



IGFBP-3-IRMA

KIP1171

Read entire protocol before use.

IGFBP-3-IRMA

I. INTENDED USE

Immunoradiometric assay kit for the in vitro quantitative determination of the Insulin-like Growth Factor Binding Protein-3 (IGFBP-3) in serum.

II. GENERAL INFORMATION

- A. **Proprietary name :** DIAsource IGFBP-3-IRMA Kit
- B. **Catalog number :** KIP1171 : 96 tests
- C. **Manufactured by :** DIAsource ImmunoAssays S.A.
Rue de l'Industrie, 8, B-1400 Nivelles, Belgium.

For technical assistance or ordering information contact :
Tel : +32 (0)67 88.99.99 Fax : +32 (0)67 88.99.96

III. CLINICAL BACKGROUND

The insulin-like growth factor (IGF) system is the primary regulator of normal body growth and regeneration, affecting cell proliferation, differentiation and apoptosis. In addition, the IGF-system appears to modify insulin sensitivity and long-term glucose metabolism. Finally, numerous epidemiological, experimental and clinical data indicate that the IGF-system is also involved in the development of several common cancers as well as frequent diseases such as atherosclerosis and type 2 diabetes mellitus.

The IGF-system consists of a family of closely related peptides, which includes the two primary growth promoting peptides, IGF-I and IGF-II, 6 specific high-affinity IGF-binding proteins (IGFBP-1 to -6), and a large non-IGF-binding glycoprotein, the "acid labile subunit" (ALS).

IGFBP-3 is the most abundant IGF-binding protein, accounting for as much as 75% or more of the circulating IGF-binding capacity in healthy subjects. IGFBP-3 shares functional properties with IGFBP-5 in that both peptides are able to form high molecular weight ternary complexes of ~150 kilo Dalton with ALS and either IGF-I or -II. However, IGFBP-5 circulates in much lower concentrations than IGFBP-3, and in healthy subjects the ternary complexes carry as much as 90% of IGFBP-3 but only about 50% of IGFBP-5.

Originally, the IGFBPs were thought to serve as IGF-carrier proteins, stabilizing plasma IGF levels and controlling the egress of IGF from the circulation to the extra-vascular compartment. Furthermore, it was assumed that IGFBP-complexed IGF was biologically more or less inactive, being deprived its ability to interact with the IGF-I receptor. However, it soon became apparent that in some experimental settings the IGFBPs stimulated rather than inhibited IGF-I mediated actions, and accordingly, the IGFBPs are now often referred to as *modulators* of IGF-I bioactivity. In addition, the majority of the IGFBPs, and in particular IGFBP-3, exerts IGF-I and IGF-I receptor independent effects, possible involving interactions with specific receptors located at the cell surface and intracellular. For example, IGFBP-3 is nowadays considered to serve as an anti-cancer molecule, apparently protecting against several common cancers, and effects of IGFBP-3 on insulin signaling in cultured adipocytes have also been suggested.

The turnover of the ternary complexes is very slow, and the plasma concentration of IGFBP-3 remains stable throughout the day, being unaffected by short-term nutritional changes. Thus, the level of IGFBP-3 may be determined by one single measurement. GH is the primary regulator of IGFBP-3 as well as of IGF-I and ALS and therefore, all three peptides increase during the pubertal growth spurt, where after levels gradually decline with increasing age. In children, IGFBP-3 has been shown to correlate with the 24-h integrated GH secretion and in particular in children IGFBP-3 may be helpful in the diagnosis of GH deficiency.

IV. PRINCIPLES OF THE METHOD

The DIASource IGFBP-3-IRMA is an immunoradiometric assay based on coated-tube. Mab1, the capture antibody, is attached to the lower and inner surface of the plastic tube. Calibrators or samples added to the tubes will at first show low affinity for Mab1. Addition of Mab2, the signal antibody labelled with ¹²⁵I, will complete the system and trigger the immunological reaction. After washing, the remaining radioactivity bound to the tube reflects the antigen concentration.

V. REAGENTS PROVIDED

Reagents	96 Test Kit	Colour Code	Reconstitution			
 Tubes coated with anti IGFBP-3(monoclonal antibody)	2 x 48	ivory	Ready for use			
<table border="1"><tr><td>Ab</td><td>¹²⁵I</td></tr></table> Anti-IGFBP-3- ¹²⁵ I (monoclonal antibody) in Tris Maleate buffer with bovine serum, azide (<0.1%) and inert red dye	Ab	¹²⁵ I	1 vial 5.5 ml 700 kBq	red	Ready for use	
Ab	¹²⁵ I					
<table border="1"><tr><td>CAL</td><td>N</td></tr></table> Calibrators 1-5 in Tris HCL buffer with bovine serum albumin and thymol. See exact value on vial labels. Calibrators are prediluted	CAL	N	5 vials lyophilised	yellow	Add 1.0 ml distilled water	
CAL	N					
<table border="1"><tr><td>DIL</td><td>BUF</td></tr></table> Dilution buffer: Tris HCL buffer with bovine albumin and azide (<0.1%)	DIL	BUF	1 vial 100 ml	green	Ready for use	
DIL	BUF					
<table border="1"><tr><td>WASH</td><td>SOLN</td><td>CONC</td></tr></table> Wash solution (TRIS-HCl)	WASH	SOLN	CONC	1 vial 10 ml	brown	Dilute 70 x with distilled water (use a magnetic stirrer).
WASH	SOLN	CONC				
<table border="1"><tr><td>CONTROL</td><td>N</td></tr></table> Controls - N = 1 or 2 in Tris HCL buffer with human serum and thymol Controls are prediluted	CONTROL	N	2 vials lyophilised	silver	Add 1.0 ml distilled water	
CONTROL	N					

Note: use the dilution buffer as zero calibrator.

VI. SUPPLIES NOT PROVIDED

The following material is required but not provided in the kit:

- 1. Distilled water
- 2. Pipettes for delivery of: 10 µl, 50 µl, 100 µl and 1 ml (the use of accurate pipettes with disposable plastic tips is recommended)
- 3. Plastic tubes for dilution of samples
- 4. Vortex mixer
- 5. Tube shaker (400 rpm)
- 6. Magnetic stirrer
- 7. 5 ml automatic syringe (Cornwall type) for washing
- 8. Aspiration system (optional)
- 9. Any gamma counter capable of measuring ¹²⁵I may be used (minimal yield 70%).

VII. REAGENT PREPARATION

- A. **Calibrators:** Reconstitute the calibrators with 1.0 ml distilled water.
- B. **Controls:** Reconstitute the controls with 1.0 ml distilled water.
- C. **Working Wash solution:** Prepare an adequate volume of Working Wash solution by adding 69 volumes of distilled water to 1 volume of Wash Solution (70x). Use a magnetic stirrer to homogenize. Discard unused Working Wash solution at the end of the day.

VIII. STORAGE AND EXPIRATION DATING OF REAGENTS

- Before opening or reconstitution, all kits components are stable until the expiry date, indicated on the label, if kept at 2 to 8°C.
- The calibrators and controls are very unstable, use them immediately after reconstitution, freeze immediately in aliquots and keep them at -20°C for maximum 3 months.
- Avoid subsequent freeze-thaw cycles.
- Freshly prepared Working Wash solution should be used on the same day.
- After its first use, tracer is stable until expiry date, if kept in the original well-closed vial at 2 to 8°C.
- Alterations in physical appearance of kit reagents may indicate instability or deterioration.

IX. SPECIMEN COLLECTION AND PREPARATION

- Serum samples must be kept at 2-8°C.
- If the test is not run within 24 h., storage at -20°C is recommended.
- Avoid subsequent freeze-thaw cycles.

X. PROCEDURE

- A. **Handling notes**
Do not use the kit or components beyond expiry date.
Do not mix materials from different kit lots.
Bring all the reagents to room temperature prior to use.
Thoroughly mix all reagents and samples by gentle agitation or swirling.
Use a clean disposable pipette tip for addition of each different reagent and sample in order to avoid cross-contamination. High precision pipettes or automated pipetting equipment will improve the precision.
Respect the incubation times.
Prepare a calibration curve for each run, do not use data from previous runs.
- B. **Procedure**
 1. Label one plain plastic tube for each sample.
 2. Dispense 1 ml of Dilution Buffer into each tube.
 3. Add 10 µl of sample into these tubes.
 4. Label coated tubes in duplicate for each calibrator, sample and control. For the determination of total counts, label 2 normal tubes.
 5. Briefly vortex calibrators, controls and pre-diluted samples and dispense 100 µl of each into the respective tubes (use the dilution buffer as zero calibrator).
 6. Dispense 50 µl of ¹²⁵Iodine labelled anti IGFBP-3 into each tube, including the uncoated tubes for total counts.
 7. Incubate for 120 minutes at room temperature on a tube shaker (400 rpm).
 8. Aspirate (or decant) the content of each tube (except total counts). Be sure that the plastic tip of the aspirator reaches the bottom of the coated tube in order to remove all the liquid.
 9. Wash tubes with 2 ml Working Wash solution (except total counts) and aspirate (or decant). Avoid foaming during the addition of the Working Wash solution.
 10. Wash tubes again with 2 ml Wash solution (except total counts) and aspirate (or decant).
 11. Let the tubes stand upright for two minutes and aspirate the remaining drop of liquid.
 12. Count tubes in a gamma counter for 60 seconds.

XI. CALCULATION OF RESULTS

- 1. Calculate the mean of duplicate determinations.
- 2. On semi logarithmic or linear graph paper plot the c.p.m. (ordinate) for each calibrator against the corresponding concentration of IGFBP-3 (abscissa) and draw a calibration curve through the calibrator points, reject the obvious outliers.
- 3. Read the concentration for each control and sample by interpolation on the calibration curve.
- 4. Computer assisted data reduction will simplify these calculations. If automatic result processing is to be used, a 4-parameter logistic function curve fitting is recommended

XII. TYPICAL DATA

The following data are for illustration only and should never be used instead of the real time calibration curve.

IGFBP-3-IRMA		cpm	B/T (%)
Total count		298318	100
Calibrator	0 ng/ml	17	0.01
	380 ng/ml	1494	0.50
	1057 ng/ml	5608	1.88
	2520 ng/ml	17131	5.74
	5589 ng/ml	54713	18.34
	13395 ng/ml	185344	62.13

The calibrators are standardized against the NIBSC/WHO recombinant IGFBP-3, reference reagent coded 93/560.

XIII. PERFORMANCE AND LIMITATIONS

A. Detection limit

Twelve zero calibrators were assayed along with a set of the other calibrators. The detection limit, defined as the apparent concentration of the average count at zero binding plus two standard deviations, was 17.3 ng/ml.

B. Specificity

Some potentially interfering hormones have been tested in this assay. At concentrations up to 10 µg/ml, none of the following hormones showed significant interference :

- rhIGF-BP1
- rhIGF-BP2
- rhIGF-BP4
- rhIGF-BP5
- rhIGF-BP6
- rhIGF-I
- rhIGF-II

C. Precision

INTRA-ASSAY PRECISION

Serum	N	<X> ± SD (ng/ml)	CV (%)
A	20	543 ± 22	4.0
B	20	2637 ± 71	2.7

INTER-ASSAY PRECISION

Serum	N	<X> ± SD (ng/ml)	CV (%)
A	10	1056 ± 34	3.2
B	10	4539 ± 255	5.6

SD: Standard Deviation; CV: Coefficient of variation

D. Accuracy

DILUTION TEST

Sample	Dilution	Theoretical Concent. (ng/ml)	Measured Concent. (ng/ml)
A	1/1	-	3004.8
	1/2	1502.4	1524.6
	1/4	751.2	765.9
	1/8	375.6	375.8
	1/16	187.8	175.3

Samples were diluted with Dilution Buffer.

RECOVERY TEST

Added IGFBP-3 (ng/ml)	Recovered IGFBP-3 (ng/ml)	Recovery (%)
2000	2094	104.7
1000	1123	112.3
500	491	98.2
250	273	109.3
125	139	111.0

E. Time delay between last calibrator and sample dispensing

As shown hereafter, assay results remain accurate even when a sample is dispensed 30 minutes after the calibrator has been added to the coated tubes.

TIME DELAY				
	0'	10'	20'	30'
S 1 (ng/ml)	1207	1204	1263	1274
S 2 (ng/ml)	4671	4986	4899	5054

XIV. INTERNAL QUALITY CONTROL

- If the results obtained for Control 1 and/or Control 2 are not within the range specified on the vial label, the results cannot be used unless a satisfactory explanation for the discrepancy has been given.
- If desirable, each laboratory can make its own pools of control samples, which should be kept frozen in aliquots.
- Acceptance criteria for the difference between the duplicate results of the samples should rely on Good Laboratory Practises.

XV. REFERENCE INTERVALS

These values are given only for guidance; each laboratory should establish its own normal range of values.

Normal subjects

Age Group	MALES (ng/ml)			FEMALES (ng/ml)		
	Mean	Range	N	Mean	Range	N
6 years	3771	2825-5178	9	3877	3400-4554	6
7 years	3718	2846-4462	20	3958	3102-4812	23
8 years	3852	3195-4978	38	3963	3156-4839	20
9 years	3833	3018-4837	29	4008	3334-4544	22
10 years	3865	2935-4524	28	4095	3257-5158	32
11 years	3991	3152-4635	28	4109	3144-5031	30
12 years	4203	3423-5153	28	4481	3643-4987	21
13 years	4488	2936-5586	34	4668	3771-5249	38
14 years	4381	3349-5220	39	4382	3585-5157	54
15 years	4212	3266-5262	31	4346	3551-5175	57
16 years	4343	3417-5662	45	4331	3475-5055	69
17 years	4287	3305-5319	19	4316	3459-5424	39
18 years	4604	3830-5583	17	4463	3518-5190	28
19 years	4321	3647-4907	17	4501	3842-5149	18
20 years	4224	3714-4871	12	4327	3686-4949	6
21 – 25 years	4633	3228-6207	27	5111	3732-6254	25
26 – 30 years	4656	3081-5881	26	4326	3038-5266	24
31 – 40 years	4392	3030-6101	47	4508	3609-5637	47
> 40 years	4354	2589-5312	18	4327	3313-5247	20

Remark : the range is based on 2.5 % and 97.5 % percentiles.

XVI. PRECAUTIONS AND WARNINGS

Safety

For *in vitro* diagnostic use only.

This kit contains ¹²⁵I (half-life: 60 days), emitting ionizing X (28 keV) and γ (35.5 keV) radiations.

This radioactive product can be transferred to and used only by authorized persons; purchase, storage, use and exchange of radioactive products are subject to the legislation of the end user's country. In no case the product must be administered to humans or animals.

All radioactive handling should be executed in a designated area, away from regular passage. A logbook for receipt and storage of radioactive materials must be kept in the lab. Laboratory equipment and glassware, which could be contaminated with radioactive substances, should be segregated to prevent cross contamination of different radioisotopes.

Any radioactive spills must be cleaned immediately in accordance with the radiation safety procedures. The radioactive waste must be disposed of following the local regulations and guidelines of the authorities holding jurisdiction over the laboratory. Adherence to the basic rules of radiation safety provides adequate protection.

The human blood components included in this kit have been tested by European approved and/or FDA approved methods and found negative for HbsAg, anti-HCV, anti-HIV-1 and 2. No known method can offer complete assurance that human blood derivatives will not transmit hepatitis, AIDS or other infections. Therefore, handling of reagents, serum or plasma specimens should be in accordance with the local safety procedures. All animal products and derivatives have been collected from healthy animals. Bovine components originate from

countries where BSE has not been reported. Nevertheless, components containing animal substances should be treated as potentially infectious. Avoid any skin contact with reagents (sodium azide as preservative). Azide in this kit may react with lead and copper in the plumbing and in this way form highly explosive metal azides. During the washing step, flush the drain with a large amount of water to prevent azide build-up. Do not smoke, drink, eat or apply cosmetics in the working area. Do not pipette by mouth. Use protective clothing and disposable gloves.

XVI. BIBLIOGRAPHY

1. LEROITH D., BONDY C., YAKAR S., LIU JL., BUTLER A.
The somatomedin hypothesis : 2001.
Endocr Rev 2001; 22:53-74.

2. POLLAK MN., SCHERNHAMMER ES., HANKINSON SE.
Insulin-like growth factors and neoplasia.
Nat Rev Cancer 2004; 4:505-518.

3. YUEN K., FRYSTYK J., UMPLEBY M., FRYKLUND L., DUNGER D.
Changes in free rather than total insulin-like growth factor-I enhance insulin sensitivity and suppress endogenous peak growth hormone (GH) release following short-term low dose GH administration in young healthy adults.
J Clin Endocrinol Metab 2004; 89:3956-3964.

4. KHANDWALA HM., McCUTCHEON IE., FLYVBJERG A., FRIEND KE.
The effects of insulin-like growth factors on tumorigenesis and neoplastic growth.
Endocr Rev 2000; 21:215-244.

5. RENEHAN AG., ZWAHLEN M., MINDER PC., O'DWYSER ST., SHALET PS., EGGER PM.
Insulin-like growth factor (IGF)-I, IGF binding protein-3, and cancer risk : systematic review and meta-regression analysis.
The Lancet 2004; 363:1346-1353.

6. JUUL A., SCHEIKE T., DAVIDSEN M., GYLLENBORG J., JORGENSEN T.
Low serum insulin-like growth factor I is associated with increased risk of ischemic heart disease : a population-based case-control study.
Circulation 2002; 106:939-944.

7. SANDHU MS., HEALD AH., GIBSON JM., CRUICKSHANK JK., DUNGER DB., WAREHAM NJ.
Circulating concentrations of insulin-like growth factor-I and development of glucose intolerance : a prospective observational study.
The Lancet 2002; 359:1740-1745.

8. VAESSEN N., HEUTINK P., JANSSEN JA., WITTEMAN JC., TESTERS L., HOFMAN A., LAMBERTS SW., OOSTRA BA., POLS HA., VAN DUJN CM.
A polymorphism in the gene for IGF-I : functional properties and risk for type 2 diabetes and myocardial infarction.
Diabetes 2001; 50:637-642.

9. JUUL A.
Serum levels of insulin-like growth factor-I and its binding proteins in health and disease.
Growth Horm IGF Res 2003; 13:113-170

10. FIRTH SM., BAXTER RC.
Cellular actions of the insulin-like growth factor binding proteins
Endocr Rev 2002; 23:824-854.

11. BAXTER RC., MEKA S., FIRTH SM.
Molecular distribution of IGF binding protein-5 in human serum.
J Clin Endocrinol Metab 2002; 87:271-276.

12. RICORT JM.
Insulin-like growth factor binding protein (IGFBP) signaling.
Growth Horm IGF Res 2004; 14:277-286.

13. JONES JL., CLEMMONS DR.
Insulin-like growth factors and their binding proteins : biological actions.
Endocr Rev 1995; 16:3-34.

14. ALI O., COHEN P., LEE KW.
Epidemiology and biology of insulin-like growth factor binding protein-3 (IGFBP-3) as an anti-cancer molecule.
Horm Metab Res 2003; 35:726-733.

15. CHAN SS., TWIGG SM., FIRTH SM., BAXTER RC.
Insulin-like growth factor binding protein-3 leads to insulin resistance in adipocytes.
J Clin Endocrinol Metab 2005; 90:6588-6595.

16. JUUL A., MAIN K., BLUM WF., LINDHOLM J., RANKE MB., SKAKKEBAEK NE.
The ration between serum levels of insulin-like growth factor (IGF)-I and the IGF binding proteins (IGFBP-1, 2 and 3) decreases with age in healty adults and is increased in acromegalic patients.
Clin Endocrinol (Oxf) 1994; 41:85-93.

17. BLUM WF., ALBERTSSON-WIKLAND K., ROSBERG S., RANKE MB.
Serum levels of insulin-like growth factor I (IGF-I) and IGF binding protein 3 reflect spontaneous growth hormone secretion.
J Clin Endocrinol Metab 1994; 76:1610-1616.

18. FRYSTYK J., IVARSEN P., SKJAERBAEK C., FLYVBJERG A., PEDERSEN EB., ORSKOV H.
Serum-free insulin-like growth factor I correlates with clearance in patients with chronic renal failure.
Kidney Int 1999; 56:2076-2084.

19. FRYSTYK J.
In Endocrinology and Metabolism – Clinics of North America 2005 :
Endocrinology of aging, Chapter XI : Aging somatotropic axis mechanisms and implications of IGFBP adaptation.

XVIII. SUMMARY OF THE PROTOCOL

	TOTAL COUNTS µl	CALIBRATORS CONTROLS µl	SAMPLE(S) µl
<u>DILUTION SAMPLE(S)</u>			
Dilution Buffer	-	-	1000
Sample	-	-	10
Shaking	Vortex		
<u>INCUBATION</u>			
Calibrators (0 to 5), controls	-	100	-
Diluted Samples	-	-	100
Tracer	50	50	50
Incubation	120 minutes at room temperature with shaking at 400 rpm		
Separation	-	Aspirate (or decant) 2 ml	
Working Wash solution		Aspirate (or decant) 2 ml	
Separation		Aspirate (or decant)	
Counting	Count tubes for 60 seconds		

DIASource Catalogue Nr : KIP1171	P.I. Number : 1700466/en	Revision nr : 090424/1
-------------------------------------	-----------------------------	---------------------------

Revision date : 2009-04-24

Lire entièrement le protocole avant utilisation.

IGFBP-3-IRMA

I. BUT DU DOSAGE

Trousse de dosage immunoradiométrique pour la détermination quantitative in vitro de la protéine de liaison 3 du facteur de croissance proche de l'insuline (IGFBP-3: Insulin-like Growth Factor Binding Protein-3) dans le sérum.

II. INFORMATIONS GENERALES

- A. **Nom du produit :** DIAsource IGFBP-3-IRMA kit
- B. **Numéro de catalogue :** KIP1171: 96 tests
- C. **Fabriqué par :** DIAsource ImmunoAssays S.A.
Rue de l'Industrie, 8 B-1400 Nivelles Belgium.

Pour une assistance technique ou une information sur une commande :

Tel : +32 (0)67 88.99.99

Fax : +32 (0)67 88.99.96

III. CONTEXTE CLINIQUE

Le système de facteur de croissance proche de l'insuline (IGF) est le régulateur primaire de la croissance corporelle normale et de la régénération influençant la prolifération, la différenciation et l'apoptose cellulaires. De plus, le système IGF modifie la sensibilité à l'insuline et le métabolisme du glucose à long terme. Enfin, de nombreuses données épidémiologiques, expérimentales et cliniques indiquent que le système IGF est également impliqué dans le développement de différents cancers courants ainsi que dans des maladies fréquentes comme l'athérosclérose et le diabète de type 2.

Le système IGF se compose d'une famille de peptides étroitement apparentés qui inclut les deux peptides primaires de promotion de la croissance, les IGF-I et IGF-II, les 6 protéines de liaison avec une forte affinité des IGF (IGFBP-1 à 6) et une grande glycoprotéine ne liant pas l'IGF, la "sous-unité acidolabile" (ALS).

L'IGFBP-3 est la sous-unité de liaison de l'IGF la plus abondante. Elle représente 75% et plus de la capacité de liaison de l'IGF circulante chez les sujets sains. L'IGFBP-3 partage des propriétés fonctionnelles avec l'IGFBP-5: les deux peptides sont capables de former des complexes ternaires de haut poids moléculaire de ~150 kilos Dalton avec l'ALS et soit l'IGF-I soit l'IGF-II. Les concentrations en IGFBP-5 sont cependant bien inférieures à celles de l'IGFBP-3. Chez le sujet sain, on retrouve jusqu'à 90% de l'IGFBP-3 sous forme de complexes ternaires, mais seulement 50% environ de l'IGFBP-5..

Au départ, on pensait que les IGFBP servaient de protéines de liaison de l'IGF, stabilisant les taux plasmatiques d'IGF et contrôlant la sortie de l'IGF de la circulation vers le compartiment extravasculaire. De plus, on a supposé que le complexe IGFBP-IGF était biologiquement plus ou moins inactif, étant privé de sa capacité à interagir avec le récepteur IGF-I. Cependant, il est rapidement apparu que, dans certaines expériences, les IGFBP stimulaient plutôt qu'inhibaient les actions médiées par l'IGF-I et, par conséquent, les IGFBP sont maintenant référencées en tant que *modulateurs* de la bioactivité de l'IGF-I. De plus, la majorité des IGFBP et, en particulier l'IGFBP-3, exercent des effets indépendants sur l'IGF-I et sur le récepteur IGF-I, provoquant éventuellement des interactions avec des récepteurs spécifiques situés à la surface et à l'intérieur de la cellule. Par exemple, l'IGFBP-3 est aujourd'hui considérée comme étant une molécule anticancéreuse, protégeant apparemment contre certains cancers courants. On a également suggéré des effets de l'IGFBP-3 sur le signal de l'insuline dans des cultures d'adipocytes.

La rotation des complexes ternaires est très lente et la concentration plasmatique en IGFBP-3 reste stable au cours de la journée, n'étant n'est pas affectée par des changements nutritionnels à court terme. Une seule mesure du taux d'IGFBP-3 est donc suffisante. La GH est le régulateur primaire de l'IGFBP-3 ainsi que de l'IGF-I et de l'ALS. Par conséquent, les trois peptides augmentent pendant la poussée de croissance pubertaire après laquelle les taux diminuent progressivement avec l'âge. On a montré que, chez l'enfant, l'IGFBP-3 est corrélée avec la sécrétion de GH intégrée sur 24 heures. Le dosage de l'IGFBP-3 peut être utile, en particulier chez l'enfant, dans le diagnostic d'une déficience en GH.

IV. PRINCIPE DU DOSAGE

L'IGFBP-3-IRMA de DIASource est un dosage immunoradiométrique basé sur un tube tapissé d'anticorps. Le Mab1, l'anticorps de capture, est adsorbé sur la surface inférieure et intérieure du tube en plastique. Les calibrateurs et les échantillons ajoutés aux tubes montreront d'abord une faible affinité pour les Mab1. L'addition de Mab2, l'anticorps de signal marqué à l¹²⁵I, complètera le système et déclenchera la réaction immunologique. Après lavage, la réactivité restante liée aux tubes reflète la concentration en antigènes.

V. REACTIFS FOURNIS

Réactifs	Trousse de 96 analyses	Code Couleur	Reconstitution			
 Tubes tapissés d'un anti-IGFBP-3 (anticorps monoclonal)	2 x 48	ivoire	Prêt à l'emploi			
<table border="1"><tr><td>Ab</td><td>¹²⁵I</td></tr></table> Anti-IGFBP-3- ¹²⁵ I (anticorps monoclonal) dans un tampon tris maléate avec du sérum bovin, de l'azoture (<0,1%) et un colorant rouge inerte	Ab	¹²⁵ I	1 flacon 5,5 ml 700 kBq	Rouge	Prêt à l'emploi	
Ab	¹²⁵ I					
<table border="1"><tr><td>CAL</td><td>N</td></tr></table> Calibrateur N = 1 à 5 (cf. Valeurs exactes sur chaque flacon) dans un tampon Tris-HCl avec de la sérum-albumine bovine et du thymol. Les calibrateurs sont prédilués	CAL	N	5 flacons lyophilisés	Jaune	Ajouter 1,0 ml d'eau distillée	
CAL	N					
<table border="1"><tr><td>DL</td><td>BUF</td></tr></table> Tampon de dilution: tampon Tris-HCl avec de l'albumine bovine et de l'azoture (<0,1%)	DL	BUF	1flacon 100 ml	vert	Prêt à l'emploi	
DL	BUF					
<table border="1"><tr><td>WASH</td><td>SOLN</td><td>CONC</td></tr></table> Solution de Lavage (TRIS-HCl)	WASH	SOLN	CONC	1 flacon 10 ml	brun	Diluer 70 x avec de l'eau distillée (utiliser un agitateur magnétique).
WASH	SOLN	CONC				
<table border="1"><tr><td>CONTROL</td><td>N</td></tr></table> Contrôles - N = 1 ou 2 dans un tampon Tris-HCl avec du sérum humain et du thymol Les contrôles sont prédilués	CONTROL	N	2 flacons lyophilisés	Gris	Ajouter 1,0 ml d'eau distillée	
CONTROL	N					

Note: utiliser le tampon de dilution comme calibrateur zéro.

VI. MATERIEL NON FOURNI

Le matériel mentionné ci-dessous est requis mais non fourni avec la trousse:

- 1. Eau distillée
- 2. Pipettes pour distribuer: 10 µl, 50 µl, 100 µl et 1 ml (l'utilisation de pipettes précises et de pointes jetables en plastique est recommandée)
- 3. Tubes en plastique pour la dilution des échantillons
- 4. Agitateur vortex
- 5. Agitateur magnétique
- 6. Agitateur de tubes (400rpm)
- 7. Seringue automatique de 5 ml (type Cornwall) pour les lavages
- 8. Système d'aspiration (optionnel)
- 9. Tout compteur gamma capable de mesurer l¹²⁵I peut être utilisé (rendement minimum 70%).

VII. PREPARATION DES REACTIFS

- A. **Calibrateurs:** Reconstituer les calibrateurs avec 1,0 ml d'eau distillée.
- B. **Contrôles :** Reconstituer les contrôles avec 1,0 ml d'eau distillée.
- C. **Solution de Lavage :** Préparer un volume adéquat de Solution de Lavage en ajoutant 69 volumes d'eau distillée à 1 volume de Solution de Lavage (70x). Utiliser un agitateur magnétique pour homogénéiser. Eliminer la Solution de Lavage non utilisée à la fin de la journée.

VIII. STOCKAGE ET DATE D'EXPIRATION DES REACTIFS

- Avant l'ouverture ou la reconstitution, tous les composants de la trousse sont stables jusqu'à la date d'expiration, indiquée sur l'étiquette, si la trousse est conservée entre 2 et 8°C.
- Les calibrateurs et les contrôles sont très instables. Utiliser les immédiatement après leur reconstitution. Congeler immédiatement en aliquotes et conserver les à -20°C pendant trois mois au maximum. Eviter des cycles de congélation et décongélation successifs.
- La Solution de Lavage préparée doit être utilisée le jour même.
- Après la première utilisation, le traceur est stable jusqu'à la date d'expiration, si celui-ci est conservé entre 2 et 8°C dans le flacon d'origine correctement fermé.
- Des altérations dans l'apparence physique des réactifs de la trousse peuvent indiquer une instabilité ou une détérioration.

IX. PREPARATION ET STABILITE DE L'ECHANTILLON

- Les échantillons de sérum doivent être gardés entre 2 et 8°C.
- Si le test n'est pas réalisé dans les 24 heures, un stockage à -20°C est recommandé.
- Eviter des cycles de congélation et décongélation successifs.

X. MODE OPERATOIRE

- A. **Notes de manipulation**
Ne pas utiliser la trousse ou ses composants après avoir dépassé la date d'expiration. Ne pas mélanger du matériel provenant de trousses de lots différents. Mettre tous les réactifs à température ambiante avant utilisation.
Mélanger tous les réactifs et les échantillons sous agitation douce. Pour éviter toute contamination croisée, utiliser une nouvelle pointe de pipette pour l'addition de chaque réactif et échantillon.
Des pipettes de haute précision ou un équipement de pipetage automatique permettent d'augmenter la précision. Respecter les temps d'incubation.
Préparer une courbe de calibration pour chaque nouvelle série d'expériences, ne pas utiliser les données d'expériences précédentes.

- B. **Mode opératoire**
 1. Étiqueter un tube ordinaire en plastique pour chacun des échantillons.
 2. Distribuer 1 ml de tampon de dilution à chacun des tubes.
 3. Ajouter 10 µl d'échantillons dans ces tubes.
 4. Identifier les tubes tapissés d'anticorps fournis dans la trousse, en double pour chaque calibrateur, échantillon, contrôle. Pour la détermination de l'activité totale, identifier 2 tubes non tapissés d'anticorps.
 5. Agiter au vortex brièvement les calibrateurs, les échantillons prédilué et les contrôles. Puis distribuer 100 µl de chacun d'eux dans leurs tubes respectifs. (utiliser le tampon de dilution comme calibrateur zéro)
 6. Ajouter 50 µL de traceur dans chaque tube à l'exception des ceux servant au comptage total.
 7. Incuber pendant 120 minutes à température ambiante sous agitation continue (400 rpm).
 8. Aspirer (ou décantier) le contenu de chaque tube (à l'exception des tubes utilisés pour la détermination de l'activité totale). Assurez-vous que la pointe utilisée pour aspirer le liquide des tubes atteint le fond de chacun d'eux pour éliminer toute trace de liquide.
 9. Laver les tubes avec 2 ml de Solution de Lavage (à l'exception des tubes utilisés pour la détermination de l'activité totale) et aspirer. Eviter la formation de mousse pendant l'addition de la Solution de Lavage.
 10. Laver les tubes à nouveau avec 2 ml de Solution de Lavage (à l'exception des tubes utilisés pour la détermination de l'activité totale) et aspirer (ou décantier).
 11. Après le dernier lavage, laisser les tubes droits pendant 2 minutes et aspirer (ou décantier) le reste de liquide.
 12. Placer les tubes dans un compteur gamma pendant 60 secondes pour quantifier la radioactivité.

XI. CALCUL DES RESULTATS

- 1. Calculer la moyenne de chaque détermination réalisée en double.
- 2. Dessiner sur un graphique linéaire ou semi-logarithmique les cpm (ordonnées) pour chaque calibrateur contre la concentration correspondante en IGFBP-3 (abscisses) et dessiner une courbe de calibration à l'aide des points de calibration, écarter les valeurs aberrantes.
- 3. Lire la concentration pour chaque contrôle et échantillon par interpolation sur la courbe de calibration.
- 4. L'analyse informatique des données simplifiera les calculs. Si un système d'analyse de traitement informatique des données est utilisé, il est recommandé d'utiliser la fonction « 4 paramètres » du lissage de courbes.

XII. DONNEES TYPES

Les données représentées ci-dessous sont fournies pour information et ne peuvent jamais être utilisées à la place d’une courbe de calibration.

IGFBP-3-IRMA		cpm	B/T (%)
Activité totale		298318	100
Calibrateur	0 ng/ml	17	0,01
	380 ng/ml	1494	0,50
	1057 ng/ml	5608	1,88
	2520 ng/ml	17131	5,74
	5589 ng/ml	54713	18,34
	13395 ng/ml	185344	62,13

Les calibrateurs sont standardisés par rapport à l'IGFBP-3 recombinante, standard de référence NIBSC/WHO code 93/560.

XIII. PERFORMANCE ET LIMITES DU DOSAGE

A. Sensibilité

Douze calibrateurs zéro ont été testés en parallèle avec un assortiment d’autres calibrateurs. La limite de détection, définie comme la concentration apparente située 2 déviations standards au-dessus de la moyenne déterminée à la fixation zéro, était de 17.3 ng/ml.

B. Spécificité

Certaines hormones pouvant potentiellement interférer ont été testées dans cet essai. À des concentrations allant jusqu'à 10 µg/ml, aucune des hormones n'a montré une interférence significative :

- rhIGF-BP1
- rhIGF-BP2
- rhIGF-BP4
- rhIGF-BP5
- rhIGF-BP6
- rhIGF-I
- rhIGF-II

C. Précision

INTRA-ESSAI				INTER-ESSAI			
Sérum	N	<X> ± SD (ng/ml)	CV (%)	Sérum	N	<X> ± SD (ng/ml)	CV (%)
A	20	543 ± 22	4,0	A	10	1056 ± 34	3,2
B	20	2637 ± 71	2,7	B	10	4539 ± 255	5,6

SD : Déviation Standard; CV: Coefficient de variation

D. Exactitude

TEST DE DILUTION			
Echantillon	Dilution	Concent. théorique (ng/ml)	Concent. Mesurée (ng/ml)
A	1/1	-	3004,8
	1/2	1502,4	1524,6
	1/4	751,2	765,9
	1/8	375,6	375,8
	1/16	187,8	175,3

Les échantillons sont dilués avec le tampon de dilution.

TEST DE RECUPERATION		
IGFBP-3 ajoutée (ng/ml)	IGFBP-3 récupérée (ng/ml)	Récupération (%)
2000	2094	104,7
1000	1123	112,3
500	491	98,2
250	273	109,3
125	139	111,0

E. Délai entre la distribution du dernier calibrateur et celle de l'échantillon

Comme le montre le tableau ci-dessous, les résultats de l'analyse restent précis lorsqu'un échantillon est distribué 30 minutes après que le calibrateur ait été ajouté aux tubes tapissés d'anticorps.

DELAÏ				
	0'	10'	20'	30'
S 1 (ng/ml)	1207	1204	1263	1274
S 2 (ng/ml)	4671	4986	4899	5054

XIV. CONTROLE DE QUALITE INTERNE

- Si les résultats obtenus pour le(s) contrôle(s) 1 et/ou 2 ne sont pas dans l'intervalle spécifié sur l'étiquette du flacon, les résultats ne peuvent pas être utilisés à moins que l'on ait donné une explication satisfaisante de la non-conformité.
- Chaque laboratoire est libre de faire ses propres stocks d'échantillons contrôles, lesquels doivent être congelés en aliquotes. Ne pas congeler – décongeler plus de deux fois.
- Les critères d'acceptation de la différence entre les résultats des échantillons analysés en double doivent être basés sur les Bonnes Pratiques de Laboratoire.

XV. VALEURS ATTENDUES

Les valeurs sont donnés à titre d’information; chaque laboratoire doit établir ses propres écarts de valeurs.

Sujets normaux

Age	MASCULIN (ng/ml)			FEMININ (ng/ml)		
	Moyen	Portée	N	Moyen	Portée	N
6 ans	3771	2825-5178	9	3877	3400-4554	6
7 ans	3718	2846-4462	20	3958	3102-4812	23
8 ans	3852	3195-4978	38	3963	3156-4839	20
9 ans	3833	3018-4837	29	4008	3334-4544	22
10 ans	3865	2935-4524	28	4095	3257-5158	32
11 ans	3991	3152-4635	28	4109	3144-5031	30
12 ans	4203	3423-5153	28	4481	3643-4987	21
13 ans	4488	2936-5586	34	4668	3771-5249	38
14 ans	4381	3349-5220	39	4382	3585-5157	54
15 ans	4212	3266-5262	31	4346	3551-5175	57
16 ans	4343	3417-5662	45	4331	3475-5055	69
17 ans	4287	3305-5319	19	4316	3459-5424	39
18 ans	4604	3830-5583	17	4463	3518-5190	28
19 ans	4321	3647-4907	17	4501	3842-5149	18
20 ans	4224	3714-4871	12	4327	3686-4949	6
21 – 25 ans	4633	3228-6207	27	5111	3732-6254	25
26 – 30 ans	4656	3081-5881	26	4326	3038-5266	24
31 – 40 ans	4392	3030-6101	47	4508	3609-5637	47
> 40 ans	4354	2589-5312	18	4327	3313-5247	20

Note : portée basés sur les percentiles de 2,5% & 97,5%.

XVI. PRECAUTIONS ET AVERTISSEMENTS

Sécurité

Pour utilisation en diagnostic *in vitro* uniquement.

Cette trousse contient de l’¹²⁵I (demi-vie: 60 jours), une matière radioactive émettant des rayonnements ionisants X (28 keV) et γ (35,5 keV).

Ce produit radioactif peut uniquement être reçu, acheté, possédé ou utilisé par des personnes autorisées; l’achat, le stockage, l’utilisation et l’échange de produits radioactifs sont soumis à la législation du pays de l'utilisateur final. Ce produit ne peut en aucun cas être administré à l’homme ou aux animaux.

Toutes les manipulations radioactives doivent être exécutées dans un secteur désigné, éloigné de tout passage. Un journal de réception et de stockage des matières radioactives doit être tenu à jour dans le laboratoire. L'équipement de laboratoire et la verrerie, qui pourrait être contaminée avec des substances radioactives, doivent être isolés afin d’éviter la contamination croisée de plusieurs isotopes.

Toute contamination ou perte de substance radioactive doit être réglée conformément aux procédures de radio sécurité. Les déchets radioactifs doivent être placés de manière à respecter les réglementations en vigueur. L'adhésion aux règles de base de sécurité concernant les radiations procure une protection adéquate.

Les composants de sang humain inclus dans ce kit ont été évalués par des méthodes approuvées par l’Europe et/ou la FDA et trouvés négatifs pour HBsAg,

l'anti-HCV, l'anti-HIV-1 et 2. Aucune méthode connue ne peut offrir l'assurance complète que des dérivés de sang humain ne transmettront pas d'hépatite, le sida ou toute autre infection. Donc, le traitement des réactifs, du sérum ou des échantillons de plasma devra être conforme aux procédures locales de sécurité. Tous les produits animaux et leurs dérivés ont été collectés d'animaux sains. Les composants bovins proviennent de pays où l'ESB n'a pas été détectée. Néanmoins, les composants contenant des substances animales devront être traités comme potentiellement infectieux. L'azoture de sodium est nocif s'il est inhalé, avalé ou en contact avec la peau (l'azoture de sodium est utilisé comme agent conservateur). L'azoture dans cette trousse pouvant réagir avec le plomb et le cuivre dans les canalisations et donner des composés explosifs, il est nécessaire de nettoyer abondamment à l'eau le matériel utilisé. Ne pas fumer, ni boire, ni manger ni appliquer de produits cosmétiques dans les laboratoires où des produits radioactifs sont utilisés. Ne pas pipeter avec la bouche. Utiliser des vêtements protecteurs et des gants à usage unique.

XV. BIBLIOGRAPHY

1. LEROITH D., BONDY C., YAKAR S., LIU JL., BUTLER A.
The somatomedin hypothesis : 2001.
Endocr Rev 2001; 22:53-74.

2. POLLAK MN., SCHERNHAMMER ES., HANKINSON SE.
Insulin-like growth factors and neoplasia.
Nat Rev Cancer 2004; 4:505-518.

3. YUEN K., FRYSTYK J., UMPLEBY M., FRYKLUND L., DUNGER D.
Changes in free rather than total insulin-like growth factor-I enhance insulin sensitivity and suppress endogenous peak growth hormone (GH) release following short-term low dose GH administration in young healthy adults.
J Clin Endocrinol Metab 2004; 89:3956-3964.

4. FREBOURG T., BERCOFF E., MANCHON N., SENANT J., BASUYAU J-P., KHANDWALA HM., McCUTCHEON IE., FLYVBJERG A., FRIEND KE.
The effects of insulin-like growth factors on tumorigenesis and neoplastic growth.
Endocr Rev 2000; 21:215-244.

5. RENEHAN AG., ZWAHLEN M., MINDER PC., O'DWYSER ST., SHALET PS., EGGER PM.
Insulin-like growth factor (IGF)-I, IGF binding protein-3, and cancer risk : systematic review and meta-regression analysis.
The Lancet 2004; 363:1346-1353.

6. JUUL A., SCHEIKE T., DAVIDSEN M., GYLLENBORG J., JORGENSEN T.
Low serum insulin-like growth factor I is associated with increased risk of ischemic heart disease : a population-based case-control study.
Circulation 2002; 106:939-944.

7. SANDHU MS., HEALD AH., GIBSON JM., CRUICKSHANK JK., DUNGER DB., WAREHAM NJ.
Circulating concentrations of insulin-like growth factor-I and development of glucose intolerance : a prospective observational study.
The Lancet 2002; 359:1740-1745.

8. VAESSEN N., HEUTINK P., JANSSEN JA., WITTEMAN JC., TESTERS L., HOFMAN A., LAMBERTS SW., OOSTRA BA., POLS HA., VAN DUIJN CM.
A polymorphism in the gene for IGF-I : functional properties and risk for type 2 diabetes and myocardial infarction.
Diabetes 2001; 50:637-642.

9. JUUL A.
Serum levels of insulin-like growth factor-I and its binding proteins in health and disease.
Growth Horm IGF Res 2003; 13:113-170

10. FIRTH SM., BAXTER RC.
Cellular actions of the insulin-like growth factor binding proteins
Endocr Rev 2002; 23:824-854.

11. BAXTER RC., MEKA S., FIRTH SM.
Molecular distribution of IGF binding protein-5 in human serum.
J Clin Endocrinol Metab 2002; 87:271-276.

12. RICORT JM.
Insulin-like growth factor binding protein (IGFBP) signaling.
Growth Horm IGF Res 2004; 14:277-286.

13. JONES JL., CLEMMONS DR.
Insulin-like growth factors and their binding proteins : biological actions.
Endocr Rev 1995; 16:3-34.

14. ALI O., COHEN P., LEE KW.
Epidemiology and biology of insulin-like growth factor binding protein-3 (IGFBP-3) as an anti-cancer molecule.
Horm Metab Res 2003; 35:726-733.

15. CHAN SS., TWIGG SM., FIRTH SM., BAXTER RC.
Insulin-like growth factor binding protein-3 leads to insulin resistance in adipocytes.
J Clin Endocrinol Metab 2005; 90:6588-6595.

16. JUUL A., MAIN K., BLUM WF., LINDHOLM J., RANKE MB., SKAKKEBAEK NE.
The ration between serum levels of insulin-like growth factor (IGF)-I and the IGF binding proteins (IGFBP-1, 2 and 3) decreases with age in healthy adults and is increased in acromegalic patients.
Clin Endocrinol (Oxf) 1994; 41:85-93.

17. BLUM WF., ALBERTSSON-WIKLAND K., ROSBERG S., RANKE MB.
Serum levels of insulin-like growth factor I (IGF-I) and IGF binding protein 3 reflect spontaneous growth hormone secretion.
J Clin Endocrinol Metab 1994; 76:1610-1616.

18. FRYSTYK J., IVARSEN P., SKJAERBAEK C., FLYVBJERG A., PEDERSEN EB., ORSKOV H.
Serum-free insulin-like growth factor I correlates with clearance in patients with chronic renal failure.
Kidney Int 1999; 56:2076-2084.

19. FRYSTYK J.
In Endocrinology and Metabolism – Clinics of North America 2005 : Endocrinology of aging, Chapter XI : **Aging somatotrophic axis mechanisms and implications of IGFBP adaptation.**

XVIII. RESUME DU PROTOCOLE

	ACTIVIT E TOTALE (µl)	CALIBRA- TEURS CONTRÔLES (µl)	ECHANTIL LONS (µl)
<u>DILUTION DES ÉCHANTILLONS</u> Tampon de dilution Échantillon	- -	- -	1000 10
Mélanger	Vortex		
<u>INCUBATION</u> Calibrateurs (0 à 5), contrôles Échantillons dilués	- -	100 -	- 100
Traceur	50	50	50
Incubation	120 minutes à température ambiante sous agitation continue (400 rpm).		
Séparation Solution de Lavage Séparation Solution de Lavage Séparation	- - - - -	Aspiration (ou décanter) 2,0 ml Aspiration (ou décanter) 2,0 ml Aspiration (ou décanter)	
Comptage	Temps de comptage des tubes: 60 secondes		

Numéro de catalogue DIAsource : KIP1171	Numéro de P.I. : 1700466/fr	Numéro de révision : 090424/1
--	--------------------------------	----------------------------------

Vor Gebrauch des Kits lesen Sie bitte diese Packungsbeilage.

IGFBP-3-IRMA

I. VERWENDUNGSZWECK

Radioimmunoassay Kit zur quantitativen invitro Bestimmung des Insulin-ähnlichen Wachstumsfaktor-bindenden Proteins (IGFBP-3) im Serum .

II. ALLGEMEINE INFORMATION

- A. **Handelsbezeichnung :** DIAsource IGFBP-3-IRMA Kit
B. **Katalognummer :** KIP1171 : 96 Tests
C. **Hergestellt von:** DIAsource ImmunoAssays S.A.
Rue de l'Industrie, 8, B-1400 Nivelles, Belgien.

Für technische Unterstützung oder Bestellungen wenden Sie sich bitte an:

Tel : +32 (0)67 88.99.99 Fax : +32 (0)67 88.99.96

Für Deutschland : Kostenfreie Rufnummer : 0800 1 00 85 74 - Kostenfreie Faxnummer : 0800 1 00 85 75

E-mail Ordering : ordering@diasource.be

III. KLINISCHER HINTERGRUND

Der insulinähnliche Wachstumsfaktor (IGF) ist der primäre Regulator des normalen Körperwachstums und der Regeneration und beeinflusst die Proliferation, die Ausdifferenzierung und die Apoptose der Zellen. Darüber hinaus scheint das IGF-System die Insulinsensitivität und langfristig den Glukosemetabolismus zu modifizieren. Letztendlich deuten viele epidemiologische, experimentelle und klinische Daten darauf hin, dass das IGF-System sowohl an der Entwicklung von verschiedenen Krebserkrankungen, als auch an häufigen Erkrankungen wie Atherosklerose und Diabetes Mellitus Typ 2 beteiligt zu sein scheint.

Das IGF-System besteht aus einer Familie von nahe verwandten Peptiden, die die zwei wichtigsten wachstumsfördernden Peptide IGF-I und IGF-II, sowie 6 spezifische hochaffine IGF-bindende Proteine (IGFBP- bis -6) und ein großes nicht-IGF-bindendes Glykoprotein, die „Säure labile Untereinheit“ (ALS) umfaßt.

IGFBP-3 ist das IGF-bindende Protein mit der höchsten Bindungsrate, d.h. es repräsentiert ca. 75% oder mehr der zirkulierenden IGF-Bindungskapazität von Gesunden. IGFBP-3 teilt sich funktionelle Eigenschaften mit IGFBP-5, beide sind in der Lage hochmolekulare Dreifachkomplexe von ~150 kD mit ALS und entweder IGF-I oder -II zu bilden. Wie auch immer, IGFBP-5 zirkuliert in viel geringeren Konzentrationen als IGFBP-3. Bei Gesunden enthalten die Dreifachkomplexe IGFBP-3 zu ungefähr 90% und IGFBP-5 nur zu 50% .

Ursprünglich dachte man, dass IGFBP als IGF-Trägerprotein fungiert, welches die Plasmaspiegel von IGF stabilisiert und den Ausgang des IGF aus der Zirkulation zum extravaskulären Sektor kontrolliert. Weiterhin wurde angenommen, dass an IGFBP gebundenes IGF biologisch mehr oder weniger inaktiv sei, weil seine Fähigkeit mit dem IGF-Rezeptor zu interagieren unterdrückt sei. Wie auch immer, stellte sich in einigen Experimenten schnell heraus, dass IGFBP die IGF-I gesteuerten Reaktionen eher stimulierte, als unterdrückte und so werden die IGFBPs nun oft als *Modulatoren* der IGF-I Bioaktivität bezeichnet. Zusätzlich gebraucht die Mehrheit der IGFBPs und im Besonderen IGFBP-3, IGF-1 und IGF-1 rezeptorunabhängige Effekte, möglicherweise unter Einbeziehung von Interaktionen mit spezifischen Rezeptoren, die sich auf der Zelloberfläche und intrazellulär befinden. Zum Beispiel wird IGFBP-3 neuerdings als ein Antikrebs Molekül eingeschätzt, das offensichtlich gegen verschiedene gängige Krebsarten schützt. Effekte von IGFBP-3 auf Insulinsignale in kultivierten Adipozyten sind vermutet worden.

Der Turnover der Dreifachkomplexe ist sehr langsam und die Plasmakonzentration von IGFBP-3 bleibt über den Tag stabil, nicht beeinflusst durch kurzfristige Wechsel in der Ernährung. Dadurch kann der IGFBP-3 Spiegel durch eine einzige Messung bestimmt werden. GH ist der primäre Regulator von IGFBP-3 und von IGF-I und ALS. Daher steigen alle drei Peptidwerte während des pubertären Wachstumsschubs an, worauf sie mit steigendem Alter graduell abnehmen. Bei Kindern wurde gezeigt, dass IGFBP-3 mit der 24 Stunden Sekretion von GH korreliert und IGFBP-3 besonders bei der Diagnose von GH Mangel bei Kindern hilfreich sein kann.

IV. GRUNDSÄTZLICHES ZUR DURCHFÜHRUNG

Das DIASource IGFBP-3-IRMA ist ein radiometrischer Immunoassay, der auf beschichteten Röhrchen basiert. Mab1, ist als Fängerantikörper an an den inneren unteren Bereich des Plastikröhrchens gebunden. Dem Röhrchen zugegebene Kalibratoren oder Proben zeigen zuerst geringe Affinität zu Mab1. Durch Zugabe von Mab2, dem mit ¹²⁵I markierten Signal-Antikörper, wird das System vervollständigt und löst die immunologische Reaktion aus. Nach dem Waschen stellt die im Röhrchen verbliebene Radioaktivität die Antigenkonzentration dar.

V. MITGELIEFERTE REAGENZIEN

Reagenzien	96 Test Kit	Farb Code	Rekonstitution			
 Röhrchen beschichtet mit IGFBP-3 (monoklonaler Antikörper)	2 x 48	elfenbein	gebrauchsfertig			
<table border="1"><tr><td>Ab</td><td>¹²⁵I</td></tr></table> Anti-IGFBP-3- ¹²⁵ I (monoklonaler Antikörper) in Tris Maleate Puffer mit Rinderserum,NaAzid (<0,1%) und inerter roter Farbe	Ab	¹²⁵ I	1 Gefäß 5,5 ml 700 kBq	rot	gebrauchsfertig	
Ab	¹²⁵ I					
<table border="1"><tr><td>CAL</td><td>N</td></tr></table> Kalibratoren 1-5 in Tris-HCl Puffer mit Rinderalbumin und Thymol. Entnehmen Sie die exakten Werte den Flaschenetiketten. Die Kalibratoren sind vorverdünnt.	CAL	N	5 Gefäße lyophilisiert	gelb	1.0 ml dest. Wasser zugeben	
CAL	N					
<table border="1"><tr><td>DIL</td><td>BUF</td></tr></table> Verdünnungspuffer: Tris HCl Puffer mit Rinderalbumin und NaAzid (<0,1%)	DIL	BUF	1 Gefäße 100 ml	grün	gebrauchsfertig	
DIL	BUF					
<table border="1"><tr><td>WASH</td><td>SOLN</td><td>CONC</td></tr></table> Waschlösung (TRIS-HCl)	WASH	SOLN	CONC	1 Gefäß 10 ml	braun	70 x mit dest. Wasser verdünnen (Magnetrührer benutzen).
WASH	SOLN	CONC				
<table border="1"><tr><td>CONTROL</td><td>N</td></tr></table> Kontrollen - N = 1 or 2 in Tris-HCl Puffer mit Humanserum und Thymol Die Kontrollen sind vorverdünnt	CONTROL	N	2 Gefäße lyophilisiert	silber	1.0 ml dest. Wasser zugeben	
CONTROL	N					

Bemerkung: Benutzen Sie den Verdünnungspuffer als Nullkalibrator.

VI. ZUSÄTZLICH BENÖTIGTES MATERIAL

Folgendes Material wird benötigt, aber nicht mit dem Kit mitgeliefert:

- 1. Dest. Wasser
- 2. Pipetten: 10 µl, 50 µl, 100 µl and 1 ml (Verwendung von Präzisionspipetten mit Wegwerf-Plastikspitzen wird empfohlen)
- 3. Plastikröhrchen zur Probenverdünnung
- 4. 5 ml automatische Spritze (Cornwall Typ) zum Waschen
- 5. Absaugsystem (optional)
- 6. Vortex Mixer
- 7. Schüttler für Röhrchen (400rpm)
- 8. Magnetrührer
- 9. Jegl. Gamma-Counter, der ¹²⁵I messen kann, kann verwendet werden. (minimal Yield 70%)

VII. REAGENT PREPARATION

- A. **Kalibratoren:** : Rekonstituieren Sie die Kalibratoren mit 1,0 ml dest. Wasser.
- B. **Kontrollen:** Rekonstituieren Sie die Kontrollen mit 1,0 ml dest. Wasser.
- C. **Waschlösung:** Bereiten Sie ein angemessenes Volumen Waschlösung aus einem Anteil Waschlösung (70x) mit 69 Anteilen dest. Wasser zu. Verwenden Sie einen Magnetrührer zum gleichmäßigen Durchmischen. Verwerfen Sie die nicht benutze Waschlösung am Ende des Tages.

VIII. AUFBEWAHRUNG UND LAGERUNG DER REAGENZIEN

- Vor dem Öffnen oder Rekonstitution sind die Reagenzien des Kits bis zum Ablaufdatum (Angaben auf Etikett) bei Lagerung bei 2°C bis 8°C stabil.
- Die Kalibratoren und Proben sind sehr instabil. Benutzung sofort nach der Rekonstitution oder sofort in Aliquots bei -20°C für bis zu 3 Monate einfrieren. Vermeiden Sie wiederholtes Einfrieren und Auftauen.
- Frisch zubereitete Waschlösung sollte am selben Tag benutzt werden.
- Nach der ersten Benutzung ist der Tracer bei Aufbewahrung im Originalgefäß und bei 2° bis 8° C bis zum Ablaufdatum stabil.
- Veränderungen im Aussehen der Kitkomponenten können ein Anzeichen für Instabilität oder Zerfall sein.

IX. PROBENSAMMLUNG UND -VORBEREITUNG

- Serumproben müssen bei 2-8°C aufbewahrt werden.
- Falls der Test nicht innerhalb von 24 Std. durchgeführt wird, ist die Aufbewahrung bei -20°C erforderlich.
- Vermeiden Sie wiederholtes Einfrieren und Auftauen.

X. DURCHFÜHRUNG

- A. **Bemerkungen zur Durchführung**
Verwenden Sie den Kit oder dessen Komponenten nicht nach Ablaufdatum. Vermischen Sie Materialien von unterschiedlichen Kit-Chargen nicht. Bringen Sie alle Reagenzien vor der Verwendung auf Raumtemperatur.
Mischen Sie alle Reagenzien und Proben gründlich durch sanftes Schütteln oder Rühren. Verwenden Sie saubere Wegwerf-Pipettenspitzen, um Kreuzkontamination zu vermeiden.
Präzisionspipetten oder ein automatisches Pipettiersystem erhöhen die Präzision. Achten Sie auf die Einhaltung der Inkubationszeiten.
Erstellen Sie für jeden Durchlauf eine Standardkurve, verwenden Sie nicht die Daten von früheren Durchläufen.
- B. **Durchführung**
 1. Kennzeichnen Sie ein leeres Plastikröhrchen pro Probe.
 2. Dispensieren Sie 1ml Verdünnungspuffer in jedes Röhrchen.
 3. Geben Sie 10 µl Probe in die Röhrchen.
 4. Beschriften Sie je 2 beschichtete Röhrchen für jeden Kalibrator, jede Probe und Kontrolle. Zur Bestimmung der Gesamtaktivität, beschriften Sie 2 normale Röhrchen.
 5. Vortexen Sie die Kalibratoren, vorverdünnten Proben und Kontrollen kurz und geben Sie jeweils 100 µl in ihre Röhrchen. (Benutzen Sie den Verdünnungspuffer als Nullkalibrator)
 6. Geben Sie 50 µl des mit ¹²⁵Jod markierten Anti-IGFBP-3 in jedes Röhrchen, einschließlic der unbeschichteten Röhrchen für die Gesamtaktivität.
 7. Inkubieren Sie 120 Minuten bei Raumtemperatur unter ständigem Schütteln (400 rpm).
 8. Saugen Sie den Inhalt jedes Röhrchens ab (oder dekantieren Sie) (außer Gesamtaktivität). Vergewissern Sie sich, dass die Plastikspitze des Absaugers den Boden des beschichteten Röhrchens erreicht, um die gesamte Flüssigkeit zu entfernen.
 9. Waschen Sie die Röhrchen mit 2 ml Waschlösung (außer Gesamtaktivität) und saugen Sie ab (oder dekantieren Sie). Vermeiden Sie Schaumbildung bei Zugabe der Waschlösung.
 10. Waschen Sie die Röhrchen mit 2 ml Waschlösung (außer Gesamtaktivität) und saugen Sie ab (oder dekantieren Sie).
 11. Lassen Sie nach dem letzten Waschen die Röhrchen 2 Minuten aufrecht stehen und saugen Sie den verbleibenden Flüssigkeitstropfen ab.
 12. Werten Sie die Röhrchen in einem Gamma-Counter 60 Sekunden aus.

XI. BERECHNUNG DER ERGEBNISSE

- 1. Berechnen Sie den Durchschnitt aus den Doppelbestimmungen.
- 2. Tragen Sie auf semilogarithmischem oder linearem Millimeterpapier den c.p.m. (Ordinate) für jeden Standard gegen die entsprechende Konzentration IGFBP-3 (Abszisse) und zeichnen Sie eine Standardkurve durch die Standardpunkte, schließen Sie offensichtliche „Ausreißer“ aus.
- 3. Berechnen Sie die Konzentration für jede Kontrolle und Probe durch Interpolation aus der Standardkurve.
- 4. Computergestützte Methoden können ebenfalls zur Erstellung der Kalibrationskurve verwendet werden. Falls die Ergebnisberechnung mit dem Computer durchgeführt wird, empfehlen wir die Berechnung mit einer “4 Parameter”-Kurvenfunktion.

XII. TYPISCHE WERTE

Die folgenden Daten dienen nur zu Demonstrationszwecken und können nicht als Ersatz für die Echtzeitstandardkurve verwendet werden.

IGFBP-3-IRMA		cpm	B/T (%)
Gesamtaktivität		298318	100
Kalibrator	0 ng/ml	17	0,01
	380 ng/ml	1494	0,50
	1057 ng/ml	5608	1,88
	2520 ng/ml	17131	5,74
	5589 ng/ml	54713	18,34
	13395 ng/ml	185344	62,13

Die Kalibratoren sind gegen das rekombinante IGFBP-3 Referenzreagenz der NIBSC/WHO mit der Bezeichnung 93/560 standardisiert.

XIII. LEISTUNGSMERKMALE UND GRENZEN DER METHODIK

- A. Nachweisgrenze
- Zwölf Null-Kalibratoren wurden zusammen mit einem Satz anderer Kalibratoren gemessen.
- Die Nachweisgrenze, definiert als die scheinbare Konzentration bei zwei Standardabweichungen über dem gemessenen Durchschnittswerts bei Nullbindung, entsprach 17,3 ng/ml.

- B. Spezifität
- Einige potentiell störenden Hormone wurden mit diesem Assay getestet. Bei Konzentrationen von bis zu 10µg/ml zeigten keine der nachfolgend angegebenen Hormone signifikante Interferenzen:
- rhIGF-BP1
 - rhIGF-BP2
 - rhIGF-BP4
 - rhIGF-BP5
 - rhIGF-BP6
 - rhIGF-I
 - rhIGF-II

C. Präzision

INTRA-ASSAY PRÄZISION				INTER-ASSAY PRÄZISION			
Serum	N	<X> ± SD (ng/ml)	CV (%)	Serum	N	<X> ± SD (ng/ml)	CV (%)
A	20	543 ± 22	4,0	A	10	1056 ± 34	3,2
B	20	2637 ± 71	2,7	B	10	4539 ± 255	5,6

SD : Standardabweichung; CV: Variationskoeffizient

D. Genauigkeit

VERDÜNNUNGSTEST

Probe	Verdünn.	Theoret. Konzentr. (ng/ml)	Gemess. Konzentr. (ng/ml)
A	1/1	-	3004,8
	1/2	1502,4	1524,6
	1/4	751,2	765,9
	1/8	375,6	375,8
	1/16	187,8	175,3

Die Proben werden mit Verdünnungspuffer verdünnt.

WIEDERFINDUNGSTEST

Zugew. IGFBP-3 (ng/ml)	Wiedergef. IGFBP-3 (ng/ml)	Wiedergefunden (%)
2000	2094	104,7
1000	1123	112,3
500	491	98,2
250	273	109,3
125	139	111,0

E. Zeitfenster zwischen der Zugabe des letzten Kalibrators und der Probenverteilung

Wie nachfolgend beschrieben, sind die Ergebnisse noch genau, selbst wenn die Probe erst 30 Minuten nach Zugabe des Kalibrators in das beschichtete Röhrchen gegeben wird.

ZEITVERZÖGERUNG				
	0'	10'	20'	30'
S 1 (ng/ml)	1207	1204	1263	1274
S 2 (ng/ml)	4671	4986	4899	5054

XIV. INTERNE QUALITÄTSKONTROLLE

- Entsprechen die Ist-Werte nicht den auf den Fläschchen angegebenen Soll-Werten, können die Werte, ohne treffende Erklärung der Abweichungen, nicht weiterverarbeitet werden.
- Falls zusätzliche Kontrollen erwünscht sind, kann jedes Labor seinen eigenen Pool herstellen, der in Aliquots eingefroren werden sollte. Erinnern Sie sich, dass zwei Gefrier-Auftau-Zyklen erlaubt sind.
- Akzeptanzkriterien für die Differenz zwischen den Resultaten der Wiederholungstests anhand der Proben müssen auf Guter Laborpraxis beruhen.

XV. REFERENZINTERVALLE

Diese Werte sind nur Richtwerte; jedes Labor muss seinen eigenen Normalwertbereich ermitteln.

Gesunde Personen

Altersgruppe	MÄNNER (ng/ml)			FRAUEN (ng/ml)		
	Mittelwert	Bereich	N	Mittelwert	Bereich	N
6 Jahre	3771	2825-5178	9	3877	3400-4554	6
7 Jahre	3718	2846-4462	20	3958	3102-4812	23
8 Jahre	3852	3195-4978	38	3963	3156-4839	20
9 Jahre	3833	3018-4837	29	4008	3334-4544	22
10 Jahre	3865	2935-4524	28	4095	3257-5158	32
11 Jahre	3991	3152-4635	28	4109	3144-5031	30
12 Jahre	4203	3423-5153	28	4481	3643-4987	21
13 Jahre	4488	2936-5586	34	4668	3771-5249	38
14 Jahre	4381	3349-5220	39	4382	3585-5157	54
15 Jahre	4212	3266-5262	31	4346	3551-5175	57
16 Jahre	4343	3417-5662	45	4331	3475-5055	69
17 Jahre	4287	3305-5319	19	4316	3459-5424	39
18 Jahre	4604	3830-5583	17	4463	3518-5190	28
19 Jahre	4321	3647-4907	17	4501	3842-5149	18
20 Jahre	4224	3714-4871	12	4327	3686-4949	6
21 – 25 Jahre	4633	3228-6207	27	5111	3732-6254	25
26 – 30 Jahre	4656	3081-5881	26	4326	3038-5266	24
31 – 40 Jahre	4392	3030-6101	47	4508	3609-5637	47
> 40 Jahre	4354	2589-5312	18	4327	3313-5247	20

Bemerkung : Bereich auf basis der 2,5% und 97,5% Perzentile

XVI. VORSICHTMASSNAHMEN UND WARNUNGEN

Sicherheit

Nur für diagnostische Zwecke.

Dieser Kit enthält ¹²⁵I (Halbwertszeit: 60 Tagen) , das ionisierende X (28 keV) und γ (35,5 keV) Strahlungen emittiert.

Dieses radioaktive Produkt kann nur an autorisierte Personen abgegeben und darf nur von diesen angewendet werden; Erwerb, Lagerung, Verwendung und Austausch radioaktiver Produkte sind Gegenstand der Gesetzgebung des Landes des jeweiligen Endverbrauchers. In keinem Fall darf das Produkt an Menschen oder Tieren angewendet werden.

Der Umgang mit radioaktiven Substanzen sollte fern von Durchgangsverkehr in einem speziell ausgewiesenen Bereich stattfinden. Ein Logbuch für Protokolle und Aufbewahrung muss im Labor sein. Die Laborausüstung und die Glasbehälter, die mit radioaktiven Substanzen kontaminiert werden können, müssen gesondert werden, um Kreuzkontaminationen mit unterschiedlichen Radioisotopen zu verhindern. Verschüttete radioaktive Substanzen müssen sofort den Sicherheitsbestimmungen entsprechend entfernt werden. Radioaktive Abfälle müssen entsprechend den lokalen Bestimmungen und Richtlinien der für das Labor zuständigen Behörden gelagert werden. Das Einhalten der Sicherheitsbestimmungen für den Umgang mit radioaktiven Substanzen gewährleistet ausreichenden Schutz.

Die menschlichen Blutkomponenten in diesem Kit wurden mit europäischen und in USA erprobten FDA-Methoden getestet, sie waren negativ für HBsAG, anti-

HCV und anti-HIV 1 und 2. Keine bekannte Methode kann jedoch vollkommene Sicherheit liefern, dass menschliche Blutbestandteile nicht Hepatitis, AIDS oder andere Infektionen übertragen. Deshalb sollte der Umgang mit Reagenzien, Serum oder Plasmaproben in Übereinstimmung mit den Sicherheitsbestimmungen erfolgen.

Alle tierischen Produkte und deren Derivate wurden von gesunden Tieren gesammelt. Komponenten von Rindern stammen aus Ländern in denen BSE nicht nachgewiesen wurde.

Trotzdem sollten Komponenten, die tierische Substanzen enthalten, als potenziell infektiös betrachtet werden.

Vermeiden Sie Hautkontakt mit den Reagenzien (Natriumazid als Konservierungsmittel). Das Azid in diesem Kit kann mit Blei oder Kupfer in den Abflussrohren reagieren und so hochexplosive Metallazide bilden. Spülen Sie während der Waschschrte den Abfluss gründlich mit viel Wasser, um die Metallazidbildung zu verhindern.

Bitte rauchen, trinken, essen Sie nicht in Ihrem Arbeitsbereich, und verwenden Sie keine Kosmetika. Pipettieren Sie nicht mit dem Mund. Verwenden Sie Schutzkleidung und Wegwerfhandschuhe.

XVII. LITERATUR

1. LEROITH D., BONDY C., YAKAR S., LIU JL., BUTLER A.
The somatomedin hypothesis : 2001.
Endocr Rev 2001; 22:53-74.

2. POLLAK MN., SCHERNHAMMER ES., HANKINSON SE.
Insulin-like growth factors and neoplasia.
Nat Rev Cancer 2004; 4:505-518.

3. YUEN K., FRYSTYK J., UMPLEBY M., FRYKLUND L., DUNGER D.
Changes in free rather than total insulin-like growth factor-I enhance insulin sensitivity and suppress endogenous peak growth hormone (GH) release following short-term low dose GH administration in young healthy adults.
J Clin Endocrinol Metab 2004; 89:3956-3964.

4. KHANDWALA HM., McCUTCHEON IE., FLYVBJERG A., FRIEND KE.
The effects of insulin-like growth factors on tumorigenesis and neoplastic growth.
Endocr Rev 2000; 21:215-244.

5. RENEHAN AG., ZWAHLEN M., MINDER PC., O'DWYSER ST., SHALET PS., EGGER PM.
Insulin-like growth factor (IGF)-I, IGF binding protein-3, and cancer risk : systematic review and meta-regression analysis.
The Lancet 2004; 363:1346-1353.

6. JUUL A., SCHEIKE T., DAVIDSEN M., GYLLENBORG J., JORGENSEN T.
Low serum insulin-like growth factor I is associated with increased risk of ischemic heart disease : a population-based case-control study.
Circulation 2002; 106:939-944.

7. SANDHU MS., HEALD AH., GIBSON JM., CRUICKSHANK JK., DUNGER DB., WAREHAM NJ.
Circulating concentrations of insulin-like growth factor-I and development of glucose intolerance : a prospective observational study.
The Lancet 2002; 359:1740-1745.

8. VAESSEN N., HEUTINK P., JANSSEN JA., WITTEMAN JC., TESTERS L., HOFMAN A., LAMBERTS SW., OOSTRA BA., POLS HA., VAN DUJN CM.
A polymorphism in the gene for IGF-I : functional properties and risk for type 2 diabetes and myocardial infarction.
Diabetes 2001; 50:637-642.

9. JUUL A.
Serum levels of insulin-like growth factor-I and its binding proteins in health and disease.
Growth Horm IGF Res 2003; 13:113-170

10. FIRTH SM., BAXTER RC.
Cellular actions of the insulin-like growth factor binding proteins
Endocr Rev 2002; 23:824-854.

11. BAXTER RC., MEKA S., FIRTH SM.
Molecular distribution of IGF binding protein-5 in human serum.
J Clin Endocrinol Metab 2002; 87:271-276.

12. RICORT JM.
Insulin-like growth factor binding protein (IGFBP) signaling.
Growth Horm IGF Res 2004; 14:277-286.

13. JONES JL., CLEMMONS DR.
Insulin-like growth factors and their binding proteins : biological actions.
Endocr Rev 1995; 16:3-34.

14. ALI O., COHEN P., LEE KW.
Epidemiology and biology of insulin-like growth factor binding protein-3 (IGFBP-3) as an anti-cancer molecule.
Horm Metab Res 2003; 35:726-733.

15. CHAN SS., TWIGG SM., FIRTH SM., BAXTER RC.
Insulin-like growth factor binding protein-3 leads to insulin resistance in adipocytes.
J Clin Endocrinol Metab 2005; 90:6588-6595.

16. JUUL A., MAIN K., BLUM WF., LINDHOLM J., RANKE MB., SKAKKEBAEK NE.
The ration between serum levels of insulin-like growth factor (IGF)-I and the IGF binding proteins (IGFBP-1, 2 and 3) decreases with age in healty adults and is increased in acromegalic patients.
Clin Endocrinol (Oxf) 1994; 41:85-93.

17. BLUM WF., ALBERTSSON-WIKLAND K., ROSBERG S., RANKE MB.
Serum levels of insulin-like growth factor I (IGF-I) and IGF binding protein 3 reflect spontaneous growth hormone secretion.
J Clin Endocrinol Metab 1994; 76:1610-1616.

18. FRYSTYK J., IVARSEN P., SKJAERBAEK C., FLYVBJERG A., PEDERSEN EB., ORSKOV H.
Serum-free insulin-like growth factor I correlates with clearance in patients with chronic renal failure.
Kidney Int 1999; 56:2076-2084.

19. FRYSTYK J.
In Endocrinology and Metabolism – Clinics of North America 2005 : Endocrinology of aging, Chapter XI : **Aging somatotropic axis mechanisms and implications of IGFBP adaptation.**

XVIII.ZUSAMMENFASSUNG DES PROTOKOLLS

	GESAMT- AKTIVITÄT (µl)	KALIBRA- TOREN KONTROLLEN (µl)	PROBEN, (µl)
<u>Verdünnte Probe(n)</u>			
Verdünnungspuffer	-	-	1000
Probe	-	-	10
Schütteln	Vortex		
<u>Inkubation</u>			
Kalibratoren (0 to 5), Kontrollen verdünnte Proben,	- -	100 -	- 100
Tracer	50	50	50
Inkubation	120 Minuten bei Raumtemperatur unter ständigem Schütteln (400 rpm)		
Trennung Waschlösung Trennung Waschlösung Trennung	-	absaugen (oder dekant.) 2,0 ml absaugen (oder dekant.) 2,0 ml absaugen (oder dekant.)	
Gamma Counter	60 Sekunden messen		

DIAsource Katalognummer : KIP1171	Beipackzettelnummer: 1700466/de	Nummer der Originalausgabe: 090424/1
---	------------------------------------	--

Prima di utilizzare il kit leggere attentamente le istruzioni per l'uso

IGFBP-3-IRMA

I. USO DEL KIT

Kit radioimmunologico per la determinazione quantitativa in vitro della Proteina 3 legante il Fattore di Crescita Insulino-simile (IGFBP-3) nel siero.

II. INFORMAZIONI DI CARATTERE GENERALE

- A. Nome commerciale:** DIAsource IGFBP-3-IRMA Kit
- B. Numero di catalogo:** KIP1171: 96 test
- C. Prodotto da:** DIAsource ImmunoAssays S.A.
Rue de l'Industrie, 8, B-1400 Nivelles, Belgio.

Per informazioni tecniche o su come ordinare il prodotto contattare:

Tel: +32 (0) 67 88.99.99

Fax: +32 (0) 67 88.99.96

III. INFORMAZIONI CLINICHE

Il sistema del fattore di crescita insulino-simile (IGF), che interviene nel processo di proliferazione, differenziazione e apoptosi cellulare, è il principale regolatore della normale crescita e rigenerazione organica. Il sistema IGF sembrerebbe inoltre modificare la sensibilità insulinica e il metabolismo del glucosio a lungo termine. Molti dati epidemiologici, sperimentali e clinici indicano come il sistema IGF sia coinvolto anche nello sviluppo di molti comuni tipi di cancro, nonché di patologie frequentemente riscontrabili quali l'aterosclerosi e il diabete mellito di tipo 2.

Il sistema IGF è costituito da una famiglia di peptidi strettamente associati tra loro, quali i due principali peptidi stimolanti la crescita, IGF-I e IGF-II, sei proteine specifiche IGF-leganti ad alta affinità (IGFBP da 1 a 6) e una grossa glicoproteina non-IGF-legante, la subunità acido labile (ALS).

La IGFBP-3, la proteina IGF-legante presente in maggior quantità, rappresenta nei soggetti sani il 75% o più della capacità IGF-legante totale. La IGFBP-3 condivide le sue proprietà funzionali con la IGFBP-5, essendo entrambi peptidi in grado di formare complessi ternari ad elevato peso molecolare di ~150 kilo Dalton con ALS e con IGF-I o IGF-II. Tuttavia, la IGFBP-5 circola in concentrazioni molto ridotte rispetto alla IGFBP-3 e, nei soggetti sani, i complessi ternari portano fino al 90% di IGFBP-3 e soltanto il 50% di IGFBP-5.

Originariamente si pensava che le IGFBP svolgessero il compito di proteine IGF-carrier, stabilizzanti i livelli plasmatici di IGF e con funzioni di controllo del passaggio di IGF dal flusso sanguigno al compartimento extra-vascolare. Si pensava inoltre che l'IGF, nella sua forma complessata IGFBP, fosse più o meno biologicamente inattiva essendo deprivata della sua capacità di interagire con il recettore IGF-I. Tuttavia, risultò ben presto evidente che in alcuni contesti sperimentali, le IGFBP avevano un effetto stimolante, più che inibente, l'azione IGF-I mediata. Pertanto, le IGFBP sono adesso considerate come *modulatori* della bioattività di IGF-1. La maggior parte delle IGFBP, e in special modo la IGFBP-3, produce effetti indipendenti sull'IGF-1 e sul suo recettore, con possibili interazioni con i recettori specifici situati sulla superficie cellulare o nel comparto intracellulare. Attualmente si pensa che la IGFBP-3 possa fungere da molecola anti-cancro, con effetto di protezione contro molte forme comuni di cancro, ed è stato ipotizzato un suo possibile effetto sulla segnalazione di insulina in adipociti in coltura.

Il turnover dei complessi ternari è molto lento e i livelli plasmatici di IGFBP-3 rimangono stabili nell'intero arco della giornata, non influenzati da variazioni nutrizionali a breve termine. I livelli di IGFBP-3 possono pertanto essere determinati sulla base di una singola valutazione. Essendo il GH il principale regolatore di IGFBP-3, IGFBP-1 e ALS, durante lo scatto di crescita puberale si verifica un aumento di tutti e tre i peptidi, il cui livello va successivamente diminuendo con l'avanzare dell'età. In età pediatrica, l'IGFBP-3 si correla con la secrezione di GH integrato nelle 24 ore e, particolarmente nei bambini, può rivelarsi utile nella diagnosi di deficit di GH.

IV. PRINCIPIO DEL METODO

DIAsource IGFBP-3-IRMA è un dosaggio immunoradiometrico in provette preadsorbite. L’anticorpo di cattura Mab1 è adsorbito sulla superficie interna della parte inferiore di provette di plastica. I calibratori e i campioni distribuiti nelle provette mostrano inizialmente una bassa affinità per il Mab1. L’aggiunta di Mab2, un anticorpo di segnale marcato con ¹²⁵I, completa il sistema innescando la reazione immunologica. Una volta effettuato il lavaggio, la radioattività residua all’interno delle provette riflette la concentrazione dell’antigene.

V. REATTIVI FORNITI

Reattivi	Kit da 96 test	Codice colore	Volume di ricostituzione
 Provette sensibilizzate con anti IGFBP-3(anticorpo monoclonale)	2 x 48	Avorio	Pronte per l’uso
Ab ¹²⁵I Anti-IGFBP-3- ¹²⁵ I (anticorpo monoclonale) in tampone Tris-Maleato con siero bovino, azide (<0,1%) e colorante rosso inerte	1 flacone 5,5 ml 700 kBq	Rosso	Pronto per l’uso
CAL N Calibratore 1-5 (le concentrazioni esatte dei calibratori sono riportate sulle etichette dei flaconi), in tampone Tris-HCl con albumina di siero bovino e timolo I calibratori sono prediluiti	5 flaconi liofiliz.	Giallo	Aggiungere 1.0 ml di acqua distillata
DIL BUF Tampone di diluizione: tampone Tris HCL con albumina bovina e azide (<0,1%)	1 flacone 100 ml	Verde	Pronto per l’uso
WASH SOLN CONC Tampone di lavaggio (TRIS-HCl)	1 flacone 10 ml	Marrone	Diluire 70 x con acqua distillata usando un agitatore magnetico
CONTROL N Controlli: N = 1 o 2, in tampone Tris-HCl con siero umano, contenente timolo I controlli sono prediluiti	2 flaconi liofiliz.	Argento	Aggiungere 1,0 ml di acqua distillata

Nota: utilizzare il tampone di diluizione come calibratore zero.

VI. REATTIVI NON FORNITI

Il seguente materiale è richiesto per il dosaggio ma non è fornito nel kit.

1. Acqua distillata.
2. Pipette per dispensare 10 µl, 50 µl, 100 µl and 1 ml (Si raccomanda di utilizzare pipette accurate con puntale in plastica monouso).
3. Provette di plastica per la diluizione dei campioni
4. Agitatore tipo vortex.
5. Agitatore magnetico.
6. Agitatore rotante (400rpm)
7. Pipetta a ripetizione automatica 5 ml (tipo del Cornwall) per i lavaggi.
8. Sistema di aspirazione dei campioni (facoltativo).
9. Contatore gamma con finestra per ¹²⁵I (efficienza minima 70%)

VII. PREPARAZIONE DEI REATTIVI

- A. Calibratore:** Ricostituire i calibratori con 1,0 ml di acqua distillata.
- B. Controlli :** Ricostituire i controlli con 1,0ml di acqua distillata.
- C. Soluzione di lavoro del tampone di lavaggio:** Preparare la quantità necessaria di soluzione di lavoro del tampone di lavaggio aggiungendo 69 parti di acqua distillata ad una parte di tampone di lavaggio concentrato (70 x). Usare un agitatore magnetico per rendere la soluzione omogenea. La soluzione di lavoro va scartata al termine della giornata.

VIII. CONSERVAZIONE E SCADENZA DEI REATTIVI

- I reattivi non utilizzati sono stabili a 2-8°C fino alla data riportata su ciascuna etichetta.
- Calibratori e controlli sono molto instabili, utilizzarli immediatamente dopo ricostituzione, congelarli immediatamente in aliquote e mantenerli a -20°C per 3 mesi.
- Evitare ripetuti cicli di congelamento-scongelamento.
- La soluzione di lavoro del tampone di lavaggio deve essere preparata fresca ogni volta e usata nello stesso giorno della preparazione.
- Dopo apertura del flacone, il marcato è stabile fino alla data di scadenza riportata sull’etichetta, se conservato a 2-8°C nel flacone originale ben tappato.
- Alterazioni dell’aspetto fisico dei reattivi possono indicare una loro instabilità o deterioramento.

IX. RACCOLTA E PREPARAZIONE DEI CAMPIONI

- Conservare i campioni di siero a 2-8°C.
- Se non si desidera eseguire il dosaggio entro 24 ore dal prelievo, si raccomanda di conservare i campioni a –20°C.
- Evitare ripetuti cicli di congelamento-scongelamento dei campioni.

X. METODO DEL DOSAGGIO

- A. Avvertenze generali**
Non usare il kit o suoi componenti oltre la data di scadenza. Non mescolare reattivi di lotti diversi. Prima dell’uso portare tutti i reattivi a temperatura ambiente.
Mescolare delicatamente i campioni per inversione o rotazione. Per evitare cross-contaminazioni, cambiare il puntale della pipetta ogni volta che si usi un nuovo reattivo o campione.
L’uso di pipette ben tarate e ripetibili o di sistemi di pipettamento automatici migliora la precisione del dosaggio. Rispettare i tempi di incubazione.
Allestire una curva di taratura per ogni seduta analitica, in quanto non è possibile utilizzare per un dosaggio curve di taratura di sedute analitiche precedenti.
- B. Metodo del dosaggio**
1. Etichettare una provetta di plastica vuota per ciascun campione.
 2. Distribuire 1ml di Tampone di Diluizione in ciascuna provetta.
 3. Aggiungere 10 µl di campione nelle rispettive provette
 4. Numerare le provette sensibilizzate necessarie per dosare in duplicato ogni standard, campione o controllo. Numerare 2 provette non sensibilizzate per la determinazione dell’attività totale.
 5. Agitare brevemente su vortex calibratori, controlli e campioni prediluiti e distribuire 100 µl di ciascuno nelle rispettive provette. (utilizzare il tampone di diluizione come calibratore zero)
 6. Distribuire 50 µl di anti-IGFBP-3 marcato con ¹²⁵I in ogni provetta, comprese quelle non pre-adsorbite per l’attività totale.
 7. Incubare 120 minuti a temperatura ambiente in agitazione (400 rpm).
 8. Aspirare (o decantare) il liquido contenuto in tutte le provette, tranne in quelle per l’attività totale, facendo attenzione che il puntale dell’aspiratore raggiunga il fondo delle provette e che aspiri tutto il liquido.
 9. Lavare tutte le provette, tranne quelle per l’attività totale, con 2 ml di soluzione di lavoro di tampone di lavaggio, evitando di provocare la formazione di schiuma.
 10. Lavare nuovamente tutte le provette, tranne quelle per l’attività totale, con 2 ml di soluzione di lavoro di tampone di lavaggio e aspirare (o decantare).
 11. Dopo il secondo lavaggio lasciare decantare le provette in posizione verticale per due minuti circa e aspirare eventuali gocce di liquido residue.
 12. Contare tutte le provette per 1 minuto con il contatore gamma.

XI. CALCOLO DEI RISULTATI

1. Calcolare la media delle determinazioni in duplicato.
2. Costruire la curva di calibrazione su carta millimetrata semilogaritmica o lineare ponendo in ordinata le medie dei colpi per minuto (cpm) dei replicati degli standard e in ascissa le rispettive concentrazioni di IGFBP-3. Scartare i duplicati palesemente discordanti.
3. Determinare le concentrazioni e controlli per interpolazione sulla curva di taratura.
4. E’ possibile utilizzare un sistema di interpolazione dati automatizzato. Con un sistema automatico di interpolazione dati, utilizzare la curva a 4 parametri.

XII. CARATTERISTICHE TIPICHE

I sotto riportati sono forniti a titolo di esempio e non devono essere utilizzati per calcolare le concentrazioni di IGFBP-3 in campioni e controlli al posto della curva standard, che va eseguita per ogni dosaggio.

IGFBP-3-IRMA		Cpm	B/T (%)
Attività totale		298318	100
Calibratore	0 ng/ml	17	0,01
	380 ng/ml	1494	0,50
	1057 ng/ml	5608	1,88
	2520 ng/ml	17131	5,74
	5589 ng/ml	54713	18,34
	13395 ng/ml	185344	62,13

I calibratori sono standardizzati rispetto all'IGFBP-3 ricombinante, standard di riferimento NIBSC/WHO, codice 93/560

XIII. CARATTERISTICHE E LIMITI DEL METODO

A. Sensibilità

Dodici replicati dello standard zero sono stati dosati insieme agli altri standard. La sensibilità, calcolata come concentrazione apparente di un campione con cpm pari alla media più 2 deviazioni standard di 12 replicati dello standard zero, è risultata essere 17,3 ng/ml.

B. Specificità

Sono stati sottoposti al test alcuni ormoni potenzialmente interferenti. Per concentrazioni fino a 10 µg/ml, non è stata evidenziata alcun interferenza significativa per nessuno di essi.

- rhIGF-BP1
- rhIGF-BP2
- rhIGF-BP4
- rhIGF-BP5
- rhIGF-BP6
- rhIGF-I
- rhIGF-II

C. Precisione

INTRA SAGGIO				INTER SAGGIO			
Siero	N	<X> ± SD (ng/ml)	CV (%)	Siero	N	<X> ± SD (ng/ml)	CV (%)
A	20	543 ± 22	4,0	A	10	1056 ± 34	3,2
B	20	2637 ± 71	2,7	B	10	4539 ± 255	5,6

SD : Deviazione Standard; CV: Coefficiente di Variazione

D. Accuratezza

TEST DI DILUIZIONE			
Campione	Diluizione	Concentrazione teorica (ng/ml)	Concentrazione misurata (ng/ml)
A	1/1	-	3004,8
	1/2	1502,4	1524,6
	1/4	751,2	765,9
	1/8	375,6	375,8
	1/16	187,8	175,3

I campioni sono stati diluiti con il Tampone di Diluizione.

TEST DI RECUPERO		
IGFBP-3 aggiunta (ng/ml)	IGFBP-3 recuperata (ng/ml)	Recupero (%)
2000	2094	104,7
1000	1123	112,3
500	491	98,2
250	273	109,3
125	139	111,0

E. Intervallo di tempo tra distribuzione dell'ultimo calibratore e un campione

Come evidenziato qui di seguito, i risultati del test hanno mantenuto il loro livello di accuratezza anche quando un campione è stato dispensato 30 minuti dopo la distribuzione del calibratore nelle provette preadsorbite.

INTERVALLO DI TEMPO				
	0'	10'	20'	30'
S 1 (ng/ml)	1207	1204	1263	1274
S 2 (ng/ml)	4671	4986	4899	5054

XIV. CONTROLLO DI QUALITA' INTERNO

- Se i risultati ottenuti dosando il Controllo 1 e il Controllo 2 non sono all'interno dei limiti riportati sull'etichetta dei flaconi, non è opportuno utilizzare i risultati ottenuti per i campioni, a meno che non si trovi una giustificazione soddisfacente.
- Ogni laboratorio può preparare un proprio pool di sieri da utilizzare come controllo, da conservare congelato in aliquote. Non congelare e scongelare un'aliquota più di due volte.
- I criteri di accettazione delle differenze tra i risultati in duplicato dei campioni devono basarsi sulla buona prassi di laboratorio.

XV. INTERVALLI DI RIFERIMENTO

Questi valori sono puramente indicativi, ciascun laboratorio potrà stabilire i propri intervalli normali.

Soggetti normali

Gruppo di età	MASCHI (ng/ml)			FEMMINE (ng/ml)		
	Media	Intervallo	N	Media	Intervallo	N
6 anni	3771	2825-5178	9	3877	3400-4554	6
7 anni	3718	2846-4462	20	3958	3102-4812	23
8 anni	3852	3195-4978	38	3963	3156-4839	20
9 anni	3833	3018-4837	29	4008	3334-4544	22
10 anni	3865	2935-4524	28	4095	3257-5158	32
11 anni	3991	3152-4635	28	4109	3144-5031	30
12 anni	4203	3423-5153	28	4481	3643-4987	21
13 anni	4488	2936-5586	34	4668	3771-5249	38
14 anni	4381	3349-5220	39	4382	3585-5157	54
15 anni	4212	3266-5262	31	4346	3551-5175	57
16 anni	4343	3417-5662	45	4331	3475-5055	69
17 anni	4287	3305-5319	19	4316	3459-5424	39
18 anni	4604	3830-5583	17	4463	3518-5190	28
19 anni	4321	3647-4907	17	4501	3842-5149	18
20 anni	4224	3714-4871	12	4327	3686-4949	6
21 – 25 anni	4633	3228-6207	27	5111	3732-6254	25
26 – 30 anni	4656	3081-5881	26	4326	3038-5266	24
31 – 40 anni	4392	3030-6101	47	4508	3609-5637	47
> 40 anni	4354	2589-5312	18	4327	3313-5247	20

Nota: intervallo basati su 2,5% e 97,5% percentili

XVI. PRECAUZIONI PER L'USO

Sicurezza

Il kit è solo per uso diagnostico in vitro. Il kit contiene ¹²⁵I (emivita: 60 giorni) emettente raggi X (28 keV) e γ (35,5 keV) ionizzanti

L'acquisto, a detenzione, l'utilizzo e il trasporto di materiale radioattivo sono soggetti a regolamentazione locale. In nessun caso il prodotto può essere somministrato ad esseri umani o animali.

Usare sempre guanti e camici da laboratorio quando si manipola materiale radioattivo. Le sostanze radioattive devono essere conservate in propri contenitori in appositi locali che devono essere interdetti alle persone non autorizzate. Deve essere tenuto un registro di carico e scarico del materiale radioattivo. Il materiale di laboratorio e la vetreria deve essere dedicato all'uso di isotopi specifici per evitare cross-contaminazioni.

In caso di contaminazione o dispersione di materiale radioattivo, fare riferimento alle norme locali di radioprotezione. I rifiuti radioattivi devono essere smaltiti secondo le norme locali di radioprotezione. Lo scrupoloso rispetto delle norme per l'uso di sostanze radioattive fornisce una protezione adeguata agli utilizzatori. I reattivi di origine umana presenti nel kit sono stati dosati con metodi approvati da organismi di controllo europei o da FDA e si sono rivelati negativi per HBs Ag, anti HCV, anti HIV1 e anti HIV2. Non sono disponibili metodi in grado di offrire la certezza assoluta che derivati da sangue umano non possano provocare epatiti, AIDS o trasmettere altre infezioni. Manipolare questi reattivi o i campioni di siero o plasma secondo le procedure di sicurezza vigenti.

Tutti i prodotti di origine animale o loro derivati provengono da animali sani. I componenti di origine bovina provengono da paesi dove non sono stati segnalati casi di BSE. E' comunque necessario considerare i prodotti di origine animale come potenziali fonti di infezioni.

Evitare ogni contatto dell'epidermide con i reattivi contenenti sodio azide come conservante. La sodio azide può reagire con piombo rame o ottone presenti nelle tubature di scarico per formare metallo-azidi esplosive. Smaltire questi reattivi facendo scorrere abbondante acqua negli scarichi.
Nei luoghi dove si usano sostanze radioattive non è consentito consumare cibi o bevande, fumare o usare cosmetici. Non pipettare i reattivi con pipette a bocca.

XVII. RIFERIMENTI BIBLIOGRAFICI

1. LEROITH D., BONDY C., YAKAR S., LIU JL., BUTLER A.
The somatomedin hypothesis : 2001.
Endocr Rev 2001; 22:53-74.

2. POLLAK MN., SCHERNHAMMER ES., HANKINSON SE.
Insulin-like growth factors and neoplasia.
Nat Rev Cancer 2004; 4:505-518.

3. YUEN K., FRYSTYK J., UMPLEBY M., FRYKLUND L., DUNGER D.
Changes in free rather than total insulin-like growth factor-I enhance insulin sensitivity and suppress endogenous peak growth hormone (GH) release following short-term low dose GH administration in young healthy adults.
J Clin Endocrinol Metab 2004; 89:3956-3964.

4. KHANDWALA HM., McCUTCHEON IE., FLYVBJERG A., FRIEND KE.
The effects of insulin-like growth factors on tumorigenesis and neoplastic growth.
Endocr Rev 2000; 21:215-244.

5. RENEHAN AG., ZWAHLEN M., MINDER PC., O'DWYSER ST., SHALET PS., EGGER PM.
Insulin-like growth factor (IGF)-I, IGF binding protein-3, and cancer risk : systematic review and meta-regression analysis.
The Lancet 2004; 363:1346-1353.

6. JUUL A., SCHEIKE T., DAVIDSEN M., GYLLENBORG J., JORGENSEN T.
Low serum insulin-like growth factor I is associated with increased risk of ischemic heart disease : a population-based case-control study.
Circulation 2002; 106:939-944.

7. SANDHU MS., HEALD AH., GIBSON JM., CRUICKSHANK JK., DUNGER DB., WAREHAM NJ.
Circulating concentrations of insulin-like growth factor-I and development of glucose intolerance : a prospective observational study.
The Lancet 2002; 359:1740-1745.

8. VAESSEN N., HEUTINK P., JANSSEN JA., WITTEMAN JC., TESTERS L., HOFMAN A., LAMBERTS SW., OOSTRA BA., POLS HA., VAN DUJN CM.
A polymorphism in the gene for IGF-I : functional properties and risk for type 2 diabetes and myocardial infarction.
Diabetes 2001; 50:637-642.

9. JUUL A.
Serum levels of insulin-like growth factor-I and its binding proteins in health and disease.
Growth Horm IGF Res 2003; 13:113-170

10. FIRTH SM., BAXTER RC.
Cellular actions of the insulin-like growth factor binding proteins
Endocr Rev 2002; 23:824-854.

11. BAXTER RC., MEKA S., FIRTH SM.
Molecular distribution of IGF binding protein-5 in human serum.
J Clin Endocrinol Metab 2002; 87:271-276.

12. RICORT JM.
Insulin-like growth factor binding protein (IGFBP) signaling.
Growth Horm IGF Res 2004; 14:277-286.

13. JONES JL., CLEMMONS DR.
Insulin-like growth factors and their binding proteins : biological actions.
Endocr Rev 1995; 16:3-34.

14. ALI O., COHEN P., LEE KW.
Epidemiology and biology of insulin-like growth factor binding protein-3 (IGFBP-3) as an anti-cancer molecule.
Horm Metab Res 2003; 35:726-733.

15. CHAN SS., TWIGG SM., FIRTH SM., BAXTER RC.
Insulin-like growth factor binding protein-3 leads to insulin resistance in adipocytes.
J Clin Endocrinol Metab 2005; 90:6588-6595.

16. JUUL A., MAIN K., BLUM WF., LINDHOLM J., RANKE MB., SKAKKEBAEK NE.
The ration between serum levels of insulin-like growth factor (IGF)-I and the IGF binding proteins (IGFBP-1, 2 and 3) decreases with age in healty adults and is increased in acromegalic patients.
Clin Endocrinol (Oxf) 1994; 41:85-93.

17. BLUM WF., ALBERTSSON-WIKLAND K., ROSBERG S., RANKE MB.
Serum levels of insulin-like growth factor I (IGF-I) and IGF binding protein 3 reflect spontaneous growth hormone secretion.
J Clin Endocrinol Metab 1994; 76:1610-1616.

18. FRYSTYK J., IVARSEN P., SKJAERBAEK C., FLYVBJERG A., PEDERSEN EB., ORSKOV H.
Serum-free insulin-like growth factor I correlates with clearance in patients with chronic renal failure.
Kidney Int 1999; 56:2076-2084.

19. FRYSTYK J.
In Endocrinology and Metabolism – Clinics of North America 2005 :
Endocrinology of aging, Chapter XI : Aging somatotrophic axis mechanisms and implications of IGFBP adaptation.

XVIII. SCHEMA DEL DOSAGGIO

	Attività totale ml	Calibratore Controlli ml	CAMPIONI ml
<u>DILUIZIONE CAMPIONE(I)</u> Tampone di Diluizione Campione	- -	- -	1000 10
Agitazione	Vortex		
<u>INCUBAZIONE</u> Calibratori (da 0 a 5) , controlli Campione Diluito	- -	100 -	- 100
Marcato	50	50	50
Incubazione	120 minuti a temperatura ambiente in agitazione (400 rpm)		
Separazione Soluzione di lavoro del tampone di lavaggio Separazione Soluzione di lavoro del tampone di lavaggio Separazione	-	Aspirare (o decantare) 2 ml Aspirare (o decantare) 2 ml Aspirare (o decantare)	
Conteggio	Contare le provette per 1 minuto		

Numero di catalogo di DIAsource : KIP1171	P.I. numero : 1700466/it	Revisione numero : 090424/1
--	-----------------------------	--------------------------------

data di revisione: 2009-04-24



es

Leer el protocolo completo antes de usar.

IGFBP-3-IRMA

I. INSTRUCCIONES DE USO

Kit para ensayo inmunoradiométrico para la determinación cuantitativa in vitro de la Proteína 3 enlazante del Factor de Crecimiento Similar a la Insulina, (IGFBP-3) en el suero,

II. INFORMACIÓN GENERAL

- A. **Nombre:** DIASource IGFBP-3-IRMA Kit
- B. **Número de Catálogo:** KIP1171 : 96 tests
- C. **Fabricado por:** DIASource ImmunoAssays S.A.
Rue de l'Industrie, 8, B-1400 Nivelles, Belgium.

Para cuestiones técnicas y información sobre pedidos contactar:

Tel : +32 (0)67 88.99.99

Fax : +32 (0)67 88.99.96

III. INFORMACIÓN CLÍNICA

El sistema del Factor de Crecimiento similar a la Insulina (IGF) es el regulador principal del crecimiento corporal normal y la regeneración, afectando la proliferación celular, diferenciación y apoptosis. Además el sistema IGF parece modificar la sensibilidad a la insulina y el metabolismo de la glucosa a largo plazo. Finalmente, muchos datos epidemiológicos, experimentales y clínicos, indican que el sistema IGF también está involucrado en el desarrollo de varios cánceres comunes como también enfermedades frecuentes tales como, arterosclerosis y diabetes mellitus tipo 2.

El sistema IGF consiste en una familia de péptidos estrechamente relacionados entre sí, incluyendo a los dos péptidos principales en la promoción del crecimiento, IGF-I e IGF-II, 6 proteínas específicas que se unen a IGF con alta afinidad (IGFBP-1 al -6), y una gran glicoproteína que no se une a IGF, la sub unidad ácido-lábil.

IGFBP-3 proteína que se une a IGF es la más abundante, cubre un 75% o más de la capacidad de unión con IGF en la circulación de individuos sanos. IGFBP-3 comparte propiedades funcionales con IGFBP-5 en que ambos péptidos son capaces de formar complejos ternarios de alto peso molecular de ~150 kilo Dalton con ALS (subunidad ácido-lábil) y ya sea IGF-I o -II. Sin embargo, la IGFBP-5 circula en mucho menor concentración que la IGFBP-3, I en individuos sanos los complejos ternarios transportan hasta 90% de IGFBP-3 pero solo alrededor de 50% de IGFBP-5.

Originalmente, se pensaba que IGFBPs funcionaban como proteínas transportadoras de IGF, estabilizando los niveles plasmáticos de IGF y controlando la salida de IGF de la circulación hacia el compartimiento extravascular. Aún más, se suponía que IGF en complejo con IGFBP, al no tener la habilidad para interactuar con el receptor IGF-I, era prácticamente inactivo biológicamente. Sin embargo muy pronto se hizo evidente que en algunas situaciones experimentales IGFBPs estimulaba en vez de inhibir las acciones mediadas por IGF-I y actualmente por esta razón a menudo son llamados moduladores de la bioactividad de IGF-I. Además la mayoría de los IGFBPs, especialmente IGFBP-3, ejercen efectos independientes en IGF-I e IGF-I, posiblemente involucrando interacciones con receptores específicos ubicados en la superficie celular e intracelular. Por ejemplo, IGFBP-3 es considerada hoy en día como una molécula anticancer, que aparentemente protege contra varios cánceres comunes y también se ha sugerido influencia de IGFBP-3 sobre señalización de la insulina en cultivo de adipositos.

La velocidad de reposición de los complejos ternarios es muy lenta y la concentración plasmática de IGFBP-3 se mantiene estable a través del día, sin ser afectada por cambios nutricionales de corto plazo. Por lo tanto, el nivel de IGFBP-3 puede determinarse con una sola medición. La GH (hormona del crecimiento) es la principal reguladora de IGFBP-3 como también de IGF-I y ALS por lo que los tres péptidos aumentan durante el rápido crecimiento durante la pubertad, luego el nivel disminuye gradualmente con la edad. En los niños, se ha demostrado que hay correlación entre IGFBP-3 y la secreción de GH integrada por 24-h IGFBP-3 puede ser útil para el diagnóstico de la deficiencia de GH.

IV. PRINCIPIOS DEL MÉTODO

DIAsource IGFBP-3-IRMA es un ensayo inmunoradiométrico basado en un tubo recubierto. Mab1, el anticuerpo de captura, recubre la parte interna inferior del tubo de plástico. Los calibradores o muestras agregadas a los tubos manifestarán al principio una baja afinidad por Mab1. La adición de Mab2, el anticuerpo de señal marcado con ¹²⁵I, completa el sistema y desencadena la reacción inmunológica. Después de lavar, la radioactividad remanente en el tubo refleja la concentración del antígeno.

V. REACTIVOS SUMINISTRADOS

Reactivos	96 test Kit	Código de Color	Reconstitución			
 Tubos recubiertos con anticuerpo IGFBP-3(anticuerpo monoclonal)	2 x 48	marfil	Listo para uso			
<table border="1"><tr><td>Ab</td><td>¹²⁵I</td></tr></table> Anti-IGFBP-3- ¹²⁵ I (anticuerpo monoclonal) en Tampón es Maleato con suero bovino, azida (<0,1%) pigmento	Ab	¹²⁵ I	1 vial 5,5 ml 700 kBq	rojo	Listo para uso	
Ab	¹²⁵ I					
<table border="1"><tr><td>CAL</td><td>N</td></tr></table> Calibradores N = 1 a 5 (mirar los valores exactos en las etiquetas) en tampónTris HCl con albúmina de suero bovino y timol. Los Calibradores vienen pre-diluidos	CAL	N	5 viales liofilizados	amarillo	Añadir 1,0 ml de agua destilada	
CAL	N					
<table border="1"><tr><td>DIL</td><td>BUF</td></tr></table> Tampón de Dilución: Tampón Tris HCl con albúmina bovina, azida (<0,1%)	DIL	BUF	1 vial 100 ml	verde	Listo para uso	
DIL	BUF					
<table border="1"><tr><td>WASH</td><td>SOLN</td><td>CONC</td></tr></table> Solución de lavado (TRIS-HCl)	WASH	SOLN	CONC	1 vial 10 ml	marrón	Diluir 70 x con agua destilada (utilizar agitador magnético)
WASH	SOLN	CONC				
<table border="1"><tr><td>CONTROL</td><td>N</td></tr></table> Controles - N = 1 o 2 en Tampón Tris HCl con suero humano y thymol Controles vienen pre-diluidos.	CONTROL	N	2 viales liofilizados	plateado	Añadir 1,0 ml de agua destilada	
CONTROL	N					

Nota: use el Tampón de Dilución para calibrar a cero.

VI. MATERIAL NO SUMINISTRADO

El material mencionado a continuación es necesario y no esta incluido en el kit

1. Agua destilada
2. Pipetas de 10 µl, 50 µl, 100 µl and 1 ml (Se recomienda el uso de pipetas precisas con puntas desechables de plástico)
3. Tubos plásticos para dilución de muestra
4. Vortex
5. Agitador magnético
6. Agitador de tubos (400rpm)
7. Jeringa automática 5 ml (tipo Cornwall) para el lavado
8. Sistema de aspiración (opcional)
9. Contador de radiaciones gamma para medir I¹²⁵ (mínima eficiencia 70%)

VII. PREPARACIÓN DE REACTIVOS

- A. Calibradores:** Reconstituya el calibrador con 1,0 ml de agua destilada
- B. Controles:** Reconstituya los controles con 1,0 ml de agua destilada.
- C. Solución de lavado de trabajo:** Preparar el volumen necesario de Solución de lavado de trabajo mezclando 69 partes de agua destilada por 1 parte de Solución de lavado (70x). Utilizar un agitador magnético para homogeneizar. Desechar la solución de lavado de trabajo no utilizada al final del día.

VIII. ALMACENAJE Y CADUCIDADES DE LOS REACTIVOS

- Antes de abrir ó reconstituir todos los componentes de los kits son estables hasta la fecha de caducidad indicada en la etiqueta, si se guardan a 2-8°C.
- Los calibradores y controles son muy inestables, por lo que deben utilizarse inmediatamente después de la reconstitución, congelarse enseguida en partes alícuotas y mantenerse a -20° C durante 3 meses. Evitar congelar y descongelar sucesivamente.
- La solución de lavado de trabajo recién preparada solo debe utilizarse en el mismo día.
- Después del primer uso, el trazador es estable hasta la fecha de caducidad, si se guarda en el vial original cerrado a 2-8°C.
- Las alteraciones de los reactivos en el aspecto físico pueden indicar inestabilidad ó deterioro.

IX. RECOGIDA Y PREPARACIÓN DE MUESTRAS

- Las muestras de suero deben ser guardadas a 2-8°C.
- Si el ensayo no se realiza en 24 hrs., almacenar las muestras a -20°.
- Evitar congelar y descongelar sucesivamente.

X. PROTOCOLO

- A. Notas de manejo**
No utilizar el kit ó componentes después de la fecha de caducidad. No mezclar reactivos de diferente número de lote. Llevar todos los reactivos a temperatura ambiente antes de su uso.
Agitar minuciosamente todos los reactivos y muestras, agitándolos o girándolos suavemente. Con el fin de evitar ninguna contaminación utilizar puntas de pipetas desechables y limpias para la adición de cada reactivo y muestra.
El uso de pipetas de precisión o equipamiento de dispensación automática mejorara la precisión. Respetar los tiempos de incubación.
Preparar la curva de calibración en cada ensayo, no utilizar los datos de un ensayo previo.

- B. Protocolo**
1. Marque un tubo plástico para cada una de las muestras.
 2. Dispense 1 ml de Tampón de Dilución en cada tubo.
 3. Agregue 10 µl de muestra a cada tubo.
 4. Marcar los tubos recubiertos por duplicado para cada unos de los estándares, muestras y controles. Para la determinación de las Cuentas Totales, marcar 2 tubos normales.
 5. Agitar brevemente los calibradores, muestras pre-diluidas y controles y dispensar 100 µl de cada uno en sus respectivos tubos. (use el Tampón de Dilución para calibrar a cero)
 6. Dispensar 50 µL de anti IGFBP-3 marcado con ¹²⁵Yodo en cada tubo, incluyendo los tubos correspondientes a las Cuentas Totales.
 7. Incubar durante 120 minutos a temperatura ambiente en agitación constante (400 rpm).
 8. Aspirar (o decantar) el contenido de cada tubo (excepto los de Cuentas Totales). Asegurarse que la punta de la pipeta de aspiración toca el fondo del tubo con el fin de aspirar todo el líquido.
 9. Lavar los tubos con 2 ml de Solución de lavado de trabajo (excepto los de Cuentas Totales) y aspirar (o decantar). Evitar la formación de espuma durante la adición de la Solución de lavado.
 10. Lavar de nuevo con 2 ml de Solución de lavado de trabajo (excepto los de Cuentas Totales) y aspirar (o decantar).
 11. Después del último lavado, dejar los tubos en posición inversa durante 2 minutos y aspirar el líquido restante.
 12. Medir la actividad de cada tubo durante 60 segundos en un Contador Gamma.

XI. CÁLCULO DE RESULTADOS

1. Calcular la media de los duplicados.
2. Representar en un gráfico semilogarítmico o linear las c.p.m. (ordenada) para cada calibrador frente a las concentraciones de IGFBP-3 (abscisa) y dibujar una curva de calibración por los puntos de calibración, rechazando los extremos claros.
3. Leer la concentración para cada control y muestra por interpolación en la curva de calibración.
4. Métodos computarizados de computación de resultados pueden ser utilizados para la construcción de la curva de calibración. Si se utiliza un sistema automático de calculo de resultados, se recomienda usar la representación gráfica “ 4 parámetros”.

XII. EJEMPLO DE RESULTADOS

Los datos mostrados a continuación sirven como ejemplo y nunca deberán ser usados como una calibración real.

IGFBP-3-IRMA		cpm	B/T (%)
Cuentas Totales		298318	100
Calibrador	0 ng/ml	17	0,01
	380 ng/ml	1494	0,50
	1057 ng/ml	5608	1,88
	2520 ng/ml	17131	5,74
	5589 ng/ml	54713	18,34
	13395 ng/ml	185344	62,13

Los calibradores se estandarizan contra el reactivo de referencia de NIBSC/WHO IGFBP-3 recombinante, código 93/560.

XIII. REALIZACIÓN Y LIMITACIONES

A. Limite de detección

Doce calibradores cero fueron medidos en una curva con otros calibradores. El limite de detección, definido como la concentración aparente resultante de dos desviaciones estándares sobre la media de enlace del calibrador cero, fue de 17,3 ng/ml.

B. Especificidad

- Algunas hormonas que en teoría podrían interferir han sido estudiadas con este ensayo. En concentraciones de hasta 10 µg/ml, ninguna de las siguientes hormonas demostró una interferencia significativa:
- rhIGF-BP1
 - rhIGF-BP2
 - rhIGF-BP4
 - rhIGF-BP5
 - rhIGF-BP6
 - rhIGF-I
 - rhIGF-II

C. Precisión

PRECISIÓN INTRA-ENSAYO				PRECISIÓN INTER-ENSAYO			
Suero	N	<X> ± SD (ng/ml)	CV (%)	Suero	N	<X> ± SD (ng/ml)	CV (%)
A	20	543 ± 22	4,0	A	10	1056 ± 34	3,2
B	20	2637 ± 71	2,7	B	10	4539 ± 255	5,6

SD : Desviación Estándar; CV: Coeficiente de Variación

D. Exactitud

TEST DILUCIÓN			
Muestra	Dilución	Concent. Teórica (ng/ml)	Concent. Medida (ng/ml)
A	1/1	-	3004,8
	1/2	1502,4	1524,6
	1/4	751,2	765,9
	1/8	375,6	375,8
	1/16	187,8	175,3

Las muestras fueron diluidas con Tampón de Dilución.

TEST DE RECUPERACIÓN		
IGFBP-3 añadido (ng/ml)	IGFBP-3 Recuperado (ng/ml)	Recuperado (%)
2000	2094	104,7
1000	1123	112,3
500	491	98,2
250	273	109,3
125	139	111,0

E. Retardo de tiempo entre dispensar el último calibrador y la muestra

Como se muestra a continuación, los resultados del ensayo no varía a pesar de que una muestra es dispensada 30 min. después que el calibrador ha sido agregado a los tubos plásticos.

RETARDO DE TIEMPO				
	0'	10'	20'	30'
S 1 (ng/ml)	1207	1204	1263	1274
S 2 (ng/ml)	4671	4986	4899	5054

XIV. CONTROL DE CALIDAD INTERNO

- Si los resultados obtenidos para el Control 1 y/o Control 2 no están dentro del rango especificado en la etiqueta del vial, los resultados obtenidos no podrán ser utilizados a no ser que se pueda dar una explicación convincente de dicha discrepancia
- Si es conveniente, - cada laboratorio puede utilizar sus propios pools de controles, los cuales se guardan en alícuotas congeladas. No congelar y descongelar más de dos veces.
- Los criterios de aceptación de la diferencia entre los resultados de los duplicados de las muestras se apoyan en las prácticas de laboratorio corrientes.

XV. INTERVALOS DE REFERENCIA

Estos valores solamente sirven de pauta; cada laboratorio tiene que establecer sus propios valores normales.

Sujetos normales

Edad	HOMBRES (ng/ml)			MUJERES (ng/ml)		
	Media	Alcance		Media	Alcance	
6 años	3771	2825-5178	9	3877	3400-4554	6
7 años	3718	2846-4462	20	3958	3102-4812	23
8 años	3852	3195-4978	38	3963	3156-4839	20
9 años	3833	3018-4837	29	4008	3334-4544	22
10 años	3865	2935-4524	28	4095	3257-5158	32
11 años	3991	3152-4635	28	4109	3144-5031	30
12 años	4203	3423-5153	28	4481	3643-4987	21
13 años	4488	2936-5586	34	4668	3771-5249	38
14 años	4381	3349-5220	39	4382	3585-5157	54
15 años	4212	3266-5262	31	4346	3551-5175	57
16 años	4343	3417-5662	45	4331	3475-5055	69
17 años	4287	3305-5319	19	4316	3459-5424	39
18 años	4604	3830-5583	17	4463	3518-5190	28
19 años	4321	3647-4907	17	4501	3842-5149	18
20 años	4224	3714-4871	12	4327	3686-4949	6
21 – 25 años	4633	3228-6207	27	5111	3732-6254	25
26 – 30 años	4656	3081-5881	26	4326	3038-5266	24
31 – 40 años	4392	3030-6101	47	4508	3609-5637	47
> 40 años	4354	2589-5312	18	4327	3313-5247	20

Nota: alcance basados en percentilos de 2.5% & 97.5%

XVI. PRECAUCIONES Y ADVERTENCIAS

Seguridad

Para uso solo en diagnóstico in vitro.
Este kit contiene I¹²⁵ (vida media : 60 días) emisor de rayos X (28 keV) y de rayos γ (35,5 keV) ionizantes.
Este producto radiactivo solo puede ser manejado y utilizado por personas autorizadas; la compra, almacenaje, uso y cambio de productos radiactivos están sujetos a la legislación del país del usuario. En ningún caso el producto deberá ser suministrado a humanos y animales.
Todo el manejo de producto radiactivo se hará en una área señalizada, diferente de la de paso regular. Deberá de utilizarse un libro de registros de productos radiactivos utilizados. El material de laboratorio, vidrio que podría estar contaminado radiactivamente deberá de descontaminarse para evitar la contaminación con otros isótopos.
Cualquier derramamiento radiactivo deberá ser limpiado de inmediato de acuerdo con los procedimientos de seguridad. Los desperdicios radiactivos deberán ser almacenados de acuerdo con las regulaciones y normativas vigentes de la legislación a la cual pertenezca el laboratorio. El ajustarse a las normas básicas de seguridad radiológica facilita una protección adecuada.
Los componentes de sangre humana utilizados en este kit han sido testados por métodos aprobados por la CEE y/o la FDA dando negativo a HBsAg, anti-HCV, anti-HIV-1 y 2. No se conoce ningún método que asegure que los derivados de la sangre humana no transmitan hepatitis, SIDA ó otras infecciones. Por lo tanto el

manejo de los reactivos y muestras se hará de acuerdo con los procedimientos de seguridad locales.

Todos los productos animales y derivados han sido obtenidos a partir de animales sanos. Componentes bovinos originales de países donde BSE no ha sido informado. Sin embargo, los componentes conteniendo sustancias animales deberán ser consideradas como potencialmente infecciosas.

Evitar cualquier contacto de los reactivos con la piel (azida sódica como conservante). La azida en este kit puede reaccionar con el plomo y cobre de las cañerías y producir azidas metálicas altamente explosivas. Durante el proceso de lavado, hacer circular mucha cantidad de agua por el sumidero para evitar el almacenamiento de la azida.

No fumar, beber, comer ó utilizar cosméticos en el área de trabajo. No pipetear con la boca. Utilizar ropa de protección y guantes.

XVII. BIBLIOGRAFIA

1. LEROITH D., BONDY C., YAKAR S., LIU JL., BUTLER A.
The somatomedin hypothesis : 2001.
Endocr Rev 2001; 22:53-74.

2. POLLAK MN., SCHERNHAMMER ES., HANKINSON SE.
Insulin-like growth factors and neoplasia.
Nat Rev Cancer 2004; 4:505-518.

3. YUEN K., FRYSTYK J., UMPLEBY M., FRYKLUND L., DUNGER D.
Changes in free rather than total insulin-like growth factor-I enhance insulin sensitivity and suppress endogenous peak growth hormone (GH) release following short-term low dose GH administration in young healthy adults.
J Clin Endocrinol Metab 2004; 89:3956-3964.

4. KHANDWALA HM., McCUTCHEON IE., FLYVBJERG A., FRIEND KE.
The effects of insulin-like growth factors on tumorigenesis and neoplastic growth.
Endocr Rev 2000; 21:215-244.

5. RENEHAN AG., ZWAHLEN M., MINDER PC., O'DWYSER ST., SHALET PS., EGGER PM.
Insulin-like growth factor (IGF)-I, IGF binding protein-3, and cancer risk : systematic review and meta-regression analysis.
The Lancet 2004; 363:1346-1353.

6. JUUL A., SCHEIKE T., DAVIDSEN M., GYLLENBORG J., JORGENSEN T.
Low serum insulin-like growth factor I is associated with increased risk of ischemic heart disease : a population-based case-control study.
Circulation 2002; 106:939-944.

7. SANDHU MS., HEALD AH., GIBSON JM., CRUICKSHANK JK., DUNGER DB., WAREHAM NJ.
Circulating concentrations of insulin-like growth factor-I and development of glucose intolerance : a prospective observational study.
The Lancet 2002; 359:1740-1745.

8. VAESSEN N., HEUTINK P., JANSSEN JA., WITTEMAN JC., TESTERS L., HOFMAN A., LAMBERTS SW., OOSTRA BA., POLS HA., VAN DIJN CM.
A polymorphism in the gene for IGF-I : functional properties and risk for type 2 diabetes and myocardial infarction.
Diabetes 2001; 50:637-642.

9. JUUL A.
Serum levels of insulin-like growth factor-I and its binding proteins in health and disease.
Growth Horm IGF Res 2003; 13:113-170

10. FIRTH SM., BAXTER RC.
Cellular actions of the insulin-like growth factor binding proteins
Endocr Rev 2002; 23:824-854.

11. BAXTER RC., MEKA S., FIRTH SM.
Molecular distribution of IGF binding protein-5 in human serum.
J Clin Endocrinol Metab 2002; 87:271-276.

12. RICORT JM.
Insulin-like growth factor binding protein (IGFBP) signaling.
Growth Horm IGF Res 2004; 14:277-286.

13. JONES JI., CLEMMONS DR.
Insulin-like growth factors and their binding proteins : biological actions.
Endocr Rev 1995; 16:3-34.

14. ALI O., COHEN P., LEE KW.
Epidemiology and biology of insulin-like growth factor binding protein-3 (IGFBP-3) as an anti-cancer molecule.
Horm Metab Res 2003; 35:726-733.

15. CHAN SS., TWIGG SM., FIRTH SM., BAXTER RC.
Insulin-like growth factor binding protein-3 leads to insulin resistance in adipocytes.
J Clin Endocrinol Metab 2005; 90:6588-6595.

16. JUUL A., MAIN K., BLUM WF., LINDHOLM J., RANKE MB., SKAKKEBAEK NE.
The ration between serum levels of insulin-like growth factor (IGF)-I and the IGF binding proteins (IGFBP-1, 2 and 3) decreases with age in healty adults and is increased in acromegalic patients.
Clin Endocrinol (Oxf) 1994; 41:85-93.

17. BLUM WF., ALBERTSSON-WIKLAND K., ROSBERG S., RANKE MB.
Serum levels of insulin-like growth factor I (IGF-I) and IGF binding protein 3 reflect spontaneous growth hormone secretion.
J Clin Endocrinol Metab 1994; 76:1610-1616.

18. FRYSTYK J., IVARSEN P., SKJAERBAEK C., FLYVBJERG A., PEDERSEN EB., ORSKOV H.
Serum-free insulin-like growth factor I correlates with clearance in patients with chronic renal failure.
Kidney Int 1999; 56:2076-2084.

19. FRYSTYK J.
In Endocrinology and Metabolism – Clinics of North America 2005 :
Endocrinology of aging, Chapter XI : **Aging somatotropic axis mechanisms and implications of IGFBP adaptation.**

XVIII. RESUMEN DEL PROTOCOLO

	CUENTAS TOTALES (µl)	CALIBRADORES CONTROL(ES) (µl)	MUESTRAS (µl)
<u>DILUCIONES DE LAS MUESTRAS</u>			
Tampón de dilución	-	-	1000
Muestra	-	-	10
agitación	Vortex		
<u>INCUBACIÓN</u>			
Calibradores (0 to 5), controles	-	100	-
Muestras Diluidas	-	-	100
Trazador	50	50	50
Incubación	120 minutos a T.A en agitación constante (400 rpm)		
Separación	-	Aspira (o decantar)	
Solución de Lavado		2,0 ml	
Separación		Aspirar (o decantar)	
Solución de Lavado		2,0 ml	
Separación		Aspirar (o decantar)	
Contaje	Contar los tubos durante 60 segundos		

DIAsource Catalogo Nr : KIP1171	P.I. Numero : 1700466/es	Revisión nr : 090424/1
------------------------------------	-----------------------------	---------------------------

fecha de la revisión: 2009-04-24

Διαβάστε ολόκληρο το πρωτόκολλο πριν από τη χρήση.

IGFBP-3-IRMA

I. ΧΡΗΣΗ ΓΙΑ ΤΗΝ ΟΠΟΙΑ ΠΡΟΟΡΙΖΕΤΑΙ

Κιτ ανοσοραδιομετρικού προσδιορισμού για τον in vitro ποσοτικό προσδιορισμό της δεσμευτικής του ινσουλινοειδούς αυξητικού παράγοντα πρωτεΐνης-3 (IGFBP-3) στον ορό.

II. ΓΕΝΙΚΕΣ ΠΛΗΡΟΦΟΡΙΕΣ

- A. Εμπορική ονομασία:** Κιτ IGFBP-3-IRMA της DIAsource
- B. Αριθμός καταλόγου:** KIP1171: 96 εξετάσεις
- Γ. Κατασκευάζεται από την:** DIAsource ImmunoAssays S.A.
Rue de l'Industrie, 8, B-1400 Nivelles, Belgium.

Για τεχνική βοήθεια ή πληροφορίες σχετικά με παραγγελίες επικοινωνήστε στα:

Τηλ.: +32 (0)67 88.99.99

Fax: +32 (0)67 88.99.96

III. ΚΛΙΝΙΚΟ ΥΠΟΒΑΘΡΟ

Ο ινσουλινοειδής αυξητικός παράγοντας (IGF) είναι ο κύριος ρυθμιστής της φυσιολογικής σωματικής ανάπτυξης και αναγέννησης. Επιδρά στον πολλαπλασιασμό, τη διαφοροποίηση και την απόπτωση των κυττάρων. Επιπλέον φαίνεται πως το σύστημα των IGF τροποποιεί την ευαισθησία στην ινσουλίνη και μακροπρόθεσμα τον μεταβολισμό της γλυκόζης. Τέλος, πολυάριθμα επιδημιολογικά, πειραματικά και κλινικά δεδομένα υποδεικνύουν συμμετοχή του συστήματος των IGF στην ανάπτυξη αρκετών, συχνών κακοήθων νεοπλασιών, όπως και συχνών ασθενειών, όπως η αρτηριοσκλήρυνση και ο σακχαρώδης διαβήτης τύπου 2.

Το σύστημα των IGF αποτελείται από μια οικογένεια συγγενικών πεπτιδίων, στα οποία περιλαμβάνονται οι δύο κύριοι αυξητικοί παράγοντες, IGF-I και IGF-II, 6 ειδικές δεσμευτικές των IGF πρωτεΐνες υψηλής συγγένειας (IGFBP-1 έως -6) και μία μεγάλη μη δεσμευτική των IGF γλυκοπρωτεΐνη, η «ασταθής σε οξεία υπομονάδα» (ALS).

Η IGFBP-3 είναι η πιο συχνά απαντώμενη δεσμευτική των IGF πρωτεΐνη, και αναλογεί σε ποσοστό τουλάχιστον 75% επί της ικανότητας δέσμευσης IGF στην κυκλοφορία υγιών υποκειμένων. Οι IGFBP-3 και IGFBP-5 έχουν παρόμοιες λειτουργικές ιδιότητες και τα δύο πεπτίδια μπορούν να σχηματίσουν υψηλού μοριακού βάρους τριμερή σύμπλοκα των ~150 kilo Dalton τόσο με την ALS, όσο και με τις IGF-I και -II. Η IGFBP-5 απαντάται σε πολύ μικρότερες συγκεντρώσεις στην κυκλοφορία από την IGFBP-3. Σε υγιή υποκείμενα, τα τριμερή σύμπλοκα δεσμεύουν έως και το 90% της IGFBP-3, σε αντίθεση με το περίπου 50% της IGFBP-5.

Αρχικά πιστευόταν πως οι IGFBP πρωτεΐνες λειτουργούν ως πρωτεΐνες μεταφοράς των IGF, σταθεροποιώντας με αυτόν τον τρόπο τα επίπεδα IGF στο πλάσμα και ελέγχοντας την έξοδο τους από την κυκλοφορία στον εξωαγγειακό χώρο. Υπήρχαν επίσης υποθέσεις, πως οι προσδεμένοι σε IGFBP παράγοντες IGF, είναι βιολογικά ανενεργοί, έχοντας στερηθεί της ικανότητας αλληλεπίδρασης με τον υποδοχέα IGF-I. Σε ορισμένες πειραματικές μελέτες φάνηκε ωστόσο, πως οι IGFBP διέγερναν παρά ανέστειλαν τις μεσολαβούμενες από τον IGF-I επιδράσεις. Ως εκ τούτου, οι IGFBP αναφέρονται πλέον συχνά ως *τροποποιητές* της βιολογικής δράσης του IGF-I. Εκτός αυτού, η πλειονότητα των IGFBP και ειδικότερα η IGFBP-3, προκαλεί επιδράσεις ανεξάρτητες του IGF-I και του υποδοχέα του, οι οποίες πιθανώς περιλαμβάνουν αλληλεπιδράσεις με συγκεκριμένους υποδοχείς της κυτταρικής μεμβράνης αλλά και ενδοκυττάριους υποδοχείς. Πιστεύεται για παράδειγμα, πως το μόριο της IGFBP-3 δρα αντικαρκινικά, παρέχοντας προστασία έναντι συγκεκριμένων κακοήθων νεοπλασιών. Έχει φανεί επίσης, πως η IGFBP-3 ασκεί επίδραση στην επαγόμενη από ινσουλίνη σηματοδότηση σε καλλιέργειες λιποκυττάρων.

Ο ρυθμός ανακύκλωσης των τριμερών συμπλόκων είναι εξαιρετικά αργός και η συγκέντρωση της IGFBP-3 στο πλάσμα παραμένει σταθερή κατά τη διάρκεια της ημέρας, χωρίς να επηρεάζεται από βραχυχρόνιες διατροφικές αλλαγές. Ως εκ τούτου, αρκεί μία και μόνο μέτρηση για τον καθορισμό των επιπέδων της IGFBP-3. Η GH (αυξητική ορμόνη) αποτελεί τον κύριο ρυθμιστή της IGFBP-3, όπως και των IGF-I και ALS. Για το λόγο αυτό, τα επίπεδα και των τριών πεπτιδίων αυξάνονται κατά την εφηβική ανάπτυξη, και μειώνονται κατόπιν σταδιακά με το πέρας της ηλικίας. Έχει φανεί πως τα επίπεδα της IGFBP-3 στα παιδιά είναι ανάλογα προς την αντίστοιχη 24ωρη έκκριση GH. Ειδικά στα παιδιά, η IGFBP-3 μπορεί να είναι χρήσιμη στη διάγνωση της ανεπάρκειας GH.

IV. ΒΑΣΙΚΕΣ ΑΡΧΕΣ ΤΗΣ ΜΕΘΟΔΟΥ

Το IGFBP-3-IRMA της DIAsource είναι ένας ανοσοραδιομετρικός προσδιορισμός με χρήση επιστρωμένων σωληναρίων. Ο πυθμένας και η εσωτερική επιφάνεια των πλαστικών σωληναρίων έχουν επιστρωθεί με το αντίσωμα σύλληψης Mab1. Οι βαθμονομητές και τα δείγματα που προστίθενται στα σωληνάρια επιδεικνύουν αρχικά χαμηλή συγγένεια για το Mab1. Η προσθήκη του σημασμένου με ¹²⁵I αντισώματος σηματοδότησης Mab2, ολοκληρώνει το σύστημα και πυροδοτεί την ανοσολογική αντίδραση. Μετά την πλύση, η υπολειπόμενη, καθηλωμένη στο σωληνάριο ραδιενέργεια αντικατοπτρίζει τη συγκέντρωση του αντιγόνου.

V. ΠΑΡΕΧΟΜΕΝΑ ΑΝΤΙΔΡΑΣΤΗΡΙΑ

Αντιδραστήρια	Κιτ 96 εξετάσεων	Χρωματι κός κωδικός	Ανασύσταση
Σωληνάρια με επίστρωση Αντι-IGFBP-3 (μονοκλωνικό αντίσωμα)	2 x 48	υπόλευκο	Έτοιμο για χρήση
Ab ¹²⁵I Αντι-IGFBP-3-¹²⁵I (μονοκλωνικό αντίσωμα) σε ρυθμιστικό διάλυμα Tris Maleate με βόειο ορό, αζίδιο (<0.1%) και αδρανή ερυθρή χρωστική	1 φιαλίδιο 5,5 ml 700 kBq	κόκκινο	Έτοιμο για χρήση
CAL N Βαθμονομητές 1-5 σε ρυθμιστικό διάλυμα Tris HCl με βόεια ορολευκωματίνη και θυμόλη. Για ακριβείς τιμές, βλ. ετικέτες των φιαλιδίων. Οι βαθμονομητές έχουν προσραιωθεί	5 φιαλίδια λυοφιλοποιη μένο	κίτρινο	Προσθέστε 1 ml απεσταγμένου νερού
DIL BUF Ρυθμιστικό διάλυμα αραιώσης Ρυθμιστικό διάλυμα Tris HCl με βόεια λευκωματίνη και αζίδιο (<0,1%)	1 φιαλίδιο 100 ml	πράσινο	Έτοιμο για χρήση
WASH SOLN CONC Διάλυμα πλύσης (TRIS-HCl)	1 φιαλίδιο 10 ml	καφέ	Αραιώστε 70 x με απεσταγμένο νερό (χρησιμοποιήστε μαγνητικό αναδευτήρα).
CONTROL N Υλικά ελέγχου - N = 1 ή 2 σε ρυθμιστικό διάλυμα Tris HCl με ανθρώπινο ορό με θυμόλη Οι οροί ελέγχου έχουν προσραιωθεί	2 φιαλίδια λυοφιλοποιη μένο	ασημί	Προσθέστε 1 ml απεσταγμένου νερού

Σημείωση: χρησιμοποιήστε το ρυθμιστικό διάλυμα αραιώσης ως μηδενικό βαθμονομητή.

VI. ΑΝΑΛΩΣΙΜΑ ΠΟΥ ΔΕΝ ΠΑΡΕΧΟΝΤΑΙ

Τα ακόλουθα υλικά απαιτούνται αλλά δεν παρέχονται στο κιτ:

1. Απεσταγμένο νερό
2. Πιπέτες για διανομή: 10 μl, 50 μl, 100 μl and 1 ml (συνιστάται η χρήση πιπετών ακριβείας με αναλowski πλαστικά ρύγχη)
3. Πλαστικά σωληνάρια για την αραιώση των δειγμάτων
4. Αναμεικτής στροβιλισμού
5. Μαγνητικός αναδευτήρας
6. Συσκευή ανάδευσης σωληναρίων (400rpm)
7. Αυτόματη σύργγα των 5 ml (τύπου Cornwall) για πλύση
8. Σύστημα αναρρόφησης (προαιρετικό)
9. Μπορεί να χρησιμοποιηθεί οποιοσδήποτε απεριθμητής ακτίνων γ με δυνατότητα μέτρησης του ¹²⁵I (ελάχιστη απόδοση 70%).

VII. ΠΑΡΑΣΚΕΥΗ ΑΝΤΙΔΡΑΣΤΗΡΙΟΥ

- A. **Βαθμονομητές:** Ανασυστήστε τους βαθμονομητές με 1,0 ml απεσταγμένου νερού.
- B. **Υλικά ελέγχου:** Ανασυστήστε τα πρότυπα ελέγχου με 1,0 ml απεσταγμένου νερού.
- C. **Διάλυμα πλύσης εργασίας:** Προετοιμάστε επαρκή όγκο διαλύματος πλύσης εργασίας με προσθήκη 69 όγκων απεσταγμένου νερού σε 1 όγκο διαλύματος πλύσης (70x). Χρησιμοποιήστε μαγνητικό αναδευτήρα για την

ομογενοποίηση. Απορρίψτε το μη χρησιμοποιημένο διάλυμα πλύσης εργασίας στο τέλος της ημέρας.

VIII. ΦΥΛΑΞΗ ΚΑΙ ΗΜΕΡΟΜΗΝΙΑ ΛΗΞΗΣ ΤΩΝ ΑΝΤΙΔΡΑΣΤΗΡΙΩΝ

- Πριν από το άνοιγμα ή την ανασύσταση, όλα τα συστατικά του κιτ παραμένουν σταθερά έως την ημερομηνία λήξης, η οποία αναγράφεται στην ετικέτα του φιαλιδίου, εφόσον διατηρούνται σε θερμοκρασία 2 έως 8° C.
- Οι βαθμονομητές και οι οροί ελέγχου είναι πολύ ασταθείς. Χρησιμοποιήστε τους αμέσως μετά από την ανασύσταση, ψύξτε αμέσως σε κλάσματα και διατηρείστε σε -20°C για 3 μήνες.
- Φρέσκο, παρασκευασμένο διάλυμα πλύσης εργασίας θα πρέπει να χρησιμοποιείται την ίδια ημέρα.
- Μετά την πρώτη χρήση του, ο ιχνηθέτης παραμένει σταθερός έως την ημερομηνία λήξης, εφόσον διατηρείται στο αρχικό, ερμητικά κλειστό φιαλίδιο σε θερμοκρασία 2 έως 8° C.
- Τυχόν μεταβολές της φυσικής εμφάνισης των αντιδραστηρίων του κιτ ενδέχεται να υποδηλώνουν αστάθεια ή αλλοίωση.

IX. ΣΥΛΛΟΓΗ ΚΑΙ ΠΡΟΕΤΟΙΜΑΣΙΑ ΔΕΙΓΜΑΤΩΝ

- Ο ορός πρέπει να φυλάσσεται σε θερμοκρασία 2-8° C.
- Εάν η εξέταση δεν πραγματοποιηθεί εντός 24 ωρών, συνιστάται η φύλαξη στους -20° C.
- Αποφεύγετε τους επακόλουθους κύκλους κατάψυξης-απόψυξης.

X. ΔΙΑΔΙΚΑΣΙΑ

- A. **Σημειώσεις σχετικά με το χειρισμό**
Μη χρησιμοποιείτε το κιτ ή τα συστατικά μετά την ημερομηνία λήξης. Μην αναμειγνύετε υλικά από διαφορετικές παρτίδες κιτ. Φέρετε όλα τα αντιδραστήρια σε θερμοκρασία δωματίου πριν από τη χρήση. Αναμείξτε καλά όλα τα αντιδραστήρια και τα δείγματα με απαλή ανακίνηση ή ανάδευση. Χρησιμοποιείτε ένα καθαρό αναλώσιμο ρύγχος πιπέτας για την προσθήκη κάθε διαφορετικού αντιδραστηρίου και δείγματος προκειμένου να αποφύγετε την επιμόλυνση. Η ακρίβεια βελτιώνεται με χρήση πιπετών υψηλής ακρίβειας ή αυτοματοποιημένου εξοπλισμού διανομής με πιπέτες. Τηρείτε τους χρόνους επώασης. Προετοιμάστε μια καμπύλη βαθμονόμησης για κάθε ανάλυση και μη χρησιμοποιείτε δεδομένα από προηγούμενες αναλύσεις.

- B. **Διαδικασία**
1. Σημάνετε ένα απλό πλαστικό σωληνάριο για κάθε δείγμα.
2. Προσθέστε 1 ml ρυθμιστικού διαλύματος αραιώσης σε κάθε σωληνάριο.
3. Προσθέστε 10 μl δείγματος σε αυτά τα σωληνάρια.
4. Σημάνετε τα επιστρωμένα σωληνάρια εις διπλούν για κάθε βαθμονομητή, δείγμα, υλικό ελέγχου. Για τον προσδιορισμό των συνολικών μετρήσεων, σημάνετε 2 φυσιολογικά σωληνάρια.
5. Αναμείξτε σύντομα (με αναμεικτή στροβιλισμού τύπου vortex) τους βαθμονομητές, ορούς ελέγχου και τα προσραιωμένα δείγματα και προσθέστε 100 μl από καθένα στα αντίστοιχα σωληνάρια. (χρησιμοποιήστε το ρυθμιστικό διάλυμα αραιώσης ως μηδενικό βαθμονομητή)
6. Διανείμετε 50 μl αντι-IGFBP-3 σημασμένου με ¹²⁵I σε κάθε σωληνάριο, συμπεριλαμβανοντας τα μη επιστρωμένα σωληνάρια που αφορούν τις μετρήσεις του ιχνηθέτη ¹²⁵I ("total").
7. Επώατε επί 120 λεπτά σε θερμοκρασία δωματίου σε αναδευτήρα σωληναρίων στις 400 rpm.
8. Αναρροφήστε (ή μεταγγίστε) το περιεχόμενο κάθε σωληναρίου (με εξαίρεση εκείνα που αφορούν τις συνολικές μετρήσεις). Βεβαιωθείτε ότι το πλαστικό ρύγχος του αναρροφητή φθάνει στον πυθμένα του επιστρωμένου σωληναρίου προκειμένου να αφαιρεθεί όλη η ποσότητα του υγρού.
9. Πλύνετε τα σωληνάρια με 2 ml διαλύματος πλύσης εργασίας (με εξαίρεση εκείνα που αφορούν τις συνολικές μετρήσεις). Αποφύγετε το σχηματισμό αφρού κατά τη διάρκεια της προσθήκης του διαλύματος πλύσης εργασίας.
10. Πλύνετε τα σωληνάρια και πάλι με 2 ml διαλύματος πλύσης εργασίας (με εξαίρεση εκείνα που αφορούν τις συνολικές μετρήσεις) και αναρροφήστε (ή μεταγγίστε).
11. Μετά την τελευταία πλύση, αφήστε τα σωληνάρια να σταθούν σε όρθια θέση για δύο λεπτά και αναρροφήστε τη σταγόνα υγρού που απομένει.
12. Υποβάλλετε σε μέτρηση τα σωληνάρια σε απεριθμητή ακτίνων γ για 60 δευτερόλεπτα.

XI. ΥΠΟΛΟΓΙΣΜΟΣ ΤΩΝ ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΩΝ

1. Υπολογίστε τη μέση τιμή των διπλών προσδιορισμών.
2. Σε ημιλογαριθμικό ή γραμμικό χαρτί γραφημάτων, παραστήστε γραφικά τις c.p.m. (κρούσεις ανά λεπτό) (τεταμένη) για κάθε βαθμονομητή έναντι της αντίστοιχης συγκέντρωσης της IGFBP-3 (τετμημένη) και σχεδιάστε μια καμπύλη βαθμονόμησης μέσω των σημείων του βαθμονομητή, απορρίψτε τις εμφανείς μη αποδεκτές τιμές.

3. Διαβάστε τη συγκέντρωση για κάθε υλικό ελέγχου και δείγμα με παρεμβολή στην καμπύλη βαθμονόμησης.
4. Αναγωγή δεδομένων με τη βοήθεια ηλεκτρονικού υπολογιστή θα απλοποιήσει αυτούς τους υπολογισμούς. Εάν χρησιμοποιείται αυτόματη επεξεργασία αποτελεσμάτων, συνιστάται προσαρμογή καμπύλης λογιστικής συνάρτησης 4 παραμέτρων.

ΧΠ. ΤΥΠΙΚΑ ΔΕΔΟΜΕΝΑ

Τα ακόλουθα δεδομένα προορίζονται μόνο ως επεξήγηση και δεν πρέπει να χρησιμοποιούνται ποτέ αντί της καμπύλης βαθμονόμησης πραγματικού χρόνου.

IGFBP-3-IRMA		cpm	B/T (%)
Συνολική μέτρηση		298318	100
Βαθμονομητής	0 ng/ml	17	0,01
	380 ng/ml	1494	0,50
	1057 ng/ml	5608	1,88
	2520 ng/ml	17131	5,74
	5589 ng/ml	54713	18,34
	13395 ng/ml	185344	62,13

Οι βαθμονομητές κανονικοποιούνται με βάση το αντιδραστήριο αναφοράς ανασυνδυασμένης IGFBP-3 του NIBSC/WHO με κωδικό 93/650.

ΧΙΙΙ. ΑΠΟΔΟΣΗ ΚΑΙ ΠΕΡΙΟΡΙΣΜΟΙ

Α. Όριο ανίχνευσης

Μετρήθηκαν δώδεκα μηδενικοί βαθμονομητές μαζί με ομάδα των άλλων βαθμονομητών. Το όριο ανίχνευσης, οριζόμενο ως η φαινομενική συγκέντρωση δύο τυπικών αποκλίσεων πάνω από τις μέσες μετρήσεις σε μηδενική δέσμευση, ήταν 17,3 ng/ml.

Β. Ειδικότητα

Για το συγκεκριμένο προσδιορισμό εξετάστηκαν ορισμένες ορμόνες με δυνητική αντιδραστικότητα. Σε συγκεντρώσεις έως 10 μg/bl, καμία από τις ακόλουθες ορμόνες δεν παρουσίασε σημαντικές παρεμβολές:

- rhIGF-BP1
- rhIGF-BP2
- rhIGF-BP4
- rhIGF-BP5
- rhIGF-BP6
- rhIGF-I
- rhIGF-II

Γ. Ακρίβεια

ΓΙΑ ΤΟΝ ΙΔΙΟ ΠΡΟΣΔΙΟΡΙΣΜΟ				ΜΕΤΑΞΥ ΔΙΑΦΟΡΕΤΙΚΩΝ ΠΡΟΣΔΙΟΡΙΣΜΩΝ			
Ορός	N	<X> ± T.A. (ng/ml)	Σ.Δ. (%)	Ορός	N	<X> ± T.A. (ng/ml)	Σ.Δ. (%)
A	20	543 ± 22	4,0	A	10	1056 ± 34	3,2
B	20	2637 ± 71	2,7	B	10	4539 ± 255	5,6

T.A.: Τυπική απόκλιση, Σ.Δ.: Συντελεστής διακύμανσης

Δ. Ορθότητα

ΕΞΕΤΑΣΗ ΑΝΑΚΤΗΣΗΣ

Προσθεθείσα IGFBP-3 (ng/ml)	Ανακτηθείσα IGFBP-3 (ng/ml)	Ανάκτηση (%)
2000	2094	104,7
1000	1123	112,3
500	491	98,2
250	273	109,3
125	139	111,0

ΕΞΕΤΑΣΗ ΑΡΑΙΩΣΗΣ

Δείγμα	Αραίωση	Θεωρητική συγκέντρωση (ng/ml)	Μετρηθείσα συγκέντρωση (ng/ml)
A	1/1	-	3004,8
	1/2	1502,4	1524,6
	1/4	751,2	765,9
	1/8	375,6	375,8
	1/16	187,8	175,3

Τα δείγματα αραιώθηκαν με ρυθμιστικό διάλυμα αραιώσης.

Ε. Χρονική καθυστέρηση μεταξύ τελευταίου βαθμονομητή και προσθήκης δείγματος

Όπως φαίνεται ακολούθως, τα αποτελέσματα του προσδιορισμού παραμένουν ακριβή ακόμη και εάν το δείγμα προστεθεί 30 λεπτά μετά την προσθήκη του βαθμονομητή στα επιστρωμένα σωληνάρια.

ΧΡΟΝΙΚΗ ΚΑΘΥΣΤΕΡΗΣΗ				
	0'	10'	20'	30'
S 1 (ng/ml)	1207	1204	1263	1274
S 2 (ng/ml)	4671	4986	4899	5054

ΧΙΥ. ΕΣΩΤΕΡΙΚΟΣ ΠΟΙΟΤΙΚΟΣ ΕΛΕΓΧΟΣ

- Εάν τα αποτελέσματα που λαμβάνονται για το υλικό ελέγχου 1 ή/και το υλικό ελέγχου 2 δε βρίσκονται εντός του πεδίου τιμών που καθορίζεται στην ετικέτα του φιαλιδίου, τα αποτελέσματα δεν είναι δυνατό να χρησιμοποιηθούν, εκτός εάν έχει δοθεί ικανοποιητική εξήγηση για την ασυμφωνία.
- Εάν είναι επιθυμητό, κάθε εργαστήριο μπορεί να δημιουργήσει τα δικά του μείγματα δειγμάτων ελέγχου, τα οποία πρέπει να διατηρούνται κατεψυγμένα σε κλάσματα. Μην καταψύχετε-αποψύχετε περισσότερο από δύο φορές.
- Τα κριτήρια αποδοχής για τη διαφορά μεταξύ των διπλών αποτελεσμάτων των δειγμάτων θα πρέπει να βασίζονται σε ορθές εργαστηριακές πρακτικές.

ΧΥ. ΔΙΑΣΤΗΜΑΤΑ ΑΝΑΦΟΡΑΣ

Οι τιμές αυτές παρέχονται μόνον ως οδηγός. Κάθε εργαστήριο θα πρέπει να καθιερώσει το δικό του πεδίο φυσιολογικών τιμών.

Φυσιολογικά άτομα

Ηλικιακή ομάδα	ΑΝΑΡΕΣ (ng/ml)			ΓΥΝΑΙΚΕΣ (ng/ml)		
	Μέση τιμή	Πεδίο τιμών		Μέση τιμή	Πεδίο τιμών	
6 ετών	3771	2825-5178	9	3877	3400-4554	6
7 ετών	3718	2846-4462	20	3958	3102-4812	23
8 ετών	3852	3195-4978	38	3963	3156-4839	20
9 ετών	3833	3018-4837	29	4008	3334-4544	22
10 ετών	3865	2935-4524	28	4095	3257-5158	32
11 ετών	3991	3152-4635	28	4109	3144-5031	30
12 ετών	4203	3423-5153	28	4481	3643-4987	21
13 ετών	4488	2936-5586	34	4668	3771-5249	38
14 ετών	4381	3349-5220	39	4382	3585-5157	54
15 ετών	4212	3266-5262	31	4346	3551-5175	57
16 ετών	4343	3417-5662	45	4331	3475-5055	69
17 ετών	4287	3305-5319	19	4316	3459-5424	39
18 ετών	4604	3830-5583	17	4463	3518-5190	28
19 ετών	4321	3647-4907	17	4501	3842-5149	18
20 ετών	4224	3714-4871	12	4327	3686-4949	6
21 – 25 ετών	4633	3228-6207	27	5111	3732-6254	25
26 – 30 ετών	4656	3081-5881	26	4326	3038-5266	24
31 – 40 ετών	4392	3030-6101	47	4508	3609-5637	47
> 40 ετών	4354	2589-5312	18	4327	3313-5247	20

Σημείωση: πεδίο τιμών που βασίζονται σε εκατοστημόρια 2,5% και 97,5%

ΧΥΙ. ΠΡΟΦΥΛΑΞΕΙΣ ΚΑΙ ΠΡΟΕΙΔΟΠΟΙΗΣΕΙΣ

Ασφάλεια

Μόνο για διαγνωστική χρήση in vitro.

Το kit αυτό περιέχει το ¹²⁵I (Χρόνος ημιζωής: 60 ημέρες), μια ραδιενεργή ουσία η οποία εκπέμπει ιονίζουσα ακτινοβολία Χ (28 keV) και γ (35,5 keV). Αυτό το ραδιενεργό προϊόν είναι δυνατό να μεταφερθεί και να χρησιμοποιηθεί μόνο από εξουσιοδοτημένα άτομα. Η αγορά, φύλαξη, χρήση και ανταλλαγή ραδιενεργών προϊόντων υπόκεινται στη νομοθεσία της χώρας του τελικού χρήστη. Σε καμία περίπτωση δεν πρέπει να χορηγείται το προϊόν σε ανθρώπους ή ζώα.

Όλος ο χειρισμός του ραδιενεργού υλικού θα πρέπει να εκτελείται σε καθορισμένο χώρο, μακριά από χώρους τακτικής διέλευσης. Στο εργαστήριο πρέπει να διατηρείται ημερολόγιο για την παραλαβή και τη φύλαξη ραδιενεργών υλικών. Εξοπλισμός και γυάλινα σκεύη του εργαστηρίου, τα οποία θα μπορούσαν να μολυνθούν με ραδιενεργές ουσίες, θα πρέπει να φυλάσσονται σε ξεχωριστό χώρο για την πρόληψη επιμόλυνσης των διαφόρων ραδιοϊσότοπων.

Τυχόν διαρροές ραδιενεργών υγρών πρέπει να καθαρίζονται αμέσως σύμφωνα με τις διαδικασίες ασφάλειας από ραδιενέργεια. Τα ραδιενεργά απόβλητα πρέπει να απορρίπτονται σύμφωνα με τους τοπικούς κανονισμούς και τις κατευθυντήριες οδηγίες των αρχών που έχουν δικαιοδοσία στο εργαστήριο. Η τήρηση των βασικών κανόνων ασφάλειας από ραδιενέργεια παρέχει επαρκή προστασία.

Τα συστατικά ανθρώπινου αίματος που περιλαμβάνονται στο κιτ αυτό έχουν ελεγχθεί με μεθόδους εγκεκριμένες στην Ευρώπη ή/και από τον FDA και έχει διαπιστωθεί ότι είναι αρνητικά ως προς την παρουσία HBsAg, αντι-HCV, αντι-HIV-1 και 2. Καμία γνωστή μέθοδος δεν είναι δυνατό να παρέχει πλήρη διασφάλιση ότι παράγωγα του ανθρώπινου αίματος δε θα μεταδώσουν ηπατίτιδα, AIDS ή άλλες λοιμώξεις. Επομένως, ο χειρισμός αντιδραστηρίων, δειγμάτων ορού ή πλάσματος θα πρέπει να γίνεται σύμφωνα με τις τοπικές διαδικασίες περί ασφάλειας.

Όλα τα ζωικά προϊόντα και παράγωγα έχουν συλλεχθεί από υγιή ζώα. Τα βόεια συστατικά προέρχονται από χώρες όπου δεν έχει αναφερθεί BSE. Παρ' όλ' αυτά, συστατικά που περιέχουν ζωικές ουσίες θα πρέπει να αντιμετωπίζονται ως δυνητικώς μολυσματικά.

Αποφεύγετε οποιαδήποτε επαφή του δέρματος με αντιδραστήρια (χρησιμοποιείται αζίδιο του νατρίου ως συντηρητικό). Το αζίδιο στο κιτ αυτό ενδέχεται να αντιδράσει με μόλυβδο και χαλκό των υδραυλικών σωληνώσεων και να σχηματίσει με τον τρόπο αυτό ιδιαίτερα εκρηκτικά αζίδια μετάλλων. Κατά τη διάρκεια του βήματος πλύσης, εκπλύνετε την αποχέτευση με μεγάλη ποσότητα νερού, για την πρόληψη τυχόν συσσώρευσης αζιδίου.

Μην καπνίζετε, μην πίνετε, μην τρώτε και μη χρησιμοποιείτε καλλυντικά στο χώρο εργασίας. Μην διανέμετε με πιπέτα χρησιμοποιώντας το στόμα σας. Χρησιμοποιείτε προστατευτικό ρουχισμό και αναλωσίμα γάντια.

XVII. BIBΛΙΟΓΡΑΦΙΑ

1. LEROITH D., BONDY C., YAKAR S., LIU JL., BUTLER A.
The somatomedin hypothesis : 2001.
Endocr Rev 2001; 22:53-74.

2. POLLAK MN., SCHERNHAMMER ES., HANKINSON SE.
Insulin-like growth factors and neoplasia.
Nat Rev Cancer 2004; 4:505-518.

3. YUEN K., FRYSTYK J., UMPLEBY M., FRYKLUND L., DUNGER D.
Changes in free rather than total insulin-like growth factor-I enhance insulin sensitivity and suppress endogenous peak growth hormone (GH) release following short-term low dose GH administration in young healthy adults.
J Clin Endocrinol Metab 2004; 89:3956-3964.

4. KHANDWALA HM., McCUTCHEON IE., FLYVBJERG A., FRIEND KE.
The effects of insulin-like growth factors on tumorigenesis and neoplastic growth.
Endocr Rev 2000; 21:215-244.

5. RENEHAN AG., ZWAHLEN M., MINDER PC., O'DWYSER ST., SHALET PS., EGGER PM.
Insulin-like growth factor (IGF)-I, IGF binding protein-3, and cancer risk : systematic review and meta-regression analysis.
The Lancet 2004; 363:1346-1353.

6. JUUL A., SCHEIKE T., DAVIDSEN M., GYLLENBORG J., JORGENSEN T.
Low serum insulin-like growth factor I is associated with increased risk of ischemic heart disease : a population-based case-control study.
Circulation 2002; 106:939-944.

7. SANDHU MS., HEALD AH., GIBSON JM., CRUICKSHANK JK., DUNGER DB., WAREHAM NJ.
Circulating concentrations of insulin-like growth factor-I and development of glucose intolerance : a prospective observational study.
The Lancet 2002; 359:1740-1745.

8. VAESSEN N., HEUTINK P., JANSSEN JA., WITTEMAN JC., TESTERS L., HOFMAN A., LAMBERTS SW., OOSTRA BA., POLS HA., VAN DUJN CM.
A polymorphism in the gene for IGF-I : functional properties and risk for type 2 diabetes and myocardial infarction.
Diabetes 2001; 50:637-642.

9. JUUL A.
Serum levels of insulin-like growth factor-I and its binding proteins in health and disease.
Growth Horm IGF Res 2003; 13:113-170

10. FIRTH SM., BAXTER RC.
Cellular actions of the insulin-like growth factor binding proteins
Endocr Rev 2002; 23:824-854.

11. BAXTER RC., MEKA S., FIRTH SM.
Molecular distribution of IGF binding protein-5 in human serum.
J Clin Endocrinol Metab 2002; 87:271-276.

12. RICORT JM.
Insulin-like growth factor binding protein (IGFBP) signaling.
Growth Horm IGF Res 2004; 14:277-286.

13. JONES JL., CLEMMONS DR.
Insulin-like growth factors and their binding proteins : biological actions.
Endocr Rev 1995; 16:3-34.

14. ALI O., COHEN P., LEE KW.
Epidemiology and biology of insulin-like growth factor binding protein-3 (IGFBP-3) as an anti-cancer molecule.
Horm Metab Res 2003; 35:726-733.

15. CHAN SS., TWIGG SM., FIRTH SM., BAXTER RC.
Insulin-like growth factor binding protein-3 leads to insulin resistance in adipocytes.
J Clin Endocrinol Metab 2005; 90:6588-6595.

16. JUUL A., MAIN K., BLUM WF., LINDHOLM J., RANKE MB., SKAKKEBAEK NE.
The ration between serum levels of insulin-like growth factor (IGF)-I and the IGF binding proteins (IGFBP-1, 2 and 3) decreases with age in healty adults and is increased in acromegalic patients.
Clin Endocrinol (Oxf) 1994; 41:85-93.

17. BLUM WF., ALBERTSSON-WIKLAND K., ROSBERG S., RANKE MB.
Serum levels of insulin-like growth factor I (IGF-I) and IGF binding protein 3 reflect spontaneous growth hormone secretion.
J Clin Endocrinol Metab 1994; 76:1610-1616.

18. FRYSTYK J., IVARSEN P., SKJAERBAEK C., FLYVBJERG A., PEDERSEN EB., ORSKOV H.
Serum-free insulin-like growth factor I correlates with clearance in patients with chronic renal failure.
Kidney Int 1999; 56:2076-2084.

19. FRYSTYK J.
In Endocrinology and Metabolism – Clinics of North America 2005 : Endocrinology of aging, Chapter XI : **Aging somatotropic axis mechanisms and implications of IGFBP adaptation.**

XVIII. ΠΕΡΙΛΗΨΗ ΤΟΥ ΠΡΩΤΟΚΟΛΛΟΥ

	ΣΥΝΟΛΙΚΕΣ ΜΕΤΡΗΣΕΙΣ (μl)	ΒΑΘΜΟΝΟ ΜΗΤΕΣ Υλικά ελέγχου (μl)	ΔΕΙΓΜΑ(ΤΑ) (μl)
<u>ΔΕΙΓΜΑΤΑ (-ΤΑ)</u> <u>ΔΡΑΙΩΣΗΣ</u> Ρυθμιστικό διάλυμα αραίωσης Δείγμα	- -	- -	1000 10
Ανάδευση	Αναμεικτής στροβίλισμού (τύπου vortex)		
<u>ΕΠΩΑΣΗ</u> Βαθμονομητές (0 έως 5), Υλικά ελέγχου Αραιωμένα δείγματα	- -	100 -	- 100
Ιχνηθέτης	50	50	50
Επώαση	120 λεπτά σε θερμοκρασία δοματίου με ανάδευση στις 400 rpm		
Διαχωρισμός Διάλυμα πλύσης εργασίας Διαχωρισμός Διάλυμα πλύσης εργασίας Διαχωρισμός	-	Αναρρόφηση (ή μετάγγιση) 2,0 ml Αναρρόφηση (ή μετάγγιση) 2,0 ml Αναρρόφηση (ή μετάγγιση)	
Μέτρηση	Μέτρηση σωληναρίων επί 60 δευτερόλεπτα		

Αρ. καταλόγου DIAsource: KIP1171	Αριθμός P.I.: 1700466/el	Αρ. αναθεώρησης: 090424/1
-------------------------------------	-----------------------------	------------------------------

Przed zastosowaniem należy przeczytać cały protokół.

IGFBP-3-IRMA

I. PRZEZNACZENIE

Zestaw do ilościowego pomiaru immunoradiometrycznego in vitro ludzkiego białka wiążącego insulinopochodny czynnik wzrostu 3 (IGFBP-3) w surowicy.

II. INFORMACJE OGÓLNE

- A. **Nazwa firmowa :** DIAsource IGFBP-3-IRMA Kit
- B. **Numer katalogowy:** KIP1171 : 96 tests
- C. **Wyprodukowano przez:** DIAsource ImmunoAssays S.A.
Rue de l'Industrie, 8, B-1400 Nivelles, Belgium.

Dział pomocy technicznej oraz informacje dotyczące zamówień:

Tel : +32 (0)67 88.99.99

Fax : +32 (0)67 88.99.96

III. INFORMACJE KLINICZNE

System insulinopodobnego czynnika wzrostu (IGF) stanowi podstawowy regulator normalnego wzrostu organizmu i jego regeneracji, wpływający na proliferację komórek, ich różnicowanie i apoptozę. Ponadto, system IGF zdaje się modyfikować czułość insuliny oraz długoterminowy metabolizm glukozy. Ponadto, liczne badania epidemiologiczne, eksperymentalne oraz dane kliniczne wskazują, że system IGF bierze również udział w rozwoju kilku często występujących typów nowotworów, jak również często spotykanych chorób, takich jak miażdżycy i cukrzyca typu 2.

System IGF składa się z rodziny blisko spokrewnionych białek, obejmującej dwa białka będące podstawowymi czynnikami promującymi działanie hormonu wzrostu - IGF-I i IGF-II, 6 białek wiążących IGF o wysokim powinowactwie (IGFBP-1 do -6) oraz dużą glikoproteinę niewiążącą IGF, stanowiącą „podjednostkę wrażliwą na działanie kwasów” (ALS).

IGFBP-3 jest białkiem wiążącym IGF o największej pojemności; u zdrowych osób odpowiada za ponad 75% całkowitej zdolności wiązania IGF. IGFBP-3 posiada właściwości zbliżone do IGFBP-5 z tym, że oba białka są zdolne do tworzenia kompleksów trzeciorzędowych o dużej wadze cząsteczkowej ~150 kilo Daltonów z ALS i innymi białkami IGF-I lub -II. Niemniej, IGFBP-5 jest obecne w krążeniu w znacznie niższych stężeniach niż IGFBP-3, a u zdrowych osób kompleksy trzeciorzędowe stanowią nawet 90% IGFBP-3, lecz tylko około 50% IGFBP-5.

Pierwotnie sądzono, że IGFBP stanowią białka przekaźnikowe IGF, stabilizujące poziom IGF i kontrolujące przechodzenie IGF z krążenia do przestrzeni pozanaczyniowej. Ponadto, zakładano, że kompleksy IGF z IGFBP są biologicznie mniej lub bardziej nieaktywne, będąc pozbawionymi możliwości interakcji z receptorem IGF. Jednakże, szybko stało się oczywiste, że w niektórych środowiskach eksperymentalnych, IGFBPs raczej stymulowało a nie hamowało działania mediowane przez IGF-I i w związku z tym IGFBP są obecnie uznawane za modulatory aktywności biologicznej IGF-I. Ponadto, większość IGFBP, a w szczególności IGFBP-3, wykazuje efekty niezależne od receptorów IGF-I i IGF-II, możliwe, że wskutek interakcji ze specyficznymi receptorami umieszczonymi na błonie komórkowej oraz śródkomórkowo. Przykładowo obecnie uważa się, że IGFBP-3 służy jako cząsteczka o działaniu antynowotworowym, w widoczny sposób chroniąc przed kilkoma często występującymi nowotworami; potwierdzono również wpływ IGFBP-3 na działanie sygnałowe insuliny w kulturach adipocytów.

Metabolizm kompleksów trzeciorzędowych jest bardzo powolny i osoczowe stężenia IGFBP-3 pozostają stabilne w ciągu dnia, nie podlegając krótkotrwałym zmianom żywieniowym. Dzięki temu, stężenie IGFBP-3 można oznaczyć za pomocą pojedynczego pomiaru. GH jest podstawowym regulatorem IGFBP-3, jak również IGF-I i ALS i tym samym, stężenie wszystkich trzech białek gwałtownie wzrasta w okresie skoku pokwitaniowego i później powoli opada wraz z wiekiem. Wykazano, że u dzieci stężenie IGFBP-3 koreluje z dobowym wydzielaniem GH oraz, że szczególnie u dzieci stężenie IGFBP-3 może być przydatne w rozpoznawaniu niedoboru GH.

IV. ZAGADNIENIA DOTYCZĄCE METODY

Oznaczenie DIAsource IGFBP-3-IRMA jest testem immunoradiometrycznym przeprowadzanym z wykorzystaniem opłaszczonych probówek. Przechwycone przeciwciała Mab1 jest przyłączone do dolnej wewnętrznej powierzchni probówki plastikowej. Kalibratory lub próbki, dodawane do probówek, będą na początku wykazywały niskie powinowactwo do Mab1. Dodanie Mab2, przeciwciała sygnałowego oznakowanego ¹²⁵I zakończy etap i wyzwoli reakcję immunologiczną. Po przepłukaniu, stopień radioaktywności związanej z probówką odzwierciedla stężenie antygenu..

V. DOSTARCZONE ODCZYNNIKI

Odczynniki	Zestaw 96 oznaczeń	Kolor	Rekonstytucja
 Probówki opłaszczane przeciwciałami anti-IGFBP3 (przeciwciała monoklonalne)	2 x 48	kość słoniowa	Gotowe do zastosowania
Ab ¹²⁵I Przeciwciała monoklonalne anti-IGFBP-3-¹²⁵I w buforze Tris z albuminą z surowicy bydlęcej, azydkiem (<0,1%) i obojętnym czerwonym barwnikiem	1 fiolka 5.5 ml 700 kBq	czerwony	Gotowe do zastosowania
CAL N Kalibratory 1-5 w buforze Tris HCL z albuminą z surowicy bydlęcej i tymolem. Dokładne wartości na etykietach fiolek. Kalibratory są wstępnie rozcieńczone	5 fiolek liofil.	żółty	Dodać 1,0 ml wody destylowanej
DIL BUF Bufor do rozcieńczania: Bufor Tris HCl z albuminą z surowicy bydlęcej i azydkiem (<0,1%)	1 fiolka 100 ml	zielony	Gotowe do zastosowania
WASH SOLN CONC Roztwór płuczący (TRIS-HCL)	1 fiolka 10 ml	brązowy	Rozcieńczyć 70x wodą destylowaną (wykorzystać mieszkadło magnetyczne).
CONTROL N Kontrola - N = od 1 do 2 w buforze Tris HCl z surowicą ludzką i tymolem Kontrola są wstępnie rozcieńczone	2 fiolek liofil.	srebrny	Dodać 1,0 ml wody destylowanej

Uwaga: jako kalibrator zerowy należy użyć bufor do rozcieńczania.

VI. MATERIAŁY WYMAGANE, ALE NIEDOSTARCZONE

Poniższe materiały są wymagane, ale nie są dostarczone w zestawie:

- 1. Woda destylowana
- 2. Pipety do dostarczania objętości: 10 µl, 50 µl, 100 µl i 1 ml. (zaleca się stosowanie właściwych pipet z jednorazowymi końcówkami plastikowymi)
- 3. Probówki plastikowe do rozcieńczania próbek
- 4. Mieszkadło wirowe
- 5. Wytrząsarka do probówek (400 rpm)
- 6. Mieszkadło magnetyczne
- 7. Strzykawka automatyczna o objętości 5 ml (rodzaj Cornwall) do płukania
- 8. Układ do aspiracji (opcjonalnie)
- 9. Może być wykorzystywany jakikolwiek licznik gamma odpowiedni do pomiaru ¹²⁵I (minimalny uzysk 70%).

VII. PRZYGOTOWANIE ODCZYNNIKÓW

- A. Kalibratory: Rekonstruować kalibratory przy pomocy 1,0 ml wody destylowanej.
- B. Kontrola: Kontrola należy rekonstruować przy pomocy 1,0 ml wody destylowanej.

- C. Roboczy roztwór płuczający: Właściwą objętość roboczego roztworu płuczającego należy przygotować dodając 69 objętości wody destylowanej do 1 objętości roztworu płuczającego (70x). Do homogenizacji należy wykorzystać mieszkadło magnetyczne. Niewykorzystany roboczy roztwór płuczający należy wylać pod koniec dnia.

VIII. PRZECHOWYWANIE I DATA WAŻNOŚCI ODCZYNNIKÓW

- Przed otwarciem lub rekonstytucją wszystkie składniki zestawu zachowują trwałość do daty ważności przedstawionej na etykiecie, jeżeli są przechowywane w temperaturze od 2 do 8°C.
- Kalibratory i materiały kontrolne są bardzo nietrwałe, dlatego należy wykorzystać je natychmiast po rekonstytucji lub natychmiast zamrozić w niewielkich objętościach w temperaturze -20°C do 3 miesięcy.
- Unikać powtarzanych cykli zamrażania i rozmrażania.
- Świeżo przygotowany roboczy roztwór płuczający powinien być wykorzystany w tym samym dniu.
- Po jego pierwszym zastosowaniu, znacznik izotopowy zachowuje trwałość do podanej daty ważności jeżeli jest przechowywany w oryginalnej, dobrze zamkniętej fiole w temperaturze od 2 do 8°C.
- Zmiany w wyglądzie fizycznym odczynników w zestawie mogą wskazywać na ich niestabilność lub zużycie.

IX. POBIERANIE I PRZYGOTOWANIE MATERIAŁU DO BADANIA

- Próbkę surowicy muszą być przechowywane w temperaturze 2 - 8°C.
- Jeżeli oznaczenie nie jest wykonywane w ciągu 24 godzin, zaleca się przechowywanie w temperaturze -20°C.
- Unikać powtarzanych cykli zamrażania i rozmrażania.

X. PROCEDURA

- A. Uwagi dotyczące obsługi
Nie wolno wykorzystywać składników zestawu po upływie daty ważności. Nie wolno mieszać materiałów pochodzących z różnych serii zestawów. Przed wykorzystaniem wszystkie odczynniki powinny osiągnąć temperaturę pokojową. Wszystkie odczynniki i próbki należy dokładnie wymieszać przez delikatne potrząsanie lub obracanie. Aby uniknąć zanieczyszczenia krzyżowego do dodawania poszczególnych odczynników i próbek należy wykorzystywać czyste, jednorazowe końcówki pipet. Pipety wysokiej precyzji lub pipety automatyczne poprawiają precyzję wykonania oznaczenia. Przestrzegać czasów inkubacji. Przygotować krzywą kalibracyjną dla każdego cyklu pomiarowego, nie wolno wykorzystywać danych z poprzednich oznaczeń.

- B. Procedura
1. Oznaczyć po jednej zwykłej probówce plastikowej dla każdej próbki.
2. Dozować po 1 ml buforu do rozcieńczania do każdej probówki.
3. Dodać 10 µl próbki do tych probówek.
4. Dla każdego kalibratora, próbki i kontroli należy oznaczyć opłaszczoną probówkę w badaniach podwójnych. W celu określenia całkowitych zliczeń należy oznaczyć 2 zwykłe probówki.
5. Szybko wymieszać odwirowując: kalibratory, wcześniej rozcieńczone próbki i dozować po 100 µl materiału do odpowiednich probówek. (jako kalibratora zerowego, należy użyć buforu do rozcieńczania).
6. Do każdej probówki, w tym do probówek nieopłaszczonych do całkowitego zliczania, dodać po 50 µl przeciwciała anti-IGFBP-3, znakowanych Jodem ¹²⁵.
7. Inkubować przez 120 minut w temperaturze pokojowej w wytrząsarce do probówek (400 rpm).
8. Aspirować (lub odlać) zawartość każdej probówki (z wyjątkiem probówek do całkowitego zliczania). Aby usunąć cały płyn należy upewnić się, że plastikowa końcówka aspiratora osiągnęła dno opłaszczonej probówki.
9. Przepłukać probówki przy pomocy 2 ml roboczego roztworu płuczającego (z wyjątkiem probówek do całkowitego zliczania) i zaaspirować (lub dekantować). W trakcie dodawania roboczego roztworu płuczającego należy unikać wytwarzania piany.
10. Ponownie przepłukać probówki przy pomocy 2 ml roztworu płuczającego (z wyjątkiem probówek do całkowitego zliczania) i aspirować (lub odlać).
11. Pozostawić probówkę w pozycji stojącej do góry na dwie minuty i aspirować pozostałe krople płynu.
12. Zliczać probówki w liczniku gamma przez 60 sekund.

XI. OBLICZANIE WYNIKÓW

- 1. Obliczyć średnią oznaczeń podwójnych.
- 2. Na papierze milimetrowym lub w kratkę wykreślić c.p.m. (rzędna) dla każdego kalibratora wobec odpowiadającego stężenia IGFBP-3 (odcietą) oraz wykreślić krzywą kalibracji przez punkty kalibratora, odrzucając oczywiste wartości odbiegające od linii środkowej.

3. Odczytać stężenie dla każdej kontroli i próbki przez naniesienie na krzywą kalibracyjną.
4. Redukcja danych przy pomocy komputera pozwoli uprościć te obliczenia. Jeżeli ma być zastosowane automatyczne przetwarzanie wyników, zaleca się dopasowanie krzywej logistycznej 4 parametrowej.

XII. PRZYKŁAD DANYCH TYPOWYCH

Poniższe dane są przedstawione wyłącznie w celach przykładowych i nie powinny być nigdy stosowane zamiast rzeczywistych krzywych kalibracyjnych.

IGFBP-3-IRMA		cpm	B/T (%)
Zliczanie całkowite		298318	100
Kalibrator	0 ng/ml	17	0.01
	380 ng/ml	1494	0.50
	1057 ng/ml	5608	1.88
	2520 ng/ml	17131	5.74
	5589 ng/ml	54713	18.34
	13395 ng/ml	185344	62.13

Kalibratory są standaryzowane względem rekombinowanego IGFBP-3 NIBSC/WHO, odczynnika referencyjnego o oznaczeniu kodowym 93/560.

XIII. DZIAŁANIE I OGRANICZENIA

A. Granica wykrywania
Dwanaście kalibratorów zerowych oznaczano wraz z zestawem innych kalibratorów. Granica wykrywania, zdefiniowana jako odmienne stężenie dwóch odchyłeń standardowych powyżej przeciętnej wartości zliczania przy wiązaniu zerowym kształtowała się na poziomie 17,3 ng/ml.

B. Swoistość
W tym oznaczeniu badano niektóre hormony potencjalnie interferujące. Żaden z następujących hormonów nie przejawiał znaczącej interferencji do wartości stężeń poniżej 10 µg/ml.

- rhIGF-BP1
- rhIGF-BP2
- rhIGF-BP4
- rhIGF-BP5
- rhIGF-BP6
- rhIGF-I
- rhIGF-II

C. Precyzja

PRECYZJA W SERII				PRECYZJA MIĘDZY SERIAMI			
Surowica	N	<X> ± SD (ng/ml)	CV (%)	Surowica	N	<X> ± SD (ng/ml)	CV (%)
A	20	543 ± 22	4.0	A	10	1056 ± 34	3.2
B	20	2637 ± 71	2.7	B	10	4539 ± 255	5.6

SD Odchylenie standardowe; CV: Współczynnik zmienności

D. Dokładność

BADANIE ROZCIEŃCZENIA			
Próbka	Rozcieńczenie	Stęż. teoretyczne (ng/ml)	Stęż. zmierzzone (ng/ml)
A	1/1	-	3004.8
	1/2	1502.4	1524.6
	1/4	751.2	765.9
	1/8	375.6	375.8
	1/16	187.8	175.3

Próbki zostały rozcieńczone przy pomocy buforu do rozcieńczania.

BADANIE ODZYSKU		
IGFBP-3 dodana (ng/ml)	IGFBP-3 odzyskany (ng/ml)	Odzysk (%)
2000	2094	104.7
1000	1123	112.3
500	491	98.2
250	273	109.3
125	139	111.0

E. Opóźnienie pomiędzy oznaczeniem ostatniego kalibratora i dozowaniem próbki

Jak wykazano, wyniki pomiaru pozostają dokładne nawet wówczas, gdy od momentu dodania kalibratora do opłaszczonych próbek minęło 30 minut.

OPÓŹNIENIE				
	0'	10'	20'	30'
S 1 (ng/ml)	1207	1204	1263	1274
S 2 (ng/ml)	4671	4986	4899	5054

XIV. WEWNĘTRZNA KONTROLA JAKOŚCI

- Jeżeli wyniki uzyskane dla kontroli 1 i/lub 2 nie znajdują się w zakresie określonym na etykiecie fiolki, wyniki nie mogą zostać wykorzystane dopóki nie uda się znaleźć właściwego wyjaśnienia tego odchylenia.
- Jeżeli to konieczne, każde laboratorium może wykonać własne próbki zbiorcze w celach kontrolnych, które powinny być zamrożone w małych objętościach.
- Dopuszczalne kryteria dotyczące różnicy pomiędzy wynikami oznaczeń podwójnych próbek powinny być zgodne z zasadami prawidłowej pracy w laboratorium.

XV. ZAKRESY REFERENCYJNE

Wartości te są podane jedynie dla orientacji; każde laboratorium powinno opracować swoje własne zakresy wartości prawidłowych.

Zdrowi osobnicy

Grupa wiekowa	MĘŻCZYŹNI (ng/ml)			KOBIETY (ng/ml)		
	Średnia	Zakres	N	Średnia	Zakres	N
6 lat	3771	2825-5178	9	3877	3400-4554	6
7 lat	3718	2846-4462	20	3958	3102-4812	23
8 lat	3852	3195-4978	38	3963	3156-4839	20
9 lat	3833	3018-4837	29	4008	3334-4544	22
10 lat	3865	2935-4524	28	4095	3257-5158	32
11 lat	3991	3152-4635	28	4109	3144-5031	30
12 lat	4203	3423-5153	28	4481	3643-4987	21
13 lat	4488	2936-5586	34	4668	3771-5249	38
14 lat	4381	3349-5220	39	4382	3585-5157	54
15 lat	4212	3266-5262	31	4346	3551-5175	57
16 lat	4343	3417-5662	45	4331	3475-5055	69
17 lat	4287	3305-5319	19	4316	3459-5424	39
18 lat	4604	3830-5583	17	4463	3518-5190	28
19 lat	4321	3647-4907	17	4501	3842-5149	18
20 lat	4224	3714-4871	12	4327	3686-4949	6
21 – 25 lat	4633	3228-6207	27	5111	3732-6254	25
26 – 30 lat	4656	3081-5881	26	4326	3038-5266	24
31 – 40 lat	4392	3030-6101	47	4508	3609-5637	47
> 40 lat	4354	2589-5312	18	4327	3313-5247	20

Uwaga: zakres wykorzystuje percentyle 2,5 % i 97,5 %.

XVI. ŚRODKI OSTROŻNOŚCI I OSTRZEŻENIA

Bezpieczeństwo

Tylko do diagnostyki *in vitro*.
Zestaw zawiera ¹²⁵I (Okres połowicznego rozpadu: 60 dni), emitujący promieniowanie jonizujące X (28 keV) i γ (35,5 keV).

Ten produkt radioaktywny może być transportowany i wykorzystany wyłącznie przez osoby autoryzowane; zakup, przechowywanie, stosowanie i wymiana produktów radioaktywnych podlega regulacjom prawnym kraju użytkownika końcowego. W żadnym wypadku produkt nie może być podawany ludziom lub zwierzętom.

Obsługa materiałów radioaktywnych powinno być przeprowadzana w miejscach do tego przeznaczonych, z dala od miejsc ogólnej użyteczności. W laboratorium musi być przechowywany rejestr przyjęć i przechowywania materiałów radioaktywnych. Wposażenie laboratorium oraz szkło, które może być skażone substancjami radioaktywnymi powinno być oddzielone w celu uniknięcia krzyżowego zanieczyszczenia różnych radioizotopów.

Wszelkie plamy z substancji radioaktywnych muszą być natychmiast oczyszczone zgodnie z procedurami dotyczącymi bezpieczeństwa radiologicznego. Odpady radioaktywne muszą być usuwane zgodnie z miejscowymi przepisami i ogólnie przyjętymi wytycznymi obowiązującymi w laboratorium. Przestrzeganie podstawowych zasad bezpieczeństwa radiologicznego zapewnia wystarczające zabezpieczenie.

Składniki zawierające ludzką krew, dostarczone w zestawie, zostały przebadane metodami zaaprobowanymi przez instytucje europejskie i/lub FDA. Stwierdzono, że nie zawierają one HbsAg, przeciwciał anty-HCV, anty-HIV-1 i 2. Żadna ze znanych metod nie może dać całkowitej pewności że materiały pochodzenia

ludzkiego nie przeniosą czynników zakaźnych wirusowego zapalenia wątroby, AIDS i innych. Dlatego postępowanie z odczynnikami i próbkami surowicy lub osocza powinno być zgodne z miejscowymi procedurami dotyczącymi bezpieczeństwa. Produkty pochodzenia zwierzęcego były pobierane od zdrowych zwierząt. Składniki bydlęce pochodzą z krajów, w których nie odnotowano występowania BSE. Pomimo to, składniki zawierające substancje pochodzenia zwierzęcego powinny być traktowane jako potencjalnie zakaźne. Unikać kontaktu skóry z odczynnikami (zawierają azydek sodowy jako środek konserwujący). Azydek znajdujący się w zestawie może reagować z miedzią i ołowiem w układzie kanalizacyjnym tworząc związki o właściwościach wybuchowych. W czasie płukania odprowadzany płyn należy płukać dużymi objętościami wody, aby zapobiec kumulacji azydków. Nie wolno palić, spożywać napojów ani pokarmów, bądź używać kosmetyków w miejscu pracy. Nie pipetować ustami. Zakładać ubranie ochronne i rękawiczki jednorazowe.

XVI. BIBLIOGRAFIA

1. LEROITH D., BONDY C., YAKAR S., LIU JL., BUTLER A.
The somatomedin hypothesis : 2001.
Endocr Rev 2001; 22:53-74.

2. POLLAK MN., SCHERNHAMMER ES., HANKINSON SE.
Insulin-like growth factors and neoplasia.
Nat Rev Cancer 2004; 4:505-518.

3. YUEN K., FRYSTYK J., UMPLEBY M., FRYKLUND L., DUNGER D.
Changes in free rather than total insulin-like growth factor-I enhance insulin sensitivity and suppress endogenous peak growth hormone (GH) release following short-term low dose GH administration in young healthy adults.
J Clin Endocrinol Metab 2004; 89:3956-3964.

4. KHANDWALA HM., McCUTCHEON IE., FLYVBJERG A., FRIEND KE.
The effects of insulin-like growth factors on tumorigenesis and neoplastic growth.
Endocr Rev 2000; 21:215-244.

5. RENEHAN AG., ZWAHLEN M., MINDER PC., O'DWYSER ST., SHALET PS., EGGER PM.
Insulin-like growth factor (IGF)-I, IGF binding protein-3, and cancer risk : systematic review and meta-regression analysis.
The Lancet 2004; 363:1346-1353.

6. JUUL A., SCHEIKE T., DAVIDSEN M., GYLLENBORG J., JORGENSEN T.
Low serum insulin-like growth factor I is associated with increased risk of ischemic heart disease : a population-based case-control study.
Circulation 2002; 106:939-944.

7. SANDHU MS., HEALD AH., GIBSON JM., CRUICKSHANK JK., DUNGER DB., WAREHAM NJ.
Circulating concentrations of insulin-like growth factor-I and development of glucose intolerance : a prospective observational study.
The Lancet 2002; 359:1740-1745.

8. VAESSEN N., HEUTINK P., JANSSEN JA., WITTEMAN JC., TESTERS L., HOFMAN A., LAMBERTS SW., OOSTRA BA., POLS HA., VAN DUJN CM.
A polymorphism in the gene for IGF-I : functional properties and risk for type 2 diabetes and myocardial infarction.
Diabetes 2001; 50:637-642.

9. JUUL A.
Serum levels of insulin-like growth factor-I and its binding proteins in health and disease.
Growth Horm IGF Res 2003; 13:113-170

10. FIRTH SM., BAXTER RC.
Cellular actions of the insulin-like growth factor binding proteins
Endocr Rev 2002; 23:824-854.

11. BAXTER RC., MEKA S., FIRTH SM.
Molecular distribution of IGF binding protein-5 in human serum.
J Clin Endocrinol Metab 2002; 87:271-276.

12. RICORT JM.
Insulin-like growth factor binding protein (IGFBP) signaling.
Growth Horm IGF Res 2004; 14:277-286.

13. JONES JL., CLEMMONS DR.
Insulin-like growth factors and their binding proteins : biological actions.
Endocr Rev 1995; 16:3-34.

14. ALI O., COHEN P., LEE KW.
Epidemiology and biology of insulin-like growth factor binding protein-3 (IGFBP-3) as an anti-cancer molecule.
Horm Metab Res 2003; 35:726-733.

15. CHAN SS., TWIGG SM., FIRTH SM., BAXTER RC.
Insulin-like growth factor binding protein-3 leads to insulin resistance in adipocytes.
J Clin Endocrinol Metab 2005; 90:6588-6595.

16. JUUL A., MAIN K., BLUM WF., LINDHOLM J., RANKE MB., SKAKKEBAEK NE.
The ration between serum levels of insulin-like growth factor (IGF)-I and the IGF binding proteins (IGFBP-1, 2 and 3) decreases with age in healthy adults and is increased in acromegalic patients.
Clin Endocrinol (Oxf) 1994; 41:85-93.

17. BLUM WF., ALBERTSSON-WIKLAND K., ROSBERG S., RANKE MB.
Serum levels of insulin-like growth factor I (IGF-I) and IGF binding protein 3 reflect spontaneous growth hormone secretion.
J Clin Endocrinol Metab 1994; 76:1610-1616.

18. FRYSTYK J., IVARSEN P., SKJAERBAEK C., FLYVBJERG A., PEDERSEN EB., ORSKOV H.
Serum-free insulin-like growth factor I correlates with clearance in patients with chronic renal failure.
Kidney Int 1999; 56:2076-2084.

19. FRYSTYK J.
In Endocrinology and Metabolism – Clinics of North America 2005 : Endocrinology of aging, Chapter XI : Aging somatotrophic axis mechanisms and implications of IGFBP adaptation.

XVIII. PODSUMOWANIE PROTOKOŁU

	CAŁKO- WITA LICZBA ZLICZEŃ µl	KALIBRATORY KONTROLE µl	PRÓBK(A)I µl
<u>ROZCIEŃCZANE</u>			
<u>PRÓBK(I)</u>	-	-	1000
Bufor do rozcieńczania	-	-	10
Próbka			
Wyttrzanie	Vortex		
<u>INKUBACJA</u>			
Kalibratory (0 - 5), kontrole	-	100	-
Rozcieńczone próbki	-	-	100
Znacznik izotopowy	50	50	50
Inkubacja	120 minut w temperaturze pokojowej, wyttrzając przy 400 rpm.		
Rozdzielenie	-	aspiracja (lub odlewanie)	
Roztwór płuczący		2 ml	
Rozdzielenie		aspiracja (lub odlewanie)	
Roztwór płuczący		2 ml	
Rozdzielenie		aspiracja (lub odlewanie)	
Zliczanie	Zliczanie próbek przez 60 sekund		

Nr katalogowy DIASource: KIP1171	Numer P.I: 1700466/pl	Nr aktualizacji: 090424/1
-------------------------------------	--------------------------	------------------------------

Használat előtt olvassa el a teljes használati utasítást.

IGFBP-3-IRMA

I. VIZSGÁLAT CÉLJA

Immunradiometriás vizsgálat inzulin-szerű növekedési faktor-kötőfehérje-3 (IGFBP-3) *in vitro* mennyiségi meghatározására vérsavóban.

II. ÁLTALÁNOS INFORMÁCIÓK

Bejegyzett név : DIASource IGFBP-3-IRMA Reagenskészlet

Katalógusszám : KIP1171: 96 vizsgálat

Gyártó : DIASource ImmunoAssays S.A.
Rue de l'Industrie, 8, B-1400 Nivelles, Belgium.

Gyakorlati jellegű vagy rendeléssel kapcsolatos kérdésekkel hívja a következő számot :
Tel : +32 (0)67 88.99.99 **Fax : +32 (0)67 88.99.96**

III. KLINIKAI HÁTTÉR

Az inzulin-szerű növekedési faktor (IGF) a normális testnövekedés és regeneráció elsődleges szabályozója. Hatással van a sejtek proliferációjára, differenciálódására, és az apoptózisra is. Úgy tűnik, hogy az IGF-rendszer ezen kívül befolyásolja az inzulin-érzékenységet, és hosszú távon a glükóz-anyagcserét is. Ezen kívül számos járványügyi, kísérleti és klinikai adat mutat arra, hogy az IGF-rendszer szerepet játszik több gyakori ráktípus kialakulásában, illetve olyan, gyakran előforduló megbetegedések esetében, mint az atherosclerosis, és a 2-es típusú diabetes mellitus.

Az IGF-rendszert egymással közeli rokonságban álló peptidek alkotják. Közéjük tartozik a két növekedést serkentő peptid: az IGF-I és az IGF-II, valamint 6 specifikus, nagy affinitású IGF-kötő fehérje (IGFB 1-6), továbbá egy nagy, nem IGF-kötő glikoprotein, a „savérzékeny aleggység” (ALS).

Az IGFBP-3 a legnagyobb mennyiségben előforduló IGF-kötő fehérje, egészséges személyekben a keringésben található IGF-kötőkapacitásnak akár 75%-át is kiteheti. Az IGFBP-3 működése az IGFBP-5-éhez hasonlít, mivel mindkét peptid nagy molekulásúlyú (~150 kD) hármas komplexeket képez az ALS-sel, és az IGF-I-gyel vagy az IGF-II-vel. Az IGFBP-5 koncentrációja azonban jóval alacsonyabb, mint az IGFBP-3-é, és egy egészséges szervezetben az IGFBP-3-nak a 90%-a, míg az IGFBP-5-nek csak 50%-a található hármas komplexek formájában.

Eleinte úgy vélték, hogy az IGFBP-k IGF-szállító proteinekként működnek, stabilizálják a vérplazma IGF-szintjét, és szabályozzák az IGF kijutását a keringésből az extravaszkuláris térbe. Azt feltételezték továbbá, hogy az IGFBP-vel komplexben található IGF biológiailag többé-kevésbé inaktív, mivel ebben a formában képtelen kötődni az IGF-I receptorhoz. Nem sokkal később azonban kiderült, hogy egyes kísérletek során az IGF-kötőfehérjék nem gátolták, hanem stimulálták az IGF-I által közvetített hatásokat, és ez alapján ma már az IGF-kötő fehérjéket az IGF-I biológiai aktivitásának *modulátoraiként* tartják nyilván. Ezen kívül az IGFBP-k többsége, különösen az IGFBP-3 az IGF-I-től és az IGF-I receptortól független hatásokat is kifejtene, feltehetően specifikus sejtfelszíni és intracelluláris receptorokkal lépnek kölcsönhatásba. Az IGFBP-3-ról például jelenleg úgy tartják, hogy fontos rákellenes molekula, mivel úgy tűnik, a rákok több gyakori formája ellen is védelmet nyújt. Feltételezik azt is, hogy az IGFBP-3 zsírsajt-tenyészetekben hatással van az inzulin-szignalizációra.

A hármas komplexek forgalma igen lassú, és a vérplazma IGFBP-3 koncentrációja a nap folyamán nem változik, mivel rövidtávú táplálkozási hatások nem befolyásolják. Így az IGFBP-3 szintje egyetlen méréssel megállapítható. Mind az IGFBP-3, mind az IGF-I, mind pedig az ALS fő szabályozója a növekedési hormon (GH), ezért mindhárom peptid koncentrációja a pubertás idején megemelkedik, majd az évek során fokozatosan csökken. Gyermekekben az IGFBP-3 koncentrációja összefüggést mutat a megelőző 24 óra integrált GH elválasztásával, ezért az IGFBP-3 szintjének meghatározása különösen hasznos lehet gyermekek esetében a GH-hiány diagnózisának felállításában.

IV. A MÓDSZER ELVE

A DIASource IGFBP-3-IRMA egy immunradiometriás vizsgálat, amely ellenanyaggal borított csöveket alkalmaz. A műanyag cső belső felszínének alsó részét elfogó ellenanyag, a Mab1 borítja. A csövekbe mért kalibrátorok és minták eleinte alacsony affinitást mutatnak a Mab1 iránt. Az immunológiai reakciót a ¹²⁵I-dal jelölt jeladó ellenanyag, a Mab2 hozzáadása indítja be. A mosás után a csövek falára kötődött radioaktivitás mértékéből lehet következtetni az antigén koncentrációjára.

V. A REAGENSKÉSZLET TARTALMA

Reagens	Mennyiség	Szín	Hígítás			
 Monoklonális anti-IGFBP-3 ellenanyaggal borított csövek	2 x 48	elefánt-csontszín	Használatra kész.			
<table border="1"><tr><td>Ab</td><td>¹²⁵I</td></tr></table> Anti-IGFBP-3- ¹²⁵ I (monoklonális ellenanyag) trisz-maleát pufferben, bovin szérummal, aziddal (<0.1%) és inert piros festékkel	Ab	¹²⁵ I	1 ampulla 5,5 ml 700 kBq	piros	Használatra kész.	
Ab	¹²⁵ I					
<table border="1"><tr><td>CAL</td><td>N</td></tr></table> Kalibrátor 1-5, Tris-HCl pufferben bovin szérum albuminnal és thymollal. A pontos koncentrációértékeket lásd az ampullák címkéin. Előre hígítva.	CAL	N	5 ampulla líoifilizált	sárga	Adjon hozzá 1 ml desztillált vizet	
CAL	N					
<table border="1"><tr><td>DIL</td><td>BUF</td></tr></table> Hígító puffer: Tris-HCl puffer, bovin albuminnal és aziddal (<0.1%)	DIL	BUF	1 ampulla 100 ml	zöld	Használatra kész.	
DIL	BUF					
<table border="1"><tr><td>WASH</td><td>SOLN</td><td>CONC</td></tr></table> Mosóoldat (TRIS-HCl)	WASH	SOLN	CONC	1 ampulla 10 ml	barna	Hígítsa 70x desztillált vízzel (használjon mágneses keverőt)
WASH	SOLN	CONC				
<table border="1"><tr><td>CONTROL</td><td>N</td></tr></table> Kontrollok - N = 1 vagy 2, Tris-HCl pufferben Emberi vérsavóban, thymollal Előre hígítva.	CONTROL	N	2 ampulla líoifilizált	ezüst	Adjon hozzá 1 ml desztillált vizet	
CONTROL	N					

Megjegyzés: nulla kalibrátorként használja a hígító puffert.

VI. A FELHASZNÁLÓ ÁLTAL BIZTOSÍTOTT ESZKÖZÖK

A következő eszközöket a készlet nem tartalmazza, de szükségesek a vizsgálat elvégzéséhez:

- Desztillált víz
- 10 µl, 50 µl, 100 µl and 1 ml bemérésére alkalmas pipetták. (ajánlott pontos pipetták és eldobható műanyag pipettahegyek használata)
- Műanyag csövek a minták hígításához
- Vortex
- Csővek rázására alkalmas rázógép (400 rpm)
- Mágneses keverő
- 5 ml automata fecskendő (Cornwall) a mosáshoz
- Vízlégszivattyú (választható).
- Bármely, ¹²⁵I mérésére képes gamma-sugármérő (minimális hozam 70%).

VII. REAGENSEK ELŐKÉSZÍTÉSE

- A. Kalibrátorok :** Oldja be a kalibrátorokat 1,0 ml desztillált vízben.
- B. Kontrollok :** Oldja be a kontrollokat 1,0 ml desztillált vízben.
- D. Hígított mosóoldat:** Készítsen megfelelő mennyiségű hígított mosóoldatot úgy, hogy 69 rész desztillált vízhez 1 rész mosóoldatot kever (70x). Homogenizálja mágneses keverő segítségével. A napi vizsgálatok végétével öntse ki a megmaradt hígított mosóoldatot.

VIII. A REAGENSEK TÁROLÁSA ÉS ELTARTHATÓSÁGA

- Felnyitás és feloldás nélkül a reagensok 2-8°C-on tárolva a címkén feltüntetett időpontig eltarthatók.
- A kalibrátorok és a kontrollok rendkívül bomlékonyak, ezért beoldás után azonnal használja fel őket, illetve ossza fel őket egyenlő mennyiségekre, és -20°C-on fagyaszttva tárolja őket legfeljebb 3 hónapig. Kerülje a minták többszöri lefagyasztását és felolvasztását.
- A frissen készült hígított mosóoldatot még aznap fel kell használni.
- Amennyiben a tracert az eredeti, jól lezárt ampullában 2-8°C-on tárolja, akkor a címkén feltüntetett időpontig eltartható.
- A reagensok fizikai tulajdonságainak megváltozása valószínűleg azt jelzi, hogy megromlottak.

IX. MINTAVÉTEL ÉS ELŐKÉSZÍTÉS

- A savómintákat 2-8°C-on kell tárolni.
- Amennyiben nem végzi el a vizsgálatot 24 órán belül, ajánlott a mintákat -20°C-on szétosztva tárolni.
- Kerülje a minták többszöri lefagyasztását és felolvasztását.

X. ELJÁRÁS

- A. Tudnivalók**
Ne használja a reagensket a lejáratí idejükön túl. Ne keverjen össze eltérő gyártási számú reagenskészletekből származó anyagokat. Használat előtt várja meg, amíg a reagensok szobahőmérsékletre melegednek. Óvatos mozgattással vagy keveréssel alaposan homogenizálja a reagensket. Minden reagens és minta beméréséhez használjon tiszta eldobható pipettahegyet, hogy elkerülje az anyagok beszenyeződését. Nagypontosságú pipetták, vagy automata pipettázó készülék használata javítja a vizsgálat pontosságát. Tartsa be a megadott inkubációs időket. Minden vizsgálathoz készítsen új kalibrációs görbét, ne használja korábbi mérések adatait.

- B. A vizsgálat menete**
 - Feliratozzon minden minta számára egy-egy egyszerű műanyag csövet.
 - Pipettázzon 1 ml hígító puffert minden csöbe.
 - Mérjen 10 µl-t a mintákból a megfelelő csövekbe.
 - Feliratozzon 2-2 csövet a kalibrátorok, a minták és a kontrollok számára. A teljes radioaktivitás méréséhez használjon 2 reagens nélküli csövet
 - Kissé vortexelje meg a kalibrátorokat, kontrollokat és az előre meghígított mintákat, majd mérjen 100 µl-t mindegyikből a megfelelő csövekbe. (nulla kalibrátorként használja a hígító puffert)
 - Mérjen 50 µl tracert minden csöbe (a totálokba is).
 - Inkubálja a csöveket 120 percig szobahőmérsékleten rázatás mellett (400 rpm).
 - Szívja le (vagy öntse le) a csövek tartalmát (kivéve a totálok). Ügyeljen, hogy a vízlégszivattyú műanyag hegye leérjen a csövek aljáig, és így az összes folyadékot eltávolítsa.
 - Mossa a csöveket 2 ml hígított mosóoldattal (kivéve a totálokat), majd távolítsa el a folyadékot. Vigyázzon, hogy a mosóoldat beméréskor ne habosodjon.
 - Ismét mossa a csöveket 2 ml mosóoldattal (kivéve a totálokat), majd szívja (vagy öntse) le a folyadékot.
 - Hagyja állni a csöveket 2 percig, majd távolítsa el a megmaradt folyadékcseppet.
 - Mérje a radioaktivitást gamma-sugármérővel 60 másodpercig.

XI. EREDMÉNYEK KISZÁMÍTÁSA

- Számolja ki a párhuzamos mérések átlagát.
- Féllogaritmikus vagy lineáris milliméterpapíron ábrázolja a kalibrátorokra kapott cpm értékeket (ordináta) a hozzájuk tartozó IGFBP-3-koncentrációk (abszcissza) függvényében. Rajzolja fel a kalibrációs görbét a kalibrációs pontok segítségével, hagyja figyelmen kívül a nyilvánvalóan kieső értékeket.
- Interpolációval olvassa le a kalibrációs görbéről a kontrollok és a minták IGFBP-3-koncentráció értékeit.
- Az adatok számítógépes értékelése egyszerűbb. Ha automatikus az adatfeldolgozást választja, a 4-paraméteres logisztikus görbeillesztési eljárás javasolt.

XII. JELLEMZŐ MÉRÉSI EREDMÉNYEK

A következő adatok csak példaként szolgálnak, soha ne használja őket a valós idejű kalibráció helyett.

IGFBP-3-IRMA		cpm	B/T (%)
Teljes radioaktivitás		298318	100
Kalibrátor	0 ng/ml	17	0,01
	380 ng/ml	1494	0,50
	1057 ng/ml	5608	1,88
	2520 ng/ml	17131	5,74
	5589 ng/ml	54713	18,34
	13395 ng/ml	185344	62,13

A kalibrátorokat a 93/560 kóddal ellátott NIBSC/WHO rekombináns IGFBP-3 referencia reagenshez standardizálták.

XIII. A VIZSGÁLAT JELLEMZŐI ÉS KORLÁTAI

A. A kimutathatóság alsó határa
Tizenkét nulla kalibrátort vizsgáltak meg a többi kalibrátorral együtt. A kimutathatóság alsó határa 17,3 ng/ml-nek bizonyult, ami a 0 kalibrátorok cpm értékeinek átlagából számolható ki a standard deviáció kétszeresének hozzáadásával.

B. Specificitás
Néhány, a reakciót potenciálisan zavaró hormon hatását vizsgálták meg. 10 µg/ml koncentrációig a következő hormonok egyike sem mutatott jelentős mértékű zavaró hatást:

- rhIGF-BP1
- rhIGF-BP2
- rhIGF-BP4
- rhIGF-BP5
- rhIGF-BP6
- rhIGF-I
- rhIGF-II

C. Reprodukálhatóság

VIZSGÁLATON BELÜLI				VIZSGÁLATOK KÖZÖTTI			
Savó	N	<X> ± SD (ng/ml)	CV %	Savó	N	<X> ± SD (ng/ml)	CV %
A	20	543 ± 22	4,0	A	10	1056 ± 34	3,2
B	20	2637 ± 71	2,7	B	10	4539 ± 255	5,6

SD : Standard deviáció; CV: variációs koefficiens

D. Pontosság

VISSZANYERÉSI VIZSGÁLAT

Hozzáadott IGFBP-3 (ng/ml)	Visszanyert IGFBP-3 (ng/ml)	Visszanyerés (%)
2000	2094	104,7
1000	1123	112,3
500	491	98,2
250	273	109,3
125	139	111,0

HÍGÍTÁSI VIZSGÁLAT

Minta	Hígítás	Elméleti koncentráció (ng/ml)	Mért koncentráció (ng/ml)
A	1/1	-	3004,8
	1/2	1502,4	1524,6
	1/4	751,2	765,9
	1/8	375,6	375,8
	1/16	187,8	175,3

A minták hígítása a hígító pufferrel történt.

E. Az utolsó kalibrátor és a minták bemérése között eltelt idő

Ahogy ezt az alábbi adatok is mutatják, a vizsgálat eredményeit nem befolyásolja, ha egy minta bemérése akár 30 perccel az utolsó kalibrátor után történik.

ELTELT IDŐ				
	0'	10'	20'	30'
S 1 (ng/ml)	1207	1204	1263	1274
S 2 (ng/ml)	4671	4986	4899	5054

XIV. BELSŐ MINŐSÉGELLENŐRZÉS

- Ha a kontroll 1-re és 2-re kapott eredmények kívül esnek az ampullák címkein feltüntetett tartományon, a vizsgálat eredményei nem felhasználhatók, kivéve, ha ismert az eltérés pontos oka.
- Igény esetén bármely laboratórium készíthet egy saját, kontrollként szolgáló savópoolt, amit azután szétosztva, lefagyaszttva kell tárolni.
- A párhuzamos vizsgálatok eredményei közötti eltérés elfogadható mértékét a GLP (Good Laboratory Practises) alapján kell meghatározni.

XV. REFERENCIA-TARTOMÁNY

Ezek az értékek tájékoztató jellegűek, minden laboratóriumnak magának kell megállapítania a saját normál értékeit.

Normál esetek:

Korcsoport	Férfiak (ng/ml)			Nők (ng/ml)		
	Átlag	Tartomány	N	Átlag	Tartomány	N
6 éves	3771	2825-5178	9	3877	3400-4554	6
7 éves	3718	2846-4462	20	3958	3102-4812	23
8 éves	3852	3195-4978	38	3963	3156-4839	20
9 éves	3833	3018-4837	29	4008	3334-4544	22
10 éves	3865	2935-4524	28	4095	3257-5158	32
11 éves	3991	3152-4635	28	4109	3144-5031	30
12 éves	4203	3423-5153	28	4481	3643-4987	21
13 éves	4488	2936-5586	34	4668	3771-5249	38
14 éves	4381	3349-5220	39	4382	3585-5157	54
15 éves	4212	3266-5262	31	4346	3551-5175	57
16 éves	4343	3417-5662	45	4331	3475-5055	69
17 éves	4287	3305-5319	19	4316	3459-5424	39
18 éves	4604	3830-5583	17	4463	3518-5190	28
19 éves	4321	3647-4907	17	4501	3842-5149	18
20 éves	4224	3714-4871	12	4327	3686-4949	6
21 – 25 éves	4633	3228-6207	27	5111	3732-6254	25
26 – 30 éves	4656	3081-5881	26	4326	3038-5266	24
31 – 40 éves	4392	3030-6101	47	4508	3609-5637	47
> 40 éves	4354	2589-5312	18	4327	3313-5247	20

Megjegyzés:: Az referenciatartomány a 2,5%-os és a 97,5%-os percentilis értékek közé esik.

XVI. MUNKAVÉDELEM

Biztonsági előírások

Csak *in vitro* diagnosztikai felhasználásra.
A kit röntgen (28 keV) és gamma (35,5 keV) sugárzó ¹²⁵I izotópot (felezési idő: 60 nap) tartalmaz.

A reagenskészletben található radioaktív anyagot csak arra jogosult személyek vehetik át és használhatják fel. Radioaktív termékek beszerzésére, tárolására, használatára, és cseréjére az adott ország törvényei érvényesek. A reagensek alkalmazása embereken és állatokon is minden körülmények között tilos.

Minden, radioaktív reagenssel végzett műveletet egy arra kijelölt, elkülönített helyen kell elvégezni. A laboratóriumba érkezett radioaktív anyagok átvételéről és tárolásáról vezetett jegyzőkönyvet a laboratórium területén kell tartani. Azokat a laboratóriumi eszközöket és üvegedényeket, amelyek radioaktív anyaggal szennyeződhetnek, különítse el, hogy elkerülje a különböző radioizotópokkal történő keresztszennyeződést.

Amennyiben bármilyen radioaktív anyag kiömlik, azonnal takarítsa fel az erre vonatkozó előírásoknak megfelelő módon. A keletkező radioaktív hulladékot a helyi szabályoknak és az illetékes hatóságok erre vonatkozó útmutatásának megfelelően kell kidobni. Ha betartja a radioaktív anyagok kezelésére vonatkozó alapvető szabályokat, megfelelően védett lesz a sugárfertőzéstől.

A készlet emberi vérből készült reagensait európai szabványok szerinti és/vagy az FDA által minősített módszerrel HBsAg-tól, valamint anti-HCV, és anti-HIV-1 és 2 ellenanyagoktól mentesnek találták. Azonban egyetlen ma ismert módszer alapján sem állítható biztosan, hogy az emberi vérből készült anyagok nem okozhatnak hepatitist, AIDS-et vagy más fertőző betegséget. Ezért minden ilyen

reagenst és minden savó-, illetve plazmamintát a fertőző anyagokra vonatkozó helyi biztonsági előírásoknak megfelelően kell kezelni.

Minden állati eredetű reagens és termék egészséges állatokból származik. A szarvasmarha eredetű reagensek olyan országokból származnak, ahonnan eddig nem jelentettek BSE esetet. Ennek ellenére minden állati eredetű anyagot tartalmazó reagenst potenciálisan fertőzésveszélyesként kell kezelni.

Vigyázzon, hogy a reagensek bőrre ne kerüljenek (tartósítószer: nátrium-azid). A reagensekben található nátrium-azid robbanásveszélyes fém-azidokat képezhet ólom és réz csővezetékek anyagával. A csövek mosásakor nagy mennyiségű vízzel együtt öntse ki ezeket az anyagokat, hogy megelőzze az azid felgyülemlését.

Ne dohányozzon, ne fogyasszon ételt vagy italt, illetve ne használjon kozmetikumokat a laboratóriumban. Ne pipettázzon szájjal. Munka közben viseljen laborköpenyt és egyszer használatos kesztyűt.

XVII. IRODALOM

1. LEROITH D., BONDY C., YAKAR S., LIU JL., BUTLER A.
The somatomedin hypothesis : 2001.
Endocr Rev 2001; 22:53-74.

2. POLLAK MN., SCHERNHAMMER ES., HANKINSON SE.
Insulin-like growth factors and neoplasia.
Nat Rev Cancer 2004; 4:505-518.

3. YUEN K., FRYSTYK J., UMPLEBY M., FRYKLUND L., DUNGER D.
Changes in free rather than total insulin-like growth factor-I enhance insulin sensitivity and suppress endogenous peak growth hormone (GH) release following short-term low dose GH administration in young healthy adults.
J Clin Endocrinol Metab 2004; 89:3956-3964.

4. KHANDWALA HM., McCUTCHEON IE., FLYVBJERG A., FRIEND KE.
The effects of insulin-like growth factors on tumorigenesis and neoplastic growth.
Endocr Rev 2000; 21:215-244.

5. RENEHAN AG., ZWAHLEN M., MINDER PC., O'DWYSER ST., SHALET PS., EGGER PM.
Insulin-like growth factor (IGF)-I, IGF binding protein-3, and cancer risk : systematic review and meta-regression analysis.
The Lancet 2004; 363:1346-1353.

6. JUUL A., SCHEIKE T., DAVIDSEN M., GYLLENBORG J., JORGENSEN T.
Low serum insulin-like growth factor I is associated with increased risk of ischemic heart disease : a population-based case-control study.
Circulation 2002; 106:939-944.

7. SANDHU MS., HEALD AH., GIBSON JM., CRUICKSHANK JK., DUNGER DB., WAREHAM NJ.
Circulating concentrations of insulin-like growth factor-I and development of glucose intolerance : a prospective observational study.
The Lancet 2002; 359:1740-1745.

8. VAESSEN N., HEUTINK P., JANSSEN JA., WITTEMAN JC., TESTERS L., HOFMAN A., LAMBERTS SW., OOSTRA BA., POLS HA., VAN DUIJN CM.
A polymorphism in the gene for IGF-I : functional properties and risk for type 2 diabetes and myocardial infarction.
Diabetes 2001; 50:637-642.

9. JUUL A.
Serum levels of insulin-like growth factor-I and its binding proteins in health and disease.
Growth Horm IGF Res 2003; 13:113-170

10. FIRTH SM., BAXTER RC.
Cellular actions of the insulin-like growth factor binding proteins
Endocr Rev 2002; 23:824-854.

11. BAXTER RC., MEKA S., FIRTH SM.
Molecular distribution of IGF binding protein-5 in human serum.
J Clin Endocrinol Metab 2002; 87:271-276.

12. RICORT JM.
Insulin-like growth factor binding protein (IGFBP) signaling.
Growth Horm IGF Res 2004; 14:277-286.

13. JONES JI., CLEMMONS DR.
Insulin-like growth factors and their binding proteins : biological actions.
Endocr Rev 1995; 16:3-34.

14. ALI O., COHEN P., LEE KW.
Epidemiology and biology of insulin-like growth factor binding protein-3 (IGFBP-3) as an anti-cancer molecule.
Horm Metab Res 2003; 35:726-733.

15. CHAN SS., TWIGG SM., FIRTH SM., BAXTER RC.
Insulin-like growth factor binding protein-3 leads to insulin resistance in adipocytes.
J Clin Endocrinol Metab 2005; 90:6588-6595.

16. JUUL A., MAIN K., BLUM WF., LINDHOLM J., RANKE MB., SKAKKEBAEK NE.
The ration between serum levels of insulin-like growth factor (IGF)-I and the IGF binding proteins (IGFBP-1, 2 and 3) decreases with age in healty adults and is increased in acromegalic patients.
Clin Endocrinol (Oxf) 1994; 41:85-93.

17. BLUM WF., ALBERTSSON-WIKLAND K., ROSBERG S., RANKE MB.
Serum levels of insulin-like growth factor I (IGF-I) and IGF binding protein 3 reflect spontaneous growth hormone secretion.
J Clin Endocrinol Metab 1994; 76:1610-1616.

18. FRYSTYK J., IVARSEN P., SKJAERBAEK C., FLYVBJERG A., PEDERSEN EB., ORSKOV H.
Serum-free insulin-like growth factor I correlates with clearance in patients with chronic renal failure.
Kidney Int 1999; 56:2076-2084.

19. FRYSTYK J.
In Endocrinology and Metabolism – Clinics of North America 2005 : Endocrinology of aging, Chapter XI : **Aging somatotropic axis mechanisms and implications of IGFBP adaptation.**

XVIII. AZ ELJÁRÁS ÖSSZEFOGLALÁSA

	TELJES RADIOAK- TIVITÁS µl	KALIBRÁTOROK KONTROLLOK µl	MINTÁK µl
MINTÁK HÍGÍTÁSA Hígító puffer Minta	- -	- -	1000 10
Rázás	Vortex		
INKUBÁCIÓ Kalibrátorok (0-5), kontrollok Hígított minták,	- -	100 -	- 100
Tracer	50	50	50
Inkubáció	120 perc szobahőmérsékleten rázatással (400 rpm)		
Elválasztás Hígított mosóoldat Elválasztás Hígított mosóoldat Elválasztás	-	Leszívás (vagy leöntés) 2 ml Leszívás (vagy leöntés) 2 ml Leszívás (vagy leöntés)	
Mérés	Radioaktivitás mérése 60 másodpercig		

DIAsource Katalógusszám : KIP1171	P.I. Szám : 1700466/hu	Verziószám : 090424/1
--------------------------------------	---------------------------	--------------------------

	<u>Used symbols</u>	<u>Symboles utilisés</u>
	Consult instructions for use	Consulter les instructions d'utilisation
	Storage temperature	Température de conservation
	Use by	Utiliser jusque
	Batch code	Numéro de lot
	Catalogue number	Référence de catalogue
	Control	Contrôle
	In vitro diagnostic medical device	Dispositif médical de diagnostic in vitro
	Manufacturer	Fabricant
	Contains sufficient for <n> tests	Contenu suffisant pour <n> tests
	Wash solution concentrated	Solution de lavage concentrée
	Zero calibrator	Calibrateur zéro
	Calibrator #	Calibrateur #
	Control #	Contrôle #
	Tracer	Traceur
	Tracer	Traceur
	Tracer concentrated	Traceur concentré
	Tracer concentrated	Traceur concentré
	Tubes	Tubes
	Incubation buffer	Tampon d'incubation
	Acetonitrile	Acétonitrile
	Serum	Sérum
	Specimen diluent	Diluant du spécimen
	Dilution buffer	Tampon de dilution
	Antiserum	Antisérum
	Immunoabsorbent	Immunoabsorbant
	Calibrator diluent	Diluant de calibrateur
	Reconstitution solution	Solution de reconstitution
	Polyethylene glycol	Glycol Polyéthylène
	Extraction solution	Solution d'extraction
	Elution solution	Solution d'élution
	Bond Elut Silica cartridges	Cartouches Bond Elut Silica
	Pre-treatment solution	Solution de pré-traitement
	Neutralization solution	Solution de neutralisation
	Tracer buffer	Tampon traceur
	Microtiterplate	Microplaque de titration
	HRP Conjugate	HRP Conjugué
	HRP Conjugate	HRP Conjugué
	HRP Conjugate concentrate	HRP Conjugué concentré
	HRP Conjugate concentrate	HRP Conjugué concentré
	Conjugate buffer	Tampon conjugué
	Chromogenic TMB concentrate	Chromogène TMB concentré
	Chromogenic TMB solution	Solution chromogène TMB
	Substrate buffer	Tampon substrat
	Stop solution	Solution d'arrêt
	Incubation serum	Sérum d'incubation
	Buffer	Tampon
	AP Conjugate	AP Conjugué
	Substrate PNPP	Tampon PNPP
	Biotin conjugate concentrate	Biotine conjugué concentré
	Avidine HRP concentrate	Avidine HRP concentré
	Assay buffer	Tampon de test
	Biotin conjugate	Biotine conjugué
	Specific Antibody	Anticorps spécifique
	Streptavidin HRP concentrate	Concentré streptavidine HRP
	Non-specific binding	Liant non spécifique
	2nd Antibody	Second anticorps
	Acidification Buffer	Tampon d'acidification

	<u>Gebruikte symbolen</u>	<u>Gebrauchte Symbolen</u>
	Raadpleeg de gebruiksaanwijzing	Gebrauchsanweisung beachten
	Bewaartemperatuur	Lagern bei
	Houdbaar tot	Verwendbar bis
	Lotnummer	Chargenbezeichnung
	Catalogusnummer	Bestellnummer
	Controle	Kontrolle
	Medisch hulpmiddel voor in-vitro diagnostiek	In Vitro Diagnostikum
	Fabrikant	Hersteller
	Inhoud voldoende voor <n> testen	Ausreichend für <n> Ansätze
	Wasoplossing, geconcentreerd	Waschlösung-Konzentrat
	Nulkalibrator	Null kalibrator
	Kalibrator #	Kalibrator #
	Controle #	Kontrolle #
	Tracer	Tracer
	Tracer	Tracer
	Tracer geconcentreerd	Tracer Konzentrat
	Tracer geconcentreerd	Tracer Konzentrat
	Buisjes	Röhrchen
	Incubatiebuffer	Inkubationspuffer
	Acetonitrile	Azetonitril
	Serum	Humanserum
	Specimen diluent	Probenverdünner
	Verdunningsbuffer	Verdünnungspuffer
	Antiserum	Antiserum
	Immunoabsorbent	Immunadsorbens
	Kalibratorverdunner	Kalibratorverdünnung
	Reconstitutieoplossing	Rekonstitutionslösung
	Polyethyleen glycol	Polyethylenglykol
	Extractieoplossing	Extraktionslösung
	Elutieoplossing	Eluierungslösung
	Bond Elut Silica kolom	Bond Elut Silikakartuschen
	Pre-behandelingsoplossing	Vorbehandlungslösung
	Neutralisatieoplossing	Neutralisierungslösung
	Tracerbuffer	Tracer-Puffer
	Microtiterplaat	Mikrotiterplatte
	HRP Conjuaat	HRP Konjugat
	HRP Conjuaat	HRP Konjugat
	HRP Conjuaat geconcentreerd	HRP Konjugat Konzentrat
	HRP Conjuaat geconcentreerd	HRP Konjugat Konzentrat
	Conjuaat buffer	Konjugatpuffer
	Chromogene TMB geconcentreerd	Chromogenes TMB Konzentrat
	Chromogene Oplossing TMB	Farblösung TMB
	Substraatbuffer	Substratpuffer
	Stopoplossing	Stopplösung
	Incubatieserum	Inkubationsserum
	Buffer	Puffer
	AP Conjuaat	AP Konjugat
	Substraat PNPP	Substrat PNPP
	Geconcentreerd Biotine conjuaat	Biotin-Konjugat-Konzentrat
	Geconcentreerd Avidine-HRP conjuaat	Avidin-HRP-Konzentrat
	Assay buffer	Assaypuffer
	Biotine conjuaat	Biotin-Konjugat
	Specifiek antilichaam	Spezifischer Antikörper
	Streptavidine-HRP concentraat	HRP Streptavidinkonzentrat
	Aspecifieke binding	Unspezifische Bindung
	2de antilichaam	Sekundärer Antikörper
	Verzuringbuffer	Ansäuerungspuffer

	<u>Simboli utilizzati</u>	<u>Símbolos utilizados</u>
	Consultare le istruzioni per l'uso	Consultar las instrucciones de uso
	Limitazioni di temperatura	Limitación de temperatura
	Utilizzare entro	Fecha de caducidad
	Numero di lotto	Código de lote
	Numero di catalogo	Número de catálogo
	Controllo	Control
	Dispositivo medico-diagnostico in vitro	Producto sanitario para diagnóstico in vitro
	Fabbricante	Fabricante
	Contenuto sufficiente per <n> saggi	Contenido suficiente para <n> ensayos
	Tampone di lavaggio concentrato	Solución de lavado concentrada
	Calibratore zero	Calibrador cero
	Standard #	Calibrador #
	Controllo #	Control #
	Marcato	Trazador
	Marcato	Trazador
	Marcato concentrato	Trazador concentrada
	Marcato concentrato	Trazador concentrada
	Provette	Tubos
	Tampone incubazione	Tampón de incubación
	Acetonitrile	Acetonitrilo
	Siero	Suero
	Diluente campione	Diluyente de Muestra
	Tampone diluizione	Tampón de dilución
	Antisiero	Antisuero
	Immunoassorbente	Inmunoadsorbente
	Diluente calibratore	Diluyente de calibrador
	Soluzione di ricostituzione	Solución de Reconstitución
	Polietilenglicole	Glicol Polietileno
	Soluzione di estrazione	Solución de extracción
	Soluzione di eluizione	Solución de elución
	Cartucce di silice bond elut	Cartuchos Bond Elut Silica
	Soluzione di pretrattamento	Solución de Pre-tratamiento
	Soluzione di neutralizzazione	Solución de Neutralización
	Tracer Buffer	Tampón de trazador
	Piastra di microtitolazione	Placa de microvaloración
	HRP Coniugato	HRP Conjugado
	HRP Coniugato	HRP Conjugado
	HRP Coniugato concentrato	HRP Conjugado concentrada
	HRP Coniugato concentrato	HRP Conjugado concentrada
	Buffer coniugato	Tampón de Conjugado
	Cromogena TMB concentrato	Cromógena TMB concentrada
	Soluzione cromogena TMB	Solución Cromógena TMB
	Tampone substrato	Tampón de sustrato
	Soluzione di arresto	Solución de Parada
	Incubazione con siero	Suero de Incubación
	Buffer	Tampón
	AP Coniugato	AP Conjugado
	Substrato PNPP	Sustrato PNPP
	Concentrato coniugato con biotina	Concentrado de conjugado de biotina
	Concentrato avidina HRP	Concentrado avidina-HRP
	Soluzione tampone per test	Tampón de ensayo
	Coniugato con biotina	Conjugado de biotina
	Anticorpo Specifico	Anticuerpo específico
	Streptavidina-HRP concentrata	Estreptavidina-HRP Concentrado
	Legame non-specifico	Unión no específica
	2° Anticorpo	Segundo anticuerpo
	Tampone Acidificante	Tampón de Acidificación

	<u>Símbolos utilizados</u>	<u>Använda symboler</u>
	Consulte instruções de utilização	Läs instruktionerna före användning
	Temperatura de conservação	Förvaringstemperatur
	Utilizar antes de	Används av
	Código de lote	Lotnummer
	Número de catálogo	Katalognummer
	Controlo	Kontroll
	Dispositivo médico de diagnóstico in vitro	In vitro diagnostiskt kit
	Fabricante	Tillverkare
	Conteúdo suficiente para <n> testes	Innehållet räcker till <n> prover
	Solução de lavagem concentrada	Tvättlösning, koncentrerad
	Calibrador zero	Nollkalibrerare
	Calibrador #	Kalibrator #
	Controlo #	Kontroll #
	Marcador	Radioisotop, antigen
	Marcador	Radioisotop, antikropp
	Marcador concentrada	Radioisotop, antigen koncentrerad
	Marcador concentrada	Radioisotop, antikropp koncentrerad
	Tubos	Rör
	Tampão de incubação	Inkuberingsbuffert
	Acetonitrilo	Acetonitril
	Soro	Serum
	Diluidor de espécimes	Spädningsbuffert för prover
	Tampão de diluição	Spädningsbuffert
	Anti-soro	Antiserum
	Imunoadsorvente	Immunoadsorberare
	Diluyente do calibrador	Kalibratordiluent
	Solução de Reconstituição	Rekonstitutionslösning
	Polietileno-glicol	Polyetylen glykol
	Solução de Extração	Extraktionslösning
	Solução de Eluição	Elueringslösning
	Cartuchos de sílica Bond Elut	Silikonpatroner för elueringsbindning
	Solução de pré-tratamento	Förbehandlingslösning
	Solução de neutralização	Neutraliseringslösning
	Tampão Marcador	Tracerbuffert
	Placa de micro titulação	Microtiterplatta
	HRP Conjugação	HRP-konjugat
	HRP Conjugação	HRP-konjugat
	HRP Conjugação concentrada	HRP-konjugat-koncentrat
	HRP Conjugação concentrada	HRP-konjugat-koncentrat
	Conjuge o tampão	Konjugatbuffert
	Cromogénica TMB concentrada	Kromogeniskt TMB-koncentrat
	Solução Cromogénica TMB	Kromogenisk TMB-lösning
	Tampão de substrato	Substratbuffert
	Solução de Paragem	Stopplösning
	Soro de incubação	Inkubationsserum
	Tampão	Buffert
	AP Conjugação	AP-konjugat
	Substrato PNPP	Substrat-PNPP
	Concentrado conjugado de biotina	Biotinkonjugat koncentrat
	Concentrado HRP de avidina	Avidin HRP-koncentrat
	Tampão de ensaio	Provbuffert
	Conjugado de biotina	Biotinkonjugat
	Anticorpo específico	-
	Estreptavidina HRP concentrado	-
	Ligações não específicas	-
	Anticorpo secundário	-
	Tampão de acidificação	-

	<u>Επεξήγηση συμβόλων</u>	<u>Anvendte symboler</u>
	Συμβουλευτείτε τις οδηγίες χρήσης	Læs brugsvejledningen
	Θερμοκρασία αποθήκευσης	Opbevaringstemperatur
	Ημερομηνία λήξης	Anvend inden
	Αριθμός παρτίδας	Batchkode
	Αριθμός καταλόγου	Katalognummer
	Πρότυπο ελέγχου	Kontrol
	In Vitro Διαγνωστικό Ιατροτεχνολογικό προϊόν	Medicinsk udstyr til in vitro-diagnosticering
	Κατασκευαστής	Fabrikant
	Περιεχόμενο επαρκές για «n» εξετάσεις	Indeholder nok til <n> test
	Συμπυκνωμένο διάλυμα έκπλυσης	Koncentreret vaskeopløsning
	Μηδενικός βαθμονομητής	Nul-kalibrator
	Βαθμονομητής #	Kalibrator nr.
	Ορός ελέγχου #	Kontrol nr.
	Ιχνηθέτης	Markør
	Ιχνηθέτης	Markør
	Χρωμογόνος Ιχνηθέτης	Koncentreret markør
	Χρωμογόνος Ιχνηθέτης	Koncentreret markør
	Σωληνάριο	Tuber
	Ρυθμιστικό διάλυμα επώασης	Inkubationsbuffer
	Ακετονιτρίλιο	Acetonitril
	Ορός	Serum
	Διάλυμα αραίωσης δειγμάτων	Prøvediluent
	Ρυθμιστικό διάλυμα αραίωσης	Fortyndingsbuffer
	Αντιορός	Antiserum
	Ανοσοπροσροφητικό	Immonoadsorbent
	Αραιωτικό βαθμονομητών	Kalibratordiluent
	Διάλυμα ανασύστασης	Rekonstitueringsopløsning
	Πολυαιθυλενογλυκόλη	Polyetylenglykol
	Διάλυμα εκχύλισης	Ekstraktionsopløsning
	Διάλυμα έκλουσης	Elueringsopløsning
	Φύσιγγες πυριτίου Bond Elut	Patroner med bindingselueringssilica
	Διάλυμα προεπεξεργασίας	Forbehandlingsopløsning
	Διάλυμα εξουδετέρωσης	Neutraliseringsopløsning
	Ρυθμιστικό διάλυμα	Markørbuffer
	Πλάκα μικροτιτλοδότησης	Mikrotiterplade
	HRP Σύζευγμα	HRP-konjugat
	HRP Σύζευγμα	HRP-konjugat
	Χρωμογόνος HRP Σύζευγμα	HRP-konjugat-koncentreret
	Χρωμογόνος HRP Σύζευγμα	HRP-konjugat-koncentreret
	Ρυθμιστικό διάλυμα συζεύγματος	Konjugatbuffer
	Χρωμογόνος TMB	Kromogen TMB-koncentreret
	Διάλυμα χρωμογόνου TMB	Kromogen TMB-opløsning
	Ρυθμιστικό διάλυμα υποστρώματος	Substratbuffer
	Ανασχετικό αντιδραστήριο	Stopopløsning
	Ορός επώασης	Inkubationsserum
	Ρυθμιστικό διάλυμα	Buffer
	AP Σύζευγμα	AP-konjugat
	PNPP υποστρώματος	Substrat PNPP
	Συμπυκνωμένο αντιδραστήριο συζευγμένο με βιοτίνη	Biotin konjugat koncentrat
	Συμπυκνωμένο διάλυμα αβιδίνης-HRP	Avidin HRP koncentrat
	Ρυθμιστικό διάλυμα προσδιορισμού	Prøvebuffer
	αντιδραστήριο συζευγμένο με βιοτίνη	Biotin konjugat
	Ειδικό Αντίσωμα	-
	Συμπυκνωμένη στρεπταβιδίνη συνεξευγμένη με HRP	-
	μη-ειδική δέσμευση	-
	2ο Αντίσωμα	-
	Ρυθμιστικό Διάλυμα όξινο	-

	<u>Stosowane symbole</u>	<u>Használt szimbólumok</u>
	Przed zastosowaniem zapoznać się z instrukcją	Olvassa el a használati útmutatót
	Temperatura przechowywania	Tárolási hőmérséklet
	Zużyć przed	Lejáratí idő
	Kod serii	Gyártási kód
	Numer katalogowy	Katalógus szám
	Kontrola	Kontrol
	Urządzenie medyczne do diagnostyki in vitro	In vitro diagnosztikai eszköz
	Producent	Gyártó
	Zawartość wystarczająca do <n> testów	Tartalma <n> teszt elvégzésére elegendő
	Roztwór płuczący stężony	Mosó folyadék koncentrátum
	Kalibrator zerowy	Zero kalibrátor
	Kalibrator nr	Kalibrátor #
	Kontrola nr	Kontrol #
	Znacznik izotopowy	Nyomjelző izotóp
	Znacznik izotopowy	Nyomjelző izotóp
	Znacznik izotopowy stężony	Nyomjelző izotóp koncentrátum
	Znacznik izotopowy stężony	Nyomjelző izotóp koncentrátum
	Probówki	Csővek
	Wymagana inkubacja buforu	Inkubáló puffer
	Acetonitryl	Acetonitril
	Surowica	Szérum
	Rozcieńczalnik próbki	Mintahígító
	Bufor do rozcieńczania	Hígító puffer
	Antysurowica	Antiszérum
	Immunoabsorbent	Immunszorbens
	Rozcieńczalnik kalibratora	Kalibrátor hígító
	Roztwór do rozcieńczania	Mintaelőkészítő oldat
	Glikol poli(oksy)etylenowy	Polietilén glikol
	Roztwór ekstrakcyjny	Extrakciós oldat
	Roztwór elucyjny	Eluáló oldat
	Kolumny krzemionkowe Bond Elut	Bond Elut Silica szilikagél patronok
	Roztwór do przygotowania wstępnego	Előkezelő oldat
	Roztwór neutralizujący	Semlegesítő oldat
	Bufor znacznika	Nyomjelző izotóp hígító puffer
	mikro płytki	Mikrotiter lemez
	Koniugat peroksydazy chrzanowej	HRP konjugátum
	Koniugat peroksydazy chrzanowej	HRP konjugátum
	Koncentrat koniugatu peroksydazy chrzanowej	HRP konjugátum koncentrátum
	Koncentrat koniugatu peroksydazy chrzanowej	HRP konjugátum koncentrátum
	Bufor do koniugacji	Konjugátum puffer
	Koncentrat chromogenu TMB (czterometylobenzodyny)	Kromogén TMB koncentrátum
	Roztwór chromogenu TMB (czterometylobenzodyny)	Kromogén TMB oldat
	Bufor substratu	Szubsztrát puffer
	Roztwór zatrzymujący reakcję	Stop oldat
	Wymagana inkubacja surowicy	Inkubációs szérum
	Bufor	Puffer
	Koniugat AP (fosfatazy alkalicznej)	AP konjugátum
	p-nitrofenylofosforan substratowy	Szubsztrát PNPP
	Koncentrat koniugatu biotyny	Biotin konjugátum koncentrátum
	Koncentrat peroksydazy chrzanowej z awidyną	Avidin HRP koncentrátum
	Bufor do oznaczania	Vizsgálati puffer
	Koniugatu biotyny	Biotin konjugátum
	Przeciwciało swoiste	Specifikus ellenanyag
	Koncentrat streptawidyny HRP	Sztreptawidin HRP koncentrátum
	Wiązanie nieswoiste	Nem-specifikus kötődés
	Drugie przeciwciało	Másodlagos ellenanyag
	Bufor zakwaszający	Savas puffer

	<u>Използвани символи</u>		
	Вижте инструкцията за работа		
	Температура на съхранение		
	Използвайте с		
	Партиден код		
	Каталожен номер		
	Контрол		
	Ин витро диагностично медицинско изделие		
	Производител		
	Съдържание достатъчно за <n> теста		
	Концентриран измиващ разтвор		
	Нулев калибратор		
	Калибратор #		
	Контрол #		
	Трейсър		
	Трейсър		
	Концентриран маркер		
	Концентриран маркер		
	Епруветки		
	Инкубационен буфер		
	Ацетонитрил		
	Серум		
	Разредител за пробите		
	Буфер за разреждане		
	Антисерум		
	Имуноабсорбент		
	Разредител за калибратора		
	Пресъздаващ разтвор		
	Полиетилен гликол		
	Екстрактов разтвор		
	Разтвор за елюиране		
	Силикагелни пълнители		
	Пред-лечебен разтвор		
	Неутрализиращ разтвор		
	Маркерен буфер		
	Микротитърна пластина		
	HRP конюгат / Конюгат на хрянова пероксидаза		
	HRP конюгат / Конюгат на хрянова пероксидаза		
	HRP конюгиран концентрат		
	HRP конюгиран концентрат		
	Буфер за конюгата		
	Хромогенен TMB концентрат		
	Хромогенен TMB разтвор		
	Субстратен буфер		
	Стоп разтвор		
	Инкубационен серум		
	Буфер		
	AP конюгат / конюгат на алкална фосфатаза		
	Субстрат PNPP / пара нитрофенил фосфат		
	Биотин конюгиран концентрат		
	Авидин HRP концентрат		
	Буфер за пробите		
	Биотин конюгат		
	специфично анти тяло		
	стрептавидин HRP концентрат		
	не специфично свързване		
	второ анти тяло		
	киселинизиращ буфер		