de lavado/Tampão de Lavagem/ wasbuffer/ Vaskebuffer/ tvättbuffert/ Bufor płukania/ Mosópuffer/ Vymývací pufer/ Vymývací pufr/ Промивен буфер/ Pesupuhver/ Ρυθμιστικό διάλυμα έκπλυσης/ Tampon pentru spălare /Izpiralni pufer/ Pesuliuos
SUBST TMB	S	Substrate/ Substrat/ Substrat/ Substrato/ Substrato/ Substrato/ substraat/ Substrat/ Substrat/ Substrat/ Substrátum/ Substrát/ Substrát/ Субстрат Substraat/ Υπόστρωμα/ Substrat/ Substrat/ Substraatiliuos
H₂SO₄	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/ Стопирещ разтвор/ Stopp-lahus/ Διάλυμα διακοπής/ Soluție de oprire/ Stop raztopina/ Pysäytysliuos
TAPE		Cover Plate with sealing tape /Platte abkleben/ Recouvrir la microplaque avec bande adhésive/ Coprire la piastra con nastro adesivo/ Cubrir la placa con una cinta adhesiva/ Cobrir a Placa com fita adesiva/ plaatje met tape afdekken/ Afdækningsplade med tape/ maskera platta/ Odkleić płytke/ Tányér leragasztása/ Oblepiť podložku lepiacou páskou/ Olepit podložku lepicí páskou/ Пластика с лента за запечатване/ Katta plaat isoleerklleplindiga/ Κολλήστε το πλακίδιο με κολλητική ταινία/ Aoperiti placa cu o bandă adezivă/ Prelepiti ploščo/ Peitã mikrotitrauslevy oheisella teipillä
MEASURE		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 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 mérése 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)./ Mäsurare 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)
Literatur		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 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
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/ kaiktiin tarvittaviin mikrotitrauslevyn syvennyksiiin

Vor Gebrauch ist die gesamte Packungsbeilage zu lesen!

Read entire protocol before use!

Symbols/ Symbole /Symboles/ Simboli/ Símbolos/ Símbolos/ Symbolen/ Symboler/ Symboler/ Symbole/ Szimbólumok/ Symboly/ Symboly/ Символы/ Sümbold/ Σύμβολα/ Simboluri/ Simboli/ Symbolit	2
Packungsbeilage	
Deutsch	
Zugelassener Verwendungszweck	5
KLINISCHE BEDEUTUNG	5
EINFÜHRUNG	5
PHYSIOLOGISCHE BEDEUTUNG	6
MATERIALIEN	7
Inhalt der Testpackung	7
Zusätzlich benötigte Materialien	7
WARNHINWEISE UND VORSICHTSMAßNAHMEN	8
METHODE	9
Lagerung der Proben	9
Proben Vorbereitung	9
TECHNISCHE HINWEISE	10
Substrat	11
TESTDURCHFÜHRUNG	12
AUSWERTUNG	13
Berechnung der Standardkurve	13
LEISTUNGSMERKMALE	14
Standard	14
Sensitivität	14
Spezifität	14
Interferenz	14
Recovery	15
Reproduzierbarkeit und Präzision	15
Linearität	15
Referenzwerte	16
EINSCHRÄNKUNGEN	16
INTENDED USE	17
Package Insert	
English	
CLINICAL IMPLICATIONS	17
INTRODUCTION	17
PHYSIOLOGICAL MEANING	17
REAGENTS PROVIDED	18
MATERIALS REQUIRED BUT NOT PROVIDED	18
WARNINGS AND PRECAUTIONS	19
PRINCIPLE	20
SPECIMEN	20
Storage of the samples	20
Sample Preparation	20
TECHNICAL NOTES	21
Microtiter plate	22
ASSAY PROCEDURE	23
CALCULATION OF RESULTS	24
Establishing the Standard Curve	24
PERFORMANCE CHARACTERISTICS	25
Sensitivity	25
Specificity	25
Interference	25
Recovery	26
Reproducibility and Precision	26
ReferEnce VALues	27
LIMITATION	27
Appendix /Anhang	28
LITERATUR / LITERATURE	31
KURZANLEITUNG – MEDIAGNOST IGFBP-2-ELISA E05	33
SUMMARY – Mediagnost IGFBP-2 ELISA E05	35
REF E05 International Test description	36

* please ask for package inserts in your national language

** please ask for special package insert

PACKUNGSBEILAGE DEUTSCH

MEDIAGNOST IGFBP-2 ELISA E05

- Messung von IGFBP-2 in **Serum** und **Plasma** und in anderen **Körperflüssigkeiten**
- Einzelstandards mit **2, 10, 20, 40** und **80 ng/ml** sind im Kit enthalten
- Gesamtinkubation nur **1,75 Stunden**
- Gebrauchsfertiges Antikörperkonjugat
- Proben-Extraktion nicht nötig
- Testplatten enthalten einzeln abbrechbare Vertiefungen
- Kalibriert mit rekombinantem IGFBP-2

ZUGELASSENER VERWENDUNGSZWECK

Messung von humanem IGFBP-2 in menschlichem Serum, EDTA Plasma, Cerebrospinalflüssigkeit, Muttermilch, Amnionflüssigkeit, Saliva und Zellkulturmedium.

KLINISCHE BEDEUTUNG

Die IGFBP-2 Konzentration ist im Blut altersabhängig (3).

Referenzwerte für Personen zwischen 1.5 bis >70 Jahre wurden für diesen Assay evaluiert

Ergänzender Parameter in der Wachstumsdiagnostik (IGFBP-2/IGFBP-3 Verhältnis), IGFBP-2 ist ein Inhibitor der Wachstumshormonwirkung (3,4).

Progressions-abhängiger Tumormarker bei Leukämien (5), astrozytischen Hirntumoren (6,7), Prostata- (8), Nebennierenrinden-(9)-, hepatozellulären (10) und anderen Karzinomen.

Anti-Aging Parameter: IGFBP-2 als physiologischer Funktionalitätsmarker (20).

EINFÜHRUNG

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

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

PHYSIOLOGISCHE BEDEUTUNG

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

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

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

MATERIALIEN

Inhalt der Testpackung

1)	MTP	Mikrotiterplatte , gebrauchsfertig: Mikrotiterplatte mit 96 Vertiefungen, die in 12 abnehmbare Streifen à 8 Vertiefungen (einzeln abbrechbar) aufgeteilt ist. Die Platte ist mit einem Antikörper gegen IGFBP-2 beschichtet.
2)	CAL	Standards A-E , lyophilisiert, enthalten humanes IGFBP-2: Die Verdünnungen der Standardkurve decken einen Bereich von 2 - 80 ng/ml (2,10,20,40,80 ng/ml) IGFBP-2 ab und werden mit je 750 µl Verdünnungspuffer VP rekonstituiert. Die exakten Konzentrationen sind auf den einzelnen Fläschchen angegeben.
3)	DILU	Verdünnungspuffer VP, 50 ml , gebrauchsfertig
4)	Control 1	Kontrollserum 1, KS1 , lyophilisiert: Enthält humanes Serum und muss in 100 µl Verdünnungspuffer VP rekonstituiert werden. Die IGFBP-2 Konzentration ist auf dem Etikett angegeben.
5)	Control 2	Kontrollserum 2, KS2 , lyophilisiert: Enthält humanes Serum und muss in 100 µl Verdünnungspuffer VP rekonstituiert werden. Die IGFBP-2 Konzentration ist auf dem Etikett angegeben.
6)	Ab CONJ	Antikörper-POD-Konjugat AK, 12 ml, gebrauchsfertig , enthält eine Mischung von biotinyliertem anti-IGFBP-2 Antikörper und POD (Meerettich-Peroxidase)-markiertem Streptavidin. Für den Assay werden jeweils 100 µl pro Vertiefung eingesetzt.
7)	WASHBUF 20x	Waschpuffer WP, 50 ml , 20-fach konzentrierte Lösung, bitte vor Gebrauch 1:20 mit A.dest. oder entmineralisiertem Wasser verdünnen (z.B. den gesamten Flascheninhalt von 50 ml im Standzylinder auf 1000 ml auffüllen). Der endverdünnte Waschpuffer kann 4 Wochen bei 4-8°C gelagert werden und ist vor Gebrauch auf Raumtemperatur zu bringen. Bitte nur nach Bedarf ansetzen.
8)	SUBST	Substrat S, 12 ml , gebrauchsfertig, Meerettich-Peroxidase-(POD)-Substrat, stabilisiertes H ₂ O ₂ -Tetramethylbenzidin
9)	H ₂ SO ₄	Stopplösung SL, 12 ml , gebrauchsfertig, 0,2 M Schwefelsäure
10)		Abdeckfolie 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
 Mikrotiterplattenschüttler (350 rpm)
 Mikrotiterplattenwasher (empfohlen)
 Photometer für Mikrotiterplatten ("ELISA-Reader"), Filter bei 450 und ≥590 nm.
 Polyethylen PE/ Polypropylen PP Röhrchen zum Verdünnen der Proben

WARNHINWEISE UND VORSICHTSMAßNAHMEN

Der Mediagnost E05 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 GmbH 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.

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: **KS1 und KS2**

Das humane Material, das für die Präparation dieses Produktes verwendet wird, ist durch von der US-amerikanischen Arzneimittelzulassungsbehörde FDA empfohlene Nachweisverfahren auf die Präsenz von Antikörpern 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 der Vorgaben der Biosicherheitsstufe 2 gehandhabt werden.

Die Reagenzien **AK, VP** enthalten als Konservierungsmittel (0,01%)

2-Methyl-4-isothiazolin-3-one Solution

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

Die Reagenzien **AK, VP, WP** enthalten als Konservierungsmittel (0,01%) (w/w)

5-chloro-2-methyl 2H isothiazol-3-one und 2-methyl-2H-isothiazol-3-one

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 (H₂SO₄)

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.

METHODE

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

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

Geeignete Proben

Serum, EDTA-Plasma, Cerebrospinal Fluid, Amnionflüssigkeit, Muttermilch, Zellkulturüberstand, und Saliva.

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

Hämolytische Reaktionen sind zu vermeiden.

Lagerung der Proben

Lagerung bei RT max. 2 Tage

Lagerung bei -20°C max. 2 Jahre

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

Proben Vorbereitung

Die Serumproben müssen vor der Messung 1:10 - 30-fach mit **Verdünnungspuffer VP** verdünnt werden, je nach erwarteten IGFBP-2-Werten. Im Allgemeinen ist eine Verdünnung 1:21 geeignet (und damit ist das minimal erforderliche Probenvolumen für eine Doppelbestimmung: 15 µl Serum). Ein Extraktionsschritt ist nicht erforderlich.

Vorgeschlagenes Verdünnungsprotokoll:

15 µl Serum werden mit der Hand oder mit Hilfe eines Dilutors mit 300 µl **Verdünnungspuffer VP** verdünnt (Verdünnung 1:21). Von dieser Lösung werden 2 x 100 µl im Assay eingesetzt. Die IGFBP-2 Konzentrationen in anderen humanen Körperflüssigkeiten als in Serum und in Kulturüberständen können stark von den Serumwerten abweichen.

TECHNISCHE HINWEISE

Der Assay ist strikt nach dem Testprotokoll durchzuführen.

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

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.

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.

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 fuselndem 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 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.

Standards und Kontrollen

Für die Rekonstitution der lyophilisierten Komponenten (Standards A-E, KS1 und KS2) muss der im Kit erhaltene Verdünnungspuffer VP verwendet werden. 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 muss vermieden werden.

Die rekonstituierten Standards und Kontrollen können bei –20°C für 2 Monate gelagert werden. Wiederholte Gefrier-/Tauzyklen sind zu vermeiden.

Waschpuffer

Das benötigte Volumen des Waschpuffers wird vorbereitet, indem das 20fach Konzentrat im Verhältnis 1:20 mit entionisiertem Wasser verdünnt wird. Der endverdünnte Waschpuffer kann 4 Wochen bei 4-8°C gelagert werden und ist vor Gebrauch auf Raumtemperatur zu bringen.

Testplatte

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

Substrat

Die Substratlösung S, stabilisiertes H₂O₂-Tetramethylbenzidin, ist lichtempfindlich – Aufbewahrung und Inkubation bitte vor Licht geschützt.

TESTDURCHFÜHRUNG

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.

Bei der Testdurchführung müssen Standards, Kontrollserum und die jeweiligen Proben möglichst in 15 Minuten pipettiert werden.

Alle Inkubationen müssen bei Raumtemperatur (20 – 25 °C) erfolgen!

Das Antikörper-POD-Konjugat AK sowie nachfolgend die Substratlösung S sollten in der gleichen Reihenfolge und in dem gleichen Zeitintervall auf die Platte zugegeben werden. Ebenso sollte die Stopplösung SL in der gleichen Reihenfolge und im gleichen Zeitintervall wie die Substratlösung auf die Testplatte gegeben werden. Dies verhindert Variationen in der Konzentrationsbestimmung durch unterschiedliche Inkubationszeiten.

- 1) In die ersten 2 Vertiefungen werden **100 µl** Verdünnungspuffer **VP** dazu pipettiert (Leerwert). Im Anschluss daran werden jeweils **100 µl Standard** oder **100 µl** der verdünnten **Kontrolle KS1** bzw. der **Kontrolle KS2** oder **100 µl** der verdünnten **Probe** gegeben.
- 2) Die Vertiefungen der Platte werden mit Klebefolie abgedeckt und **1 Stunde schüttelnd** (350 rpm) inkubiert.
- 3) Nach Ablauf der Inkubationszeit werden die Lösungen abgesaugt und die Platte mit **300 µl Waschpuffer WP** / Vertiefung **fünfmal** gewaschen. Der Waschpuffer sollte vor dem Absaugen mindestens 15 Sekunden in den Vertiefungen verbleiben.
- 4) Im Anschluss an den letzten Waschschrift werden **100 µl** des Antikörper-POD-Konjugates AK in jede Vertiefung pipettiert und der Ansatz **30 Minuten schüttelnd** (350 rpm) inkubiert.
- 5) Nach Abschluss dieser Inkubation wird die Platte wie in Schritt 3) beschrieben 5x gewaschen
- 6) In jede Vertiefung werden **100 µl** der **Substratlösung S** pipettiert.
- 7) Die Platte wird **15 Minuten** im Dunkeln inkubiert.
- 8) Nach Ablauf der Inkubationszeit wird in jede Vertiefung **100 µl Stopplösung SL** pipettiert
- 9) Die Ausmessung der Farbreaktion erfolgt **innerhalb von 30 Minuten bei 450 nm** (**Referenzfilter ≥ 590 nm**).

AUSWERTUNG

Berechnung der Standardkurve

Zur Auswertung des Testes muss gewährleistet sein, dass die Extinktionen des Leerwertes 0,25 Einheiten nicht überschreiten, Standard E muss dagegen Extinktionen über 1,0 Einheiten erreichen.

Proben, die höhere Extinktionen als der Standard E erzielen, liegen außerhalb der Standardkurve, zur sicheren Bestimmung müssen diese Proben in einer zweiten Testdurchführung bei höherer Verdünnung nochmals bestimmt werden.

Die bereitgestellten Standards enthalten folgende IGFBP-2-Konzentrationen:

Standard	A	B	C	D	E
ng/ml	2	10	20	40	80

- 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. **Ein höhergradiges Polynom, 4-Parameter-Anpassungen** oder **nicht-lineare Regression** sind zur Auswertung geeignet, in manchen Fällen kann eine Spline oder Punkt-zu-Punkt Anpassung angebracht sein.
- 5) Aus der Standardkurve erhält man derart die IGFBP-2-Konzentration der verdünnten Kontrollen KS1 & KS2 bzw. der verdünnten Proben (mit der individuellen Verdünnung, allgemein für Serum- und Plasma empfohlen 1:21). Die **Multiplikation** des jeweiligen berechneten IGFBP-2-Gehaltes **mit dem entsprechenden Verdünnungsfaktor** ergibt dann die IGFBP-2-Konzentration der unverdünnten Ausgangslösungen

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

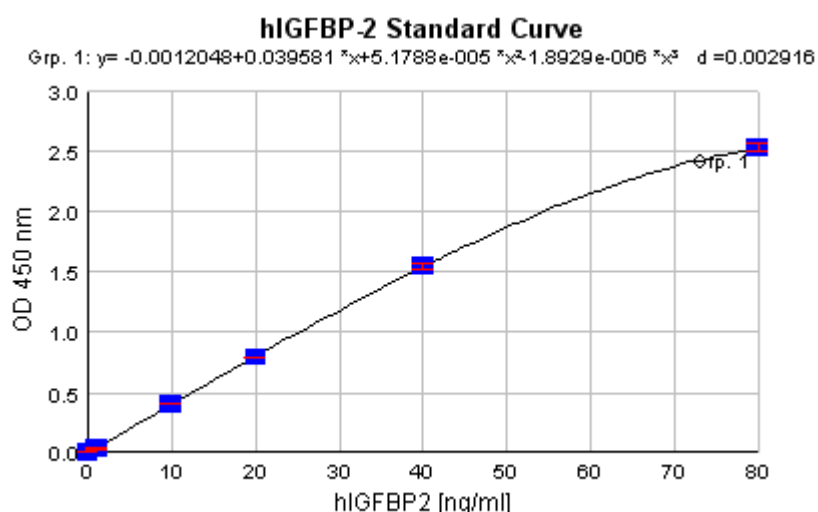


Abb. 1: Typische Standardkurve mit einem Polynom 3. Grades zur Berechnung der Standardkurve

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

Gemessene Extinktion der Probe: 0,37

Gemessene Extinktion des Nullwertes: 0.06

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

$$0,31 = -0,0012048 + 0,039581x + 5,1788 \cdot 10^{-0,005} \cdot x^2 - 1,8929x \cdot 10^{-0,06} \cdot x^3$$

$$7,93 = x$$

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

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

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

LEISTUNGSMERKMALE

Standard

Die Standards des ELISA E05 bestehen aus **humanem IGFBP-2** in Konzentrationen von **2, 10, 20, 40 und 80 ng/ml**.

Sensitivität

Die analytische Sensitivität des ELISA E05 beträgt 0,2 ng/ml (zweifache Standardabweichung des Null-Standards).

Spezifität

Das Testsystem ist spezifisch für humanes IGFBP-2

Kreuzreaktivität mit Hund-, Pferde-, Esel-, Katzen-, Ziegenserum.

Keine gemessene Kreuzreaktivität mit Schwein-, Rind-, Kaninchen-, Maus-, Hühner-, Ratten-, Meerschweinchen und Schafserum.

Keine messbare Kreuzreaktivität mit IGFBP-1 und IGFBP-3.

Interferenz

Die Interferenz physiologisch auftretender Substanzen wurde durch Zugabe unterschiedlicher Mengen dieser Substanzen zu Serumproben getestet. In Tabelle 1 ist die relative Wiederfindung im Vergleich zum Serum ohne Zusätze für die maximal zugegebene Menge der potentiell interferierenden Substanz dargestellt.

Keine der untersuchten Substanzen beeinflusst das Ergebnis des Testes signifikant.

Tabelle 1: %-Wiederfindung im Vergleich zum Normalserum

Bilirubin		Triglycerides	
[µg/ml]	%	[mg/ml]	%
25	95,07	12,5	100,79
50	92,80	25	101,01
100	93,83	50	103,65
200	88,15	100	101,34

Recovery

Die Wiederfindung des Standardmaterials betrug in einer Serummatrix durchschnittlich 108,7%

Tabelle 2: Wiederfindung vom rekombinanten IGFBP-2

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

Reproduzierbarkeit und Präzision

Die Inter- und Intra-Assay Variationskoeffizienten liegen beide deutlich unter 10%. Beispielhafte Bestimmungen sind in Tabelle 3 und Tabelle 4 dargestellt.

Tabelle 3 : Interassay-Varianz

Probe 1 (ng/ml)	137	159	152
Probe 2 (ng/ml)	672	697	688
Probe 3 (ng/ml)	928	929	956

Tabelle 4: Intraassay-Varianz

Probe 1 ng/ml	322	375	298	305	318	311	320	325	302	301	305	317
Probe 2 ng/ml	612	609	616	648	594	597	620	613	617	611	636	698

Linearität

Der Mediagnost IGFBP-2 ELISA E05 ist über einen sehr weiten Bereich verdünnungsecht. Die Linearität von Serenverdünnungen ist hervorragend (s. Tab.5):

Tabelle 5: Linearität der Probenverdünnung:

Verdünnung	Serum 1 (ng/ml)	Serum 2 (ng/ml)	Liquor (ng/ml)	Amnionflüssigkeit (ng/ml)
1:10	938	582	426	nicht bestimmt
1:20	1061	673	428	460
1:40	1055	719	379	483
1:80	1004	691	318	431
1:160	952	668	426	415

REFERENZWERTE

Die IGFBP-2 Konzentration ist im Serum abhängig vom Alter (Tabelle 8) sowie vom Body Mass Index (BMI; Tabelle 7). Zur Erhebung von Referenzwerten erfolgte die Bestimmung der IGFBP-2 Spiegel im Serum bei über 400 gesunden Kindern und Erwachsenen (siehe Tabelle 8 und Abbildung 2); (3).

Erwartungswerte von IGFBP-2 in anderen humanen Körperflüssigkeiten als Serum und in Zellkulturüberständen sind in Tabelle 6 beispielhaft dargestellt.

EINSCHRÄNKUNGEN

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

PACKAGE INSERT ENGLISH

Mediagnost human **IGFBP-2 ELISA E05**

- Measures total IGFBP-2 concentration in serum, plasma and in other human body fluids
- single standards with **2; 10; 20; 40 and 80 ng/ml** are
- Total Incubation time only **1.75** hours
- 2 Control Sera are provided for quality control purposes according GLP
- ready-to-use Antibody Conjugate
- no sample extraction needed
- Microtiter plate separately break apart

INTENDED USE

Measurement of human IGFBP-2 in human serum, EDTA-plasma, cerebrospinal fluid, breast milk, amniotic fluid, saliva and in cell culture medium.

CLINICAL IMPLICATIONS

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

Normal values for healthy individuals (1.5 to > 70 years) were evaluated for this assay.

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

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

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

INTRODUCTION

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

PHYSIOLOGICAL MEANING

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

REAGENTS PROVIDED

1)	MTP	Microtiter plate , ready for use: Microtiter plate with 96 wells, divided up in 12 strips with 8 wells separately breakable, coated with antibody against anti-IGFBP-2 antibody packed in a laminate bag.
2)	CAL	Standards A-E , lyophilized: contain humanIGFBP-2: Standard values are between 2 - 80 ng/ml (2, 10, 20, 40, 80 ng/ml) IGFBP-2 and have to be reconstituted with 750 µl Dilution Buffer VP each.
3)	DILU	Dilution Buffer VP, 50 ml , ready for use
4)	Control	Control Serum KS1 , lyophilized: Contains human serum and has to be reconstituted with 100 µl Dilution Buffer VP . The exact concentration of IGFBP-2 is given on the vial label.
5)	Control	Control Sera KS2 , lyophilized: Contain human serum and has to be reconstituted with 100 µl Dilution Buffer VP . The exact concentration of IGFBP-2 is given on the vial label.
6)	Ab CONJ	Antibody POD-Conjugate AK, 12 ml , ready for use: Contains a mix of biotinylated anti-human IGFBP-2 antibody and Horseradish peroxides conjugated streptavidin. Use 100 µl per well in the assay
7)	WASHBUF 20x	Washing Buffer (WP), 50 ml , 20 X concentrated solution. Washing Buffer (WP) has to be diluted 1:20 with distilled or demineralised water before use (e.g. add the complete contents of the flask (50 ml) into a graduated flask and fill up with A.dest. to 1000 ml). Please dilute only according to requirements. The diluted washing buffer is stable for 4 weeks at 2-8°C. It has to be at room temperature for usage!
8)	SUBST	Substrate (S), 12 ml , ready for use, horseradish-peroxidase-(HRP)-substrate, stabilised H ₂ O ₂ Tetramethylbencidine.
9)	H ₂ SO ₄	Stopping Solution (SL), 12 ml , ready for use, 0.2 M sulphuric acid, Caution acid!
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 shaker (350 rpm)

Microtiter plate washer (recommended)

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

Polyethylen PE/Polypropylen PP tubes for dilution of samples

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.

Before use, all kit components should be brought **to room temperature at 20 - 25°C**. Precipitates in buffers should be dissolved before use by thorough mixing and warming. Do not mix reagents of different lots. Do not use expired reagents.

The microplate contains snap-off strips. Unused wells must be stored at 2 - 8°C in the sealed foil pouch and used in the frame provided.

Caution: This kit contains material of human and/or animal origin. Source human serum for the **Control Sera KS1** and **KS2** provided in this kit was 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) antibody. 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.

Following components contain < 0.01% 2-Methyl-4-isothiazolin-3-one solution as preservative : **AK, VP**

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

Following components contain < 0.01%(w/w) 5-chloro-2-methyl 2H isothiazol-3-one and 2-methyl-2H-isothiazol-3-one as preservative: **AK, VP, WP**

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
S28.1	After contact with skin, wash immediately with plenty of water

Stop solution contains 0.2 M Sulfuric Acid (H₂SO₄)

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.

Pipetting of samples and reagents must be done as quickly as possible and in the same sequence for each step. 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.

TMB-Substrate (S) contains 3,3',5,5' Tetramethylbenzidine. Store and Incubate in the dark.

R20/21/R22	Harmful by inhalation, in contact with skin and if swallowed
R36/37/38	Irritating to eyes, respiratory system 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

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.

PRINCIPLE

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

SPECIMEN

Serum and plasma samples as well as cell culture medium, breast milk, amniotic fluid, cerebrospinal fluid and saliva are applicable.

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

Blood samples may be taken at any time of the day.

Storage of the samples

Storage at RT max. 2 days

Storage at –20°C max. 2 years

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

Sample Preparation

Samples have to be diluted 1:10-30-fold with Dilution Buffer (VP).

For clinical purposes we recommend a standard dilution of **1:21**.

Suggestion for dilution protocol:

Mix 15 µl serum manually or with the aid of a dilutor with 300 µl Dilution Buffer VP (1:21). Use 2 x 100 µl of this dilution in the assay or pipette 100 µl buffer in wells and add 5 µl serum.

IGFBP-2 concentrations may be completely different in body fluids of human origin other than serum or cell culture supernatant (s. Table 5).

TECHNICAL NOTES

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

Reagents with different lot numbers cannot be mixed. The microtiter plate 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: Incubation at 20-25°C

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 become 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.

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

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

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

When using an automatic microtiter plate washer, the respective instructions for use must be carefully followed. Device adjustments, e.g. for plate geometry and the provided washing parameters, must be performed. Dispensing and aspirating manifold must not scratch the inside well surface. Provisions must be made that the remaining fluid volume of every aspiration step is minimized. Following the last aspiration step of each washing cycle, this could be controlled, and possible remaining fluid could then be removed, by inverting the plate and repeatedly tapping it dry on non fuzzy absorbent tissue.

Manual washing is an adequate alternative option. Washing Buffer may be dispensed via a multistepper device, a multichannel pipette, or a squirt bottle. The fluid may be removed by dynamically 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.

Standards and Controls

For the reconstitution of the lyophilised components (Standards A - E 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!) with a Vortex mixer.

The reconstituted standard and controls can be stored for 2 months at –20°C. Repeated freeze/thaw cycles have to be avoided.

Washing Buffer

The required volume of washing buffer is prepared by 1:20 dilution of the provided 20fold concentrate with deionised water. The diluted washing buffer is stable for 4 weeks at 2-8°C. It has to be at room temperature for usage!

Substrat

The Substrat Solution S, stabilised H₂O₂- Tetramethylbenzidine, is photosensitive– Storage and Incubation in the dark.

Microtiter plate

Unused microtiter plate stripes have to be stored airtight together with the desiccant bag at 2-8°C. The labelled expiry is not influenced in case of proper storage.

ASSAY PROCEDURE

All determinations (Standards, Control Sera KS1 & KS2 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).

All incubations have to be conducted at room temperature (20-25°C)!

To avoid distortions due to differences in incubation times, Antibody-POD-Conjugate AK as well as the following Substrate Solution S should be added to the plate in the same order and in the same time interval as the samples. Stop Solution SL should be added to the plate in the same order as the Substrate Solution.

- 1) Add **100 µl** Dilution Buffer VP to the first wells (blank). Subsequently, add **100 µl** of each **Standard** or diluted **Control (KS1&KS2)** or diluted **Sample** to the following wells.
- 2) Cover the wells with sealing tape and incubate the plate for **1 hour** shaking with **350 rpm**.
- 3) After incubation aspirate the contents of the wells into a disinfectant (possible theoretically risk of infection!) and wash the wells **5 times** with **300 µl** of **Washing Buffer WP** / well respectively. The washing buffer WP should incubate at least for 15 seconds/cycle.
- 4) Pipette **100 µl** of the **Antibody-POD-Conjugate AK** in each well and incubate **30 minutes** shaking with **350 rpm**.
- 5) After incubation wash the wells 5 times with Washing Buffer as described in step 3.
- 6) Pipette **100 µl of the Substrate (S)** in each well.
- 7) Incubate the plate for **15 minutes in the dark at room temperature (20 - 25°C)**.
- 8) Stop the reaction by adding **100 µl of Stopping Solution (SL)**.
- 9) Measure the colour reaction within 30 minutes at **450 nm (reference filter ≥ 590 nm)**.

CALCULATION OF RESULTS

Establishing the Standard Curve

For the evaluation of the assay it is preconditioned that the absorbance values of the blank should be below 0.25, these of standard E should be above 1.0.

Samples, which yield higher absorbance values than Standard E are beyond the standard curve, for reliable determinations these samples should be tested anew with a higher dilution.

Standards are provided in the following IGFBP-2 concentrations

Standard	A	B	C	D	E
ng/ml	2	10	20	40	80

- 1) Calculate the **mean absorbance** value for the blank from the duplicated determination (well A1/A2).
- 2) Subtract the mean absorbance of the blank from the mean absorbances of all other values.
- 3) Plot the standard concentrations on the x-axis versus the mean value of the absorbance of the standards on the y-axis.
- 4) Recommendation: Calculation of the standard curve should be done by using a computer program. **A higher-grade polynomial, or four parametric logistic (4-PL) curve fit or non-linear regression** are usually suitable for the evaluation (as might be spline or point-to-point alignment in individual cases).
- 5) The IGFBP-2 concentration of the diluted sample or the diluted control sera KS1&2 in ng/ml is calculated in this way, the IGFBP-2 concentration of the **undiluted sample** and of KS1 & KS2 is calculated **by multiplication** with the respective dilution factor.

The exemplary shown standard curve in Fig.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 the IGFBP-2 concentration of undiluted sample:

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

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

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

$$0.31 = -0.0012048 + 0.039581x + 5.1788 \cdot 10^{-0,005} \cdot x^2 - 1.8929x \cdot 10^{-0,06} \cdot x^3$$

$$7.93 = x$$

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

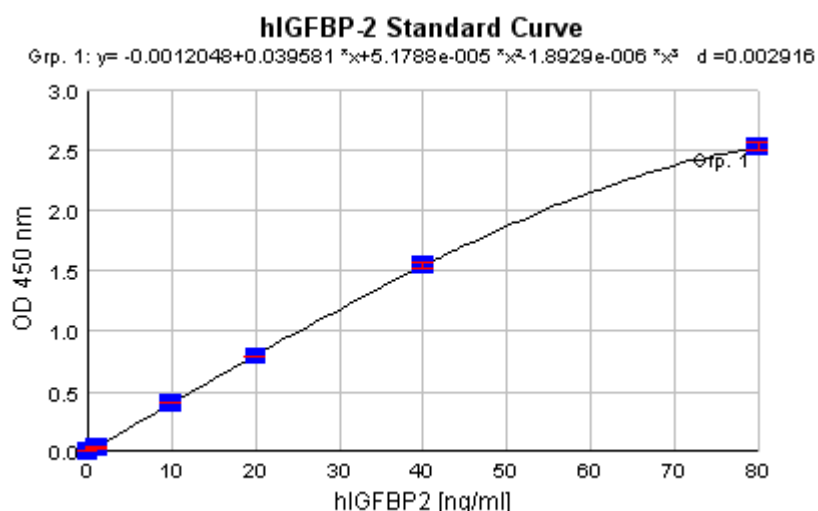


Fig. 1: Exemplary Standard Curve with a polynomial 3rd degree as curve fit.

PERFORMANCE CHARACTERISTICS

Standards

The Standards of the ELISA E05 are prepared from **human IGFBP-2** in concentrations of 2, 10, 20, 40 and 80 ng/ml.

Sensitivity

The analytical sensitivity of the assay yields 0.2 ng/ml (2x SD of zero standards)

Specificity

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

There was no cross reactivity with IGFBP-1 and IGFBP-3.

Interference

Interference of bilirubin and triglycerides was tested by adding different amounts of these substances to human serum containing IGFBP-2. For comparison the same amount of buffer without any substance was also added to the serum. Table 1 demonstrates that neither bilirubin nor triglycerides exert any influence on the measurement of IGFBP-2 in human serum.

Table 1: Interference

Bilirubin		Triglycerides	
[µg/ml]	% of control	[mg/ml]	% of control
25	95.07	12.5	100.79
50	92.80	25	101.01
100	93.83	50	103.65
200	88.15	100	101.34

Recovery

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

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

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

Reproducibility and Precision

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

Table 3: Interassay-Variation

Sample1 (ng/ml)	137	159	152
Sample 2 (ng/ml)	672	697	688
Sample 3 (ng/ml)	928	929	956

Table 4: Intra-Assay-Variation

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

Table 5: Linearity of the sample dilution:

Dilution	Serum 1 (ng/ml)	Serum 2 (ng/ml)	Cerebrospinal fluid (ng/ml)	Amniotic fluid (ng/ml)
1:10	938	582	426	Not determined
1:20	1061	673	428	460
1:40	1055	719	379	483
1:80	1004	691	318	431
1:160	952	668	426	415

REFERENCE VALUES

The IGFBP-2 concentration in serum is depended on age (Table 8) and on Body Mass Index (BMI; Table 7). For data collection of these reference values IGFBP-2 levels were determined in serum of over 400 normal children and adults (see table 8 figure 2); (3).

Please see the expected values of IGFBP-2 levels in other human body fluids than serum and in cell culture medium in the table 6.

LIMITATION

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

APPENDIX /ANHANG**Tabelle 6:** Erwartungswerte von IGFBP-2 in humanen Körperflüssigkeiten und in Zellkulturüberständen**Table 6 :** Expected values of IGFBP-2 in body fluids of human origin and in cell culture supernatants:

Probenmaterial Sample	Erwartungswert Expected Value [ng/ml]
Serum/ serum	[100 - 1000]
Liquor/ cerebro-spinal fluid	[100 - 300]
Amnionflüssigkeit/ amniotic fluid	[200 - 10000]
Samenflüssigkeit/ seminal plasma	[5000 - 15000]
Muttermilch/ breast milk	[1500-3000]
Zellkulturüberstand/ cell culture supernatants	[5 - 300]

Tabelle 7. BMI abhängige Referenzwerte, Erwachsene zwischen 20 und 80Jahren**Table 7:** BMI dependent reference values, adults between 20 and 80 years

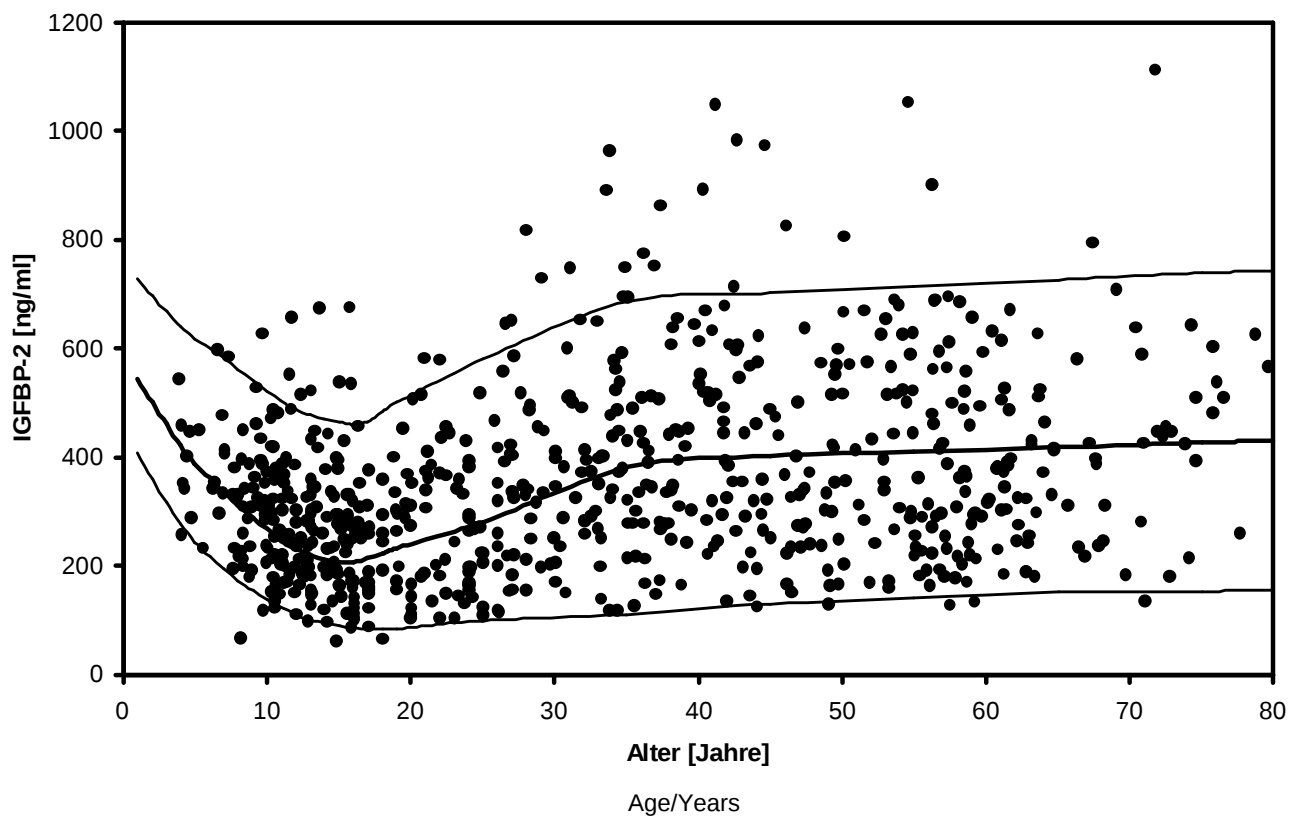
BMI		Mittelwert mean	SA	Perzentilen percentiles		
[kg/m ²]	N	IGFBP-2 [ng/ml]	SD	5.	50.	95.
15	12	612	110	431	612	793
17,5	14	568	126	361	568	775
20	76	509	144	271	509	746
22,5	124	449	162	182	449	716
25	101	398	165	127	398	670
27,5	52	348	147	106	348	590
30	25	315	118	120	315	510
32,5	15	282	90	135	282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

Tabelle 8: IGFBP-2 Serum Werte (in ng/ml) von > 400 gesunden Personen. Der Normal-Bereich der jeweiligen Altersgruppe wird durch die 5., 50. und 95. Perzentilen gegeben.

Table 8: IGFBP-2 serum levels (in ng/ml) of > 400 healthy individuals. The normal range is given by the 5., 50. and 95. percentile for age classes.

Altersabhängiger Normalbereich von IGFBP-2 Serumkonzentrationen
Age-dependent normal range of serum IGFBP-2

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



Von Dr. R. Schweizer, Tübingen, zusammengestellt (3).

Assembled by Dr. R. Schweizer, Tübingen,

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

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

LITERATUR / LITERATURE

1. Elmlinger MW, Wimmer K, Biemer E, Blum WF, Ranke MB, Dannecker GE, (1996) Insulin-like growth factor binding protein 2 is differentially expressed in leukaemic T-and B-cell lines. *Growth Regulation* 6, 152-157
2. Hoefflich A, Nedbal S, Blum WF, Erhard M, Lahm H, Brem G, Kolb HJ, Wanke R, Wolf E. (2001) Growth inhibition in giant growth hormone transgenic mice by overexpression of insulin-like growth factor-binding protein-2. *Endocrinology* 142:1889-98
3. Ranke MB, Schweizer R, Elmlinger MW, Weber K, Binder G, Schwarze CP, Wollmann HA (2000) Significance of basal IGF-I, IGFBP-3 and IGFBP-2 measurements in the diagnostics of short stature in children. *Hormone Research* 54: 60-68
4. Ranke MB, Schweizer R, Elmlinger MW, Weber K, Binder G, Schwarze CP, Wollmann HA (2001). Relevance of IGF-I, IGFBP-3, and IGFBP-2 measurements during GH treatment of GH-deficient and non-GH-deficient children and adolescents. *Hormone Research* 55: 115-124
5. Crofton PM, Ahmed SF, Wade JC, Elmlinger MW, Ranke MB, Kelnar CJH, Wallace WHB (1999) Effects of a third intensification block of chemotherapy on bone and collagen turnover, insulin-like growth factor I, its binding proteins and short term growth in children with acute lymphoblastic leukemia. *European Journal of Cancer* 35: 960-967
6. Muller HL, Oh Y, Lehrnbecher T, Blum WF, Rosenfeld RG. (1994) Insulin-like growth factor-binding protein-2 concentrations in cerebrospinal fluid and serum of children with malignant solid tumors or acute leukemia. *J Clin Endocrinol Metab.* 79: 428-34
7. Martin W Elmlinger, Martin H Deininger, Burkhardt S Schuett, Richard Meyermann, Frank Duffner, Ernst H Grote, and Michael B Ranke (2001) In vivo expression of the insulin-like growth factor binding protein-2 in human gliomas increases with the tumor grade. *Endocrinology* 142: 1652-1658
8. Cohen P, Peehl DM, Stamey TA, Wilson KF, Clemmons DR, Rosenfeld RG (1993) Elevated levels of insulin-like growth factor-binding protein-2 in the serum of prostate cancer patients. *J Clin Endocrinol Metab.* 76: 1031-1035
9. Boulle N, Baudin E, Gicquel C, Logie A, Bertherat J, Penfornis A, Bertagna X, Luton JP, Schlumberger M, Le Bouc Y. (2001) Evaluation of plasma insulin-like growth factor binding protein-2 as a marker for adrenocortical tumors. *Eur J Endocrinol.* 144: 29-36
10. Ranke MB, Maier KP, Schweizer R, Stadler B, Schleicher s, Elmlinger MW, Flehmig B (2003), Pilot study of elevated levels of insulin-like growth factor-binding protein-2 as indicators of hepatocellular carcinoma. *Horm Res* 60:174-180
11. Rosenfeld RG, Roberts CT Jr. (eds.) (1999) *The IGF system: Contemporary Endocrinology Series*; Humana Press
12. Jones JI, Clemmons DR. (1995) Insulin-like growth factors and their binding proteins: biological actions. *Endocr Rev.* 16: 3-34
13. Chard T (1994) Insulin-like growth factors and their binding proteins in normal and abnormal fetal growth. *Growth Reg* 4: 91-100
14. Ranke MB, Elmlinger MW (1997) Functional role of insulin-like growth factor binding proteins. *Hormone Research* 48 (suppl 4): 9-15
15. Elmlinger MW, Bell M, Schütt, BS, Langkamp M, Kutoh E, Ranke MB (2001) Transactivation of the IGFBP-2 promoter in human tumor cell lines. *Molecular and Cellular Endocrinology* 175: 211-218
16. Hoefflich A, Reisinger R, Lahm H, Kiess W, Blum WF, Kolb HJ, Weber MM, Wolf E. (2001) Insulin-like growth factor-binding protein 2 in tumorigenesis: protector or promoter? *Cancer Res.* 15: 8601-8610
17. Miell JP, Langford KS, Jones JS, Noble P, Westwood M, White A, Nicolaides KH. (1997) The maternal insulin-like growth factor (IGF) and IGF-binding protein response to trisomic pregnancy during the first trimester: a possible diagnostic tool for trisomy 18 pregnancies. *J Clin Endocrinol Metab.* 82: 287-292
18. Elmlinger MW., Regine Grund, Michael Buck, Hartmut A Wollmann, Norman Feist, Matthias M. Weber, Christian C. Speer and Michael B. Ranke (1999). Limited proteolysis of the insulin-like growth factor binding protein (IGFBP)-2 by a specific serine protease activity in early breast milk. *Pediatric Research* 46: 76-81
19. Elmlinger MW, Michael S Sanatani, Mathias Bell, Günther E Dannecker, Michael B Ranke (1998) Elevated insulin-like growth factor (IGF) binding protein (IGFBP)-2 and IGFBP-4 expression of leukemic T-cells is affected by autocrine/paracrine IGF-II action but not by IGF type I receptor expression. *European Journal of Endocrinology* 138: 337-343
20. van den Beld, Blum W, Pols H, Grobbee D, Lamberts S (2003) Serum insulin-like growth factor binding protein-2 levels as an indicator of functional ability in elderly men. *European Journal of Endocrinology* 148: 627-634

KURZANLEITUNG – MEDIAGNOST IGFBP-2-ELISA E05

Reagenz:	Rekonstitution:	Verdünnung:
Standards A-E	je 750 µl Verdünnungspuffer VP	
Kontrollserum KS	in 100 µl Verdünnungspuffer VP	1:21 mit Verdünnungspuffer VP
Waschpuffer WP		1:20 mit Aqua. dest. (z.B. den gesamten Flascheninhalt von (50 ml) im Standzylinder auf 1000 ml auffüllen)
Probenverdünnung: 1:10 bis 1:30-fach mit Verdünnungspuffer VP , i.Allg. ist die Verdünnung 1:21 geeignet: 15 µl Serum werden mit 300 µl Verdünnungspuffer VP verdünnt. Von dieser Lösung werden 2 x 100 µl im Assay eingesetzt.		

Testdurchführung in Doppelbestimmungen:

Pipetieren	Reagenzien	Position
100 µl	Verdünnungspuffer VP	A1/2
100 µl	Standard A (2 ng/ml)	B1/2
100 µl	Standard B (10 ng/ml)	C1/2
100 µl	Standard C (20 ng/ml)	D1/2
100 µl	Standard D (40 ng/ml)	E1/2
100 µl	Standard E (80 ng/ml)	F1/2
100 µl	Kontrollserum KS1	G1/2
100 µl	Kontrollserum KS2	H1/2
100 µl	Probenverdünnung	nachfolgende Vertiefungen
Mit Klebefolie die Vertiefungen dicht abdecken.		
Inkubation: 1 h bei RT, 350 rpm		
5x 300 µl	Absaugen und die Platte 5x mit je 300 µl Waschpuffer WP / Vertiefung waschen.	In jede Vertiefung
100 µl	Antikörper-POD-Konjugat AK	In jede Vertiefung
Inkubation: 30 min bei RT, 350 rpm		
5x 300 µl	Absaugen und die Platte 5x mit je 300 µl Waschpuffer WP / Vertiefung waschen.	In jede Vertiefung
100 µl	Substratlösung 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 (Referenzfilter ≥590 nm).		

SUMMARY – MEDIAGNOST IGFBP-2 ELISA E05

Reagent:	Reconstitution:	dilution:
Standards A-E	in 750 µl Dilution Buffer VP	
Control Serum KS1	in 100 µl Dilution Buffer VP	1:21 with Dilution Buffer VP
Control Serum KS2	in 100 µl Dilution Buffer VP	1:21 with Dilution Buffer VP
Washing Buffer WP		1:20 with Aqua. dest. (e.g., add the complete contents of the flask (50 ml) into a graduated flask and fill with A.dest. to 1000 ml).
Sample Dilution: Serum samples should be diluted prior to measurement 1:10-30-fold with Dilution Buffer VP depending on the expected values. In general a dilution of 1:21 is appropriate. Use 2 x 100 µl of this dilution in the assay		

Assay Procedure for Double Determination

Pipette	Reagents	Position
100 µl	Dilution Buffer VP	A1/2
100 µl	Standard A (2 ng/ml)	B1/2
100 µl	Standard B (10 ng/ml)	C1/2
100 µl	Standard C (20 ng/ml)	D1/2
100 µl	Standard D (40 ng/ml)	E1/2
100 µl	Standard E (80 ng/ml)	F1/2
100 µl	Controll Serum KS1	G1/2
100 µl	Controll Serum KS2	H1/2
100 µl	Sample dilution	following wells
Cover the wells with the sealing tape.		
Incubation: 1 h at RT, 350 rpm		
5x 300 µl	Aspirate the contents of the wells and wash 5x with 300 µl Wash Buffer WP	each well
100 µl	Antibody-POD-Conjugate AK	each well
Incubation: 30 min at RT, 350 rpm		
5x 300 µl	Aspirate the contents of the wells and wash 5x with 300 µl Wash Buffer WP	each well
100 µl	Substrate Solution S	each well
Incubation: 15 min in the Dark at RT		
100 µl	Stopping Solution SL	each well
Measure the absorbance within 30 min at 450 nm with ≥ 590 nm as reference wavelength.		

REF E05



INTERNATIONAL TEST DESCRIPTION

CAL A-E	A -E	Rec in 750 µl VP	
Control	KS1 & KS2	Rec in 100 µl VP	1:21 DILU VP
WASHBUF 20x	WP		1:20 DILU A. dest.

SPE	1:21 DILU VP
°C 20-25 °C	

100 µl	VP	A1/2
100 µl	CAL A A (2 ng/ml)	B1/2
100 µl	CAL B B (10 ng/ml)	C1/2
100 µl	CAL C C (20 ng/ml)	D1/2
100 µl	CAL D D (40 ng/ml)	E1/2
100 µl	CAL E E (80 ng/ml)	F1/2
100 µl	CONTROL KS1	G1/2
100 µl	CONTROL KS2	H1/2
100 µl	SPE	
TAPE		

1 h **°C** 20-25 350 rpm

5x 300 µl	5x WASHBUF WP
100 µl	AbCONJ AK
TAPE	

0.5 h **°C** 20-25 350 rpm

5x 300 µl	5x WASHBUF WP
100 µl	SUBST TMB S

15 min **°C** 20-25

100 µl	H₂SO₄ SL
MEASURE	