

# Product information

Information about other products is available at: [www.demeditec.com](http://www.demeditec.com)



User's Manual

# IGF-I ELISA



DEE020



96 wells

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/ Symboly/ 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 годности/ 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/ Vă rugăm să respectați instrucțiunile de utilizare/ Upoštečajte navodila za uporabo/ Lue käyttöohje huolellisesti!



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



Lot-Batch Number/ Charge-Chargennummer/ Lot-Code du lot/ Lotto-Numero di lotto/ Lote-Código de lote/ Lote-Código do Lote/Lot-Partijnummer/ Lot-Batchkode/ Partisatskod/ Numer serii/ 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/ Tootja/ Κατασκευάζεται από/ Produs de/ Proizvajalec/ Valmistaja



Catalogue Number/ Bestellnummer/ Numéro de référence/Numero di riferimento/ Número de referencia/ Número de Referência/ Referentienummer/ Referencenummer/ 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 rozmezí/ Температурно ограничение/ Säilittä 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/ Contenido suficiente per x test/ Contenido suficiente para x pruebas/ Conteúdo suficiente para x testes/ Bevat voldoende voor x bepalingen/ Indeholder tilstrækkeligt til x prøver/ Innehållet räcker till x analyser/ Zawartość na x testów/ Tartalma x teszt elvégzésére elegendő/ Obsahuje materiál pre x testov / Obsah dostačuje pro x testů/ Съдържание достатъчно за x тестове/ Sisust jätkub x katse jaoks/ Το περιεχόμενο επαρκεί για x δοκιμές/ Conținut suficient pentru x teste/ Vsebina zadostuje za x preizkusov/ Sisältö riittää x testille



Keep away from sunlight/ Nicht dem Sonnenlicht aussetzen/ Conserver à l'abri de la lumière/ Conservare al riparo della luce solare/ No exponer a la luz solar/ Proteger da luz solar/ Niet aan zonlicht blootstellen/ Må ikke udsættes for sollys/ 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 auringonvalolta



Incubation time/ Inkubationszeit/ Temps d'incubation/ Tempo d'incubazione/ Tiempo de incubación/ Tempo de incubação/ incubatietijd/Inkubationstid/ inkubationstid/ Czas inkubacji/ Inkubációs idő/ Inkubačná lehota/ 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/ Разклащане/ Raputada/ Ανακινήστε/ Vibrare/ Stresite/ Sekoita



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

<b>Rec in</b>	Reconstitute in/ Rekonstituieren in/ Reconstituer dans/ Ricostituire nel/ Reconstituir en/ Reconstituir em/ reconstituieren in/ Rekonstituér i/ rekonstituera/ Rekonstituować w/ Helyreállítás/ Znovu pripraviť za/ Znovu připravit za/ Разтваряне в/ Moodustada uuesti / Ανασυστήστε σε/ Reconstituire în/ Predelava v/ rekonstituioti
<b>SPE</b>	Sample/ Probe /Echantillon/ campione/ Muestra/ Amostra/ monster/ Prøve/ prov/ Próbká/ Minta/ Vzorka/ Vzorek/ Проба/ Proov/ Δείγμα/ Probá/ Vzorec/ Näyte
<b>Ab</b>	Antibody and Enzyme Conjugate/ Antikörper und Enzym Konjugat/ anticorps conjuguée et conjugué enzymatique/ Coniugato di anticorpo ed enzima/ Conjugado de anticuerpos y enzimas/ Conjugado Anticorpo-Enzima/ antilichaamen enzymconjugaat/ Antistoffer og enzym-konjugat/ antikropps- och enzymkonjugat (antikropp och enzym, konjugat)/ Koniugat antyciał i enzymów/ Antitest és enzim páros/ Protílátkový a enzymatický konjugát/ Protílátkový a enzymatický konjugát/ Антипяло и энзим конюгат/ Antikehad ja ensüümi konjugaat/ Σύμπλοκο αντισώματος-ενζύμου/ Compuși din anticorpi și enzime/ Antitelesa in konjugat encima/ Vasta-aine ja entsymi konjugaatti
<b>CONJ</b>	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/ späđ i buffert X/ Rozcieńczenie w buforze X/ Hígítás X pufferben/ Riedit' v pufrí X/ Ředit v pufru X/ Разреждане в бyфep X/ Lahjendada puhvrís X/ Αραιώστε σε ρυθμιστικό διάλυμα X/ Diluați în tamponul X/ Razredčiti v pufru X/ Iaimennetaan x puskuriin
<b>DILU X</b>	Standard X/Standard X/ Etalon X/ Standard X/ Estándar X/ Standard X/ standaard X/ Standard X/ Standard X/ Standard X/ Standard X/ Πρότυπο X/ Standard X/ Standardni X/ Kalibraattori X
<b>CAL X</b>	Control Serum / Kontrollserum/ Contôle sérique/ Siero di controllo/ Suero de control/ Soro de Controlo/ controleserum/ Kontrolserum/ Kontrollserum/ Serum kontrolne/ Ellenőrző szérum/ Kontrolné sérum/ Kontrolní sérum/ Kontrolen serum/ Kontrollseerum/ Ορός ελέγχου/Ser de control/ Kontrolni serum/ Kontrollni seerumi
<b>Control</b>	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 plukania koncentrat/ Mosópufer koncentrátum/ Koncentrát vymývacieho pufru/ Концентрат на промивен бyфep/ Pesupuhvi kontsentraat/ Συμπύκνωμα ρυθμιστικού διαλύματος έκπλυσης/ Concentrat pentru tamponul de spălare/ Koncentrat izpiralnega pufru/ Pesuliuositiiviste
<b>WASHBUF 20x</b>	Washing Buffer / Waschpuffer/ Tampon de lavage/ Tampone di lavaggio/ Tampón de lavado/Tampão de Lavagem/ wasbuffer/ Vaskebuffer/ tvättbuffert/ Bufor plukania/ Mosópufer/ Vymývací pufer/ Vymývací pufr/ Промивен бyфep/ Pesupuhver/ Ρυθμιστικό διάλυμα έκπλυσης/ Tampon pentru spălare /Izpiralni pufer/ Pesuliuos
<b>WASHBUF</b>	Substrate/ Substrat/ Substrat/ Substrato/ Substrato/ Substrato/ substraat/ Substrat/ Substrat/ Substrat/ Szubsztrátum/ Substrát/ Substrát/ Субстрат Substraat/ Υπόστρωμα/ Substrat/ Substrat/ Substraattiliuos
<b>SUB TMB</b>	Stop Solution/ Stopp Lösung/ Stop Solution/ Soluzione di stop/ Stop Solución/ Solução Stop/ stopoplossing/ Stopopløsning/ Stopplösning/ Stop roztwór/ Megállító oldat/ Roztok na ukončenie/ Roztok pro ukončeni/ Стопираш разтвор/ Stopp-lahus/ Διάλυμα διακοπής/ Soluție de oprire/ Stop raztopina/ Pysäytysliuos
<b>STOP SOLN</b>	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/ Oblepiť podložku lepiacou páskou/ Olepit podložku lepící páskou/ Плака с лента за запечатване/ Katta plaat isoleerikleepindiga/ Κολλήστε το πλακίδιο με κολλητική ταινία/ Aoperiți placa cu o bandă adezivă/ Prelepiti ploščo/ Peitä mikrotitrauslevyn oheisella teipillä
<b>TAPE</b>	Measure plate within 30 min at 450 nm (Referencefilter ≥590nm)/Ausmessung innerhalb von 30 min bei 450 nm (Referenzfilter ≥ 590 nm)./ Measure lábsorbance en l'espace de 30 min à450 nm avec ≥590nm longueur d'onde pour référence/Misurazione entro 30 min. a 450 nm (filtro di riferimento ≥ 590 nm)./ Medición de la placa dentro de los siguientes 30 min a 450 nm (filtro de referencia ≥ 590nm)/ Medir a placa dentro de 30 min a 450 nm (Filtro de referência ≥590nm)/ Binnen 30 minuten bij 450 nm meten (referentiefilter ≥ 590 nm)./ Mål plade i løbet af 30 min ved nm (referencefilter ≥590nm)/ Mät inom 30 min vid 450 nm (referensfilter ≥ 590 nm)./ Pomiar w ciągu 30 min przy 450 nm (filtr odniesienia ≥ 590 nm)./ Ki méréis 30 percen belül 450 nm-nél (referenciaszűrő ≥ 590 nm)./ Merať 30 minút pri 450 nm/Měřit 30 minut při 450 nm/ Отчитане в рамките на 30 min при 450 nm (референтен филтър ≥ 590 nm)./ Mõõtmise 30 min jooksul 450 nm korral (võrdlusfilter ≥ 590 nm)./ Μέτρηση εντός 30 min στα 450 nm (φίλτρο αναφοράς ≥ 590 nm)./ 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)
<b>MEASURE</b>	Literature/ Literatur/ Bibliographie/ Letterario/ Bibliografía/ Literatura documentação/ literatuur/ Litteratur/ litteratur/ Literatura/ Irodalom/ Literatúra/ Literatura/ Литература// Kirjandus/ Βιβλιογραφία/ Bibliografie/ literatura/ Lähdeluettelo
<b>Literatur</b>	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/ Medzinárodný návod k testu/ Mezinárodní návod k testu/ rahvusvaheline katse kirjeldus/ Διεθνείς οδηγίες για εργαστηριακές δοκιμές/ instrucțiuni internaționale pentru testare/ mednarodna navodila za preizkus/ Kansainvälinen käyttöohje
<b>International Test description</b>	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
<b>End</b>	

## **Vor Gebrauch ist die gesamte Packungsbeilage zu lesen!**

### **Read entire protocol before use**

Symbols/ Symbole /Symboles/ Simboli/ Símbolos/ Símbolos/ Symbolen/ Symboler/ Symboler/ Symbole/ Szimbólumok/ Symboly/ Symboly/ Символи/ Sümbolid/ Σύμβολα/ Simboluri/ Simboli/ Symbolit	2
TECHNISCHE EIGENSCHAFTEN + EINSATZMÖGLICHKEITEN	5
ZUGELASSENER VERWENDUNGSZWECK	5
EINFÜHRUNG	5
Klinische Bedeutung	6
Wissenschaftliche Anwendung	7
Assay Eigenschaften und Validierung	7
TESTPRINZIP	9
Einsatzmöglichkeiten	9
Proben: Eignung, Vorbereitung und Lagerung	9
MATERIALIEN	11
Inhalt der Testpackung	11
Zusätzlich benötigte Materialien	11
TECHNISCHE HINWEISE	11
WARNHINWEISE UND VORSICHTSMAßNAHMEN	13
TESTDURCHFÜHRUNG	14
AUSWERTUNG	14
Berechnung der Standardkurve	14
Referenzwerte	15
EINSCHRÄNKUNGEN	15
TECHNICAL FEATURES+APPLICATIONS	17
Intended Use	17
INTRODUCTION	17
Clinical Significance	18
Scientific Use	19
INTENDED USE	19
PRINCIPLE	20
PERFORMANCE CHARACTERISTICS AND VALIDATION	20
SPECIMEN COLLECTION, PREPARATION AND STORAGE	21
REAGENTS PROVIDED	22
MATERIALS REQUIRED BUT NOT PROVIDED	23
TECHNICAL NOTES	23
STORAGE CONDITIONS	24
WARNINGS AND PRECAUTIONS	24
ASSAY PROCEDURE	26
CALCULATION OF RESULTS	26
Establishing the Standard Curve	27
EXPECTED NORMAL VALUES	27
LIMITATIONS OF PROCEDURE	27
Appendix /Anhang	28
LITREATURE / LITERATUR	29
KURZANLEITUNG – Demeditec IGF-I-ELISA DEE020	32
SUMMARY – DEMEDITEC IGF-I ELISA DEE020	33
<b>REF</b> DEE020            International Test Description	34

## PACKUNGSBEILAGE DEUTSCH

### TECHNISCHE EIGENSCHAFTEN + EINSATZMÖGLICHKEITEN

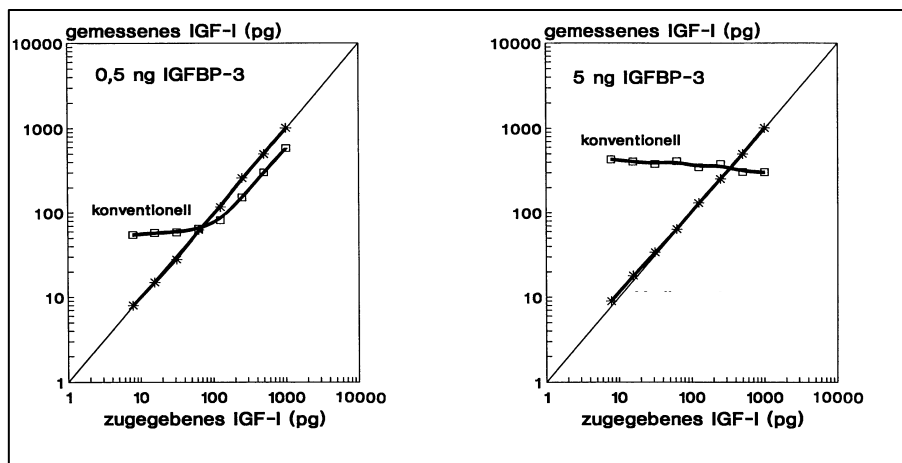
- ◆ Korrekte Messung von IGF-I in **nicht-extrahierten** Proben. Keine physikalische Abtrennung des IGF-I von seinen Bindungsproteinen erforderlich
- ◆ Vermeidung der **Interferenz mit IGF-Bindungsproteinen** durch einen hohen Überschuss an IGF-II
- ◆ Kalibriert am Internationalen Standard der **WHO NIBSC 02/254**
- ◆ **98,7% Wiederfindung** von IGF-I führt zu richtigen Absolutwerten
- ◆ **Sensitivität von 0,09 ng/ml**
- ◆ Inter Assay Varianz von 6,8% und Intra Assay Varianz von 6,7%
- ◆ Kleine Probenvolumina: ideal für junge Patienten und Pädiatrie
- ◆ Für die klinische Anwendung ist **nur eine Probenverdünnung** ausreichend
- ◆ Einfache Methode für die korrekte Messung von IGF-I in Proben mit niedrigem IGF-I und hohem IGFBP-Gehalt

### ZUGELASSENER VERWENDUNGSZWECK

Messung von humanem IGF-I in menschlichem Serum und Plasma.

### EINFÜHRUNG

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



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

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

Um diese Schwierigkeiten zu umgehen, wurde ein einfacher Assay entwickelt, der vor der eigentlichen Messung keine besondere Probenvorbereitung erfordert, abgesehen von einer Ansäuerung oder Verdünnung in einem speziell zusammengesetzten Puffersystem.

### Klinische Bedeutung

Abgesehen von WH beeinflusst eine Anzahl von Faktoren den Serum-IGF-I-Spiegel. Erniedrigte Werte werden bei Malnutrition/Malabsorption, Hypothyreose, Lebererkrankungen, unbehandeltem Diabetes mellitus, chronisch-entzündlichen Erkrankungen (1,6), malignen Erkrankungen oder Polytrauma gefunden. Hohe Spiegel lassen sich bei Pubertas praecox oder Adipositas finden. Entscheidend für die korrekte Interpretation von IGF-I-Bestimmungen ist die Berücksichtigung der Altersabhängigkeit der IGF-I-Spiegel. Es ist sicher unangebracht, für alle Altersgruppen einen allgemeinen Normalbereich festzulegen, dies gilt speziell bei Kindern und Jugendlichen (altersabhängige Normalwerte siehe Tab. 2 und Abb. 3-6).

Auf Grund seiner WH-Abhängigkeit sind Bestimmungen von Serum-IGF-I für die Diagnostik von Wachstumsstörungen von großem Nutzen, speziell im Hinblick auf WH-

Mangel oder Akromegalie (6,16–19,23,24). Der wichtigste Vorteil der IGF-I-Bestimmung im Vergleich zur WH-Bestimmung ist seine stabile zirkadiane Konzentration, d.h. eine Einzelmessung ist ausreichend informativ. IGF-I -Bestimmungen sollten deshalb in der Labordiagnostik an erster Stelle stehen. Eindeutig normale Spiegel schließen eine Störung der WH-IGF-I-Achse aus. Niedrige Spiegel, d.h. Spiegel nahe oder unter der altersbezogenen 5. Perzentile machen weitere diagnostische Schritte notwendig. Subnormale IGF-I-Spiegel können ein Anzeichen für eine eingeschränkte WH-Sekretion sein, falls andere Ursachen für niedriges Serum-IGF-I wie Mangelernährung oder eine beeinträchtigte Leberfunktion ausgeschlossen sind. Für die Unterscheidung von gesunden minderwüchsigen Kindern ohne WH-Mangel von Kindern mit "klassischem" WH-Mangel erwies sich die 0,1. Perzentile als günstige Trenngrenze. Dies gilt speziell ab einem Alter von 8 Jahren. Es muss jedoch angemerkt werden, dass kleinwüchsige Kinder ohne WH-Mangel mit ihren Werten sehr wohl zwischen der 0,1. und 5. Perzentile liegen können (19). Im Gegensatz dazu ist die Akromegalie durch pathologisch erhöhte IGF-I-Spiegel gekennzeichnet, die offensichtlich den Schweregrad der Erkrankung besser reflektieren als WH-Messungen (17,18,20).

### Wissenschaftliche Anwendung

IGF-I findet sich in sehr niedrigen Konzentrationen in verschiedenen Körperflüssigkeiten ebenso wie in konditionierten Zellkulturmedien vieler Zelllinien. Die Bestimmung in diesen Proben ist besonders schwierig. Die Ursache hierfür sind IGFBPs, die oft in größeren Mengen vorhanden sind. Dies erklärt, warum konventionelle Assays, in denen die IGFBPs nicht entfernt werden, falsche IGF-Werte ergeben, die weniger die exakte Konzentration von IGF-I als vielmehr die IGFBP-Konzentration widerspiegeln (Abb. 1) (15, 21). Die niedrigen IGF-I-Konzentrationen erfordern nach der Extraktion oft zusätzliche Schritte, um den Extrakt zu konzentrieren, damit eine ausreichende Sensitivität erreicht wird. Der IGFBP-blockierte EIA umgeht diese Probleme und erlaubt die einfache, korrekte und sensitive IGF-I-Bestimmung in zahlreichen Proben mit minimalem Zeitaufwand.

### Assay Eigenschaften und Validierung

Der Demeditec ELISA für IGF-I DEE020 ist ein sogenannter Sandwich-Assay unter Verwendung zweier spezifischer und hochaffiner Antikörper. Der an die Mikrotiterplatte gekoppelte erste Antikörper bindet das IGF-I aus der Probe. Im nachfolgenden Schritt bindet am derart immobilisierten IGF-I der zweite spezifische anti-IGF-I-Antikörper. Dieser ist biotinyliert und wird durch ein Streptavidin-Peroxidase-Enzymkonjugat gebunden. In der abschließenden Substratreaktion wird hochspezifisch der Farbumschlag katalysiert, quantitativ abhängig vom IGF-I-Gehalt der Proben.

Die Standards des ELISA DEE020 bestehen aus **rekombinantem IGF-I** in Konzentrationen von **2, 5, 15, 30 und 50 ng/ml**, entsprechend umfasst der Messbereich des Testes bei der empfohlenen Normal-Probenverdünnung den Bereich **von 42 bis 1050 ng/ml**. Durch Variation der Probenverdünnung kann dieser natürlich an spezielle individuelle Bedürfnisse angepasst werden.

Die **analytische Sensitivität** des ELISA DEE020 beträgt **0,09 ng/ml** (zweifache Standardabweichung des Null-Standards in 17facher Bestimmung).

Die **Wiederfindung** des rekombinanten IGF-I betrug in einer Serummatrix durchschnittlich 98,67%.

Die **Inter- und Intra-Assay** Variationskoeffizienten sind **kleiner als 6,8% bzw. 6,7%**. Beispielhafte Bestimmungen sind in Tabelle 1 und 2 dargestellt.

**Tabelle 1 :** Inter-Assay-Varianz

	Mittelwert (ng/ml)	Standardabweichung (ng/ml)	VK (%)
<b>Probe 1</b>	174	11,79	6,79
<b>Probe 2</b>	494	11,11	2,25
<b>Probe 3</b>	142	8,68	6,11

**Tabelle 2:** Intra-Assay-Varianz (n=18)

	Mittelwert (ng/ml)	Standardabweichung (ng/ml)	VK (%)
<b>Probe 1</b>	144,8	9,63	6,65
<b>Probe 2</b>	140,79	7,15	5,08
<b>Probe 3</b>	138,02	7,86	5,69

**Tabelle 3:** Verdünnungslinearität (hier: typische Ergebnisse zweier verschiedener Seren)

Verdünnung:	Probe 1 (rekalkuliert, ng/ml)	Verdünnung:	Probe 2 (rekalkuliert, ng/ml)
1:10	137,2	1:10	439,1
1:20	133,5	1:20	500,2
1:40	133,6	1:40	499,2
1:80	134,6	1:80	490,5
1:160	134,4	1:160	494,5
1:320	135,7	1:320	526,4
		1:640	463,69
<b>MW / SA / VK%</b>	134.8 / 1.4 / 1.04	<b>MW / SA / VK%</b>	487.6/ 28.2 / 5.79

MW = Mittelwert, SA = Standardabweichung, VK = Variationskoeffizient

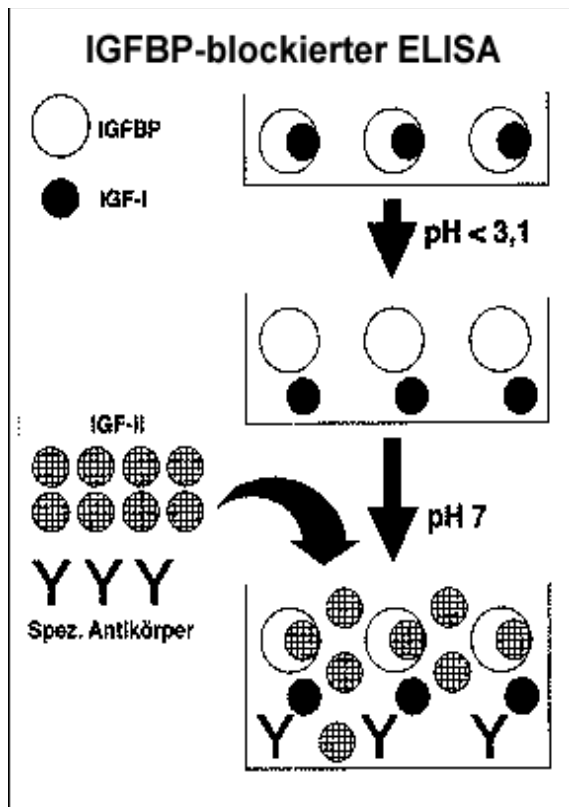
Der Demeditec IGF-I ELISA ist mit der internationalen Standard-Präparation der WHO für IGF-I,  
**WHO NIBSC 02/254** kalibriert (25-26).

### Klinische Validierung

Der Demeditec IGF-I ELISA wurde in Übereinstimmung mit dem Demeditec IGF-I RIA entwickelt. Die klinische Validierung des Radioimmunoassays erfolgte durch Bestimmung der IGF-I-Spiegel bei einer großen Zahl gesunder Kinder und Erwachsener, minderwüchsiger Kinder ohne Wachstumshormonmangel, Mädchen mit Ullrich-Turner-Syndrom, Kindern mit Silver-Russell-Syndrom, Patienten mit WH-Mangel, Kindern mit familiärem Hochwuchs, Sotos-Syndrom, Patienten mit Akromegalie und Kindern mit Pubertas praecox.



## TESTPRINZIP



Um IGF-I von den IGFBPs zu dissoziieren, müssen die Proben in einem sauren Puffer (**Probenpuffer PP**) verdünnt werden (Abb. 2). Die verdünnten Proben werden dann in die Vertiefungen pipettiert, der pH wird dabei neutralisiert. Nach Neutralisation der Probe besetzt das in hohem Überschuss vorhandene IGF-II die IGF-Bindungsstellen der Bindungsproteine. Dies erlaubt die problemlose Messung des nun freien IGF-I. Bei diesem Verfahren werden also nicht die IGFBP-Moleküle per se entfernt, sondern lediglich deren Funktion und damit ihre Interferenz im Assay neutralisiert. Wegen der extrem niedrigen Kreuzreaktivität des IGF-I-Antikörpers mit IGF-II stört der hohe Überschuss an IGF-II die Interaktion mit IGF-I nicht. Im weiteren Verlauf wird der Assay wie ein konventioneller ELISA unter Verwendung eines Streptavidin-Peroxidase-Konjugates fortgeführt.

**Abb. 2.** Prinzip des IGFBP-blockierten ELISA

### Einsatzmöglichkeiten

Dieser ELISA-Kit ist für die wissenschaftliche und diagnostische Messung von IGF-I in humanem Serum oder Plasma, in Zerebrospinalflüssigkeit und in anderen humanen Körperflüssigkeiten oder konditionierten Medien verschiedener humaner Zelllinien geeignet.

Auf Grund der guten Kreuzreaktion der ersten Antikörper mit IGF-I von anderen Säugetierspezies kann der EIA-Kit auch als **Assay** zur Messung von **IGF-I in Primaten, Rind, Schwein, Schaf, Pferd, Esel, Ziege, Hund, Katze, Kaninchen und Meerschweinchen** verwendet werden. Für Bestimmung in Ratte, Maus sowie Huhn ist der Test nicht geeignet.

### Proben: Eignung, Vorbereitung und Lagerung

Geeignet sind Serumproben sowie Heparin-, EDTA- und Citrat-Plasmaproben. Eine eventuelle Verdünnung der Probe durch das Antikoagulans muss berücksichtigt werden. Eine spezielle externe Probenvorbereitung ist nicht nötig. 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 haben in unseren Versuchen jedoch auf die messbare IGF-I Konzentration keine Auswirkungen gehabt. Die hohe Sensitivität des Assays erlaubt IGF-I Messungen in kleinen Probenvolumina. Für die meisten Untersuchungen (Serum- oder Plasmaproben und keine Extremwerte zu erwarten) sollten **Verdünnungen von 1:10 bis 1:50 in Probenpuffer PP geeignet** sein.

Eine Serum- oder Plasma-**Verdünnung von 1:21 ist im Allgemeinen optimal geeignet.**

**Vorschlag Verdünnungsprotokoll:**

200 µl **Probenpuffer PP** in PE-/PP-Gefäße vorlegen (bei größeren Serien empfiehlt sich hierfür die Verwendung eines Multi-Steppers), dazu 10 µl Serum- oder Plasma pipettieren (Proben sind 1:21 verdünnt). Nach dem Mischen werden von dieser Lösung **20 µl pro Bestimmung innerhalb von max. 2 h** im Assay eingesetzt.

Gegebenenfalls kann, je nach erwarteten IGF-I-Werten, geringer oder stärker in Probenpuffer PP verdünnt werden. Achtung: Serum- und Plasmaproben müssen mind. 1:10 in Probenpuffer PP verdünnt werden, um eine ausreichende Ansäuerung der Proben zu erreichen.

Die IGF-I Konzentrationen in anderen humanen Körperflüssigkeiten und in Kulturüberständen können stark von den Serumwerten abweichen.

## MATERIALIEN

### Inhalt der Testpackung

1)	<b>SORB MTP</b>	<b>Mikrotiterplatte</b> , 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 IGF-I beschichtet.
2)	<b>CAL</b>	<b>Standards A-E</b> , lyophilisiert, enthalten rekombinantes humanes IGF-I. Die Standardkurve deckt einen Bereich von <b>2 bis 50 ng/ml</b> (2, 5, 15, 30, 50 ng/ml) IGF-I ab, die einzelnen Standards werden mit je <b>500 µl Probenpuffer PP</b> rekonstituiert. Nach Einsatz im Test müssen die rekonstituierten Standards schnellstmöglich bei $-20^{\circ}\text{C}$ in den Originalgefäßen gelagert werden. Zur weiteren Verwendung dann bitte schnell aber schonend Auftauen (keine Temperaturerhöhung über Raumtemperatur und kein übermäßiges Vortexen), bis zu 3 dieser Einfrier-Auftauzyklen zeigten keinen Einfluss auf den Test. Für den Assay werden jeweils 20 µl pro Vertiefung eingesetzt.
3)	<b>SAM BUF</b>	<b>Probenpuffer PP, 25 ml</b> , gebrauchsfertig, bitte für <b>Rekonstitution</b> von Standards und Kontrollseren KS1+KS2, sowie für <b>Verdünnung</b> von Proben und Kontrollseren verwenden.
4)	<b>Control</b>	<b>Kontrollseren KS1/KS2, 500 µl</b> , lyophilisiert, enthalten humanes Serum und müssen in je <b>500 µl Probenpuffer PP</b> rekonstituiert werden. Nach Einsatz im Test müssen die rekonstituierten Kontrollseren schnellstmöglich bei $-20^{\circ}\text{C}$ im Originalgefäß gelagert werden. Zur weiteren Verwendung dann bitte schnell aber schonend Auftauen (keine Temperaturerhöhung über Raumtemperatur und kein übermäßiges Vortexen), bis zu 3 dieser Einfrier-Auftauzyklen zeigten keinen Einfluss auf den Test. Die IGF-I Soll-Konzentrationen und die Schwankungsbereiche sind auf dem QC-Datenblatt angegeben. Sie sollten im Assay in der gleichen Verdünnung wie die jeweiligen Proben bestimmt werden.
5)	<b>Ab CONJ</b>	<b>Antikörperkonjugat AK, 9 ml</b> , gebrauchsfertig, enthält biotinylierten anti-human IGF-Antikörper. Bitte 80 µl pro Vertiefung einsetzen. <b>ACHTUNG GEBRAUCHSFERTIGE LÖSUNG</b>
6)	<b>ENZ CONJ</b>	<b>Enzymkonjugat EK, 12 ml</b> , gebrauchsfertig, enthält POD (Meerettich-Peroxidase)-markiertes Streptavidin. Bitte 100 µl pro Vertiefung einsetzen. <b>ACHTUNG GEBRAUCHSFERTIGE LÖSUNG!</b>
7)	<b>WASH BUF</b> <b>20x</b>	<b>Waschpuffer WP, 50 ml</b> , 20-fach konzentrierte Lösung, bitte <b>vor Gebrauch 1:20 mit A.dest.</b> 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)	<b>SUB TMB</b>	<b>Substrat, S 12 ml</b> , gebrauchsfertig, Meerettich-Peroxidase-(POD)-Substrat, stabilisiertes $\text{H}_2\text{O}_2$ -Tetramethylbenzidin
9)	<b>STOP SOLN</b>	<b>Stopplösung, SL 12 ml</b> , gebrauchsfertig, 0,4 N saure Lösung
10)		<b>Abdeckfolie</b> für Mikrotiterplatten, 2 Stück, selbstklebend

### Zusätzlich benötigte Materialien

Destilliertes oder entmineralisiertes Wasser zum Verdünnen des Waschpuffers WP  
 Mikropipetten und Mehrkanal-Pipetten mit auswechselbaren Einmalspitzen  
 Vortex-Mischgerät  
 Mikrotiterplattenschüttler (350 rpm)  
 Mikrotiterplattenwasher (empfohlen)  
 Photometer für Mikrotiterplatten ("ELISA-Reader"), Filter bei 450 und  $\geq 590$  nm  
 Polyethylen PE/ Polypropylen PP Röhrchen zum Verdünnen der Proben

### TECHNISCHE HINWEISE

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

Bei sachgemäßer Handhabung ist die **Haltbarkeit der Reagenzien nach Öffnung** nicht beeinträchtigt. Nicht verwendete Streifen der Testplatte sind zusammen mit dem Trockenkissen **luftdicht** bei  $2^{\circ} - 8^{\circ}\text{C}$  zu

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

lagern. **Rekonstituierte Komponenten** (Standards **A – E** und Kontrollseren **KS1/KS2**) sollten bei -20°C aufbewahrt werden, dies verlängert die Haltbarkeit auf mind. 3 Monate. Zur weiteren Verwendung dann bitte schnell aber schonend Auftauen (keine Temperaturerhöhung über Raumtemperatur und kein übermäßiges Vortexen), bis zu 3 dieser Einfrier-Auftauzyklen zeigten keinen Einfluss auf den Test.

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

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

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

Die Substratlösung **S**, stabilisiertes H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>-Tetramethylbenzidin, ist lichtempfindlich–Aufbewahrung und Inkubation bitte vor Licht geschützt.

Bei der **Testdurchführung** sollten Standards **A-E**, Kontrollseren **KS1/KS2** und die jeweiligen Proben möglichst schnell pipettiert werden (z.B. in 15 Minuten). Das Enzymkonjugat **EK** sowie nachfolgend die Substratlösung **S** sollten in der gleichen Reihenfolge und in dem gleichen Zeitintervall auf die Platte zugegeben werden. Ebenso sollte die Stopplösung **SL** in der gleichen Reihenfolge und im gleichen Zeitintervall wie die Substratlösung auf die Testplatte gegeben werden. Dies verhindert Variationen in der Konzentrationsbestimmung durch unterschiedliche Inkubationszeiten.

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

Korrektes Waschen ist von grundlegender Bedeutung für den sicheren, richtigen und präzisen Ablauf des Testes. Ungenügendes Waschen ist eine häufige Ursache für nicht valide Testdurchführungen. Mögliche Folgen sind unkontrollierte unspezifische Variationen der gemessenen optischen Dichten, die zu falschen Ergebnisberechnungen der Proben führen können. Mögliche Hinweise darauf sind z.B. hohe Leerwerte und variabel streuende Messwerte.

Zum Waschen muss der mitgelieferte und auf Gebrauchskonzentration verdünnte Waschpuffer verwendet werden. Das Waschvolumen pro Waschzyklus und Vertiefung muss mindestens 300 µl betragen.

Die mögliche Gefährdung durch den Umgang mit zumindest potentiell infektiösem Material muss beachtet werden.

Bei Gebrauch eines speziellen automatischen Mikrotiterplattenwashers ist unbedingt dessen Gebrauchsanweisung zu befolgen. Die Geräteeinstellungen müssen u.a. der Mikrotiterplattengeometrie und den Parametern der Waschspezifikation angepasst werden. Es ist zu beachten, dass die Dispensier- und Absaugkapillaren des Gerätes nicht die Oberfläche der Vertiefungen der Mikrotiterplatte beschädigen. Die verbleibende Restflüssigkeit nach jedem Absaugen muss minimiert werden. Nach Ende des gesamten Waschvorganges sollte die Menge der verbleibenden Restflüssigkeit überprüft und ggfs. verringert werden durch mehrmaliges Ausklopfen der Mikrotiterplatte auf nicht fuselndem Zellstoff.

Manuelles Waschen ist eine gute Alternativoption. Die Waschflüssigkeit kann dabei per Multistepper, Mehrkanalpipette oder auch mit einer Spritzflasche dispensiert werden. Die Waschflüssigkeit kann durch schwingvolles Ausschwenken der Mikrotiterplatte über einem Becken entfernt werden. Falls Absaugvorrichtungen eingesetzt werden, ist darauf zu achten, dass die Oberflächen der Vertiefungen der Mikrotiterplatte nicht beschädigt werden. Nach jedem einzelnen Waschzyklus sollte die verbleibende Restflüssigkeit durch Ausklopfen der Mikrotiterplatte auf nicht fuselndem Zellstoff gründlich entfernt werden.

## 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 Diagnostics GmbH kann nicht für einen eventuellen Verlust oder Schaden haftbar gemacht werden, der durch Nichtbeachtung der Instruktionen entsteht, soweit keine gesetzliche Regelung anderes besagt.

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

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

Reagenzien aus Kits mit unterschiedlichen Chargen-Nummern sollten nicht vermischt werden.

### Menschliches Serum:

in folgenden Komponenten enthalten: **KS1/ KS2**

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

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

#### **5-chloro-2-methyl-4-isothiazolin-3-one und 2-methyl-4-isothiazolin-3-one**

(w/w) 5-chloro-2-methyl 2H isothiazol-3-one und 2-methyl-2H-isothiazol-3-one

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

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

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

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

### Substratlösung (S)

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

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

### Stopplösung (SL)

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

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

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.

- 1) In **alle** Vertiefungen die benutzt werden, bitte **80 µl Antikörperkonjugat AK** pipettieren.
- 2) In die Positionen A1/2 werden je **20 µl Probenpuffer PP** gegeben, sowie in die Positionen B1/2 werden je **20 µl Standard A (2 ng/ml)** in die Positionen C1/2 je **20 µl Standard B (5 ng/ml)**, in die Positionen D1/2 je **20 µl Standard C (15 ng/ml)**, in die Positionen E1/2 je **20 µl Standard D (30 ng/ml)**, in die Positionen F1/2 je **20 µl Standard E (50 ng/ml)**, Zur Kontrolle der korrekten Durchführung des Tests können je **20 µl** der 1:21 in Probenpuffer **PP** (oder im jeweiligen Verdünnungsverhältnis der Proben) verdünnte **Kontrollen KS1 und KS2** in die Positionen G1/2 bzw. H1/2 gegeben werden.  
In die restlichen Vertiefungen können je **20 µl der verdünnten Proben** (i.a. 1:21 in Probenpuffer **PP** verdünnt) pipettiert werden.
- 3) Die Vertiefungen der Platte werden mit Klebefolie dicht abgedeckt und **1 Stunde** bei **Raumtemperatur** inkubiert (unter Schütteln 350 rpm).
- 4) Nach Ablauf der Inkubationszeit werden die Lösungen abgesaugt und die Platte mit **300 µl Waschpuffer WP** / Vertiefung **fünfmal** gewaschen.
- 5) Nach dem letzten Waschschrift werden **100 µl Enzymkonjugat EK** in jede Vertiefung pipettiert.
- 6) Die Vertiefungen der Platte werden mit Klebefolie dicht abgedeckt und **30 Minuten** bei **Raumtemperatur** inkubiert (unter Schütteln 350 rpm).
- 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.
- 9) Die Platte wird **15 Minuten im Dunkeln** bei **Raumtemperatur** inkubiert.
- 10) Nach Ablauf der Inkubationszeit wird in jede Vertiefung **100 µl Stopplösung SL** pipettiert.
- 11) Die Ausmessung der Farbreaktion erfolgt **innerhalb von 30 Minuten bei 450 nm (Referenzfilter ≥590 nm)**.

## AUSWERTUNG

### Berechnung der Standardkurve

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

Die bereitgestellten Standards enthalten folgende IGF-I-Konzentrationen:

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

Der Umrechnungsfaktor von ng/mL in nmol/L: 0,13074

- 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** .

## Referenzwerte

Die IGF-I-Spiegel sind bei Kindern stark altersabhängig. Bei Erwachsenen bis zu einem Alter von etwa 60 Jahren ist dieses Phänomen weniger ausgeprägt. Die Normalbereiche der verschiedenen Altersgruppen, die log-normal verteilt sind, sind in Tabelle 5 durch Perzentilen angegeben. Zwischen 8 und 19 Jahren sind die Werte für Jungen und Mädchen getrennt aufgeführt, da der Pubertätsgipfel üblicherweise bei Mädchen 2 Jahre früher auftritt. Graphische Darstellungen werden in Abbildungen 3-5 gezeigt. Ein Hauptproblem für die Interpretation von IGF-I-Werten ergibt sich aus der Tatsache, dass Minderwuchs oft auf eine Entwicklungsverzögerung zurückzuführen ist, seltener auf eine metabolische oder endokrine Erkrankung (konstitutionelle Entwicklungsverzögerung). Der scharfe Anstieg der IGF-I-Spiegel während der Pubertät führt deshalb gelegentlich zu falsch subnormalen Werten, wenn die gemessenen IGF-I-Konzentrationen des Patienten auf das chronologische und nicht auf das biologische Alter bezogen werden. Es empfiehlt sich, in einem solchen Fall das Pubertätsstadium in die Betrachtung miteinzubeziehen (Tabelle 4 und Abb. 6 im Anhang), um ein angemessenes Bild von der Situation zu erhalten.

## EINSCHRÄNKUNGEN

IGF-I-Spiegel hängen in erster Linie von der Wachstumshormonsekretion ab. Erniedrigte Werte beweisen jedoch keinesfalls einen Wachstumshormonmangel, da eine Reihe anderer Faktoren die Plasma-Konzentration von IGF-I ebenfalls beeinflussen und deshalb zur korrekten Interpretation in die Betrachtung mit einbezogen werden müssen.

IGF-I-Spiegel nehmen während des Fastens (mehr als 1 Tag), als Ergebnis chronischer Malnutrition, Malabsorption und Kachexie, bei eingeschränkter Leberfunktion, bei Hypothyreose und unbehandeltem Diabetes mellitus ab. Zudem können sie bei systemisch-entzündlichen Erkrankungen und malignen Erkrankungen erniedrigt sein. IGF-I-Spiegel sind erhöht bei vorzeitiger Pubertät. In klinischen Situationen, die mit

Hyperprolaktinämie einhergehen oder bei Patienten mit Craniopharyngeom können gelegentlich trotz bestehenden Wachstumshormonmangels normale Werte auftreten. Während der späten Schwangerschaft sind die IGF-I-Werte mäßig erhöht.



## PACKAGE INSERT ENGLISH

### TECHNICAL FEATURES+APPLICATIONS

- High Specificity for IGF-I
- Correct measurement of IGF-I in **non-extracted** samples. No physical separation of IGF-I from IGF-binding proteins required
- Elimination of **interference by IGF-binding proteins** through excess IGF-II
- Calibration against the WHO International Reference Standard preparation of IGF-I,  
**WHO NIBSC 02/254**
- 98,7 % recovery of recombinant IGF-I leads to correct absolute values
- Precise measurement of very low IGF-I levels: **sensitivity of 0.09 ng/ml**
- Small sample volume requirement, thus ideal for young patients.
- For clinical application: **only one dilution** necessary
- Inter- and Intra-assay variance: 6.8 and 6.7%

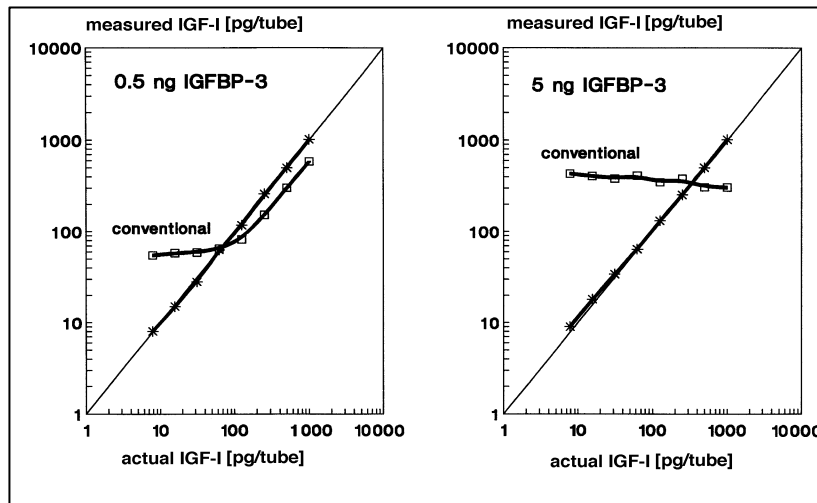
### Intended Use

Measurement of human IGF-I in human serum and plasma samples.

### INTRODUCTION

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

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



**Figure 1.** Interference of IGFBP in IGF-I measurements. Known concentrations of IGF-I were assayed in the presence of 0.5 ng (left) or 5 ng (right) hIGFBP-3 by a conventional (□) and by the IGFBP-blocked assay (\*).

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

### Clinical Significance

There are apart from GH, a number of variables that influence serum IGF-I. Decreased levels are found in states of malnutrition/malabsorption, hypothyroidism, liver disease, untreated diabetes mellitus, chronic inflammatory disease (1,6), malignant disease or polytrauma. High levels, on the other hand, are likely to be present in precocious puberty or obesity. Crucially important to the correct interpretation of IGF-I measurements is the relationship between age and IGF-I levels. It is certainly inadequate to use a common cut-off point to define "normal" levels for all age groups, particularly in children and adolescents.

Due to its GH-dependence, determination of serum IGF-I was shown to be a useful tool in diagnosis of growth disorders, especially with regard to GH deficiency (GHD) or acromegaly (6,16-19,23,24). The major advantage of IGF-I determination compared to GH determination is its stable circadian concentration; therefore a single measurement is sufficient. Hence IGF-I determination should be the first in a series of laboratory test. Clearly normal levels would then rule out disturbances of the GH-IGF-

I-axis. Low levels, i.e. close to or below the age-related 5th percentile would indicate the necessity of further diagnostic efforts. Subnormal levels of IGF-I would be evidence for reduced GH secretion, if other causes of low serum IGF-I (e.g. malnutrition or impaired liver function) can be ruled out. For differentiation of healthy short children without GH deficiency and children with "classical" GH deficiency, the 0.1st percentile proved to be an appropriate cut-off point, especially after the age of eight. However, IGF-I levels of short children not suffering from GHD may nevertheless lay between the 0.1st and 5th percentile (19). In contrast, acromegaly is characterized by pathologically elevated IGF-I levels, which apparently reflect the severity of the disease better than GH-levels (17,18,20).

### **Scientific Use**

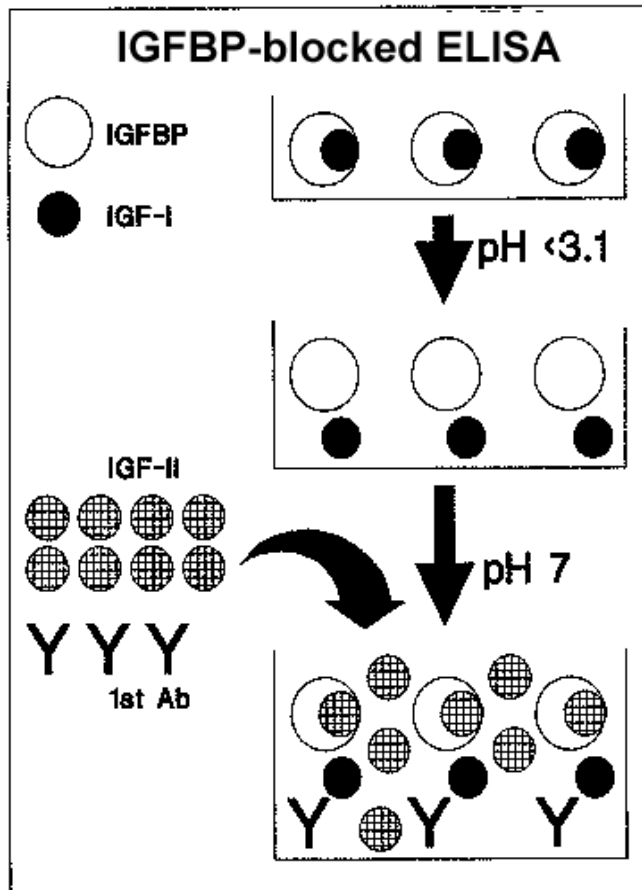
IGF-I is present in low concentrations in various body fluids and in conditioned cell culture media of many cell lines. However, the determination of IGF-I in these specimens is particularly difficult due to the presence of IGFBPs usually in excessive amounts. This explains why conventional assays, in which IGFBPs are not removed, result in incorrect IGF-I values, which reflect more the present amount of IGFBP rather than the exact concentration of IGF-I (Figure 1.) (15,21). The low IGF-I concentrations require often additional efforts after the extraction procedure to concentrate the extract for obtaining a satisfactory sensitivity. The IGFBP-blocked IGF-I ELISA avoids these problems and allows the simple, correct and sensitive IGF-I determination in numerous samples at the same time.

### **INTENDED USE**

This ELISA kit is suitable for the scientific and diagnostic measurement of IGF-I in human serum or plasma, in cerebrospinal fluid and other human body fluids or conditioned media of human cell lines. Due to the high cross-reactivity with IGF-I from other mammalian species, it can also be used as a **assay** for determination of IGF-I in **primates, cattle, pig, sheep, horse, donkey, goat, dog, cat, rabbit and guinea pig**, however for rat, mouse and chicken derived samples the kit is not suited.

## PRINCIPLE

The Demeditec ELISA for IGF-I DEE020 is a so-called Sandwich-Assay. It utilizes two specific and high affinity antibodies for this protein. The IGF-I in the sample binds to the immobilized first antibody on the microtiter plate, the biotinylated and Streptavidin-Peroxidase conjugated second specific anti-IGF-I-Antibody binds in turn to the immobilized IGF-I. In the closing



substrate reaction the turn of the colour will be high specific catalysed, quantitatively depending on the IGF-I-level of the samples.

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

Figure 2: Principle of the IGFBP blocked IGF-I ELISA

## PERFORMANCE CHARACTERISTICS AND VALIDATION

The standards of the ELISA DEE020 are **recombinant IGF-I** in concentrations of **2,5,15,30 and 50 ng/ml**, respectively the assay range covers –at recommended normal sample dilution- the **range from 42 to 1050 ng/ml**. By varying the sample dilution this can be adapted to the special individual requirements.

### Sensitivity

The **analytical sensitivity** of the ELISA DEE020 yields **0.09 ng/ml** (2 SD of zero standard in 17fold determination).

The **Inter-** and **Intra-Assay variation** coefficients are less than 6.8% and 6.7 % respectively. Exemplary determinations are represented in the Table 1 and 2.

**Table 1: Inter-Assay-Variation**

	Mean value (ng/ml)	Standard deviation	VC %
Sample 1	174	11.79	6.79
Sample 2	494	11.11	2.25
Sample 3	142	8.68	6.11

**Table 2: Intra-Assay-Variation (n=18)**

	Mean value (ng/ml)	Standard deviation	VC %
Sample 1	144.8	9.63	6.65
Sample 2	140.79	7.15	5.08
Sample 3	138.02	7.86	5.69

**Linearity**

Dilution:	Sample 1 (recalculated, ng/ml)	Dilution:	Sample 2 (recalculated, ng/ml)
1:10	137.2	1:10	439.1
1:20	133.5	1:20	500.2
1:40	133.6	1:40	499.2
1:80	134.6	1:80	490.5
1:160	134.4	1:160	494.5
1:320	135.7	1:320	526.4
		1:640	463.69
<b>AV / SD / VC%</b>	134.8 / 1.4 / 1.04	<b>AV / SD / VC%</b>	487.6 / 28.2 / 5.79

AV = Average Value , SD = Standard Deviation; VC = Coefficient of Variation

**Recovery**

In different human sera the **recovery** was on average **98.67%** of the hypothetical expected amount.

The Demeditec IGF-I ELISA is calibrated against the WHO International Reference Standard preparation of IGF-I, **WHO NIBSC 02/254** (25-26).

**Validation**

The Demeditec IGF-I ELISA was developed in accordance with the Demeditec IGF-I RIA. The clinical validation of the radioimmunoassay was achieved by determining the IGF-I levels in a large number of normal children and adults, normal short statured children without GH deficiency, girls with Ullrich-Turner syndrome, children with Silver-Russell syndrome, patients with GH deficiency, children with familial tall stature, Sotos syndrome, patients with acromegaly, and children with precocious puberty

**SPECIMEN COLLECTION, PREPARATION AND STORAGE**

Serum samples as well as Heparin-, EDTA- and Citrat-Plasma samples are suited. Possible dilution of the sample by the anticoagulant must be considered.

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 IGF-I levels were found to be unaffected by few cycles in our experiments.

The high sensitivity of the assays allows IGF-I determinations in small sample volumes. For most of the determinations (Serum- or Plasma-Samples and no extreme values expected) the **dilutions of 1:10 to 1:50 in Sample Buffer PP** should be suited. Generally, a dilution of **1:21 is well suited** for serum or plasma samples.

Suggestion for dilution protocol:

Please pipette 200 µl **Sample Buffer PP** in PE/PP-Tubes (application of a multi-stepper is recommended in larger series); subsequently add 10 µl serum or plasma samples (dilution 1:21). After mixing use 20 µl of this dilution per determination within max. 2 h.

If necessary – depending on the expected IGF-I level- it is possible to use higher or lower dilution in **Sample Buffer PP**. Attention: Serum or Plasma samples must be diluted at least 1:10 in Sample Buffer PP in order to achieve the sufficient sample acidification.

IGF-I concentration in other body fluids or cell culture supernatants however could differ strongly.

**REAGENTS PROVIDED**

1)	<b>SORB MTP</b>	<b>Microtiter plate</b> , ready for use: Microtiter plate with 96 wells, divided up in 12 strips with 8 wells separately breakable, coated with anti-human IGF-I Antibody, packed in a laminate bag.
2)	<b>CAL</b>	<b>Standards A-E</b> , lyophilised, contain recombinant human IGF-I. Standard values are <b>between 2 50 ng/ml</b> (2, 5, 15, 30 and 50 ng/ml) IGF-I and have to be reconstituted in <b>500 µl (each) in Sample Buffer PP</b> . After using store the reconstituted standards in the original flasks as soon as possible at –20°C. 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. 20 µl per well are used in the assay
3)	<b>SAM BUF</b>	<b>Sample Buffer PP</b> 25 ml, ready for use, please use for reconstitution of Standards and Controls and for dilution of samples and Controls
4)	<b>Control</b>	<b>Control Serum KS1, KS2</b> , 500 µl, lyophilised, contain human serum and has to be reconstituted in <b>500 µl Sample Buffer PP</b> . The reconstituted Control Sera must be stored in the original flask as soon as possible at –20°C after using. When using 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. The IGF-I target value concentrations and the respective ranges are given on the QC-Certificate. The dilution of the Control Sera should be according to the dilution of the respective samples.
5)	<b>Ab CONJ</b>	<b>Antibody Conjugate AK</b> , 9 ml, ready for use, contains the biotinylated anti-IGF-I antibody. use 80 µl for each well in the assay. <b>ATTENTION: READY FOR USE!</b>
6)	<b>ENZ CONJ</b>	<b>Enzyme Conjugate EK</b> , 12 ml, ready for use, contains horseradisch-peroxidase conjugate to streptavidin, use 100 µl for each well in the assay. <b>ATTENTION: READY FOR USE!</b>
7)	<b>WASHBUF 20x</b>	<b>Washing Buffer (WP)</b> , 50 ml, <b>20X concentrated</b> solution. <b>Washing Buffer (WP)</b> has to be diluted 1:20 with distilled or demineralised water before use (e.g. add the complete contents of the flask (50 ml) into a graduated flask and fill up with A.dest. to 1000 ml). Attention: After dilution the Washing Buffer is only 4 weeks stable, dilute only according to requirements.
8)	<b>SUB TMB</b>	<b>Substrate (S)</b> , 12 ml, ready for use, horseradish-peroxidase-(HRP)-substrate, stabilised H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> Tetramethylbencidine.
9)	<b>STOP SOLN</b>	<b>Stopping Solution (SL)</b> , 12 ml, ready for use, 0.4 N acididc solution, Caution acid!
10)		Sealing tape for covering of the microtiter plate, 2 x, adhesive.

## MATERIALS REQUIRED BUT NOT PROVIDED

Precision pipettes and multichannel pipettes with disposable plastic tips  
Distilled or deionized water for dilution of the Washing Buffer (WP)  
Vortex-mixer  
Microtiter plate shaker (350 rpm)  
Microtiter plate washer (recommended)  
Micro plate reader ("ELISA-Reader") with filter for 450 and  $\geq 590$  nm  
Polyethylene PE/Polypropylene PP tubes for dilution of samples

## TECHNICAL NOTES

### Room temperature incubation means: Incubation at 20 - 25°C.

The microtiter plate and all reagents are stable unopened until the expiry date, if stored in the dark at 2° - 8°C (see label).

The Standards **A – E** and **Control Sera** are reconstituted with the **Sample Buffer PP** provided in the Kit. It is recommended to keep the 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 shelf life of the components after opening is not affected, if used appropriately. Store the unused seal stripes of the microtiter plate together with the desiccant at 2-8°C. Reconstituted Components (**Standards A – E** and **Control Sera**) should be stored at -20°C (or below). Freezing extends the expiry at least 3 months. 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.

The 1:20 diluted Washing Buffer **WP** is only 4 weeks stable. Please dilute only according to daily requirements.

Before use, all kit components should be brought to room temperature. **Precipitates, possible in buffers, should be dissolved before use through mixing and warming.**

The **Substrate Solution S**, stabilised H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>-Tetramethylbenzidine, is photosensitive – store and incubate in the dark.

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

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

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

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

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

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

---

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

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

## STORAGE CONDITIONS

The microtiter plate wells and all undiluted reagents are stable until the expiry date, if stored in the dark at 2-8°C.

Store the unused seal strips and microtiter wells together with the desiccant at 2° to 8°C.

The Substrate Solution (S), stabilised H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>-Tetramethylbenzidine, is photosensitive – store and incubate in the dark.

Store the unused seal stripes of the microtiter plate together with the desiccant at 2-8°C. Reconstituted components (**Standards A – E** and **Control Sera**) should be stored at -20°C. Freezing extends the expiry at least 2 months. When using the Standards or Control Serum KS 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.

## WARNINGS AND PRECAUTIONS

### For In Vitro Diagnostic Use.

#### For professional use only.

Before starting the assay, read the instructions completely and carefully. Use the valid version of the package insert provided with the kit. Be sure that everything is understood.

Before use, all kit components should be brought to **room temperature at 20 - 25°C**. Precipitates in buffers should be dissolved before use by thorough mixing and warming. **Temperature WILL affect the absorbance** readings of the assay. However, values for the patient samples will not be affected.

Reagents from Kits with different lot numbers should not be mixed. Do not use expired reagents.

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

Caution: This kit contains material of human and/or animal origin. Source of human serum for the Control Serum provided in this kit was tested by FDA recommended methods and found non-reactive for Hepatitis-B surface antigen (HBsAg), Hepatitis C virus (HCV), and Human Immunodeficiency Virus 1 and 2 (HIV) antibodies. 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 0.2 M Sulfuric Acid (H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>)

R36/38 Irritating to eyes and skin

S26 In case of contact with eyes, rinse immediately with plenty of water and seek medical advice

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

S36/37 Wear suitable protective clothing and gloves.

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

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

R34 Irritating to eyes and skin

R43 Sensibilisation through skin contact possible

---

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

Phone: +49 (0)431/71922-0 • Fax. +49 (0)431/71922-55

Email: info@demeditec.de • http://www.demeditec.com



S26 In case of contact with eyes, rinse immediately with plenty of water and seek medical advice  
S36/37 Wear suitable protective clothing and gloves  
S45 In case of accident or if you feel unwell seek medical advice

Following components contain < 0.01% (w/w) **5-chloro-2-methyl-4-isothiazolin-3-one and 2-methyl-4-isothiazolin-3-one** as preservative: **AK, EK, PP, WP**

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

**TMB-Substrate (S) contains 3,3',5,5' Tetramethylbenzidine.**

R20/21/R22 Harmful by inhalation, in contact with skin and if swallowed  
R36/37/38 Irritating to eyes, respiratory system and skin  
S26 In case of contact with eyes, rinse immediately with plenty of water and seek medical advice  
S28.1 After contact with skin, wash immediately with plenty of water  
S36/37 Wear suitable protective clothing and gloves

**General first aid procedures:**

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

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

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

Do not eat, drink or smoke in these areas.

Never pipette the materials with the mouth.

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

## 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.

- 1) Add **80 µl Antibody Conjugate AK** in all wells used
- 2) Pipette in positions A1/2 **20 µl Sample Buffer PP**
- 3) Pipette in positions B1/2 **20 µl of the Standard A (2 ng/ml)**,  
pipette in positions C1/2 **20 µl of the Standard B (5 ng/ml)**,  
pipette in positions D1/2 **20 µl of the Standard C (15 ng/ml)**,  
pipette in positions E1/2 **20 µl of the Standard D (30 ng/ml)**,  
pipette in positions F1/2 **20 µl of the Standard E (50 ng/ml)**.  
To control the correct accomplishment of the assay **20 µl** of the 1:21 (or in respective dilution ratio of the samples) in Sample Buffer diluted **Control Sera KS1/KS2** can be pipetted in positions G1/2 and H1/2.  
Pipette **20 µl** each of the diluted samples (e.g. dilute 1:21 with Sample Buffer **PP**)  
In the rest of wells, according to your requirements.
- 4) Cover the wells with sealing tape and incubate the plate for **1 hour** at **room temperature** (shake at 350 rpm)
- 5) After incubation aspirate the contents of the wells and wash the wells **5 times 300 µl Washing Buffer WP** / well.
- 6) Following the last washing step pipette **100 µl** of the **Enzyme Conjugate EK** in each well.
- 7) Cover the wells with sealing tape and incubate the plate for **30 Minutes** at **room temperature** (shake at 350 rpm).
- 8) After incubation wash the wells **5 times** with Washing Buffer **WP** as described in step 5.
- 9) Pipette **100 µl** of the **Substrate Solution S** in each well.
- 10) Incubate the microtiter plate for **15 minutes in the dark** at **room temperature**.
- 11) Stop the reaction by adding **100 µl Stopping Solution SL** to all wells.
- 12) Measure the absorbance within **30 minutes at 450 nm (Reference filter ≥ 590 nm)**.

## CALCULATION OF RESULTS

For the evaluation of the assay it is required that the absorbance values of the blank should be below 0.25, and the absorbance of standard E should be above 1.00. Samples, which yield higher absorbance values than **Standard E**, 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 recombinant hIGF-I:

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

The Conversion factor of ng/mL in nmol/L is 0.13074

- 1) Calculate the **mean absorbance** value for the blank from the duplicated determination (well A1/A2).
- 2) Subtract the mean absorbance of the blank from the mean absorbances of all other values.
- 3) Plot the standard concentrations on the x-axis versus the mean value of the absorbance of the standards on the y-axis.
- 4) Recommendation: Calculation of the standard curve should be done by using a computer program 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**.

## EXPECTED NORMAL VALUES

IGF-I levels are highly age-dependent in children, less so in adults until the age of about 60. The normal ranges in various age groups, which are log-normally distributed, are given in Table 5 by percentiles. Between 8 and 19 years of age, values are given for boys and girls separately, because the pubertal peak usually occurs approximately 2 years earlier in girls. A graphic presentation is shown in Figures 3, 4 and 5. A major problem for the interpretation of IGF-I values arises from the fact that short stature is often due to developmental delay rather than any metabolic or endocrine disorder (constitutional delay of growth and adolescence). The sharp rise in IGF-I levels during puberty may therefore cause some uncertainty as to whether or not it would be appropriate to relate measured values to chronological age. It is recommended to take the pubertal stage into account (Table 4 and Figure 6) to get a more complete picture of this situation.

## LIMITATIONS OF PROCEDURE

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

## Appendix /Anhang

**Table 4:** Normal range of serum IGF-I levels (ng/ml) at different pubertal stages according to Tanner. Because no significant difference between boys and girls is observed, both sexes are combined. Only children and adolescents between 7 and 17 years of age are included.

**Tabelle 4:** Normalbereich der Serum-IGF-I-Spiegel (ng/ml) in verschiedenen Pubertätsstadien nach Tanner. Da zwischen Mädchen und Jungen keine Unterschiede bestanden, wurden jeweils beide Geschlechter zusammengefasst. Lediglich Kinder und Jugendliche zwischen 7 und 17 Jahren wurden betrachtet

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

**Table 5:** Serum levels of IGF-I in healthy subjects at various ages. Individuals between 8 and 19 years of age were classified according to gender, as the pubertal peak occurs almost 2 years earlier in girls than in boys

**Tab.5:** IGF-I Serumkonzentrationen gesunder Probanden in Abhängigkeit vom Alter. zwischen dem 8. und 19. Lebensjahr wurden die Daten nach Geschlecht getrennt ausgewertet, weil bei den Mädchen der Anstieg der Serumkonzentrationen während der Pubertät meistens 2 Jahre früher erfolgt.

Age	Altersgruppe	Percentiles / Perzentilen													
		0,1	1	5	10	20	30	40	50	60	70	80	90	95	99
0-2 y.	0-2 J.	13	20	28	34	43	50	58	66	75	87	102	128	156	220
2-4 y.	2-4 J.	20	29	40	48	59	68	77	87	98	111	129	159	189	260
4-6 y.	4-6 J.	26	36	50	59	73	85	96	108	122	138	160	196	233	320
6-7 y.	6-7 J.	34	46	62	72	87	99	111	124	138	155	176	212	248	332
7-8 y.	7-8 J.	45	60	78	90	107	121	134	148	163	181	205	243	281	364
8-9 y. boys	8-9 J. Jungen	54	71	90	102	119	133	146	160	175	192	214	250	284	362
	Mädchen	55	75	99	115	137	156	174	193	214	239	271	324	376	496
9-10 y. boys	9-10 J. Jungen	63	82	102	115	133	148	162	176	191	209	232	269	304	379
	Mädchen	68	89	114	130	152	170	187	205	224	247	276	323	369	469
10-11 y. boys	10-11 J. Jungen	77	96	117	130	148	162	176	189	203	220	241	274	305	370
	Mädchen	81	106	134	153	178	199	219	239	261	287	321	374	426	539
11-12 y. boys	11-12 J. Jungen	85	106	129	144	163	179	194	209	225	244	267	304	339	413
	Mädchen	91	123	160	185	220	248	276	305	337	374	424	503	581	758
12-13 y. boys	12-13 J. Jungen	88	112	141	159	184	204	223	243	264	289	321	371	419	525
	Mädchen	116	155	201	231	274	309	342	377	415	460	519	614	707	914
13-14 y. boys	13-14 J. Jungen	111	143	179	203	235	261	286	311	339	371	412	477	540	677
	Mädchen	163	207	256	287	329	364	395	428	463	504	556	637	716	884
14-15 y. boys	14-15 J. Jungen	140	182	229	260	303	337	370	404	441	484	539	625	691	896
	Mädchen	193	236	284	314	353	385	414	443	474	510	556	628	713	832
15-16 y. boys	15-16 J. Jungen	176	221	269	299	340	372	402	433	466	504	552	626	697	849
	Mädchen	187	231	279	309	350	382	412	442	474	512	559	632	700	845
16-17 y. boys	16-17 J. Jungen	178	221	267	296	335	366	395	424	455	491	537	607	673	814
	Mädchen	183	225	270	298	336	366	395	424	455	491	537	607	673	792
17-18 y. boys	17-18 J. Jungen	173	207	243	265	294	319	344	369	394	424	455	491	527	618
	Mädchen	176	210	246	268	297	322	347	372	397	427	458	494	533	624
18-19 y. boys	18-19 J. Jungen	167	201	235	256	285	309	333	357	381	409	438	471	512	600
	Mädchen	167	199	233	254	281	305	329	353	377	405	434	467	499	583
19-20 y.	19-20 J.	158	189	220	240	265	285	304	322	341	363	391	433	471	550
20-30 y.	20-30 J.	72	92	115	130	150	167	182	198	215	235	261	302	340	425
30-40 y.	30-40 J.	68	87	109	123	142	158	173	188	204	223	248	287	324	404
40-50 y.	40-50 J.	64	82	103	116	135	150	164	178	194	212	235	272	310	385
50-60 y.	50-60 J.	60	77	97	110	127	142	155	169	184	201	224	260	292	369
60-70 y.	60-70 J.	55	72	91	103	120	134	147	161	176	193	215	251	282	362
70-80 y.	70-80 J.	25	35	47	55	67	78	88	98	110	124	142	173	207	276
>80 y.	>80 J.	21	30	40	47	58	67	76	85	95	108	125	153	184	245

Serum concentrations are given in ng/mL. Determined with IGFBP-blocked IGF-I RIA without extraction step (Blum and Breier 1994),27.

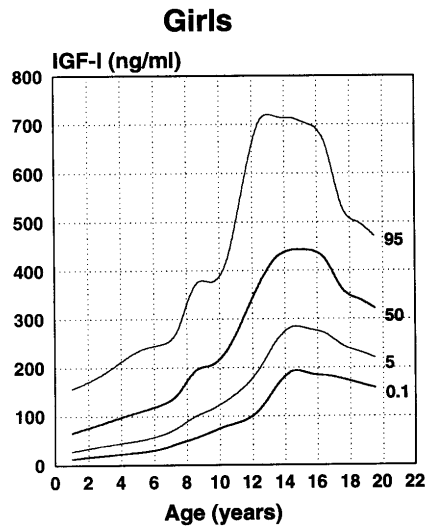


Fig. 3: Age-dependent normal range of serum IGF-I levels in girls

Abb.3: Altersabhängiger Normalbereich der IGF-I Spiegel bei Mädchen. Alter in Jahren

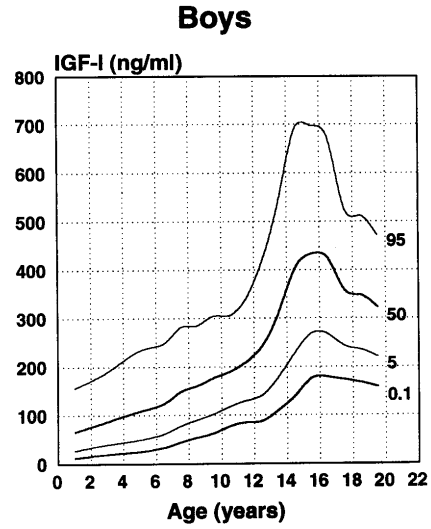


Fig. 4: Age-dependent normal range of serum IGF-I levels in boys

Abb.4: Altersabhängiger Normalbereich der IGF-I Spiegel bei Jungen. Alter in Jahren

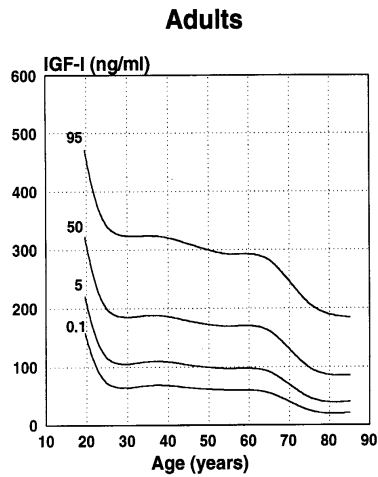


Fig. 5: Age-dependent normal range of serum IGF-I levels in adults

Abb.5: Altersabhängiger Normalbereich der IGF-I Spiegel bei Erwachsenen. Alter in Jahren

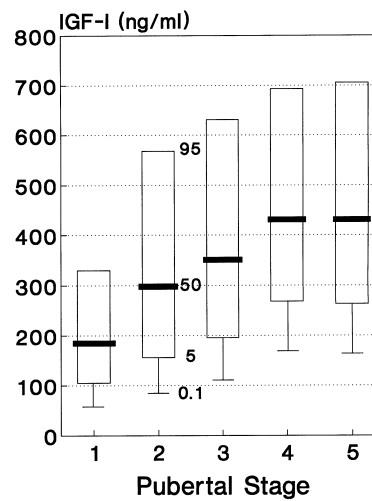


Fig 6.: Serum IGF-I levels in normal children and adolescents (7 to 17 years) according to pubertal stages. Both sexes were included.

## LITREATURE / LITERATUR

- 1) Baxter RC. 1986 The somatomedins: insulin-like growth factors. *Adv Clin Chem.*25:49-115
- 2) Daughaday WH, Rotwein P. 1989 Insulin-like growth factors I and II. Peptide, messenger ribonucleic acid and gene structures, serum, and tissue concentrations. *Endocr Rev.* 10:68-91
- 3) Spencer EM (Ed.) 1991 *Modern Concepts of Insulin-Like Growth Factors.* New York: Elsevier.
- 4) Klapper DG, Svoboda ME, Van Wyk JJ. 1983 Sequence analysis of somatomedin-C: confirmation of identity with insulin-like growth factor-I. *Endocrinology.* 112:2215-2217.
- 5) Rinderknecht E, Humbel RE. 1978 The amino acid sequence of human insulin-like growth factor I and its structural homology with proinsulin. *J Biol Chem.* 253:2769-2276.
- 6) Clemmons DR, Van Wyk JJ. 1984 Factors controlling blood concentration of somatomedin C. *Clin Endocrinol Metab.* 13:113-143.
- 7) Ballard J, Baxter R, Binoux M, et al. 1989 On the nomenclature of the IGF binding proteins. *Acta Endocrinol (Copenh).* 121:751-752.
- 8) Drop SLS. 1992 Report on the nomenclature of the IGF binding proteins. *J. Clin Endocrinol Metab.* 74:1215-1216.
- 9) Martin JL, Baxter RC. 1986 Insulin-like growth factor binding protein from human plasma. Purification and characterization. *J Biol Chem.* 261:8754-8760.
- 10) Binkert C, Landwehr J, Mary JL, Schwander J, Heinrich G. 1989 Cloning, sequence analysis and expression of a cDNA encoding a novel insulin-like growth factor binding protein (IGFBP-2). *EMBO J.* 8:2497-2502.
- 11) Furlanetto RW, Underwood LE, Van Wyk JJ, D'Ercole AJ. 1977 Estimation of somatomedin-C levels in normals and patients with pituitary disease by radioimmunoassay. *J. Clin Invest.* 60:648-657.
- 12) Daughaday WH, Kapadia M, Mariz I. 1987 Serum somatomedin binding proteins: physiologic significance and interference in radioligand assay. *J Lab Clin Med.* 109:355-363.
- 13) Breier BH, Gallaher BW, Gluckman PD. 1991 Radioimmunoassay for insulin-like growth factor-I: solutions to some potential problems and pitfalls. *J Endocrinol.* 128:347-357.
- 14) Daughaday WH, Mariz IK, Blethen SL. 1980 Inhibition of access of bound somatomedin to membrane receptor and immunobinding sites: a comparison of radioreceptor and radioimmunoassay of somatomedin in native and acid-ethanol-extracted serum. *J Clin Endocrinol Metab.* 51:781-788.
- 15) Ranke MB (ed): *Diagnostics of Endocrine Function in Children and Adolescents,* Basel, Karger, 2003, pp 166-199
- 16) Rosenfeld RG, Wilson DM, Lee PDK, Hintz RL. 1986 Insulin-like growth factors I and II in evaluation of growth retardation. *J Pediatr.* 109:428-433.
- 17) Clemmons DR, Van-Wyk JJ, Ridgway EC, Kliman B, Kjellberg RN, Underwood LE. 1979 Evaluation of acromegaly by radioimmunoassay of somatomedin-C. *N.Engl J Med.* 301:1138-1142
- 18) Zapf J, Walter H, Froesch ER. 1981 Radioimmunological determination of insulin-like growth factors I and II in normal subjects and in patients with growth disorders and extrapancreatic tumor hypoglycemia. *J Clin Invest.* 68:1321-1330.
- 19) Blum WF. 1992 Insulin-like growth factors and their binding proteins. In: Ranke MB, ed. *Functional Endocrinologic Diagnostics in Children and Adolescence.* Mannheim: J + J Verlag; 102-117.
- 20) Rieu M, Girard F, Bricaire H, Binoux M. 1982 The importance of insulin-like growth factor (somatomedin) measurements in the diagnosis and surveillance of acromegaly. *J Clin Endocrinol Metab.* 55:147-153.
- 21) Blum WF, Ranke MB, Bierich JR. 1988 A specific radioimmunoassay for insulin-like growth factor II: the interference of IGF binding proteins can be blocked by excess IGF-I. *Acta Endocrinol (Copenh).* 118:374-380.
- 22) Wilson EM, Oh Y, Rosenfeld RG (1997) Generation and characterization of an IGFBP-7 antibody: Identification of 31 kD IGFBP-7 in human biological fluids and Hs578T human breast cancer conditioned media. *J Clin Endocrinol Metab* Vol 82, 4:1301-1303
- 23) Ranke MB, Schweizer R, Elmlinger MW, Weber K, Binder G, Schwarze CP, Wollmann HA (2000) Significance of basal IGF-I, IGFBP-3 and IGFBP-2 measurements in the diagnostics of short stature in children. *Horm Res* 54:60-68
- 24) Ranke MB, Schweizer R, Elmlinger MW, Weber K, Binder G, Schwarze CP, Wollmann HA (2001) Relevance of IGF-I, IGFBP-3 and IGFBP-2 measurements during GH treatment of GH-deficient and non-GH-deficient children and adolescents. *Horm Res* 55:155-124
- 25) Address NIBSC:Blance Lane, South Mimms, Potters Bar, Hertford EN 6 3 QG, Great Britain

- 26) Burns C, Rigsby P, Moore M, Rafferty B. (2009) The first International Standard for Insulin-like Growth Factor-1 (IGF-1) for immunoassay: Preparation and calibration in an international collaborative study. *Growth Hormone & IGF Research* (2009)
- 27) Blum WH, Breier BH (1994) Radioimmunoassays for IGFs and IGF-BPs. *Growth Regulation* 4 (Suppl. 1):11-19
- 28) Ranke MB, Osterziel KJ, Schweitzer R, Schuett B., Weber K., Röbbel P, Vornwald A, Blumenstock G, Elmlinger MB (2003) Reference Levels of Insulin-Like-Growth Factor I in the Serum of Healthy Adults: Comparison of Four Immunoassays. *Clin Chem Lab Med* Vol 41(10):1329-1334

## KURZANLEITUNG – Demeditec IGF-I-ELISA DEE020

Rekonstitution/ Verdünnung von Reagenzien		
<b>Standards A-E</b>	Rekonstitution in Probenpuffer <b>PP</b>	<b>500 µl</b>
<b>Kontrollserum KS1&amp;KS2</b>	Rekonstitution in Probenpuffer <b>PP</b>	<b>500 µl</b>
<b>Waschpuffer WP</b>	verdünnen in <b>A. dest.</b> (z.B. die gesamte Menge von 50 ml im Standzylinder auf 1000 ml auffüllen)	<b>1:20</b>
<b>Proben und Kontrollseren KS1 &amp; KS2: 1:21 in Probenpuffer PP verdünnen, sofort mischen, max. 120 min inkubieren. Davon 20 µl pro Bestimmung einsetzen</b>		
Vor der Testdurchführung alle <b>Reagenzien</b> auf <b>Raumtemperatur</b> bringen.		

### Testdurchführung in Doppelbestimmung

Pipettieren	Reagenzien	Position
80 µl	Antikörperkonjugat <b>AK</b>	in <b>alle</b> benötigten Vertiefungen pipettieren
20 µl	Probenpuffer <b>PP</b> als Leerwert	A1 und A2
20 µl	Standard <b>A (2 ng/ml)</b>	B1 und B2
20 µl	Standard <b>B (5 ng/ml)</b>	C1 und C2
20 µl	Standard <b>C (15 ng/ml)</b>	D1 und D2
20 µl	Standard <b>D (30 ng/ml)</b>	E1 und E2
20 µl	Standard <b>E (50 ng/ml)</b>	F1 und F2
20 µl	Kontrollserum <b>KS1</b>	G1 und G2
20 µl	Kontrollserum <b>KS2</b>	H1 und H2
20 µl	Verdünnte Proben	in Vertiefungen nach Bedarf pipettieren
Mit Klebefolie die Vertiefungen dicht abdecken.		

#### Inkubation: 1 h bei RT, 350 rpm

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

#### Inkubation: 30 min bei RT, 350 rpm

5x 300 µl	Absaugen und die Platte mit <b>300 µl</b> Waschpuffer <b>WP</b> / Vertiefung <b>fünfmal</b> waschen.	In jede Vertiefung
100 µl	Substratlösung <b>S</b>	In jede Vertiefung

#### Inkubation: 15 min im Dunklen bei RT

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



## SUMMARY – DEMEDITEC IGF-I ELISA DEE020

Reconstitution / Dilution of Reagents		
Standards A-E	Reconstitution in <b>Sample Buffer PP</b>	<b>500 µl</b>
Control Serum KS1	Reconstitution in <b>Sample Buffer PP</b>	<b>500 µl</b>
Control Serum KS2	Reconstitution in <b>Sample Buffer PP</b>	<b>500 µl</b>
Wash Buffer WP	dilute in <b>A. dest.</b> (eg. total volume of 50 ml in a graduated flask and fill up to 1000 ml)	<b>1:20</b>
<b>Sample + Control Sera KS1 and KS2: dilute 1:21 in Sample Buffer PP, mix immediately, incubate max. 2h. Use 20 µl for each well in the assay.</b>		
Before conducting the assay equilibrate all <b>reagents to room temperature.</b>		

### Assay Procedure for Double Determinations:

Pipette	Reagent	Position
80 µl	Antibody Conjugate <b>AK</b>	in <b>all</b> wells used
20 µl	Sample Buffer <b>PP</b> (blank)	A1 and A2
20 µl	Standard <b>A (2 ng/ml)</b>	B1 and B2
20 µl	Standard <b>B (5 ng/ml)</b>	C1 and C2
20 µl	Standard <b>C (15 ng/ml)</b>	D1 and D2
20 µl	Standard <b>D (30 ng/ml)</b>	E1 and E2
20 µl	Standard <b>E (50 ng/ml)</b>	F1 and F2
20 µl	Control Serum <b>KS1</b>	G1 and G2
20 µl	Control Serum <b>KS2</b>	H1 and H2
20 µl	Diluted Samples	following wells
Cover the wells with the sealing tape.		

### Incubation: 1 h at RT, 350 rpm

5x 300 µl	Aspirate the contents of the wells and wash <b>5x</b> with <b>300 µl Wash Buffer WP</b>	each well
100 µl	Enzyme Conjugate <b>EK</b>	each well

### Incubation: 30 min at RT, 350 rpm

5x 300 µl	Aspirate the contents of the wells and wash <b>5x</b> with <b>300 µl Wash Buffer WP</b>	each well
100 µl	Substrate <b>S</b>	each well

### Incubation: 15 min in the dark RT

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



<b>CAL</b> A-E	A -E	<b>Rec in</b> 500 µl <b>BUF</b> PP	
<b>Control</b>	KS1&KS2	<b>Rec in</b> 500 µl <b>BUF</b> PP	
<b>WASHBUF</b> 20x	WP		1:20 <b>DILU</b> A. dest.

**SPE** + **Control** 1:21 **SAM** **BUF** PP ↔ ⌚ max. 2 h

°C 20-25 °C

80 µl	<b>Ab CONJ</b>	A1 - End
20 µl	<b>SAM</b> <b>BUF</b> PP	A1/2
20 µl	<b>CAL</b> <b>A</b> Std A (2 ng/ml)	B1/2
20 µl	<b>CAL</b> <b>B</b> Std B (5 ng/ml)	C1/2
20 µl	<b>CAL</b> <b>C</b> Std C (15 ng/ml)	D1/2
20 µl	<b>CAL</b> <b>D</b> Std D (30 ng/ml)	E1/2
20 µl	<b>CAL</b> <b>E</b> Std E (50 ng/ml)	F1/2
20 µl	<b>CONTROL</b> KS 1	G1/2
20 µl	<b>CONTROL</b> KS 2	H1/2
20 µl	<b>SPE</b>	
<b>TAPE</b>		

⌚ 1 h °C 20-25 ↔ 350 rpm

5x 300 µl	5x <b>WASHBUF</b> WP
100 µl	<b>ENZ CONJ</b>
<b>TAPE</b>	

⌚ 0.5 h °C 20-25 ↔ 350 rpm

5 x 300 µl	5x <b>WASHBUF</b> WP
100 µl	<b>SUB</b> <b>TMB</b> S

⌚ 15 min °C 20-25

100 µl	<b>STOP SOLN</b> SL
<b>MEASURE</b>	

