

IGF-I ELISA

Enzymimmunoassay für die quantitative Bestimmung von

humanem insulinähnlichem Wachstumsfaktor I (IGF-I)
(IGFBP-blockiert)

Deutsch

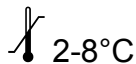
Enzyme Immunoassay for Quantitative Determination of

Human Insulin-like Growth Factor I (IGF-I)
(IGFBP-blocked)

English

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

Alle anderen Länder / All other countries:
Nur für Forschungszwecke. Nicht für diagnostische Anwendungen geeignet.
For Research Use Only. Not for use in diagnostic procedures.



REF E20



Gesellschaft für Forschung und Herstellung von Diagnostika GmbH



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

	Expiry date/ Verfallsdatum/ Date de péremption/ Data di scadenza/ Fecha de caducidad/ Data de validade/ Uiterste gebruiksdatum/ Udløbsdato/ Bäst före-datum/ Termin ważności/ Lejárati idő/ Čas expirácie/ Doba expirace/ Срок на годност/ Aegumiskuupäev/ Ημερομηνία λήξης/ Data de expirare/ Rok uporabe/ Viimeinen käyttöpäivä
	Consider instructions for use/ Bitte Gebrauchsanweisung beachten/ Consultez la notice d'utilisation/ Consultare le istruzioni per l'uso/ Consulte las instrucciones de uso/ Respeitar as instruções de utilização/ A.u.b. de gebruiksaanwijzing volgen/ Se brugsanvisningen/ Läs anvisningarna före användning/ Proszę przeczytać instrukcję obsługi/ Vegye figyelembe a használati utasításban foglaltakat/ Postupujte podľa pokynov na použitie/ Dodržujte návod k použití/ Моля, спазвайте инструкцията за употреба/ Palun järgige kasutusjuhendit/ Λάβετε υπόψη σας τις οδηγίες χρήσης/ Vá rugám szárespectați 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 orvodiasznostikai termék (in vitro diagnosztikai használatához)/ 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-diagnostiikkäyttö
	Lot-Batch Number/ Charge-Chargennummer/ Lot-Code du lot/ Lotto-Numero di lotto/ Lote-Código de lote/ Lote-Código do Lote/Lot-Partijnummer/ Lot-Batchcode/ Partisatskod/ Numer serii/ Tétel-szám/ Číslo šarže/ Číslo šarže/ Партиден номер/Partii number/ Παρτίδα-αριθμός παρτίδας/ Lot-număr lot/ Številka serije/ Erä
	Manufactured by/ Hergestellt von/ Fabriqué par/ Prodotto da/ Fabricado por/ Fabricado por/ Vervaardigd door/ Fabrikation af/ Tillverkad av/ Wyprodukowane przez/ Gyártotta/ Vyrobene/ Vyrobena v/ Производител/ Τοοτја/ Κατασκευάζεται από/ Proodus de/ Proizvajalec/ Valmistaja
	Catalogue Number/ Bestellnummer/ Numéro de référence/ Numero di riferimento/ Número de referencia/ Número de Referência/ Referentienummer/ Referencennummer/ Beställningsnummer/ Numer katalogowy/ Rendelési szám/ Katalógové číslo/ Objednací číslo/ Каталоген номер/ Tellimisnumber/ Αρ. παραγγελίας/Număr comandă/ Številka naročila/ Viite tai tilausnumero
	Store at between/ Lagerung bei zwischen/ Conserver à entre/ Conservare a tra/ Conservar a temp. entre/ Armazenar entre/ Bewaar bij tussen/ Opbevaars mellem/ Förvaras vid/ Przechowywać w/ Tárolási tartomány/ Skladujte v rozsahu / Skladujte v rozmezí/ Температурно ограничение/ Säilittä temperatuuridel/ Φύλαξη σε θερμοκρασία/ Depozitare între/ 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
	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/ Mikrotiiterplaat/ Τρυβλίο μικροτιτλοδότησης/ Microplacă/ Mikrotitrská plošča/ Mikrotitruslevy
	Reconstitute in/ Rekonstituieren in/ Reconstituer dans/ Ricostituire nel/ Reconstituir en/ Reconstituir em/ Reconstituieren in/ Rekonstituér i/ Rekonstituera/ Rekonstituować w/ Helyreállítás/ Znovu pripraviť za/ Znovu připravit za/ Разтваряне в/ Moodustada uuesti/ Ανασυστήστε σε/ Reconstituire în/ Predelava v/ Rekonstituoi
	Sample/ Probe/ Echantillon/ Campione/ Muestra/ Amostra/ Monster/ Prøve/ prov/ Próbka/ Minta/ Vzorka/ Vzorek/ Проба/ Proov/ Δείγμα/ Probă/ Vzorec/ Näyte
	Antibody Conjugate/ Antikörperkonjugat/ Anticorps conjugué/ Coniugato di anticorpo/ Conjugado de anticuerpos/ Conjugado anticorpo/ Antilichaamconjugaat/ Antistoffer-konjugat/ Antikroppskonjugat/ Koniugat antycial/ Antitest páros/ Protílátkový konjugát/ Protílátkový konjugát/ Антицяло конюгат/ Antikehad konjugaat/ Σύμπλοκο αντισώματος/ Compuși din anticorpi/ Antitelesa konjugat/ Vasta-aine konjugaatti

CONJ	Enzyme Conjugate/ Enzymkonjugat/ Conjugué enzymatique/ Coniugato di enzima/ Conjugado de enzimas/ Conjugado Enzima/ Enzymconjugaat/ Enzym-konjugat/ Enzymkonjugat/ Koniugat enzymów/ Enzim páros/ Enzymatický konjugát/ Enzymatický konjugát/ ензим конюгат/ Ensüümi konjugaat/ Σύμπλοκο –ενζύμου/ Compuși din enzime/ Encima konjugat/ Enzymi-konjugaatti
BUF	Buffer/ Puffer/ Tampon/ Tampone/ Tampón/ Tampão/ Buffer/ Buffer/ Buffert/ Bufor/ Puffer/ Pufer/ Pufr/ Бүфер/ Puhver/ Пуθμιστικό διάλυμα/ Tampon/ Pufer/ Puskuri
DILU BUF X	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/ Rozcieńczenie w buforze X/ Hígítás X pufferben/ Riedit' v pufrí X/ Ředit v pufru X/ Разреждане в бyфep X/ Lahjendada puhvris X/ Αραιώστε σε ρυθμιστικό διάλυμα X/ Diluați în tamponul X/ Razredčiti v pufru X/ Laimennetaan x puskuriin
STD	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/ Standardi X
Control	Control Serum X/ Kontrollserum X/ Contôle sérique X/ Siero di controllo X/ Suero de control X/ Soro de Controlo X/ controleserum X/ Kontrolserum X/ Kontrollserum X/ Serum kontrolne X/ Ellenőrző szérum X/ Kontrolné serum X/ Kontrolní serum X/ Контролен сeрyм X/ Kontrollseerum X/ Ορός ελέγχου X/ Ser de control X/ Kontrolni serum X/ Kontrolli seerumi X
WASHBUF 20x	Washing Buffer Concentrate/ Waschpufferkonzentrat/ Tampon de lavage conc./ Tampone di lavaggio concentrato/ Tampón de lavado concentrado/ Tampão de Lavagem Concentrado/ wasbuffer, geconcentreerd/ Vaskebufferkonzentrat/ Vaskebufferkonzentrat/ tvättbuffertkoncentrat/ Bufor płukania koncentrat/ Mosópuffer koncentrátum/ Koncentrát vymývacieho pufru/ Концентрат на промивен бyфep/ Pesurpuhvi kontsentraat/ Συμπύκνωμα ρυθμιστικού διαλύματος έκπλυσης/ Concentrat pentru tamponul de spălare/ Koncentrat izpiralne 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 бyфep/ Pesurpuhver/ Пуθμιστικό διάλυμα έκπλυσης/ Tampon pentru spălare/ Izpiralni pufer/ Pesuliuos
SUBST TMB	Substrate/ Substrat/ Substrat/ Substrato/ Substrato/ Substrato/ substraat/ Substrat/ Substrat/ Substrat/ Szubsztrátum/ Substrát/ Substrát/ Субстрат Substraat/ Υπόστρωμα/ Substrat/ Substrat/ Substraattiliuos
H₂SO₄	Stopping Solution/ Stopplösung/ Stop Solution/ Soluzione di stop/ Stop Solución/ Solução Stop/ stopoplossing/ Stopoplösning/ 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 płytkę/ Tányér leragasztása/ Oblepit' podložku lepiacou páskou/ Olepit podložku lepici páskou/ Плака с лента за запечатване/ Katta plaat isoleerkeeleplindiga/ Κολλήστε το πλακίδιο με κολλητική ταινία/ Aoperiți placa cu o bandă adezivă/ Prelepiti ploščo/ Peitã mikrotitrauslevy oheisella teipillä
MEASURE	Measure plate within 30 min at 450 nm (Referencefilter ≥590 nm)/ Ausmessung innerhalb von 30 min bei 450 nm (Referenzfilter ≥ 590 nm)/ Measure lábsorbance en l'espac de 30 min à 450 nm avec ≥590 nm longueur d'onde pour référence/ Misurazione entro 30 min. a 450 nm (filtro di riferimento ≥ 590 nm)/ Medición de la placa dentro de los siguientes 30 min a 450 nm (filtro de referencia ≥ 590nm)/ Medir a placa dentro de 30 min a 450 nm (Filtro de referência ≥ 590 nm)/ Binnen 30 minuten bij 450 nm meten (referentiefilter ≥ 590 nm)./ Mål plade i løbet af 30 min ved nm (referencefilter ≥590 nm)/ Mät inom 30 min vid 450 nm (referensfilter ≥ 590 nm)./ Pomiar w ciągu 30 min przy 450 nm (filtr odniesienia ≥ 590 nm)/ Ki mérés 30 percen belül 450 nm-nél (referenciaszűrő ≥ 590 nm)/ Merať 30 minút pri 450 nm (Referenčný filter ≥590 nm)/ Měřit 30 minut při 450 nm (Referenční filtr ≥ 590 nm)/ Отчитане в рамките на 30 min при 450 nm (референтен филтър ≥ 590 nm)/ Mõõtmise 30 min jooksul 450 nm korral (võrdlusfilter ≥ 590 nm)/ Μέτρηση εντός 30 min στα 450 nm (φίλτρο αναφοράς ≥ 590 nm)/ Măsurare în decurs de 30 min la 450 nm (filtru de referință ≥ 590 nm)/ Izmerite ploščico v 30 min pri 450 nm (referenčni filter ≥590nm)/ Mittaa 30 minuutin aikana 450 nm:ssä (referenssi suodatin ≥ 590 nm)
Literatur	Literature/ Literatur/ Bibliographie/ Letterario/ Bibliografia/ Literatura documentaço/ literatuur/ Litteratur/ litteratur/ Literatura/ Irodalom/ Literaturá/ 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/ kaikkiin tarvittaviin mikrotitrauslevyn syvennyksiin

INHALTSVERZEICHNIS / TABLE OF CONTENTS

DEUTSCH	Gebrauchsanweisung	5
1	ZWECKBESTIMMUNG	5
2	EINFÜHRUNG	5
3	TESTPRINZIP	7
4	WARNHINWEISE UND VORSICHTSMAßNAHMEN	8
5	PROBEN	9
6	MATERIALIEN	10
7	TECHNISCHE HINWEISE	11
8	TESTDURCHFÜHRUNG	12
9	QUALITÄTSKONTROLLE	13
10	AUSWERTUNG	13
11	EINSCHRÄNKUNGEN	15
12	REFERENZWERTE	16
13	ASSAY EIGENSCHAFTEN UND VALIDIERUNG	17
14	VERGLEICHsstUDIEN	20
15	WISSENSCHAFTLICHE ANWENDUNGEN	22
ENGLISH	Instructions for use	24
16	LITERATUR / REFERENCES	41
17	INTERNATIONALE ASSAY DESCRIPTION	44

DEUTSCH Gebrauchsanweisung

IGF-I ELISA E20	96 Bestimmungen
CE	DE/CA40/00809/20
Testprinzip	Enzyme-linked Immunoassay
Dauer (Inkubationszeit)	1,75 h
Antikörper	Spezifische monoklonale Antikörper und polyklonale hochaffine Antisera.
Kreuzreaktivität mit IGF-II, Insulin, C-Peptid	< 0,1%
Puffer	Gebrauchsfertig und 20fach Konzentrat
Standard	5 Einzel-Standards: 2 - 50 ng/mL, rekombinantes humanes IGF-I
Referenzmaterial	Internationaler Standard WHO/NIBSC 02/254
Assay Bereich	0,09 – 1050 ng/mL
Kontrolle	2 Kontrollseren, gefriergetrocknet
Probe	human serum / plasma
Erforderliches Probenvolumen	10 µL
Proben Verdünnung	1:21
Analytische Sensitivität	ø 0,09 µg/L
Intra- / Interassay Variation	ø < 10 %
Referenz Werte	Blum W.F., Schweizer R. Insulin-Like Growth Factors and Their Binding Proteins. In: Ranke MB (ed): Diagnostics of Endocrine Function in Children and Adolescents. Basel, Karger, 2003, pp.166-199

1 ZWECKBESTIMMUNG

Quantitative Messung von humanem insulinähnlichem Wachstumsfaktor I (IGF-I) in menschlichem Serum oder Plasma. In Kombination mit Wachstumsverzögerung und anderen klinischen Symptomen können die Ergebnisse dieses Testsystems als zusätzliche Information verwendet werden, um Störungen der Wachstumshormonachse zu beurteilen.

2 EINFÜHRUNG

Insulin-like growth factors (IGF)-I und-II spielen eine Schlüsselrolle bei der Regulation von Proliferation, Differenzierung und spezifischer Funktionen vieler Zelltypen (1-3). IGF-I ist identisch mit Somatomedin C (Sm-C) (4) und hat ein Molekulargewicht von 7649 Dalton (5). Seine wichtigsten Regulatoren sind das Wachstumshormon (WH) und die Ernährung (6), wenn auch seine Synthese in spezifischen Geweben durch eine Vielzahl tropischer Hormone und anderer Peptid-Wachstumsfaktoren beeinflusst wird. Im Gegensatz zu vielen anderen Peptidhormonen sind IGFs mit hoher Affinität an spezifische Bindungsproteine (IGFBP) gebunden. Sieben Klassen von Bindungsproteinen sind derzeit bekannt (7,8,22). Sie binden entweder IGF-I und IGF-II mit ähnlicher Affinität oder weisen eine Präferenz für IGF-II auf (9,10). Ein Hauptproblem bei der Messung von IGF-I resultiert aus der Interferenz mit IGFBPs im Assay. Die direkte Bestimmung in unbehandelten Serumproben (11) führt zu falschen Ergebnissen, weil auf Grund der extrem langsamen Dissoziation des IGF-I/IGFBP-

3-Komplexes während der Assay-Inkubationszeit nur ein Teil des IGF-I der Messung zur Verfügung steht. In Abhängigkeit vom Verhältnis von IGF-I zu IGFBPs in der Probe kommt es zu Interferenzen: (s. beispielhaft in Abb.1)

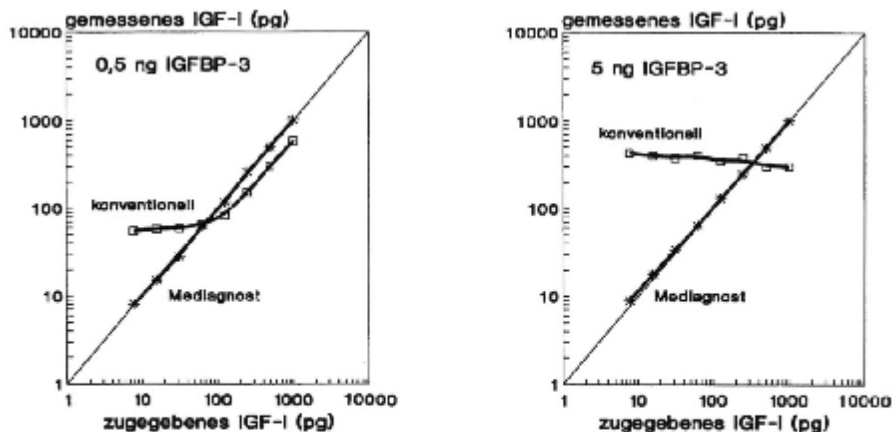


Abb. 1: Interferenz von IGFBP bei IGF-I-Messungen. Bekannte IGF-I-Konzentrationen wurden in Gegenwart von 0,5 ng (links) bzw. 5 ng (rechts) hIGFBP-3 mit einem konventionellen RIA (□) oder dem IGFBP-blockierten RIA (*) gemessen.

Deshalb wurden verschiedene Verfahren entwickelt, um vor der eigentlichen Messung IGF-I von seinen Bindungsproteinen abzutrennen: (a) Ausschlusschromatographie unter sauren Bedingungen, (b) Festphasenextraktion und (c) Säure-Alkohol-Extraktion (2,12,13). Diese Methoden sind jedoch entweder umständlich und zeitaufwendig oder führen zu unvollständiger und vor allem nicht reproduzierbarer Wiederfindung. Die am weitesten verbreitete Methode ist die Säure-Alkohol-Extraktion (13,14). Infolge von Co-Präzipitation ergibt sie jedoch nur eine Ausbeute von 70 - 80 % des gebundenen IGF-I. Die gemessenen Absolutwerte nach einem solchen Extraktionsschritt sind deshalb falsch niedrig (15). Die Extraktionsprozedur führt zu einer Vorverdünnung der Proben und dadurch zu einer verminderten Sensitivität des Assays. Zudem wird durch die Extraktion IGFBP nur unzureichend entfernt. Die im Extrakt verbleibenden IGFBPs können den Assay immer noch stören. Abgesehen von Serum oder Plasma ist die Säure-Alkohol-Extraktion in anderen Proben (z.B. Zellkulturmedien) völlig ineffektiv. Gerade hier ist die IGF-I-Bestimmung besonders schwierig, da diese Proben häufig einen hohen Überschuss an IGFBPs enthalten.

Klinische Bedeutung

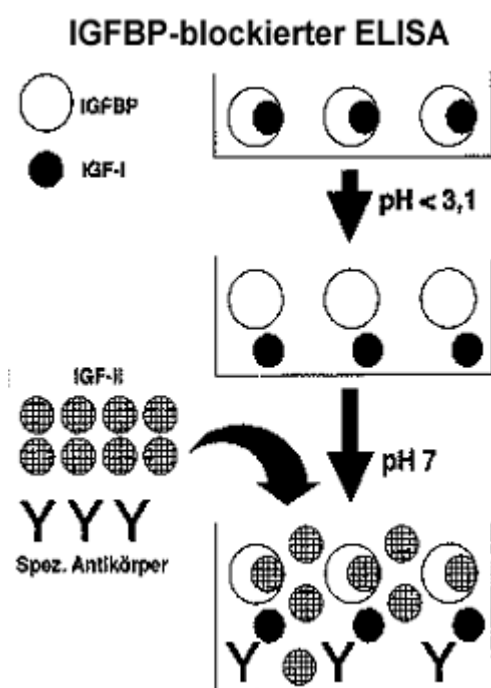
Abgesehen von WH beeinflusst eine Anzahl von Faktoren den Serum-IGF-I-Spiegel. Erniedrigte Werte werden bei Malnutrition/Malabsorption, Hypothyreose, Lebererkrankungen, unbehandeltem Diabetes mellitus, chronisch-entzündlichen Erkrankungen (1,6), malignen Erkrankungen oder Polytrauma gefunden. Hohe Spiegel lassen sich bei Pubertas praecox oder Adipositas finden. Entscheidend für die korrekte Interpretation von IGF-I-Bestimmungen ist die Berücksichtigung der Altersabhängigkeit der IGF-I-Spiegel (altersabhängige Referenzwerte siehe Tab. 2 und Abb. 4-6).

Auf Grund seiner WH-Abhängigkeit sind Bestimmungen von Serum-IGF-I für die Diagnostik von Wachstumsstörungen von großem Nutzen, speziell im Hinblick auf WH-Mangel oder Akromegalie (6,16–19, 23, 24). Der wichtigste Vorteil der IGF-I-Bestimmung im Vergleich zur WH-Bestimmung ist seine stabile zirkadiane Konzentration, d.h. eine Einzelmessung ist ausreichend informativ. IGF-I -Bestimmungen sollten deshalb in der Labordiagnostik an erster Stelle stehen. Eindeutig normale Spiegel schließen eine Störung der WH-IGF-I-Achse aus. Niedrige Spiegel, d.h. Spiegel nahe oder unter der altersbezogenen 5. Perzentile machen weitere diagnostische Schritte notwendig. Subnormale IGF-I-Spiegel können ein Anzeichen für eine eingeschränkte WH-Sekretion sein, falls andere Ursachen für niedriges Serum-IGF-I wie Mangelernährung oder eine beeinträchtigte Leberfunktion ausgeschlossen sind. Für die Unterscheidung von gesunden minderwüchsigen Kindern ohne WH-Mangel von Kindern mit "klassischem" WH-Mangel erwies sich die 0,1. Perzentile als günstige

Trenngrenze. Dies gilt speziell ab einem Alter von 8 Jahren. Es muss jedoch angemerkt werden, dass kleinwüchsige Kinder ohne WH-Mangel mit ihren Werten sehr wohl zwischen der 0,1. und 5. Perzentile liegen können (19). Im Gegensatz dazu ist die Akromegalie durch pathologisch erhöhte IGF-I-Spiegel gekennzeichnet, die offensichtlich den Schweregrad der Erkrankung besser reflektieren als WH-Messungen (17,18, 20).

3 TESTPRINZIP

Um IGF-I von den IGFBPs zu dissoziieren, müssen die Proben in einem sauren Puffer (Probenpuffer PP) verdünnt werden (Abb. 2). Die verdünnten Proben werden dann in die Vertiefungen pipettiert, der pH wird dabei neutralisiert. Nach Neutralisation der Probe besetzt das in hohem Überschuss vorhandene IGF-II die IGF-Bindungsstellen der Bindungsproteine. Dies erlaubt die problemlose Messung des nun freien IGF-I. Wegen der extrem niedrigen Kreuzreaktivität des IGF-I-Antikörpers mit IGF-II stört der hohe Überschuss an IGF-II die Interaktion mit IGF-I nicht.



Der Mediagnost IGF-I ELISA E20 ist ein sogenannter Sandwich-Assay unter Verwendung zweier spezifischer und hochaffiner Antikörper. Der an die Mikrotiterplatte gekoppelte erste Antikörper bindet das IGF-I aus der Probe. Im nachfolgenden Schritt bindet am derart immobilisierten IGF-I der zweite spezifische anti-IGF-I-Antikörper. Dieser ist biotinyliert und ermöglicht die Bindung eines Streptavidin-Peroxidase-Enzymkonjugats.

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

Abb. 2. Prinzip des IGFBP-blockierten ELISA

4 WARNHINWEISE UND VORSICHTSMAßNAHMEN

Für In-Vitro-Diagnostik. Zum Gebrauch durch Fachpersonal.

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 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.

Bitte verwenden Sie keine abgelaufenen, offensichtlich beschädigten, mikrobiell kontaminierten oder ausgelaufenen Reagenzien.

Angemessene Vorsichtsmaßnahmen und die Regeln der guten Laborpraxis müssen bei Lagerung, Gebrauch und Entsorgung der Bestandteile des Kits eingehalten werden. Die Entsorgung der Bestandteile des Kits muss nach den örtlichen Vorschriften erfolgen.

Menschliches Serum:

in folgenden Komponenten enthalten: **Kontrollserum KS1 & KS2**

Das humane Material, das für die Präparation dieses Produktes verwendet wird, wurde mit negativem Ergebnis auf Humanes Immundefizienz-Virus (HIV I und II), Hepatitis B-Oberflächenantigen und Hepatitis C Virus getestet. Da kein Test das Vorhandensein von infektiösen Erregern völlig ausschließen kann, sollten die Reagenzien wie potentiell infektiöses Material gehandhabt werden.

Reagenzien A-E, AK, EK, VP, WP

enthalten als Konservierungsmittel eine Mischung aus **5-chloro-2-methyl-4-isothiazolin-3-one** und **2-methyl-4-isothiazolin-3-one** (<0,015%)

H317	Kann allergische Hautreaktionen verursachen.
P280	Schutzhandschuhe/ Schutzkleidung/ Augenschutz/ Gesichtsschutz tragen.
P272	Kontaminierte Arbeitskleidung nicht außerhalb des Arbeitsplatzes tragen.
P261	Einatmen von Dampf vermeiden.
P333+P313	Bei Hautreizung oder –ausschlag: Ärztlichen Rat einholen/ ärztliche Hilfe hinzuziehen.
P302+P352	BEI KONTAKT MIT DER HAUT: Mit viel Wasser und Seife waschen.
P501	Entsorgung des Inhalts/ des Behälters gemäß den örtlichen/ regionalen/ nationalen/ internationalen Vorschriften.

Substratlösung (S)

Das TMB-Substrat (S) enthält 3,3',5,5' Tetramethylbenzidin.(<0.05%).

H315	Verursacht Hautreizungen.
H319	Verursacht schwere Augenreizung.
H335	Kann Atemwege reizen.
P261	Einatmen von Staub/ Rauch/ Gas/ Nebel/ Dampf/ Aerosol vermeiden.
P305+P351+	BEI KONTAKT MIT DEN AUGEN: Einige Minuten lang behutsam mit Wasser spülen.
P338	Vorhandene Kontaktlinsen nach Möglichkeit entfernen. Weiter spülen.

Stopplösung (SL)

Die Stopplösung enthält 0,2 M Schwefelsäure (H₂SO₄).

H290	Kann gegenüber Metallen korrosiv sein.
H314	Verursacht schwere Verätzung der Haut und schwere Augenschäden.
P280	Schutzhandschuhe/ Schutzkleidung/ Augenschutz/ Gesichtsschutz tragen.
P301+P330+	BEI VERSCHLUCKEN: Mund ausspülen.
P331	KEIN Erbrechen herbeiführen.
P305+P351+	BEI KONTAKT MIT DEN AUGEN: Einige Minuten lang behutsam mit Wasser spülen.
P338	Vorhandene Kontaktlinsen nach Möglichkeit entfernen. Weiter spülen.
P309+P310	BEI Exposition oder Unwohlsein: Sofort GIFT INFORMATIONSZENTRUM oder Arzt anrufen.

4.1 Erste-Hilfe Maßnahmen:

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

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

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

5 PROBEN

5.1 Probenmaterial

Serum und Plasma

Serum und Heparin/EDTA Plasma ergeben vergleichbare Werte. Citrat-Plasma Proben sind aufgrund der relativ hohen Menge an Antikoagulantien verdünnt und die IGF-I Werte entsprechend reduziert.

5.2 Probenentnahme

Das Blut zur Probengewinnung mittels standardmäßiger Venenpunktion entnehmen. Hämolytische Reaktionen sind zu vermeiden.

5.3 Erforderliches Probenvolumen: 10 µL

5.4 Probenstabilität

In fest verschließbaren, geeigneten Probengefäßen

- Lagerung bei 20-25°C max. 24 Stunden
- Lagerung bei -20°C mind. 2 Jahre
- Gefrier-Auftau-Zyklen max. 3

Die Lagerung von Proben über einen Zeitraum von 2 Jahren bei -20°C zeigte keinen Einfluss auf den Messwert. Einfrieren und Auftauen der Proben sollte minimiert werden. 3 Frier-Tauzyklen zeigten keinen Einfluss auf die Proben.

5.5 Interferenz

Hämoglobin, Triglyceride und Bilirubin in der Probe stören nicht bis zu einer Konzentration von **10 mg/mL**, **100 mg/mL** bzw. **200 µg/mL**. Der Einsatz hämolytischer, lipämischer oder ikterischer Proben sollte trotzdem zuvor vom Anwender validiert werden.

5.6 Probenverdünnung

- Verdünnung: **1:21** mit Probenpuffer **PP**
- Beispiel: **10 µL** Probe werden zu **200 µL Probenpuffer PP** gegeben (Verdünnungsfaktor **21**). Nach dem Mischen werden von dieser Lösung 20 µl pro Bestimmung innerhalb von max. 2 h im Assay eingesetzt.
- Gegebenenfalls kann, je nach erwarteten **IGF-I-Werten**, geringer oder stärker in **Probenpuffer PP** verdünnt werden.
- Achtung: Serum- und Plasmaproben müssen mind. **1:10** in **Probenpuffer PP** verdünnt werden, um eine ausreichende Ansäuerung der Proben zu erreichen.
- Probenstabilität nach dem Verdünnen in Probenpuffer PP: max 2.h.

6 MATERIALIEN

6.1 Inhalt der Testpackung

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

MTP	Mikrotiterplatte , gebrauchsfertig, beschichtet mit Maus-anti-hIGF-I-Antikörper. Die Vertiefungen sind einzeln abbrechbar.	(8x12) Vertiefungen
A-E	Standards , lyophilisiert (rekombinantes humanes IGF-I), die Konzentrationen sind auf dem Qualitätszertifikat angegeben.	5 x 500 µL
KS1	Kontrollserum 1 , lyophilisiert, (humanes Serum), die Konzentration ist auf dem Qualitätszertifikat angegeben.	1 x 500 µL
KS2	Kontrollserum 2 , lyophilisiert, (humanes Serum), die Konzentration ist auf dem Qualitätszertifikat angegeben.	1 x 500 µL
AK	Antikörperkonjugat , gebrauchsfertig, Ziegen-anti-hIGF-I-Antikörper biotinyliert.	1 x 9 mL
EK	Enzymkonjugat (POD) , gebrauchsfertig, Streptavidin-Peroxidase-Konjugat.	1 x 12 mL
PP	Probenpuffer , gebrauchsfertig	1 x 25 mL
WP	Waschpuffer WP , 20fach konzentrierte Lösung	1 x 50 mL
S	Substrat S , gebrauchsfertig, Meerrettich-Peroxidase (POD)-Substrat, stabilisiertes Tetramethylbenzidin.	1 x 12 mL
SL	Stopplösung SL , gebrauchsfertig, 0,2 M Schwefelsäure.	1 x 12 mL
-	Abdeckfolie für die Mikrotiterplatte	2 x
	Packungsbeilage	1 x
-	Qualitätszertifikat	1 x

6.2 Nicht mitgelieferte, benötigte Materialien

- Entmineralisiertes Wasser oder destilliertes Wasser (Aqua destillata) (**A. dest.**), 950 mL.
- Mikropipetten und Mehrkanal-Pipetten mit auswechselbaren Einmalspitzen
- Einmalröhrchen aus Polyethylen PE/ Polypropylen PP Röhrchen zum Verdünnen der Proben
- Vortex-Mixer
- Mikrotiterplattenschüttler (350 rpm)
- Mikrotiterplattenwasher (empfohlen)
- Photometer für Mikrotiterplatten ("ELISA-Reader"), Filter bei 450 und ≥ 590 nm

7 TECHNISCHE HINWEISE

Lagerbedingungen

Nach Erhalt sollte der Test-Kit bei 2 - 8°C (rekonstituierte Reagenzien bei -20°C) bis zum Verfallsdatum gelagert werden. Wiederholtes Einfrieren und Auftauen ist zu vermeiden.

Haltbarkeit

Die Haltbarkeit der Reagenzien **nach Öffnung** beträgt 4 Wochen. Nicht verwendete Streifen **der Testplatte** sind zusammen mit dem Trockenkissen **luftdicht** in dem wiederverschließbaren Klippbeutel bei 2° - 8°C zu lagern. Die Streifen bitte nur in dem mitgelieferten Rahmen verwenden. **Rekonstituierte Komponenten** (Standards **A – E** und Kontrollseren **KS1 und KS2**) sollten bei -20°C aufbewahrt werden. Zur weiteren Verwendung schnell aber schonend auftauen (keine Temperaturerhöhung über Raumtemperatur und kein übermäßiges Vortexen), bis zu 3 dieser Einfrier-Auftauzyklen zeigten keinen Einfluss auf den Test. Der 1:20 gebrauchsfertig verdünnte Waschpuffer **WP** ist 4 Wochen haltbar.

Vorbereitung der Reagenzien

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

Rekonstitution

Die Standards **A – E** und Kontrollserum **KS1 und KS2** werden mit dem im Kit enthaltenen Probenpuffer **PP** rekonstituiert. Es empfiehlt sich zum Rekonstituieren die Reagenzien 15 Minuten bei Raumtemperatur stehen zu lassen und sie anschließend kräftig mit einem Vortex-Mixer zu mischen. Schaumbildung sollte jedoch vermieden werden.

Verdünnung

Nach der Rekonstitution werden die Kontrollseren **KS1 und KS2** im gleichen Verhältnis (1:21) wie die Proben mit dem Probenpuffer **PP** verdünnt.

Das benötigte Volumen des Waschpuffers **WP** wird vorbereitet, indem das 20fach Konzentrat im Verhältnis 1:20 mit Aqua dest. verdünnt wird.

Testdurchführung

Die Messungen (Leerwert, Standards **A - E**, Kontrollseren **KS1 und KS2** und Proben) sollten stets in Doppelbestimmung durchgeführt werden. Um optimale Ergebnisse zu erhalten, ist auf genaues Pipettieren und strikte Befolgung des Testprotokolls zu achten. Bei der Testdurchführung sollten Standards **A - E**, Kontrollseren **KS1 und KS2** und die jeweiligen Proben möglichst schnell pipettiert werden z.B. in 15 Minuten). Das Enzymkonjugat **EK** sowie nachfolgend die Substratlösung **S** und die Stopplösung **SL** sollten in der gleichen Reihenfolge und in dem gleichen Zeitintervall auf die Platte zugegeben werden. Dies verhindert Variationen in der Konzentrationsbestimmung durch unterschiedliche Inkubationszeiten.

Inkubation

Inkubation bei Raumtemperatur bedeutet: **Inkubation bei 20 - 25°C**. Die Substratlösung **S**, stabilisiertes Tetramethylbenzidin, ist lichtempfindlich–Aufbewahrung und Inkubation bitte vor Licht geschützt.

Schütteln

Die Inkubationen sollen geschüttelt bei mittlerer Umdrehungsfrequenz eines für Mikrotiterplatten geeigneten Schüttlers erfolgen. Wir empfehlen 350 rpm. Bauartbedingt kann die Schüttelfrequenz angepasst werden müssen. Zu geringes Schütteln kann durch ungenügende Vermischung der Lösungen zu verringerten optischen Dichten, hohen Streuungen und/oder falschen Werten führen, zu starkes Schütteln dagegen zu erhöhten optischen Dichten und/oder falschen Werten.

Waschen

Korrektes Waschen ist von grundlegender Bedeutung für den sicheren, richtigen und präzisen Ablauf des Testes. Ungenügendes Waschen ist eine häufige Ursache für nicht valide Testdurchführungen. Mögliche Folgen sind unkontrollierte unspezifische Variationen der gemessenen optischen Dichten, die zu falschen Ergebnisberechnungen der Proben führen können. Mögliche Hinweise darauf sind z.B. hohe Leerwerte und variabel streuende Messwerte. Zum Waschen muss der mitgelieferte und auf Gebrauchskonzentration verdünnte Waschpuffer verwendet werden. Das Waschvolumen pro Waschzyklus und Vertiefung muss mindestens 300 µL betragen.

Bei Gebrauch eines speziellen **automatischen Mikrotiterplattenwashers** ist unbedingt dessen Gebrauchsanweisung zu befolgen. Die Geräteeinstellungen müssen u.a. der 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 Alternative. Die Waschflüssigkeit kann dabei per Multistepper, Mehrkanalpipette oder auch mit einer Spritzflasche dispensiert werden. Die Waschflüssigkeit kann durch schwingvolles Ausschwenken der Mikrotiterplatte über einem Becken entfernt werden. Falls Absaugvorrichtungen eingesetzt werden, ist darauf zu achten, dass die Oberflächen der Vertiefungen der Mikrotiterplatte nicht beschädigt werden. Nach jedem einzelnen Waschzyklus sollte die verbleibende Restflüssigkeit durch Ausklopfen der Mikrotiterplatte auf nicht fuselndem Zellstoff gründlich entfernt werden.

8 TESTDURCHFÜHRUNG

Vorbereitung der Reagenzien

Reagenzpräparation:		Rekonstitution:	Verdünnung:
A-E	Standards	in 500 µL Probenpuffer PP	-
KS1	Kontrollserum 1	in 500 µL Probenpuffer PP	1:21 mit Probenpuffer PP
KS2	Kontrollserum 2	in 500 µL Probenpuffer PP	1:21 mit Probenpuffer PP
WP	Waschpuffer	-	1:20 mit Aqua dest.

Proben + Kontrollseren KS1 und KS2 mit Probenpuffer PP 1:21 verdünnen, sofort mischen, max. 120 min inkubieren. Davon 20 µl pro Bestimmung einsetzen.

Vor der Testdurchführung alle **Reagenzien auf Raumtemperatur (20-25°C)** bringen.

Testdurchführung in Doppelbestimmung:

Pipettieren	Reagenzien	Position
80 µL	Antikörper-Konjugat AK	in <u>alle</u> benötigten Vertiefungen pipettieren
20 µL	Probenpuffer PP (Leerwert)	A1/A2
20 µL	Standard A (2 ng/mL)	B1/B2
20 µL	Standard B (5 ng/mL)	C1/C2
20 µL	Standard C (15 ng/mL)	D1/D2
20 µL	Standard D (30 ng/mL)	E1/E2
20 µL	Standard E (50 ng/mL)	F1/F2
20 µL	Kontrollserum KS1 (1:21 verdünnt)	G1/G2
20 µL	Kontrollserum KS2 (1:21 verdünnt)	H1/H2
20 µL	Probe (1:21 verdünnt)	in die restlichen Vertiefungen nach Bedarf pipettieren

Mit Klebefolie die Vertiefungen dicht abdecken.

Proben-Inkubation: 1 h bei 20 - 25°C, 350 rpm

5x 300 µL	Absaugen und die Platte 5x mit je 300 µL Waschpuffer WP / Vertiefung waschen.	In jede Vertiefung
100 µL	Enzymkonjugat EK	In jede Vertiefung

Mit Klebefolie die Vertiefungen dicht abdecken.

Inkubation: 30 Minuten bei 20 - 25°C, 350 rpm

5x 300 µL	Absaugen und die Platte 5x mit je 300 µL Waschpuffer WP / Vertiefung waschen.	In jede Vertiefung
100 µL	Substratlösung S	In jede Vertiefung

Substrat S Inkubation: 15 Minuten im Dunklen bei 20 - 25°C

100 µL	Stopplösung SL	In jede Vertiefung
--------	-----------------------	--------------------

Messung der Absorption innerhalb von 30 min bei **450 nm** (Referenzfilter ≥ 590 nm).

9 QUALITÄTSKONTROLLE

GLP erfordert, dass mit jeder Standardkurve Kontrollen mitgeführt werden. Um eine ordnungsgemäße Durchführung zu gewährleisten, sollte eine statistisch signifikante Anzahl der Kontrollen untersucht werden, um Mittelwerte und akzeptable Bereiche zu ermitteln. Die Kit-Kontrollen müssen innerhalb der zulässigen Bereiche, die auf dem QC-Zertifikat angegeben worden sind gefunden werden. Wenn die Kriterien nicht erfüllt sind, ist der Test ungültig und sollte wiederholt werden.

9.1 Qualitätskriterien

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

10 AUSWERTUNG

10.1 Erstellung der Standardkurve

Als Standardmaterial wurde der 1. Internationaler Standard für WHO NIBSC 02/254, verwendet. Die bereitgestellten Standards enthalten folgende hIGF-I-Konzentrationen:

Standard	A	B	C	D	E
ng/mL	2	5	15	30	50
nmol/ L	0,26	0,66	1,96	3,92	6,54

- 1) Ermittlung des **Mittelwertes** 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** des jeweiligen für die Proben und Kontrollen KS1 und KS2 berechneten IGF-I-Gehaltes mit dem entsprechenden **Verdünnungsfaktor** der Proben und Kontrollen ergibt die **IGF-I-Konzentration in ng/mL** (oder nmol/L, je nach gewählter Einheit der Standards).

10.2 Beispiel für eine typische Standardkurve

Die exemplarischen Daten und die Standardkurve in der Abbildung 3 können **nicht** für die Berechnung der Testergebnisse genutzt werden! Für jeden Test muss eine eigene Standardkurve mitgeführt werden.

	Leerwert	A	B	C	D	E
ng/mL	0	2	5	15	30	50
OD (450-620 nm)	0,00	0,088	0,299	0,985	1,727	2,543

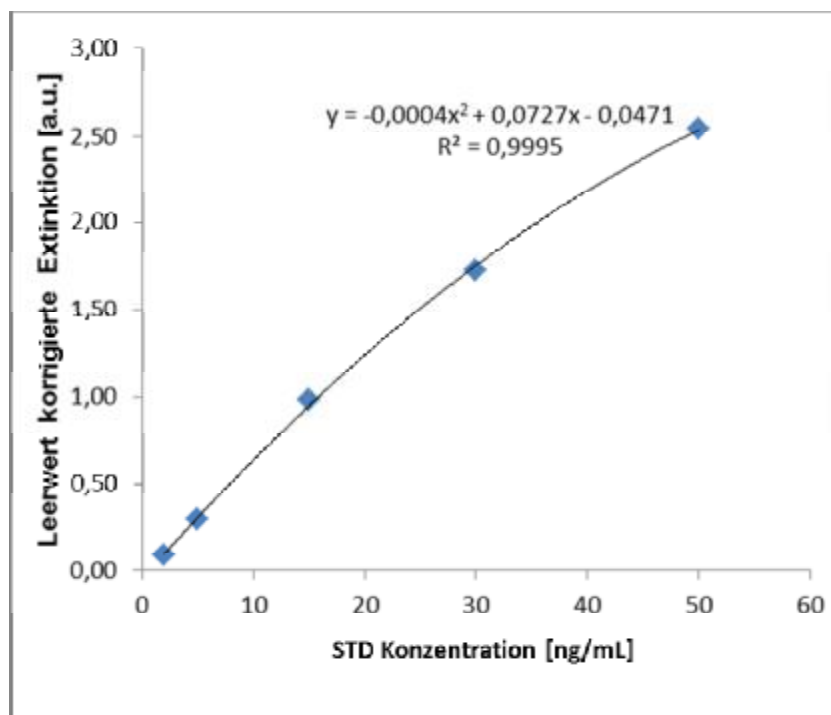


Abbildung 3: Exemplarische Standardkurve

10.3 Beispielhafte Berechnung der hIGF-I-Konzentration

Probenverdünnung: 1:21

Gemessene Extinktion des Leerwertes: 0,0165

Gemessene Extinktion der Probe: 0,2695

Aus der Differenz der Probenextinktion und der Extinktion des Leerwertes **berechnet Ihr Auswertungsprogramm** mit der entsprechenden Kurvenanpassung die hIGF-I-Konzentration der verdünnten Probe durch Auflösen der Gleichung aus Abb. 3 nach x. In diesem Fall ergibt sich eine IGF-I-Konzentration in der verdünnten Probe von

$$0,253 = -0,0004x^2 + 0,0727x - 0,0471$$

$$4,57 = x$$

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

$$4,57 \times 21 = 96 \text{ ng/mL}$$

10.4 Interpretation der Ergebnisse

Das Testergebnis allein sollte nicht der einzige Grund für therapeutische Entscheidungen sein. Die Ergebnisse sollten in Bezug auf die Anamnese, weitere klinische Beobachtungen der testspezifischen Referenzwerte und den Resultaten anderer diagnostischer Untersuchungen interpretiert werden. Darüber hinaus empfehlen wir, dass jedes Labor seine eigenen Referenz-Bereiche ermittelt.

Es wird empfohlen die internationalen und nationalen Leitlinien zur Diagnostik des Wachstumshormonmangels bzw. der Akromegalie zu beachten.

11 EINSCHRÄNKUNGEN

IGF-I-Spiegel hängen in erster Linie von der Wachstumshormonsekretion ab. Erniedrigte Werte beweisen jedoch keinesfalls einen Wachstumshormonmangel, da eine Reihe anderer Faktoren die IGF-I Konzentration ebenfalls beeinflussen und deshalb zur korrekten Interpretation in die Betrachtung mit einbezogen werden müssen. IGF-I-Spiegel nehmen während des Fastens (mehr als 1 Tag), als Ergebnis chronischer Malnutrition, Malabsorption und Kachexie, bei eingeschränkter Leberfunktion, bei Hypothyreose und unbehandeltem Diabetes mellitus ab. Zudem können sie bei systemisch-entzündlichen Erkrankungen und malignen Erkrankungen erniedrigt sein.

IGF-I-Spiegel sind erhöht bei vorzeitiger Pubertät. In klinischen Situationen, die mit Hyperprolaktinämie einhergehen oder bei Patienten mit Craniopharyngeom können gelegentlich trotz bestehenden Wachstumshormonmangels normale Werte auftreten. Während der späten Schwangerschaft sind die IGF-I-Werte mäßig erhöht.

Der Mediagnost IGF-I ELISA E20 basiert auf einer Kombination aus monoklonalem Fänger- und polyklonalen Detektionsantikörper. Grundsätzlich kann das Ergebnis von immunologischen Testsystemen durch z.B. heterophile Antikörper oder Rheumafaktoren beeinflusst werden. Über das Assay Design werden diese Einflüsse minimiert, können jedoch nicht vollständig ausgeschlossen werden.

12 REFERENZWERTE

Die IGF-I-Spiegel sind bei Kindern stark altersabhängig. Bei Erwachsenen bis zu einem Alter von etwa 60 Jahren ist dieses Phänomen weniger ausgeprägt. Die Referenzbereiche der verschiedenen Altersgruppen, die log-normal verteilt sind, sind in der Tabelle 2 durch Perzentilen angegeben. Diese Werte sind nur Richtwerte; für die diagnostische Auswertung von Patientendaten muss jedes Labor eigene Referenzwerte ermitteln.

Zwischen 8 und 19 Jahren sind die Werte für Jungen und Mädchen getrennt aufgeführt, da der Pubertätsgipfel üblicherweise bei Mädchen 2 Jahre früher auftritt. Graphische Darstellungen werden in Abbildung 4, 5 und 6 gezeigt. Ein Hauptproblem für die Interpretation von IGF-I-Werten ergibt sich aus der Tatsache, dass Minderwuchs oft auf eine Entwicklungsverzögerung zurückzuführen ist, seltener auf eine metabolische oder endokrine Erkrankung (konstitutionelle Entwicklungsverzögerung). Der starke Anstieg der IGF-I-Spiegel während der Pubertät führt deshalb gelegentlich zu falsch subnormalen Werten, wenn die gemessenen IGF-I-Konzentrationen des Patienten auf das chronologische und nicht auf das biologische Alter bezogen werden. Es empfiehlt sich, in einem solchen Fall das Pubertätsstadium in die Betrachtung mit einzubeziehen (Tabelle 1), um ein angemessenes Bild von der Situation zu erhalten.

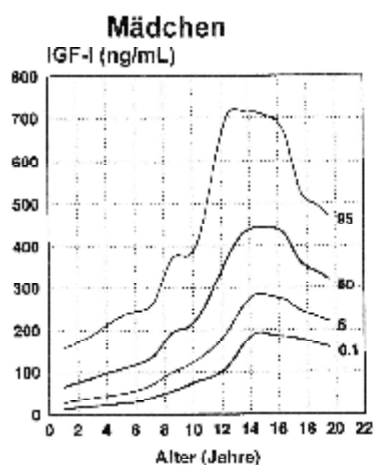


Abb. 4: Altersabhängiger Referenzbereich der Serum-IGF-I Spiegel bei Mädchen.

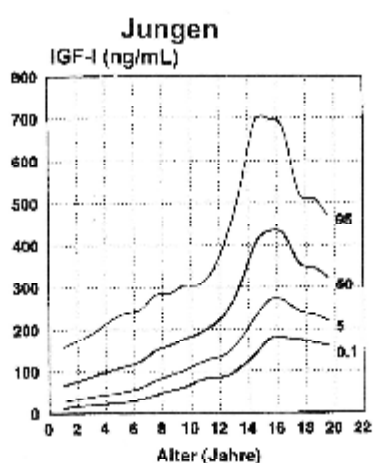


Abb. 5: Altersabhängiger Referenzbereich der Serum-IGF-I Spiegel bei Jungen.

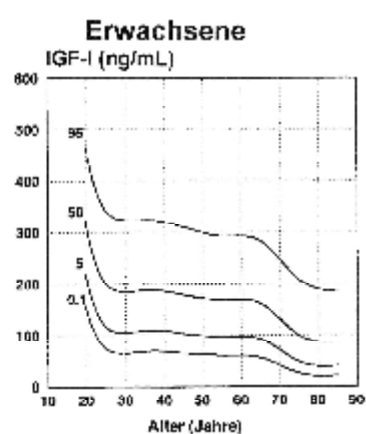


Abb. 6: Altersabhängiger Referenzbereich der Serum-IGF-I Spiegel bei Erwachsenen.

Tabelle 1 Referenzbereich der Serum-IGF-I-Spiegel angegeben in ng/mL in verschiedenen Pubertätsstadien nach Tanner. Da zwischen Mädchen und Jungen keine Unterschiede bestanden, wurden jeweils beide Geschlechter zusammengefasst. Lediglich Kinder und Jugendliche zwischen 7 und 17 Jahren wurden betrachtet

Pubertätsstadium	Perzentile			
	0,1.	5.	50.	95.
1	61	105	186	330
2	85	156	298	568
3	113	196	352	631
4	171	268	431	693
5	165	263	431	706

Tabelle 2 IGF-I Serumkonzentrationen gesunder Probanden in Abhängigkeit vom Alter. Zwischen dem 8. und 19. Lebensjahr wurden die Daten nach Geschlecht getrennt ausgewertet, weil bei den Mädchen der Anstieg der Serumkonzentrationen während der Pubertät meistens 2 Jahre früher erfolgt.

Perzentile														
Altersgruppe	0,1.	1.	5.	10.	20.	30.	40.	50.	60.	70.	80.	90.	95.	99.
0-2 J.	13	20	28	34	43	50	58	66	75	87	102	128	156	220
2-4 J.	20	29	40	48	59	68	77	87	98	111	129	159	189	260
4-6 J.	26	36	50	59	73	85	96	108	122	138	160	196	233	320
6-7 J.	34	46	62	72	87	99	111	124	138	155	176	212	248	332
7-8 J.	45	60	78	90	107	121	134	148	163	181	205	243	281	364
8-9 J. Jungen	54	71	90	102	119	133	146	160	175	192	214	250	284	362
8-9 J. Mädchen	55	75	99	115	137	156	174	193	214	239	271	324	376	496
9-10 J. Jungen	63	82	102	115	133	148	162	176	191	209	232	269	304	379
9-10 J. Mädchen	68	89	114	130	152	170	187	205	224	247	276	323	369	469
10-11 J. Jungen	77	96	117	130	148	162	176	189	203	220	241	274	305	370
10-11 J. Mädchen	81	106	134	153	178	199	219	239	261	287	321	374	426	539
11-12 J. Jungen	85	106	129	144	163	179	194	209	225	244	267	304	339	413
11-12 J. Mädchen	91	123	160	185	220	248	276	305	337	374	424	503	581	758
12-13 J. Jungen	88	112	141	159	184	204	223	243	264	289	321	371	419	525
12-13 J. Mädchen	116	155	201	231	274	309	342	377	415	460	519	614	707	914
13-14 J. Jungen	111	143	179	203	235	261	286	311	339	371	412	477	540	677
13-14 J. Mädchen	163	207	256	287	329	364	395	428	463	504	556	637	716	884
14-15 J. Jungen	140	182	229	260	303	337	370	404	441	484	539	625	691	896
14-15 J. Mädchen	193	236	284	314	353	385	414	443	474	510	556	628	713	832
15-16 J. Jungen	176	221	269	299	340	372	402	433	466	504	552	626	697	849
15-16 J. Mädchen	187	231	279	309	350	382	412	442	474	512	559	632	700	845
16-17 J. Jungen	178	221	267	296	335	366	395	424	455	491	537	607	673	814
16-17 J. Mädchen	183	225	270	298	336	366	394	422	452	486	530	597	660	792
17-18 J. Jungen	173	207	243	265	294	317	337	358	380	405	436	484	527	618
17-18 J. Mädchen	176	210	246	268	297	320	341	362	384	409	441	488	533	624
18-19 J. Jungen	167	201	235	256	285	307	327	347	368	393	423	469	512	600
18-19 J. Mädchen	167	199	233	254	281	302	322	341	362	385	414	458	499	583
19-20 J.	158	189	220	240	265	285	304	322	341	363	391	433	471	550
20-30 J.	72	92	115	130	150	167	182	198	215	235	261	302	340	425
30-40 J.	68	87	109	123	142	158	173	188	204	223	248	287	324	404
40-50 J.	64	82	103	116	135	150	164	178	194	212	235	272	310	385
50-60 J.	60	77	97	110	127	142	155	169	184	201	224	260	292	369
60-70 J.	55	72	91	103	120	134	147	161	176	193	215	251	282	362
70-80 J.	25	35	47	55	67	78	88	98	110	124	142	173	207	276
>80 J.	21	30	40	47	58	67	76	85	95	108	125	153	184	245

Die Serumkonzentrationen sind in **ng/ml** angegeben.

Diese Referenzwerte wurden von Prof. Dr. W.H Blum durch einen Radioimmunoassay, der identisch mit dem Mediagnost IGF-R20 ist, erhoben. Somit können die alters- und geschlechtsspezifischen Referenzwerte, die in *Diagnostics of Endocrine Function in Children and Adolescents* (In: Ranke MB (ed): ISBN-3-335-00496-5) publiziert wurden, auf alle Mediagnost IGF-I-Tests angewendet werden. Üblicherweise wird eine Abweichung im Bereich von mehr als $\pm 2SD$ als pathologisch betrachtet und fordert weitere Untersuchungen in Bezug auf die klinischen Symptome.

13 ASSAY EIGENSCHAFTEN UND VALIDIERUNG

13.1 Analytische Sensitivität

Die analytische Sensitivität (Limit of Detection) wurde durch mehrfaches Messen des Leerwertes bestimmt. Die daraus ermittelte zweifache Standardabweichung des Leerwertes beträgt 0,09 ng/mL. In 19 unabhängigen Bestimmungen wurden Werte von 0,03 ng/mL bis 0,17 ng/mL gefunden.

13.2 Spezifität

Die Kreuzreaktivität mit IGF-II, Insulin und C-Peptid wurde getestet. Diese IGF-verwandten Proteine wurden dem Assay-Puffer in verschiedenen Konzentrationen zugegeben, und die Lösung wurde als Probe ohne weitere Verdünnung im Assay eingesetzt. Die gemessene IGF-I Konzentration des Leerwertes ohne diese Proteine betrug 0,78 µg/L. Somit zeigt sich keine signifikante Kreuzreaktivität von IGF-II, Insulin oder C-Peptid (siehe Tabelle 3).

Tabelle 3 Spezifität: Kreuzreaktivität des Testsystems mit unterschiedlichen IGF-I - ähnlichen Proteinen.

zugesetzt C-Peptide [µg/L]	gemessen IGF-I [µg/L]	zugesetzt Insulin [µg/L]	gemessen IGF-I [µg/L]	zugesetzt IGF-II [µg/L]	gemessen IGF-I [µg/L]
500	0,73	100	0,78	1250	0,77
100	0,78	10	0,77	750	0,73
10	0,77	1	0,76	250	0,77
0	0,78	0	0,78	0	0,78

13.3 Präzision

Intra-Assay Variabilität

Drei Proben wurden sechs bis 18 Mal in dem gleichen Assay gemessen. Die Ergebnisse sind in Tabelle 4 gezeigt, der gemessene Variationskoeffizient (VK) beträgt 5,81% im Durchschnitt.

Tabelle 4 Intra-Assay Variabilität

	Anzahl von Bestimmungen	Mittelwert (ng/mL)	Standard Abweichung (ng/mL)	VK (%)
Probe 1	18	144,8	9,63	6.65
Probe 2	18	140,79	7,15	5.08
Probe 3	18	138,02	7,86	5.69

Inter-Assay und Lot-to-Lot Variabilität

Serumproben, wurden in unabhängigen Tests gemessen. Beispielhafte Ergebnisse sind in der Tabelle 5 gezeigt. Chargen-übergreifend wurden in acht verschiedenen Chargen innerhalb eines Zeitraumes von vier Jahren in fünf Serumproben ein Variationskoeffizient von Ø 8,57% ermittelt (min/max: 6,76 – 10,46%).

Tabelle 5 Inter-Assay Variabilität

	Anzahl von Bestimmungen	Mittelwert (ng/mL)	Standard Abweichung (ng/mL)	VK (%)
Probe 1	8	81	5,34	6,56
Probe 2	16	192	12,35	6,43
Probe 3	17	498	27,52	5,53

13.4 Linearität

Die Linearität wurde durch Verdünnungen von nativen Seren mit unterschiedlichen IGF-I Konzentration (Probe 1-3) getestet. Die Proben wurden seriell in Probenpuffer verdünnt und der IGF-I Gehalt in jeder Verdünnung ermittelt. Aus Abbildung 7 wird ersichtlich, dass die unter Berücksichtigung des Verdünnungsfaktors berechnete IGF-I Konzentration in der Probe unabhängig von der Verdünnung ist. Die Variabilität über die 4 bzw. 5 Verdünnungsstufen beträgt für die Proben mit einer IGF-I Konzentration von 183, 322 und 397ng/mL 3,38, 3,11 und 2,14%.

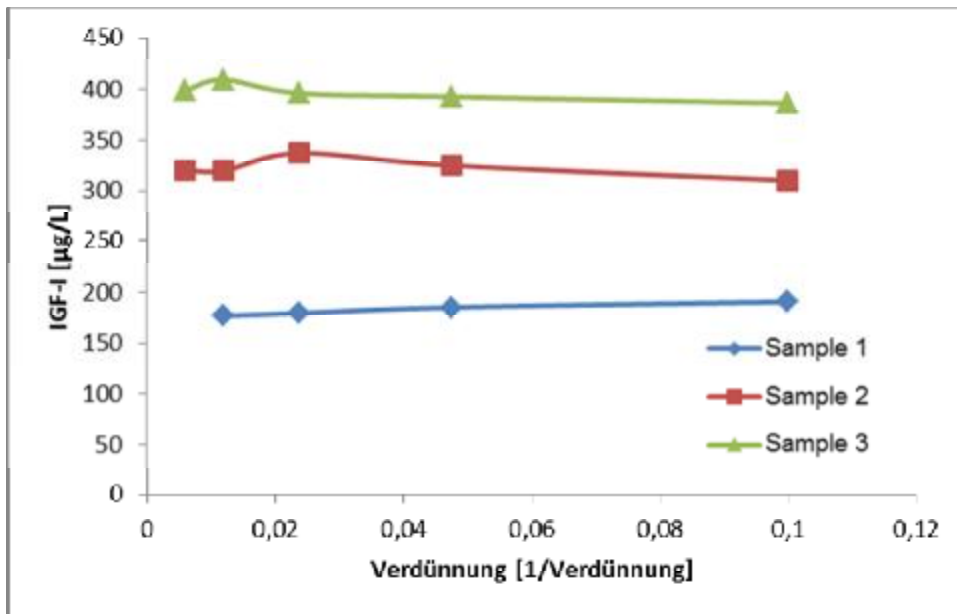


Abbildung 7 Linearität, neu berechnet IGF-I-Konzentrationen von differentiell verdünnten Proben. Die Proben müssen mindestens 1:10 verdünnt werden, die empfohlene Verdünnung ist 1:21.

13.5 Wiederfindung und Richtigkeit

Rekombinantes IGF-I wurde in unterschiedlichen Mengen in Seren zugegeben. Die IGF-I-Gehalt der so angereicherten Proben wurde gemessen und die Wiederfindung im Vergleich zu angereichertem Puffer berechnet. Ergebnisse sind in der Tabelle 6 gezeigt.

Tabelle 6 Wiederfindung von rekombinanten IGF-I in Humanserum

IGF-I [µg/L]	Probe 1	Probe 2	Probe 3	Probe 4
Probe	138	172	133	180
+ IGF-I 200	287	372	--	--
+ IGF-I 400	--	--	539	591
% Wiederfindung	85	100	101	102

13.6 Rückführbarkeit / Assay Kalibration

Die Quantifizierung des IGF-I in der Probe erfolgt durch den Einsatz eines Standards, der rekombinant exprimiertes IGF-I in einer Reinheit von > 98% (SDS-PAGE, Silberfärbung) enthält. Die Rückführbarkeit der Konzentration des rekombinanten Standardmaterials auf das internationale Referenzmaterial (WHO 02/254) wurde durch eine unabhängige, internationale Studie gezeigt. Die Ergebnisse wurden von Burns C et al. in der Zeitschrift Growth Horm IGF Res. 2009 Oct;19(5):457-62. Epub 2009 Mar 20 publiziert. Der Mediagnost IGF-I ELISA E20 ist in der Studie der mit 14c bezeichnete Test.

Das Referenzmaterial enthält **8.5 µg IGF-I pro Ampulle**. Dieser Messwert wurde über eine Aminosäureanalyse und HPLC ermittelt. Der Mediagnost E20 Immunoassay (Assay No. 14c) bestimmt eine IGF-I Konzentration von 11.55 µg pro Ampulle. Im Vergleich dazu liegt die gemessene IGF-I Menge im Mittel aller Immunoassays bei **11.61 µg pro Ampulle**. Somit beträgt der Faktor, um Mediagnost Messergebnisse auf den WHO 02/254 Standard zu normieren, **0,735**.

13.7 Interferenz

Der Einfluss von Bilirubin, Hämoglobin und Triglyceriden auf die Messung von IGF-I wurde durch Zugabe von verschiedenen Mengen dieser Stoffe zu humanen Serumproben getestet. Um den Einfluss der jeweiligen Lösungsmittel auszuschließen, wurde zum Vergleich die gleiche Menge / Volumen Puffer ohne Zusatz zu den Seren dazugegeben. Tabelle 7 zeigt, dass weder Bilirubin, Hämoglobin noch Triglycerid einen Einfluss auf die Messung von IGF-I in menschlichem Serum ausüben.

Tabelle 7 Testung von Interferenz von physiologischen Substanzen auf IGF-I Messung Drei humane Serumproben wurden mit unterschiedlichen Mengen an Triglyceriden, Bilirubin oder Hämoglobin versetzt und die Auswirkung auf die gemessene IGF-I Konzentration im Vergleich zum nativen Serum bestimmt. Hier gezeigt die höchsten Konzentrationen und ihre Auswirkung auf die Wiederfindung des IGF-I [%]

	Triglyceride 100 mg/mL	Bilirubin 200 µg/mL	Hämoglobin 10 mg/ml
Serum 1	93	90	97
Serum 2	100	101	110
Serum 3	120	120	104

Der Einfluss von Bindungsproteinen auf IGF-I-Messung wurde exemplarisch mit IGFBP-3 erläutert. Verschiedene Mengen an IGF-I und 3 bzw. 6 mg/L IGFBP-3 wurden in Puffer (pH 2) und in PSB (pH 7,4) zugegeben. Nach einer Inkubationszeit von 15 Minuten bei Raumtemperatur wurde der IGF-I Gehalt dieser Proben im E20 bestimmt. IGFBP-3 stört bis 6 mg/L im Probenpuffer **PP** die IGF-I-Messung nicht. Ohne eine Ansäuerung der Probe kommt es jedoch zu einer starken Abweichung vom Zielwert (Tabelle 8).

Tabelle 8 Interferenz von IGFBP-3 auf die IGF-I Messung

IGFBP-3 [mg/L]	Probenpuffer PP + IGF-I [µg/L]		
	50	100	300
0	46	116	358
3	47	116	384
6	52	123	355
IGFBP-3 [mg/L]	PBS + IGF-I [µg/L]		
	50	100	300
0	34	90	349
3	7	12	152
6	7	10	48

14 VERGLEICHSTUDIEN

Mediagnost E20 IGF-I wurde mit dem Mediagnost IGF-R20 verglichen. 196 Serumproben wurden in beiden Tests gemessen. Die Korrelation (Abbildung 8) mit den beiden Tests war sehr gut. Die Abweichung liegt im Bereich der Inter-Assay-Variabilität und ist deshalb vernachlässigbar. Des Weiteren wurden Vergleiche mit kommerziell verfügbaren IGF-I Tests durchgeführt. Diese zeigen eine gute Korrelation der Messergebnisse des Mediagnost IGF-I ELISA E20 ($R^2 > 0,9$).

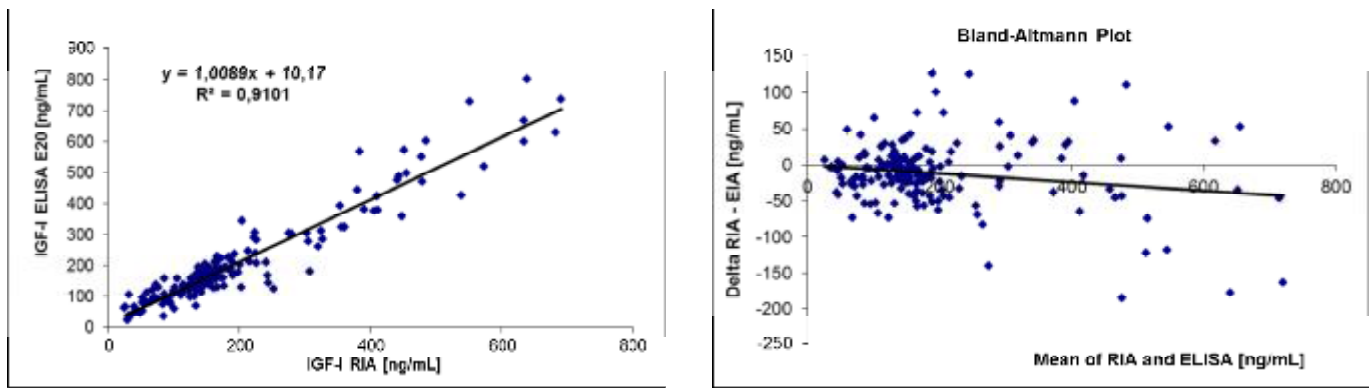


Abbildung 8: Testvergleich Mediagnost RIA R20 und Mediagnost ELISA E20

Gebrauchsinformation für wissenschaftliche Anwendungen

15 WISSENSCHAFTLICHE ANWENDUNGEN

IGF-I findet sich in sehr niedrigen Konzentrationen in verschiedenen Körperflüssigkeiten ebenso wie in Zellkulturmedien vieler Zelllinien. Die Bestimmung in diesen Proben ist besonders schwierig. Die Ursache hierfür sind IGFBPs, die oft in größeren Mengen vorhanden sind. Der IGFBP-blockierte ELISA erlaubt die einfache, korrekte und sensitive IGF-I-Bestimmung in zahlreichen Proben mit minimalem Zeitaufwand.

15.1 Geeignete Proben für Forschungszwecke

Serum, Plasma, Zellkulturüberstand verschiedener humaner **Zelllinien, Urin, Liquor.**

Die IGF-I Konzentration in diesen Probenmatrices können stark schwanken, daher muss die optimale Verdünnung im Einzelfall vom Anwender ausgetestet werden. Rekombinantes IGF-I konnte erfolgreich in **1:2 in Probenpuffer PP verdünntem Urin, Zerebrospinal Flüssigkeit** und **in Zellkulturmedien** gemessen werden (bei Berücksichtigung der Spezies-Kreuzreaktivitäten (s.u.)).

Auch in Zelllysaten kann IGF-I mittels dieses Testsystems nachgewiesen werden. Ein möglicher Lysispuffer könnte aus folgenden Bestandteilen zusammengesetzt sein: 10 mM Tris/ 5 mM EDTA/ 50 mM NaCl/ 30 mM Sodium Pyrophosphate/ 50 mM Sodium Fluoride/ 100 µM Sodium Orthovanadate/ 1 mM PMSF/ 1% Triton X-100. Entscheidend ist die IGF-I Synthese, ist diese zu niedrig (< 0,09 ng/mL bzw. 0,9 ng/mL bei 1:10 Verdünnung) so kann der Test kein IGF-I detektieren.

Expressiert die Zelllinie keine IGF-Bindungsproteine, so kann das Zelllysate direkt als Probe eingesetzt werden. Jedoch sollte die Messung für jede Zelllinie und jeden Zelllysispuffer durch den Einsatz von rekombinantem IGF-I in Wiederfindungsexperimenten validiert werden.

Ein vergleichbares Verfahren zur Messung von IGF-II wurde von Mohlin S, Hamidian A, Pählman in NEOPLASIA, 2013, Volume 15 No 3 veröffentlicht.

15.2 Kreuzreaktivität

Die Kreuzreaktivitäten von mehreren handelsüblichen tierischen Seren wurden in diesem Assay getestet.

Damit wurde nachgewiesen, dass der Test als heterologer Assay für IGF-I-Messung in Serumproben von Primaten, Rindern, Schweinen, Schafen, Pferden, Eseln, Ziegen, Hunden, Katzen, Kaninchen und Meerschweinchen eingesetzt werden kann. Artspezifische Kalibrierung muss durch den Benutzer durchgeführt werden.

Für IGF-I Bestimmung in Seren von Ratten, Mäusen sowie Hühnern ist der Test **nicht** geeignet.

Um exakte artspezifische IGF-I Konzentrationen zu ermitteln, muss das Testsystem speziesspezifisch kalibriert werden: Verwendung von z.B. bovinem IGF-I in bekannter Konzentration.

TABLE OF CONTENTS

Instructions for use

1	INTENDED USE.....	24
2	INTRODUCTION	24
3	PRINCIPLE.....	26
4	WARNINGS AND PRECAUTIONS	27
5	SAMPLES.....	28
6	MATERIALS	29
7	TECHNICAL NOTES	30
8	ASSAY PROCEDURE.....	31
9	QUALITY CONTROL.....	32
10	EVALUATION OF RESULTS	32
11	LIMITATIONS OF PROCEDURE	34
12	REFERENCE VALUES	34
13	PERFORMANCE CHARACTERISTICS.....	36
14	ASSAY COMPARISON.....	39
15	SCIENTIFIC APPLICATION.....	40
16	LITERATUR / REFERENCES	41
	Internationale Assay Description.....	44

IGF-I ELISA E20	96 Determinations
CE	DE/CA40/00809/20
Principle of the test	Enzyme-linked Immunoassay
Duration (incubation period)	1.75 h
Antibodies	specific, monoclonal antibody and high-affinity polyclonal antiserum
Cross reactivity with IGF-II, Insulin, C-Peptide	< 0.1%
Buffer	Ready for use and 20fold concentrate
Standard	5 single standards: 2 -50 ng/mL, recombinant human IGF-I
Reference material	International Standard WHO/NIBSC 02/254
Assay Range	0.09 – 1050 ng/mL
Control	2 control sera, freeze-dried
Sample	human serum / plasma
Required sample volume	10 µL
Sample dilution	1:21
Analytical sensitivity	ø 0.09 µg/L
Intra- / Interassay Variance	ø < 10 %
Reference values	Blum W.F., Schweizer R. Insulin-Like Growth Factors and Their Binding Proteins. In: Ranke MB (ed): Diagnostics of Endocrine Function in Children and Adolescents. Basel, Karger, 2003, pp.166-199:

1 INTENDED USE

The ELISA E20 is intended to be used for the measurement of human IGF-I in serum and plasma samples. In combination with growth retardation and other clinical symptoms the results of this test system can be used as supplementary data to assess disturbances of the growth hormone axis.

2 INTRODUCTION

Insulin-like growth factors (IGF) I and II play a pivotal role in regulating the proliferation, differentiation and specific functions of many cell types (1-3). IGF-I is identical with Somatomedin C (Sm-C) (4) and has a molecular weight of 7649 Dalton (5). Its major regulators are growth hormone (GH) and nutrition (6), although its production in specific tissues is affected by a multitude of tropic hormones and other peptide growth factors. In contrast to many other peptide hormones, IGFs are avidly bound to specific binding proteins (IGFBP). The seven classes of IGFBPs which are known at present (7,8,22) either bind IGF-I and IGF-II with similar affinities or show a preference for IGF-II (9,10).

A major problem of IGF-I measurement results from the interference of IGFBPs in the assay. Direct determinations in untreated serum samples (11) give false values because of the extremely slow dissociation of the IGF-I/IGFBP-3 complexes during the assay incubation. Depending on the ratio IGF-I to IGFBP the following errors may occur (see also Figure 1):

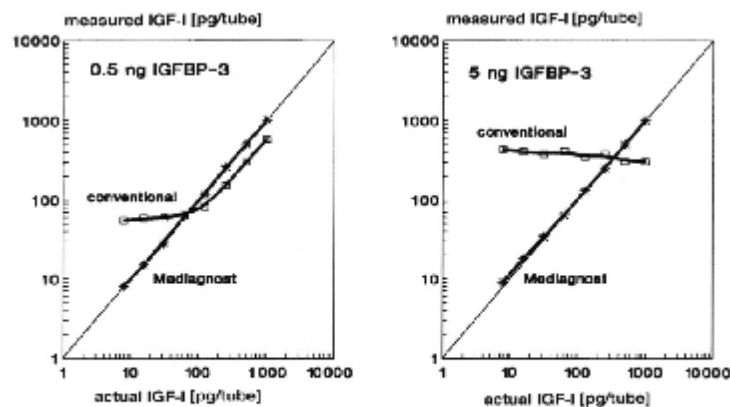


Figure 1: Interference of IGF-BP in IGF-I measurements. Known concentrations of IGF-I were assayed in the presence of 0.5 ng (left) or 5 ng (right) hIGFBP-3 by a conventional (○) and by the IGF-BP-blocked RIA (●).

Therefore, various techniques were applied to physically separate IGF-I from its binding proteins before measurement, including (a) size exclusion chromatography under acidic conditions, (b) solid-phase extraction and (c) acid-ethanol extraction (2,12,13). These techniques, however, are either inconvenient or time-consuming or give incomplete and not-reproducible recoveries. The most widely used method is the acid-ethanol extraction (13,14) with a recovery of only 70-80 % of IGF-BP-bound IGF-I as a result of co-precipitation. The absolute results of such an extraction are therefore false low (15). The extraction removes the IGF-BPs only insufficiently and leads to reduction in sensitivity of the assay due to pre-dilution of the samples by the extraction procedure. Furthermore, the remaining IGF-BP may still interfere in the assay. In addition, the acid-ethanol extraction is ineffective in specimens other than serum or plasma (e.g. cell culture media), in which determination of IGF-I is already difficult enough due to the fact that IGF-BPs are frequently present at large excess. To avoid these difficulties, an uncomplicated assay was developed, in which special sample preparation is not required before measurement.

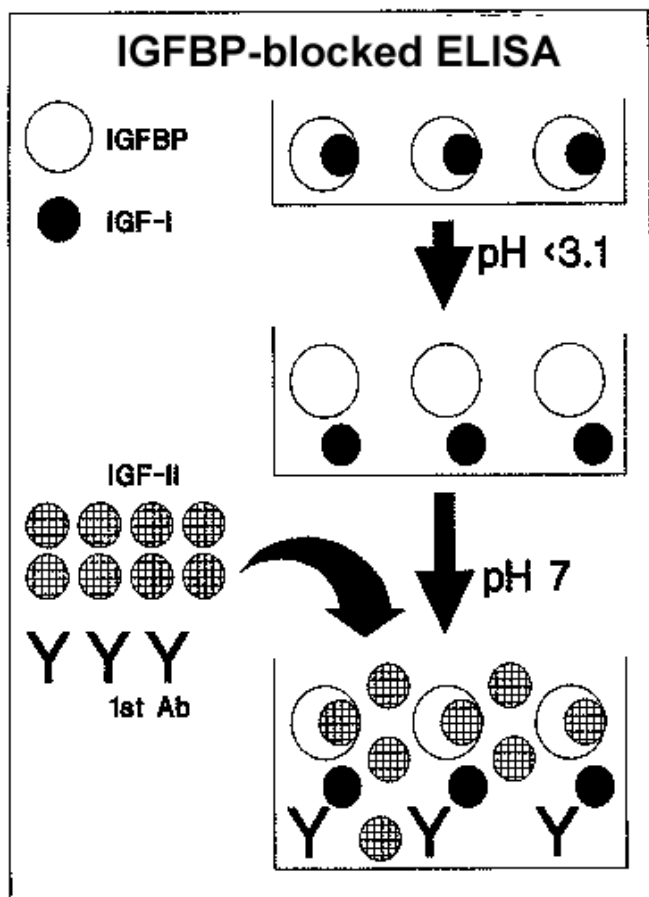
Clinical Significance

There are apart from GH, a number of variables that influence serum IGF-I. Decreased levels are found in states of malnutrition/ malabsorption, hypothyroidism, liver disease, untreated diabetes mellitus, chronic inflammatory disease (1,6), malignant disease or polytrauma. High levels, on the other hand, are likely to be present in precocious puberty or obesity. Crucially important to the correct interpretation of IGF-I measurement is the relationship between age and IGF-I levels (see Table 2 and Fig.: 4-6).

Due to its GH-dependence, determination of serum IGF-I was shown to be a useful tool in diagnosis of growth disorders, especially with regard to GH deficiency (GHD) or acromegaly (6,16-19,23,24). The major advantage of IGF-I determination compared to GH determination is its stable circadian concentration; therefore a single measurement is sufficient. Hence IGF-I determination should be the first in a series of laboratory test. Clearly normal levels would then rule out disturbances of the GH-IGF-I-axis. Low levels, i.e. close to or below the age-related 5th percentile would indicate the necessity of further diagnostic efforts. Subnormal levels of IGF-I would be evidence for reduced GH secretion, if other causes of low serum IGF-I (e.g. malnutrition or impaired liver function) can be ruled out. For differentiation of healthy short children without GH deficiency and children with "classical" GH deficiency, the 0.1st percentile proved to be an appropriate cut-off point, especially after the age of eight. However, IGF-I levels of short children not suffering from GHD may nevertheless lay between the 0.1st and 5th percentile (19). In contrast, acromegaly is characterized by pathologically elevated IGF-I levels, which apparently reflect the severity of the disease better than GH-levels (17,18,20).

3 PRINCIPLE

The Mediagnost ELISA for IGF-I E20 is a so-called Sandwich-Assay. It utilizes two specific and high affinity antibodies for this protein. The IGF-I in the sample binds to the immobilized first antibody on the microtiter plate, the biotinylated and Streptavidin-Peroxidase conjugated second



specific anti-IGF-I-Antibody binds in turn to the immobilized IGF-I. In the closing substrate reaction the turn of the colour will be high specific catalysed, quantitatively depending on the IGF-I-level of the samples.

In order to dissociate IGF-I from the IGFBPs, the samples must be diluted in an acidic buffer (**Sample Buffer PP**) (Figure 2). The diluted samples are then pipetted into the wells, by this the pH-value will be neutralized. After neutralization of the samples, the excess IGF-II occupies the IGF-binding sites of the binding proteins, thus allowing the measurement of resulting free IGF-I. With this method, the IGFBPs are not removed, but their function and therefore their interference in the assay is neutralized. Due to the extremely low cross-reactivity of the IGF-I antibody with IGF-II, the excess of IGF-II does not disturb the interaction with IGF-I.

The test runs like a conventional ELISA using a Streptavidin-Peroxidase-Enzyme Conjugate.

Figure 2 Principle of the IGFBP blocked IGF-I ELISA

4 WARNINGS AND PRECAUTIONS

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

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

Caution: This kit contains material of human and/or animal origin. Therefore all components and patient's specimens should be treated as potentially infectious.

Do not use obvious damaged or microbial contaminated or spilled material.

Appropriate precautions and good laboratory practices must be used in the storage, handling and disposal of the kit reagents. The disposal of the kit components must be made according to the local regulations.

Human Serum

Following components contain human serum: **Control Serum KS1 and KS2**

Source human serum for the control sera provided in this kit was tested and found non-reactive for Hepatitis-B surface antigen (HBsAg), Hepatitis C virus (HCV), and Human Immunodeficiency Virus 1 and 2 (HIV). No known methods can offer total security of the absence of infectious agents; therefore all components and patient's specimens should be treated as potentially infectious.

Reagents A-E, AK, EK, VP, WP

Contain as preservative a mixture of **5-chloro-2-methyl-4-isothiazolin-3-one and 2-methyl-4-isothiazolin-3-one** (<0.015%)

H317	May cause an allergic skin reaction.
P280	Wear protective gloves/ protective clothing/ eye protection/ face protection.
P272	Contaminated work clothing should not be allowed out of the workplace.
P261	Avoid breathing dust/ fume/ gas/ mist/ vapours/ spray.
P333+P313	If skin irritation or rash occurs: Get medical advice/ attention.
P302+P352	IF ON SKIN: Wash with plenty of soap and water.
P501	Dispose of contents/ container in accordance with local/ regional/ national/ international regulations.

Substrate Solution (S)

The TMB-Substrate (S) contains 3,3',5,5' Tetramethylbencidine (<0.05%)

H315	Causes skin irritation.
H319	Causes serious eye irritation.
H335	May cause respiratory irritation.
P261	Avoid breathing dust/ fume/ gas/ mist/ vapours/ spray.
P305+P351+	IF IN EYES: Rinse cautiously with water for several minutes.
P338	Remove contact lenses, if present and easy to do. Continue rinsing.

Stopping Solution (SL)

The Stopping solution contains 0.2 M acid sulphur acid (H₂SO₄)

H290	May be corrosive to metals.
H314	Causes severe skin burns and eye damage.
P280	Wear protective gloves/ protective clothing/ eye protection/ face protection.
P301+P330+	IF SWALLOWED: rinse mouth.
P331	Do NOT induce vomiting.
P305+P351+	IF IN EYES: Rinse cautiously with water for several minutes.
P338	Remove contact lenses, if present and easy to do. Continue rinsing.
P309+P310	IF exposed or if you feel unwell: Immediately call a POISON CENTER or doctor/physician.

1.1 General first aid procedures:

Skin contact: Wash affected area rinse immediately with plenty of water at least 15 minutes. Remove contaminated cloths and shoes.

Eye contact: In case of contact with eyes, rinse immediately with plenty of water at least 15 minutes. In order to assure an effectual rinsing spread the eyelids.

Ingestion: After swallowing the product, if the affected person is conscious, rinse out the mouth with plenty of water: seek medical advice immediately.

5 SAMPLES

5.1 Sample type

Serum and Plasma

Serum and Heparin/EDTA Plasma yield comparable values. The IGF-I levels are reduced in citrate plasma samples, because of the relatively high amount of anticoagulant.

5.2 Specimen collection

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

5.3 Required sample volume: 10 µL

5.4 Sample stability

In firmly closable sample vials

- Storage at 20-25°C: max. 24 hours
- Storage at -20° C: min. 2 years
- Freeze-thaw cycles max. 3

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

5.5 Interference

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

5.6 Sample dilution

- Dilution: **1:21** with Sample Buffer **PP**
- Pipette **200 µL Sample Buffer PP** in PE-/PP-Tube (application of a multi-stepper is recommended in larger series); add **10 µL sample** (dilution 1:21). After mixing use 2 x 20 µL of this dilution in the assay.
- Attention: serum and plasma samples must be diluted at least 1:10 in **Sample Buffer PP** in order to achieve sufficient acidification of the samples.
- Depending on the expected IGF-I values the samples can be diluted higher in **Sample Buffer PP**.
- Sample stability after dilution of the sample: maximum 2 hours at 20-25°C.

6 MATERIALS

6.1 Materials provided

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

MTP	Microtiter plate , ready for use, coated with mouse-anti-hIGF-I-antibody. Wells are separately breakable.	(8x12) wells
A-E	Standards , lyophilized, (recombinant human hIGF-I), concentrations are given on vial labels and on quality certificate.	5 x 500 µL
KS1	Control Serum 1 , lyophilised, (human serum), concentration is given on quality certificate.	1 x 500 µL
KS2	Control Serum 2 , lyophilised, (human serum), concentration is given on quality certificate.	1 x 500 µL
AK	Antibody Conjugate , ready for use, contains goat biotinylated anti-hIGF-I antibody.	1 x 9 mL
EK	Enzyme Conjugate , ready for use, contains HRP (Horseradish-Peroxidase)-labelled Streptavidin.	1 x 12 mL
PP	Sample Buffer , ready for use.	1 x 25 mL
WP	Washing Buffer , 20-fold concentrated solution	1 x 50 mL
S	Substrate , ready for use, horseradish-peroxidase-(HRP) substrate, stabilised Tetramethylbencidine.	1 x 12 mL
SL	Stopping Solution , ready for use, 0.2 M sulphuric acid.	1 x 12 mL
-	Sealing Tape , for covering the microtiter plate .	2 x
	Instructions for use	1 x
--	Quality Certificate	1 x

6.2 Materials required, but not provided

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

7 TECHNICAL NOTES

Storage Conditions

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

Storage Life

The shelf life of the components **after initial opening** is warranted for **4 weeks**, store the unused strips and microtiter wells **airtight** together with the desiccant at 2-8°C in the clip-lock bag, use in the frame provided. The **reconstituted components** standards **A-E** and Control Sera **KS1** and **KS2** must be stored at -20°C (max. 4 weeks). For further use, thaw quickly but gently (avoid temperature increase above room temperature and avoid excessive vortexing). Up to 3 of the freeze-thaw cycles did not influence the assay. The 1:20 diluted Washing Buffer **WP** is 4 weeks stable at 2-8°C

Preparation of reagents

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

Reconstitution

The Standards **A – E** and Control **KS1** and **KS2** are reconstituted with the Sample Buffer **PP**. It is recommended to keep reconstituted reagents at room temperature for 15 minutes and then to mix them thoroughly but gently (no foam should result) with a Vortex mixer.

Dilution

After reconstitution dilute the Control **KS1** and **KS2** with the Sample Buffer **PP** in the same ratio (1:21) as the sample. The required volume of Washing Buffer **WP** is prepared by 1:20 dilution of the provided 20fold concentrate with Aqua dest.

Assay Procedure

When performing the assay, Blank, Standards **A-E**, Controls **KS1** and **KS2** and the samples should be pipette as fast as possible (e.g. <15 minutes). To avoid distortions due to differences in incubation times, Antibody Conjugate **AK** and the Enzyme Conjugate **EK** as well as the succeeding Substrate Solution **S** should be added to the plate in the same order and in the same time interval as the samples. Stopping Solution **SL** should be added to the plate in the same order as Substrate Solution **S**.

All determinations (Blank, Standards **A-E**, Control **KS1** and **KS2** and samples) should be assayed in duplicate. For optimal results, accurate pipetting and adherence to the protocol are recommended.

Incubation

Incubation at room temperature means: Incubation at 20 - 25°C. The Substrate Solution **S**, stabilised Tetramethylbencidine, is photosensitive—storage and incubation in the dark.

Shaking

The incubation steps should be performed at mean rotation frequency of a microtiter plate shaker. We recommend 350 rpm. Depending on the design of the shaker, the shaking frequency should be adjusted. Insufficient shaking may lead to inadequate mixing of the solutions and thereby to low optical densities, high variations and/ or false values, excessive shaking may result in high optical densities and/ or false values.

Washing

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

All washing must be performed with the provided Washing Buffer **WP** diluted to usage concentration. Washing volume per washing cycle and well must be 300 µL at least.

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

Manual washing is an adequate alternative option. Washing Buffer may be dispensed via a multistepper device, a multichannel pipette, or a squirt bottle. The fluid may be removed by dynamical swinging out the microtiter plate over a basin. If aspirating devices are used, care has to be taken that the inside well surface is not scratched. Subsequent to every single washing step, the remaining fluid should be removed by inverting the plate and repeatedly tapping it dry on non-fuzzy absorbent tissue.

8 ASSAY PROCEDURE

Preparation of reagents		Reconstitution:	Dilution
A-E	Standards	in 500 µL Sample Buffer PP	-
KS1	Control Serum 1	in 500 µL Sample Buffer PP	1:21 with Sample Buffer PP
KS2	Control Serum 2	in 500 µL Sample Buffer PP	1:21 with Sample Buffer PP
WP	Washing Buffer	-	1:20 with Aqua dest.
Sample + Control Sera KS1 and KS2: dilute 1:21 in Sample Buffer PP, mix immediately, incubate max. 2h. Use 20 µl for each well in the assay.			
Before assay procedure bring all reagents to room temperature (20-25°C).			
Assay procedure in double determination			
Pipette	Reagents		Position
80 µL	Antibody Conjugate AK		in <u>all</u> wells used
20 µL	Sample Buffer PP (Blank)		A1/A2
20 µL	Standard A (2 ng/mL)		B1/B2
20 µL	Standard B (5 ng/mL)		C1/C2
20 µL	Standard C (15 ng/mL)		D1/D2
20 µL	Standard D (30 ng/mL)		E1/E2
20 µL	Standard E (50 ng/mL)		F1/F2
20 µL	Control Serum KS1	(1:21 diluted)	G1/G2
20 µL	Control Serum KS2	(1:21 diluted)	H1/H2
20 µL	Sample	(1:21 diluted)	in the rest of the wells according the requirements
Cover the wells with the sealing tape.			
Sample-Incubation: 1 h at 20-25°C, 350 rpm			
5x 300 µL	Aspirate the contents of the wells and wash 5 x with 300 µL each Washing Buffer WP/ well		In each well
100 µL	Enzyme Conjugate EK		In each well
Cover the wells with the sealing tape.			
Incubation: 30 Minutes at 20-25°C, 350 rpm			
5x 300 µL	Aspirate the contents of the wells and wash 5 x with 300 µL each Washing Buffer WP/ well		In each well
100 µL	Substrate Solution S		In each well
Incubation: 15 Minutes in the Dark at 20-25°C			
100 µL	Stopping Solution SL		In each well
Measure the absorbance within 30 min at 450 nm with ≥ 590 nm as reference wavelength.			

9 QUALITY CONTROL

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

9.1 Quality criteria

For the evaluation of the assay it is required that the absorbance values of the blank should be below 0.25, and the absorbance of standard E should be above 1.00.

Samples, which yield higher absorbance values than **Standard E**, should be re-tested with a higher dilution.

10 EVALUATION OF RESULTS

IGF-I levels are highly age-dependent in children, less so in adults until the age of about 60. The normal ranges in various age groups, which are log-normally distributed, are given in Table 2 by percentiles. Between 8 and 19 years of age, values are given for boys and girls separately, because the pubertal peak usually occurs approximately 2 years earlier in girls. A graphic presentation is shown in Figures 4, 5 and 6. A major problem for the interpretation of IGF-I values arises from the fact that short stature is often due to developmental delay rather than any metabolic or endocrine disorder (constitutional delay of growth and adolescence). The sharp rise in IGF-I levels during puberty may therefore cause some uncertainty as to whether or not it would be appropriate to relate measured values to chronological age. It is recommended to take the pubertal stage into account (Table 1) to get a more complete picture of this situation.

10.1 Establishing of the standard curve

The International Standard for hIGF-I, WHO NIBSC Code 02/254 was used as standard material and the following IGF-I concentrations are used.

Standard	A	B	C	D	E
ng/mL	2	5	15	30	50
nmol/L	0.26	0.66	1.96	3.92	6.54

- 1) Calculate the **mean absorbance** value for the blank from the duplicated determination (well A1/A2).
- 2) Subtract the mean absorbance of the blank from the mean absorbances of all other samples and standards
- 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, because the curve is in general (without respective transformation) not ideally described by linear regression. **A higher-grade polynomial, or four parametric logistic (4-PL) curve fit or non-linear regression** are usually suitable for the evaluation (as might be spline or point-to-point alignment in individual cases).
- 5) The IGF-I concentration in ng/mL of the samples can be calculated by **multiplication** with the respective **dilution factor**.

10.2 Example of a typical standard curve

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

	Blank	A	B	C	D	E
ng/mL	0.0	2	5	15	30	50
OD _(450-620 nm)	0.00	0.088	0.299	0.985	1.727	2.543

The exemplary shown standard curve in Figure 3 **cannot** be used for calculation of your test results. You have to establish a standard curve for each test you conduct!

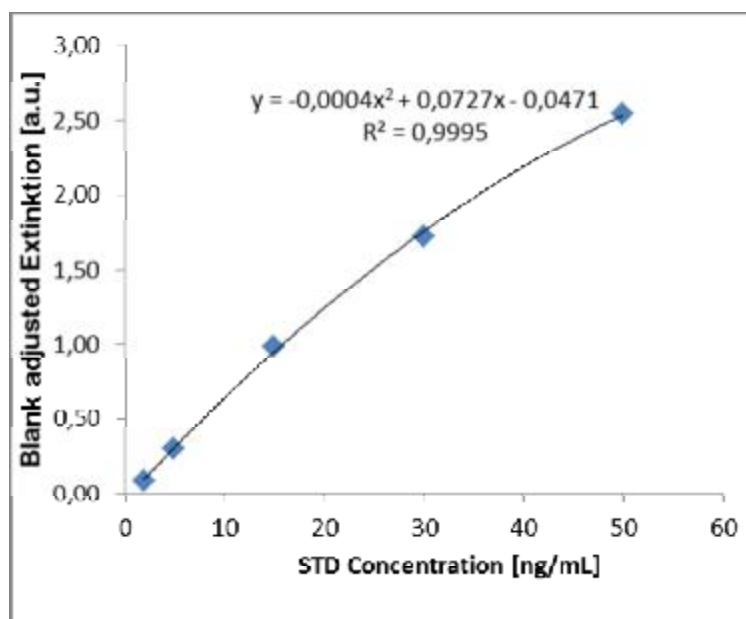


Figure 3 Exemplary standard curve

10.3 Exemplary calculation of IGF-I concentrations

Sample dilution: 1:21

Measured extinction of the blank	0.0165
Measured extinction of your sample	0.2695

Your measurement program will calculate the IGF-I concentration of the diluted sample automatically by using the difference of sample and blank for the calculation. You only have to determine the most suitable curve fit.

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

$$0.253 = -0.0004x^2 + 0.0727x - 0.0471$$
$$4.57 = x$$

If the dilution factor (1:21) is taken into account the **IGF-I** concentration of the undiluted sample is

$$4.57 \text{ ng/mL} \times 21 = 96 \text{ ng/mL}$$

10.4 Interpretation of results

The test results should not be the only base for therapeutic decisions. The results should be interpreted in regard to anamnesis, further clinical observations and results of other diagnostic investigations. Further, it is recommended to establish reference and cut-off values corresponding to the relevant group of patients for each laboratory. Please consider the international and national guidelines for diagnosis and treatment of growth hormone deficiency / acromegaly.

11 LIMITATIONS OF PROCEDURE

IGF-I levels depend to a great degree on GH secretion. Diminished IGF-I values, however, do not prove GH deficiency, because a number of other factors can influence the plasma concentration of IGF-I and must therefore be taken into account in order to make a correct interpretation. IGF-I levels decrease during fasting (more than 1 day), as a result of malnutrition, malabsorption, cachexia, impaired hepatic function, or in hypothyroidism and untreated diabetes mellitus. They may also be low in chronic inflammatory disease and malignancies. IGF-I levels are high in states of accelerated sexual development. In clinical situations with hyperprolactinemia or in patients with craniopharyngioma, normal levels may be observed despite GH deficiency. In late pregnancy, IGF-I levels are moderately elevated.

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

12 REFERENCE VALUES

IGF-I levels are highly age-dependent in children, less so in adults until the age of about 60. The normal ranges in various age groups, which are log-normally distributed, are given in Table 2 by percentiles. These values are given only for guidance; each laboratory should establish its own reference of values for the diagnostic evaluation of patient results.

Between 8 and 19 years of age, values are given for boys and girls separately, because the pubertal peak usually occurs approximately 2 years earlier in girls. A graphic presentation is shown in Figures 4, 5 and 6. A major problem for the interpretation of IGF-I values arises from the fact that short stature is often due to developmental delay rather than any metabolic or endocrine disorder (constitutional delay of growth and adolescence). The sharp rise in IGF-I levels during puberty may therefore cause some uncertainty as to whether or not it would be appropriate to relate measured values to chronological age. It is recommended to take the pubertal stage into account (Table 1) get a more complete picture of this situation.

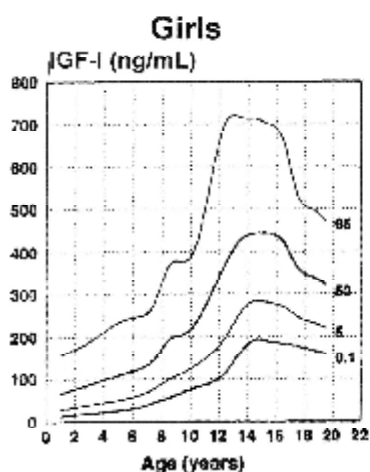


Fig. 4.: Age-dependent reference range of serum IGF-I levels in girls.

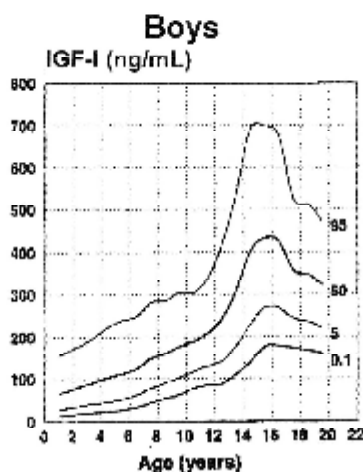


Fig. 5.: Age-dependent reference range of serum IGF-I levels in boys.

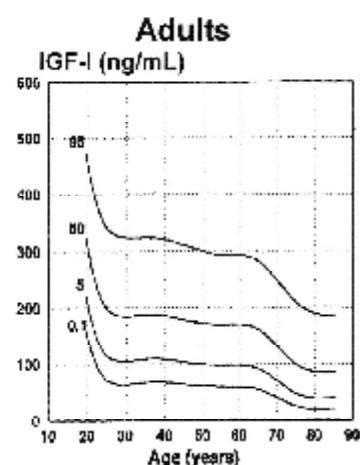


Fig. 6.: Age-dependent reference range of serum IGF-I levels in adults.

Table 1 Normal range of serum IGF-I levels given in ng/mL at different pubertal stages according to Tanner. Because no significant difference between boys and girls is observed, both sexes are combined. Only children and adolescents between 7 and 17 years of age are included.

Pubertal Stage	Percentile			
	0.1th	5th	50th	95th
1	61	105	186	330
2	85	156	298	568
3	113	196	352	631
4	171	268	431	693
5	165	263	431	706

Table 2 Serum levels of IGF-I in healthy subjects at various ages. Individuals between 8 and 19 years of age were classified according to gender, as the pubertal peak occurs almost 2 years earlier in girls than in boys.

Age	Percentile													
	0.1	1	5	10	20	30	40	50	60	70	80	90	95	99
0-2 y.	13	20	28	34	43	50	58	66	75	87	102	128	156	220
2-4 y.	20	29	40	48	59	68	77	87	98	111	129	159	189	260
4-6 y.	26	36	50	59	73	85	96	108	122	138	160	196	233	320
6-7 y.	34	46	62	72	87	99	111	124	138	155	176	212	248	332
7-8 y.	45	60	78	90	107	121	134	148	163	181	205	243	281	364
8-9 y. boys	54	71	90	102	119	133	146	160	175	192	214	250	284	362
girls	55	75	99	115	137	156	174	193	214	239	271	324	376	496
9-10 y. boys	63	82	102	115	133	148	162	176	191	209	232	269	304	379
girls	68	89	114	130	152	170	187	205	224	247	276	323	369	469
10-11 y. boys	77	96	117	130	148	162	176	189	203	220	241	274	305	370
girls	81	106	134	153	178	199	219	239	261	287	321	374	426	539
11-12 y. boys	85	106	129	144	163	179	194	209	225	244	267	304	339	413
girls	91	123	160	185	220	248	276	305	337	374	424	503	581	758
12-13 y. boys	88	112	141	159	184	204	223	243	264	289	321	371	419	525
girls	116	155	201	231	274	309	342	377	415	460	519	614	707	914
13-14 y. boys	111	143	179	203	235	261	286	311	339	371	412	477	540	677
girls	163	207	256	287	329	364	395	428	463	504	556	637	716	884
14-15 y. boys	140	182	229	260	303	337	370	404	441	484	539	625	691	896
girls	193	236	284	314	353	385	414	443	474	510	556	628	713	832
15-16 y. boys	176	221	269	299	340	372	402	433	466	504	552	626	697	849
girls	187	231	279	309	350	382	412	442	474	512	559	632	700	845
16-17 y. boys	178	221	267	296	335	366	395	424	455	491	537	607	673	814
girls	183	225	270	298	336	366	394	422	452	486	530	597	660	792
17-18 y. boys	173	207	243	265	294	317	337	358	380	405	436	484	527	618
girls	176	210	246	268	297	320	341	362	384	409	441	488	533	624
18-19 y. boys	167	201	235	256	285	307	327	347	368	393	423	469	512	600
girls	167	199	233	254	281	302	322	341	362	385	414	458	499	583
19-20 y.	158	189	220	240	265	285	304	322	341	363	391	433	471	550
20-30 y.	72	92	115	130	150	167	182	198	215	235	261	302	340	425
30-40 y.	68	87	109	123	142	158	173	188	204	223	248	287	324	404
40-50 y.	64	82	103	116	135	150	164	178	194	212	235	272	310	385
50-60 y.	60	77	97	110	127	142	155	169	184	201	224	260	292	369
60-70 y.	55	72	91	103	120	134	147	161	176	193	215	251	282	362
70-80 y.	25	35	47	55	67	78	88	98	110	124	142	173	207	276
>80 y.	21	30	40	47	58	67	76	85	95	108	125	153	184	245

Serum concentrations are given in ng/ml.

Reference values have been evaluated by Prof Blum by a radioimmunoassay identical to Mediagnost IGF-R20. Thus, the age and sex specific reference values published in Diagnostics of Endocrine Function in Children and Adolescents (Edited by Prof Ranke. ISBN-3-335-00496-5) can be applied to all Mediagnost IGF-I assays. Generally, a standard deviation score of +/-2SDS is acknowledged as pathological and should initiate further investigations regarding clinical symptoms.

13 PERFORMANCE CHARACTERISTICS

13.1 Sensitivity

Sensitivity was assessed by measuring the blank and calculating the theoretical concentration of the blank + 2SD. The analytical sensitivity of the Mediagnost E20 is 0.091 ng/mL as mean, in 19 independent determinations values from 0.03 ng/mL to 0.2 ng/mL were found.

13.2 Specificity

The measurements of E20 cross reactivity with IGF-II, Insulin and C-Peptide. These IGF-related proteins were added to assay buffer in the indicated concentration and the solution was applied as sample without any further dilution. The concentration measured within the blank without any protein was 0.78 µg/L. Thus, neither IGF-II nor Insulin or C-Peptide are measured by the Mediagnost E20 ELISA (see table 3).

Table 3 Specificity. Cross reactivity of the test system with different IGF-I related proteins.

added C-Peptide [µg/L]	measured IGF-I [µg/L]	added Insulin [µg/L]	measured IGF-I [µg/L]	added IGF-II [µg/L]	measured IGF-I [µg/L]
500	0.73	100	0.78	1250	0.77
100	0.78	10	0.77	750	0.73
10	0.77	1	0.76	250	0.77
0	0.78	0	0.78	0	0.78

13.3 Precision

Intra-Assay Variance

Three samples have been measured six to 18 times in the same assay. The results are shown in Table 4. The measured coefficient of variation (CV) is 5.81% on average.

Table 4 Intra-Assay variability

	Number of determinations	Mean value (ng/mL)	Standard deviation (ng/mL)	VC (%)
Sample 1	18	144.8	9.63	6.65
Sample 2	18	140.79	7.15	5.08
Sample 3	18	138.02	7.86	5.69

Inter-Assay and Lot-to-Lot Variance

Serum samples were measured in independent assays. Exemplary results are shown in table 5. Further, five samples were also tested repeatedly four years in eight different lots. The variability on average is 8.57% (6.8 – 10.5%).

Table 5 Inter-Assay variability

	Number of determinations	Mean value [ng/mL]	Standard deviation [ng/mL]	VC [%]
Sample 1	8	81	5.34	6.56
Sample 2	16	192	12.38	6.43
Sample 3	17	498	27.52	5.53

13.4 Linearity

Linearity was tested by dilution of native sera with different IGF-I contents (Sample 1-3). The amount of measured IGF-I was recalculated and is shown in Figure 7.

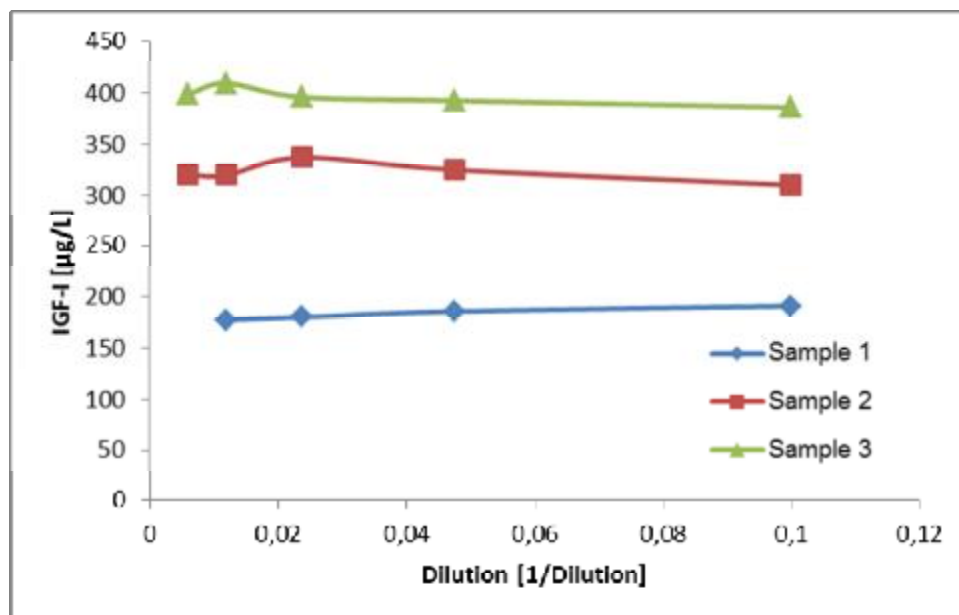


Figure 7 Linearity, recalculated IGF-I concentrations of differentially diluted samples. The minimal dilution is 1:10, the recommended dilution is 1:21.

13.5 Recovery and Accuracy

Recombinant IGF-I was added in different amounts to human serum. The IGF-I content of the so enriched samples was measured and recovery in comparison to enriched buffer calculated. Results are shown in Table 6.

Table 6 Recovery of recombinant IGF-I in human serum

IGF-I [µg/L]	Sample 1	Sample 2	Sample 3	Sample 4
Sample	138	172	133	180
+ IGF-I 200	287	372	-	-
+ IGF-I 400	-	-	539	591
% Recovery	85	100	101	102

13.6 Trueness / Assay Calibration

Recombinant IGF-I produced by E. coli and of >98% purity (SDS-PAGE, Silverstain) is used as calibrator within the assay. The traceability of this recombinant calibration material to the international reference material of the WHO 02/254 has been proven. Results are published by Burns C et al. in Growth Horm IGF Res. 2009 Oct;19(5):457-62. Epub 2009 Mar 20. Mediagnost E20 ELISA is coded by 14c.

The reference material includes **8.5 µg/ampoule** IGF-I measured by amino acid analysis and HPLC. Mediagnost E20 immunoassay (assay No. 14c) measures **11.55 µg/ampoule**. The mean of all tested immunoassays is 11.61 µg/ampoule.

Thus, Mediagnost results are comparable to other immunological tests for measurement of IGF-I and can easily be transformed to WHO 02/254 by a factor of **0.735**.

13.7 Interference

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

Table 7 Interference of physiologic substances on IGF-I measurement. Human serum samples were enriched with different amounts of triglycerides, bilirubin or hemoglobin and the recovery of IGF-I was measured. Here the relative recovery in [%] of not enriched samples is shown.

	Triglyceride 100 mg/mL	Bilirubin 200 µg/mL	Hemoglobin 10 mg/ml
Serum 1	93	90	97
Serum 2	100	101	110
Serum 3	120	120	104

Influence of binding proteins on IGF-I measurement was exemplarily elucidated with IGFBP-3.

Different amounts of IGF-I and 3 or 6 mg/L of IGFBP-3 were added to sample buffer (pH 2) and phosphate based saline buffer (pH 7.4). After a short incubation of 15 minutes at room temperature these samples were diluted and applied to the Mediagnost E20 as described in the package insert. In case of sample buffer IGFBP-3 up to 6 mg/L did not interfere with IGF-I measurement. But without acidification of the sample a strong interference of IGFBP-3 with IGF-I measurement was detected (Table 8).

Table 8 Interference of IGFBP-3 with IGF-I measurement

IGFBP-3	Sample Buffer		
	50 µg/L IGF-I	100 µg/L IGF-I	300 µg/L IGF-I
-	46.38	116.14	358.1
3 mg/L	47.33	115.83	384.15
6 mg/L	52.32	123.38	355.41
IGFBP-3	Phosphate buffered Saline		
	50 µg/L IGF-I	100 µg/L IGF-I	300 µg/L IGF-I
-	34.2	90.23	349.04
3 mg/L	7.4	12.16	152.14
6 mg/L	7.2	10.12	48.15

14 ASSAY COMPARISON

Mediagnost E20 IGF-I was compared with the Mediagnost R20 IGF-I. 196 serum samples were measured in both assays and an excellent coefficient of correlation was shown with $r = 0.95$. Additionally, the Mediagnost IGF-I ELISA E20 was compared with an Enzyme-Immunoassay of other commercially available IGF-I test and a correlation of $R^2 > 0.9$ was shown.

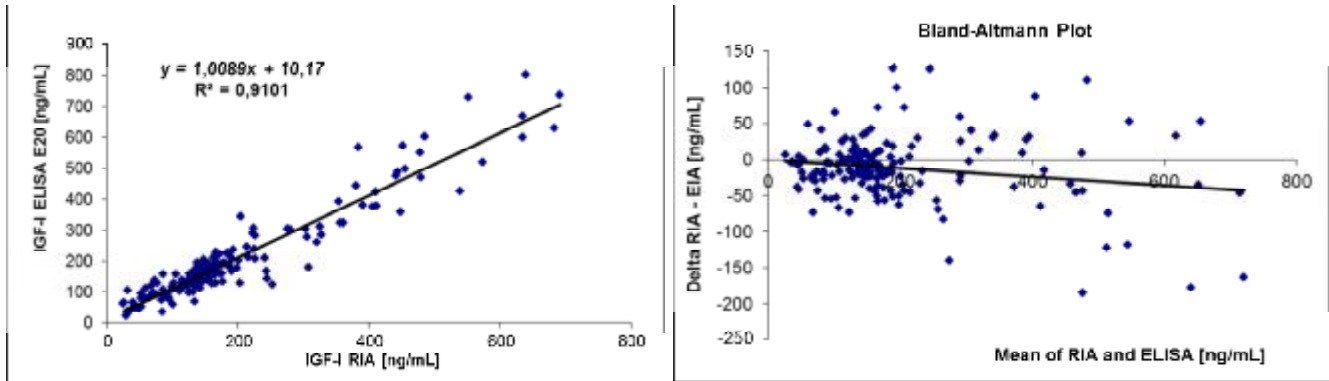


Figure 8 Assay Comparison Mediagnost RIA R20 and Mediagnost ELISA E20

Instructions for use for scientific application

15 SCIENTIFIC APPLICATION

IGF-I is present in low concentrations in various body fluids and in conditioned cell culture media of many cell lines. However, the determination of IGF-I in these specimens is particularly difficult due to the presence of IGFBPs usually in excessive amounts. The IGFBP-blocked IGF-I ELISA avoids these problems and allows the simple, correct and sensitive IGF-I determination in numerous samples with minimal expenditure of time.

15.1 Samples suitable for scientific application

Serum, plasma, cerebrospinal and urine samples, as well as in cell culture media. The IGF-I levels can vary considerably, the optimal dilution must be found out by the customer. Recombinant IGF-I could be measured in **1:2 in Sample Puffer PP diluted urine, cerebrospinal fluid and in cell culture media**, if species cross reactivity was taken into account (FCS supplemented media).

Measurement of IGF-I in cell lysates is possible. A suitable lysis buffer might be: 10 mM Tris/ 5 mM EDTA/ 50 mM NaCl/ 30 mM Sodium Pyrophosphate/ 50mM Sodium Fluoride/ 100 µM Sodium Orthovanadate/ 1 mM PMSF/ 1% Triton X-100.

But the amount of intracellular IGF-I is also crucial: if it is too low (0.09 ng/mL or 0.9 ng/mL in case of 1:10 dilution), the sensitivity of the assay might not be sufficient.

The measurement must be validated for each different tissue as well as for each different cell line. If there is no IGFBP expression in the respective tissue or cell line, the dilution might be skipped and the cell lysate can be used as sample. For method validation we recommend to use recombinant IGF-I and the lysis buffer as well as some cell lysate for recovery experiments. A reference publication measuring IGF-II in cell lysate and cell culture supernatant is available: Mohlin S, Hamidian A, Pählman in NEOPLASIA, 2013, Volume 15 No 3.

15.2 Cross reactions with animal samples

Several commercially available animal sera have been used as samples in this assay and therewith it is proven, that the test can be used as heterologous assay for IGF-I measurement in serum samples of primates, cattle, pig, sheep, horse, donkey, goat, dog, cat, rabbit and guinea pig. For the determination of IGF-I in chicken, rat and mouse sera is this kit not usable.

Species specific calibration has to be done by the user.

To determine exact species-specific IGF-I concentrations, the test system must be calibrated respectively: for example, using bovine IGF-I in a known concentration.

16 LITERATUR / REFERENCES

- 1) Baxter RC. 1986 The somatomedins: insulin-like growth factors. *Adv Clin Chem.*25:49-115
- 2) Daughaday WH, Rotwein P. 1989 Insulin-like growth factors I and II. Peptide, messenger ribonucleic acid and gene structures, serum, and tissue concentrations. *Endocr Rev.* 10:68-91
- 3) Spencer EM (Ed.) 1991 *Modern Concepts of Insulin-Like Growth Factors*. New York: Elsevier.
- 4) Klapper DG, Svoboda ME, Van Wyk JJ. 1983 Sequence analysis of somatomedin-C: confirmation of identity with insulin-like growth factor-I. *Endocrinology.* 112:2215-2217.
- 5) Rinderknecht E, Humbel RE. 1978 The amino acid sequence of human insulin-like growth factor I and its structural homology with proinsulin. *J Biol Chem.* 253:2769-2276.
- 6) Clemmons DR, Van Wyk JJ. 1984 Factors controlling blood concentration of somatomedin C. *Clin Endocrinol Metab.* 13:113-143.
- 7) Ballard J, Baxter R, Binoux M, et al. 1989 On the nomenclature of the IGF binding proteins. *Acta Endocrinol (Copenh).* 121:751-752.
- 8) Drop SLS. 1992 Report on the nomenclature of the IGF binding proteins. *J. Clin Endocrinol Metab.* 74:1215-1216.
- 9) Martin JL, Baxter RC. 1986 Insulin-like growth factor binding protein from human plasma. Purification and characterization. *J Biol Chem.* 261:8754-8760.
- 10) Binkert C, Landwehr J, Mary JL, Schwander J, Heinrich G. 1989 Cloning, sequence analysis and expression of a cDNA encoding a novel insulin-like growth factor binding protein (IGFBP-2). *EMBO J.* 8:2497-2502.
- 11) Furlanetto RW, Underwood LE, Van Wyk JJ, D'Ercole AJ. 1977 Estimation of somatomedin-C levels in normals and patients with pituitary disease by radioimmunoassay. *J. Clin Invest.* 60:648-657.
- 12) Daughaday WH, Kapadia M, Mariz I. 1987 Serum somatomedin binding proteins: physiologic significance and interference in radioligand assay. *J Lab Clin Med.* 109:355-363.
- 13) Breier BH, Gallaher BW, Gluckman PD. 1991 Radioimmunoassay for insulin-like growth factor-I: solutions to some potential problems and pitfalls. *J Endocrinol.* 128:347-357.
- 14) Daughaday WH, Mariz IK, Blethen SL. 1980 Inhibition of access of bound somatomedin to membrane receptor and immunobinding sites: a comparison of radioreceptor and radioimmunoassay of somatomedin in native and acid-ethanol-extracted serum. *J Clin Endocrinol Metab.* 51:781-788.
- 15) Ranke MB (ed.): *Diagnostics of Endocrine Function in Children and Adolescents*, Basel, Karger, 2003, pp 166-199
- 16) Rosenfeld RG, Wilson DM, Lee PDK, Hintz RL. 1986 Insulin-like growth factors I and II in evaluation of growth retardation. *J Pediatr.* 109:428-433.
- 17) Clemmons DR, Van-Wyk JJ, Ridgway EC, Kliman B, Kjellberg RN, Underwood LE. 1979 Evaluation of acromegaly by radioimmunoassay of somatomedin-C. *N.Engl J Med.* 301:1138-1142
- 18) Zapf J, Walter H, Froesch ER. 1981 Radioimmunological determination of insulin-like growth factors I and II in normal subjects and in patients with growth disorders and extrapancreatic tumor hypoglycemia. *J Clin Invest.* 68:1321-1330.
- 19) Blum WF. 1992 Insulin-like growth factors and their binding proteins. In: Ranke MB, ed. *Functional Endocrinologic Diagnostics in Children and Adolescence*. Mannheim: J + J Verlag; 102-117.
- 20) Rieu M, Girard F, Bricaire H, Binoux M. 1982 The importance of insulin-like growth factor (somatomedin) measurements in the diagnosis and surveillance of acromegaly. *J Clin Endocrinol Metab.* 55:147-153.
- 21) Blum WF, Ranke MB, Bierich JR. 1988 A specific radioimmunoassay for insulin-like growth factor II: the interference of IGF binding proteins can be blocked by excess IGF-I. *Acta Endocrinol (Copenh).*118:374-380.

- 22) Wilson EM, Oh Y, Rosenfeld RG (1997) Generation and characterization of an IGFBP-7 antibody: Identification of 31 kD IGFBP-7 in human biological fluids and Hs578T human breast cancer conditioned media. J Clin Endocrinol Metab Vol 82, 4:1301-1303
- 23) 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. Horm Res 54:60-68
- 24) 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. Horm Res 55:155-124
- 25) Address NIBSC:Blance Lane, South Mimms, Potters Bar, Hertford EN 6 3 QG, Great Britain
- 26) Burns C, Rigsby P, Moore M, Rafferty B. (2009) The first International Standard for Insulin-like Growth Factor-1 (IGF-1) for immunoassay: Preparation and calibration in an international collaborative study. Growth Hormone & IGF Research (2009)
- 27) Blum WH, Breier BH (1994) Radioimmunoassays for IGFs and IGFBPs. Growth Regulation 4 (Suppl. 1):11-19
- 28) Ranke MB, Osterziel KJ, Schweitzer R, Schuett B., Weber K., Röbbel P, Vornwald A, Blumenstock G, Elmlinger MB (2003) Reference Levels of Insulin-Like-Growth Factor I in the Serum of Healthy Adults: Comparison of Four Immunoassays. Clin Chem Lab Med Vol 41(10):1329-1334

17 INTERNATIONALE ASSAY DESCRIPTION

A-E	STD	Rec in 500 µL	BUF PP	-
KS1	Control	Rec in 500 µL	BUF PP	1:21 DILU BUF PP
KS2	Control	Rec in 500 µL	BUF PP	1:21 DILU BUF PP
WP	WASHBUF 20x	-		1:20 DILU A. dest.
-	SPE			1:21 DILU BUF PP
-	°C 20-25 °C, 		max. 2 h	
80 µl	Ab AK			A1 - End
20 µl	BUF PP			A1/A2
20 µL	STD A (2 ng/ml)			B1/B2
20 µL	STD B (5 ng/ml)			C1/C2
20 µL	STD C (15 ng/ml)			D1/D2
20 µL	STD D (30 ng/ml)			E1/E2
20 µL	STD E (50 ng/ml)			F1/F2
20 µL	CONTROL KS 1 1:21 DILU BUF PP			G1/G2
20 µL	CONTROL KS 2 1:21 DILU BUF PP			H1/H2
20 µL	SPE 1:21 DILU BUF PP			
TAPE				
 1 h °C 20-25  350 rpm				
5x 300 µL	5x WASHBUF WP			
100 µL	CONJ EK			
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 				
H ₂ SO ₄ SL				
MEASURE				