



IGFBP-1 Elisa

KAPME01

History

Summary of change :

Previous Version :	Current Version :
230727	250703
New DiaSource logo	Update of the hazard warnings in the "WARNINGS AND PRECAUTIONS" section



IGFBP-1-ELISA

Enzyme Immunoassay for the Quantitative Determination of
Human Insulin-like Growth Factor Binding Protein-1
KAPME01
IN VITRO DIAGNOSTIC USE

en

DIAsource ImmunoAssays S.A. - Rue du Bosquet 2, B-1348 Louvain-la-Neuve, Belgium - Tel: +32 10 84 99 11 - Fax : +32 10 84 99 91

INTENDED USE

This enzyme immunoassay kit is suited for measuring IGFBP-1 in human serum and plasma.

INTRODUCTION

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

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

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

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

Relevance of serum and amnion IGFBP-1 in diagnostics has been investigated in several areas.

- Energy metabolism

Based on the influence of Insulin on IGFBP-1 serum concentrations IGFBP-1 is said to be a possible marker for insulin resistance.

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

- Pregnancy

In pregnancy IGFBP-1 concentrations could be used for different applications. Specially, a potential diagnostic value was shown for membrane rupture and intra uterine growth disturbances. There are also data that IGFBP-1 in maternal serum might be a marker for trisomy 18, but here the IGFBP-1/IGFBP-2 ratio seems to be of value [14].

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

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

ASSAY PRINCIPLE

The DIAsource **IGFBP-1 Elisa KAPME01** is a so-called Sandwich-Assay. It utilizes two specific antibodies of high affinity. First the IGFBP-1 in the sample binds to the immobilized antibody on the microtiter plate. In the following step, the anti-IGFBP-1-Antibody binds in turn to the immobilised IGFBP-1. This is biotinylated and allows the binding of a streptavidin-peroxidase enzyme conjugate.

Subsequently, the peroxidase catalyzes an enzymatic reaction resulting in a blue coloration. The intensity of the blue color depends on the IGFBP-1 content of the sample. The reaction is stopped by the addition of stop solution and color intensity is quantified by measuring the absorption.

WARNINGS AND PRECAUTIONS

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

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

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

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

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

Human Serum

Following components contain human serum: **Control 1 and 2 CONTROL N, Calibrators 0-6 CAL N**

Source human serum for the control sera provided in this kit was tested and found non-reactive for Hepatitis-B surface antigen (HBsAg), Hepatitis C virus (HCV), and Human Immunodeficiency Virus 1 and 2 (HIV). No known methods can offer total security of the absence of infectious agents; therefore all components and patient's specimens should be treated as potentially infectious.

Components

All components of the product that contain hazardous substances in declarable concentrations in accordance with European Regulation 1272/2008 are listed below:

Dilution Buffer DIL BUF/ Antibody Conjugate Ab BIOT / Enzyme Conjugate SAV HRP

The buffers contain the hazardous ingredients listed below, based on this the following labeling of the two mixtures results:



Hazard pictograms (CLP):

GHS07

Signal word (CLP):

Warning

Hazardous components:

2-methylisothiazol-3(2H)-one (< 0,06 %)
reaction mass of 5-chloro-2-methyl-2H-isothiazol-3-one and 2-methyl-2H-isothiazol-3-one (3:1) (< 0,015 %)

Hazard statements (CLP):

H317 - May cause an allergic skin reaction.

Safety instructions (CLP):

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

Washing Buffer WASH SOLN CONC

The buffer contains a mixture of 5-chloro-2-methyl-4-isothiazolin-3-one and 2-methyl-4-isothiazolin-3-one (< 0.015 %) as a preservative.

EUH208 Contains reaction mass of 5-chloro-2-methyl-2H-isothiazol-3-one and 2-methyl-2H-isothiazol-3-one (3:1).
May produce an allergic reaction.

EUH210 Safety data sheet available on request.

Stop Solution STOP SOLN

The stop solution contains 0.2 M sulphuric acid.

EUH210 Safety data sheet available on request.

Protective equipment and first aid measures

After contact with skin: Take off immediately all contaminated clothing. Rinse skin with water or shower. In case of skin reactions, consult a physician.

After contact with eyes: Rinse cautiously with water for several minutes. Remove contact lenses, if present and easy to do. Continue rinsing. In case of eye irritation consult an ophthalmologist.

After ingestion: Call a doctor if you feel unwell.

Avoid contact with the ingredients. Detailed information on personal protective equipment and first aid measures can be found in the safety data sheet for IGFBP-1 Elisa. This can be accessed electronically via the DIAsource website at <https://diasource-diagnostics.com/> or will be made available on request via products.support@diasource.be.

SAMPLES

Sample type

Beside serum also EDTA- and Heparin Plasma can be used

Specimen collection

Use standard venipuncture for the blood sampling. Haemolytic reactions have to be avoided. For blood sampling diurnal variations specially influenced by nutrition should be considered [5].

Required sample volume: 20 µL

Sample stability

- In firmly closable sample vials
- Storage at 20-25°C: 3 days
- Storage at -20°C: min. 2 years
- Freeze-thaw cycles max. 3

The storage of samples over a period of 2 years at -20°C, showed no influence on the reading. Freezing and thawing of samples should be minimized. 3 Freezing-Thawing showed no effect on samples.

Interference

Triglyceride, bilirubin and hemoglobin in the sample do not interfere to a concentration of 100 mg/mL, 100 µg/mL or 5 mg/mL, respectively. However, the use of haemolytic, lipemic or icteric samples should be validated by the user.

Sample dilution

- Dilution: $\geq 1:16$ with Dilution Buffer
- Pipette **300 µL** Dilution Buffer (red colored) in PE-/PP-Tubes (application of a multi-stepper is recommended in larger series), add **20 µL Serum-** or **Plasma** (dilution factor 16). After mixing use **50 µL** diluted solution **within 1 hour per determination** in the assay.

REAGENTS PROVIDED

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



Microtiter plate, ready for use: **Microtiter plate** with 96 wells (8x12), divided up in 12 strips with 8 wells separately breakable, coated with anti-IGFBP-1 antibody and packed in a laminate bag.

CAL	N
-----	---

Calibrators 0-6, lyophilized: contain native human IGFBP-1. Calibrators values are between 0 – 8 ng/ml (0, 0.1, 0.5, 1, 2, 4 and 8 ng/ml) IGFBP-1. Calibrators should be reconstituted with 500 µl Dilution Buffer each. Use 50 µl per well in the assay.

DIL	BUF
-----	-----

Dilution Buffer, 125 ml, ready for use, please use for reconstitution of samples, control and calibrators.

CONTROL	N
---------	---

Control 1 and 2, lyophilized, contain human Serum and should be reconstituted in 250 µl Dilution Buffer each. The IGFBP-1 target values and the respective ranges are given on the vial label. The dilutions should be according to the dilution of the respected samples. Use 50 µl per well in the assay.

Ab	BIOT
----	------

Biotin Conjugate, 6 ml, ready for use, contains biotinylated anti-human IGFBP-1 Antibody. Use 50 µl per well in the assay.

SAV	HRP
-----	-----

Streptavidin HRP, 12 ml, contains HRP (Horseradish-Peroxidase)-labelled Streptavidin. Ready for use. Use 100 µl per well in the assay.

WASH	SOLN	CONC
------	------	------

Washing Buffer, 50 ml, 20 X concentrated solution. Dilute 1:20 with Aqua dest. The 1:20 diluted Washing Buffer is only limited stable. Please dilute only according to daily requirements.

CHROM	TMB
-------	-----

TMB-Substrate Solution 12 ml, ready for use, horseradish-peroxidase-(HRP)-substrate, stabilised H₂O₂-Tetramethylbenzidine. Use 100 µl per well in the assay.

STOP	SOLN
------	------

Stopping Solution, 12 ml, ready for use, 0.2 M sulphuric acid. Use 100 µl per well in the assay.

Sealing tape for covering of the microtiter plate, 2 x, adhesive.

MATERIALS REQUIRED BUT NOT PROVIDED

Distilled (Aqua destillata) or deionized water for dilution of the Washing Buffer, 950 mL.
Precision pipettes and multichannel pipettes with disposable plastic tips
Polyethylene PE/Polypropylene PP tubes for dilution of samples
Vortex-mixer
Microtiter plate shaker (350 rpm)
Microtiter plate washer (recommended)
Micro plate reader ("ELISA-Reader") with filter for 450 and ≥ 590 nm

TECHNICAL NOTES

Storage Conditions

Store the kit at 2-8°C after receipt until its expiry date. The lyophilized reagents should be stored at -20 °C after reconstitution. Avoid repeated thawing and freezing.

Storage Life

The shelf life of the components **after initial opening** is warranted for **4 weeks**, store the unused strips and microtiter wells **airtight** together with the desiccant at 2-8°C in the clip-lock bag, use in the frame provided. The **reconstituted components** calibrators 0-6 and Control Sera **1** and **2** must be stored at -20°C. For further use, thaw quickly but gently (avoid temperature increase above room temperature and avoid excessive vortexing). Up to 3 of the freeze-thaw cycles did not influence the assay. The 1:20 diluted Washing Buffer is stable for **4 weeks** at **2-8°C**

Preparation of reagents

Bring all reagents to room temperature (20°C - 25°C) before use. Possible precipitations in the buffers have to be resolved before usage by mixing and / or warming. Reagents with different lot numbers cannot be mixed.

Reconstitution

The **Calibrators 0 - 6** and **Controls 1 and 2** are reconstituted with the Dilution Buffer. It is recommended to keep reconstituted reagents at room temperature for 15 minutes and then to mix them thoroughly but gently (no foam should result) with a Vortex mixer.

Dilution

After reconstitution dilute the Control Sera 1 and 2 with the Dilution Buffer in the same ratio as the sample.
The required volume of Washing Buffer is prepared by 1:20 dilution of the provided 20 fold concentrate with Aqua dest.

Assay Procedure

When performing the assay, Calibrators 0-6, Control Serum 1 and 2 and the samples should be pipette as fast as possible (e.g. <15 minutes). To avoid distortions due to differences in incubation times, Biotin Conjugate, Streptavidin HRP as well as the succeeding Substrate Solution should be added to the plate in the same order and in the same time interval as the samples. Stopping Solution should be added to the plate in the same order as Substrate Solution.

All determinations (Calibrators 0-6, Control Sera 1 and 2 and samples) should be assayed in duplicate. For optimal results, accurate pipetting and adherence to the protocol are recommended.

Incubation

Incubation at room temperature means: Incubation at 20 - 25°C. The Substrate Solution, stabilized H₂O₂-Tetramethylbencidine, is photosensitive—store and incubation in the dark.

Shaking

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

Washing

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

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

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

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

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

ASSAY PROCEDURE

Preparation of reagents		Reconstitution:	Dilution
	Calibrators 0-6	in 500 µL Dilution Buffer	-
	Control Serum 1	in 250 µL Dilution Buffer	≥ 1:16 with Dilution buffer
	Control Serum 2	in 250 µL Dilution Buffer	≥ 1:16 with Dilution buffer
	Washing Buffer	-	1:20 with distilled water
Sample dilution: with Dilution Buffer ≥ 1:16			
Before assay procedure bring all reagents to room temperature 20-25°C.			
Assay Procedure in Double Determination:			
Pipette	Reagents	Position	
50 µL	Biotin Conjugate	Pipette in <u>all</u> required number of wells	
50 µL	Calibrator 0 (0 ng/mL)	A1/A2	
50 µL	Calibrator 1 (0.1 ng/mL)	B1/B2	
50 µL	Calibrator 2 (0.5 ng/mL)	C1/C2	
50 µL	Calibrator 3 (1 ng/mL)	D1/D2	
50 µL	Calibrator 4 (2 ng/mL)	E1/E2	
50 µL	Calibrator 5 (4 ng/mL)	F1/F2	
50 µL	Calibrator 6 (8 ng/mL)	G1/G2	
50 µL	Control Serum 1 (≥ 1:16 diluted)	H1/G2	
50 µL	Control Serum 2 (≥ 1:16 diluted)	A3/A4	
50 µL	Sample (≥ 1:16 diluted)	in the rest of the wells according the requirements	
Cover the wells with the sealing tape.			
Sample Incubation <u>with Shaking</u> : 1 h at 20°C - 25°C, <u>350 rpm</u>			
5 x 300 µL	Aspirate the contents of the wells and wash 5 x with 300 µL each Washing Buffer/ well		In each well
100 µL	Streptavidin HRP		In each well
Cover the wells with the sealing tape.			
Incubation <u>with Shaking</u> : 30 Minutes at 20°C - 25°C, <u>350 rpm</u>			
5 x 300 µL	Aspirate the contents of the wells and wash 5 x with 300 µL each Washing Buffer/ well		In each well

100 µL	TMB-Substrate Solution	In each well
Incubation: 15 Minutes in the Dark at 20°C - 25°C		
100 µL	Stopping Solution	In each well
Measure the absorbance within 30 min at 450 nm with ≥ 590 nm as reference wavelength		

QUALITY CONTROL

Good laboratory practice requires that controls are included in each assay. A statistically significant number of controls should be assayed to establish mean values and acceptable ranges to assure proper performance. The test results are only valid if the test has been performed following the instructions. Moreover the user must strictly adhere to the rules of GLP (Good Laboratory Practice) or other applicable federal, state or local standards/laws. All standards and kit controls must be found within the acceptable ranges as stated on the QC Certificate. If the criteria are not met, the run is not valid and should be repeated. Each laboratory should use known samples as further controls.

Quality criteria

For the evaluation of the assay it is required that the absorbance values of the Calibrator 0 should be below 0.25, and the absorbance of Calibrator 6 should be above 1.00. Samples, which yield higher absorbance values than Calibrator 6, should be re-tested with a higher dilution.

EVALUATION OF RESULTS

Establishing of the calibration curve

The Calibrator provided contain the following concentrations of hIGFBP-1

Standard	0	1	2	3	4	5	6
ng/ml	0	0.1	0.5	1	2	4	8
OD (450-620 nm)	0.012	0.043	0.189	0.381	0.771	1.596	2.748

- 1) Plot the calibrator concentrations on the x-axis versus the mean value of the absorbance of the calibrator on the y-axis.
- 2) Recommendation: Calculation of the calibration curve should be done by using a computer program, because the curve is in general (without respective transformation) not ideally described by linear regression. **A higher-grade polynomial, or four parametric logistic (4-PL) curve fit or non-linear regression** are usually suitable for the evaluation (as might be spline or point-to-point alignment in individual cases).
- 3) The IGFBP-1 concentration in ng/mL of the samples can be calculated by **multiplication** with the respective **dilution factor**.

Example of a typical calibration curve

The following data is for demonstration only and cannot be used in place of data generation at the time of assay. The exemplary shown calibration curve in Figure 1 **cannot** be used for calculation of your test results. You have to establish a calibration curve for each test you conduct!

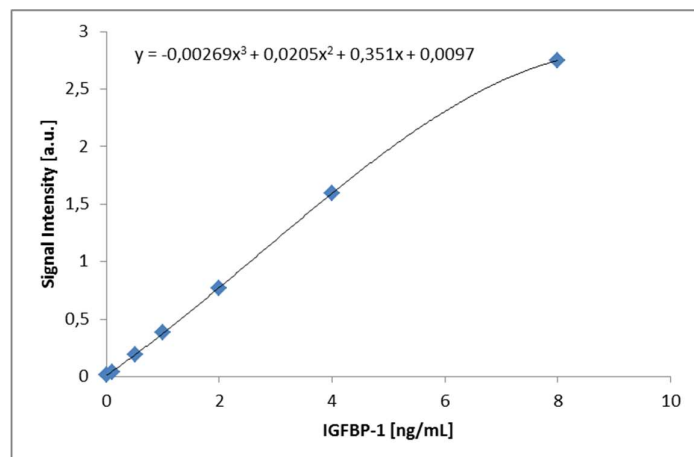


Figure 1. Exemplary calibration curve

Exemplary calculation of IGFBP-1 concentrations

Sample dilution: 1:16

Measured extinction of your sample: 0.199

Your **measurement program** will calculate the IGFBP-1 concentration of the diluted sample automatically. You only have to determine the most suitable curve fit (here: polynomial 3rd degree). In this exemplary case the following equation is solved by the program to calculate the IGFBP-1 concentration in the sample:

$$y = -0.00269x^3 + 0.0205x^2 + 0.351x + 0.0097$$

$$0.199 = -0.00269x^3 + 0.0205x^2 + 0.351x + 0.0097$$

$$x = 0.5235$$

If the dilution factor (1:16) is taken into account the IGFBP-1 concentration of the undiluted sample is $0.5235 \text{ ng/mL} \times 16 = 8.376 \text{ ng/mL}$

Interpretation of results

The test results should not be the only base for therapeutic decisions. The results should be interpreted in regard to anamnesis, further clinical observations and results of other diagnostic investigations. Further, it is recommended to establish reference and cut-off values corresponding to the relevant group of patients for each laboratory.

LIMITATION OF PROCEDURE

The DAsource IGFBP-1 ELISA kit, is based on murine antibodies. Generally, this technique is sensible to heterophilic antibodies as well as to human anti mouse antibodies in the sample. The influence of these antibodies is reduced by assay design, but cannot be excluded completely. Further, for interpretation of IGFBP-1 concentrations diagnostic sensitivity and specificity must be taken into account.

Also test duration has to be considered, this test system is not suitable for point-of care.

REFERENCE VALUES

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

Table 1. IGFBP-1 Expectation values in sera of healthy adults (measured values in ng/ml)

Gender	No. of Samples	Average value	Median	Min. – Max.
female	33	4.79	4.24	0.23 – 16.07
male	36	5.22	2.71	0.42 – 17.94
total	69	5.01	2.77	0.23 – 17.94

PERFORMANCE CHARACTERISTICS

Sensitivity

The analytical sensitivity was determined by measuring the null standard (calibrator 0) and calculating the corresponding concentration of the signal intensity of the calibrator 0 + 2SD. In three different assays analytical sensitivities from 0.03 to 0.08 ng/mL were measured with an average value of 0.055 ng/mL.

Specificity

The IGF/IGFBP-System consists of several related and homologous proteins. Thus the cross-reactivity of the DAsource IGFBP-1 ELISA kit to other IGFBPs was tested exemplarily with the two IGFBPs most abundant in circulation. Table 2 summarizes the results.

Table 2. Cross-reactivity to related IGFBPs. 500 ng of the indicated IGFBP were added to 1mL dilution buffer and measured as a sample. Shown is the concentration measured and the relative cross reactivity.

	Concentration [ng/ml]	Relative cross-reactivity [%]
IGFBP-2	0.0071	0.00142
IGFBP-3	0.0033	0.00066

Reproducibility and Precision

Intra-Assay-Variation

Serum samples were measured up to 20 times in the same assay and the coefficient was calculated based on the recalculated IGFBP-1 concentration. Exemplary data are shown in Table 3. The mean measured coefficient of variation (CV) is 6.52% (n =6).

Table 3 Intra-Assay Variation

	Sample 1	Sample 2	Sample 3
Mean [ng/mL]	4.25	12.21	55.17
SD [ng/mL]	0.24	0.75	2.38
CV [%]	5.59	6.11	4.32
Number [n]	20	20	20

Inter-Assay Variance

Serum samples were measured in independent assays. On average the coefficient of variation was 6.05% (SD 0.46). Exemplary results are shown in table 4.

Table 4: Inter-Assay Variation

	Sample 1	Sample 2	Sample 3	Sample 4	Sample 5	Sample 6
Mean [ng/mL]	12.50	8.52	6.42	18.62	4.43	9.01
SD [ng/mL]	0.17	0.24	0.25	0.52	0.18	0.18
CV [%]	1.33	2.80	3.90	2.80	4.11	2.05
Number [n]	5	5	5	5	5	5

Linearity

The linearity of sample dilution is shown in Figure 1. Exemplarily three serum samples were diluted 1:5 up to 1:512 and the IGFBP-1 concentration was measured within each dilution. The results were analysed by linear regression analysis and revealed coefficients of determination of >0.98 for each of the samples.

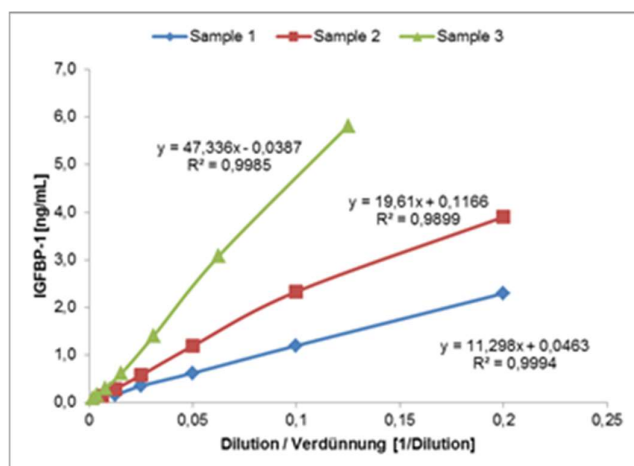


Figure 2. Linearity of the sample dilution

Recovery

Native IGFBP-1 (4.5 ng/mL) was added to human serum and quantified in comparison to the same amount of IGFBP-1 in buffer. The mean recovery detected was 82%. Also, the IGFBP-1 content of samples enriched with recombinant IGFBP-1 was measured and recovery calculated in comparison to enriched buffer (45 ng/mL) with a mean recovery of 94%.

Trueness / Assay calibration

There is no IGFBP-1 reference preparation available. The DAsource IGFBP-1 ELISA kit was calibrated against purified, native human IGFBP-1. Traceability / lot-to-lot consistency is accomplished by a panel of different serum samples.

Interference

Interference of haemoglobin, bilirubin and triglycerides was tested by adding the indicated amount of these substances to human serum containing IGFBP-1. For comparison the same amount of buffer without any substance was also added to the serum and the relative recovery rate was calculated. Table 5 shows that on average neither haemoglobin, bilirubin nor

triglycerides exert significant influence on the measurement of IGFBP-1 in human serum. But generally measurement of IGFBP-1 in haemolytic, icteric or lipaemic samples should be avoided.

Table 5. Interference of haemoglobin, bilirubin and triglycerides on IGFBP-1 measurement in human serum. Shown is the relative recovery of IGFBP-1 measured in human serum samples after adding the indicated amount of possibly interfering substances in comparison to serum samples only buffer was added to.

Recovery [%]	Triglyceride 100 mg/mL	Bilirubin 100 µg/mL	Haemoglobin 5 mg/mL
Sample 1	142	72	122
Sample 2	125	46	119
Sample 3	82	113	97
Mean	116	77	113

ASSAY COMPARISON

The DAsource IGFBP-1 ELISA kit was compared with two competitor assays. The correlation of these test systems and the DAsource assay was evaluated by Passing-Bablok regression and linear regression. The results are shown in Table 6.

Table 6. Assay comparison
RSD = residual standard deviation

	Sample [n]	Passing Bablok Regression	Linear Regression coefficient of regression
Competitor A	36	$y = -0.99 + 0.3x$ (RSD 2.97)	0.89
Competitor B	34	$y = 0.1 + 1.17x$ (RSD 0.84)	0.84

The analysis reveals that the DAsource test correlates well with both of the competitive tests. But regarding the absolute concentrations measured, there is a significant difference especially in comparison to Competitor A. This indicates differences in calibration or binding properties of the antibodies used.

Instruction for scientific application

SCIENTIFIC APPLICATION

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

Samples suitable for scientific application

Where required, depending on the expected IGFBP-1-values, the dilution with Dilution Buffer can be higher or lower (at least however 1:2.5). The IGFBP-1 concentration may be completely variable in different body fluids. Examples as well as dilution recommendations are given in table 7.

Table 7 Results of matrix tests. Purified native IGFBP-1 was added to the respectively diluted samples. Enriched samples were measured without further dilution. Shown is the relative recovery of added IGFBP-1 of the value measured in enriched Dilution Buffer.

Samples	Expected IGFBP-1 [ng/ml]	Recovery IGFBP-1 [%]	Recommended Dilution
Amniotic Fluid	8.140 - 16.450	n.d.	≥1:5000 up to 1:25000
Mother's milk	5.12	96	1:10
Urine	0.07	90	1:2.5
Saliva	< 0.02	63	≥1:2.5
Bronchial Lavage	< 0.02	100	1:2.5
Sputum	< 0.02	100	1:20
Cell Culture Media	---	94	≥1:5

n.d. = not determined

Species cross reactivity

Serum of the cited species was diluted and used as sample in this assay system.

No signal was detected in serum of the following species:

Rat, mouse, guinea pig, rabbit, pig, sheep, goat, cattle, horse, dog, cat, chicken or donkey.

REFERENCES

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

Revision date: 2025-07-03



IGFBP-1-ELISA

Inmunoensayo enzimático para la determinación cuantitativa
Proteína 1 de unión al factor de crecimiento similar a la insulina humana
KAPME01
USO DIAGNÓSTICO IN VITRO

es

DIAsource ImmunoAssays S.A. - Rue du Bosquet 2, B-1348 Louvain-la-Neuve, Bélgica- Tel: +32 10 84 99 11 - Fax: +32 10 84 99 91

INDICACIONES

Este kit de inmunoensayo enzimático es adecuado para medir IGFBP-1 en suero y plasma humanos.

INTRODUCCIÓN

Los factores de crecimiento I y II similares a la insulina se encuentran libres en los líquidos y tejidos corporales, pero están unidos a proteínas de unión específicas. Hasta el día de hoy se pueden diferenciar siete proteínas de unión diferentes (IGFBP-1 a -7), además también se han detectado varias proteínas relacionadas con la IGFBP. La biodisponibilidad del IGF está regulada por estas IGFBP o por su escisión proteolítica que reduce la afinidad al IGF. Las IGFBP, así como sus fragmentos proteolíticos, también pueden producir efectos independientes del IGF, como influir en la migración o proliferación celular.

La IGFBP-1 (proteína placentaria 12) consta de 234 aminoácidos y tiene un peso molecular de aproximadamente 25 kDa. La región codificante del ADN se encuentra en el cromosoma 7 [1, 2]. La IGFBP-1 se sintetiza principalmente mediante tejido hepático fetal y adulto y endometrio decidual. La intensidad de la expresión varía durante la menstruación con una expresión máxima en la fase secretora tardía [3, 4]. La expresión adicional de IGFBP-1 parece estar regulada por la concentración de insulina, y la insulina inhibe la expresión. La regulación de la insulina da como resultado fluctuaciones diurnas de hasta el factor 10[5]. La IGFBP-1 es postraslacional modificada por fosforilación de los residuos de serina 101, 119 y 169. La fosforilación tiene relevancia fisiológica ya que aumenta la afinidad de la IGFBP-1 por el IGF. En los seres humanos adultos, la IGFBP-1 fosforilada del hígado es la forma que predomina en la circulación. La IGFBP-1 producida por el tejido endometrial está significativamente menos fosforilada que la forma originada en el hígado [6].

En el embarazo, la concentración sérica materna de IGFBP-1 aumenta significativamente con valores máximos en el segundo trimestre o las 22-23 semanas de gestación (75,8 ng/ml) [5] y disminuye lentamente hasta término. La concentración de IGFBP-1 no solo aumenta en el suero materno sino también en el fetal, se encuentran concentraciones extremadamente altas en el líquido amniótico. Aquí la concentración puede alcanzar más de 1000 veces los valores séricos [7]. Los cambios a largo plazo de la concentración sérica de IGFBP-1 también se pueden encontrar en el líquido amniótico. Después del nacimiento, el nivel de IGFBP-1 del niño disminuye hasta que alcanza el nivel bajo de estado estable de la pubertad y la edad adulta [8, 9].

La concentración sérica de IGFBP-1 a corto plazo está fuertemente influenciada por el nivel de nutrición y con ello por la insulina. Los niveles de IGFBP-1 disminuyen durante el ayuno o en la diabetes; los niveles de IGFBP-1 aumentan en caso de ejercicio intensivo [10-12].

Se ha investigado la importancia de la IGFBP-1 en suero y en líquido cerebroespinal para el diagnóstico en varios ámbitos.

- Metabolismo energético

Basándose en la influencia de la insulina en las concentraciones séricas de IGFBP-1, se dice que la IGFBP-1 es un posible marcador de resistencia a la insulina.

En un pequeño estudio, Maddux et al pudieron demostrar en 23 pacientes no diabéticos, que la concentración sérica de IGFBP-1 se correlacionaba muy bien con la tasa de absorción de glucosa, incluso mejor que el índice HOMA [13].

- Embarazo

En el embarazo, las concentraciones de IGFBP-1 podrían usarse para diferentes aplicaciones. Particularmente, se demostró un valor diagnóstico potencial para la rotura de membranas y las alteraciones del crecimiento intrauterino. También hay datos de que la IGFBP-1 en el suero materno podría ser un marcador de trisomía 18, pero aquí la relación IGFBP-1/IGFBP-2 puede resultar de utilidad [14].

Se detectó una diferencia significativa en la concentración sérica de IGFBP-1 entre embarazadas sanas y mujeres diabéticas y preeclámpticas (102,8 frente a 203,71 o 281,09 ng/ml respectivamente) [15].

Además, durante la evaluación de IGFBP-1 como marcador de la rotura de membrana se determinaron unos valores de especificidad (97 %) y sensibilidad (75 %) altos ante IGFBP-1 en secreciones vaginales/cervicales. En el caso de que la membrana permaneciera intacta, la concentración de IGFBP-1 sería <90 ng/ml en la secreción. Después 8 horas de la rotura espontánea o inducida de la membrana, los valores de IGFBP-1 aumentaron significativamente con una concentración media de 1900 ng/ml. En este estudio se establecieron concentraciones de IGFBP-1 >100 ng/ml como umbral para la detección de líquido amniótico y, con ello, el diagnóstico de rotura de la membrana [16]. Un valor predictivo positivo del 97 % indica que la IGFBP-1 es un marcador adecuado para la rotura prematura de membranas [17].

PRINCIPIO DEL ENSAYO

El **ELISA de IGFBP-1 KAPME09 de DIAsource** es un ensayo tipo sándwich. Utiliza dos anticuerpos específicos de alta afinidad. Primero la IGFBP-1 de las muestras se une al anticuerpo inmovilizado en la placa de microvaloración. En el siguiente paso, el anticuerpo anti-IGFBP-1 se une a su vez a la IGFBP-1 inmovilizada. Éste se biotinila y permite la unión de un conjugado enzimático de peroxidasa estreptavidina.

Posteriormente, la peroxidasa cataliza una reacción enzimática que produce una coloración azul. La intensidad del color azul depende del contenido de IGFBP-1 de la muestra. La reacción se detiene mediante la adición de solución de parada y la intensidad del color se cuantifica midiendo la absorción.

ADVERTENCIAS Y PRECAUCIONES

Solo para uso diagnóstico in vitro. Solo para uso profesional.

El kit DAsource solo es adecuado para diagnósticos in vitro y no para uso interno en seres humanos y animales. Siga estrictamente el protocolo de prueba. Utilice la versión válida del prospecto que se incluye con el kit. Asegúrese de que ha comprendido todo. DAsource no se hace responsable de ninguna pérdida o daño (salvo que lo exija la ley) causado por el incumplimiento de las instrucciones proporcionadas.

No utilice material que presente daños evidentes, esté contaminado por microorganismos o se haya derramado.

Precaución: Este kit contiene material de origen humano y/o animal. Por lo tanto, todos los componentes y muestras de los pacientes deben tratarse como potencialmente infecciosos.

Se deben tomar las precauciones adecuadas y seguir las buenas prácticas de laboratorio en el almacenamiento, la manipulación y la eliminación de los reactivos del kit. La eliminación de los componentes del kit debe realizarse de acuerdo con la normativa local.

Suero humano

Los siguientes componentes contienen suero humano: **Controls 1 y 2 CONTROL N, y Calibrators 0-6 CAL N.**

El suero humano de origen de los controles proporcionados en este kit se ha analizado y se ha comprobado que no es reactivo al antígeno de superficie de la hepatitis B (HBsAg), al virus de la hepatitis C (VHC) y al virus de la inmunodeficiencia humana 1 y 2 (VIH). No existe ningún método conocido que pueda garantizar totalmente la ausencia de agentes infecciosos; por lo tanto, todos los componentes y las muestras de los pacientes deben tratarse como potencialmente infecciosos.

Componentes

A continuación se enumeran todos los componentes del producto que contienen sustancias peligrosas en concentraciones declarables de conformidad con el Reglamento europeo 1272/2008:

Dilution Buffer DIL BUF/ Antibody Conjugate Ab BIOT / Enzyme Conjugate SAV HRP

Los tampones contienen los ingredientes peligrosos que se enumeran a continuación, por lo que el etiquetado de las dos mezclas es el siguiente:



GHS07

Indicaciones de peligro (CLP):

Palabra de advertencia (CLP):

Componentes peligrosos:

Indicaciones de peligro (CLP):

Consejos de precaución (CLP):

Advertencia

2-metilisotiazol-3(2H)-ona (< 0,06 %)

masa de reacción de 5-cloro-2-metil 2H isotiazol-3-ona y 2-metil-2H-isotiazol-3-ona (3:1) (< 0,015 %)

H317 - Puede provocar una reacción alérgica en la piel.

P280 - Llevar guantes/prendas/gafas/máscara de protección y protección auditiva.

P272 - Las prendas de trabajo contaminadas no podrán sacarse del lugar de trabajo.

P261 - Evitar respirar el polvo/el humo/el gas/la niebla/los vapores/el aerosol.

P333+P313 - En caso de irritación o erupción cutánea: Consultar a un médico.

P302+P352 - EN CASO DE CONTACTO CON LA PIEL: Lavar con abundante agua.

P501 - Eliminar el contenido/el recipiente de conformidad con la normativa nacional sobre eliminación.

Washing Buffer WASH SOLN CONC

El tampón contiene una mezcla de 5-cloro-2-metil-4-isotiazolin-3-ona y 2-metil-4-isotiazolin-3-ona (< 0,015 %) como conservante.

EUH208 Contiene masa de reacción de 5-cloro-2-metil-2H-isotiazol-3-ona y 2-metil-2H-isotiazol-3-ona (3:1). Puede provocar una reacción alérgica.

EUH210 Existe disponible una Ficha de datos de seguridad bajo solicitud.

Stop Solution STOP SOLN

La solución de parada contiene ácido sulfúrico 0,2 M.

EUH210 Existe disponible una Ficha de datos de seguridad bajo solicitud.

Protective equipment and first aid measures

Después del contacto con la piel: Quítese inmediatamente toda la ropa contaminada. Enjuague la piel con agua o dúchese. En caso de reacciones cutáneas, consulte a un médico.

Después del contacto con los ojos: Enjuague cuidadosamente con agua durante varios minutos. Quítese las lentes de contacto, si las lleva y es fácil hacerlo. Continúe enjuagando. En caso de irritación ocular, consulte a un oftalmólogo.

Después de la ingestión: Llame a un médico si se encuentra mal.

Evite el contacto con los ingredientes. En la ficha de datos de seguridad de IGFBP-1 Elisa encontrará información detallada sobre el equipo de protección personal y las medidas de primeros auxilios. Puede acceder a ella electrónicamente a través del sitio web de DAsource en <https://diasource-diagnostics.com/> o solicitarla a través de products.support@diasource.be.

SAMPLES

Tipo de muestra

Además del suero, también se pueden utilizar EDTA y plasma con heparina.

Recogida de las muestras

Utilice venopunción estándar para la muestra de sangre. Deben evitarse reacciones hemolíticas.

Para la toma de muestras de sangre, se deben considerar las variaciones diurnas especialmente influenciadas por la nutrición [5].

Volumen necesario de la muestra: 20 µl

Estabilidad de la muestra

En viales de muestra firmemente cerrados.

- Conservación a 20-25 °C: 3 días
- Conservación a -20 °C mín. 2 años
- Ciclos de congelación-descongelación: máx. 3

La conservación de las muestras durante un período de 2 años a -20 °C no mostró influir sobre la lectura. Debe minimizarse la congelación y descongelación de las muestras. 3 La congelación y descongelación no mostró ningún efecto sobre las muestras.

Interferencia

Los triglicéridos, la bilirrubina y la hemoglobina en la muestra no interfieren a una concentración de 100 mg/ml, 100 µg/ml y 5 mg/ml, respectivamente. Sin embargo, el uso de muestras hemolíticas, lipémicas o ictericas debe ser validado por el usuario.

Dilución de la muestra

- Dilución: $\geq 1:16$ con tampón de dilución
- Pipetee **300 µl** de tampón de dilución (de color rojo) en tubos de PE/PP (se recomienda aplicar un multistepper para series más grandes), añada **20 µl de suero o plasma** (dilución 1:21). Después de mezclar use **50 µl** de solución diluida **antes de 1 hora por determinación** en el ensayo.

REACTIVOS PROPORCIONADOS

Los reactivos que se indican a continuación son suficientes para 96 pocillos, incluida la curva de calibración.



Placa de microvaloración, lista para usar: **Placa de microvaloración** con 96 pocillos (8x12), divididos en 12 tiras con 8 pocillos separables individualmente, recubiertos con anticuerpos anti-IGFBP-1 y envasados en una bolsa laminada.

CAL	N
-----	---

Calibradores 0-6, liofilizados: contienen IGFBP-1 nativa de origen humano. Los valores de los calibradores se encuentran entre 0-8 ng/ml (0; 0,1; 0,5; 1; 2; 4 y 8 ng/ml) de IGFBP-1. Cada uno de los calibradores debe reconstituirse con 500 µl de tampón de dilución. Utilice 50 µl por pocillo en el ensayo.

DIL	BUF
-----	-----

Tampón de dilución, 125 ml, listo para usar, utilícelo para la reconstitución de muestras, control y calibradores.

CONTROL	N
---------	---

Controles 1 y 2, liofilizados, contienen suero humano y cada uno debe reconstituirse en 250 µl de tampón de dilución. El valor diana de la IGFBP-1 y los intervalos respectivos se muestran en la etiqueta del vial. Las diluciones deben hacerse según la dilución de las muestras respetadas. Utilice 50 µl por pocillo en el ensayo.

Ab	BIOT
----	------

Conjugado de biotina, 6 ml, listo para usar, contiene anticuerpo anti-IGFBP-1 humana biotinilado. Utilice 50 µl por pocillo en el ensayo.

SAV	HRP
-----	-----

Estreptavidina-HRP, 12 ml, contiene estreptavidina marcada con HRP (peroxidasa de rábano picante). Lista para usar. Utilice 100 µl por pocillo en el ensayo.

WASH	SOLN	CONC
------	------	------

Tampón de lavado, 50 ml, Solución concentrada 20x. Diluya a 1:20 con agua destilada El tampón de dilución diluido a 1:20 tiene una estabilidad limitada. Diluya solo según los requisitos diarios.

CHROM	TMB
-------	-----

Solución de sustrato de TMB 12 ml, lista para usar, sustrato de peroxidasa de rábano picante (HRP), H₂O₂-tetrametilbencidina estabilizada. Utilice 100 µl por pocillo en el ensayo.

STOP	SOLN
------	------

Solución de parada, 12 ml, lista para usar, ácido sulfúrico 0,2 M. Utilice 100 µl por pocillo en el ensayo.

Cinta selladora para tapar la placa de microvaloración, 2 x, adhesiva.

MATERIALES NECESARIOS PERO NO SUMINISTRADOS

Agua destilada (Aqua destillata) o desionizada para la dilución del tampón de lavado (950 ml)

Pipetas de precisión y pipetas multicanal con puntas de plástico desechables

Tubos de polietileno (PE) / polipropileno (PP) para la dilución de las muestras

Agitador tipo vórtex

Agitador de placas de microvaloración (350 rpm)

Lavador de placas de microvaloración (recomendado)

Lector de microplacas ("lector ELISA") con filtro de 450 y ≥590 nm

NOTAS TÉCNICAS

Condiciones de conservación

Conserve el kit a 2 - 8 °C una vez recibido hasta su fecha de caducidad. Los reactivos liofilizados deben conservarse a -20 °C tras su reconstitución. Evite congelar y descongelar repetidamente.

Tiempo de conservación

El período de validez de los componentes **una vez abiertos** está garantizado durante **4 semanas; guarde las tiras y los pocillos de microvaloración no utilizados** herméticamente junto con el desecante a 2 - 8 °C en la bolsa con cierre de clip, use en el marco proporcionado. Los calibradores 0-6 y los sueros de control **1 y 2** de los **componentes reconstituidos** se deben almacenar a -20 °C. Para usos futuros, congele rápido pero cuidadosamente (evite aumentos de temperatura superiores a la temperatura ambiente y no agite excesivamente con el vórtex). Un máximo de 3 ciclos de congelación-descongelación no afectaron al ensayo. El tampón de dilución diluido a 1:20 es estable durante **4 semanas a 2-8 °C**.

Preparación de los reactivos

Todos los reactivos deben estar a temperatura ambiente (20 °C - 25 °C) antes de usarse. Las posibles precipitaciones en los tampones deben disolverse antes de usar mezclándolos o calentándolos. No pueden mezclarse reactivos de distintos números de lote.

Reconstitución

Los calibradores 0 - 6 y los controles 1 y 2 se reconstituyen con el tampón de dilución. Se recomienda conservar los reactivos reconstituidos a temperatura ambiente durante 15 minutos y luego mezclarlos completamente pero con suavidad (no debe formarse espuma) con un agitador tipo vórtex.

Dilución

Después de la reconstitución, diluya los sueros de control 1 y 2 con el tampón de dilución en la misma proporción que la muestra. El volumen necesario de tampón de lavado se prepara diluyendo a 1:20 el concentrado 20 veces proporcionado con agua destilada.

Procedimiento del ensayo

Al realizar el ensayo, los calibradores 0-6, el suero control 1 y 2 y las muestras deben pipetarse lo más rápido posible (p. ej. <15 minutos). Para evitar distorsiones debido a diferencias en los tiempos de incubación, deberá añadirse a la placa el conjugado de biotina, así como la solución de sustrato en el mismo orden y en el mismo intervalo de tiempo que las muestras. La solución de parada deberá añadirse a la placa en el mismo orden que la solución de sustrato.

Todas las determinaciones (calibradores 0-6, suero control 1 y 2 y muestras) deben analizarse por duplicado. Se recomienda un pipeteo preciso y la adherencia al protocolo para obtener unos resultados óptimos.

Incubación

Una incubación a temperatura ambiente significa: Incubación a 20 - 25 °C. La solución de sustrato, H₂O₂-tetrametilbencidina estabilizada, es fotosensible—consérvese e incube en la oscuridad.

Agitación

Los pasos de incubación deben realizarse a una frecuencia de rotación media de un agitador de placas de microvaloración que sea especialmente adecuado. Recomendamos 350 rpm. Debido a ciertas diferencias técnicas pueden producirse desviaciones, en cuyo caso debe ajustarse la frecuencia de rotación. Una agitación insuficiente puede hacer que la mezcla de las soluciones no sea adecuada y por tanto que las densidades ópticas sean bajas, las variaciones altas y/o los valores falsos; una agitación excesiva puede producir densidades ópticas altas y/o valores falsos.

Lavado

Un lavado apropiado es de una **importancia** esencial para que la prueba sea segura, fiable y precisa. Es común realizar un lavado incompleto, lo que afectará negativamente al resultado de la prueba. Las posibles consecuencias pueden ser variaciones inespecíficas no controladas de las densidades ópticas medidas, que podrían producir cálculos de resultados falsos de las muestras examinadas. Unos efectos como valores de fondo altos o variaciones altas podrían indicar problemas de lavado.

Todo lavado debe realizarse con el tampón de lavado proporcionado diluido a la concentración de uso. El volumen de lavado por ciclo de lavado y pocillo debe ser de 300 µl como mínimo.

El peligro de manipular material potencialmente infeccioso debe tenerse en cuenta.

Cuando se utilice un lavador de placas de **microvaloración automático**, deben seguirse atentamente las instrucciones de uso correspondientes. Deben realizarse los ajustes del dispositivo, p. ej. para la geometría de la placa y los parámetros de lavado proporcionados. El dispositivo de dispensación y aspiración no debe rayar la superficie interior de los pocillos. Debe preverse minimizar el volumen de líquido remanente de cada paso de aspiración. Después del último paso de aspiración de cada ciclo de lavado, esto podría controlarse, y el posible líquido remanente podría eliminarse a continuación invirtiendo la placa y dando golpecitos reiteradamente sobre papel absorbente que no suelte pelusa.

El **lavado manual** es una opción alternativa adecuada. Puede dispensarse tampón de lavado empleando un dispositivo multistepper, una pipeta multicanal o un frasco de lavado. El líquido puede eliminarse basculando dinámicamente la placa de microvaloración sobre un recipiente. Si se utilizan dispositivos de aspiración, debe tenerse cuidado de no rayar la superficie interior de los pocillos. Con posterioridad a cada paso de lavado individual, debe eliminarse el líquido remanente invirtiendo la placa y dando golpecitos reiteradamente sobre papel absorbente que no suelte pelusa.

PROCEDIMIENTO DEL ENSAYO

Preparación de los reactivos		Reconstitución:	Dilución
	Calibradores 0-6	En 500 µl de tampón de dilución	-
	Suero control 1	En 250 µl de tampón de dilución	≥1:16 con tampón de dilución
	Suero control 2	En 250 µl de tampón de dilución	≥1:16 con tampón de dilución
	Tampón de lavado	-	1:20 con agua destilada
Dilución de la muestra: con tampón de dilución ≥1:16			
Antes del procedimiento del ensayo todos los reactivos deben estar a una temperatura ambiente de 20 - 25 °C.			
Procedimiento del ensayo en determinación doble:			
Pipeta	Reactivos	Posición	
50 µl	Conjugado de biotina	Pipetee en todos los pocillos necesarios	
50 µl	Calibrador 0 (0 ng/ml)	A1/A2	
50 µl	Calibrador 1 (0,1 ng/ml)	B1/B2	
50 µl	Calibrador 2 (0,5 ng/ml)	C1/C2	
50 µl	Calibrador 3 (1 ng/ml)	D1/D2	
50 µl	Calibrador 4 (2 ng/ml)	E1/E2	
50 µl	Calibrador 5 (4 ng/ml)	F1/F2	
50 µl	Calibrador 6 (8 ng/ml)	G1/G2	
50 µl	Suero control 1 (≥1:16 diluido)	H1/G2	
50 µl	Suero control 2 (≥1:16 diluido)	A3/A4	
50 µl	Muestra (≥1:16 diluida)	En el resto de los pocillos conforme a los requisitos	
Tape los pocillos con la cinta selladora.			

incubación de la muestra <u>con agitación</u> : 1 h a 20 °C - 25 °C, <u>350 rpm</u>		
5 x 300 µl	Aspire el contenido de los pocillos y lave 5 veces con 300 µl cada una con tampón de lavado/ pocillo	En cada pocillo
100 µl	Estreptavidina-HRP	En cada pocillo
Tape los pocillos con la cinta selladora.		
Incubación <u>con agitación</u> : 30 minutos a 20 °C - 25 °C, <u>350 rpm</u>		
5 x 300 µl	Aspire el contenido de los pocillos y lave 5 veces con 300 µl cada una con tampón de lavado/ pocillo	En cada pocillo
100 µl	Solución de sustrato de TMB	En cada pocillo
Incubación: 15 minutos en la oscuridad a 20 °C - 25 °C		
100 µl	Solución de parada	En cada pocillo
Mida la absorbancia antes de 30 min a 450 nm con ≥ 590 nm como longitud de onda de referencia.		

CONTROL DE CALIDAD

Las buenas prácticas de laboratorio requieren incluir controles en cada ensayo. Debería analizarse un número estadísticamente significativo de controles para establecer los valores medios y los intervalos aceptables que garanticen una eficacia adecuada. Los resultados de la prueba solo son válidos si la prueba se ha realizado siguiendo las instrucciones. Lo que es más, el usuario debe observar estrictamente los principios de las Buenas Prácticas de Laboratorio u otras normas/leyes federales, estatales o locales aplicables. Todos los estándares y controles del kit deben encontrarse dentro de los intervalos aceptables conforme se indica en el Certificado de control de calidad. Si no se satisfacen los criterios, el análisis no será válido y deberá repetirse. Cada laboratorio debería utilizar muestras conocidas como controles adicionales.

Criterios de calidad

Para la evaluación del ensayo es preciso que los valores de la absorbancia del calibrador 0 se encuentren por debajo de 0,25, y la absorbancia del calibrador 6 debería estar por encima de 1,00. Las muestras que arrojen valores de la absorbancia más altos que los del Calibrador 6 deberán volverse a analizar con una dilución más alta.

EVALUACIÓN DE LOS RESULTADOS

Establecimiento de la curva de calibración

Los calibradores suministrados contienen las siguientes concentraciones de hIGFBP-1:

Estándar	0	1	2	3	4	5	6
ng/ml	0	0,1	0,5	1	2	4	8
DO (450-620 nm)	0,012	0,043	0,189	0,381	0,771	1,596	2,748

- Trace las concentraciones de calibrador en el eje de la X en función del valor medio de la absorbancia de los calibradores en el eje de la Y.
- Recomendación: el cálculo de la curva de calibración debe efectuarse utilizando un programa informático porque por lo general la curva no se describe idealmente (sin la transformación correspondiente) mediante regresión lineal. **Para la evaluación normalmente son adecuados un ajuste de curva polinomial de un grado más alto, o un ajuste de curva logística de cuatro parámetros (4-PL) o una regresión no lineal** (como podría ser una alineación spline o en escala milimetrada en casos individuales).
- La concentración de IGFBP-1 en ng/ml de las muestras se puede calcular mediante **multiplicación** con el **factor de dilución** correspondiente.

Ejemplo de curva de calibración típica

Los datos siguientes son solo a efectos de demostración y no se pueden utilizar en lugar de la generación de datos en el momento de realizar el ensayo. La curva de calibración de ejemplo mostrada en la figura 1 **no se puede** utilizar para calcular los resultados de su prueba. Debe establecer una curva de calibración para cada prueba que lleve a cabo.

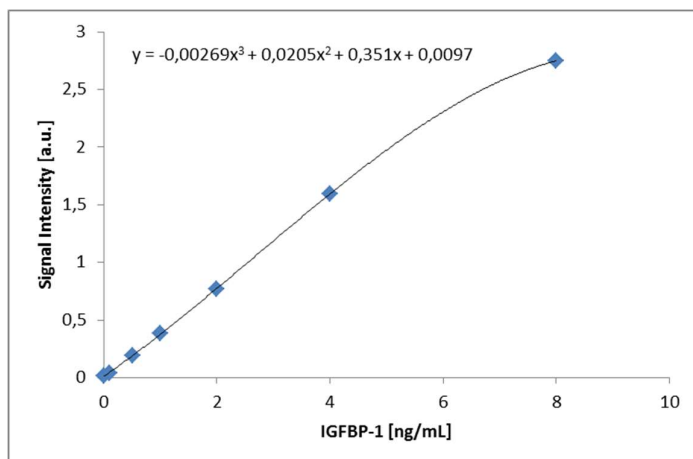


Figura 1. Curva de calibración de ejemplo

Cálculo de ejemplo de concentraciones de IGFBP-1

Dilución de la muestra: 1:16

Extinción medida de su muestra: 0,199

Su **programa de medición** calculará automáticamente la concentración de IGFBP-1 de la muestra diluida. Usted solo tiene que determinar el ajuste de la curva más apropiado (aquí: polinomial de 3^{er} grado). En este caso de ejemplo el programa resuelve la siguiente ecuación para calcular la concentración de IGFBP-1 en la muestra:

$$y = -0,00269x^3 + 0,0205x^2 + 0,351x + 0,0097$$

$$0,199 = -0,00269x^3 + 0,0205x^2 + 0,351x + 0,0097$$

$$x = 0,5235$$

Si se tiene en cuenta el factor de dilución (**1:16**), la concentración de IGFBP-1 de la muestra sin diluir será 0,5235 ng/ml x 16 = 8,376 ng/ml

Interpretación de los resultados

Los resultados de la prueba no deben ser la única base para la toma de decisiones terapéuticas. Los resultados deben interpretarse con relación a la anamnesis, observaciones clínicas adicionales y los resultados de otras pruebas diagnósticas. Asimismo, se recomienda establecer valores de referencia y de corte correspondientes al grupo relevante de pacientes de cada laboratorio.

LIMITACIÓN DEL PROCEDIMIENTO

El kit ELISA de IGFBP-1 de DIASource se basa en anticuerpos murinos. Generalmente, esta técnica es sensible a los anticuerpos heterófilos así como a los anticuerpos humanos anti-ratón en la muestra. La influencia de estos anticuerpos está reducida por el diseño del ensayo, pero no se puede excluir completamente. Además, para la interpretación de las concentraciones de IGFBP-1, se debe tener en cuenta la sensibilidad y la especificidad del diagnóstico. También se debe tener en cuenta la duración de la prueba, este sistema de prueba no es adecuado para el punto de cuidado.

VALORES DE REFERENCIA

Las concentraciones de IGFBP-1 en sueros humanos de 69 donantes adultos sanos se determinaron con el kit ELISA de DIASource. Se encontraron ligeras diferencias dependientes del sexo, las concentraciones de todas las muestras variaron desde un mínimo de 0,23 ng/ml hasta un máximo de 17,94 ng/ml (ver tabla 1).

Tabla 1. Valores esperados de IGFBP-1 en sueros de adultos sanos (valores medidos en ng/ml)

Sexo	N.º de muestras	Valor promedio	Mediana	Mín. – Máx.
mujer	33	4,79	4,24	0,23 – 16,07
hombre	36	5,22	2,71	0,42 – 17,94
Total	69	5,01	2,77	0,23 – 17,94

EFICACIA DIAGNÓSTICA

Sensibilidad

La sensibilidad analítica se determinó midiendo el estándar nulo (calibrador 0) y calculando la concentración correspondiente de la intensidad de la señal del calibrador 0 + 2SD. En tres ensayos diferentes se midieron sensibilidades analíticas de 0,03 a 0,08 ng/ml con un valor promedio de 0,055 ng/ml.

Especificidad

El sistema IGF/IGFBP consta de varias proteínas relacionadas y homólogas. Por tanto, se analizó, a modo de ejemplo, la reactividad cruzada del kit ELISA de IGFBP-1 de DIAsource frente otras IGFBP, con las dos IGFBP más comunes en circulación. En la Tabla 2 se resumen los resultados.

Tabla 2. Reactividad cruzada con las IGFBP relacionadas. Se añadieron 500 ng de la IGFBP indicada a 1 ml de tampón de dilución y se midieron como una muestra. Se muestra la concentración medida y la reactividad cruzada relativa.

	Concentración [ng/ml]	Reactividad cruzada relativa [%]
IGFBP-2	0,0071	0,00142
IGFBP-3	0,0033	0,00066

Reproducibilidad y precisión

Variación intraensayo

Las muestras de suero se midieron hasta 20 veces en el mismo ensayo y el coeficiente se calculó basándose en la concentración de IGFBP-1 recalculada. Los datos de ejemplo se muestran en la Tabla 3. El coeficiente de variación (CV) medio medido es del 6,52 % (n = 6).

Tabla 3 Variación intraensayo

	Muestra 1	Muestra 2	Muestra 3
Media [ng/ml]	4,25	12,21	55,17
DE (ng/ml)	0,24	0,75	2,38
CV [%]	5,59	6,11	4,32
Número [n]	20	20	20

Variación interensayo

Se midieron las muestras de suero en ensayos independientes. El promedio del coeficiente de variación fue del 6,05 % (DE 0,46). En la tabla 4 se presentan los resultados de ejemplo.

Tabla 4: Variación interensayo

	Muestra 1	Muestra 2	Muestra 3	Muestra 4	Muestra 5	Muestra 6
Media [ng/ml]	12,50	8,52	6,42	18,62	4,43	9,01
DE (ng/ml)	0,17	0,24	0,25	0,52	0,18	0,18
CV [%]	1,33	2,80	3,90	2,80	4,11	2,05
Número [n]	5	5	5	5	5	5

Linealidad

En la figura 1 se muestran la linealidad e la dilución de la muestra A modo de ejemplo, se diluyeron tres muestras de suero 1:5 hasta 1:512 y se midió la concentración de IGFBP-1 dentro de cada dilución. Los resultados se analizaron mediante análisis de regresión lineal y revelaron coeficientes de determinación >0,98 para cada una de las muestras.

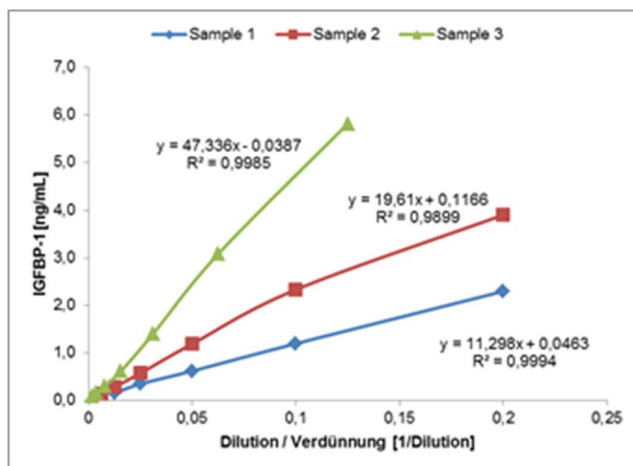


Figura 2. Linealidad de la dilución de la muestra

Recuperación

Se añadió IGFBP-1 nativa (4,5 ng/ml) al suero humano y se cuantificó comparándola con la misma cantidad de IGFBP-1 en tampón. La recuperación media detectada fue del 82 %. Además, se midió el contenido de IGFBP-1 de las muestras enriquecidas con IGFBP-1 recombinante y se calculó la recuperación en comparación con el tampón enriquecido (45 ng/ml) con una recuperación media del 94 %.

Calibración de veracidad/ensayo

No hay preparación de referencia de IGFBP-1 disponible. Se calibró el kit ELISA de IGFBP-1 de DIAsource con respecto a la IGFBP-1 humana nativa purificada. La trazabilidad/consistencia lote a lote se logra mediante un panel de diferentes muestras de suero.

Interferencia

Se analizó la interferencia de la hemoglobina, bilirrubina y los triglicéridos añadiendo la cantidad indicada de estas sustancias a suero humano que contenía IGFBP-1. Se añadió también la misma cantidad de tampón sin ninguna sustancia al suero para su comparación y se calculó la tasa de recuperación relativa. La Tabla 5 muestra que, de media, ni la hemoglobina, la bilirrubina ni los triglicéridos ejercen una influencia significativa sobre la medición de IGFBP-1 en suero humano. Pero generalmente se debe evitar la medición de IGFBP-1 en muestras hemolíticas, ictericas o lipémicas.

Tabla 5. Interferencia de hemoglobina, bilirrubina y triglicéridos en la medición de IGFBP-1 en suero humano. Se muestra la recuperación relativa de IGFBP-1 medida en muestras de suero humano después de agregar la cantidad indicada de sustancias posiblemente interferentes en comparación con las muestras de suero a las que solo se agregó tampón.

Recuperación [%]	Triglicéridos 100 mg/ml	Bilirrubina 100 µg/ml	Hemoglobina 5 mg/ml
Muestra 1	142	72	122
Muestra 2	125	46	119
Muestra 3	82	113	97
Media	116	77	113

COMPARACIÓN DEL ENSAYO

El kit ELISA de IGFBP-1 de DIAsource se comparó con dos ensayos de la competencia. La correlación de estos sistemas de prueba y el ensayo DIAsource se evaluó mediante regresión de Passing-Bablok y regresión lineal. En la tabla 6 se presentan los resultados.

Tabla 6. Comparación del ensayo
RSD = desviación estándar residual

	Muestra [n]	Regresión de Passing Bablok	Regresión lineal coeficiente de regresión
Competidor A	36	$y = -0,99 + 0,3x$ (RSD 2.97)	0,89
Competidor B	34	$y = 0,1 + 1,17x$ (RSD 0.84)	0,84

El análisis revela que la prueba DIAsource se correlaciona bien con las dos pruebas competitivas. Pero con respecto a las concentraciones absolutas medidas, existe una diferencia significativa especialmente en comparación con el Competidor A. Esto indica diferencias en las propiedades de calibración o unión de los anticuerpos utilizados.

Instrucción para aplicación científica

APLICACIÓN CIENTÍFICA

Este kit de inmunoensayo enzimático es adecuado para medir IGFBP-1 en suero humano o heparina y plasma EDTA o en otros fluidos corporales, por ejemplo, líquido amniótico, leche materna, orina o saliva, con fines científicos. También es adecuado para cuantificar IGFBP-1 en medios de cultivo celular.

Muestras adecuadas para aplicación científica

Cuando sea necesario, dependiendo de los valores esperados de IGFBP-1, la dilución con tampón de dilución puede ser mayor o menor (al menos 1:2.5). La concentración de IGFBP-1 puede variar totalmente entre los diferentes fluidos corporales. En la tabla 7 se presentan ejemplos y recomendaciones de dilución.

Tabla 7 Resultados de pruebas de matriz. Se añadió IGFBP-1 nativa a las respectivas muestras diluidas. Se midieron las muestras enriquecidas sin diluir más. Se muestra la recuperación relativa de la IGFBP-1 añadida del valor medido en tampón de dilución enriquecido.

Muestras	Esperadas IGFBP-1 [ng/ml]	Recuperación IGFBP-1 [%]	Recomendado Dilución
Líquido amniótico	8,140 - 16,450	s/d	≥1:5000 hasta 1:25000
Leche materna	5,12	96	1:10
Orina	0,07	90	1:2,5
Saliva	< 0,02	63	≥1:2,5
Lavado bronquial	< 0,02	100	1:2,5
Espujo	< 0,02	100	1:20
Medio de cultivo celular	---	94	≥1:5

S/d = sin determinar

Reactividad cruzadas entre especies

El suero de las especies citadas se diluyó y utilizó de muestra en este sistema de ensayo.

No se detectó **ninguna señal** en el suero de las siguientes especies:

Rata, ratón, cobaya, conejo, cerdo, oveja, cabra, ganado, caballo, perro, gato, pollo o burro.

REFERENCIAS

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

15. Than, G.N., et al., *Levels of placenta-specific tissue protein 12 (VP12) in serum during normal pregnancy and in patients with trophoblastic tumour*. Arch Gynecol, 1983. **234**(1): p. 39-46.
16. Rutanen, E.M., F. Pekonen, and T. Karkkainen, *Measurement of insulin-like growth factor binding protein-1 in cervical/vaginal secretions: comparison with the ROM-check Membrane Immunoassay in the diagnosis of ruptured fetal membranes*. Clin Chim Acta, 1993. **214**(1): p. 73-81.
17. Martinez de Tejada, B., et al., *Can we improve the diagnosis of rupture of membranes? The value of insulin-like growth factor binding protein-1*. Bjog, 2006. **113**(9): p. 1096-9.

Fecha de revisión: 03/07/2025