

# IGFBP-3 ELISA

Enzymimmunoassay für die quantitative Bestimmung von  
**humanem insulinähnlichem Wachstumsfaktor  
Bindungsprotein 3 (IGFBP-3)**

Deutsch

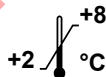
Enzyme Immunoassay for Quantitative Determination of

**human Insulin-like Growth Factor  
Binding Protein 3 (IGFBP-3)**

English

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

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



96 wells



**REF E03A**



**mediagnost®**

Gesellschaft für Forschung und Herstellung von Diagnostika GmbH



: Aspenhastr. 25 • D-72770 Reutlingen / Germany  
Telefon: + 49 - (0) 7121 51484-0 • Fax: + 49 - (0) 7121 51484-10  
E-Mail: [contact@mediagnost.de](mailto: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, sa' respektatji instrukciunile de utilizare/ Upoštevajite navodila za uporabo/ Lue käyttöohje huolellisesti!                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                  |
|    | In vitro Diagnostic Medical Device (for in vitro diagnostic use)/ In-vitro-Diagnostikum (zur In-vitro-Diagnostik)/ Dispositif médical de diagnostic in vitro (Pour usage diagnostique in vitro)/ Dispositivo medico per diagnostica in vitro (per uso diagnostico in vitro)/ Dispositivo médico de diagnóstico in vitro (para uso diagnóstico in vitro)/ Dispositivo Médico para Diagnóstico in vitro (Para Utilização de Diagnóstico in vitro)/ Medisch hulpmiddel voor diagnostiek in vitro (voor diagnostisch gebruik in vitro)/ Medicinsk udstyr til in vitro-diagnostik (Udelukkende til in vitro diagnostisk anvendelse)/ Medicinteknisk produkt avsedd för in vitro-diagnostik (för in vitro-diagnostiskt bruk)/ Wyrób medyczny do diagnostyki in vitro/ In vitro orvosdiagnosztikai termék (in vitro diagnosztikai használatához)/ In vitro diagnostický zdravotnický materiál (určené na diagnostiku „in vitro“)/ In vitro diagnostický zdravotnícký materiál (určeno pro diagnostiku „in vitro“)/ Медицинско устройство за ин-витро диагностика (за ин-витро диагностика)/ in vitro diagnostikaseade (in vitro diagnostika tegemiseks)/ In vitro διαγνωστικό (για διάγνωση in vitro)/ Dispozitiv de diagnosticare in vitro (pentru diagnosticarea in-vitro)/ In vitro diagnostika (o in vitro diagnostiki)/ in vitro-diagnostiikkakäyttö |
|    | Lot-Batch Number/ Charge-Chargennummer/ Lot-Code du lot/ Lotto-Numero di lotto/ Lote-Código de lote/ Lote-Código do Lote/Lot-Partijnummer/ Lot-Batchcode/ Partisatskod/ Numer serii/ Tétel-sarzs szám/ Číslo šarže/ Číslo šarže/ Партиден номер/Partii number/ Παρτίδα-αριθμός παρτίδας/ Lot-număr lot/ Številka serije/ Erä                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                       |
|   | Manufactured by/ Hergestellt von/ Fabriqué par/ Prodotto da/ Fabricado por/ Fabricado por/ Vervaardigd door/ Fabrikation af/ Tillverkad av/ Wyprodukowane przez/ Gyártotta/ Vyrobené/ Vyrobeno v/ Производител/ Tootja/ Κατασκευάζεται από/ Produz 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/ Opbevares mellem/ Förvaras vid/ Przechowywać w/ Tárolási tartomány/ Skladujte v rozsahu / Skladujte v rozmezí/ Температурно ограничение/ Säilätä temperatuuridel/ Φύλαξη σε θερμοκρασία/ Depozitare între/ Skladiščenje med/ Säilytys x-y Celsiusasteen lämpötilassa                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                    |
|  | Contains sufficient for x tests/ Inhalt ausreichend für x Tests/ Contient suffisant pour x tests/ Contenuto sufficiente per x test/ Contenido suficiente para x pruebas/ Conteúdo suficiente para x testes/ Bevat voldoende voor x bepalingen/ Innehåller tillräckligt till 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                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                   |
|  | Mix tubes with a Vortex mixer/ Mix Röhrchen mit Vortex Mixer/ Mélanger à l'aide d'un vortex/ Miscelare la provetta con agitatore Vortex/ Tubos de mezcla con mezclador de vortex/ Misturar os tubos com um agitador Vortex/ buisjes mengen met een Vortex/ Blanderør med Vortex-mixer/ Blanda rören med en vortexblandare/ Miksowanie rurek w mikserze Vortex/ Csővecskék keverése örvénykeverővel/ Premiešat pomocou prístroja Vortex/ Promíchat pomocí přístroje Vortex/ Разбъркване на епруветките с миксер Vortex/ Segada torukesi Vortexi mikseriga/ Αναμίξτε τους σωληνίσκους με αναδευτήρα Vortex/ Amestecati epurubetele cu ajutorul unui agitator vortex/ Mešanje cevčic z mešalnikom Vortex/ Sekoita putket Vortex sekoittajalla                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                         |
|  | Mikrotiterplate/ Mikrotiterplatte/ plaque de microtitrage/ Piastra di microtitolazione/ Placa de microtitulación/ Placa de Microtitulação/ Microtiterplaat/ Mikrotiterplade/ mikrotiterplatta/ microtiterplaat/ Płytko microtiter/ Mikrotiter lap/ Mikrotitračná podložka/ Mikrotitrační podložka/ Микротитърна плака/ Mikrotiterplaat/ Τρυβλίο μικροτιτλοδότησης/ Microplacă/ Mikrotitrská plošča/ Mikrotitrauslevy                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                               |
|  | Reconstitute in/ Rekonstituieren in/ Reconstituer dans/ Ricostituire nel/ Reconstituir en/ Reconstituir em/ Reconstituieren in/ Rekonstituér i/ Rekonstituera/ Rekonstituować w/ Helyreállítás/ Znovu pripravit' za/ Znovu připravit za/ Разтваряне в/ Moodustada uuesti/ Ανασυστήστε σε/ Reconstituire în/ Predelava v/ Rekonstituoi                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                              |



# INHALTSVERZEICHNIS / TABLE OF CONTENTS

|                                                  |    |
|--------------------------------------------------|----|
| 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 .....                       | 15 |
| 13     ASSAY EIGENSCHAFTEN UND VALIDIERUNG ..... | 17 |
| 14     VERGLEICHSTUDIEN .....                    | 19 |
| TABLE OF CONTENTS                                |    |
| ENGLISH    Instructions for use.....             | 21 |
| 15      LITERATUR / REFERENCES.....              | 36 |
| Internationale Assay Description .....           | 40 |

# DEUTSCH      Gebrauchsanweisung

| IGFBP-3 ELISA E03A                            | 96 Bestimmungen                                                                                                                                                                                            |
|-----------------------------------------------|------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|
| CE                                            | DE/CA40/00809/22                                                                                                                                                                                           |
| Testprinzip                                   | Sandwich ELISA                                                                                                                                                                                             |
| Dauer (Inkubationszeit)                       | 2,5 h                                                                                                                                                                                                      |
| Antikörper-POD-Konjugat                       | gebrauchsfertig                                                                                                                                                                                            |
| Puffer & Substrat                             | gebrauchsfertig                                                                                                                                                                                            |
| Standards                                     | 5 Einzelstandards: 0,4 - 30 ng/mL, gefriergetrocknet, humanes IGFBP-3                                                                                                                                      |
| Assay Range                                   | 0,03 – 15150 ng/mL                                                                                                                                                                                         |
| Kontrolle                                     | 2 Kontrollsera, gefriergetrocknet                                                                                                                                                                          |
| Proben                                        | humanes Serum / Plasma                                                                                                                                                                                     |
| Erforderliches Probenvolumen                  | 10 µL                                                                                                                                                                                                      |
| Probenverdünnung                              | 1:505                                                                                                                                                                                                      |
| Analytische Sensitivität                      | 0,03 ng/mL                                                                                                                                                                                                 |
| Durchschnittliche Intra- / Interassay Varianz | 1,9% / 5,7%                                                                                                                                                                                                |
| Referenzwerte                                 | Blum W.F et al.1990 Insulin-Like Growth Factors and Their Binding Proteins. In: Ranke MB, Mullins P.E.(ed): Diagnostics of Endocrine Function in Children and Adolescents. Basel, Karger, 2011, pp.157-181 |

## 1 ZWECKBESTIMMUNG

Quantitative Messung von humanem insulinähnlichem Wachstumsfaktor 3 (IGFBP-3) in menschlichem Serum oder EDTA- und Heparin-Plasma für diagnostische und wissenschaftliche Zwecke.

## 2 EINFÜHRUNG

Insulin-like growth factors (IGF)-I und -II sind im Blutkreislauf an spezielle Bindungsproteine (IGFBPs) gebunden. Bisher wurden sechs verschiedene Bindungsproteine anhand ihrer Aminosäuresequenz identifiziert und als IGFBP-1, IGFBP-2, ..., IGFBP-6 klassifiziert (1). Im Blut überwiegt IGFBP-3, das hauptsächlich zur Regulierung der IGF-I und -II Konzentrationen dient. Im Gegensatz zu den anderen Bindungsproteinen hat IGFBP-3 die Eigenschaft, neben IGF-I bzw. -II noch eine säurelabile Untereinheit (acid-labile subunit, ALS) zu binden (3-5). IGFBP-3 liegt fast vollständig in Form dieses hochmolekularen ternären Komplexes vor, es finden sich aber auch geringe Mengen freies IGFBP-3 im Blut (6,7).

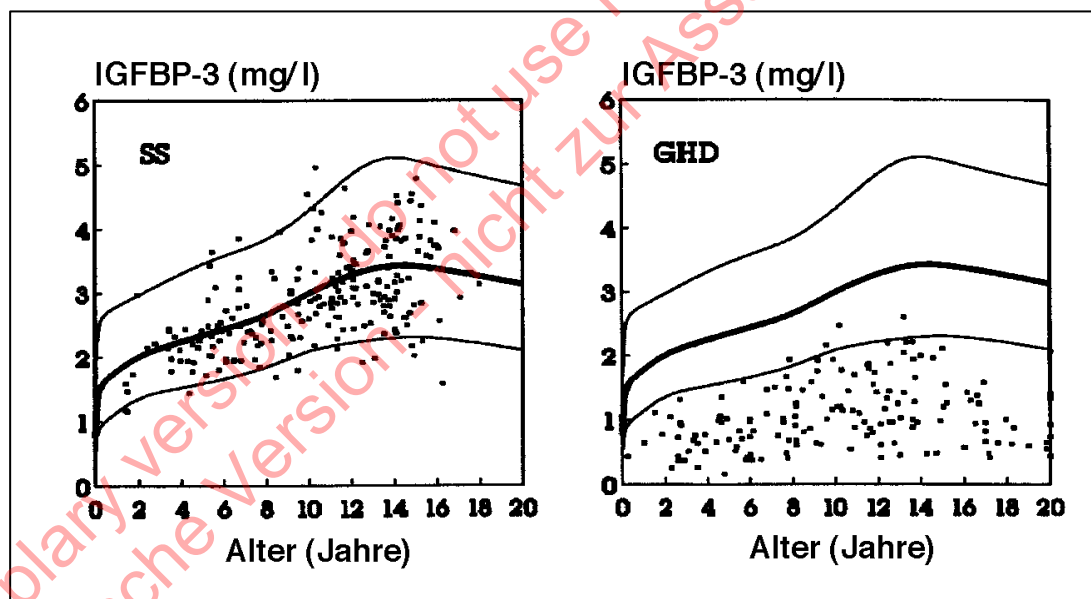
Die Entwicklung spezifischer Immunoassays, die IGFBP-3 auch im ternären Komplex erkennen, ermöglichte neue Einsichten in die Regulation dieses Proteins (6-9). Demnach erwies sich IGFBP-3 als nützlicher Parameter bei der Diagnose von Wachstumsstörungen (7,8).

Jedoch wird die IGFBP-3 Konzentration nicht nur vom Wachstumshormon sondern auch von weiteren Faktoren beeinflusst: Alter und sexuelles Entwicklungsstadium, Ernährung, Hypothyreose, Diabetes mellitus, Leber- und Nierenfunktion. IGFBP-3 Werte sind erniedrigt bei Unterernährung, bei Hypothyreose, Diabetes mellitus und Lebererkrankungen (6-8). Bei Vorliegen einer chronischen Niereninsuffizienz liegen jedoch erhöhte Konzentrationen vor (6,10,11). 24-Stunden-Messungen zeigen keine zirkadianen Schwankungen (12,13). Für

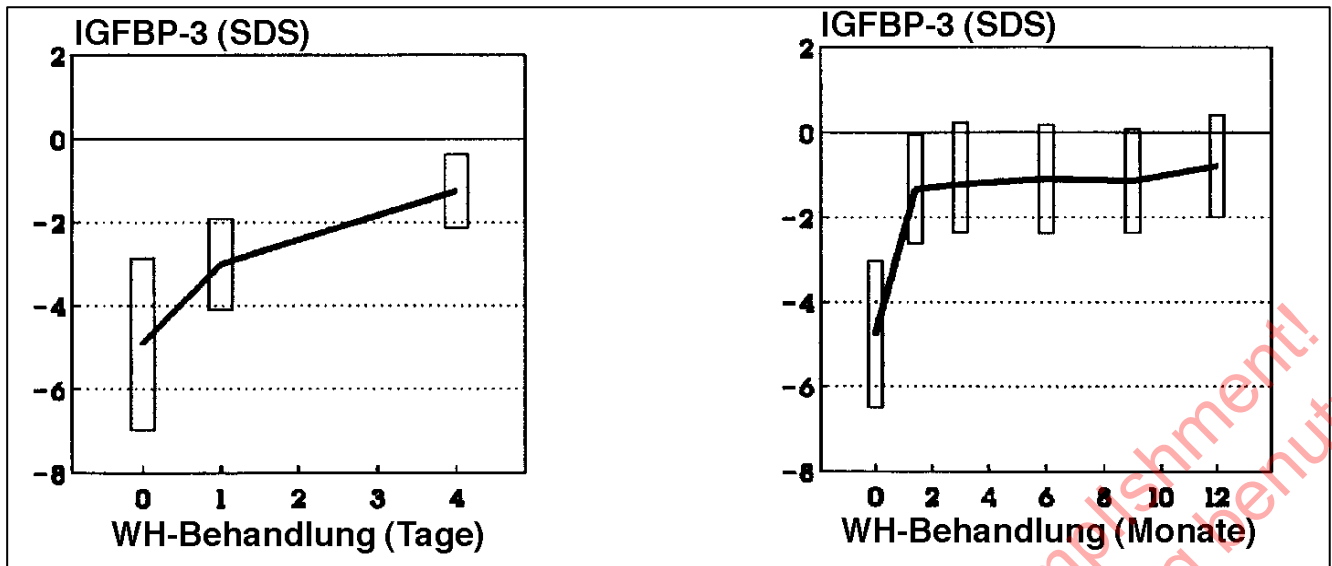
klinische Belange ist der wichtigste regulierende Faktor das Wachstumshormon. IGFBP-3-Einzelmessungen korrelieren positiv mit dem Logarithmus der spontanen Gesamt-WH-Sekretion (8,14). Bei Patienten mit WH-Mangel sind auch die IGFBP-3 Werte erniedrigt. Mehrere Tage nach Beginn einer WH Therapie steigt die IGFBP-3 Konzentration langsam bis in den normalen Bereich an (7,8). Die langsame Reaktion auf WH-Konzentrationsänderungen und konstante zirkadiane Werte während täglicher WH-Gabe (13) lassen die Vermutung zu, dass IGFBP-3 den WH-Sekretionsstatus über mehrere Tage widerspiegelt.

Die großen Vorteile der IGFBP-3 Messung verglichen mit der IGF-I Messung sind:

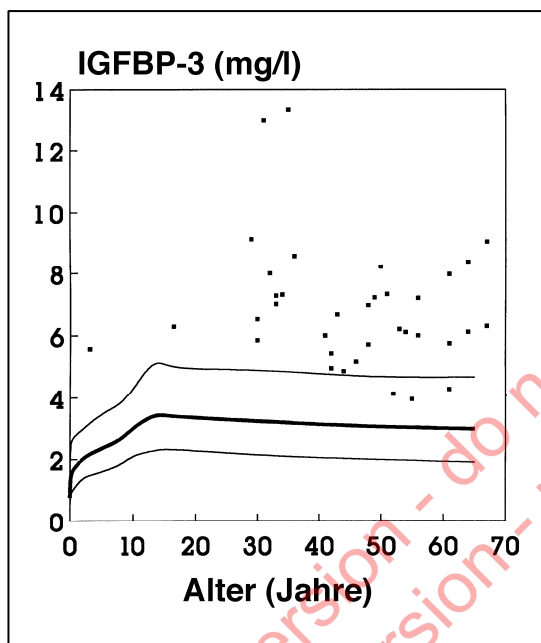
1. Vor der Messung ist kein Extraktionsschritt notwendig. Diese Vereinfachung der Testdurchführung erhöht automatisch die Genauigkeit.
2. Die Normalwerte bei Kleinkindern sind relativ hoch, sodass die Messung subnormaler Werte verlässlicher wird.
3. Patienten mit WH-Mangel besitzen subnormale IGFBP-3 Werte. Andererseits besitzen die meisten kleinwüchsigen Kinder mit normaler WH-Sekretion auch IGFBP-3 Werte im Normalbereich (Abb. 1). Beide Gruppen sind durch die Messung der IGFBP-3 Konzentration also leicht zu unterscheiden. Bei kleinwüchsigen Kindern steigen die IGFBP-3 Werte während kontinuierlicher WH-Behandlung stetig bis in den Normalbereich an und bleiben bei fortgesetzter Therapie auch konstant (Abb. 2). Daher ist die IGFBP-3 Messung im Serum auch geeignet, WH-Therapien zu überwachen (19). Bei anderen Patienten mit ausgeprägtem Minderwuchs aber normaler WH-Sekretion, z. B. Turner-Syndrom oder Silver-Russell-Syndrom, sind die IGFBP-3 Serumwerte ebenfalls normal (8).



**Abb. 1:** IGFBP-3 Serumwerte bei kleinwüchsigen Patienten ohne WH-Mangel: angeborene Wachstums- und Entwicklungsverzögerung, vererbte Kleinwüchsigkeit, intra-uterine Wachstumsverzögerung (SS: short stature) sowie bei idiopathischem oder organischem WH-Mangel (GHD: growth hormone deficiency). Der Normalbereich ist durch die 5. und 95. Perzentile definiert.



**Abb. 2:** IGFBP-3 Serumwerte bei Kindern mit WH-Mangel vor und während der Behandlung mit WH. Aufgrund der Altersabhängigkeit wurden die Werte über die Standardabweichungen (SDS: Standard Deviation Score) gemittelt angegeben.



**Abb. 3:** IGFBP-3 Serumwerte bei Akromegalie. Der Normalbereich ist durch die 5., 50. und 95. Perzentile definiert.

Bei normalwüchsigen Kindern und Jugendlichen oder bei Patienten mit Sotos-Syndrom sind die IGFBP-3 Werte normal oder leicht erhöht. Im Gegensatz dazu sind die Werte bei Kindern mit Gigantismus oder Erwachsenen mit Akromegalie stark erhöht (Abbildung 3) (6,15) und normalisieren sich nach erfolgreicher Behandlung. Daher ist die IGFBP-3-Messung auch hier ein nützlicher Parameter zur Diagnose von WH-Überschuss und Überwachung des Behandlungserfolgs. Bei frühreifen Kindern sind die IGFBP-3-Werte deutlich erhöht, während sie sich bei Patientinnen mit verfrühter Thelarche im oberen Normalbereich bewegen (15).

### 3 TESTPRINZIP

Der Mediagnost **IGFBP-3 ELISA E03A** ist ein so genannter Sandwich-Assay unter Verwendung zweier spezifischer und hochaffiner Antikörper. Der an die Mikrotiterplatte gekoppelte erste Antikörper bindet das IGFBP-3 aus der Probe. Im nachfolgenden Schritt bindet am derart gebundenen IGFBP-3 ein Komplex aus Biotin-konjugiertem anti-IGFBP-3 Fab-Antikörper und Streptavidin-Peroxidase. In der abschließenden Reaktion katalysiert die gebundene Peroxidase die Umsetzung des Substrats. Diese enzymatische Reaktion führt zu einer, quantitativ vom IGFBP-3-Gehalt der Proben abhängigen, Blaufärbung. Die Reaktion wird durch die Zugabe der Stopplösung beendet und die Farbtintensität durch die Messung der Absorption bestimmt.

## 4 WARNHINWEISE UND VORSICHTSMAßNAHMEN

Der Mediagnost Kit ist nur zur In-vitro-Diagnostik und nicht zur inneren Anwendung bei Mensch und Tier geeignet. Dieses Produkt darf nur exakt wie in der mitgelieferten Anleitung beschrieben eingesetzt werden. Mediagnost kann nicht für einen eventuellen Verlust oder Schaden haftbar gemacht werden, der durch Nichtbeachtung der Instruktionen entsteht, soweit keine gesetzliche Regelung anderes besagt.

**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: **KS1, KS2, STD**

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

### Reagenzien AK, VP, WP

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

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

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

### Stopplösung (SL)

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

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

### 4.1 Erste-Hilfe Maßnahmen:

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

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

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

## 5 PROBEN

### 5.1 Probenmaterial

Serum und Plasma

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

### 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 3 Tage
- Lagerung bei -20°C mind. 2 Jahre
- Gefrier-Auftau-Zyklen max. 10

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. 10 Frier-Tauzyklen zeigten keinen Einfluss auf die Proben.

### 5.5 Interferenz

**Triglyceride, Bilirubin oder Hämoglobin** in der Probe stören bis zu einer Konzentration von **100 mg/mL, 100 µg/mL bzw. 5 mg/mL** nicht. Der Einsatz hämolytischer, lipämischer oder ikterischer Proben sollte trotzdem zuvor vom Anwender validiert werden.

### 5.6 Probenverdünnung

- Verdünnung: **1:505** mit Probenpuffer **PP**
- Beispiel: **10 µL Probe** werden zu **1 mL** Probepuffer **PP** (rot gefärbt) gegeben (Verdünnungsfaktor 101). In ein weiteres PE-/PP-Gefäß **400 µL** Probenpuffer **PP** vorlegen und **100 µL** von der gut durchmischten **ersten Verdünnung** geben (Verdünnungsfaktor 5). **Nach dem Mischen innerhalb von 1 Stunde von dieser Lösung mit einer Endverdünnung von (1:505), 50 µL pro Bestimmung** im Assay einsetzen.
- Die verdünnte Probe ist für maximal eine Stunde stabil bei 20-25°C.

## 6 MATERIALIEN

### 6.1 Inhalt der Testpackung

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

|                                                                                     |                                                                                                                                                             |                            |
|-------------------------------------------------------------------------------------|-------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|----------------------------|
| <b>MTP</b>                                                                          | <b>Mikrotiterplatte</b> , gebrauchsfertig, beschichtet mit Kaninchen-anti-hlGFBP-3-Antikörper. Die Vertiefungen sind einzeln abbrechbar.                    | <b>(8x12) Vertiefungen</b> |
| <b>A-E</b>                                                                          | <b>Standards</b> , lyophilisiert (humanes IGFBP-3), Konzentrationen sind auf den Etiketten und auf dem <b>QC-Zertifikat</b> angegeben.                      | <b>5 x 1 mL</b>            |
| <b>KS1</b>                                                                          | <b>Kontrollserum 1</b> , lyophilisiert, (humanes Serum), die Konzentration ist auf dem <b>QC-Zertifikat</b> angegeben.                                      | <b>1x 250 µL</b>           |
| <b>KS2</b>                                                                          | <b>Kontrollserum 2</b> , lyophilisiert, (humanes Serum), die Konzentration ist auf dem <b>QC-Zertifikat</b> angegeben.                                      | <b>1x 250 µL</b>           |
| <b>AK</b>                                                                           | <b>Antikörper-POD-Konjugat</b> , gebrauchsfertig, Kaninchen-anti-hlGFBP-3-Antikörper biotinyliert und POD (Meerrettich-Peroxidase) markiertes Streptavidin. | <b>1 x 12 mL</b>           |
| <b>PP</b>                                                                           | <b>Probenpuffer</b> , rotgefärbt, gebrauchsfertig.<br><b>Bitte vor Gebrauch Schütteln!</b>                                                                  | <b>1 x 120 mL</b>          |
| <b>VP</b>                                                                           | <b>Verdünnungspuffer</b> , gebrauchsfertig.<br><b>Bitte vor Gebrauch Schütteln!</b>                                                                         | <b>1 x 30 mL</b>           |
| <b>WP</b>                                                                           | <b>Waschpuffer WP</b> , 20fach konzentrierte Lösung                                                                                                         | <b>1 x 50 mL</b>           |
| <b>S</b>                                                                            | <b>Substrat S</b> , gebrauchsfertig, Meerrettich-Peroxidase (POD)-Substrat, stabilisiertes H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> -Tetramethylbenzidin.              | <b>1 x 12 mL</b>           |
| <b>SL</b>                                                                           | <b>Stopplösung SL</b> , gebrauchsfertig, 0,2 M Schwefelsäure.                                                                                               | <b>1 x 12 mL</b>           |
| -                                                                                   | <b>Abdeckfolie</b> für die <b>Mikrotiterplatte</b>                                                                                                          | <b>2 x</b>                 |
|  | <b>Packungsbeilage</b>                                                                                                                                      | <b>1 x</b>                 |
| -                                                                                   | <b>Qualitätskontrollzertifikat (QC-Zertifikat)</b>                                                                                                          | <b>1 x</b>                 |

### 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 nur 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 sollten nicht vermisch werden.

### Rekonstitution

Die Standards **A – E** und Kontrollseren **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 (1:505) 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.

### Inkubation

Inkubation bei Raumtemperatur bedeutet: **Inkubation bei 20 - 25°C**. Die Substratlösung **S**, stabilisiertes H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>-Tetramethylbenzidin, ist lichtempfindlich–Aufbewahrung und Inkubation bitte vor Licht geschützt.

### 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 Antikörper-POD-Konjugat **AK** 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.

### Schütteln

Die Inkubationen sollen geschüttelt bei mittlerer Umdrehungsfrequenz eines für Mikrotiterplatten geeigneten Schüttlers erfolgen. Wir empfehlen 350 rpm. Bauartbedingt können individuell Abweichungen von diesem Wert möglich sein, dann muss die Umdrehungsfrequenz angepasst werden. Zu geringes Schütteln kann durch ungenügende Vermischung der Lösungen zu verringerten optischen Dichten, hohen Streuungen und/oder falschen Werten führen, zu starkes Schütteln dagegen zu erhöhten optischen Dichten und/oder falschen Werten.

### Waschen

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

Bei Gebrauch eines speziellen **automatischen Mikrotiterplattenwashers** ist unbedingt dessen Gebrauchsanweisung zu befolgen. Die Geräteeinstellungen müssen u.a. der 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 1 mL Probenpuffer PP   | -                                                      |
| KS1                                                                               | Kontrollserum 1                                                              | in 250 µL Probenpuffer PP | 1:505 mit PP                                           |
| KS2                                                                               | Kontrollserum 2                                                              | in 250 µL Probenpuffer PP | 1:505 mit PP                                           |
| WP                                                                                | Waschpuffer                                                                  | -                         | 1:20 mit Aqua dest.                                    |
| Proben mit Probenpuffer PP 1:505 verdünnen                                        |                                                                              |                           |                                                        |
| Vor der Testdurchführung alle Reagenzien auf Raumtemperatur (20-25°C) bringen.    |                                                                              |                           |                                                        |
| Testdurchführung in Doppelbestimmung:                                             |                                                                              |                           |                                                        |
| Pipettieren                                                                       | Reagenzien                                                                   |                           | Position                                               |
| 50 µL                                                                             | Verdünnungspuffer VP                                                         |                           | in <u>alle</u> benötigten Vertiefungen pipettieren     |
| 50 µL                                                                             | Probenpuffer PP (Leerwert)                                                   |                           | A1/A2                                                  |
| 50 µL                                                                             | Standard A (0,4 ng/mL)                                                       |                           | B1/B2                                                  |
| 50 µL                                                                             | Standard B (2 ng/mL)                                                         |                           | C1/C2                                                  |
| 50 µL                                                                             | Standard C (6 ng/mL)                                                         |                           | D1/D2                                                  |
| 50 µL                                                                             | Standard D (15 ng/mL)                                                        |                           | E1/E2                                                  |
| 50 µL                                                                             | Standard E (30 ng/mL)                                                        |                           | F1/F2                                                  |
| 50 µL                                                                             | Kontrollserum KS 1 (1:505 verdünnt)                                          |                           | G1/G2                                                  |
| 50 µL                                                                             | Kontrollserum KS 2 (1:505 verdünnt)                                          |                           | H1/H2                                                  |
| 50 µL                                                                             | Probe (1:505 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                                                                            | Antikörper-POD-Konjugat AK                                                   |                           | In jede Vertiefung                                     |
| Mit Klebefolie die Vertiefungen dicht abdecken.                                   |                                                                              |                           |                                                        |
| 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                                                                            | Substratlösung S                                                             |                           | In jede Vertiefung                                     |
| Substrat S Inkubation: 30 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-Kontrolle muss innerhalb des zulässigen Bereichs, der auf dem QC-Zertifikat angegeben worden ist, gefunden werden. Wenn die Kriterien nicht erfüllt sind, ist der Test ungültig und sollte wiederholt werden.

### 9.1 Qualitätskriterien

Zur Auswertung des Testes sollte gewährleistet sein, dass die Extinktionen des Leerwertes 0,25 Einheiten nicht überschreiten, 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

Die bereitgestellten Standards enthalten folgende human IGFBP-3-Konzentrationen:

| Standard | A   | B | C | D  | E  |
|----------|-----|---|---|----|----|
| ng/mL    | 0,4 | 2 | 6 | 15 | 30 |

- 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 berechneten IGFBP-3-Gehaltes mit dem entsprechenden **Verdünnungsfaktor** der Proben ergibt die **IGFBP-3-Konzentration in ng/mL** (oder pg/mL, je nach gewählter Einheit der Standards).

## 10.2 Beispiel einer typische Standardkurve

Die exemplarischen Daten und die Standardkurve in der Abbildung 4 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           | 0,0      | 0,4   | 2     | 6     | 15    | 30    |
| OD (450-620 nm) | 0,204    | 0,254 | 0,453 | 0,911 | 1,706 | 2,390 |

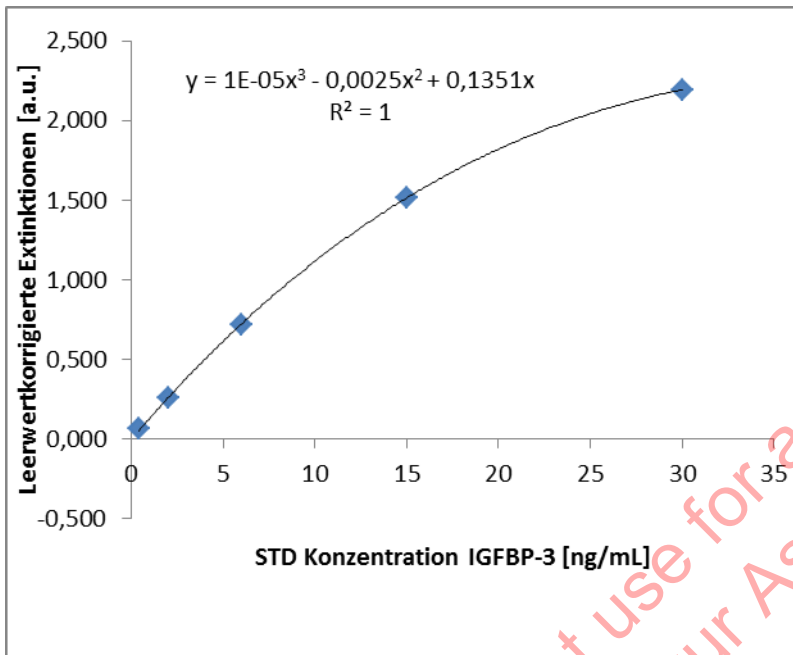


Abb. 4: Exemplarische Standardkurve

## 10.3 Beispielhafte Berechnung der IGFBP-3-Konzentration

Probenverdünnung: 1:505

Gemessene Extinktion der Probe: 0,975

Gemessene Extinktion des Leerwertes: 0,204

Aus der Differenz der Proben-Extinktion und der Extinktion des Leerwertes (0,204) **berechnet Ihr Auswertungsprogramm** mit der entsprechenden Kurvenanpassung (hier: Polynom x. Grades) die IGFBP-3-Konzentration der verdünnten Probe durch Auflösen der Gleichung aus Abb. 4 nach x. In diesem Fall ergibt sich eine IGFBP-3-Konzentration in der verdünnten Probe von

$$0,771 = 1E-05x^3 - 0,0025x^2 + 0,1351x$$

$$6,617 = x$$

und unter Berücksichtigung des Verdünnungsfaktors (**1:505**) somit eine IGFBP-3-Konzentration in der unverdünnten Probe von

$$6,617 \text{ ng/mL} \times 505 = 3342 \text{ ng/mL} = 3,342 \text{ mg/L}$$

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

## 11 EINSCHRÄNKUNGEN

IGFBP-3-Spiegel hängen in erster Linie von der Wachstumshormonsekretion ab. Aber auch eine Reihe anderer Faktoren beeinflusst die IGFBP-3 Plasmakonzentration und sie müssen deshalb zur korrekten Interpretation in die Betrachtung mit einbezogen werden. IGFBP-3 Spiegel nehmen während des Fastens (mehr als 1 Tag), bei Malnutrition, Malabsorption, Kachexie, eingeschränkter Leberfunktion, Hypothyreose und Diabetes mellitus ab. Zudem können sie bei chronisch-entzündlichen und malignen Erkrankungen erniedrigt sein. Erhöhte Werte treten bei eingeschränkter Nierenfunktion und vorzeitiger Pubertät auf. In klinischen Situationen, die mit Hyperprolaktinämie einhergehen oder bei Patienten mit Craniopharyngeom können gelegentlich trotz bestehenden Wachstumshormonmangels normale IGFBP-3-Werte auftreten.

In einigen physiologischen (z.B. Schwangerschaft) oder pathologischen Situationen kann IGFBP-3 durch spezifische Proteasen zu niedermolekularen Fragmenten abgebaut werden (16,17), die sich zwar auf das IGFBP-3-Muster im Western-blot auswirken, das Ergebnis des ELISA aber kaum beeinflussen. Für den Fall des speziellen Interesses in diesen physiologischen Vorgang steht der Mediagnost ELISA für funktionales IGFBP-3 E04A zur Verfügung. Der ELISA E04A ermöglicht die Quantifizierung des **IGFBP-3 Fragmentierungsgrades** in Proben.

Der Mediagnost IGFBP-3 ELISA E03a basiert auf polyklonalen Kaninchen-Antikörpern. Im Allgemeinen kann diese Technik durch heterophile Antikörper in der Probe beeinflusst werden. Der Einfluss der heterophilen Antikörper wird durch das Assay-Design reduziert, aber kann nicht vollständig ausgeschlossen werden.

## 12 REFERENZWERTE

Die IGFBP-3-Spiegel sind bei Kindern stark altersabhängig. Bei Erwachsenen ist dieses Phänomen weniger ausgeprägt. Die Normalbereiche der verschiedenen Altersgruppen, die log-normal verteilt sind, sind in Tabelle 1 durch Perzentilen angegeben. In Abb.5 und 6 sind diese Werte graphisch dargestellt. Es wird empfohlen, für jedes Labor eigene Normalbereiche aufzustellen.

**Tab. 1:** IGFBP-3 Serumkonzentrationen gesunder Probanden in Abhängigkeit vom Alter. Zwischen dem 7. und 17. Lebensjahr wurden die Daten nach Geschlecht getrennt ausgewertet, weil bei den Mädchen der Anstieg der Serumkonzentrationen während der Pubertät meistens 2 Jahre früher erfolgt.

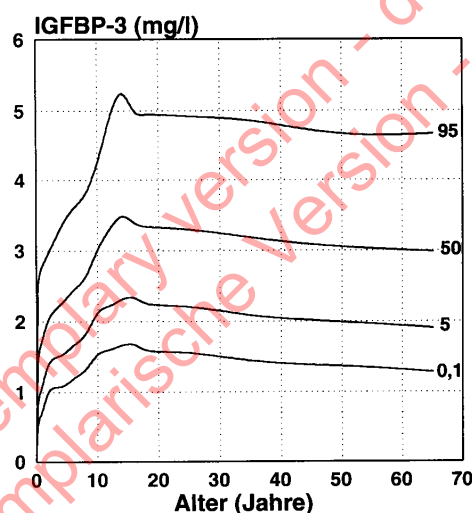
| Altersgruppe | Perzentilen         |      |      |      |      |      |      |      |      |      |      |      |      |      |
|--------------|---------------------|------|------|------|------|------|------|------|------|------|------|------|------|------|
|              | 0.1                 | 1    | 5    | 10   | 20   | 30   | 40   | 50   | 60   | 70   | 80   | 90   | 95   | 99   |
| 0-1 Woche    | 0.25                | 0.33 | 0.42 | 0.48 | 0.57 | 0.64 | 0.70 | 0.77 | 0.85 | 0.93 | 1.05 | 1.23 | 1.41 | 1.81 |
| 1-4 Woche    | 0.49                | 0.62 | 0.77 | 0.86 | 0.99 | 1.10 | 1.19 | 1.29 | 1.40 | 1.52 | 1.68 | 1.93 | 2.16 | 2.68 |
| 1-3 Monate   | 0.55                | 0.70 | 0.87 | 0.98 | 1.13 | 1.25 | 1.36 | 1.48 | 1.61 | 1.75 | 1.94 | 2.23 | 2.52 | 3.14 |
| 3-6 Monate   | 0.64                | 0.80 | 0.98 | 1.10 | 1.25 | 1.38 | 1.49 | 1.61 | 1.74 | 1.88 | 2.07 | 2.37 | 2.65 | 3.24 |
| 6-12 Monate  | 0.71                | 0.88 | 1.07 | 1.19 | 1.35 | 1.48 | 1.60 | 1.72 | 1.85 | 2.00 | 2.19 | 2.49 | 2.76 | 3.36 |
| 1-3 Jahre    | 1.02                | 1.21 | 1.41 | 1.53 | 1.69 | 1.82 | 1.94 | 2.05 | 2.17 | 2.31 | 2.48 | 2.74 | 2.98 | 3.47 |
| 3-5 Jahre    | 1.08                | 1.30 | 1.52 | 1.66 | 1.84 | 1.99 | 2.12 | 2.25 | 2.39 | 2.55 | 2.75 | 3.05 | 3.33 | 3.91 |
| 5-7 Jahre    | 1.19                | 1.42 | 1.66 | 1.81 | 2.01 | 2.16 | 2.30 | 2.44 | 2.59 | 2.76 | 2.97 | 3.29 | 3.59 | 4.2  |
| 7-9 J.       | Jungen /<br>Mädchen | 1.25 | 1.48 | 1.73 | 1.88 | 2.07 | 2.22 | 2.36 | 2.50 | 2.65 | 2.81 | 3.02 | 3.33 | 3.61 |
|              |                     | 1.36 | 1.61 | 1.88 | 2.04 | 2.25 | 2.42 | 2.57 | 2.72 | 2.88 | 3.06 | 3.28 | 3.62 | 3.94 |
| 9-11 J.      | Jungen /<br>Mädchen | 1.47 | 1.73 | 1.99 | 2.15 | 2.36 | 2.52 | 2.66 | 2.81 | 2.96 | 3.14 | 3.35 | 3.67 | 3.97 |
|              |                     | 1.56 | 1.90 | 2.20 | 2.38 | 2.62 | 2.80 | 2.96 | 3.13 | 3.30 | 3.50 | 3.75 | 4.11 | 4.45 |
| 11-13 J.     | Jungen /<br>Mädchen | 1.58 | 1.88 | 2.19 | 2.38 | 2.63 | 2.82 | 3.00 | 3.18 | 3.37 | 3.58 | 3.84 | 4.25 | 4.62 |
|              |                     | 1.62 | 1.90 | 2.24 | 2.46 | 2.74 | 2.97 | 3.17 | 3.38 | 3.60 | 3.85 | 4.17 | 4.65 | 5.10 |
| 13-15 J.     | Jungen /<br>Mädchen | 1.62 | 1.89 | 2.24 | 2.46 | 2.76 | 2.99 | 3.20 | 3.42 | 3.65 | 3.91 | 4.24 | 4.75 | 5.22 |
|              |                     | 1.69 | 2.03 | 2.39 | 2.61 | 2.91 | 3.14 | 3.35 | 3.56 | 3.79 | 4.04 | 4.36 | 4.85 | 5.30 |
| 15-17 J.     | Jungen /<br>Mädchen | 1.70 | 2.02 | 2.36 | 2.57 | 2.84 | 3.05 | 3.25 | 3.44 | 3.65 | 3.88 | 4.17 | 4.61 | 5.01 |
|              |                     | 1.62 | 1.93 | 2.26 | 2.46 | 2.73 | 2.93 | 3.12 | 3.31 | 3.51 | 3.74 | 4.02 | 4.45 | 4.85 |
| 17-20 J.     |                     | 1.58 | 1.90 | 2.24 | 2.45 | 2.72 | 2.94 | 3.13 | 3.33 | 3.54 | 3.78 | 4.07 | 4.53 | 4.95 |
| 20-30 J.     |                     | 1.55 | 1.86 | 2.20 | 2.41 | 2.68 | 2.90 | 3.09 | 3.29 | 3.50 | 3.74 | 4.04 | 4.50 | 4.92 |
| 30-40 J.     |                     | 1.44 | 1.75 | 2.08 | 2.29 | 2.56 | 2.78 | 2.98 | 3.18 | 3.39 | 3.64 | 3.95 | 4.42 | 4.86 |
| 40-50 J.     |                     | 1.38 | 1.68 | 2.01 | 2.21 | 2.48 | 2.69 | 2.88 | 3.08 | 3.29 | 3.53 | 3.83 | 4.29 | 4.72 |
| 50-60 J.     |                     | 1.34 | 1.64 | 1.96 | 2.16 | 2.42 | 2.63 | 2.83 | 3.02 | 3.23 | 3.46 | 3.76 | 4.22 | 4.65 |
| 60-70 J.     |                     | 1.28 | 1.58 | 1.90 | 2.10 | 2.37 | 2.58 | 2.78 | 2.98 | 3.19 | 3.44 | 3.75 | 4.23 | 4.67 |
| 70-80 J.     |                     | 1.20 | 1.50 | 1.81 | 2.00 | 2.27 | 2.47 | 2.67 | 2.87 | 3.08 | 3.32 | 3.62 | 4.09 | 4.52 |
| > 80 J.      |                     | 1.13 | 1.43 | 1.73 | 1.92 | 2.19 | 2.39 | 2.59 | 2.79 | 3.00 | 3.23 | 3.54 | 4.00 | 4.44 |

Die Serumkonzentrationen sind in mg/L angegeben

Mit IGFBP-3-RIA gemessen (Blum et al. 1990)

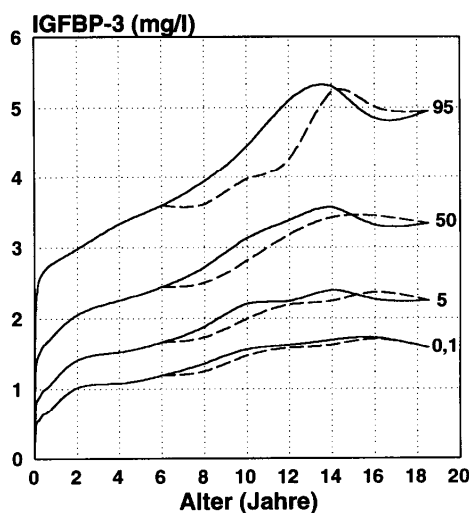
Die Werte für über 70-Jährige sind extrapoliert.

### Serumkonz. nach Alter



**Abb. 5:** Altersabhängiger Normalbereich der IGFBP-3-Spiegel (dargestellt als 0,1., 5., 50. und 95. Perzentile)

### Kinder und Jugendliche



**Abb. 6:** Normalbereich bei Kindern und Jugendlichen (Mädchen —, Jungen - - -)

## 13 ASSAY EIGENSCHAFTEN UND VALIDIERUNG

### 13.1 Sensitivität

Die Sensitivität wurde durch Messen des Leerwertes und durch Berechnung der theoretischen Konzentration der zweifachen Standardabweichung des Leerwertes evaluiert. Die analytische Sensitivität des E03A beträgt 0,03 ng/ml. Nach ICH Q2 R1 (CPMP/ICH/381/95) wird die untere Nachweisgrenze (LOQ) durch die rückberechnete IGFBP-3-Konzentration der 10fachen Standardabweichung des Leerwertes wiedergegeben, die damit 0,15 ng/mL beträgt.

### 13.2 Spezifität

Zur Bestimmung der Kreuzreaktivität mit homologen Proteinen wurden IGFBP-1,-2,-4,-5 und -6 in einer Konzentration von 200 ng/mL in Testpuffer verdünnt und als Probe eingesetzt. Die maximale relative Kreuzreaktivität betrug  $\leq 0,125\%$ .

### 13.3 Präzision

#### Intra-Assay-Varianz

Zur Bestimmung der Intra-Assay Variabilität wurde eine Probe 10-mal im gleichen Test eingesetzt. Die Ergebnisse sind in der Tabelle 2 dargestellt. Der Variationskoeffizient (VK) ist im Durchschnitt 1,9%. Beispielhafte Bestimmungen werden in der Tabelle 2 gezeigt.

**Tab. 2: Intra-Assay-Variation.** Drei beispielhafte Serum-Proben wurden verdünnt und 10-mal in einem Assay gemessen.

|                    | Probe 1 | Probe 2 | Probe3 |
|--------------------|---------|---------|--------|
| Mittelwert [ng/mL] | 3630    | 3789    | 3016   |
| SA [ng/mL]         | 70,83   | 83,75   | 46,71  |
| %VK                | 1,95    | 2,21    | 1,55   |
| n                  | 10      | 10      | 10     |

#### Inter-Assay-Varianz

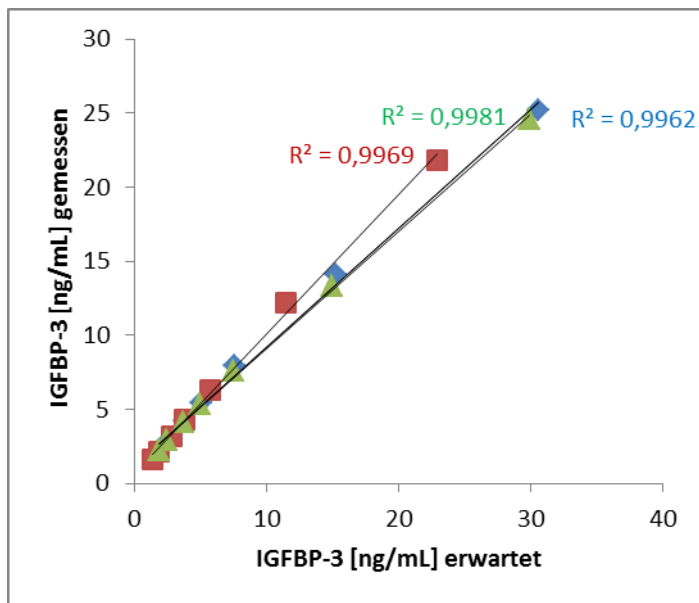
Zur Bestimmung der Inter-Assay Variabilität wurden Serumproben an unterschiedlichen Tagen in unabhängigen Tests gemessen. Im Durchschnitt betrug der Variationskoeffizient 5,7%. Die Ergebnisse sind im Detail in der Tabelle 3 gezeigt.

**Tab. 3: Inter-Assay-Variation.** Serum-Proben wurden wie empfohlen verdünnt und IGFBP-3-Konzentration in verschiedenen unabhängigen Tests gemessen.

|                    | Probe 1 | Probe 2 | Probe 3 | Probe 4 | Probe 5 | Probe 6 | Probe 7 | Probe 8 |
|--------------------|---------|---------|---------|---------|---------|---------|---------|---------|
| Mittelwert [ng/mL] | 2886    | 3525    | 3229    | 3219    | 4025    | 3293    | 3889    | 4328    |
| SA [ng/mL]         | 193     | 178     | 140     | 237     | 171     | 177     | 199     | 322     |
| %VK                | 6,68    | 5,05    | 4,34    | 7,36    | 4,25    | 5,38    | 5,12    | 7,44    |
| n                  | 4       | 10      | 9       | 7       | 10      | 10      | 7       | 10      |

### 13.4 Linearität

Die Linearität wurde durch Verdünnung von drei verschiedenen Serum-Proben mit bekannter IGFBP-3-Konzentration nachgewiesen. Die IGFBP-3-Konzentration der verdünnten Probe wurde gemessen und mit der Konzentration des Zielwertes verglichen. Die linearen Regressionsanalysen sind in der Abbildung 7 dargestellt. Keine der IGFBP-3-Konzentrationen der eingesetzten Verdünnungen (1:125 - 1:2000) ist stärker als 20 % von dem erwarteten Wert abgewichen ( $\leq -17\%$ ).



**Abb. 7 Linearität.** Dargestellt sind die gemessenen Konzentrationen in verschiedenen Verdünnungen von drei Serumproben.

### 13.5 Wiederfindung und Richtigkeit

Serum und Plasma-Proben wurden mit rekombinantem IGFBP-3 angereichert und die Wiederfindung wurde mit der gleichen Menge an IGFBP-3 angereicherten Puffer verglichen. Die nativen Proben hatten eine IGFBP-3-Konzentration von 2684 bis 3667 ng/mL, die relative Wiederfindung lag zwischen 109 bis 118 %. Die Ergebnisse werden in der Tabelle 4 gezeigt.

**Tab.4 Wiederfindung [%]** von rekombinantem IGFBP-3 in nativen Serum-/ Plasma-Proben im Vergleich zu rekombinantem IGFBP-3 im Puffer.

| IGFBP-3        |        | Probe [ng/mL] | Probe angereichert [ng/mL] | Zielwert [ng/mL] | Wiederfindung [%] |
|----------------|--------|---------------|----------------------------|------------------|-------------------|
| <b>Probe 1</b> | Plasma | 3641          | 5107                       | 4324             | 118               |
| <b>Probe 2</b> | Plasma | 3667          | 4778                       | 4350             | 110               |
| <b>Probe 3</b> | Serum  | 2869          | 3778                       | 3552             | 106               |
| <b>Probe 4</b> | Serum  | 2684          | 3677                       | 3367             | 109               |

### 13.6 Interferenz

Die Interferenz physiologisch auftretender Substanzen wurde durch Zugabe unterschiedlicher Mengen dieser Substanzen zu Serum-Proben getestet. In Tabelle 5 ist die relative Wiederfindung vom IGFBP-3 im Vergleich zum Serum ohne Zusätze für die maximal zugegebene Menge der potentiell interferierenden Substanz dargestellt.

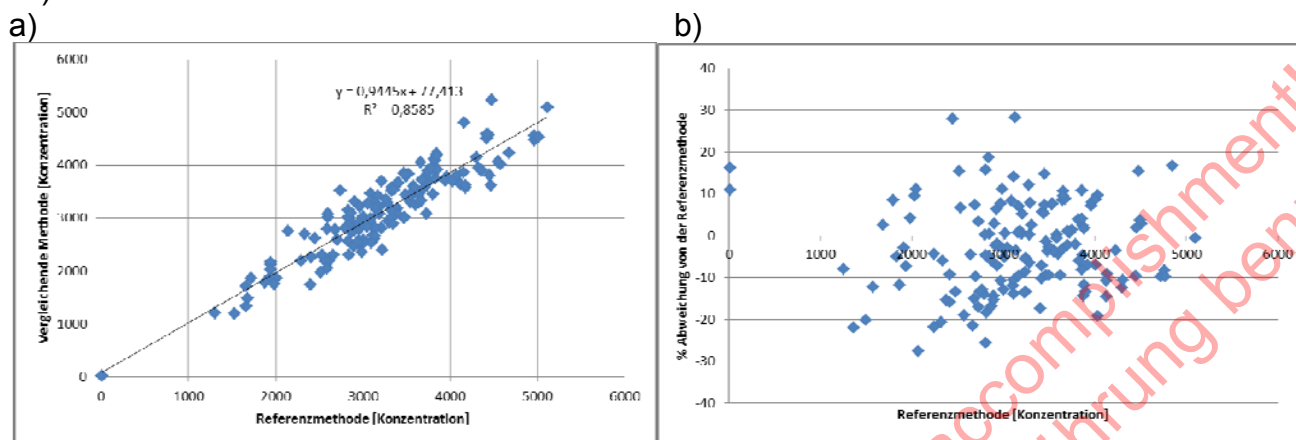
Keine der untersuchten Substanzen beeinflusst das Ergebnis des Testes signifikant.

**Tab. 5: [%]-Wiederfindung** im Vergleich zum nativen Serum

|                | Triglyzeride<br>100 mg/mL | Bilirubin<br>100 µg/mL | Hämoglobin<br>5 mg/mL |
|----------------|---------------------------|------------------------|-----------------------|
| <b>Probe 1</b> | 89                        | 93                     | 81                    |
| <b>Probe 2</b> | 87                        | 91                     | 106                   |
| <b>Probe 3</b> | 88                        | 96                     | 93                    |

## 14 VERGLEICHSTUDIEN

Der Mediagnost IGFBP-3 ELISA E03A wurde mit dem Mediagnost RIA-Testsystem (IGF-R10) verglichen. Insgesamt 150 verschiedene Proben mit IGFBP-3-Konzentrationen von 10 – 5118 ng/mL wurden verwendet. Die Ergebnisse sind graphisch in Abbildung 8 dargestellt. Die relative Abweichung vom Mediagnost RIA beträgt durchschnittlich 9,00% (0,18 bis 28,29 %).



**Abb. 8:** Ein Vergleich des Mediagnost RIA mit dem IGFBP-3 ELISA E03A. Die IGFBP-3-Konzentration wurde in 150 Proben mit beiden Assays gemessen. In Abbildung a) ist die Ergebnisanalyse mittels linearer Regression und in Abbildung b) durch Bland-Altman Plot dargestellt.

Weitere Daten aus der externen Qualitätskontrolle der DGKL/ RfB (Deutschland) werden in der Tabelle 6 gezeigt. Die Abweichung vom methodenspezifischen Mittelwert beträgt durchschnittlich -17%, die vom methodenübergreifenden Mittelwert -19%. Die Abweichung liegt damit innerhalb der Annahmekriterien der DGKL/ RfB ( $\leq 30$  %).

**Tab. 6** Externe Qualitätsbewertungsschema DGKL / RfB Deutschland retrospektive Analyse von 2013/2014 Proben.

| DGKL EQA                  |         | Mittelwert | HP1/14 | HP4/13 | HP3/13 | HP2/13 | HP1/13 |
|---------------------------|---------|------------|--------|--------|--------|--------|--------|
| Messwert [ng/mL]          | Probe A | -          | 3608   | 3778   | 3163   | 3222   | 3144   |
| Zielwert [ng/mL]          | Probe A | -          | 3377   | 3723   | 3532   | 3740   | 3889   |
| Mittelwert [ng/mL]        | Probe A | -          | 3948   | 3899   | 3825   | 3826   | 3922   |
| $\Delta$ A Zielwert [%]   | Probe A | -15.76     | 6.83   | 1.47   | -10.46 | -13.85 | -19.16 |
| $\Delta$ A Total Mean [%] | Probe A | -17.82     | -8.62  | -3.11  | -17.32 | -15.79 | -19.84 |
| DGKL EQA                  |         | Mittelwert | HP1/14 | HP4/13 | HP3/13 | HP2/13 | HP1/13 |
| Messwert [ng/mL]          | Probe B | -          | 3101   | 3588   | 3243   | 3098   | 3149   |
| Zielwert [ng/mL]          | Probe B | -          | 3422   | 4008   | 3360   | 4170   | 3618   |
| Mittelwert [ng/mL]        | Probe B | -          | 3941   | 3864   | 3846   | 3857   | 3873   |
| $\Delta$ B Zielwert [%]   | Probe B | -18.84     | -9.38  | -10.47 | -3.47  | -25.71 | -12.97 |
| $\Delta$ B Total Mean [%] | Probe B | -19.19     | -21.32 | -7.14  | -15.67 | -19.68 | -18.70 |

## TABLE OF CONTENTS

|                |                                               |           |
|----------------|-----------------------------------------------|-----------|
| <b>ENGLISH</b> | <b>Instructions for use</b> .....             | <b>21</b> |
| <b>1</b>       | <b>INTENDED USE</b> .....                     | <b>21</b> |
| <b>2</b>       | <b>INTRODUCTION</b> .....                     | <b>21</b> |
| <b>3</b>       | <b>ASSAY PRINCIPLE</b> .....                  | <b>23</b> |
| <b>4</b>       | <b>WARNINGS AND PRECAUTIONS</b> .....         | <b>24</b> |
| <b>5</b>       | <b>SAMPLES</b> .....                          | <b>25</b> |
| <b>6</b>       | <b>MATERIALS</b> .....                        | <b>26</b> |
| <b>7</b>       | <b>TECHNICAL NOTES</b> .....                  | <b>27</b> |
| <b>8</b>       | <b>ASSAY PROCEDURE</b> .....                  | <b>28</b> |
| <b>9</b>       | <b>QUALITY CONTROL</b> .....                  | <b>29</b> |
| <b>10</b>      | <b>EVALUATION OF RESULTS</b> .....            | <b>29</b> |
| <b>11</b>      | <b>LIMITATION OF PROCEDURE</b> .....          | <b>31</b> |
| <b>12</b>      | <b>REFERENCE VALUES</b> .....                 | <b>32</b> |
| <b>13</b>      | <b>PERFORMANCE CHARACTERISTICS</b> .....      | <b>33</b> |
| <b>14</b>      | <b>COMPARISON WITH OTHER ASSAYS</b> .....     | <b>35</b> |
|                | <b>LITERATUR / REFERENCES</b> .....           | <b>36</b> |
|                | <b>Internationale Assay Description</b> ..... | <b>40</b> |

| IGFBP-3 ELISA                            | 96 Determinations                                                                                                                                                                                             |
|------------------------------------------|---------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|
| CE                                       | DE/CA40/00809/22                                                                                                                                                                                              |
| Principle of the test                    | Sandwich ELISA                                                                                                                                                                                                |
| Duration (incubation period)             | 2.5 h                                                                                                                                                                                                         |
| Antibody-HRP-Conjugate                   | ready for use                                                                                                                                                                                                 |
| Buffer and Substrate                     | ready for use                                                                                                                                                                                                 |
| Standards                                | 5 single standards: 0.4 - 30 ng/mL, lyophilized, human IGFBP-3                                                                                                                                                |
| Assay Range                              | 0.03 – 15150 ng/mL                                                                                                                                                                                            |
| Control                                  | 2 control sera, lyophilised                                                                                                                                                                                   |
| Sample                                   | human serum / plasma                                                                                                                                                                                          |
| Required sample volume                   | 10 µL                                                                                                                                                                                                         |
| Sample dilution                          | 1:505                                                                                                                                                                                                         |
| Analytical sensitivity                   | 0.03 ng/mL                                                                                                                                                                                                    |
| average<br>Intra- / Inter-Assay Variance | 1.9% / 5.7%                                                                                                                                                                                                   |
| Reference Values                         | Blum W.F et.al.1990 Insulin-Like Growth Factors and Their Binding Proteins. In: Ranke MB, Mullins P.E.(ed):<br>Diagnostics of Endocrine Function in Children and Adolescents. Basel, Karger, 2011, pp.157-181 |

## 1 INTENDED USE

This enzyme immunoassay kit is suited for measuring IGFBP-3 in human serum, EDTA and Heparin-plasma for diagnostic and scientific purposes.

## 2 INTRODUCTION

Insulin-like growth factors (IGF)-I and -II are bound to specific binding proteins (IGFBPs) in the circulation. To date, at least six binding proteins can be distinguished on the basis of their amino acid sequence. They are designated as IGFBP-1, IGFBP-2, ... IGFBP-6 (1). The predominating IGFBP in blood is IGFBP-3, which largely determines the total IGF-I and IGF-II concentration. In contrast to the other binding proteins, IGFBP-3 has the property to associate with an acid-labile subunit (ALS) after binding of either IGF-I or IGF-II (3-5). Most of the IGFBP-3 in plasma is present as high molecular weight ternary complex, however, small amounts of free IGFBP-3 are also found (6,7).

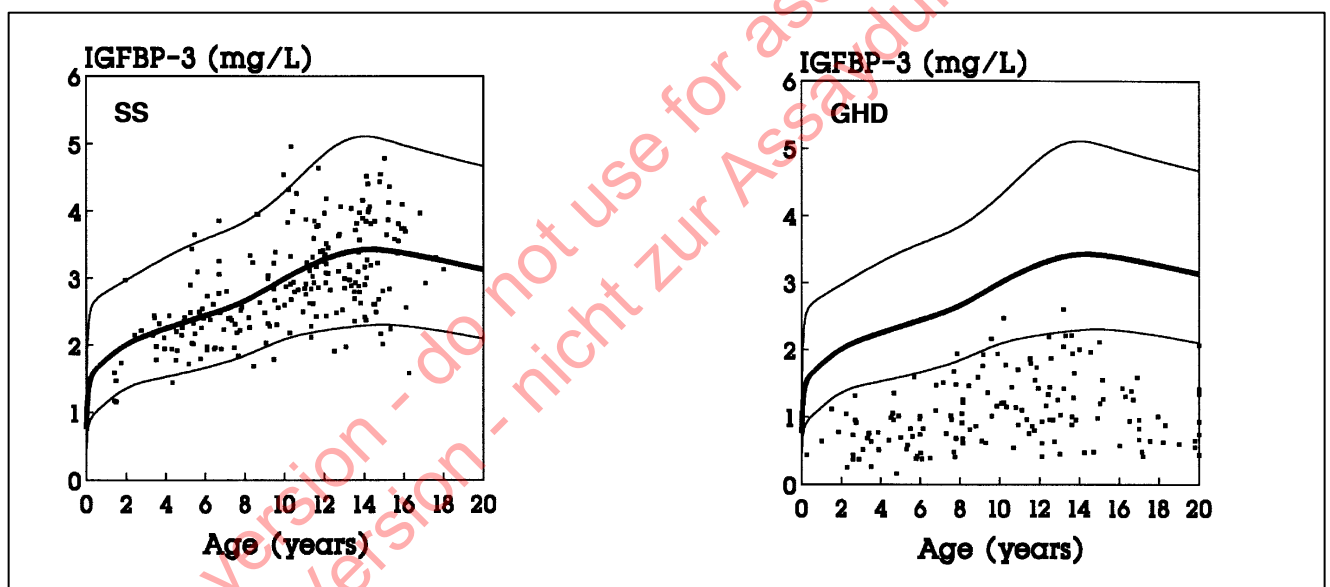
The development of a specific immunoassays for IGFBP-3, which detects IGFBP-3 in the ternary complex, provided new in-sights into IGFBP-3 regulation (6-9). On the basis of these findings serum IGFBP-3 has been proven to be an additional useful test in the repertoire of diagnostic tools for evaluation of growth disorders (7,8).

Several factors besides GH influence IGFBP-3 levels: age including sexual development, nutrition, hypothyroidism, diabetes mellitus, liver function and kidney function. IGFBP-3 levels are decreased by malnutrition, although less than IGF-I, in hypothyroidism, in diabetes mellitus and in hepatic failure (6-8), but are increased in chronic renal failure (6,10,11). Measurement over 24 hours revealed no circadian rhythm (12,13). For clinical practice, the most important regulatory factor is GH. Single IGFBP-3 measurements correlate significantly

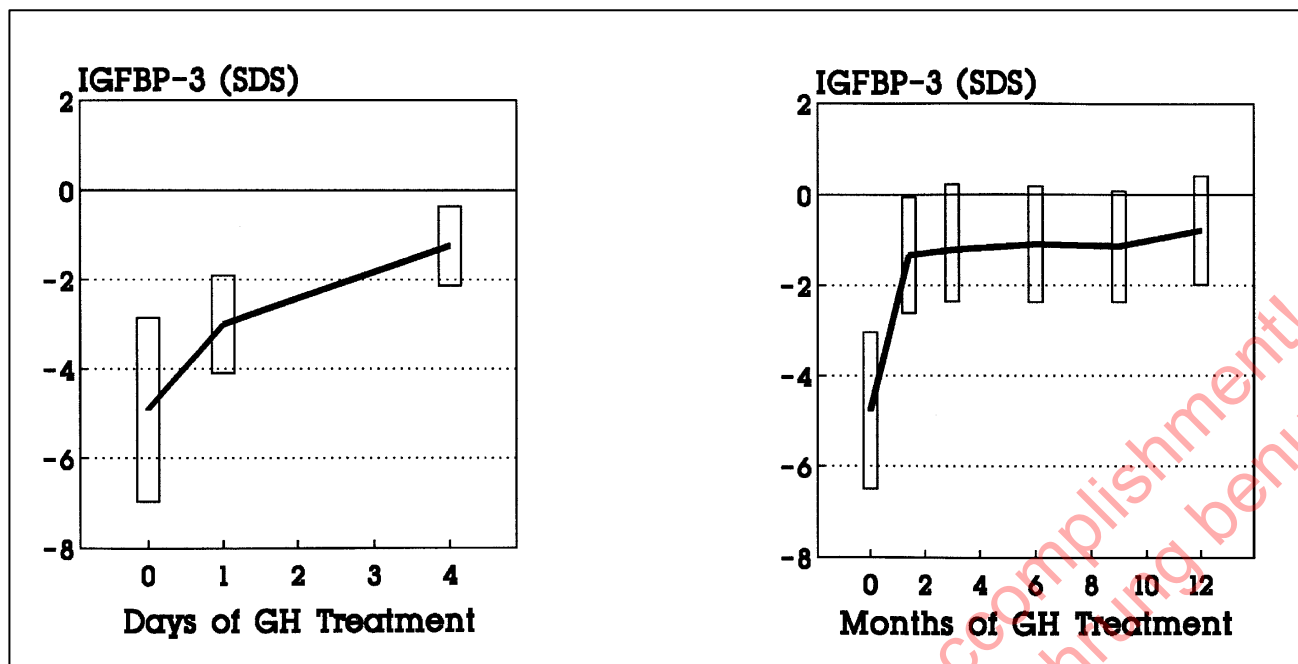
with the logarithm of the integrated spontaneous GH secretion (8,14). In patients with GH deficiency, IGFBP-3 levels are subnormal and increase gradually to within the normal range after several days of GH administration (7,8). The slow response to GH and constant circadian levels during chronic daily application of GH (13) suggest that IGFBP-3 reflects the GH secretory state over days.

The major advantages of IGFBP-3 over IGF-I are:

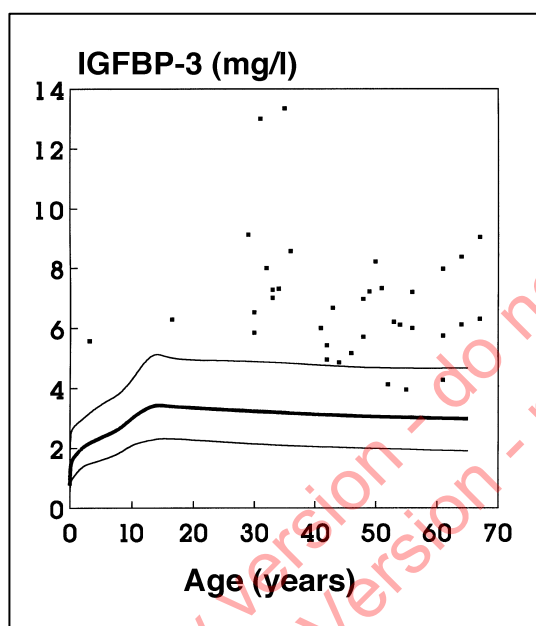
1. No extraction step is required prior to measurement thus improving test accuracy by simplifying the assay procedure.
2. The normal range in young children is comparatively high making the detection of subnormal levels more reliable.
3. Patients with GH deficiency have subnormal IGFBP-3 levels. In contrast, most of the small statured children with normal GH secretion have levels within the normal range (Figure 1). The separation of these two groups is easy. In small statured children IGFBP-3 levels rise to normal range within several days of GH administration and remain normal during continuous GH treatment (Figure 2). Therefore, serum IGFBP-3 measurements are also suited for evaluating the potential of a patient to respond to GH and for GH therapy monitoring (19). In other patients of severe short stature, e.g. Ullrich-Turner syndrome or Silver-Russell syndrome, IGFBP-3 levels were found normal (8) reflecting normal GH secretion.



**Fig. 1:** Serum IGFBP-3 levels in patients with short stature without GH deficiency (SS: constitutional delay of growth and adolescence, familial short stature, intra-uterine growth retardation) and in idiopathic or organic GH deficiency (GHD). The normal range is given by the 5th, 50th and 95th percentile.



**Fig. 2:** IGFBP-3 levels in GH deficient children before and during GH treatment. Because of the age-dependence, values are given as the mean of standard deviation scores (SDS).



**Fig. 3:** Serum IGFBP-3 levels in acromegaly. The normal range is given by the 5th, 50th and 95th percentile.

In normal tall children and adolescents without excessive GH secretion or in patients with Sotos syndrome, IGFBP-3 levels are normal or slightly increased. In contrast, children with pituitary gigantism or adults with acromegaly have clearly elevated levels (Figure 3) (6,15) that normalize on successful treatment. Therefore, IGFBP-3 is also a useful parameter for the detection of excessive GH secretion and monitoring therapy efficacy. In precocious puberty, IGFBP-3 levels are clearly increased by chronological age, whereas patients with premature thelarche have IGFBP-3 levels in the upper normal range (15).

### 3 ASSAY PRINCIPLE

The Mediagnost ELISA for IGFBP-3 E03A is a so-called Sandwich-Assay. It utilizes two specific antibodies of high affinity. First the IGFBP-3 in the sample binds to the immobilized antibody on the microtiter plate. In the following step, the complex of biotinylated anti-IGFBP-3-Antibody and Streptavidin-Peroxidase binds in turn to the immobilised IGFBP-3. Subsequently, the peroxidase catalyzes an enzymatic reaction resulting in a blue coloration. The intensity of the blue color depends on the IGFBP-3 content of the sample. The reaction is stopped by the addition of stop solution and color intensity is quantified by measuring the absorption.

## 4 WARNINGS AND PRECAUTIONS

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

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

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

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

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

#### Human Serum

Following components contain human serum: **Control Sera KS1 / KS2, Standards A-E**

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 AK, VP, WP

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

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

#### Substrate 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+ P338 IF IN EYES: Rinse cautiously with water for several minutes. Remove contact lenses, if present and easy to do. Continue rinsing.

#### Stopping Solution (SL)

The Stopping solution contains 0.2 M acid sulphur acid (H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>)

- 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+ P331 IF SWALLOWED: rinse mouth. Do NOT induce vomiting.
- P305+P351+ P338 IF IN EYES: Rinse cautiously with water for several minutes. Remove contact lenses, if present and easy to do. Continue rinsing.
- P309+P310 IF exposed or if you feel unwell: Immediately call a POISON CENTER or doctor/physician.

### 4.1 General first aid procedures:

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

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

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

## 5 SAMPLES

### 5.1 Sample type

Serum and Plasma

Serum and Heparin/EDTA Plasma yield comparable values.

### 5.2 Specimen collection

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

### 5.3 Required sample volume: 10 µL

### 5.4 Sample stability

In firmly closable sample vials

- Storage at 20-25°C: 3 days
- Storage at -20° C: min. 2 years
- Freeze-thaw cycles max. 10

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. 10 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, 100 µg/mL or 5 mg/mL, respectively. However, the use of haemolytic, lipemic or icteric samples should be validated by the user.

### 5.6 Sample dilution

- Dilution: **1:505** with Sample Buffer **PP**
- Pipette **1 ml Sample Buffer PP** (red colored) in PE-/PP-Tubes (application of a multi-stepper is recommended in larger series), add **10 µL Serum-** or **Plasma** (dilution factor 101). Add **400 µL Sample Buffer PP** in another PE-/PP-tube and **100 µL** of the thoroughly mixed first dilution (dilution factor 5). After mixing use **50 µL** of this 1:505 diluted solution **within 1 hour per determination** in the assay.
- Sample stability after dilution of the sample: maximum 1 hour at 20-25°C.

## 6 MATERIALS

### 6.1 Materials provided

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

|                                                                                     |                                                                                                                                          |                     |
|-------------------------------------------------------------------------------------|------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|---------------------|
| <b>MTP</b>                                                                          | <b>Microtiter plate</b> , ready for use, coated with rabbit-anti-hIGFBP-3-antibody. Wells are separately breakable.                      | <b>(8x12) wells</b> |
| <b>A-E</b>                                                                          | <b>Standards</b> , lyophilized, (human IGFBP-3), concentrations are given on vial labels and on the QC-certificate.                      | <b>5 x 1 mL</b>     |
| <b>KS1</b>                                                                          | <b>Control Serum 1</b> , lyophilised, (human serum), concentration is given on the QC-certificate.                                       | <b>1 x 250 µL</b>   |
| <b>KS2</b>                                                                          | <b>Control Serum 2</b> , lyophilised, (human serum), concentration is given on the QC-certificate.                                       | <b>1 x 250 µL</b>   |
| <b>AK</b>                                                                           | <b>Antibody-HRP-Conjugate</b> , ready for use, contains rabbit biotinylated anti-hIGFBP-3 antibody.                                      | <b>1 x 12 mL</b>    |
| <b>PP</b>                                                                           | <b>Sample Buffer</b> , red color, ready for use,<br><b>Please shake before use!</b>                                                      | <b>1 x 120 mL</b>   |
| <b>VP</b>                                                                           | <b>Dilution Buffer</b> , ready for use,<br><b>Please shake before use!</b>                                                               | <b>1x 30 mL</b>     |
| <b>WP</b>                                                                           | <b>Washing Buffer</b> , 20-fold concentrated solution                                                                                    | <b>1 x 50 mL</b>    |
| <b>S</b>                                                                            | <b>Substrate</b> , ready for use, horseradish-peroxidase-(HRP) substrate, stabilised H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> Tetramethylbencidine. | <b>1 x 12 mL</b>    |
| <b>SL</b>                                                                           | <b>Stopping Solution</b> , ready for use, 0.2 M sulphuric acid.                                                                          | <b>1 x 12 mL</b>    |
| -                                                                                   | <b>Sealing Tape</b> , for covering the <b>microtiter plate</b> .                                                                         | <b>2 x</b>          |
|  | <b>Instructions for use</b>                                                                                                              | <b>1 x</b>          |
| --                                                                                  | <b>Quality Control Certificate</b>                                                                                                       | <b>1 x</b>          |

### 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  $\geq 590$  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 Controls **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 Sera **KS1** and **KS2** with the Sample Buffer **PP** in the same ratio (1:505) 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**, Control Serum **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-HRP-Conjugate **AK** 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 Sera **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 H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>-Tetramethylbenzidine, is photosensitive—store and incubation in the dark.

### Shaking

The incubation steps should be performed at mean rotation frequency of a particularly suitable microtiter plate shaker. We are recommending 350 rpm. Due to certain technical differences deviations may occur, in case the rotation frequency must be adjusted. Insufficient shaking may lead to inadequate mixing of the solutions and thereby to low optical densities, high variations and/ or false values, excessive shaking may result in high optical densities and/ or false values.

### Washing

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

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

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

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

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

## 8 ASSAY PROCEDURE

| Preparation of reagents                                                |                                                                                          | Reconstitution:                                     | Dilution             |
|------------------------------------------------------------------------|------------------------------------------------------------------------------------------|-----------------------------------------------------|----------------------|
| A-E                                                                    | Standards                                                                                | in 1 mL Sample Buffer PP                            | -                    |
| KS1                                                                    | Control Serum 1                                                                          | in 250 µL Sample Buffer PP                          | 1:505 with PP        |
| KS2                                                                    | Control Serum 2                                                                          | in 250 µL Sample Buffer PP                          | 1:505 with PP        |
| WP                                                                     | Washing Buffer                                                                           | -                                                   | 1:20 with Aqua dest. |
| Sample dilution: with Sample Buffer PP 1:505                           |                                                                                          |                                                     |                      |
| Before assay procedure bring all reagents to room temperature 20-25°C. |                                                                                          |                                                     |                      |
| Assay Procedure in Double Determination:                               |                                                                                          |                                                     |                      |
| Pipette                                                                | Reagents                                                                                 | Position                                            |                      |
| 50 µL                                                                  | Dilution Buffer VP                                                                       | Pipette in <u>all</u> required number of wells      |                      |
| 50 µL                                                                  | Sample Buffer PP as Blank                                                                | A1/A2                                               |                      |
| 50 µL                                                                  | Standard A (0.4 ng/mL)                                                                   | B1/B2                                               |                      |
| 50 µL                                                                  | Standard B (2 ng/mL)                                                                     | C1/C2                                               |                      |
| 50 µL                                                                  | Standard C (6 ng/mL)                                                                     | D1/D2                                               |                      |
| 50 µL                                                                  | Standard D (15 ng/mL)                                                                    | E1/E2                                               |                      |
| 50 µL                                                                  | Standard E (30 ng/mL)                                                                    | F1/F2                                               |                      |
| 50 µL                                                                  | Control Serum KS 1 (1:505 diluted)                                                       | G1/G2                                               |                      |
| 50 µL                                                                  | Control Serum KS 2 (1:505 diluted)                                                       | H1/G2                                               |                      |
| 50 µL                                                                  | Sample (1:505 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                             |                                                                                          |                                                     |                      |
| 5 x 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                                                                 | Antibody-POD-Conjugate AK                                                                |                                                     | In each well         |
| Cover the wells with the sealing tape.                                 |                                                                                          |                                                     |                      |
| Incubation: 1 hour at 20-25°C, 350 rpm                                 |                                                                                          |                                                     |                      |
| 5 x 300 µL                                                             | Aspirate the contents of the wells and wash 5 x with 300 µL each Washing Buffer WP/ well |                                                     | In each well         |
| 100 µL                                                                 | Substrate Solution S                                                                     |                                                     | In each well         |
| Incubation: 30 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

### 10.1 Establishing of the standard curve

The standards provided contain the following concentrations of hIGFBP-3

| Standard | A   | B | C | D  | E  |
|----------|-----|---|---|----|----|
| ng/mL    | 0.4 | 2 | 6 | 15 | 30 |

- 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 IGFBP-3 concentration in ng/mL (or pg/mL, according the chosen unit for the standards) 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   | 0.4   | 2     | 6     | 15    | 30    |
| OD <sub>(450-620 nm)</sub> | 0.204 | 0.254 | 0.453 | 0.911 | 1.706 | 2.390 |

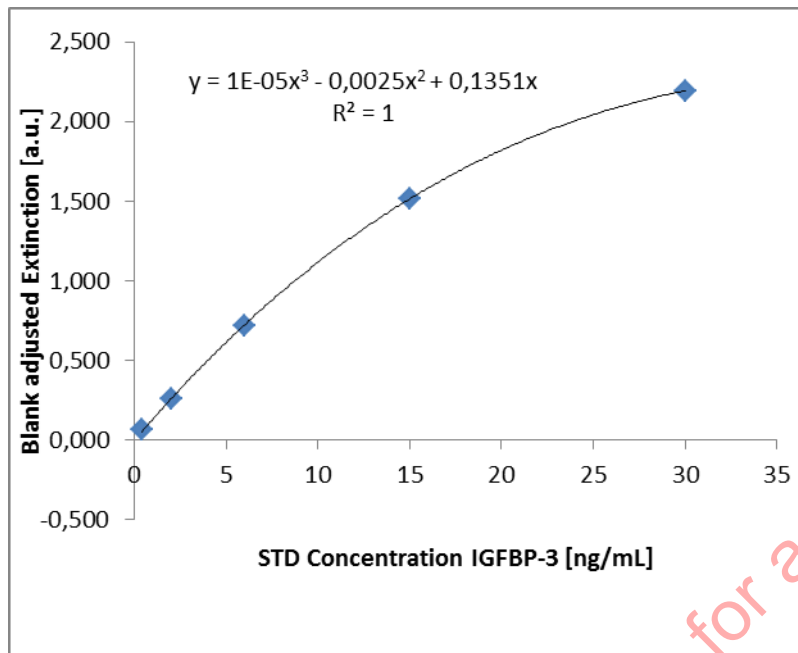


Fig. 4: Exemplary standard curve

The exemplary shown standard curve in Figure 4 **cannot** be used for calculation of your test results. You have to establish a standard curve for each test you conduct!

## 10.3 Exemplary calculation of IGFBP-3 concentrations

Sample dilution: 1:505

|                                    |       |
|------------------------------------|-------|
| Measured extinction of your sample | 0.975 |
| Measured extinction of the blank   | 0.204 |

Your measurement program will calculate the IGFBP-3 concentration of the diluted sample automatically by using the difference of sample and blank for the calculation. You only have to determine the most suitable curve fit (here: polynomial  $x^{\text{rd}}$  degree).

In this exemplary case the following equation is solved by the program to calculate the IGFBP-3 concentration in the sample:

$$0.771 = 1\text{E-}05x^3 - 0.0025x^2 + 0.1351x$$

$$6.617 = x$$

If the dilution factor (**1:505**) is taken into account the IGFBP-3 concentration of the undiluted sample is

$$6.617 \text{ ng/mL} \times 505 = 3342 \text{ ng/mL} = 3,342 \text{ mg/L}$$

#### 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.

#### 11 LIMITATION OF PROCEDURE

IGFBP-3 levels are strongly dependent on GH secretion. However, a number of factors influence its plasma concentration and should be taken into account for appropriate interpretation. Plasma levels decrease during fasting (more than 1 day), in malnutrition, malabsorption, cachexia, impaired hepatic function, hypothyroidism, and diabetes mellitus. They may also be decreased in chronic inflammatory disease and malignancy. Levels are increased in states of impaired renal function and precocious puberty. In clinical situations with hyperprolactinemia or in patients with craniopharyngeoma, normal levels may be observed despite GH deficiency.

In certain physiological (e.g. pregnancy) and pathological states, IGFBP-3 may be degraded to smaller molecular size compounds (16,17) by specific proteases which affect IGFBP patterns seen in Western ligand blotting, but in general only have little influence on the outcome of ELISA determinations. In case of special interest in this physiological process, the Mediagnost ELISA for **functional IGFBP-3 E04A** is available. The ELISA E04A enables to quantify the degree of IGFBP-3 fragmentation in samples.

The Mediagnost IGFBP-3 ELISA, E03A is based on polyclonal rabbit antibodies. Generally, this technique is sensible to heterophilic antibodies in the sample. The influence of heterophilic antibodies is reduced by assay design, but cannot be excluded completely.

## 12 REFERENCE VALUES

IGFBP-3-levels are strongly age-dependent in children, less so in adults. The normal ranges in various age-groups which were log-normally distributed are given in table 1 by the percentiles (see Appendix). A graphic presentation is shown in Figure 5 and 6. It is recommended for each laboratory to establish its own normal range.

**Tab. 1:** Serum levels of IGFBP-3 in healthy subjects at various ages. Individuals between 7 and 17 years of age were classified according to gender, as the pubertal peak occurs almost 2 years earlier in girls than in boys.

| Age group   | Percentiles |      |      |      |      |      |      |      |      |      |      |      |      |      |
|-------------|-------------|------|------|------|------|------|------|------|------|------|------|------|------|------|
|             | 0.1         | 1    | 5    | 10   | 20   | 30   | 40   | 50   | 60   | 70   | 80   | 90   | 95   | 99   |
| 0-1 week    | 0.25        | 0.33 | 0.42 | 0.48 | 0.57 | 0.64 | 0.70 | 0.77 | 0.85 | 0.93 | 1.05 | 1.23 | 1.41 | 1.81 |
| 1-4 weeks   | 0.49        | 0.62 | 0.77 | 0.86 | 0.99 | 1.10 | 1.19 | 1.29 | 1.40 | 1.52 | 1.68 | 1.93 | 2.16 | 2.68 |
| 1-3 months  | 0.55        | 0.70 | 0.87 | 0.98 | 1.13 | 1.25 | 1.36 | 1.48 | 1.61 | 1.75 | 1.94 | 2.23 | 2.52 | 3.14 |
| 3-6 months  | 0.64        | 0.80 | 0.98 | 1.10 | 1.25 | 1.38 | 1.49 | 1.61 | 1.74 | 1.88 | 2.07 | 2.37 | 2.65 | 3.24 |
| 6-12 months | 0.71        | 0.88 | 1.07 | 1.19 | 1.35 | 1.48 | 1.60 | 1.72 | 1.85 | 2.00 | 2.19 | 2.49 | 2.76 | 3.36 |
| 1-3 years   | 1.02        | 1.21 | 1.41 | 1.53 | 1.69 | 1.82 | 1.94 | 2.05 | 2.17 | 2.31 | 2.48 | 2.74 | 2.98 | 3.47 |
| 3-5 years   | 1.08        | 1.30 | 1.52 | 1.66 | 1.84 | 1.99 | 2.12 | 2.25 | 2.39 | 2.55 | 2.75 | 3.05 | 3.33 | 3.91 |
| 5-7 years   | 1.19        | 1.42 | 1.66 | 1.81 | 2.01 | 2.16 | 2.30 | 2.44 | 2.59 | 2.76 | 2.97 | 3.29 | 3.59 | 4.2  |
| 7-9 y.      | boys        | 1.25 | 1.48 | 1.73 | 1.88 | 2.07 | 2.22 | 2.36 | 2.50 | 2.65 | 2.81 | 3.02 | 3.33 | 3.61 |
|             | girls       | 1.36 | 1.61 | 1.88 | 2.04 | 2.25 | 2.42 | 2.57 | 2.72 | 2.88 | 3.06 | 3.28 | 3.62 | 3.94 |
| 9-11 y.     | boys        | 1.47 | 1.73 | 1.99 | 2.15 | 2.36 | 2.52 | 2.66 | 2.81 | 2.96 | 3.14 | 3.35 | 3.67 | 3.97 |
|             | girls       | 1.56 | 1.90 | 2.20 | 2.38 | 2.62 | 2.80 | 2.96 | 3.13 | 3.30 | 3.50 | 3.75 | 4.11 | 4.45 |
| 11-13 y.    | boys        | 1.58 | 1.88 | 2.19 | 2.38 | 2.63 | 2.82 | 3.00 | 3.18 | 3.37 | 3.58 | 3.84 | 4.25 | 4.62 |
|             | girls       | 1.62 | 1.90 | 2.24 | 2.46 | 2.74 | 2.97 | 3.17 | 3.38 | 3.60 | 3.85 | 4.17 | 4.65 | 5.10 |
| 13-15 y.    | boys        | 1.62 | 1.89 | 2.24 | 2.46 | 2.76 | 2.99 | 3.20 | 3.42 | 3.65 | 3.91 | 4.24 | 4.75 | 5.22 |
|             | girls       | 1.69 | 2.03 | 2.39 | 2.61 | 2.91 | 3.14 | 3.35 | 3.56 | 3.79 | 4.04 | 4.36 | 4.85 | 5.30 |
| 15-17 y.    | boys        | 1.70 | 2.02 | 2.36 | 2.57 | 2.84 | 3.05 | 3.25 | 3.44 | 3.65 | 3.88 | 4.17 | 4.61 | 5.01 |
|             | girls       | 1.62 | 1.93 | 2.26 | 2.46 | 2.73 | 2.93 | 3.12 | 3.31 | 3.51 | 3.74 | 4.02 | 4.45 | 4.85 |
| 17-20 y.    |             | 1.58 | 1.90 | 2.24 | 2.45 | 2.72 | 2.94 | 3.13 | 3.33 | 3.54 | 3.78 | 4.07 | 4.53 | 4.95 |
| 20-30 y.    |             | 1.55 | 1.86 | 2.20 | 2.41 | 2.68 | 2.90 | 3.09 | 3.29 | 3.50 | 3.74 | 4.04 | 4.50 | 4.92 |
| 30-40 y.    |             | 1.44 | 1.75 | 2.08 | 2.29 | 2.56 | 2.78 | 2.98 | 3.18 | 3.39 | 3.64 | 3.95 | 4.42 | 4.86 |
| 40-50 y.    |             | 1.38 | 1.68 | 2.01 | 2.21 | 2.48 | 2.69 | 2.88 | 3.08 | 3.29 | 3.53 | 3.83 | 4.29 | 4.72 |
| 50-60 y.    |             | 1.34 | 1.64 | 1.96 | 2.16 | 2.42 | 2.63 | 2.83 | 3.02 | 3.23 | 3.46 | 3.76 | 4.22 | 4.65 |
| 60-70 y.    |             | 1.28 | 1.58 | 1.90 | 2.10 | 2.37 | 2.58 | 2.78 | 2.98 | 3.19 | 3.44 | 3.75 | 4.23 | 4.67 |
| 70-80 y.    |             | 1.20 | 1.50 | 1.81 | 2.00 | 2.27 | 2.47 | 2.67 | 2.87 | 3.08 | 3.32 | 3.62 | 4.09 | 4.52 |
| > 80 y      |             | 1.13 | 1.43 | 1.73 | 1.92 | 2.19 | 2.39 | 2.59 | 2.79 | 3.00 | 3.23 | 3.54 | 4.00 | 4.44 |

Serum levels are given as mg/L  
y. = years

Determined with IGFBP-3 RIA (Blum et al. 1990)  
The values above 70 years are extrapolated.

Serum conc. according to age

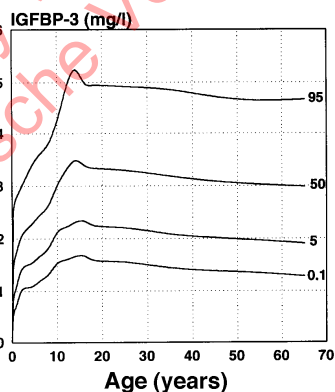


Fig. 5: Age-dependant normal values of IGFBP-3 (presented as 0.1., 5., 50., and 95. percentile)

Children and adolescents

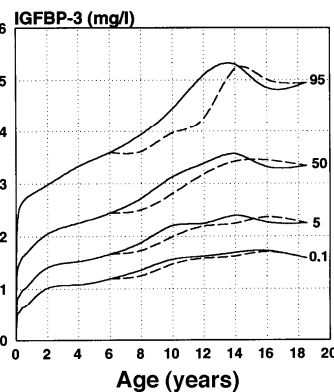


Fig. 6: Normal values of children and adolescents (girls — boys - - -)

## 13 PERFORMANCE CHARACTERISTICS

### 13.1 Sensitivity

Sensitivity was assessed by measuring the blank and calculating the theoretical concentration of the 2fold standard deviation of the blank. The analytical sensitivity of the E03A is 0.03 ng/mL.

According ICH Q2 R1 (CPMP/ICH/381/95) the limit of quantification (LoQ) is reflected by the recalculated IGFBP-3 concentration of the 10fold standard deviation of the blank, which therewith is 0.15 ng/mL.

### 13.2 Specificity

The cross-reactivity of the antibodies used for Mediagnost IGFBP-3 ELISA to homologous proteins was evaluated by diluting IGFBP-1, -2,-4,-5 and -6 in assay buffer to a concentration of 200 ng/mL and subsequent measurement of IGFBP-3. The relative cross-reactivities were  $\leq 0.125\%$ .

### 13.3 Reproducibility and Precision

#### Intra-Assay-Variation

One sample has been measured 10 times in the same assay. The results are shown in table 2. The measured coefficient of variation (CV) is on average 1.9%

**Tab. 2:** Intra-Assay-Variation. Three exemplary serum samples were diluted and measured 10 times within one assay.

|              | Sample 1 | Sample 2 | Sample 3 |
|--------------|----------|----------|----------|
| Mean [ng/mL] | 3630     | 3789     | 3016     |
| SD           | 70.83    | 83.75    | 46.71    |
| %CV          | 1.95     | 2.21     | 1.55     |
| n            | 10       | 10       | 10       |

#### Inter-assay-Variation

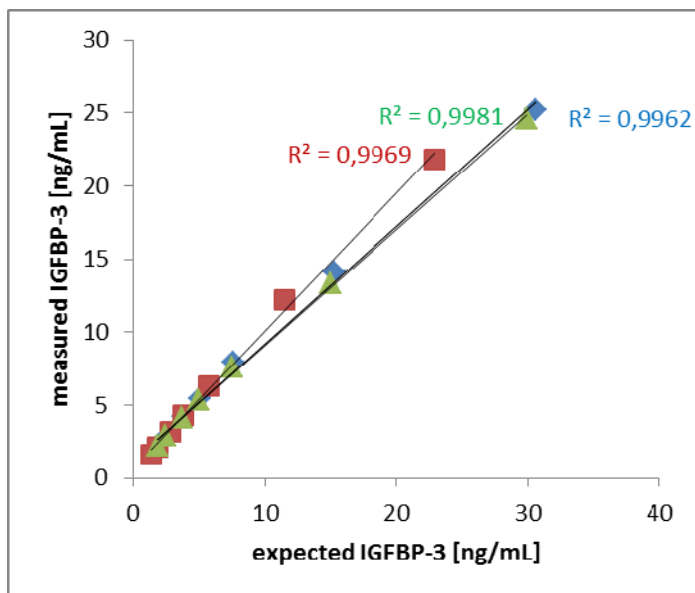
Serum samples were measured in independent assays on different days. On average the coefficient of variation was 5.7%. Results are shown in detail in table 3.

**Tab. 3:** Inter-Assay-Variation. Serum samples were diluted as recommended (1:505) and IGFBP-3 concentration was measured in different independent assays.

|              | Sample 1 | Sample 2 | Sample 3 | Sample 4 | Sample 5 | Sample 6 | Sample 7 | Sample 8 |
|--------------|----------|----------|----------|----------|----------|----------|----------|----------|
| Mean [ng/mL] | 2886     | 3525     | 3229     | 3219     | 4025     | 3293     | 3889     | 4328     |
| SD           | 193      | 178      | 140      | 237      | 171      | 177      | 199      | 322      |
| %CV          | 6.68     | 5.05     | 4.34     | 7.36     | 4.25     | 5.38     | 5.12     | 7.44     |
| n            | 4        | 10       | 9        | 7        | 10       | 10       | 7        | 10       |

### 13.4 Linearity

Linearity was proven by dilution of three different serum samples with known IGFBP-3 concentration. The IGFBP-3 concentration of the diluted sample was measured and compared with the concentration expected. Results of linear regression analysis are shown in Figure 7. None of IGFBP-3 concentrations of the dilutions (1:125 to 1:2000) deviated more than 20% of the expected value ( $\leq -17\%$ ).



**Fig. 7: Linearity.** Shown are the measured concentrations in different dilutions of three serum samples.

### 13.5 Recovery

Serum and plasma samples were enriched with recombinant IGFBP-3 and the recovery was calculated in comparison to buffer enriched with the same amount of IGFBP-3. The native samples used had an IGFBP-3 concentration of 2684 to 3667 ng/mL and the relative recovery was 109 – 118%. Results are shown in Table 4.

**Tab. 4: Recovery [%]** of recombinant IGFBP-3 in native serum/plasma samples in comparison to recombinant IGFBP-3 in buffer.

| IGFBP-3  |        | Sample [ng/mL] | Sample enriched [ng/mL] | Target value [ng/mL] | Recovery [%] |
|----------|--------|----------------|-------------------------|----------------------|--------------|
| Sample 1 | Plasma | 3641           | 5107                    | 4324                 | 118          |
| Sample 2 | Plasma | 3667           | 4778                    | 4350                 | 110          |
| Sample 3 | Serum  | 2869           | 3778                    | 3552                 | 106          |
| Sample 4 | Serum  | 2684           | 3677                    | 3367                 | 109          |

### 13.6 Interference

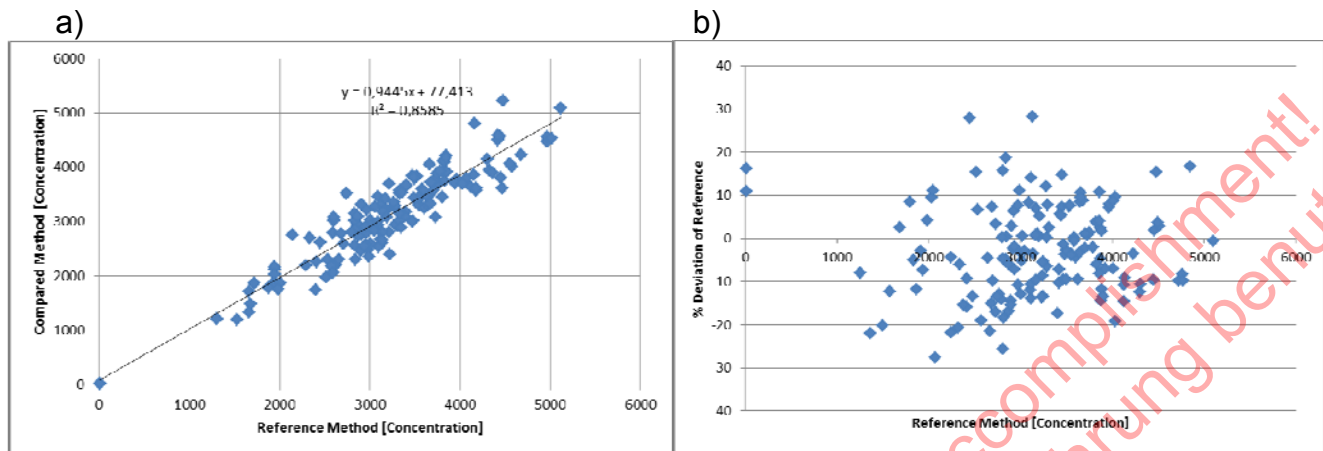
Interference of physiological appearing substance with the IGFBP-3 measurement was investigated. Serum samples have been enriched with different concentrations of possibly interfering substances and the amount of IGFBP-3 was measured and compared with the IGFBP-3 concentration in the same sample without any enrichment. In Table 5 the relative results are shown. None of the tested substances interfered significantly with IGFBP-3 measurement.

**Tab. 5: Recovery [%]** in comparison to the native serum.

|          | Triglyceride<br>100 mg/mL | Bilirubin<br>100 µg/mL | Hemoglobin<br>5 mg/mL |
|----------|---------------------------|------------------------|-----------------------|
| Sample 1 | 89                        | 93                     | 81                    |
| Sample 2 | 87                        | 91                     | 106                   |
| Sample 3 | 88                        | 96                     | 93                    |

## 14 Comparison with other assays

The Mediagnost IGFBP-3 ELISA E03A was compared with the Mediagnost RIA test system (IGF-R10). In total 150 different samples with IGFBP-3 concentrations of 10 – 5118 ng/mL were used. The results are shown graphically in Figure 8. The relative deviation of Mediagnost RIA is on average 9.00% (0.18-28.29%).



**Fig. 8:** Comparison of Mediagnost RIA to Mediagnost IGFBP-3 ELISA E03A with Fab Detection Antibody. IGFBP-3 concentration was measured in 150 samples with both assays. Here results are analysed by linear regression analysis (a) and Bland-Altman plot (b).

Further, data resulting from the external quality assessment provided by DGKL/ RfB (Germany) are shown (Table 6). Here the deviation of the concentrations measured by Mediagnost IGFBP-3 ELISA E03A from the method-specific and method-independent target value is shown. The deviation of the Method-specific target value is -17% and the deviation of the method-independent target value is -19% on average, which is within the acceptance criteria of the DGKL/RfB ( $\leq 30\%$ ).

**Tab. 6: External Quality Assessment Scheme:**

DGKL/RfB Germany retrospective analysis of 2013/2014 samples.

| DGKL EQA                   |         | Mean   | HP1/14 | HP4/13 | HP3/13 | HP2/13 | HP1/13 |
|----------------------------|---------|--------|--------|--------|--------|--------|--------|
| Measured Value [ng/mL]     | Probe A | -      | 3608   | 3778   | 3163   | 3222   | 3144   |
| Target Value [ng/mL]       | Probe A | -      | 3377   | 3723   | 3532   | 3740   | 3889   |
| Total Mean[ng/mL]          | Probe A | -      | 3948   | 3899   | 3825   | 3826   | 3922   |
| $\Delta$ A Targetvalue [%] | Probe A | -15.76 | 6.83   | 1.47   | -10.46 | -13.85 | -19.16 |
| $\Delta$ A Total Mean [%]  | Probe A | -17.82 | -8.62  | -3.11  | -17.32 | -15.79 | -19.84 |
| DGKL EQA                   |         | Mean   | HP1/14 | HP4/13 | HP3/13 | HP2/13 | HP1/13 |
| Measured Value [ng/mL]     | Probe B | -      | 3101   | 3588   | 3243   | 3098   | 3149   |
| Target Value [ng/mL]       | Probe B | -      | 3422   | 4008   | 3360   | 4170   | 3618   |
| Total Mean [ng/mL]         | Probe B | -      | 3941   | 3864   | 3846   | 3857   | 3873   |
| $\Delta$ B Targetvalue [%] | Probe B | -18.84 | -9.38  | -10.47 | -3.47  | -25.71 | -12.97 |
| $\Delta$ B Total Mean [%]  | Probe B | -19.19 | -21.32 | -7.14  | -15.67 | -19.68 | -18.70 |

## 15 LITERATUR / REFERENCES

- 1) Ballard J, Baxter R, Binoux M, Clemmons D, Drop S, Hall K, Hintz R, Rechler M, Rutanen E, Schwander J (1989) On the nomenclature of the IGF binding proteins. *Acta Endocrinol (Copenh)* 121:751-752
- 2) 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
- 3) Baxter RC (1988) Characterization of the acid-labile subunit of the growth hormone-dependent insulin-like growth factor binding protein complex. *J Clin Endocrinol Metab* 67:265-272
- 4) Baxter RC, Martin JL (1989) Structure of the Mr 140,000 growth hormone dependent insulin-like growth factor binding protein complex: determination by reconstitution and affinity-labeling. *Proc Natl Acad Sci USA* 86:6898-6902
- 5) Holman SR, Baxter RC (1996) Insulin-like growth factor-binding protein-3: factors affecting binary and ternary complex formation. *Growth Regulation* 6: 42-47.
- 6) Baxter RC, Martin J (1986): Radioimmunoassay of growth hormone-dependent insulin-like growth factor binding protein in human plasma. *J Clin Invest* 78:1504-1512
- 7) Blum WF, Ranke MB, Kietzmann K, Gauggel E, Zeissel HJ, Bierich JR (1990) A specific radioimmunoassay for the growth hormone (GH)-dependent somatomedin-binding protein: its use for diagnosis of GH deficiency. *J Clin Endocrinol Metab* 70:1292-1298
- 8) Blum WF, Ranke MB (1990) Use of insulin-like growth factor binding protein 3 for the evaluation of growth disorders. *Horm Res* 34 (Suppl):31-37
- 9) Blum WF (1993) Insulin-like growth factor-binding protein 3: Entwicklung eines Radioimmunoassays und Untersuchungen zur klinischen Bedeutung. Habilitationsschrift, Tübingen.
- 10) Lee PDK, Hintz RL, Sperry JB, Baxter RC, Powell DR (1989) IGF-binding proteins in growth-retarded children with chronic renal failure. *Pediatr Res* 26:308-315
- 11) Blum WF, Ranke MB, Kietzmann K, Tönshoff B, Mehls O (1989) Excess of IGF-binding proteins in chronic renal failure: evidence for relative GH resistance and inhibition of somatomedin activity. In: Drop SLS, Hintz RL (eds) *Insulin-like Growth Factor Binding Proteins*. Excerpta Medica, Amsterdam, pp 93-101
- 12) Baxter RC, Cowell CT (1987) Diurnal rhythm of growth hormone-independent binding protein for insulin-like growth factors in human plasma. *J Clin Endocrinol Metab* 65:432-440
- 13) Jorgensen JOL, Blum WF, Moller N, Ranke MB, Christiansen JS (1990) Circadian patterns of serum insulin-like growth factor (IGF)-II and IGF-binding protein 3 in growth hormone deficient patients and age- and sex-matched normal subjects. *Acta Endocrinol (Copenh.)* 123:257-262
- 14) Blum WF, Albertsson-Wikland K, Rosberg S, Jorgensen JOL, Ranke MB (1990) Insulin-like growth factor binding protein 3 (IGFBP-3) reflects spontaneous growth hormone (GH) secretion. *Horm Res* 33 (Suppl 3): 3 (Abstract)
- 15) Blum WF, Ranke MB (1990) Insulin-like growth factor-binding proteins (IGFBPs) with special reference to IGFBP-3. *Acta Paediatr Scand (Suppl)* 367:55-62
- 16) Giudice LC, Farrell EM, Pham H, Lamson G, Rosenfeld RG (1990) Insulin-like growth factor binding proteins in maternal serum throughout gestation and in the puerperium: effects of a pregnancy-associated serum protease activity. *J Clin Endocrinol Metab* 71:806-816
- 17) Hossenlopp P, Segovia B, Lassarre C, Roghani M, Bredon M, Binoux M (1990) Evidence of enzymatic degradation of insulin-like growth factor-binding proteins in the 150k complex during pregnancy. *J Clin Endocrinol Metab* 71:797-805
- 18) 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* 2000;54:60-68

- 19) 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 2001;55:115-124
- 20) Langkamp M, Weber K, Kirschner M, Pridzun L, Ranke M.B. Validation of Functional insulin-Like Growth Factor Binding Protein-3 measurement by a Ligand Immunoassay. Clin Lab. 11+12/2010, 56; 535-542

Exemplary version - do not use for assay accomplishment!  
Exemplarische Version - nicht zur Assaydurchführung benutzen!

Exemplary version - do not use for assay accomplishment!  
Exemplarische Version - nicht zur Assaydurchführung benutzen!

Exemplary version - do not use for assay accomplishment!  
Exemplarische Version - nicht zur Assaydurchführung benutzen!

# Internationale Assay Description

|                                   |                               |               |        |                    |
|-----------------------------------|-------------------------------|---------------|--------|--------------------|
| A-E                               | STD                           | Rec in 1 mL   | BUF PP | -                  |
| KS1                               | Control                       | Rec in 250 µL | BUF PP | 1:505 DILU BUF PP  |
| KS2                               | Control                       | Rec in 250 µL | BUF PP | 1:505 DILU BUF PP  |
| WP                                | WASHBUF 20x                   | -             | -      | 1:20 DILU A. dest. |
| -                                 | SPE                           | -             | -      | 1:505 DILU BUF PP  |
| -                                 | °C 20-25 °C                   | -             | -      | -                  |
| 50 µL                             | BUF VP                        | -             | -      | A1 - End           |
| 50 µL                             | BUF PP                        | -             | -      | A1/A2              |
| 50 µL                             | STD A (0.4 ng/mL)             | -             | -      | B1/B2              |
| 50 µL                             | STD B (2 ng/mL)               | -             | -      | C1/C2              |
| 50 µL                             | STD C (6 ng/mL)               | -             | -      | D1/D2              |
| 50 µL                             | STD D (15 ng/mL)              | -             | -      | E1/E2              |
| 50 µL                             | STD E (30 ng/mL)              | -             | -      | F1/F2              |
| 50 µL                             | CONTROL KS1 1:505 DILU BUF PP | -             | -      | G1/G2              |
| 50 µL                             | CONTROL KS2 1:505 DILU BUF PP | -             | -      | H1/H2              |
| 50 µL                             | SPE 1:505 DILU BUF PP         | -             | -      | -                  |
| TAPE                              |                               |               |        |                    |
| 🕒 1 h °C 20-25 ↔ 350 rpm          |                               |               |        |                    |
| 5x 300 µL                         | 5x WASHBUF WP                 | -             | -      | -                  |
| 100 µL                            | Ab CONJ AK                    | -             | -      | -                  |
| TAPE                              |                               |               |        |                    |
| 🕒 1 h °C 20-25 ↔ 350 rpm          |                               |               |        |                    |
| 5x 300 µL                         | 5x WASHBUF WP                 | -             | -      | -                  |
| 100 µL                            | SUBST TMB S                   | -             | -      | -                  |
| 🕒 0.5 h °C 20-25 ☀️               |                               |               |        |                    |
| H <sub>2</sub> SO <sub>4</sub> SL |                               |               |        |                    |
| MEASURE                           |                               |               |        |                    |