



# IGFBP-3-IRMA

*KIP1171*

---

Version : 230123

Date of issue : 23/01/2023

Revision date: 23/01/2023

# History

---

## Summary of change:

<b>Current Version:</b>
<b>230123</b>
New logo



en

Read entire protocol before use.

# IGFBP-3-IRMA

## I. INTENDED USE

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

## II. GENERAL INFORMATION

- A. Proprietary name : DIAsource IGFBP-3-IRMA Kit
- B. Catalog number : KIP1171 : 96 tests
- C. Manufactured by : DIAsource ImmunoAssays S.A.  
Rue du Bosquet, 2, B-1348 Louvain-la-Neuve, Belgium.

For technical assistance or ordering information contact :  
Tel : +32 (0)10 84.99.11                      Fax : +32 (0)1 84.99.91

## III. CLINICAL BACKGROUND

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

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

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

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

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

#### IV. PRINCIPLES OF THE METHOD

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

#### V. REAGENTS PROVIDED

Reagents	96 Tests Kit	Colour Code	Reconstitution
Tubes coated with anti IGFBP-3(monoclonal antibody)	2 x 48	ivory	<b>Ready for use</b>
Anti-IGFBP-3- $^{125}\text{I}$ (monoclonal antibody) in Tris Maleate buffer with bovine serum, azide (<0.1%) and inert red dye	1 vial 5.5 ml 700 kBq	red	<b>Ready for use</b>
Calibrators 1-5 in Tris HCL buffer with bovine serum albumin and thymol. See exact value on the vial labels.  Calibrators are prediluted	5 vials lyophilised	yellow	<b>Add 1 ml distilled water</b>
Dilution buffer: Tris HCl buffer with bovine albumin and azide (<0.1%)	1 vial 100 ml	green	<b>Ready for use</b>
Wash solution (TRIS-HCl)	1 vial 10 ml	brown	<b>Dilute 70 x with distilled water (use a magnetic stirrer).</b>
Controls - N = 1 or 2 in Tris HCl buffer with human plasma and thymol  Controls are prediluted	2 vials lyophilised	silver	<b>Add 1 ml distilled water</b>

**Note:** use the dilution buffer as zero calibrator.

#### VI. SUPPLIES NOT PROVIDED

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

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

#### VII. REAGENT PREPARATION

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

#### VIII. STORAGE AND EXPIRATION DATING OF REAGENTS

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

#### IX. SPECIMEN COLLECTION AND PREPARATION

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

#### X. PROCEDURE

##### A. Handling notes

Do not use the kit or components beyond expiry date.  
Do not mix materials from different kit lots.  
Bring all the reagents to room temperature (18-25°C) prior to use.  
Thoroughly mix all reagents and samples by gentle agitation or swirling.  
Use a clean disposable pipette tip for addition of each different reagent and sample in order to avoid cross-contamination. High precision pipettes or automated pipetting equipment will improve the precision.  
Respect the incubation times.  
Prepare a calibration curve for each run, do not use data from previous runs.

##### B. Procedure

1. Label one plain plastic tube for each sample.
2. Dispense 1 ml of Dilution Buffer into each tube.
3. Add 10  $\mu\text{l}$  of sample into these tubes.
4. Label coated tubes in duplicate for each calibrator, sample and control. For the determination of total counts, label 2 normal tubes.
5. Briefly vortex calibrators, controls and pre-diluted samples and dispense 100  $\mu\text{l}$  of each into the respective tubes (use the dilution buffer as zero calibrator).
6. Dispense 50  $\mu\text{l}$  of  $^{125}\text{I}$ odine labelled anti IGFBP-3 into each tube, including the uncoated tubes for total counts.
7. Incubate for 120 minutes at room temperature (18-25°C) on a tube shaker (400 rpm).
8. Aspirate (or decant) the content of each tube (except total counts). Be sure that the plastic tip of the aspirator reaches the bottom of the coated tube in order to remove all the liquid.
9. Wash tubes with 2 ml Working Wash solution (except total counts) and aspirate (or decant). Avoid foaming during the addition of the Working Wash solution.
10. Wash tubes again with 2 ml Wash solution (except total counts) and aspirate (or decant).
11. Let the tubes stand upright for two minutes and aspirate the remaining drop of liquid.
12. Count tubes in a gamma counter for 60 seconds.

#### XI. CALCULATION OF RESULTS

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

## XII. TYPICAL DATA

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

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

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

## XIII. PERFORMANCE AND LIMITATIONS

### A. Detection limit

The limit of Blank (LOB), limit of Detection (LOD) and the limit of Quantification (LOQ), were determined in accordance with the CLSI guideline EP17-A.

The LOB was calculated by measuring the blank several times and calculating the 95<sup>th</sup> percentile of the distribution of the tests values. The LOB was calculated to be 27.9 ng/ml.

The LOD was calculated as described in the guideline. The LOD was calculated to be 61.63 ng/ml.

The LOQ was calculated by testing 4 samples of low value 10 times in different tests. The LOQ was calculated to be 123.1 ng/ml with CV of 20%.

### B. Specificity

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

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

### C. Precision

#### INTRA-ASSAY PRECISION

Serum	N	$\bar{X} \pm SD$ (ng/ml)	CV (%)	Serum	N	$\bar{X} \pm SD$ (ng/ml)	CV (%)
A	20	1647 ± 76	4.6	A	10	1708 ± 32	1.8
B	20	4443 ± 211	4.8	B	10	4426 ± 18	3.1

SD: Standard Deviation; CV: Coefficient of variation

### D. Accuracy

#### DILUTION TEST

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

Samples were diluted with Dilution Buffer

#### RECOVERY TEST

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

### E. Time delay between last calibrator and sample dispensing

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

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

### F. Hook Effect

No high dose Hook effect was observed with IGFBP-3 concentration up to 600000 ng/ml. A sample spiked with IGFBP-3 up to 600000 ng/ml gives higher cpm's than the last calibrator point.

## XIV. LIMITATIONS

- Specimens from patients who have received preparations of mouse monoclonal antibodies for diagnosis or therapy may contain human anti-mouse antibodies (HAMA). Such specimens may show either falsely elevated or depressed values when tested with assay kits which employ mouse monoclonal antibodies.
- Heterophilic antibodies in human serum can react with reagent immunoglobulins, interfering with in vitro immunoassays. Patients routinely exposed to animals or animal serum products can be prone to this interference and anomalous values may be observed in case of the presence of heterophelic antibodies. Carefully evaluate the results of patients suspected of having these antibodies.
- If results are not consistent with other clinical observations, additional information should be required before diagnosis.

## XV. INTERNAL QUALITY CONTROL

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

## XVI. REFERENCE INTERVALS

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

Normal subjects

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

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

## XVII. PRECAUTIONS AND WARNINGS

### Safety

For *in vitro* diagnostic use only.

This kit contains  $^{125}\text{I}$  (half-life: 60 days), emitting ionizing X (28 keV) and  $\gamma$  (35.5 keV) radiations.

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

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

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

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

Avoid any skin contact with reagents (sodium azide as preservative). Azide in this kit may react with lead and copper in the plumbing and in this way form highly explosive metal azides. During the washing step, flush the drain with a large amount of water to prevent azide build-up.

Do not smoke, drink, eat or apply cosmetics in the working area. Do not pipette by mouth. Use protective clothing and disposable gloves.

## XVIII. BIBLIOGRAPHY

1. LEROITH D., BONDY C., YAKAR S., LIU JL., BUTLER A.  
**The somatomedin hypothesis : 2001.**  
Endocr Rev 2001; 22:53-74.
2. POLLAK MN., SCHERNHAMMER ES., HANKINSON SE.  
**Insulin-like growth factors and neoplasia.**  
Nat Rev Cancer 2004; 4:505-518.
3. YUEN K., FRYSTYK J., UMPLEBY M., FRYKLUND L., DUNGER D.  
**Changes in free rather than total insulin-like growth factor-I enhance insulin sensitivity and suppress endogenous peak growth hormone (GH) release following short-term low dose GH administration in young healthy adults.**  
J Clin Endocrinol Metab 2004; 89:3956-3964.
4. KHANDWALA HM., McCUTCHEON IE., FLYVBJERG A., FRIEND KE.  
**The effects of insulin-like growth factors on tumorigenesis and neoplastic growth.**  
Endocr Rev 2000; 21:215-244.
5. RENEHAN AG., ZWAHLEN M., MINDER PC., O'DWYSER ST., SHALET PS., EGGER PM.  
**Insulin-like growth factor (IGF)-I, IGF binding protein-3, and cancer risk : systematic review and meta-regression analysis.**  
The Lancet 2004; 363:1346-1353.
6. JUUL A., SCHEIKE T., DAVIDSEN M., GYLLENborg J., JORGENSEN T.  
**Low serum insulin-like growth factor I is associated with increased risk of ischemic heart disease : a population-based case-control study.**  
Circulation 2002; 106:939-944.
7. SANDHU MS., HEALD AH., GIBSON JM., CRUICKSHANK JK., DUNGER DB., WAREHAM NJ.  
**Circulating concentrations of insulin-like growth factor-I and development of glucose intolerance : a prospective observational study.**  
The Lancet 2002; 359:1740-1745.
8. VAESSEN N., HEUTINK P., JANSSEN JA., WITTEMAN JC., TESTERS L., HOFMAN A., LAMBERTS SW., OOSTRA BA., POLS HA., VAN DUIJN CM.  
**A polymorphism in the gene for IGF-I : functional properties and risk for type 2 diabetes and myocardial infarction.**  
Diabetes 2001; 50:637-642.
9. JUUL A.  
**Serum levels of insulin-like growth factor-I and its binding proteins in health and disease.**  
Growth Horm IGF Res 2003; 13:113-170
10. FIRTH SM., BAXTER RC.  
**Cellular actions of the insulin-like growth factor binding proteins**  
Endocr Rev 2002; 23:824-854.
11. BAXTER RC., MEKA S., FIRTH SM.  
**Molecular distribution of IGF binding protein-5 in human serum.**  
J Clin Endocrinol Metab 2002; 87:271-276.
12. RICORT JM.  
**Insulin-like growth factor binding protein (IGFBP) signaling.**  
Growth Horm IGF Res 2004; 14:277-286.
13. JONES JI., CLEMMONS DR.  
**Insulin-like growth factors and their binding proteins : biological actions.**  
Endocr Rev 1995; 16:3-34.
14. ALI O., COHEN P., LEE KW.  
**Epidemiology and biology of insulin-like growth factor binding protein-3 (IGFBP-3) as an anti-cancer molecule.**  
Horm Metab Res 2003; 35:726-733.
15. CHAN SS., TWIGG SM., FIRTH SM., BAXTER RC.  
**Insulin-like growth factor binding protein-3 leads to insulin resistance in adipocytes.**  
J Clin Endocrinol Metab 2005; 90:6588-6595.
16. JUUL A., MAIN K., BLUM WF., LINDHOLM J., RANKE MB., SKAKKEBAEK NE.  
**The ration between serum levels of insulin-like growth factor (IGF)-I and the IGF binding proteins (IGFBP-1, 2 and 3) decreases with age in healthy adults and is increased in acromegalic patients.**  
Clin Endocrinol (Oxf) 1994; 41:85-93.
17. BLUM WF., ALBERTSSON-WIKLAND K., ROSBERG S., RANKE MB.  
**Serum levels of insulin-like growth factor I (IGF-I) and IGF binding protein 3 reflect spontaneous growth hormone secretion.**  
J Clin Endocrinol Metab 1994; 76:1610-1616.
18. FRYSTYK J., IVARSEN P., SKJAERBAEK C., FLYVBJERG A., PEDERSEN EB., ORSKOV H.  
**Serum-free insulin-like growth factor I correlates with clearance in patients with chronic renal failure.**  
Kidney Int 1999; 56:2076-2084.
19. FRYSTYK J.  
In Endocrinology and Metabolism – Clinics of North America 2005 : Endocrinology of aging, Chapter XI : Aging somatotropic axis mechanisms and implications of IGFBP adaptation.

**XIX. SUMMARY OF THE PROTOCOL**

	TOTAL COUNTS µl	CALIBRATORS CONTROLS µl	SAMPLE(S) µl
<b>DILUTION SAMPLE(S)</b>			
Dilution Buffer	-	-	1000
Sample	-	-	10
Shaking	Vortex		
<b>INCUBATION</b>			
Calibrators (0 to 5), controls	-	100	-
Diluted Samples	-	-	100
Tracer	50	50	50
Incubation	120 minutes at room temperature (18-25°C) with shaking at 400 rpm		
Separation	-	Aspirate (or decant)	
Working Wash solution		2 ml	
Separation		Aspirate (or decant)	
Working Wash solution		2 ml	
Separation		Aspirate (or decant)	
Counting	Count tubes for 60 seconds		

Other translations of this Instruction for Use can be downloaded from our website: <https://www.diasource-diagnostics.com/>

Lire entièrement le protocole avant utilisation.

## IGFBP-3-IRMA

### I. BUT DU DOSAGE

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

### II. INFORMATIONS GENERALES

- A. **Nom du produit :** DIAsource IGFBP-3-IRMA kit
- B. **Numéro de catalogue :** KIP1171: 96 tests
- C. **Fabriqué par :** DIAsource ImmunoAssays S.A.  
Rue du Bosquet, 2, B-1348 Louvain-la-Neuve, Belgium.

**Pour une assistance technique ou une information sur une commande :**

**Tel : +32 (0)10 84.99.11      Fax : +32 (0)10 84.99.91**

### III. CONTEXTE CLINIQUE

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

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

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

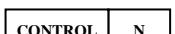
Au départ, on pensait que les IGFBP servaient de protéines de liaison de l'IGF, stabilisant les taux plasmatiques d'IGF et contrôlant la sortie de l'IGF de la circulation vers le compartiment extravasculaire. De plus, on a supposé que le complexe IGFBP-IGF était biologiquement plus ou moins inactif,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

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

#### IV. PRINCIPE DU DOSAGE

L'IGFBP-3-IRMA de DIAsource est un dosage immunoradiométrique basé sur un tube tapissé d'anticorps. Le Mab1, l'anticorps de capture, est adsorbé sur la surface inférieure et intérieure du tube en plastique. Les calibrateurs et les échantillons ajoutés aux tubes montreront d'abord une faible affinité pour les Mab1. L'addition de Mab2, l'anticorps de signal marqué à l'<sup>125</sup>I, complétera le système et déclenchera la réaction immunologique. Après lavage, la réactivité restante liée aux tubes reflète la concentration en antigènes.

#### V. REACTIFS FOURNIS

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

**Note:** utiliser le tampon de dilution comme calibrateur zéro.

#### VI. MATERIEL NON FOURNI

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

1. Eau distillée
2. Pipettes pour distribuer: 10 µl, 50 µl, 100 µl et 1 ml (l'utilisation de pipettes précises et de pointes jetables en plastique est recommandée)
3. Tubes en plastique pour la dilution des échantillons
4. Agitateur vortex
5. Agitateur magnétique
6. Agitateur de tubes (400rpm)
7. Serigraphe automatique de 5 ml (type Cornwall) pour les lavages
8. Système d'aspiration (optionnel)
9. Tout compteur gamma capable de mesurer l'<sup>125</sup>I peut être utilisé (rendement minimum 70%).

#### VII. PREPARATION DES REACTIFS

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

#### VIII. STOCKAGE ET DATE D'EXPIRATION DES REACTIFS

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

#### IX. PREPARATION ET STABILITE DE L'ECHANTILLON

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

#### X. MODE OPERATOIRE

##### A. Notes de manipulation

Ne pas utiliser la trousse ou ses composants après avoir dépassé la date d'expiration. Ne pas mélanger du matériel provenant de trousse de lots différents. Mettre tous les réactifs à température ambiante (18-25°C) avant utilisation.  
Mélanger tous les réactifs et les échantillons sous agitation douce. Pour éviter toute contamination croisée, utiliser une nouvelle pointe de pipette pour l'addition de chaque réactif et échantillon.  
Des pipettes de haute précision ou un équipement de pipetage automatique permettent d'augmenter la précision. Respecter les temps d'incubation. Préparer une courbe de calibration pour chaque nouvelle série d'expériences, ne pas utiliser les données d'expériences précédentes.

##### B. Mode opératoire

1. Étiqueter un tube ordinaire en plastique pour chacun des échantillons.
2. Distribuer 1 ml de tampon de dilution à chacun des tubes.
3. Ajouter 10 µl d'échantillons dans ces tubes.
4. Identifier les tubes tapissés d'anticorps fournis dans la trousse, en double pour chaque calibrateur, échantillon, contrôle. Pour la détermination de l'activité totale, identifier 2 tubes non tapissés d'anticorps.
5. Agiter au vortex brièvement les calibrateurs, les échantillons prédilués et les contrôles. Puis distribuer 100 µl de chacun d'eux dans leurs tubes respectifs. (utiliser le tampon de dilution comme calibrateur zéro)
6. Ajouter 50 µL de traceur dans chaque tube à l'exception des ceux servant au comptage total.
7. Incuber pendant 120 minutes à température ambiante (18-25°C) sous agitation continue (400 rpm).
8. Aspirer (ou décanter) le contenu de chaque tube (à l'exception des tubes utilisés pour la détermination de l'activité totale). Assurez-vous que la pointe utilisée pour aspirer le liquide des tubes atteint le fond de chacun d'eux pour éliminer toute trace de liquide.
9. Laver les tubes avec 2 ml de Solution de Lavage (à l'exception des tubes utilisés pour la détermination de l'activité totale) et aspirer. Eviter la formation de mousse pendant l'addition de la Solution de Lavage.
10. Laver les tubes à nouveau avec 2 ml de Solution de Lavage (à l'exception des tubes utilisés pour la détermination de l'activité totale) et aspirer (ou décanter).
11. Après le dernier lavage, laisser les tubes droits pendant 2 minutes et aspirer (ou décanter) le reste de liquide.
12. Placer les tubes dans un compteur gamma pendant 60 secondes pour quantifier la radioactivité.

#### XI. CALCUL DES RESULTATS

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

## XII. DONNEES TYPES

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

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

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

## XIII. PERFORMANCE ET LIMITES DU DOSAGE

### A. Sensibilité

La limite de blanc (LOB), la limite de détection (LOD) et la limite de quantification (LOQ) ont été déterminées conformément à la directive EP17-A du CLSI.

La LOB a été calculée en mesurant le blanc plusieurs fois et en calculant le 95e centile de la distribution des valeurs de test. La LOB a été calculée à 27,9 ng/ml.

La LOD a été calculée comme décrite dans la directive. La LOD a été calculée à 61,63 ng/ml.

La LOQ a été calculée en testant 4 échantillons de faible valeur 10 fois dans différents tests. La LOQ a été calculée à 123,1 ng/ml avec un CV de 20%.

### B. Spécificité

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

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

### C. Précision

INTRA-ESSAI			INTER-ESSAIS				
Sérum	N	$\bar{X} \pm SD$ (ng/ml)	CV (%)	Sérum	N	$\bar{X} \pm SD$ (ng/ml)	CV (%)
A	20	1647 ± 76	4.6	A	10	1708 ± 32	1.8
B	20	4443 ± 211	4.8	B	10	4426 ± 18	3.1

SD : Déviation Standard; CV: Coefficient de variation

### D. Exactitude

#### TEST DE DILUTION

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

Les échantillons sont dilués avec le tampon de dilution.

#### TEST DE RECUPERATION

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

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

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

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

### F. Effet Hook

Aucun effet Hook à haute dose n'a été observé avec une concentration de IGFBP-3 allant jusqu'à 600 000 ng / ml. Un échantillon enrichi en IGFBP-3 jusqu'à 600 000 ng / ml donne des cpm plus élevés que le dernier point d'étalonnage.

## XIV. LIMITATIONS

- Les échantillons de patients ayant reçu des préparations d'anticorps monoclonaux de souris pour un diagnostic ou comme traitement peuvent contenir des anticorps humains anti-souris (HAMA). De tels échantillons peuvent montrer des valeurs soit faussement élevées soit faussement basses lorsqu'ils sont analysés avec des trousseuses d'analyses utilisant des anticorps monoclonaux de souris.
- Des anticorps hétérophiles dans le sérum humain peuvent réagir avec le réactif immunoglobulines, interférant ainsi avec les méthodes d'analyse immunologiques *in vitro*.
- Les patients couramment en contact avec des animaux ou des produits de sérum animal peuvent être sujets à ces interférences. Des valeurs anormales peuvent être observées en cas de présence d'anticorps hétérophiles. Évaluer soigneusement les résultats des patients suspectés d'avoir ces anticorps.
- Si les résultats ne sont pas cohérents avec les autres observations cliniques, des informations supplémentaires doivent être demandées avant de poser le diagnostic.

## XV. CONTROLE DE QUALITE INTERNE

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

## XVI. VALEURS ATTENDUES

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

### Sujets normaux

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

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

## XVII. PRECAUTIONS ET AVERTISSEMENTS

### Sécurité

Pour utilisation en diagnostic *in vitro* uniquement.

Cette trousse contient de l'<sup>125</sup>I (demi-vie: 60 jours), une matière radioactive émettant des rayonnements ionisants X (28 keV) et  $\gamma$  (35,5 keV).

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

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

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

Les composants de sang humain inclus dans ce kit ont été évalués par des méthodes approuvées par l'Europe et/ou la FDA et trouvés négatifs pour HBsAg, l'anti-HCV, l'anti-HIV-1 et 2. Aucune méthode connue ne peut offrir l'assurance complète que des dérivés de sang humain ne transmettront pas d'hépatite, le sida ou toute autre infection. Donc, le traitement des réactifs, du sérum ou des échantillons de plasma devra être conforme aux procédures locales de sécurité. Tous les produits animaux et leurs dérivés ont été collectés d'animaux sains. Les composants bovins proviennent de pays où l'ESB n'a pas été détectée. Néanmoins, les composants contenant des substances animales devront être traités comme potentiellement infectieux.

L'azoture de sodium est nocif s'il est inhalé, avalé ou en contact avec la peau (l'azoture de sodium est utilisé comme agent conservateur). L'azoture dans cette trousse pouvant réagir avec le plomb et le cuivre dans les canalisations et donner des composés explosifs, il est nécessaire de nettoyer abondamment à l'eau le matériel utilisé.

Ne pas fumer, ni boire, ni manger ni appliquer de produits cosmétiques dans les laboratoires où des produits radioactifs sont utilisés. Ne pas pipeter avec la bouche. Utiliser des vêtements protecteurs et des gants à usage unique.

## XVIII. BIBLIOGRAPHY

1. LEROITH D., BONDY C., YAKAR S., LIU JL., BUTLER A.  
**The somatomedin hypothesis : 2001.**  
Endocr Rev 2001; 22:53-74.
2. POLLAK MN., SCHERNHAMMER ES., HANKINSON SE.  
**Insulin-like growth factors and neoplasia.**  
Nat Rev Cancer 2004; 4:505-518.
3. YUEN K., FRYSTYK J., UMPLEBY M., FRYKLUND L., DUNGER D.  
**Changes in free rather than total insulin-like growth factor-I enhance insulin sensitivity and suppress endogenous peak growth hormone (GH) release following short-term low dose GH administration in young healthy adults.**  
J Clin Endocrinol Metab 2004; 89:3956-3964.
4. FREBOURG T., BERCOFF E., MANCHON N., SENANT J., BASUYAU J.-P., KHANDWALA HM., McCUTCHEON IE., FLYVBJERG A., FRIEND KE.  
**The effects of insulin-like growth factors on tumorigenesis and neoplastic growth.**  
Endocr Rev 2000; 21:215-244.
5. RENEHAN AG., ZWAHLEN M., MINDER PC., O'DWYSER ST., SHALET PS., EGGER PM.  
**Insulin-like growth factor (IGF)-I, IGF binding protein-3, and cancer risk : systematic review and meta-regression analysis.**  
The Lancet 2004; 363:1346-1353.
6. JUUL A., SCHEIKE T., DAVIDSEN M., GYLLENborg J., JORGENSEN T.  
**Low serum insulin-like growth factor I is associated with increased risk of ischemic heart disease : a population-based case-control study.**  
Circulation 2002; 106:939-944.
7. SANDHU MS., HEALD AH., GIBSON JM., CRUICKSHANK JK., DUNGER DB., WAREHAM NJ.  
**Circulating concentrations of insulin-like growth factor-I and development of glucose intolerance : a prospective observational study.**  
The Lancet 2002; 359:1740-1745.
8. VAESEN N., HEUTINK P., JANSSEN JA., WITTEMAN JC., TESTERS L., HOFMAN A., LAMBERTS SW., OOSTRA BA., POLS HA., VAN DUIJN CM.  
**A polymorphism in the gene for IGF-I : functional properties and risk for type 2 diabetes and myocardial infarction.**  
Diabetes 2001; 50:637-642.
9. JUUL A.  
**Serum levels of insulin-like growth factor-I and its binding proteins in health and disease.**  
Growth Horm IGF Res 2003; 13:113-170
10. FIRTH SM., BAXTER RC.  
**Cellular actions of the insulin-like growth factor binding proteins**  
Endocr Rev 2002; 23:824-854.
11. BAXTER RC., MEKA S., FIRTH SM.  
**Molecular distribution of IGF binding protein-5 in human serum.**  
J Clin Endocrinol Metab 2002; 87:271-276.
12. RICORT JM.  
**Insulin-like growth factor binding protein (IGFBP) signaling.**  
Growth Horm IGF Res 2004; 14:277-286.
13. JONES JI., CLEMMONS DR.  
**Insulin-like growth factors and their binding proteins : biological actions.**  
Endocr Rev 1995; 16:3-34.
14. ALI O., COHEN P., LEE KW.  
**Epidemiology and biology of insulin-like growth factor binding protein-3 (IGFBP-3) as an anti-cancer molecule.**  
Horm Metab Res 2003; 35:726-733.
15. CHAN SS., TWIGG SM., FIRTH SM., BAXTER RC.  
**Insulin-like growth factor binding protein-3 leads to insulin resistance in adipocytes.**  
J Clin Endocrinol Metab 2005; 90:6588-6595.
16. JUUL A., MAIN K., BLUM WF., LINDHOLM J., RANKE MB., SKAKKEBAEK NE.  
**The ration between serum levels of insulin-like growth factor (IGF)-I and the IGF binding proteins (IGFBP-1, 2 and 3) decreases with age in healthy adults and is increased in acromegalic patients.**  
Clin Endocrinol (Oxf) 1994; 41:85-93.
17. BLUM WF., ALBERTSSON-WIKLAND K., ROSBERG S., RANKE MB.  
**Serum levels of insulin-like growth factor I (IGF-I) and IGF binding protein 3 reflect spontaneous growth hormone secretion.**  
J Clin Endocrinol Metab 1994; 76:1610-1616.
18. FRYSTYK J., IVARSEN P., SKJAERBAEK C., FLYVBJERG A., PEDERSEN EB., ORSKOV H.  
**Serum-free insulin-like growth factor I correlates with clearance in patients with chronic renal failure.**  
Kidney Int 1999; 56:2076-2084.
19. FRYSTYK J.  
In Endocrinology and Metabolism – Clinics of North America 2005 : Endocrinology of aging, Chapter XI : Aging somatotropic axis mechanisms and implications of IGFBP adaptation.

**XIX. RESUME DU PROTOCOLE**

	ACTIVITE TOTALE (µl)	CALIBRA- TEURS CONTRÔLES (µl)	ECHANTILLONS (µl)
<b>DILUTION DES ÉCHANTILLONS</b> Tampon de dilution Échantillon	- -	- -	1000 10
Mélanger	Vortex		
<b>INCUBATION</b> Calibrateurs (0 à 5), contrôles Échantillons dilués	- -	100 -	- 100
Traceur	50	50	50
Incubation	120 minutes à température ambiante (18-25°C) sous agitation continue (400 rpm).		
Séparation Solution de Lavage Séparation Solution de Lavage Séparation	- - - - -	Aspiration (ou décanter) 2 ml Aspiration (ou décanter) 2 ml Aspiration (ou décanter)	
Comptage	Temps de comptage des tubes: 60 secondes		



de

**Vor Gebrauch des Kits lesen Sie bitte diese Packungsbeilage.**

## **IGFBP-3-IRMA**

### **I. VERWENDUNGSZWECK**

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

### **II. ALLGEMEINE INFORMATION**

- A. Handelsbezeichnung :** DIAsource IGFBP-3-IRMA Kit
- B. Katalognummer :** KIP1171 : 96 Tests
- C. Hergestellt von:** DIAsource ImmunoAssays S.A.  
Rue du Bosquet, 2, B-1348 Louvain-la-Neuve, Belgien.

**Für technische Unterstützung oder Bestellungen wenden Sie sich bitte an:**

**Tel : +32 (0)10 84.99.11 Fax : +32 (0)10 84.99.91**

**Für Deutschland : Kostenfreie Rufnummer : 0800 1 00 85 74 - Kostenfreie Faxnummer : 0800 1 00 85 75**  
**E-mail Ordering : [ordering@diasource.be](mailto:ordering@diasource.be)**

### **III. KLINISCHER HINTERGRUND**

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

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

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

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

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

## IV. GRUNDSÄTZLICHES ZUR DURCHFÜHRUNG

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

## V. MITGELIEFERTE REAGENZIEN

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

Bemerkung: Benutzen Sie den Verdünnungspuffer als Nullkalibrator.

## VI. ZUSÄTZLICH BENÖTIGTES MATERIAL

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

- Dest. Wasser
- Pipetten: 10  $\mu\text{l}$ , 50  $\mu\text{l}$ , 100  $\mu\text{l}$  und 1 ml (Verwendung von Präzisionspipetten mit Wegwerf-Plastikspitzen wird empfohlen)
- Plastikröhrchen zur Probenverdünnung
- 5 ml automatische Spritze (Cornwall Typ) zum Waschen
- Absaugsystem (optional)
- Vortex Mixer
- Schüttler für Röhrchen (400rpm)
- Magnetrührer
- Jegl. Gamma-Counter, der  $^{125}\text{I}$  messen kann, kann verwendet werden. (minimal Yield 70%)

## VII. REAGENT PREPARATION

- Kalibratoren:** : Rekonstituieren Sie die Kalibratoren mit 1 ml dest. Wasser.
- Kontrollen:** Rekonstituieren Sie die Kontrollen mit 1 ml dest. Wasser.
- Waschlösung:** Bereiten Sie ein angemessenes Volumen Waschlösung aus einem Anteil Waschlösung (70x) mit 69 Anteilen dest. Wasser zu.

Verwenden Sie einen Magnetrührer zum gleichmäßigen Durchmischen. Verwerfen Sie die nicht benutzte Waschlösung am Ende des Tages.

## VIII. AUFBEWAHRUNG UND LAGERUNG DER REAGENZIEN

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

## IX. PROBENSAMMLUNG UND -VORBEREITUNG

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

## X. DURCHFÜHRUNG

### A. Bemerkungen zur Durchführung

Verwenden Sie den Kit oder dessen Komponenten nicht nach Ablaufdatum. Vermischen Sie Materialien von unterschiedlichen Kit-Chargen nicht. Bringen Sie alle Reagenzien vor der Verwendung auf Raumtemperatur (18-25°C). Mischen Sie alle Reagenzien und Proben gründlich durch sanftes Schütteln oder Rühren. Verwenden Sie saubere Wegwerf-Pipettenspitzen, um Kreuzkontamination zu vermeiden. Präzisionspipetten oder ein automatisches Pipettiersystem erhöhen die Präzision. Achten Sie auf die Einhaltung der Inkubationszeiten. Erstellen Sie für jeden Durchlauf eine Standardkurve, verwenden Sie nicht die Daten von früheren Durchläufen.

### B. Durchführung

- Kennzeichnen Sie ein leeres Plastikröhrchen pro Probe.
- Dispensieren Sie 1ml Verdünnungspuffer in jedes Röhrchen.
- Geben Sie 10  $\mu\text{l}$  Probe in die Röhrchen.
- Beschriften Sie je 2 beschichtete Röhrchen für jeden Kalibrator, jede Probe und Kontrolle. Zur Bestimmung der Gesamtaktivität, beschriften Sie 2 normale Röhrchen.
- Vortexen Sie die Kalibratoren, vorverdünnten Proben und Kontrollen kurz und geben Sie jeweils 100  $\mu\text{l}$  in ihre Röhrchen. (Benutzen Sie den Verdünnungspuffer als Nullkalibrator)
- Geben Sie 50  $\mu\text{l}$  des mit  $^{125}\text{I}$  markierten Anti-IGFBP-3 in jedes Röhrchen, einschließlich der unbeschichteten Röhrchen für die Gesamtaktivität.
- Inkubieren Sie 120 Minuten bei Raumtemperatur (18-25°C) unter ständigem Schütteln (400 rpm).
- Saugen Sie den Inhalt jedes Röhrchens ab (oder dekantieren Sie) (außer Gesamtaktivität). Vergewissern Sie sich, dass die Plastikspitze des Absaugers den Boden des beschichteten Röhrchens erreicht, um die gesamte Flüssigkeit zu entfernen.
- Waschen Sie die Röhrchen mit 2 ml Waschlösung (außer Gesamtaktivität) und saugen Sie ab (oder dekantieren Sie). Vermeiden Sie Schaumbildung bei Zugabe der Waschlösung.
- Waschen Sie die Röhrchen mit 2 ml Waschlösung (außer Gesamtaktivität) und saugen Sie ab (oder dekantieren Sie).
- Lassen Sie nach dem letzten Waschen die Röhrchen 2 Minuten aufrecht stehen und saugen Sie den verbleibenden Flüssigkeitstropfen ab.
- Werten Sie die Röhrchen in einem Gamma-Counter 60 Sekunden aus.

## XI. BERECHNUNG DER ERGEBNISSE

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

## XII. TYPISCHE WERTE

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

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

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

## XIII. LEISTUNGSMERKMALE UND GRENZEN DER METHODIK

### A. Nachweisgrenze

Das Limit of Blank (LOB), das Limit of Detection (LOD) und das Limit of Quantification (LOQ) wurden gemäß der CLSI-Richtlinie EP17-A bestimmt.

Das LOB wurde berechnet, indem der Blindwert mehrere Male gemessen und das 95. Perzentil der Verteilung der Testwerte berechnet wurde. Das LOB wurde zu 27,9 ng / ml berechnet.

Die LOD wurde wie in der Richtlinie beschrieben berechnet. Die LOD wurde zu 61,63 ng / ml berechnet.

Der LOQ wurde durch 10-maliges Testen von 4 Proben mit niedrigem Wert in verschiedenen Tests berechnet. Der LOQ wurde zu 123,1 ng / ml mit einem CV von 20% berechnet.

### B. Spezifität

Einige potentiell störenden Hormone wurden mit diesem Assay getestet. Bei Konzentrationen von bis zu 10 µg/ml zeigten keine der nachfolgend angegebenen Hormone signifikante Interferenzen:

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

### C. Präzision

#### INTRA-ASSAY PRÄZISION

#### INTER-ASSAY PRÄZISION

Serum	N	$\bar{X} \pm SD$ (ng/ml)	CV (%)	Serum	N	$\bar{X} \pm SD$ (ng/ml)	CV (%)
A	20	1647 ± 76	4.6	A	10	1708 ± 32	1.8
B	20	4443 ± 211	4.8	B	10	4426 ± 18	3.1

SD : Standardabweichung; CV: Variationskoeffizient

### D. Genauigkeit

#### VERDÜNNUNGSTEST

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

Die Proben werden mit Verdünnungspuffer verdünnt.

#### WIEDERFINDUNGSTEST

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

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

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

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

### F. Hook-Effekt

Bei einer IGFBP-3-Konzentration von bis zu 600000 ng / ml wurde kein hochdosierter Hook-Effekt beobachtet. Eine mit IGFBP-3 bis zu 600000 ng / ml dotierte Probe ergibt höhere cpm als der letzte Kalibratorpunkt.

## XIV. ANWENDUNGSGRENZEN

- Proben von Patienten, die Zubereitungen von monoklonalen Maus-Antikörpern zur Diagnose oder Therapie erhalten haben, können humane Anti-Maus Antikörper (HAMA) enthalten. Solche Proben können entweder falsch erhöhte oder zu niedrige Werte ergeben, wenn sie mit Testsystemen getestet werden, die monoklonale Maus Antikörper enthalten.
- Heterophile Antikörper im humanen Serum können mit Immunglobulinen der Reagenzien reagieren und so mit in vitro Immunoassays interferieren.
- Patienten, die routinemäßig Umgang mit Tieren oder Tierseren haben, können zu dieser Interferenz neigen und so können anomale Werte in Gegenwart von heterophilen Antikörpern beobachtet werden. Ergebnisse von Patienten, bei denen diese Antikörper vermutet werden, müssen sorgfältig evaluiert werden.
- Wenn die Ergebnisse nicht mit anderen klinischen Beobachtungen übereinstimmen, sollten weitere Informationen vor der Diagnosestellung ermittelt werden.

## XV. INTERNE QUALITÄTSKONTROLLE

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

## XVI. REFERENZ INTERVALLE

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

Gesunde Personen

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

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

## XVII. VORSICHTMASSNAHMEN UND WARNUNGEN

### Sicherheit

Nur für diagnostische Zwecke.

Dieser Kit enthält  $^{125}\text{I}$  (Halbwertzeit: 60 Tagen), das ionisierende X (28 keV) und  $\gamma$  (35,5 keV) Strahlungen emittiert.

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

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

Die menschlichen Blutkomponenten in diesem Kit wurden mit europäischen und in USA erprobten FDA-Methoden getestet, sie waren negativ für HBsAG, anti-HCV und anti-HIV 1 und 2. Keine bekannte Methode kann jedoch vollkommene Sicherheit liefern, dass menschliche Blutbestandteile nicht Hepatitis, AIDS oder andere Infektionen übertragen. Deshalb sollte der Umgang mit Reagenzien, Serum oder Plasmaproben in Übereinstimmung mit den Sicherheitsbestimmungen erfolgen.

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

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

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

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

## XVIII. LITERATUR

- LEROITH D., BONDY C., YAKAR S., LIU JL., BUTLER A. **The somatomedin hypothesis : 2001.** Endocr Rev 2001; 22:53-74.
- POLLAK MN., SCHERNHAMMER ES., HANKINSON SE. **Insulin-like growth factors and neoplasia.**

Nat Rev Cancer 2004; 4:505-518.

- YUEN K., FRYSTYK J., UMPLEBY M., FRYKLUND L., DUNGER D. **Changes in free rather than total insulin-like growth factor-I enhance insulin sensitivity and suppress endogenous peak growth hormone (GH) release following short-term low dose GH administration in young healthy adults.** J Clin Endocrinol Metab 2004; 89:3956-3964.
- KHANDWALA HM., McCUTCHEON IE., FLYVBJERG A., FRIEND KE. **The effects of insulin-like growth factors on tumorigenesis and neoplastic growth.** Endocr Rev 2000; 21:215-244.
- RENEHAN AG., ZWAHLEN M., MINDER PC., O'DWYSER ST., SHALET PS., EGGER PM. **Insulin-like growth factor (IGF)-I, IGF binding protein-3, and cancer risk : systematic review and meta-regression analysis.** The Lancet 2004; 363:1346-1353.
- JUUL A., SCHEIKE T., DAVIDSEN M., GYLLENborg J., JORGENSEN T. **Low serum insulin-like growth factor I is associated with increased risk of ischemic heart disease : a population-based case-control study.** Circulation 2002; 106:939-944.
- SANDHU MS., HEALD AH., GIBSON JM., CRUICKSHANK JK., DUNGER DB., WAREHAM NJ. **Circulating concentrations of insulin-like growth factor-I and development of glucose intolerance : a prospective observational study.** The Lancet 2002; 359:1740-1745.
- VAESSEN N., HEUTINK P., JANSSEN JA., WITTEMAN JC., TESTERS L., HOFMAN A., LAMBERTS SW., OOSTRA BA., POLS HA., VAN DUIJN CM. **A polymorphism in the gene for IGF-I : functional properties and risk for type 2 diabetes and myocardial infarction.** Diabetes 2001; 50:637-642.
- JUUL A. **Serum levels of insulin-like growth factor-I and its binding proteins in health and disease.** Growth Horm IGF Res 2003; 13:113-170
- FIRTH SM., BAXTER RC. **Cellular actions of the insulin-like growth factor binding proteins** Endocr Rev 2002; 23:824-854.
- BAXTER RC., MEKA S., FIRTH SM. **Molecular distribution of IGF binding protein-5 in human serum.** J Clin Endocrinol Metab 2002; 87:271-276.
- RICORT JM. **Insulin-like growth factor binding protein (IGFBP) signaling.** Growth Horm IGF Res 2004; 14:277-286.
- JONES JI., CLEMMONS DR. **Insulin-like growth factors and their binding proteins : biological actions.** Endocr Rev 1995; 16:3-34.
- ALI O., COHEN P., LEE KW. **Epidemiology and biology of insulin-like growth factor binding protein-3 (IGFBP-3) as an anti-cancer molecule.** Horm Metab Res 2003; 35:726-733.
- CHAN SS., TWIGG SM., FIRTH SM., BAXTER RC. **Insulin-like growth factor binding protein-3 leads to insulin resistance in adipocytes.** J Clin Endocrinol Metab 2005; 90:6588-6595.
- JUUL A., MAIN K., BLUM WF., LINDHOLM J., RANKE MB., SKAKKEBAEK NE. **The ration between serum levels of insulin-like growth factor (IGF)-I and the IGF binding proteins (IGFBP-1, 2 and 3) decreases with age in healthy adults and is increased in acromegalic patients.** Clin Endocrinol (Oxf) 1994; 41:85-93.

17. BLUM WF., ALBERTSSON-WIKLAND K., ROSBERG S., RANKE MB.  
**Serum levels of insulin-like growth factor I (IGF-I) and IGF binding protein 3 reflect spontaneous growth hormone secretion.**  
 J Clin Endocrinol Metab 1994; 76:1610-1616.
18. FRYSTYK J., IVARSEN P., SKJAERBAEK C., FLYVBJERG A., PEDERSEN EB., ORSKOV H.  
**Serum-free insulin-like growth factor I correlates with clearance in patients with chronic renal failure.**  
 Kidney Int 1999; 56:2076-2084.
19. FRYSTYK J.  
 In Endocrinology and Metabolism – Clinics of North America 2005 :  
 Endocrinology of aging, Chapter XI : Aging somatotropic axis mechanisms and implications of IGFBP adaptation.

#### XIX. ZUSAMMENFASSUNG DES PROTOKOLLS

	GESAMT-AKTIVITÄT (µl)	KALIBRA-TOREN KONTROLLEN (µl)	PROBEN, (µl)
<b><u>Verdünnte Probe(n)</u></b>	-	-	1000
Verdünnungspuffer Probe	-	-	10
Schütteln	Vortex		
<b><u>Inkubation</u></b>			
Kalibratoren (0 to 5), Kontrollen verdünnte Proben,	-	100	-
-	-	-	100
Tracer	50	50	50
Inkubation	120 Minuten bei Raumtemperatur (18-25°C) unter ständigem Schütteln (400 rpm)		
Trennung Waschlösung	-	absaugen (oder dekant.) 2 ml	
Trennung Waschlösung		absaugen (oder dekant.) 2 ml	
Trennung		absaugen (oder dekant.)	
Gamma Counter	60 Sekunden messen		



it

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

## IGFBP-3-IRMA

### I. USO DEL KIT

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

### II. INFORMAZIONI DI CARATTERE GENERALE

A. Nome commerciale: DIAsource IGFBP-3-IRMA Kit

B. Numero di catalogo: KIP1171: 96 test

C. Prodotto da: DIAsource ImmunoAssays S.A.  
Rue du Bosquet, 2, B-1348 Louvain-la-Neuve, Belgio.

Per informazioni tecniche o su come ordinare il prodotto contattare:

Tel: +32 (0)10 84.99.11

Fax: +32 (0)10 84.99.91

### III. INFORMAZIONI CLINICHE

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

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

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

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

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

#### IV. PRINCIPIO DEL METODO

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

#### V. REATTIVI FORNITI

Reattivi	Kit da 96 test	Codice colore	Volume di ricostituzione
	2 x 48	Avorio	Pronta per l'uso
	1 flacone 5,5 ml 700 kBq	Rosso	Pronta per l'uso
Anti-IGFBP-3- $^{125}\text{I}$ (anticorpo monoclonale) in tampone Tris-Maleato con siero bovino, azide (<0,1%) e colorante rosso inerte			
	5 flaconi liofiliz.	Giallo	Aggiungere 1 ml di acqua distillata
Calibratore 1-5 (le concentrazioni esatte dei calibratori sono riportate sulle etichette dei flaconi), in tampone Tris-HCl con albumina di siero bovino e timolo			
<b>I calibratori sono prediluiti</b>			
	1 flacone 100 ml	Verde	Pronta per l'uso
Tampone di diluizione: tampone Tris-HCl con albumina bovina e azide (<0,1%)			
	1 flacone 10 ml	Marrone	Diluire 70 x con acqua distillata usando un agitatore magnetico
Tampone di lavaggio (TRIS-HCl)			
	2 flaconi liofiliz.	Argento	Aggiungere 1 ml di acqua distillata
Controlli: N = 1 o 2, in tampone Tris-HCl con plasma umano, contenente timolo			
<b>I controlli sono prediluiti</b>			

**Nota:** utilizzare il tampone di diluizione come calibratore zero.

#### VI. REATTIVI NON FORNITI

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

- Acqua distillata.
- Pipette per dispensare 10  $\mu\text{l}$ , 50  $\mu\text{l}$ , 100  $\mu\text{l}$  and 1 ml (Si raccomanda di utilizzare pipette accurate con puntale in plastica monouso).
- Provette di plastica per la diluizione dei campioni
- Agitatore tipo vortex.
- Agitatore magnetico.
- Agitatore rotante (400rpm)
- Pipetta a ripetizione automatica 5 ml (tipo del Cornwall) per i lavaggi.
- Sistema di aspirazione dei campioni (facoltativo).
- Contatore gamma con finestra per  $^{125}\text{I}$  (efficienza minima 70%)

#### VII. PREPARAZIONE DEI REATTIVI

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

#### VIII. CONSERVAZIONE E SCADENZA DEI REATTIVI

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

#### IX. RACCOLTA E PREPARAZIONE DEI CAMPIONI

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

#### X. METODO DEL DOSAGGIO

##### A. Avvertenze generali

Non usare il kit o suoi componenti oltre la data di scadenza. Non mescolare reattivi di lotti diversi. Prima dell'uso portare tutti i reattivi a temperatura ambiente (18-25°C). Mescolare delicatamente i campioni per inversione o rotazione. Per evitare cross-contaminazioni, cambiare il puntale della pipetta ogni volta che si usa un nuovo reattivo o campione. L'uso di pipette ben tarate e ripetibili o di sistemi di pipettamento automatici migliora la precisione del dosaggio. Rispettare i tempi di incubazione. Allestire una curva di taratura per ogni seduta analitica, in quanto non è possibile utilizzare per un dosaggio curve di taratura di sedute analitiche precedenti.

##### B. Metodo del dosaggio

- Etichettare una provetta di plastica vuota per ciascun campione.
- Distribuire 1ml di Tampone di Diluizione in ciascuna provetta.
- Aggiungere 10  $\mu\text{l}$  di campione nelle rispettive provette
- Numerare le provette sensibilizzate necessarie per dosare in duplice ogni standard, campione o controllo. Numerare 2 provette non sensibilizzate per la determinazione dell'attività totale.
- Agitare brevemente su vortex calibratori, controlli e campioni prediluiti e distribuire 100  $\mu\text{l}$  di ciascuno nelle rispettive provette. (utilizzare il tampone di diluizione come calibratore zero)
- Distribuire 50  $\mu\text{l}$  di anti-IGFBP-3 marcato con  $^{125}\text{I}$  in ogni provetta, comprese quelle non pre-adsorbite per l'attività totale.
- Incubare 120 minuti a temperatura ambiente (18-25°C) in agitazione (400 rpm).
- Aspirare (o decantare) il liquido contenuto in tutte le provette, tranne in quelle per l'attività totale, facendo attenzione che il puntale dell'aspiratore raggiunga il fondo delle provette e che aspiri tutto il liquido.
- Lavare tutte le provette, tranne quelle per l'attività totale, con 2 ml di soluzione di lavoro di tampone di lavaggio, evitando di provocare la formazione di schiuma.
- Lavare nuovamente tutte le provette, tranne quelle per l'attività totale, con 2 ml di soluzione di lavoro di tampone di lavaggio e aspirare (o decantare).
- Dopo il secondo lavaggio lasciare decantare le provette in posizione verticale per due minuti circa e aspirare eventuali gocce di liquido residue.
- Contare tutte le provette per 1 minuto con il contatore gamma.

#### XI. CALCOLO DEI RISULTATI

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

## XII. CARATTERISTICHE TIPICHE

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

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

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

## XIII. CARATTERISTICHE E LIMITI DEL METODO

### A. Sensibilità

Il limite di vuoto (LOB), il limite di rilevazione (LOD) e il limite di quantificazione (LOQ), sono stati determinati in conformità con le linee guida CLSI EP17-A.

Il LOB è stato calcolato misurando più volte il bianco e calcolando il 95 ° percentile della distribuzione dei valori dei test. Il LOB è stato calcolato in 27,9 ng / ml.

Il LOD è stato calcolato come descritto nelle linee guida. Il LOD è stato calcolato in 61,63 ng / ml.

Il LOQ è stato calcolato testando 4 campioni di basso valore 10 volte in diversi test. Il LOQ è stato calcolato in 123,1 ng / ml con CV del 20%.

### B. Specificità

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

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

### C. Precisione

INTRA SAGGIO				INTER SAGGIO			
Siero	N	$\text{\times } \pm \text{SD}$ (ng/ml)	CV (%)	Siero	N	$\text{\times } \pm \text{SD}$ (ng/ml)	CV (%)
A	20	1647 ± 76	4.6	A	10	1708 ± 32	1.8
B	20	4443 ± 211	4.8	B	10	4426 ± 18	3.1

SD : Deviazione Standard; CV: Coefficiente di Variazione

### D. Accuratezza

#### TEST DI DILUIZIONE

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

I campioni sono stati diluiti con il Tampone di Diluizione.

#### TEST DI RECUPERO

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

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

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

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

### F. Effetto Hook

Non è stato osservato alcun effetto Hook ad alte dosi con concentrazione di IGFBP-3 fino a 600000 ng / ml. Un campione arricchito con IGFBP-3 fino a 600000 ng / ml fornisce cpm più alti dell'ultimo punto del calibratore.

## XIV. LIMITAZIONI

- Campioni di pazienti che abbiano assunto preparazioni a base di anticorpi monoclonali murini a scopo diagnostico o terapeutico potrebbero contenere anticorpi umani antimurini (HAMA). Tali campioni, quando testati con metodiche basate sull'impiego di anticorpi monoclonali murini, potrebbero produrre valori falsamente elevati o ridotti.
- Nell'esecuzione di tecniche di immunodosaggio in vitro, la presenza in campioni di siero umano di anticorpi eterofili che possono reagire con immunoglobuline reattive può dar luogo ad interferenze.
- Pazienti sistematicamente esposti al contatto con animali o con prodotti derivanti da siero animale possono essere oggetto di tale tipo di interferenza, con conseguente riscontro di risultati anomali in caso di presenza di anticorpi eterofili. Si raccomanda pertanto di valutare attentamente i risultati relativi ai pazienti con sospetta presenza di tale tipo di anticorpo.
- Qualora i risultati non fossero in linea con le altre osservazioni cliniche si renderà necessaria la raccolta di ulteriori informazioni prima della formulazione di una diagnosi.

## XV. CONTROLLO DI QUALITÀ' INTERNO

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

## XVI. INTERVALLI DI RIFERIMENTO

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

Soggetti normali

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

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

## XVII. PRECAUZIONI PER L'USO

### Sicurezza

Il kit è solo per uso diagnostico in vitro.

Il kit contiene  $^{125}\text{I}$  (emivita: 60 giorni) emettente raggi X (28 keV) e  $\gamma$  (35,5 keV) ionizzanti.

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

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

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

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

Evitare ogni contatto dell'epidermide con i reattivi contenenti sodio azide come conservante. La sodio azide può reagire con piombo rame o ottone presenti nelle tubature di scarico per formare metallo-azidi esplosive. Smaltire questi reattivi facendo scorrere abbondante acqua negli scarichi.

Nei luoghi dove si usano sostanze radioattive non è consentito consumare cibi o bevande, fumare o usare cosmetici. Non pipettare i reattivi con pipette a bocca.

## XVIII. RIFERIMENTI BIBLIOGRAFICI

1. LEROITH D., BONDY C., YAKAR S., LIU JL., BUTLER A.  
**The somatomedin hypothesis : 2001.**  
Endocr Rev 2001; 22:53-74.
2. POLLAK MN., SCHERNHAMMER ES., HANKINSON SE.  
**Insulin-like growth factors and neoplasia.**  
Nat Rev Cancer 2004; 4:505-518.
3. YUEN K., FRYSTYK J., UMPLEBY M., FRYKLUND L., DUNGER D.  
**Changes in free rather than total insulin-like growth factor-I enhance insulin sensitivity and suppress endogenous peak growth hormone (GH) release following short-term low dose GH administration in young healthy adults.**  
J Clin Endocrinol Metab 2004; 89:3956-3964.
4. KHANDWALA HM., McCUTCHEON IE., FLYVBJERG A., FRIEND KE.  
**The effects of insulin-like growth factors on tumorigenesis and neoplastic growth.**  
Endocr Rev 2000; 21:215-244.
5. RENEHAN AG., ZWAHLEN M., MINDER PC., O'DWYSER ST., SHALET PS., EGGER PM.  
**Insulin-like growth factor (IGF)-I, IGF binding protein-3, and cancer risk : systematic review and meta-regression analysis.**  
The Lancet 2004; 363:1346-1353.
6. JUUL A., SCHEIKE T., DAVIDSEN M., GYLLENborg J., JORGENSEN T.  
**Low serum insulin-like growth factor I is associated with increased risk of ischemic heart disease : a population-based case-control study.**  
Circulation 2002; 106:939-944.
7. SANDHU MS., HEALD AH., GIBSON JM., CRUICKSHANK JK., DUNGER DB., WAREHAM NJ.  
**Circulating concentrations of insulin-like growth factor-I and development of glucose intolerance : a prospective observational study.**  
The Lancet 2002; 359:1740-1745.
8. VAESSEN N., HEUTINK P., JANSSEN JA., WITTEMAN JC., TESTERS L., HOFMAN A., LAMBERTS SW., OOSTRA BA., POLS HA., VAN DUIJN CM.  
**A polymorphism in the gene for IGF-I : functional properties and risk for type 2 diabetes and myocardial infarction.**  
Diabetes 2001; 50:637-642.
9. JUUL A.  
**Serum levels of insulin-like growth factor-I and its binding proteins in health and disease.**  
Growth Horm IGF Res 2003; 13:113-170
10. FIRTH SM., BAXTER RC.  
**Cellular actions of the insulin-like growth factor binding proteins**  
Endocr Rev 2002; 23:824-854.
11. BAXTER RC., MEKA S., FIRTH SM.  
**Molecular distribution of IGF binding protein-5 in human serum.**  
J Clin Endocrinol Metab 2002; 87:271-276.
12. RICORT JM.  
**Insulin-like growth factor binding protein (IGFBP) signaling.**  
Growth Horm IGF Res 2004; 14:277-286.
13. JONES JI., CLEMMONS DR.  
**Insulin-like growth factors and their binding proteins : biological actions.**  
Endocr Rev 1995; 16:3-34.
14. ALI O., COHEN P., LEE KW.  
**Epidemiology and biology of insulin-like growth factor binding protein-3 (IGFBP-3) as an anti-cancer molecule.**  
Horm Metab Res 2003; 35:726-733.
15. CHAN SS., TWIGG SM., FIRTH SM., BAXTER RC.  
**Insulin-like growth factor binding protein-3 leads to insulin resistance in adipocytes.**  
J Clin Endocrinol Metab 2005; 90:6588-6595.
16. JUUL A., MAIN K., BLUM WF., LINDHOLM J., RANKE MB., SKAKKEBAEK NE.  
**The ration between serum levels of insulin-like growth factor (IGF)-I and the IGF binding proteins (IGFBP-1, 2 and 3) decreases with age in healthy adults and is increased in acromegalic patients.**  
Clin Endocrinol (Oxf) 1994; 41:85-93.
17. BLUM WF., ALBERTSSON-WIKLAND K., ROSBERG S., RANKE MB.  
**Serum levels of insulin-like growth factor I (IGF-I) and IGF binding protein 3 reflect spontaneous growth hormone secretion.**  
J Clin Endocrinol Metab 1994; 76:1610-1616.
18. FRYSTYK J., IVARSEN P., SKJAERBAEK C., FLYVBJERG A., PEDERSEN EB., ORSKOV H.  
**Serum-free insulin-like growth factor I correlates with clearance in patients with chronic renal failure.**  
Kidney Int 1999; 56:2076-2084.
19. FRYSTYK J.  
In Endocrinology and Metabolism – Clinics of North America 2005 :  
**Endocrinology of aging, Chapter XI : Aging somatotropic axis mechanisms and implications of IGFBP adaptation.**

**XIX. SCHEMA DEL DOSAGGIO**

	Attività totale µl	Calibratore Controlli µl	CAMPIONI µl
<b>DILUIZIONE CAMPIONE(I)</b> Tampone di Diluizione Campione	- -	- -	1000 10
Agitazione		Vortex	
<b>INCUBAZIONE</b> Calibratori (da 0 a 5) , controlli Campione Diluito	- -	100 -	- 100
Marcato	50	50	50
Incubazione	120 minuti a temperatura ambiente (18-25°C) in agitazione (400 rpm)		
Separazione Soluzione di lavoro del tampone di lavaggio Separazione Soluzione di lavoro del tampone di lavaggio Separazione	-	Aspirare (o decantare) 2 ml  Aspirare (o decantare) 2 ml  Aspirare (o decantare)	
Conteggio	Contare le provette per 1 minuto		



es

Leer el protocolo completo antes de usar.

## IGFBP-3-IRMA

### I. INSTRUCCIONES DE USO

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

### II. INFORMACIÓN GENERAL

- A. **Nombre:** DIAsource IGFBP-3-IRMA Kit
- B. **Número de Catálogo:** KIP1171 : 96 tests
- C. **Fabricado por:** DIAsource ImmunoAssays S.A.  
Rue du Bosquet, 2, B-1348 Louvain-la-Neuve, Belgium.

Para cuestiones técnicas y información sobre pedidos contactar:

Tel : +32 (0)10 84.99.11      Fax : +32 (0)10 84.99.91

### III. INFORMACIÓN CLÍNICA

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

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

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

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

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

#### IV. PRINCIPIOS DEL MÉTODO

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

#### V. REACTIVOS SUMINISTRADOS

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

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

#### VI. MATERIAL NO SUMINISTRADO

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

1. Agua destilada
2. Pipetas de 10  $\mu\text{l}$ , 50  $\mu\text{l}$ , 100  $\mu\text{l}$  and 1 ml (Se recomienda el uso de pipetas precisas con puntas desechables de plástico)
3. Tubos plásticos para dilución de muestra
4. Vortex
5. Agitador magnético
6. Agitador de tubos (400rpm)
7. Jeringa automática 5 ml (tipo Cornwall) para el lavado
8. Sistema de aspiración (opcional)
9. Contador de radiaciones gamma para medir  $\text{I}^{125}$  (mínima eficiencia 70%)

#### VII. PREPARACIÓN DE REACTIVOS

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

#### VIII. ALMACENAJE Y CADUCIDADES DE LOS REACTIVOS

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

#### IX. RECOGIDA Y PREPARACIÓN DE MUESTRAS

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

#### X. PROTOCOLO

##### A. Notas de manejo

No utilizar el kit ó componentes después de la fecha de caducidad. No mezclar reactivos de diferente número de lote. Llevar todos los reactivos a temperatura ambiente (18-25°C) antes de su uso.

Agitar minuciosamente todos los reactivos y muestras, agitándolos o girándolos suavemente. Con el fin de evitar ninguna contaminación utilizar puntas de pipetas desechables y limpias para la adición de cada reactivo y muestra.

El uso de pipetas de precisión o equipamiento de dispensación automática mejorará la precisión. Respetar los tiempos de incubación.

Preparar la curva de calibración en cada ensayo, no utilizar los datos de un ensayo previo.

##### B. Protocolo

1. Marque un tubo plástico para cada una de las muestras.
2. Dispense 1 ml de Tampón de Dilución en cada tubo.
3. Agregue 10  $\mu\text{l}$  de muestra a cada tubo.
4. Marcar los tubos recubiertos por duplicado para cada uno de los estándares, muestras y controles. Para la determinación de las Cuentas Totales, marcar 2 tubos normales.
5. Agitar brevemente los calibradores, muestras pre-diluidas y controles y dispensar 100  $\mu\text{l}$  de cada uno en sus respectivos tubos. (use el Tampón de Dilución para calibrar a cero)
6. Dispensar 50  $\mu\text{l}$  de anti IGFBP-3 marcado con  $^{125}\text{Yodo}$  en cada tubo, incluyendo los tubos correspondientes a las Cuentas Totales.
7. Incubar durante 120 minutos a temperatura ambiente (18-25°C) en agitación constante (400 rpm).
8. Aspirar (o decantar) el contenido de cada tubo (excepto los de Cuentas Totales). Asegurarse que la punta de la pipeta de aspiración toca el fondo del tubo con el fin de aspirar todo el líquido.
9. Lavar los tubos con 2 ml de Solución de lavado de trabajo (excepto los de Cuentas Totales) y aspirar (o decantar). Evitar la formación de espuma durante la adición de la Solución de lavado.
10. Lavar de nuevo con 2 ml de Solución de lavado de trabajo (excepto los de Cuentas Totales) y aspirar (o decantar).
11. Despues del último lavado, dejar los tubos en posición inversa durante 2 minutos y aspirar el líquido restante.
12. Medir la actividad de cada tubo durante 60 segundos en un Contador Gamma.

#### XI. CÁLCULO DE RESULTADOS

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

## XII. EJEMPLO DE RESULTADOS

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

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

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

## XIII. REALIZACIÓN Y LIMITACIONES

### A. Límite de detección

El límite de blanco (LOB), el límite de detección (LOD) y el límite de cuantificación (LOQ) se determinaron de acuerdo con la directriz EP17-A de CLSI.

El LOB se calculó midiendo el blanco varias veces y calculando el percentil 95 de la distribución de los valores de las pruebas. El LOB se calculó en 27,9 ng / ml.

El LOD se calculó como se describe en la guía. La LOD se calculó en 61,63 ng / ml.

El LOQ se calculó probando 4 muestras de bajo valor 10 veces en diferentes pruebas. Se calculó que el LOQ era 123,1 ng / ml con un CV del 20%.

### B. Especificidad

Algunas hormonas que en teoría podrían interferir han sido estudiadas con este ensayo. En concentraciones de hasta 10 µg/ml, ninguna de las siguientes hormonas demostró una interferencia significativa:

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

### C. Precisión

#### PRECISIÓN INTRA-ENSAYO

#### PRECISIÓN INTER-ENSAYO

Suero	N	$\text{} \pm \text{SD}$ (ng/ml)	CV (%)	Suero	N	$\text{} \pm \text{SD}$ (ng/ml)	CV (%)
A	20	1647 ± 76	4.6	A	10	1708 ± 32	1.8
B	20	4443 ± 211	4.8	B	10	4426 ± 18	3.1

SD : Desviación Estándar; CV: Coeficiente de Variación

### D. Exactitud

#### TEST DILUCIÓN

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

Las muestras fueron diluidas con Tampón de Dilución.

#### TEST DE RECUPERACIÓN

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

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

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

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

### F. Efecto Hook

No se observó un efecto Hook de dosis alta con una concentración de IGFBP-3 de hasta 600000 ng / ml. Una muestra enriquecida con IGFBP-3 hasta 600000 ng / ml proporciona cpm más altos que el último punto de calibración.

### XIV. LIMITACIONES

- Es posible que las muestras de pacientes que han recibido preparaciones de anticuerpos monoclonales de ratón para diagnóstico o terapia, puedan contener anticuerpos humanos anti ratón (HAMA). Los resultados de estas muestras analizadas con kits que utilizan anticuerpos monoclonales de ratón, pueden dar valores falsamente aumentados o disminuidos.
- Los anticuerpos heterófilos en el suero humano pueden reaccionar con las inmunoglobulinas que forman parte del reactivo, interfiriendo con los inmunoensayos in vitro. Pacientes que en forma rutinaria están en contacto con animales o productos derivados de suero animal, pueden tender a presentar esta interferencia y se pueden observar valores anómalos en caso de haber presencia de anticuerpos heterófilos. Evalúe cuidadosamente los resultados de aquellos pacientes sospechosos de tener estos anticuerpos. Si los resultados no concuerdan con otras observaciones clínicas, será necesario obtener información adicional antes de hacer un diagnóstico.

### XV. CONTROL DE CALIDAD INTERNO

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

### XVI. INTERVALOS DE REFERENCIA

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

#### Sujetos normales

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

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

## XVII. PRECAUCIONES Y ADVERTENCIAS

### Seguridad

Para uso solo en diagnóstico in vitro.

Este kit contiene I<sup>125</sup> (vida media : 60 días) emisor de rayos X (28 keV) y de rayos γ (35,5 keV) ionizantes.

Este producto radiactivo solo puede ser manejado y utilizado por personas autorizadas; la compra, almacenaje, uso y cambio de productos radiactivos están sujetos a la legislación del país del usuario. En ningún caso el producto deberá ser suministrado a humanos y animales.

Todo el manejo de producto radiactivo se hará en una área señalizada, diferente de la de paso regular. Deberá de utilizarse un libro de registros de productos radiactivos utilizados. El material de laboratorio, vidrio que podría estar contaminado radiactivamente deberá de descontaminarse para evitar la contaminación con otros isótopos.

Cualquier derramamiento radiactivo deberá ser limpiado de inmediato de acuerdo con los procedimientos de seguridad. Los desperdicios radiactivos deberán ser almacenados de acuerdo con las regulaciones y normativas vigentes de la legislación a la cual pertenezca el laboratorio. El ajustarse a las normas básicas de seguridad radiológica facilita una protección adecuada.

Los componentes de sangre humana utilizados en este kit han sido testados por métodos aprobados por la CEE y/o la FDA dando negativo a HBsAg, anti-HCV, anti-HIV-1 y 2. No se conoce ningún método que asegure que los derivados de la sangre humana no transmitan hepatitis, SIDA ó otras infecciones. Por lo tanto el manejo de los reactivos y muestras se hará de acuerdo con los procedimientos de seguridad locales.

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

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

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

## XVIII. BIBLIOGRAFIA

1. LEROITH D., BONDY C., YAKAR S., LIU JL., BUTLER A.  
**The somatomedin hypothesis : 2001.**  
Endocr Rev 2001; 22:53-74.
2. POLLAK MN., SCHERNHAMMER ES., HANKINSON SE.  
**Insulin-like growth factors and neoplasia.**  
Nat Rev Cancer 2004; 4:505-518.
3. YUEN K., FRYSTYK J., UMPLEBY M., FRYKLUND L., DUNGER D.  
**Changes in free rather than total insulin-like growth factor-I enhance insulin sensitivity and suppress endogenous peak growth hormone (GH) release following short-term low dose GH administration in young healthy adults.**  
J Clin Endocrinol Metab 2004; 89:3956-3964.
4. KHANDWALA HM., McCUTCHEON IE., FLYVBJERG A., FRIEND KE.  
**The effects of insulin-like growth factors on tumorigenesis and neoplastic growth.**  
Endocr Rev 2000; 21:215-244.
5. RENEHAN AG., ZWAHLEN M., MINDER PC., O'DWYSER ST., SHALET PS., EGGER PM.  
**Insulin-like growth factor (IGF)-I, IGF binding protein-3, and cancer risk : systematic review and meta-regression analysis.**  
The Lancet 2004; 363:1346-1353.
6. JUUL A., SCHEIKE T., DAVIDSEN M., GYLLENborg J., JORGENSEN T.  
**Low serum insulin-like growth factor I is associated with increased risk of ischemic heart disease : a population-based case-control study.**  
Circulation 2002; 106:939-944.
7. SANDHU MS., HEALD AH., GIBSON JM., CRUICKSHANK JK., DUNGER DB., WAREHAM NJ.  
**Circulating concentrations of insulin-like growth factor-I and development of glucose intolerance : a prospective observational study.**  
The Lancet 2002; 359:1740-1745.
8. VAESSEN N., HEUTINK P., JANSSEN JA., WITTEMAN JC., TESTERS L., HOFMAN A., LAMBERTS SW., OOSTRA BA., POLS HA., VAN DUIJN CM.  
**A polymorphism in the gene for IGF-I : functional properties and risk for type 2 diabetes and myocardial infarction.**  
Diabetes 2001; 50:637-642.
9. JUUL A.  
**Serum levels of insulin-like growth factor-I and its binding proteins in health and disease.**  
Growth Horm IGF Res 2003; 13:113-170
10. FIRTH SM., BAXTER RC.  
**Cellular actions of the insulin-like growth factor binding proteins**  
Endocr Rev 2002; 23:824-854.
11. BAXTER RC., MEKA S., FIRTH SM.  
**Molecular distribution of IGF binding protein-5 in human serum.**  
J Clin Endocrinol Metab 2002; 87:271-276.
12. RICORT JM.  
**Insulin-like growth factor binding protein (IGFBP) signaling.**  
Growth Horm IGF Res 2004; 14:277-286.
13. JONES JI., CLEMMONS DR.  
**Insulin-like growth factors and their binding proteins : biological actions.**  
Endocr Rev 1995; 16:3-34.
14. ALI O., COHEN P., LEE KW.  
**Epidemiology and biology of insulin-like growth factor binding protein-3 (IGFBP-3) as an anti-cancer molecule.**  
Horm Metab Res 2003; 35:726-733.
15. CHAN SS., TWIGG SM., FIRTH SM., BAXTER RC.  
**Insulin-like growth factor binding protein-3 leads to insulin resistance in adipocytes.**  
J Clin Endocrinol Metab 2005; 90:6588-6595.
16. JUUL A., MAIN K., BLUM WF., LINDHOLM J., RANKE MB., SKAKKEBAEK NE.  
**The ration between serum levels of insulin-like growth factor (IGF)-I and the IGF binding proteins (IGFBP-1, 2 and 3) decreases with age in healthy adults and is increased in acromegalic patients.**  
Clin Endocrinol (Oxf) 1994; 41:85-93.
17. BLUM WF., ALBERTSSON-WIKLAND K., ROSBERG S., RANKE MB.  
**Serum levels of insulin-like growth factor I (IGF-I) and IGF binding protein 3 reflect spontaneous growth hormone secretion.**  
J Clin Endocrinol Metab 1994; 76:1610-1616.
18. FRYSTYK J., IVARSEN P., SKJAERBAEK C., FLYVBJERG A., PEDERSEN EB., ORSKOV H.  
**Serum-free insulin-like growth factor I correlates with clearance in patients with chronic renal failure.**  
Kidney Int 1999; 56:2076-2084.
19. FRYSTYK J.  
**In Endocrinology and Metabolism – Clinics of North America 2005 : Endocrinology of aging, Chapter XI : Aging somatotropic axis mechanisms and implications of IGFBP adaptation.**

**XIX. RESUMEN DEL PROTOCOLO**

	CUENTAS TOTALES ( $\mu$ l)	CALIBRADORES CONTROL(ES) ( $\mu$ l)	MUESTRAS ( $\mu$ l)
<b>DILUCIONES DE LAS MUESTRAS</b>			
Tampón de dilución	-	-	1000
Muestra	-	-	10
agitación		Vortex	
<b>INCUBACIÓN</b>			
Calibradores (0 to 5), controles	-	100	-
Muestras Diluidas	-	-	100
Trazador	50	50	50
Incubación	120 minutos a T.A (18-25°C) en agitación constante (400 rpm)		
Separación Solución de Lavado Separación Solución de Lavado Separación	-	Aspira (o decantar) 2 ml Aspirar (o decantar) 2 ml Aspirar (o decantar)	
Contaje	Contar los tubos durante 60 segundos		

CE

el

Διαβάστε ολόκληρο το πρωτόκολλο πριν από τη χρήση.

## IGFBP-3-IRMA

### I. ΧΡΗΣΗ ΓΙΑ ΤΗΝ ΟΠΟΙΑ ΠΡΟΟΡΙΖΕΤΑΙ

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

### II. ΓΕΝΙΚΕΣ ΠΛΗΡΟΦΟΡΙΕΣ

A. Εμπορική ονομασία: Κιτ IGFBP-3-IRMA της DIAsource

B. Αριθμός καταλόγου: KIP1171: 96 εξετάσεις

C. Κατασκευάζεται από την: DIAsource ImmunoAssays S.A.  
Rue du Bosquet, 2, B-1348 Louvain-la-Neuve, Belgium.

Για τεχνική βιοήθεια ή πληροφορίες σχετικά με παραγγελίες επικοινωνήστε στα:

Τηλ.: +32 (0)10 84.99.11 Fax: +32 (0)10 84.99.91

### III. ΚΛΙΝΙΚΟ ΥΠΟΒΑΘΡΟ

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

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

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

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

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

#### IV. ΒΑΣΙΚΕΣ ΑΡΧΕΣ ΤΗΣ ΜΕΘΟΔΟΥ

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

#### V. ΠΑΡΕΧΟΜΕΝΑ ΑΝΤΙΔΡΑΣΤΗΡΙΑ

Αντιδραστήρια	Κιτ 96 εξετάσεων	Χρωματικός κωδικός	Ανασύσταση
Σωληνάρια με επίστρωση Αντι-IGFBP-3 (μονοκλωνικό αντίστοιχο)	2 x 48	υπόλευκο	Έτοιμο για χρήση
Ab $^{125}\text{I}$	1 φιαλίδιο 5,5 ml 700 kBq	κόκκινο	Έτοιμο για χρήση
Αντι-IGFBP-3- $^{125}\text{I}$ (μονοκλωνικό αντίστοιχο) σε ρυθμιστικό διάλυμα Tris Maleate με βόειο ορό, αζίδιο (<0.1%) και αδρανή ερυθρή χρωστική	5 φιαλίδια λυοφιλοποιημένο	κίτρινο	Προσθέστε 1 ml απεσταγμένου νερού
CAL N	1 φιαλίδιο 100 ml	πράσινο	Έτοιμο για χρήση
Βαθμονομητές 1-5 σε ρυθμιστικό διάλυμα Tris HCl με βόεια ορούς και θυμόλη. Για ακριβείς τιμές, βλ. ετικέτες των φιαλιδίων. Οι βαθμονομητές έχουν προαριστεί	WASH SOLN CONC Διάλυμα πλύσης (TRIS-HCl)	καφέ	Αραιώστε 70 x με απεσταγμένο νερό (χρησιμοποιήστε μαγνητικό αναδευτήρα).
CONTROL N	2 φιαλίδια λυοφιλοποιημένο	ασημί	Προσθέστε 1 ml απεσταγμένου νερού
Υλικά ελέγχου - N = 1 ή 2 σε ρυθμιστικό διάλυμα Tris HCl με ανθρώπινο πλάσμα με θυμόλη Οι οροί ελέγχου έχουν προαριστεί			

**Σημείωση:** χρησιμοποιήστε το ρυθμιστικό διάλυμα αραίωσης ως μηδενικό βαθμονομητή.

#### VI. ΑΝΑΛΩΣΙΜΑ ΠΟΥ ΔΕΝ ΠΑΡΕΧΟΝΤΑΙ

Τα ακόλουθα υλικά απαιτούνται αλλά δεν παρέχονται στο κιτ:

- Απεσταγμένο νερό
- Πιπέτες για διανομή: 10 μl, 50 μl, 100 μl and 1 ml (συνιστάται η χρήση πιπετών ακριβείας με αναλώσιμα πλαστικά ρύγχη)
- Πλαστικά σωληνάρια για την αραίωση των δείγμάτων
- Αναμείκτης στροβίλισμού
- Μαγνητικός αναδευτήρας
- Συσκευή ανάδευσης σωληναρίων (400rpm)
- Αυτόματη σύριγγα των 5 ml (τύπου Cornwall) για πλύση
- Σύστημα αναρρόφησης (προαιρετικό)
- Μπορεί να χρησιμοποιηθεί οποιοσδήποτε απαριθμητής ακτίνων γ με δυνατότητα μέτρησης του  $^{125}\text{I}$  (ελάχιστη απόδοση 70%).

#### VII. ΠΑΡΑΣΚΕΥΗ ΑΝΤΙΔΡΑΣΤΗΡΙΟΥ

- A. **Βαθμονομητές:** Ανασυστήστε τους βαθμονομητές με 1 ml απεσταγμένου νερού.

B. **Υλικά ελέγχου:** Ανασυστήστε τα πρότυπα ελέγχου με 1 ml απεσταγμένου νερού.

C. **Διάλυμα πλύσης εργασίας:** Προετοιμάστε επαρκή όγκο διαλύματος πλύσης εργασίας με προσθήκη 69 όγκων απεσταγμένου νερού σε 1 όγκο διαλύματος πλύσης (70x). Χρησιμοποιήστε μαγνητικό αναδευτήρα για την ομογενοποίηση. Απορρίνετε το μη χρησιμοποιημένο διάλυμα πλύσης εργασίας στο τέλος της ημέρας.

#### VIII. ΦΥΛΑΞΗ ΚΑΙ ΗΜΕΡΟΜΗΝΙΑ ΛΗΣΗΣ ΤΩΝ ΑΝΤΙΔΡΑΣΤΗΡΙΩΝ

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

#### IX. ΣΥΛΛΟΓΗ ΚΑΙ ΠΡΟΕΤΟΙΜΑΣΙΑ ΔΕΙΓΜΑΤΩΝ

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

#### X. ΔΙΑΔΙΚΑΣΙΑ

##### A. Σημειώσεις σχετικά με το χειρισμό

Μη χρησιμοποιείτε το κιτ ή τα συστατικά μετά την ημερομηνία λήξης. Μην αναμειγνύετε υλικά από διαφορετικές παρτίδες κιτ. Φέρετε όλα τα αντιδραστήρια σε θερμοκρασία δωματίου (18-25°C) πριν από τη χρήση. Αναμείξτε καλά όλα τα αντιδραστήρια και τα δείγματα με απλή ανακίνηση ή ανάδευση. Χρησιμοποιείτε ένα καθαρό αναλώσιμο ρύγχος πιπέτας για την προσθήκη κάθε διαφορετικού αντιδραστηρίου και δείγματος προκειμένου να αποφύγετε την επιμόλυνση. Η ακρίβεια βελτιώνεται με χρήση πιπετών υψηλής ακρίβειας ή αυτοματοποιημένου εξοπλισμού διανομής με πιπέτες. Τηρείτε τους χρόνους επώασης. Προετοιμάστε μια καμπύλη βαθμονόμησης για κάθε ανάλυση και μη χρησιμοποιείτε δεδομένα από προηγούμενες αναλύσεις.

##### B. Διαδικασία

- Σημάνετε ένα απλό πλαστικό σωληνάριο για κάθε δείγμα.
- Προσθέστε 1 ml ρυθμιστικού διαλύματος αραίωσης σε κάθε σωληνάριο.
- Προσθέστε 10 μl δείγματος σε αυτά τα σωληνάρια.
- Σημάνετε τα επιστρωμένα σωληνάρια εις διπλούν για κάθε βαθμονομητή, δείγμα, υλικό ελέγχου. Για τον προσδιορισμό των συνολικών μετρήσεων, σημάνετε 2 φυσιολογικά σωληνάρια.
- Αναμείξτε σύντομα (με αναμείκητη στροβίλισμο τύπου vortex) τους βαθμονομητές, ορούς ελέγχου και τα προαραίωσέντα δείγματα και προσθέστε 100 μl από καθένα στα αντίστοιχα σωληνάρια. (χρησιμοποιήστε το ρυθμιστικό διάλυμα αραίωσης ως μηδενικό βαθμονομητή)
- Διανείμετε 50 μl αντι-IGFBP-3 σημασμένου με  $^{125}\text{I}$  σε κάθε σωληνάριο, συμπεριλαμβάνοντας τα μη επιστρωμένα σωληνάρια που αφορούν τις μετρήσεις του ιχνηθέτη  $^{125}\text{I}$  ("total").
- Επωάστε επί 120 λεπτά σε θερμοκρασία δωματίου (18-25°C) σε αναδευτήρα σωληναρίων στις 400 rpm.
- Αναρροφήστε (ή μεταγγίστε) το περιεχόμενο κάθε σωληναρίου (με εξαίρεση εκείνα που αφορούν τις συνολικές μετρήσεις). Βεβαιωθείτε ότι το πλαστικό ρύγχος του αναρροφητή φθάνει στον πυθμένα του επιστρωμένου σωληναρίου προκειμένου να αφαιρεθεί όλη η ποσότητα του υγρού.
- Πλύνετε τα σωληνάρια με 2 ml διαλύματος πλύσης εργασίας (με εξαίρεση εκείνα που αφορούν τις συνολικές μετρήσεις). Αποφύγετε το σχηματισμό αφρού κατά τη διάρκεια της προσθήκης του διαλύματος πλύσης εργασίας.
- Πλύνετε τα σωληνάρια και πάλι με 2 ml διαλύματος πλύσης εργασίας (με εξαίρεση εκείνα που αφορούν τις συνολικές μετρήσεις) και αναρροφήστε (ή μεταγγίστε).
- Μετά την τελευταία πλύση, αφήστε τα σωληνάρια να σταθούν σε όρθια θέση για δύο λεπτά και αναρροφήστε τη σταγόνα υγρού που απομένει.
- Υποβάλλετε σε μέτρηση τα σωληνάρια σε απαριθμητή ακτίνων γ για 60 δευτερόλεπτα.

## XI. ΥΠΟΛΟΓΙΣΜΟΣ ΤΩΝ ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΩΝ

- Υπολογίστε τη μέση τιμή των διπλών προσδιορισμών.
- παραστήστε γραφικά τις c.p.m. (κρούσεις ανά λεπτό) (τεταγμένη) για κάθε βαθμονομητή έναντι της αντίστοιχης συγκέντρωσης της IGFBP-3 (τεταγμένη) και σχεδιάστε μια καμπύλη βαθμονόμησης μέσω των σημείων του βαθμονομητή, απορρίψτε τις εμφανείς μη αποδεκτές τιμές.
- Διαβάστε τη συγκέντρωση για κάθε υλικό ελέγχου και δείγμα με παρεμβολή στην καμπύλη βαθμονόμησης.
- Αναγωγή δεδομένων με τη βοήθεια ηλεκτρονικού υπολογιστή θα απλοποιήσει αυτούς τους υπολογισμούς. Εάν χρησιμοποιείται αυτόματη επεξεργασία αποτελεσμάτων, συνιστάται προσαρμογή καμπύλης λογιστικής συνάρτησης 4 παραμέτρων.

## XII. ΤΥΠΙΚΑ ΔΕΔΟΜΕΝΑ

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

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

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

## XIII. ΑΠΟΔΟΣΗ ΚΑΙ ΠΕΡΙΟΡΙΣΜΟΙ

### A. Όριο ανίχνευσης

Τα όρια του Blank (LOB), του ορίου ανίχνευσης (LOD) και του ορίου ποσοτικού προσδιορισμού (LOQ) προσδιορίστηκαν σύμφωνα με την κατευθυντήρια γραμμή EP17-A του CLSI.

Η τιμή LOB υπολογίστηκε μετρώντας το κενό αρκετές φορές και υπολογίζοντας το 95ο εκατοστημόριο της κατανομής των τιμών των δοκιμών. Η LOB υπολογίστηκε ότι είναι 27,9 ng / ml.

Η LOD υπολογίστηκε όπως περιγράφεται στην κατευθυντήρια γραμμή. Η LOD υπολογίστηκε ότι είναι 61,63 ng / ml.

Το LOQ υπολογίστηκε με δοκιμή 4 δειγμάτων χαμηλής τιμής 10 φορές σε διαφορετικές δοκιμές.

Το LOQ υπολογίστηκε ότι είναι 123,1 ng / ml με CV 20%.

### B. Ειδικότητα

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

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

### C. Ακρίβεια

ΓΙΑ ΤΟΝ ΙΔΙΟ ΠΡΟΣΔΙΟΡΙΣΜΟ			ΜΕΤΑΞΥ ΔΙΑΦΟΡΕΤΙΚΩΝ ΠΡΟΣΔΙΟΡΙΣΜΩΝ				
Ορός	N	<X> ± T.A. (ng/ml)	Σ.Δ. (%)	Ορός	N	<X> ± T.A. (ng/ml)	Σ.Δ. (%)
A	20	1647 ± 76	4.6	A	10	1708 ± 32	1.8
B	20	4443 ± 211	4.8	B	10	4426 ± 18	3.1

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

## Δ. Ορθότητα

### ΕΞΕΤΑΣΗ ΑΝΑΚΤΗΣΗΣ

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

### ΕΞΕΤΑΣΗ ΑΡΑΙΩΣΗΣ

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

Τα δείγματα αραίωθηκαν με ρυθμιστικό διάλυμα αραίωσης.

### E. Χρονική καθυστέρηση μεταξύ τελευταίου βαθμονομητή και προσθήκης δείγματος

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

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

### F. εφε Hook

Δεν παρατηρήθηκε επίδραση Hook με υψηλή δόση με συγκέντρωση IGFBP-3 έως 600000 ng / ml. Ένα δείγμα με κορυφαία IGFBP-3 έως 600000 ng / ml δίνει υψηλότερα cpm από το τελευταίο σημείο βαθμονόμησης.

## XIV. ΠΕΡΙΟΡΙΣΜΟΙ

- Δείγματα από ασθενείς που έχουν λάβει παρασκευάσματα μονοκλωνικών αντισωμάτων ποντικού για σκοπούς διάγνωσης ή θεραπείας, ενδεχομένως να περιέχουν ανθρώπινα αντισώματα αντίποντικού (HAMA). Σε αυτά τα δείγματα μπορούν να παρατηρηθούν ψευδώς ανημένες ή ψευδώς μειωμένες τιμές, όταν ελέγχονται με κιτ προσδιορισμού που χρησιμοποιούν μονοκλωνικά αντισώματα ποντικού.
- Τα ετεροφιλικά αντισώματα στον ανθρώπινο ορό μπορούν να αντιδράσουν με ανοσοσφαρίνες των αντιδραστηρίων, προκαλώντας παρεμβολή σε *in vitro* ανοσοπροσδιορισμούς.

Ασθενείς που εκτίθενται τακτικά σε ζώα ή προϊόντα ζώικου ορού ενδεχομένως να είναι επιφρεπείς σε αυτήν την παρεμβολή. Παθολογικές τιμές μπορούν να παρατηρηθούν σε παρουσία ετεροφιλικών αντισωμάτων. Αξιολογείται με προσοχή τα αποτελέσματα ασθενών, στους οποίους υπάρχει υποψία αυτών των αντισωμάτων.

Εάν τα αποτελέσματα δεν είναι σύμφωνα με άλλες κλινικές παρατηρήσεις, θα χρειαστεί η λήψη περαιτέρω πληροφοριών πριν από τη θέση της διάγνωσης.

## XV. ΕΣΩΤΕΡΙΚΟΣ ΠΟΙΟΤΙΚΟΣ ΕΛΕΓΧΟΣ

- Εάν τα αποτελέσματα που λαμβάνονται για το υλικό ελέγχου 1 ή/και το υλικό ελέγχου 2 δε βρίσκονται εντός του πεδίου τιμών που καθορίζεται στην ετικέτα του φαΐλιδου, τα αποτελέσματα δεν είναι δυνατό να χρησιμοποιηθούν, εκτός εάν έχει ικανοποιητική εξήγηση για την ασυμφωνία.
- Εάν είναι επιθυμητό, κάθε εργαστήριο μπορεί να δημιουργήσει τα δικά του μείγματα δειγμάτων ελέγχου, τα οποία πρέπει να διατηρούνται κατεψυγμένα σε κλάσματα. Μην καταψύχετε-αποψύχετε περισσότερο από δύο φορές.

- Τα κριτήρια αποδοχής για τη διαφορά μεταξύ των διπλών αποτελεσμάτων των δειγμάτων θα πρέπει να βασίζονται σε ορθές εργαστηριακές πρακτικές.

## XVI. ΔΙΑΣΤΗΜΑΤΑ ΑΝΑΦΟΡΑΣ

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

Φυσιολογικά άτομα

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

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

## XVII. ΠΡΟΦΥΛΑΞΕΙΣ ΚΑΙ ΠΡΟΕΙΔΟΠΟΙΗΣΕΙΣ

### Ασφάλεια

Μόνο για διαγνωστική χρήση *in vitro*.

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

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

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

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

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

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

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

## XVIII. ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ

1. LEROITH D., BONDY C., YAKAR S., LIU JL., BUTLER A. **The somatomedin hypothesis : 2001.** Endocr Rev 2001; 22:53-74.
2. POLLAK MN., SCHERNHAMMER ES., HANKINSON SE. **Insulin-like growth factors and neoplasia.** Nat Rev Cancer 2004; 4:505-518.
3. YUEN K., FRYSTYK J., UMPLEBY M., FRYKLUND L., DUNGER D. **Changes in free rather than total insulin-like growth factor-I enhance insulin sensitivity and suppress endogenous peak growth hormone (GH) release following short-term low dose GH administration in young healthy adults.** J Clin Endocrinol Metab 2004; 89:3956-3964.
4. KHANDWALA HM., McCUTCHEON IE., FLYVBJERG A., FRIEND KE. **The effects of insulin-like growth factors on tumorigenesis and neoplastic growth.** Endocr Rev 2000; 21:215-244.
5. RENEHAN AG., ZWAHLEN M., MINDER PC., O'DWYSER ST., SHALET PS., EGGER PM. **Insulin-like growth factor (IGF)-I, IGF binding protein-3, and cancer risk : systematic review and meta-regression analysis.** The Lancet 2004; 363:1346-1353.
6. JUUL A., SCHEIKE T., DAVIDSEN M., GYLLENborg J., JORGENSEN T. **Low serum insulin-like growth factor I is associated with increased risk of ischemic heart disease : a population-based case-control study.** Circulation 2002; 106:939-944.
7. SANDHU MS., HEALD AH., GIBSON JM., CRUICKSHANK JK., DUNGER DB., WAREHAM NJ. **Circulating concentrations of insulin-like growth factor-I and development of glucose intolerance : a prospective observational study.** The Lancet 2002; 359:1740-1745.
8. VAESEN N., HEUTINK P., JANSEN JA., WITTEMAN JC., TESTERS L., HOFMAN A., LAMBERTS SW., OOSTRA BA., POLS HA., VAN DUIJN CM. **A polymorphism in the gene for IGF-I : functional properties and risk for type 2 diabetes and myocardial infarction.** Diabetes 2001; 50:637-642.
9. JUUL A. **Serum levels of insulin-like growth factor-I and its binding proteins in health and disease.** Growth Horm IGF Res 2003; 13:113-170.
10. FIRTH SM., BAXTER RC. **Cellular actions of the insulin-like growth factor binding proteins** Endocr Rev 2002; 23:824-854.
11. BAXTER RC., MEKA S., FIRTH SM. **Molecular distribution of IGF binding protein-5 in human serum.** J Clin Endocrinol Metab 2002; 87:271-276.
12. RICORT JM. **Insulin-like growth factor binding protein (IGFBP) signaling.** Growth Horm IGF Res 2004; 14:277-286.
13. JONES JI., CLEMMONS DR. **Insulin-like growth factors and their binding proteins : biological actions.** Endocr Rev 1995; 16:3-34.
14. ALI O., COHEN P., LEE KW. **Epidemiology and biology of insulin-like growth factor binding protein-3 (IGFBP-3) as an anti-cancer molecule.** Horm Metab Res 2003; 35:726-733.
15. CHAN SS., TWIGG SM., FIRTH SM., BAXTER RC. **Insulin-like growth factor binding protein-3 leads to insulin resistance in adipocytes.** J Clin Endocrinol Metab 2005; 90:6588-6595.
16. JUUL A., MAIN K., BLUM WF., LINDHOLM J., RANKE MB., SKAKKEBAEK NE.

The ration between serum levels of insulin-like growth factor (IGF)-I and the IGF binding proteins (IGFBP-1, 2 and 3) decreases with age in healthy adults and is increased in acromegalic patients.  
 Clin Endocrinol (Oxf) 1994; 41:85-93.

17. BLUM WF., ALBERTSSON-WIKLAND K., ROSBERG S., RANKE MB. Serum levels of insulin-like growth factor I (IGF-I) and IGF binding protein 3 reflect spontaneous growth hormone secretion. J Clin Endocrinol Metab 1994; 76:1610-1616.
18. FRYSTYK J., IVARSEN P., SKJAERBAEK C., FLYVBJERG A., PEDERSEN EB., ORSKOV H. Serum-free insulin-like growth factor I correlates with clearance in patients with chronic renal failure. Kidney Int 1999; 56:2076-2084.
19. FRYSTYK J. In Endocrinology and Metabolism – Clinics of North America 2005 : Endocrinology of aging, Chapter XI : Aging somatotropic axis mechanisms and implications of IGFBP adaptation.

#### XIX. ΠΕΡΙΛΗΨΗ ΤΟΥ ΠΡΩΤΟΚΟΛΛΟΥ

	ΣΥΝΟΛΙΚΕΣ ΜΕΤΡΗΣΕΙΣ (μl)	ΒΑΘΜΟΝΟ ΜΗΤΕΣ Υλικά ελέγχου (μl)	ΔΕΙΓΜΑ(ΤΑ) (μl)
<b>ΔΕΙΓΜΑΤΑ (-ΤΑ)</b> <b>ΑΡΑΙΩΣΗΣ</b> Ρεθμιστικό διάλυμα αραιώσης Δείγμα	- -	- -	1000 10
Ανάδευση	Αναμείκτης στροβιλισμού (τύπου vortex)		
<b>ΕΠΩΑΣΗ</b> Βαθμονομητές (0 έως 5), <b>Υλικά ελέγχου</b> Αραιωμένα δείγματα	- -	100 -	- 100
Ιχνηθέτης	50	50	50
Επώαση	120 λεπτά σε θερμοκρασία δοκατίου (18-25°C) με ανάδευση στις 400 rpm		
Διαχωρισμός Διάλυμα πλύσης εργασίας Διαχωρισμός Διάλυμα πλύσης εργασίας Διαχωρισμός	-	Αναρρόφηση (ή μετάγγιση) 2 ml Αναρρόφηση (ή μετάγγιση) 2 ml Αναρρόφηση (ή μετάγγιση)	
Μέτρηση	Μέτρηση σωληναρίων επί 60 δευτερόλεπτα		

Przed zastosowaniem należy przeczytać cały protokół.

## IGFBP-3-IRMA

### I. PRZEZNACZENIE

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

### II. INFORMACJE OGÓLNE

- A. Nazwa firmowa : DIAsource IGFBP-3-IRMA Kit
- B. Numer katalogowy: KIP1171 : 96 tests
- C. Wyprodukowano przez: DIAsource ImmunoAssays S.A.  
Rue du Bosquet, 2, B-1348 Louvain-la-Neuve, Belgium.

Dział pomocy technicznej oraz informacje dotyczące zamówień:  
Tel : +32 (0)10 84.99.11                      Fax : +32 (0)10 84.99.91

### III. INFORMACJE KLINICZNE

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

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

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

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

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

#### IV. ZAGADNIENIA DOTYCZĄCE METODY

Oznaczenie DIAsource IGFBP-3-IRMA jest testem immunoradiometrycznym przeprowadzanym z wykorzystaniem opłaszczonych probówek. Przechwycone przeciwiało Mab1 jest przyłączone do dolnej wewnętrznej powierzchni probówki plastycznej. Kalibratory lub próbki, dodawane do probówek, będą na początku wykazywały niskie powinnowactwo do Mab1. Dodanie Mab2, przeciwiała sygnałowego oznakowanego  $^{125}\text{I}$  zakończy etap i wyzwoli reakcję immunologiczną. Po przephukaniu, stopień radioaktywności związanej z probówką odzwierciedla stężenie antygenu..

#### V. DOSTARCZONE ODCZYNNIKI

Odczynniki	Zestaw 96 oznaczeń	Kolor	Rekonstytucja
Probówki opłaszczone przeciwiałami anty-IGFBP3 (przeciwiała monoklonalne)	2 x 48	kość słoniowa	<b>Gotowe do zastosowania</b>
Przeciwiała monoklonalne anty-IGFBP-3- $^{125}\text{I}$ w buforze Tris z albuminą z surowicy bydlęcej, azykiem (<0,1%) i obojętnym czerwonym barwnikiem	1 fiołka 5,5 ml 700 kBq	czerwony	<b>Gotowe do zastosowania</b>
Kalibratory 1-5 w buforze Tris HCl z albuminą z surowicy bydlęcej i tymolem. <b>Dokładne wartości na etykietach fiolek.</b>  Kalibratory są wstępnie rozcieńczone	5 fiołek liofil.	żółty	<b>Dodać 1 ml wody destylowanej</b>
Bufor do rozcieńczania: Bufor Tris HCl z albuminą z surowicy bydlęcej i azykiem (<0,1%)	1 fiołka 100 ml	zielony	<b>Gotowe do zastosowania</b>
Roztwór pluczający (TRIS-HCl)	1 fiołka 10 ml	brązowy	<b>Rozcieńczyć 70x wodą destylowaną (wykorzystać mieszadło magnetyczne).</b>
Kontrole - N = od 1 do 2 w buforze Tris HCl z surowicą plazma z tymolem  Kontrole są wstępnie rozcieńczone	2 fiołek liofil.	srebrny	<b>Dodać 1 ml wody destylowanej</b>

**Uwaga:** jako kalibrator zerowy należy użyć bufor do rozcieńczania.

#### VI. MATERIAŁY WYMAGANE, ALE NIEDOSTARCZONE

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

- Woda destylowana
- Pipety do dostarczania objętości: 10 µl, 50 µl, 100 µl i 1 ml. (zaleca się stosowanie właściwych pipet z jednorazowymi końcówkami plastycznymi)
- Probówki plastikowe do rozcieńczania próbek
- Mieszadło wirowe
- Wytrząsarka do probówek (400 rpm)
- Mieszadło magnetyczne
- Strzykawka automatyczna o objętości 5 ml (rodzaj Cornwall) do plukania
- Układ do aspiracji (opcjonalnie)
- Może być wykorzystywany jakkolwiek licznik gamma odpowiedni do pomiaru  $^{125}\text{I}$  (minimalny uzysk 70%).

#### VII. PRZYGOTOWANIE ODCZYNNIKÓW

- A. Kalibratory:** Rekonstytuować kalibratory przy pomocy 1 ml wody destylowanej.

**B. Kontrole:** Kontrole należy rekonstytuować przy pomocy 1 ml wody destylowanej.

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

#### VIII. PRZECHOWYWANIE I DATA WAŻNOŚCI ODCZYNNIKÓW

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

#### IX. POBIERANIE I PRZYGOTOWANIE MATERIAŁU DO BADANIA

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

#### X. PROCEDURA

##### A. Uwagi dotyczące obsługi

Nie wolno wykorzystywać składników zestawu po upłynięciu daty ważności. Nie wolno mieszać materiałów pochodzących z różnych serii zestawów. Przed wykorzystaniem wszystkie odczynniki powinny osiągnąć temperaturę pokojową.

Wszystkie odczynniki i próbki należy dokładnie wymieszać przez delikatne potrząsanie lub obracanie. Aby uniknąć zanieczyszczenia krzyżowego do dodawania poszczególnych odczynników i próbek należy wykorzystywać czyste, jednorazowe końcówki pipet.

Pipety wysokiej precyzji lub pipety automatyczne poprawiają precyzję wykonania oznaczenia. Przestrzegać czasów inkubacji.

Przygotować krzywą kalibracyjną dla każdego cyklu pomiarowego, nie wolno wykorzystywać danych z poprzednich oznaczeń.

##### B. Procedura

- Oznaczyć po jednej zwykłej probówce plastikowej dla każdej próbki.
- Dozować po 1 ml buforu do rozcieńczania do każdej probówki.
- Dodać 10 µl próbki do tych probówek.
- Dla każdego kalibratora, próbki i kontroli należy oznaczyć opłaszczone probówki w badaniach podwójnych. W celu określenia całkowitych zliczeń należy oznaczyć 2 zwykłe probówki.
- Szybko wymieszać odwracając: kalibratory, wcześniej rozcieńczone próbki i dozować po 100 µl materiału do odpowiednich probówek. (jako kalibratora zerowego, należy użyć buforu do rozcieńczania).
- Do każdej próbówki, w tym do probówek nieopłaszczonych do całkowitego zliczania, dodać po 50 µl przeciwiała anty-IGFBP-3, znakowanych Jodem<sup>125</sup>.
- Inkubować przez 120 minut w temperaturze pokojowej (18-25°C) w wytrząsarce do probówek (400 rpm).
- Aspirować (lub odlać) zawartość każdej próbówki (z wyjątkiem probówek do całkowitego zliczania). Aby usunąć cały płyn należy upewnić się, że plastikowa końcówka aspiratora osiągnęła dno opłaszczonej probówki.
- Przepłukać próbówki przy pomocy 2 ml roboczego roztworu pluczającego (z wyjątkiem probówek do całkowitego zliczania) i zaaspirować (lub dekantować). W trakcie dodawania roboczego roztworu pluczającego należy unikać tworzenia piany.
- Ponownie przepłukać próbówki przy pomocy 2 ml roztworu pluczającego (z wyjątkiem probówek do całkowitego zliczania) i aspirować (lub odlać).
- Pozostawić próbówki w pozycji stojącej do góry na dwie minuty i aspirować pozostałe krople płynu.
- Zliczać próbówki w liczniku gamma przez 60 sekund.

## XI. OBLICZANIE WYNIKÓW

- Obliczyć średnią oznaczeń podwójnych.
- W kratkę wykreślić c.p.m. (rzędna) dla każdego kalibratora wobec odpowiadającego stężenia IGFBP-3 (odcienia) oraz wykreślić krzywą kalibracji przez punkty kalibratora, odrzucając oczywiste wartości odbiegające od linii środkowej.
- Odczytać stężenie dla każdej kontroli i próbki przez naniesienie na krzywą kalibracyjną.
- Redukcja danych przy pomocy komputera pozwoli uprościć te obliczenia. Jeżeli ma być zastosowane automatyczne przetwarzanie wyników, zaleca się dopasowanie krzywej logistycznej 4 parametrowej.

## XII. PRZYKŁAD DANYCH TYPOWYCH

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

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

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

## XIII. DZIAŁANIE I OGRANICZENIA

### A. Granica wykrywania

Limit ślepej próby (LOB), limit wykrywalności (LOD) i limit kwantyfikacji (LOQ) zostały określone zgodnie z wytycznymi CLSI EP17-A.

LOB obliczono przez kilkakrotne zmierzenie ślepej próby i obliczenie 95. percentyla rozkładu wartości testowych. Obliczono LOB na 27,9 ng / ml. LOD obliczono zgodnie z opisem w wytycznych. LOD obliczono na 61,63 ng / ml.

LOQ obliczono przez przetestowanie 4 próbek o niskiej wartości 10 razy w innym teście.

Obliczono LOQ na 123,1 ng / ml przy CV 20%.

### B. Swoistość

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

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

### C. Precyzyja

#### PRECYZJA W SERII

#### PRECYZJA MIĘDZY SERIAMI

Suwrowica	N	$\bar{X} \pm SD$ (ng/ml)	CV (%)	Suwrowica	N	$\bar{X} \pm SD$ (ng/ml)	CV (%)
A	20	1647 ± 76	4.6	A	10	1708 ± 32	1.8
B	20	4443 ± 211	4.8	B	10	4426 ± 18	3.1

SD Odchylenie standardowe; CV: Współczynnik zmienności

### D. Dokładność

#### BADANIE ROZCIEŃCZENIA

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

Próbki zostały rozcieńczone przy pomocy buforu do rozcieńczania.

## BADANIE ODZYSKU

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

### E. Opóźnienie pomiędzy oznaczeniem ostatniego kalibratora i dozowaniem próbki

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

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

### F. Efekt Hook

Nie zaobserwowano efektu dużej dawki Hook przy stężeniu IGFBP-3 do 600000 ng/ml. Próbka wzbogacona IGFBP-3 do 600000 ng/ml daje wyższe cpm niż ostatni punkt kalibratora.

## XIV. OGRANICZENIA

- Próbki od pacjentów, którzy w celach diagnostycznych lub terapeutycznych otrzymywali preparaty z mysich przeciwciąż monoklonalnych, mogą zawierać ludzkie przeciwciąża anty-mysie (HAMA). Próbki takie, oznaczane z użyciem zestawów testowych wykorzystujących mysie przeciwciąża monoklonalne, mogą wykazywać wartości fałszywie zawyżone lub zaniżone.
- Przeciwiąża heterofilne w ludzkiej surowicy mogą reagować z immunoglobulinami odczynnika, interferując z oznaczeniami immunologicznymi przeprowadzanymi in vitro. Pacjenci rutynowo eksponowani na zwierzęta lub produkty z surowic zwierzęcych mogą wykazywać skłonność do takich interferencji i w razie obecności przeciwciąż heterofilnych występować mogą u nich nieprawidłowe wyniki testów. Wyniki oznaczeń próbek od pacjentów z takimi przeciwciążami należy interpretować z ostrożnością. Jeżeli wyniki nie są zgodne z obserwacjami klinicznymi, przed postawieniem rozpoznania powinny być uzyskane dodatkowe informacje.

## XV. WEWNĘTRZNA KONTROLA JAKOŚCI

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

## XVI. ZAKRESY REFERENCYJNE

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

Zdrowi osobnicy

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

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

## XVII. ŚRODKI OSTROŻNOŚCI I OSTRZEŻENIA

### Bezpieczeństwo

Tylko do diagnostyki *in vitro*.

Zestaw zawiera  $^{125}\text{I}$  (Okres połowicznego rozpadu: 60 dni), emittujący promieniowanie jonizujące X (28 keV) i  $\gamma$  (35,5 keV).

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

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

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

Składniki zawierające ludzką krew, dostarczone w zestawie, zostały przebadane metodami zaaprobowanymi przez instytucje europejskie i/lub FDA. Stwierdzono, że nie zawierają one HbsAg, przeciwciąż anty-HCV, anty-HIV-1 i 2. Żadna ze znanych metod nie może dać całkowitej pewności, że materiały pochodzenia ludzkiego nie przenoszą czynników zakaźnych wirusowego zapalenia wątroby, AIDS i innych. Dlatego postępowanie z odczynnikami i próbami surowiczy lub osocza powinno być zgodne z miejscowymi procedurami dotyczącymi bezpieczeństwa.

Produkty pochodzenia zwierzęcego były pobierane od zdrowych zwierząt. Składniki bydlęce pochodzą z krajów, w których nie odnotowano występowania BSE. Pomimo to, składniki zawierające substancje pochodzenia zwierzęcego powinny być traktowane jako potencjalnie zakaźne.

Unikać kontaktu skóry z odczynnikami (zawierającymi azydęk sodowy jako środek konserwujący). Azydek znajdujący się w zestawie może reagować z miedzią i ołówkiem w układzie kanalizacyjnym tworząc związki o właściwościach wybuchowych. W czasie płukania odprowadzany płyn należy płukać dużymi objętościami wody, aby zapobiec kumulacji azydków.

Nie wolno palić, spożywać napojów ani pokarmów, bądź używać kosmetyków w miejscu pracy. Nie pipetować ustami. Zakładać ubranie ochronne i rękawiczki jednorazowe.

## XVIII. BIBLIOGRAFIA

- LEROITH D., BONDY C., YAKAR S., LIU JL., BUTLER A. *The somatomedin hypothesis : 2001*. Endocr Rev 2001; 22:53-74.
- POLLAK MN., SCHERNHAMMER ES., HANKINSON SE. *Insulin-like growth factors and neoplasia*. Nat Rev Cancer 2004; 4:505-518.
- YUEN K., FRYSTYK J., UMPLEBY M., FRYKLUND L., DUNGER D. *Changes in free rather than total insulin-like growth factor-I enhance insulin sensitivity and suppress endogenous peak growth hormone (GH) release following short-term low dose GH administration in young healthy adults*. J Clin Endocrinol Metab 2004; 89:3956-3964.
- KHANDWALA HM., McCUTCHEON IE., FLYVBJERG A., FRIEND KE. *The effects of insulin-like growth factors on tumorigenesis and neoplastic growth*. Endocr Rev 2000; 21:215-244.
- RENEHAN AG., ZWAHLEN M., MINDER PC., O'DWYSER ST., SHALET PS., EGGER PM. *Insulin-like growth factor (IGF)-I, IGF binding protein-3, and cancer risk : systematic review and meta-regression analysis*. The Lancet 2004; 363:1346-1353.
- JUUL A., SCHEIKE T., DAVIDSEN M., GYLLENborg J., JORGENSEN T. *Low serum insulin-like growth factor I is associated with increased risk of ischemic heart disease : a population-based case-control study*. Circulation 2002; 106:939-944.
- SANDHU MS., HEALD AH., GIBSON JM., CRUICKSHANK JK., DUNGER DB., WAREHAM NJ. *Circulating concentrations of insulin-like growth factor-I and development of glucose intolerance : a prospective observational study*. The Lancet 2002; 359:1740-1745.
- VAESSEN N., HEUTINK P., JANSSEN JA., WITTEMAN JC., TESTERS L., HOFMAN A., LAMBERTS SW., OOSTRA BA., POLS HA., VAN DUIJN CM. *A polymorphism in the gene for IGF-I : functional properties and risk for type 2 diabetes and myocardial infarction*. Diabetes 2001; 50:637-642.
- JUUL A. *Serum levels of insulin-like growth factor-I and its binding proteins in health and disease*. Growth Horm IGF Res 2003; 13:113-170.
- FIRTH SM., BAXTER RC. *Cellular actions of the insulin-like growth factor binding proteins*. Endocr Rev 2002; 23:824-854.
- BAXTER RC., MEKA S., FIRTH SM. *Molecular distribution of IGF binding protein-5 in human serum*. J Clin Endocrinol Metab 2002; 87:271-276.
- RICORT JM. *Insulin-like growth factor binding protein (IGFBP) signaling*. Growth Horm IGF Res 2004; 14:277-286.
- JONES JI., CLEMMONS DR. *Insulin-like growth factors and their binding proteins : biological actions*. Endocr Rev 1995; 16:3-34.
- ALI O., COHEN P., LEE KW. *Epidemiology and biology of insulin-like growth factor binding protein-3 (IGFBP-3) as an anti-cancer molecule*. Horm Metab Res 2003; 35:726-733.
- CHAN SS., TWIGG SM., FIRTH SM., BAXTER RC. *Insulin-like growth factor binding protein-3 leads to insulin resistance in adipocytes*. J Clin Endocrinol Metab 2005; 90:6588-6595.
- JUUL A., MAIN K., BLUM WF., LINDHOLM J., RANKE MB., SKAKKEBAEK NE. *The ration between serum levels of insulin-like growth factor (IGF)-I and the IGF binding proteins (IGFBP-1, 2 and 3) decreases with age in healthy adults and is increased in acromegalic patients*. Clin Endocrinol (Oxf) 1994; 41:85-93.

17. BLUM WF., ALBERTSSON-WIKLAND K., ROSBERG S., RANKE MB.  
**Serum levels of insulin-like growth factor I (IGF-I) and IGF binding protein 3 reflect spontaneous growth hormone secretion.**  
 J Clin Endocrinol Metab 1994; 76:1610-1616.
18. FRYSTYK J., IVARSEN P., SKJAERBAEK C., FLYVBJERG A., PEDERSEN EB., ORSKOV H.  
**Serum-free insulin-like growth factor I correlates with clearance in patients with chronic renal failure.**  
 Kidney Int 1999; 56:2076-2084.
19. FRYSTYK J.  
 In Endocrinology and Metabolism – Clinics of North America 2005 :  
 Endocrinology of aging, Chapter XI : Aging somatotropic axis mechanisms  
 and implications of IGFBP adaptation.

**XIX. PODSUMOWANIE PROTOKOLU**

	CALKO-WITA LICZBA ZLICZEŃ μl	KALIBRATORY KONTROLE μl	PRÓBKA(I) μl
<b>ROZCIEŃCZANE</b> <b>PRÓBKI</b> Bufor do rozcieńczania Próbka	- -	- -	1000 10
Wytrząsanie	Vortex		
<b>INKUBACJA</b> Kalibratory (0 - 5), kontrole Rozcieńczone próbki	- -	100 -	- 100
Znacznik izotopowy	50	50	50
Inkubacja	120 minut w temperaturze pokojowej (18-25°C), wytrząsać przy 400 rpm.		
Rozdzielenie Roztwór płuczący Rozdzielenie Roztwór płuczący Rozdzielenie	-	aspiracja (lub odlewanie) 2 ml aspiracja (lub odlewanie) 2 ml aspiracja (lub odlewanie)	
Zliczanie	Zliczanie probówek przez 60 sekund		



hu

Használat előtt olvassa el a teljes használati utasítást.

## IGFBP-3-IRMA

### I. VIZSGÁLAT CÉLJA

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

### II. ÁLTALÁNOS INFORMÁCIÓK

**Bejegyzett név :** DIAsource IGFBP-3-IRMA Reagenskészlet

**Katalógusszám :** KIP1171: 96 vizsgálat

**Gyártó :** DIAsource ImmunoAssays S.A.  
Rue du Bosquet, 2, B-1348 Louvain-la-Neuve, Belgium.

**Gyakorlati jellegű vagy rendeléssel kapcsolatos kérdésekkel hívja a következő számot :**  
**Tel : +32 (0)10 84.99.11**      **Fax : +32 (0)10 84.99.91**

### III. KLINIKAI HÁTTÉR

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

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

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

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

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

## IV. A MÓDSZER ELVE

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

## V. A REAGENSKÉSZLET TARTALMA

Reagens	Mennyiség	Szín	Hígítás
Monoklonális anti-IGFBP-3 ellenanyaggal borított csövek	2 x 48	elefántcsontszín	Használatra kész.
Anti-IGFBP-3- $^{125}\text{I}$ (monoklonális ellenanyag) trisz-maleát pufferben, bovin szérummal, aziddal (<0.1%) és inert piros festékkel	1 ampulla 5.5 ml 700 kBq	piros	Használatra kész.
Kalibrátor 1-5, Tris-HCl pufferben bovin szérum albuminnal és thymollal. A pontos koncentrációértékeket lásd az ampullák címéin.  Előre hígítva.	5 ampulla liofilizált	sárga	Adjon hozzá 1 ml desztillált vizet
Hígító puffer: Tris-HCl puffer, bovin albuminnal és aziddal (<0.1%)	1 ampulla 100 ml	zöld	Használatra kész.
Mosóoldat (TRIS-HCl)	1 ampulla 10 ml	barna	<b>Hígítsa</b> 70x desztillált vízzel (használjon mágneses keverőt)
Kontroll - N = 1 vagy 2, Tris-HCl pufferben Emberi plazma, thymollal  Előre hígítva.	2 ampulla liofilizált	ezüst	Adjon hozzá 1 ml desztillált vizet

**Megjegyzés:** nulla kalibrátorként használja a hígító puffert.

## VI. A FELHASZNÁLÓ ÁLTAL BIZTOSÍTOTT ESZKÖZÖK

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

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

## VII. REAGENSEK ELŐKÉSZÍTÉSE

- Kalibrátorok :** Oldja be a kalibrátorokat 1 ml desztillált vízben.
- Kontrollok :** Oldja be a kontrollokat 1 ml desztillált vízben.
- Hígított mosóoldat:** Készítsen megfelelő mennyiségű hígított mosóoldatot úgy, hogy 69 rész desztillált vízhez 1 rész mosóoldatot kever

(70x). Homogenizálja mágneses keverő segítségével. A napi vizsgálatok végeztével öntse ki a megmaradt hígított mosóoldatot.

## VIII. A REAGENSEK TÁROLÁSA ÉS ELTARTHATÓSÁGA

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

## IX. MINTAVÉTEL ÉS ELŐKÉSZÍTÉS

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

## X. ELJÁRÁS

### A. Tudnivalók

Ne használja a reagenseket a lejáratú idejükön túl. Ne keverjen össze eltérő gyártási számára reagenskészletekből származó anyagokat. Használat előtt várja meg, amíg a reagensek szobahőmérsékletre melegednek. Óvatos mozgatással vagy keveréssel alaposan homogenizálja a reagenseket. minden reagens és minta beméréséhez használjon tiszta eldobható pipettahegyet, hogy elkerülje az anyagok beszennyeződését. Nagypontosságú pipetták, vagy automata pipettázó készülék használata javítja a vizsgálat pontosságát. Tartsa be a megadott inkubációs időket. minden vizsgálathoz készítsen új kalibrációs görbét, ne használja korábbi mérések adatait.

### B. A vizsgálat menete

- Feliratozzon minden minta számára egy-egy egyszerű műanyag csövet.
- Pipettázzon 1 ml hígító puffer minden csőbe.
- Mérjen 10 µl-t a mintákból a megfelelő csövekbe.
- Feliratozzon 2-2 csövet a kalibrátorok, a minták és a kontrollok számára. A teljes radioaktivitás méréséhez használjon 2 reagens nélküli csövet
- Kissé vortexelje meg a kalibrátorokat, kontrollokat és az előre meghígított mintákat, majd mérjen 100 µl-t mindegyikből a megfelelő csövekbe. (nulla kalibrátorként használja a hígító puffer)
- Mérjen 50 µl tracer minden csőbe (a totálókba is).
- Inkubálja a csöveget 120 percig szobahőmérsékleten (18-25°C) rázatás mellett (400 rpm).
- Szívja le (vagy öntse le) a csövek tartalmát (kivéve a totálok). Ügyeljen, hogy a vízlelgszívattyú műanyag hegye leérjen a csövek aljáig, és így az összes folyadékot eltávolítsa.
- Mossa a csöveget 2 ml hígított mosóoldattal (kivéve a totálok), majd távolítsa el a folyadékot. Vigyázzon, hogy a mosóoldat beméréskor ne habosodjon.
- Ismétossa a csöveget 2 ml mosóoldattal (kivéve a totálok), majd szívja (vagy öntse) le a folyadékot.
- Hagyja állni a csöveget 2 percig, majd távolítsa el a megmaradt folyadékcsépet.
- Mérje a radioaktivitást gamma-sugárzásmórral 60 másodpercig.

## XI. EREDMÉNYEK KISZÁMÍTÁSA

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

## XII. JELLEMZŐ MÉRÉSI EREDMÉNYEK

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

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

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

## XIII. A VIZSGÁLAT JELLEMZŐI ÉS KORLÁTAI

### A. A kimutathatóság alsó határa

A Blank (LOB), a detektálás (LOD) és a mennyiségi meghatározás (LOQ) határat a CLSI EP17-A irányíthatással összhangban határozták meg. A LOB-ot úgy számítottuk ki, hogy a vakpróbát többször megmértük, és kiszámítottuk a tesztértekkel eloszlásának 95. százalékát. A LOB kiszámítása 27,9 ng / ml volt.

Az LOD-t az útmutatóban leírtak szerint számítottuk ki. Az LOD számítása 61,63 ng / ml volt.

A LOQ kiszámításához 4 alacsony értékű mintát 10-szer teszteltek különböző tesztriben. A LOQ-t úgy számítottuk, hogy 123,1 ng / ml, 20% CV-vel.

### B. Specificitás

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

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

### C. Reprodukálhatóság

VIZSGÁLATON BELÜLI				VIZSGÁLATOK KÖZÖTTI			
Savó	N	$\text{\times} \pm \text{SD}$ (ng/ml)	CV %	Savó	N	$\text{\times} \pm \text{SD}$ (ng/ml)	CV %
A	20	1647 ± 76	4.6	A	10	1708 ± 32	1.8
B	20	4443 ± 211	4.8	B	10	4426 ± 18	3.1

SD : Standard deviáció; CV: variációs koeficiens

### D. Pontosság

#### VISSZANYERÉSI VIZSGÁLAT

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

## HÍGÍTÁSI VIZSGÁLAT

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

A minták hígítása a hígító pufferrel történt.

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

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

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

### F. Hook effectus

Nem tapasztaltunk nagy dózisú Hook-hatást, ha a IGFBP-3-koncentráció 600000 ng / ml-ig terjedt. A IGFBP-3-val 600000 ng / ml-ig megtöltött minta magasabb cpm-t ad, mint az utolsó kalibráló pont.

## XIV. KORLÁTOZÁSOK

- Az olyan betegektől származó minták, akik – a diagnózis vagy a terápia miatt – egér monoklonális antitestekből készült készítményeket kaptak, humán antigére antitesteket (HAMA) tartalmazhatnak. Az ilyen minták – ha azokat egér monoklonális antitesteket alkalmazó vizsgálati kitekkel tesztelik – vagy hamisán magas, vagy hamisán alacsony értékeket mutathatnak.
- A humán szérumban jelen lévő heterophil antitestek reakcióba léphetnek a reagens immunoglobulinjeivel, vagyis megzavarhatják az in vitro immunvizsgálatokat.
- A rutinszerűen az állatok, illetve állati szérumból készült termékek hatásának kitett betegek hajlamosak lehetnek az ilyen jellegű interferenciára, egyszersem akár anomális értékek is megfigyelhetők heterophil antitestek jelenlétében. Körültekintően kell kiértékelni azoknak a betegeknek az eredményét, akiknél gyanítható, hogy ilyen antitestük van.
- Ha az eredmények nem összeegyeztethetők a többi klinikai megfigyeléssel, a diagnózis felállítása előtt további adatokra van szükség.

## XV. BELSŐ MINŐSÉGELLENŐRZÉS

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

## XVI. REFERENCIA-TARTOMÁNY

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

Normál esetek:

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

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

## XVII. MUNKAVÉDELEM

### Biztonsági előírások

Csak *in vitro* diagnosztikai felhasználásra.

A kit röntgen (28 keV) és gamma (35,5 keV) sugárzó  $^{125}\text{I}$  izotópot (felezési idő: 60 nap) tartalmaz.

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

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

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

A készlet emberi vérből készült reagenseit európai szabványok szerinti és/vagy az FDA által minősített módszerrel HBsAg-tól, valamint anti-HCV, és anti-HIV-1 és 2 ellenanyagoktól mentesnek találták. Azonban egyetlen ma ismert módszer alapján sem állítható biztosan, hogy az emberi vérből készült anyagok nem okozhatnak hepatitis, AIDS-et vagy más fertőző betegséget. Ezért minden ilyen reagenst és minden savó-, illetve plazmamaintárt a fertőző anyagokra vonatkozó helyi biztonsági előírásoknak megfelelően kell kezelni.

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

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

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

## XVIII. IRODALOM

1. LEROITH D., BONDY C., YAKAR S., LIU JL., BUTLER A.

**The somatomedin hypothesis : 2001.**

Endocr Rev 2001; 22:53-74.

2. POLLAK MN., SCHERNHAMMER ES., HANKINSON SE.

**Insulin-like growth factors and neoplasia.**

Nat Rev Cancer 2004; 4:505-518.

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

J Clin Endocrinol Metab 2004; 89:3956-3964.

4. KHANDWALA HM., McCUTCHEON IE., FLYVBJERG A., FRIEND KE. **The effects of insulin-like growth factors on tumorigenesis and neoplastic growth.**

Endocr Rev 2000; 21:215-244.

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

The Lancet 2004; 363:1346-1353.

6. JUUL A., SCHEIKE T., DAVIDSEN M., GYLLENborg J., JORGENSEN T. **Low serum insulin-like growth factor I is associated with increased risk of ischemic heart disease : a population-based case-control study.**

Circulation 2002; 106:939-944.

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

The Lancet 2002; 359:1740-1745.

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

Diabetes 2001; 50:637-642.

9. JUUL A. **Serum levels of insulin-like growth factor-I and its binding proteins in health and disease.**

Growth Horm IGF Res 2003; 13:113-170.

10. FIRTH SM., BAXTER RC. **Cellular actions of the insulin-like growth factor binding proteins**

Endocr Rev 2002; 23:824-854.

11. BAXTER RC., MEKA S., FIRTH SM. **Molecular distribution of IGF binding protein-5 in human serum.**

J Clin Endocrinol Metab 2002; 87:271-276.

12. RICORT JM. **Insulin-like growth factor binding protein (IGFBP) signaling.**

Growth Horm IGF Res 2004; 14:277-286.

13. JONES JI., CLEMMONS DR. **Insulin-like growth factors and their binding proteins : biological actions.**

Endocr Rev 1995; 16:3-34.

14. ALI O., COHEN P., LEE KW. **Epidemiology and biology of insulin-like growth factor binding protein-3 (IGFBP-3) as an anti-cancer molecule.**

Horm Metab Res 2003; 35:726-733.

15. CHAN SS., TWIGG SM., FIRTH SM., BAXTER RC. **Insulin-like growth factor binding protein-3 leads to insulin resistance in adipocytes.**

J Clin Endocrinol Metab 2005; 90:6588-6595.

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

Clin Endocrinol (Oxf) 1994; 41:85-93.

17. BLUM WF., ALBERTSSON-WIKLAND K., ROSBERG S., RANKE MB. **Serum levels of insulin-like growth factor I (IGF-I) and IGF binding protein 3 reflect spontaneous growth hormone secretion.**

J Clin Endocrinol Metab 1994; 76:1610-1616.

18. FRYSTYK J., IVARSEN P., SKJAERBAEK C., FLYVBJERG A., PEDERSEN EB., ORSKOV H.  
**Serum-free insulin-like growth factor I correlates with clearance in patients with chronic renal failure.**  
 Kidney Int 1999; 56:2076-2084.
19. FRYSTYK J.  
 In Endocrinology and Metabolism – Clinics of North America 2005 : Endocrinology of aging, Chapter XI : **Aging somatotropic axis mechanisms and implications of IGFBP adaptation.**

**XIX. AZ ELJÁRÁS ÖSSZEFoglalása**

	TELJES RADIOAK- TIVITÁS µl	KALIBRÁTOROK KONTROLLOK µl	MINTÁK µl
<b>MINTÁK HÍGÍTÁSA</b> Hígító puffer Minta	- -	- -	1000 10
Rázás	Vortex		
<b>INKUBÁCIÓ</b> Kalibrátorok (0-5), kontrollok Hígított minták,	- -	100 -	- 100
Tracer	50	50	50
Inkubáció	120 perc szabahőmérsékleten (18-25°C) rázatással (400 rpm)		
Elválasztás Hígított mosóoldat Elválasztás Hígított mosóoldat Elválasztás	-	Leszívás (vagy leöntés) 2 ml Leszívás (vagy leöntés) 2 ml Leszívás (vagy leöntés)	
Mérés	Radioaktivitás mérése 60 másodpercig		