

Product information

Information about other products is available at: www.demeditec.com



User's Manual

IGFBP-1 - ELISA

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

Enzymeimmunoassay for quantitative Determination of
**human Insulin-like Growth Factor
Binding Protein - 1**
English

IVD



REF

DEE001



96

Europäische Union / European Union*
für in vitro Diagnostik / for in vitro diagnostics
Rest of the world: for research use only!

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

Symbols/ Symbole /Symboles/ Simboli/ Símbolos/ Símbolos/ Symbolen/ Symboler/ Symboler/ Symbole/ Szimbólumok/ Symbole/ Symboly/ Символи/ Sümbolid/ Σύμβολα/ Simboluri/ Simboli/ Symbolit

according to DIN EN 980 and EDMA recommendations Standard News 6 2001



Expiry date/ Verfallsdatum/ Date de péremption/ Data di scadenza/ Fecha de caducidad/ Data de validade/ Uiterste gebruiksdatum/ Udløbsdato/ Bäst före-datum/ Termin ważności/ Lejárati idő/ Čas expirácie/ Doba expirace/ Срок на годност/ Aegumiskuurpäev/ Ημερομηνία λήξης/ Data de expirare/ Rok uporabe/ Viimeinen käyttöpäivä



Consider instructions for use/ Bitte Gebrauchsanweisung beachten/ Consultez la notice d'utilisation/ Consultare le istruzioni per l'uso/ Consulte las instrucciones de uso/ Respeitar as instruções de utilização./ A.u.b de gebruiksaanwijzing volgen/ Se brugsanvisningen/ Läs anvisningarna före användning/ Proszę przeczytać instrukcję obsługi/ Vegye figyelembe a használati utasításban foglaltakat/ Postupujte podľa pokynov na použitie/ Dodržujte návod k použití/ Моля, спазвайте инструкцията за употреба/ Palun järgige kasutusjuhendit./ Λάβετε υπόψη σας τις οδηγίες χρήσης/ Vá rugám sá respectați instrucțiunile de utilizare/ Upoštevejajte navodila za uporabo!/ Lue käyttöohje huolellisesti!



In-vitro diagnostic medical device (for in -vitro diagnostic Use)/ in-vitro-Diagnostikum (zur In-vitro-Diagnostik)/ Dispositif médical de diagnostic in vitro (Pour usage diagnostique in vitro)/ Dispositivo medico per diagnostica in vitro (per uso diagnostico in vitro)/ Dispositivo médico de diagnóstico in vitro (para uso diagnóstico in vitro)/ Dispositivo Médico para Diagnóstico in vitro (Para Utilização de Diagnóstico in vitro)/ Medisch hulpmiddel voor diagnostiek in vitro (voor diagnostisch gebruik in vitro)/ Medicinsk udstyr til in vitro-diagnostik (Udelukkende til in vitro diagnostisk anvendelse)/ Medicinteknisk produkt avsedd för in vitro-diagnostik (för in vitro-diagnostiskt bruk)/ Wyrób medyczny do diagnostyki in vitro/ In vitro orvosdiagnostikai termék (in vitro diagnosztikai használathoz)/ In vitro diagnostický zdravotnícký materiál (určené na diagnostiku „in vitro“)/ In vitro diagnostický zdravotnícký materiál (určeno pro diagnostiku „in vitro“)/ Медицинско устройство за ин-витро диагностика (за ин-витро диагностика)/ in vitro diagnostikaseade (in vitro diagnostika tegemiseks)/ In vitro διαγνωστικό (για διάγνωση in vitro)/ Dispozitiv de diagnosticare in vitro (pentru diagnosticarea in-vitro)/ In vitro diagnostika (o in vitro diagnostiki)/ in vitro-diagnostiikkäyttö



Lot-Batch Number/ Charge-Chargennummer/ Lot-Code du lot/ Lotto-Numero di lotto/ Lote-Código de lote/ Lote-Código do Lote/Lot-Partijnummer/ Lot-Batchkode/ Partisatskod/ Numer serii/ Tétel-sarzs szám/ Číslo šarže/ Číslo šarže/ Партиден номер/Partii – partii number/ Παρτίδα-αριθμός παρτίδας/ Lot-număr lot/ Številka serije/ erä



Manufactured by/ Hergestellt von/ Fabriqué par/ Prodotto da/Fabricado por/ Fabricado por/ Vervaardigd doo/Fabrikation af /Tillverkad av/ Wyprodukowane przez/ Gyártotta / Vyrobené/ Vyrobeno v/ Производител/ Τοοτja/ Κατασκευάζεται από/ Produs de/ Proizvajalec/ Valmistaja



Catalogue Number/ Bestellnummer/ Numéro de référence/Numero di riferimento/ Número de referencia/ Número de Referência/ Referentienummer/ Referencennummer /Beställningsnummer/ Numer katalogowy/ Rendelési szám/Katalógové číslo/ Objednací číslo/Каталожен номер/Tellimisnumber/ Αρ. παραγγελίας/Număr comandă/ Številka naročila/ viite tai tilausnumero



Store at between/ Lagerung bei zwischen/ Conserver à entre/ Conservare a tra/ Conservar a temp. Entre/ Armazénar entre/ Bewaar bij tussen/ Opbevares mellem/ Förvaras vid/ Przechowywać w/ Tárolási tartomány/ Skladujte v rozsahu / Skladujte v rozmezi/ Температурно ограничение/ Säilätada temperatuuridel/ Φύλαξη σε θερμοκρασία/ Depozitare între/ Skladiščenje med/ Säilytys x-y Celsiusasteen lämpötilassa



Contains sufficient for x tests/ Inhalt ausreichend für x Tests/ Contient suffisant pour x tests/ Contenuto sufficiente per x test/ Contenido suficiente para x pruebas/ Conteúdo suficiente para x testes/ Bevat voldoende voor x bepalingen/ Ineholder tilstrækkeligt til x prøver/ Innehållet räcker till x analyser/ Zawartość na x testów/ Tartalma x teszt elvégzésére elegendő/ Obsahuje materiál pre x testov / Obsah dostahuje pro x testů/ Съдържание достатъчно за x тестове/ Sisust jätkub x katse jaoks/ Το περιεχόμενο επαρκεί για x δοκιμές/ Conținut suficient pentru x teste/ Vsebina zadostuje za x preizkusov/ Sisältö riittää x testille



Keep away from sunlight/ Nicht dem Sonnenlicht aussetzen/ Conserver à l'abri de la lumière/ Conservare al riparo della luce solare/ No exponer a la luz solar/ Proteger da luz solar/ Niet aan zonlicht blootstellen/ Må ikke udsættes for sollys/ Utsätt inte för solljus/ Nie wystawiać na słońce/ Napfénytől távol tartandó/ Nevystavovat' slnečnému svetlu/ Nevystavovat' slunečnímu světlu/ Да се предпазва от слънчева светлина/ Kaitsta otsese päikesekiirguse eest/ Κρατήστε το μακριά από την ηλιακή ακτινοβολία/ Țineți departe de lumina soarelui/ Ne izpostavljajte sončni svetlobi/ suojaa auringovalolta



Incubation time/ Inkubationszeit/ Temps d'incubation/ Tempo d'incubazione/ Tiempo de incubación/ Tempo de incubação/ incubatietijd/Inkubationstid/ inkubationstid/ Czas inkubacji/ Inkubációs idő/ Inkubačná lehota/ Inkubačni doba/ Инкубационен период/ Inkubatsiooniaeg/ Χρόνος επώασης/ Timp de incubare/ Inkubacijska doba/ inkubaatioaika



incubate at / Inkubation bei/ Incuber à/ Incubare a/incubar a/Incubar a/ incubatietemperatuur/ Inkubation ved/ inkubation vid/ Inkubacja przy/ Inkubáció hőmérséklete/Inkubácia pri/ Inkubace při/Инкубира се при/ Inkubatsioon temperatuuril/ Επώαση στους/ Incubare la/ Inkubacija pri/ inkubaatiolämpötila



Shaking/ Schütteln/ Mélanger/ Agitare/ Agitar/ Agitação/ Schudden/ Ryster/ Skaka/ Wstrząsanie/ Rázás/ Pretrepat/ Protřepat/ Разклацане/ Raputada/ Ανακινήστε/ Vibrare/ Stresite/ Sekoita

SORB MT

Mikrotiterplate/ Mikrotiterplatte/ plaque de microtitrage/ Piastra di microtitolazione/ Placa de microtitulación/ Placa de Microtitulação/ microtiterplaat/ Mikrotiterplade/ mikrotiterplatta/ microtiterplaat/ Płytká microtiter/ Mikrotiter lap/ Mikrotitračná podložka/ Mikrotitrační podložka/ Микротитърна плака/ Mikrotiterplaat/ Τρυβλίο μικροπιλοδότησης/ Microplacă/ Mikrotitrská plošča/ Mikrotitrauslevy

Rec in

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

Demeditec Diagnostics GmbH • Lise-Meitner-Straße 2 • D-24145 Kiel (Germany)

SPE	Sample/ Probe /Echantillon/ campione/ Muestra/ Amostra/ monster/ Prøve/ prov/ Próbka/ Minta/ Vzorka/ Vzorek/ Проба/ Proov/ Δείγμα/ Probă/ Vzorec/ Näyte
DILU X	VP Dilute in Buffer X/ Verdünnen in Puffer X/ Diluer dans le tampon X/ Diluire nel tampone X/ Diluir en tampón X/ Diluir no Tampão X/ verdunnen in buffer X/ Fortyndes i buffer X/ späd i buffert X/ Rozcieńczanie w buforze X/ Hígítás X pufferben/ Riedit' v pufrí X/ Ředit v pufru X/ Разреждане в буфер X/ Lahjendada puhvrís X/ Αραιώστε σε ρυθμιστικό διάλυμα X/ Diluați în tamponul X/ Razredčiti v pufru X/ Iaimennetaan x puskuriin
Ab	AK Antibody and Enzyme Conjugate/ Antikörper und Enzym Konjugat/ anticorps conjugué et conjugué enzymatique/ Coniugato di anticorpo ed enzima/ Conjugado de anticuerpos y enzimas/ Conjugado Anticorpo-Enzima/ antilichaam-en enzymconjugaat/ Antistoffer og enzym-konjugat/ antikropp- och enzymkonjugat (antikropp och enzym, konjugat)/
CONJ	EK Koniugat antyciał i enzymów/ Antitest és enzim páros/ Protílátkový a enzymatický konjugát/ Protílátkový a enzymatický konjugát/ Антитяло и ензим конюгат/ Antikehad ja ensüümi konjugaat/ Σύμπλοκο αντισώματος-ενζύμου/ Compuși din anticorpi și enzime/ Antitelesa in konjugat encima/ Vasta-aine ja entsymi konjugaatti
CAL X	A-G Standard X/Standard X/ Etalon X/ Standard X/ Estándar X/ Standard X/ standaard X/ Standard X/ standard X/ Standard X/ Standard X/ Štandard X/ Standard X/ Стандарт X/ Standard X/ Πρότυπο X/ Standard X/ Standardni X/ Kalibraattori X
Control	KS1/ Control Serum / Kontrollserum/ Contrôle sérique/ Siero di controllo/ Suero de control/ Soro de Controllo/ KS2 controleserum/ Kontrolserum/ Kontrollserum/ Serum kontrolne/ Ellenőrző szérum/ Kontrolné sérum/ Kontrolní sérum/ Контролен сeрyм/ Kontrollseerum/ Ορός ελέγχου/Ser de control/ Kontrolni serum/ Kontrolli seerumi
BUF WASH 20x	WP Washing Buffer Concentrate/ Waschpufferkonzentrat/ Tampon de lavage conc./ Tampone di lavaggio concentrato/ Tampón de lavado concentrado/ Tampão de Lavagem Concentrado/ wasbuffer, geconcentreerd/ Vaskebufferkoncentrat/ Vaskebufferkoncentrat/ tvättbuffertkoncentrat/ Bufor płukania koncentrat/ Mosópuffer koncentrátum/ Koncentrát vymývacieho pufru/ Концентрат на промивен буфер/ Pesupuhvri kontsentraat/ Συμπύκνωμα ρυθμιστικού διαλύματος έκπλυσης/ Concentrat pentru tamponul de spălare/ Koncentrat izpiralnega pufru/ Pesuliuositiiviste
BUF WASH	Washing Buffer / Waschpuffer/ Tampon de lavage/ Tampone di lavaggio/ Tampón de lavado/Tampão de Lavagem/ wasbuffer/ Vaskebuffer/ tvättbuffert/ Bufor płukania/ Mosópuffer/ Vymývací pufer/ Vymývací pufr/ Промивен буфер/ Pesupuhver/ Ρυθμιστικό διάλυμα έκπλυσης/ Tampon pentru spălare /Izpiralni pufer/ Pesuliuos
SUB TMB	S Substrate/ Substrat/ Substrat/ Substrato/ Substrato/ Substrato/ substraat/ Substrat/ Substrat/ Substrat/ Szubsztrátum/ Substrát/ Substrát/ Субстрат Substraat/ Υπόστρωμα/ Substrat/ Substrat/ Substraattiliuos
STOP SOLN	SL Stop Solution/ Stopp Lösung/ Stop Solution/ Soluzione di stop/ Stop Solución/ Solução Stop/ stopoplossing/ Stopoplösning/ Stopplösning/ Stop roztwór/ Megállító oldat/ Roztok na ukončenie/ Roztok pro ukončení/ Стопиратс разтвор/ Stopp-lahus/ Διάλυμα διακοπής/ Soluție de oprire/ Stop raztopina/ Pysäytysliuos
TAPE	Cover Plate with sealing tape /Platte abkleben/ Recouvrir la microplaque avec bande adhésive/ Coprire la piastra con nastro adesivo/ Cubrir la placa con una cinta adhesiva/ Cobrir a Placa com fita adesiva/ plaatje met tape afdekken/ Afdækningsplade med tape/ maskera platta/ Odkleić plytkę/ Tányér leragasztása/ Oblepit' podložku lepiacou páskou/ Olepit podložku lepící páskou/ Пластика с лента за запечатване/ Katta plaat isoleerikleepindiga/ Κολλήστε το πλακίδιο με κολλητική ταινία/ Aoperiți placa cu o bandă adezivă/ Prelepiti ploščo/ Peitã mikrotitrauslevy oheisella teipillä
MEASURE	Measure plate within 30 min at 450 nm (Referencefilter ≥590nm)/Ausmessung innerhalb von 30 min bei 450 nm (Referenzfilter ≥ 590 nm)./ Mesure l'absorbance en l'espace de 30 min à 450 nm avec ≥590nm longueur d'onde pour référence/Misurazione entro 30 min. a 450 nm (filtro di riferimento ≥ 590 nm)./ Medición de la placa dentro de los siguientes 30 min a 450 nm (filtro de referencia ≥ 590nm)/ Medir a placa dentro de 30 min a 450 nm (Filtro de referência ≥590nm)/ Binnen 30 minuten bij 450 nm meten (referentiefilter ≥ 590 nm)./ Mål plade i løbet af 30 min ved 450 nm (referencefilter ≥590nm)/ Mät inom 30 min vid 450 nm (referensfilter ≥ 590 nm)./ Pomiar w ciągu 30 min przy 450 nm (filtr odniesienia ≥ 590 nm)./ Ki mérés 30 percen belül 450 nm-nél (referenciaszűrő ≥ 590 nm)./ Merat' 30 minút pri 450 nm/Měřit 30 minut při 450 nm/ Отчитане в рамките на 30 min при 450 nm (референтен филтър ≥ 590 nm)./ Mõõtmise 30 min jooksul 450 nm korral (võrdlusfilter ≥ 590 nm). Μέτρηση εντός 30 min στα 450 nm (φίλτρο αναφοράς ≥ 590 nm)./ Măsurare în decurs de 30 min la 450 nm (filtru de referință ≥ 590 nm)./ Izmerite ploščico v 30 min pri 450 nm (referenčni filter ≥590nm) / Mittaa 30 minuutin aikana 450 nm:ssä (referenssi suodatin ≥ 590 nm)
Literatur	Literature/ Literatur/ Bibliographie/ Letterario/ Bibliografía/ Literatura documentação/ literatuur/ Litteratur/ litteratur/ Literatura/ Irodalom/ Literatura/ Literatura/ Литература// Kirjandus/ Βιβλιογραφία/ Bibliografie/ literatura/ Lähdeluettelo
International Test description	International test description/ internationale Testanleitung/ description internationale de test/ Istruzioni per il test internazionali/ Descripción de ensayo internacional/ Descrição internacional do teste/ internationale testbeskrivning/ international testbeskrivning/ Opis testu międzynarodowego/ nemzetközi teszt-útmutató/ Mezinárodní návod k testu/ Mezinárodní návod k testu/ rahvusvaheline katse kirjeldus/ Διεθνείς οδηγίες για εργαστηριακές δοκιμές/ instrucțiuni internaționale pentru testare/ mednarodna navodila za preizkus/ Kansainvälinen käyttöohje
End	in all required wells/ in allen benötigten Vertiefungen/ dans tous les godets requis/ in tutti i pozzetti richiesti/ en todos los pozos requeridos/ em todos os tubos necessários/ in alle nodige putjes/ i alle nødvendige brønde/ i alla nödvändiga brunnar/ we wszystkich potrzebnych wgłębieniach/ minden szükséges forrásban/ vo všetkých potrebných miestach/ ve všech potřebných místech/ във всички необходими ямки/ kõigis vajalikes süvendites/ σε όλες τις απαραίτητες κοιλότητες/ în toate cavitățile necesare/ v vseh zahtevanih vdolbinah /kaikkiin tarvittaviin mikrotitrauslevyn syvennyksiin

Symbols/ Symbole /Symboles/ Simboli/ Símbolos/ Símbolos/ Symbolen/ Symboler/ Symboler/ Symbole/ Szimbólumok/ Symboly/ Symboly/ Символи/ Sümbolid/ Σύμβολα/ Simboluri/ Simboli/ Symbolit	2
---	---

PACKUNGSBEILAGE DEUTSCH

TECHNISCHE EIGENSCHAFTEN und EINSATZMÖGLICHKEITEN	5
EINFÜHRUNG	5
EINSATZMÖGLICHKEITEN	6
Assay Eigenschaften und Validierung	6
Proben: Eignung, Vorbereitung und Lagerung	7
MATERIALIEN	9
Inhalt der Testpackung	9
Zusätzlich benötigte Materialien	9
TECHNISCHE HINWEISE	9
WARNHINWEISE UND VORSICHTSMAßNAHMEN	10
TESTDURCHFÜHRUNG	11
AUSWERTUNG	12
Berechnung der Standardkurve	12
ERWARTUNGSWERTE	12

PACKAGE INSERT ENGLISH

TECHNICAL FEATURES+APPLICATIONS	14
INTRODUCTION	14
INTENDED USE	15
PERFORMANCE CHARACTERISTICS AND VALIDATION	15
SPECIMEN COLLECTION, PREPARATION AND STORAGE	16
REAGENTS PROVIDED	17
MATERIALS REQUIRED BUT NOT PROVIDED	18
Technical Recommendations	18
WARNINGS AND PRECAUTIONS	18
ASSAY PROCEDURE	20
CALCULATION OF RESULTS	21
Establishing the Standard Curve	21
EXPECTATION VALUES	21
LITREATURE / LITERATUR	22
KURZANLEITUNG – DEMEDITEC IGFBP-1 -ELISA DEE001	23
SUMMARY – DEMEDITEC IGFBP-1 ELISA DEE001	24
REF DEE001 International Test Description	25

* please ask for package inserts in your national language

PACKUNGSBEILAGE DEUTSCH

TECHNISCHE EIGENSCHAFTEN und EINSATZMÖGLICHKEITEN

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

EINFÜHRUNG

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

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

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

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

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

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

- **Energiemetabolismus**

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

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

- **Schwangerschaftsdiagnostik**

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

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

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

EINSATZMÖGLICHKEITEN

Der Demeditec IGFBP-1 ELISA DEE001 ist dazu geeignet IGFBP-1 in humanem Serum und Plasma sowie weiteren Körperflüssigkeiten, wie z.B. Amnionflüssigkeit, Muttermilch, Speichel oder Urin nachzuweisen. In Zellkulturmedien kann mit ihm ebenfalls die Konzentration von IGFBP-1 bestimmt werden.

Assay Eigenschaften und Validierung

Die Standards des ELISA DEE001 bestehen aus **nativem humanem IGFBP-1** in Konzentrationen von **0, 0.1, 0.5, 1, 2, 4 und 8 ng/ml**.

Die **analytische Sensitivität** des ELISA DEE001 beträgt **0,02 ng/ml** (zweifache Standardabweichung des Null-Standards in 22facher Bestimmung).

Die Bestimmung von IGFBP-1 mit dem ELISA DEE001 ist über einen **weiten Bereich verdünnungsecht**, die Linearität von Serumverdünnungen ist hervorragend (s. Tab. 1).

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

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

MW = Mittelwert, SA = Standardabweichung, VK = Variationskoeffizient

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

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

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

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

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

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

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

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

Proben: Eignung, Vorbereitung und Lagerung

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

Generell sollten Proben so schnell wie möglich nach der Abnahme gekühlt werden. Falls zwischen Abnahme und Bestimmung ein längerer Zeitraum liegt, sollten die unverdünnten Proben bei -20 °C oder kälter in fest verschließbaren Plastikgefäßen aufbewahrt werden.

Wiederholtes Einfrieren und Auftauen von Serum/Plasma sollte prinzipiell vermieden werden (gegebenenfalls subaliquotieren) einige Zyklen (3x) haben in unseren Versuchen jedoch auf die messbare IGFBP-1 Konzentration keine Auswirkungen gehabt.

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

Vorschlag Verdünnungsprotokoll:

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

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

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

Tabelle 4: Probenmatrizes, Wiederfindung und Verdünnungsempfehlung

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

n.b.= nicht bestimmt

MATERIALIEN

Inhalt der Testpackung

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

Zusätzlich benötigte Materialien

Destilliertes oder entmineralisiertes Wasser zum Verdünnen des Waschpuffers WP

Mikropipetten und Mehrkanal-Pipetten mit auswechselbaren Einmalspitzen

Vortex-Mischgerät

Vorrichtung zum Absaugen der Proben-Lösungen aus den Vertiefungen der Platte (empfohlen wegen potentieller Infektionsgefahr bei humanen Proben)

Mikrotiterplatten-Waschgerät (empfohlen)

Photometer für Mikrotiterplatten ("ELISA-Reader"), Filter bei 450 und 620 nm (bzw. ≥590 nm).

TECHNISCHE HINWEISE

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

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

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

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

Standards und Kontrollen

Die Standards **A – G** und Kontrollseren **KS1 & KS2** werden mit dem im Kit enthaltenen Probenpuffer **VP** rekonstituiert. Es empfiehlt sich, zum Rekonstituieren die Reagenzien

15 Minuten bei Raumtemperatur stehen zu lassen und sie anschließend kräftig mit einem Vortex-Mixer zu mischen. Schaumbildung sollte jedoch vermieden werden.

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

Waschpuffer

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

Testplatte

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

Substrat

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

WARNHINWEISE UND VORSICHTSMAßNAHMEN

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

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

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

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

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

Menschliches Serum:

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

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

2-Methyl-4-Isouthiazolin-3-one

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

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

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

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

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

Substratlösung (S)

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

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

Stopplösung (SL)

Die Stopplösung enthält 0,2 N Säure

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

Erste-Hilfe Maßnahmen:

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

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

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

TESTDURCHFÜHRUNG

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

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

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

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

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

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

- 3) Die Vertiefungen der Platte werden mit Klebefolie dicht abgedeckt und **1 Stunde** bei **Raumtemperatur** inkubiert.
- 4) Nach Ablauf der Inkubationszeit werden die Lösungen abgesaugt und die Platte mit **250 µl Waschpuffer WP** / Vertiefung **dreimal** gewaschen.
- 5) Nach dem letzten Waschschrift werden **100 µl Enzymkonjugat EK** in jede Vertiefung pipettiert, **außer A1/A2**.
- 6) Die Vertiefungen der Platte werden mit Klebefolie dicht abgedeckt und **30 min** bei **Raumtemperatur** inkubiert.
- 7) Nach Abschluss dieser Inkubation wird die Platte wie in Schritt 4) beschrieben gewaschen.
- 8) In jede Vertiefung werden **100 µl der Substratlösung S** pipettiert, **auch in A1/A2**.
- 9) Die Platte wird **15 Minuten im Dunkeln** bei **Raumtemperatur** inkubiert.
- 10) Nach Ablauf der Inkubationszeit wird in jede Vertiefung, **auch in A1/A2**, **100 µl Stopplösung SL** pipettiert.
- 11) Die Ausmessung der Farbreaktion erfolgt **innerhalb von 30 Minuten bei 450 nm** (**Referenzfilter ≥ 590 nm, z.B. 620 nm**).

AUSWERTUNG

Berechnung der Standardkurve

Zur Auswertung des Testes sollte gewährleistet sein, dass die Extinktionen des Leerwertes 0,2 Einheiten nicht überschreiten, Standard G sollte dagegen Extinktionen über 1,0 Einheiten erreichen. Proben, die höhere Extinktionen als der Standard G erzielen, liegen außerhalb der Standardkurve, zur sicheren Bestimmung sollten diese Proben in einer zweiten Testdurchführung bei höherer Verdünnung nochmals bestimmt werden.

Die bereitgestellten Standards enthalten folgende hIGFBP-1 Konzentrationen:

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

- 1) Ermittlung des **Mittelwerts** der optischen Dichte des Leerwertes aus den Doppelbestimmungen (Vertiefung A1/A2).
- 2) Von den Mittelwerten der optischen Dichte der Standardkonzentrationen und der Proben wird der mittlere Leerwert abgezogen.
- 3) Die Standardkonzentrationen (x-Achse) werden gegen die gemessene optische Dichte (y-Achse) aufgetragen.
- 4) Die Berechnung der Standardkurve sollte durch ein statistisches Programm erfolgen, da die Kurve i.Allg. nicht ideal durch eine lineare Regression beschrieben wird. **Ein höhergradiges Polynom, 4-Parameter-Anpassungen** oder **nicht-lineare Regression** sind zur Auswertung geeignet, in manchen Fällen kann eine Spline oder Punkt-zu-Punkt Anpassung angebracht sein.
- 5) Die **Multiplikation** der jeweiligen für die Proben berechneten Konzentration mit dem entsprechenden **Verdünnungsfaktor** der Proben ergibt die **Endkonzentration in ng/ml**.

ERWARTUNGSWERTE

Die IGFBP-1 Konzentrationen in humanen Serumproben von 69 gesunden Probanden wurde mit dem Demeditec DEE001 Kit gemessen. Es zeigten sich leichte geschlechtsspezifische Differenzen. Dabei lag die Konzentration aller Proben im Bereich von 0,23 ng/ml bis 17,94 ng/ml (s. Tabelle 5).

Tabelle 5: Erwartungswerte in Serum gesunder Erwachsener

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

PACKAGE INSERT ENGLISH

TECHNICAL FEATURES+APPLICATIONS

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

INTRODUCTION

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

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

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

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

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

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

- **Energy metabolism**

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

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

- **Pregnancy**

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

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

INTENDED USE

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

PERFORMANCE CHARACTERISTICS AND VALIDATION

The Demeditec ELISA for IGFBP-1 DEE001 is a so-called Sandwich-Assay. It utilizes two specific and high affinity antibodies for this protein. The IGFBP-1 in the sample binds to the immobilized first antibody on the microtiter plate. In the following step, the biotinylated and Streptavidin-Peroxidase conjugated second specific anti-IGFBP-1-Antibody binds in turn to the immobilised IGFBP-1. Finally, the bound peroxidase catalyses the substrate reaction resulting in a colored product. Therefore colour intensity is highly specific and quantitatively depending on the IGFBP-1-level of the samples.

The standards of the ELISA DEE001 are **native human IGFBP-1** in concentrations of **0; 0.1; 0.5; 1; 2; 4 and 8 ng/ml**.

The **analytical sensitivity** of the ELISA DEE001 yields **0.02 ng/ml** (equal to **2 pg per well**; 2 SD of zero standard in 22fold determination).

The determination of IGFBP-1 with Demeditec ELISA DEE001 is over a very wide range authentic in dilution. The **linearity of serum dilutions** is over a wide range **excellent** (table 1).

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

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

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

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

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

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

Table 2: Inter-Assay-Variation

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

Table 3: Intra-Assay-Variation

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

The comparison of IGFBP-1 determinations of 35 sera from healthy adults with the Demeditec ELISA DEE001 and another commercially available ELISA yields a very good accordance of absolute concentrations by a **very high correlation**: $y = 1.15x + 0.12$; $r^2 = 0.94$, the comparison with a further commercial ELISA yields, at a likewise **very high correlation**: $y = 3.33x + 3.0$; $r^2 = 0.90$, measured values of approx. one third of the respective concentrations.

SPECIMEN COLLECTION, PREPARATION AND STORAGE

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

Samples should be handled as recommended in general: as fast as possible and chilled as soon as possible. In case there will be a longer period between the sample withdrawal and determination store the undiluted samples frozen -20°C or below in tightly closable plastic tubes. Avoid on principal repeated freeze-thaw cycles of serum/plasma (if required, please subaliquote) although IGFBP-1 levels were found to be unaffected by few cycles(3x) in our experiments.

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

Suggestion for dilution protocol:

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

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

Table 4: Sample matrices, recovery and dilution recommendation

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

n.d.= not determined

REAGENTS PROVIDED

1)	SORB MT	Microtiter plate , ready for use: Microtiter plate with 96 wells, divided up in 12 strips with 8 wells separately breakable, coated with anti-human IGFBP-1 Antibody, packed in a laminate bag.
2)	CAL	Standards A-G , lyophilised, contain native human IGFBP-1. Standard values are between 0 – 8 ng/ml (0; 0.1; 0.5; 1; 2; 4 and 8 ng/ml) IGFBP-1, Standards are reconstituted with 500 µl Dilution Buffer VP each . Use 50 µl pro well in the assay.
3)	DIL BUF	Dilution Buffer VP , 125 ml, ready for use, please use for dilution of samples, control and standards.
4)	CONTROL	Control Sera KS1 and KS2 , 250 µl, lyophilised, contain human Serum and should be reconstituted in 250 µl Dilution Buffer VP each . The IGFBP-1 target values and the respective ranges are given on the vial label. The dilutions should be according to the dilution of the respected samples. Use 50 µl pro well in the assay.
5)	Ab CONJ	Antibody Conjugate AK , 6 ml, contains biotinylated anti-human IGFBP-1 Antibody. Ready for use. Use 50 µl pro well in the assay.
6)	ENZ CONJ	Enzyme Conjugate EK , 12 ml, contains HRP (Horseradish-Peroxidase)-labeled Streptavidin. Ready for use. Use 100 µl pro well in the assay.
7)	BUF WASH 20x	Washing Buffer (WP) , 50 ml, 20 X concentrated solution. Dilute 1:20 with Aqua dest. Attention: After dilution the Washing Buffer is only 4 weeks stable, dilute only according to requirements.
8)	SUB TMB	Substrate (S) , 12 ml, ready for use, horseradish-peroxidase-(HRP)-substrate, stabilised H ₂ O ₂ Tetramethylbencidine. Use 100 µl pro well in the assay
9)	STOP SOLN	Stopping Solution (SL) , 12 ml, ready for use, 0.4 acidic solution, Caution acid! Use 100 µl pro well in the assay
10)		Sealing tape for covering of the microtiter plate, 2 x, adhesive.

MATERIALS REQUIRED BUT NOT PROVIDED

Precision pipettes (100 and 200 µl) Micropipettes and multichannel pipettes with disposable plastic tips
Distilled or Deionized water for dilution of the Washing Buffer (WP)
Vortex-mixer
Device to aspirate the standards and the samples from the wells (recommended because of the potential danger of infection by human samples)
Timer (120 min. range)
Reservoirs (disposable)
Plate washer and plate shaker (recommended)
Calibrated Micro plate reader ("ELISA-Reader") with filter for 450 and 620nm (or ≥ 590 nm)

Technical Recommendations

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

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

Bring all reagents to room temperature (20 - 25 °C) before use. Possible precipitations in the buffers have to be resolved before usage by mixing and / or warming.

Incubation at room temperature means: 20-25 °C

Standards and Controls

For the reconstitution of the lyophilised components (Standards A - G and Control Sera KS1 & KS2) the kit **Dilution Buffer VP** has to be used. It is recommended to keep reconstituted reagents at room temperature for 15 minutes and then to mix them thoroughly but gently (no foam should result) with a Vortex mixer.

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

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

Washing Buffer

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

Substrate Solution

The **Substrate Solution S**, stabilised H₂O₂-Tetramethylbencidine, is photosensitive – store and incubate in the dark.

Microtiterplate

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

WARNINGS AND PRECAUTIONS

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

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

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

Do not use expired reagents.

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

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

Human Serum

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

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

Stop solution contains 0.4 N acidic solution

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

2-Methyl-4-Isothiazolin-3-one

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

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

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

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

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

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

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

General first aid procedures:

Skin contact: Wash affected area thoroughly with water. Discard contaminated cloths and shoes.

Eye contact: In case of contact with eyes, rinse immediately with plenty of water at least 15 minutes.

In order to assure an effectual rinsing spread the eyelids.

Ingestion: If swallowed, wash out mouth thoroughly with water. Immediately see a physician.

Do not eat, drink or smoke in these areas.

Never pipette the materials with the mouth.

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

ASSAY PROCEDURE

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

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

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

- 1) Please pipette in all needed wells, **except A1/A2**, **50 µl Antibody Conjugate AK**.
- 2) Pipette in positions B1/2 **50µl** each **Standard A (0 ng/ml)**,
pipette in positions C1/2 **50µl** each **Standard B (0.1 ng/ml)**,
pipette in positions D1/2 **50µl** each **Standard C (0.5ng/ml)**,
pipette in positions E1/2 **50µl** each **Standard D (1 ng/ml)**,
pipette in positions F1/2 **50µl** each **Standard E (2 ng/ml)**,
pipette in positions G1/2 **50µl** each **Standard F (4 ng/ml)**,
pipette in positions H1/2 **50µl** each **Standard G (8 ng/ml)**.

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

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

- 3) Cover the wells with the sealing tape and incubate the plate for **1 hour** at **room temperature**
- 4) After incubation aspirate the contents of the wells and wash the wells **3 times** with **250 µl Washing Buffer WP**.
- 5) Following the last washing step, pipette **100 µl Enzyme Conjugate EK** in each well, **except A1/A2**.
- 6) Cover the wells with the sealing tape and incubate **30 min** at **room temperature**
- 7) After incubation wash the wells 3 times with **Washing Buffer WP** as described in step 4)
- 8) Pipette **100 µl of the TMB-Substrate solution S** in each well, **also in A1/A2**.
- 9) Incubate the plate for **15 Minutes in the dark** at **room temperature**.
- 10) After incubation pipette **100 µl Stop Solution SL** in each well, **also in A1/A2**.
- 11) Measure the absorbance **within 30 minutes at 450 nm** (Reference filter ≥ 590 nm, e.g. 620 nm).

CALCULATION OF RESULTS

For the evaluation of the assay it is required that the absorbance values of the blank should be below 0.20 and the absorbance of Standard G should be greater than 1.00.

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

Establishing the Standard Curve

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

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

- 1) Calculate the **mean absorbance** value for the blank from the duplicated determination (well A1/A2).
- 2) Subtract the mean absorbance of the blank from the mean absorbances of all other values.
- 3) Plot the standard concentrations on the x-axis versus the mean value of the absorbances of the standards on the y-axis.
- 4) Recommendation: Calculation of the standard curve should be done by using a computer program, because the curve is in general (without respective transformation) not ideally described by linear regression. **A higher-grade polynomial, or four parametric logistic (4-PL) curve fit or non-linear regression** are usually suitable for the evaluation (as might be spline or point-to-point alignment in individual cases).
- 5) The **concentration in ng/ml** of the samples can be calculated **by multiplication** with the respective dilution factor.

EXPECTATION VALUES

Concentrations of IGFBP-1 in human sera of 69 healthy adult donors were determined with the Demeditec ELISA DEE001. Slight gender dependent differences were found, the concentrations of all samples varied from minimal 0.23 ng/ml to maximal 17.94 ng/ml (see table 5).

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

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

LITREATURE / LITERATUR

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

KURZANLEITUNG – DEMEDITEC IGFBP-1 -ELISA DEE001

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

Testdurchführung Doppelbestimmung (Vorschlag):

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

Inkubation: 1 h bei RT, ohne Schütteln

3x 250 µl	Absaugen und die Platte 3x mit je 250 µl Waschpuffer WP / Vertiefung waschen.	In jede Vertiefung
100 µl	Enzym Konjugat EK	In jede Vertiefung, außer A1/A2

Inkubation: 30 min bei RT, ohne Schütteln

3x 250 µl	Absaugen und die Platte 3x mit je 250 µl Waschpuffer WP / Vertiefung waschen	In jede Vertiefung
100 µl	Substrat S	In jede Vertiefung

Inkubation: 15 min im Dunklen bei RT

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

SUMMARY – DEMEDITEC IGFBP-1 ELISA DEE001

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

Assay Procedure for Double Determinations:

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

Incubation: 1 h at RT, without shaking

3x 250 µl	Aspirate the contents of the wells and wash 3x with 250 µl Wash Buffer WP	each well
100 µl	Enzyme Conjugate EK	each well, except A1/A2

Incubation: 30 min at RT, without shaking

3x 250 µl	Aspirate the contents of the wells and wash 3x with 250 µl Wash Buffer WP	each well
100 µl	Substrate S	each well

Incubation: 15 min in the dark RT

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



CAL A-G	A -G	Rec in 500 µl VP	500 µl
Control	KS1, KS2	Rec in 250 µl VP	250 µl
BUF WASH 20x	WP		1:20 DILU A. dest.

SPE + Control 1:16 DIL BUF		50 µl
°C 20-25 °C		
50 µl	AK	B1/2 → End
50 µl	CAL A (0 ng/ml)	B1/2
50 µl	CAL B (0.1 ng/ml)	C1/2
50 µl	CAL C (0.5 ng/ml)	D1/2
50 µl	CAL D (1 ng/ml)	E1/2
50 µl	CAL E (2 ng/ml)	F1/2
50 µl	CAL F (4 ng/ml)	G1/2
50 µl	CAL G (8 ng/ml)	H1/2
50 µl	CONTROL KS1 1:16 ↔	A3/4
50 µl	CONTROL KS2 1:16 ↔	B3/4
50 µl	SPE 1:16 DIL BUF VP (20 µl SPE +300 µl VP) ↔	
TAPE		

1 h **°C** 20-25

3x 250 µl	3x BUF WASH WP	
100 µl	ENZ CONJ EK	B1/2→ End
TAPE		

0.5 h **°C** 20-25

3x 250 µl	3x BUF WASH WP	
100 µl	SUBST TMB S	A1/2→ End

0.25 h **°C** 20-25

100 µl	STOP SOLN SL	A1/2→ End
MEASURE		