



IGFBP-3-EASIA

KAP1171

Read entire protocol before use.

IGFBP-3-EASIA

I. INTENDED USE

Immunoenzymetric assay for the *in vitro* quantitative measurement of the human Insulin-like Growth Factor Binding Protein-3 (IGFBP-3) in serum.

II. GENERAL INFORMATION

- A. **Proprietary name :** DIAsource IGFBP-3-EASIA Kit
- B. **Catalogue number :** KAP1171 : 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)10 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, possible involving interactions with specific receptors located at the cell surface and intracellular. For example, IGFBP-3 is nowadays considered to serve as an anti-cancer molecule, apparently protecting against several common cancers, and effects of IGFBP-3 on insulin signaling in cultured adipocytes have also been suggested.

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

IV. PRINCIPLES OF THE METHOD

The DIAsource IGFBP-3-EASIA is a solid phase Enzyme Amplified Sensitivity Immunoassay performed on microtiterplates. Calibrators and samples react with the capture monoclonal antibody (MAB 1) coated on microtiter well and with a monoclonal antibody (MAB 2) labelled with horseradish peroxidase (HRP). After an incubation period allowing the formation of a sandwich: coated MAB 1 – human IGFBP-3– MAB 2 – HRP, the microtiterplate is washed to remove unbound enzyme labelled antibody. Bound enzyme-labelled antibody is measured through a chromogenic reaction. Chromogenic solution (TMB) is added and incubated. The reaction is stopped with the addition of Stop Solution and the microtiterplate is then read at the appropriate wavelength. The amount of substrate turnover is determined colourimetrically by measuring the absorbance, which is proportional to the human IGFBP-3 concentration. A calibration curve is plotted and IGFBP-3 concentration in samples is determined by interpolation from the calibration curve.

V. REAGENTS PROVIDED

Reagents	96 tests Kit	Color Code	Reconstitution
 Microtiterplate with 96 anti IGFBP3 (monoclonal antibodies) coated breakable wells	96 wells	blue	Ready for use
Ab HRP CONC Conjugate: HRP labelled anti-IGFBP-3 (monoclonal antibodies) in citrate buffer with bovine serum albumin and Proclin	1 vial 0.5 ml	red	Dilute 20 x with conjugate buffer
CONJ BUF Conjugate buffer: Tris buffer with bovine serum albumin and thymol	1 vial 10 ml	red	Ready for use
CAL N Calibrators - N = 1 to 5 , in phosphate buffer with bovine serum and thymol. See exact values on vial labels. Calibrators are prediluted. ! Use dilution buffer as zero calibrator.	5 vials lyophilized	yellow	Add 1 ml distilled water
DIL BUF Dilution buffer: Phosphate buffer with bovine albumin ,bovine serum and thymol.	1 vial 100 ml	black	Ready for use
CONTROL N Controls - N = 1 or 2 in human plasma with thymol. Controls are prediluted.	2 vials lyophilized	silver	Add 1 ml distilled water
WASH SOLN CONC Wash Solution (Tris-HCl)	1 vial 10 ml	brown	Dilute 200 x with distilled water (use a magnetic stirrer).
CHROM TMB Chromogenic TMB Solution (Tetramethylbenzidine)	1 vial 12 ml	white	Ready for use
STOP SOLN Stop solution: HCl 1.0 N	1 vial 12 ml	black	Ready for use

Note: use the dilution buffer as zero calibrator. The calibrators are standardized against the NIBSC/WHO recombinant IGFBP-3, reference reagent coded 93/560.

VI. SUPPLIES NOT PROVIDED

- The following material is required but not provided in the kit:
- High quality distilled water
 - Pipettes for delivery of: 50 µl, 100 µl and 1 ml (the use of accurate pipettes with disposable plastic tips is recommended)
 - Plastic tubes for dilution of samples
 - Vortex mixer
 - Magnetic stirrer
 - Washer for microtiterplates
 - Microtiterplate reader capable of reading at 450 nm and 650 nm (monochromatic reading)

VII. REAGENT PREPARATION

- A. Calibrators:** Reconstitute calibrators with 1 ml distilled water.
! Use dilution buffer as zero calibrator
B. Controls : Reconstitute the controls with 1 ml distilled water.
C Working IGFBP-3-HRP conjugate : Prepare an adequate volume of conjugate solution by adding for example :100 µl of the 20 x concentrated IGFBP-3-HRP conjugate to 2 ml of conjugate buffer. Use a vortex to homogenize. Extemporaneous preparation is recommended.
D. Working Wash solution : Prepare an adequate volume of Working Wash solution by adding 199 volumes of distilled water to 1 volume of Wash Solution (200x). 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 kit components are stable until the expiry date, indicated on the vial label, if kept at 2 to 8°C.
- Unused strips must be stored, at 2-8°C, in a sealed bag containing a desiccant until expiration date.
- After reconstitution, calibrators and controls are stable for one week at 2 to 8°C. For longer storage periods, aliquots should be made and kept at -20°C for maximum 3 months. Avoid successive freezing and thawing
- The concentrated Wash Solution is stable at room temperature until expiration date.
- The Working IGFBP-3-HRP conjugate is stable for 4 hours at room temperature, avoid direct sunlight.
- Alterations in physical appearance of kit reagents may indicate instability or deterioration.

IX. SPECIMEN COLLECTION AND PREPARATION

- Serum must be kept at 2 - 8°C.
- If the test is not run within 24 hours, storage in aliquots at -20°C is recommended. Avoid subsequent freeze thaw cycles.
- Prior to use, all samples should be at room temperature. It is recommended to vortex the samples before use.
- Do not use haemolysed samples.

X. PROCEDURE

- A. Handling notes**
Do not use the kit or components beyond expiry date.
Do not mix materials from different kit lots.
Bring all the reagents to room temperature prior to use.
Thoroughly mix all reagents and samples by gentle agitation or swirling.
Perform calibrators, controls and samples in duplicate. Vertical alignment is recommended.
Use a clean plastic container to prepare the Wash Solution.
In order to avoid cross-contamination, use a clean disposable pipette tip for the addition of each reagent and sample.
For the dispensing of the Chromogenic Solution and the Stop Solution avoid pipettes with metal parts.
High precision pipettes or automated pipetting equipment will improve the precision.
Respect the incubation times.
To avoid drift, the time between pipetting of the first calibrator and the last sample must be limited to the time mentioned in section XIII paragraph E. (Time delay).
Prepare a calibration curve for each run, do not use data from previous runs.
Dispense the Chromogenic Solution within 15 minutes following the washing of the microtiterplate.
During incubation with Chromogenic Solution, avoid direct sunlight on the microtiterplate.

B. Procedure

1. Label one plain plastic tube for each sample.
2. Dispense 1 ml of Dilution Buffer into each tube.
3. Add 10 µl of sample into these tubes.
4. Vortex pre-diluted samples ,reconstituted calibrators and controls.
5. Select the required number of wells for the run. The unused wells should be resealed in the bag with a desiccant and stored at 2-8°C.
6. Secure the wells into the holding frame.
7. Pipette 100 µl of dilution buffer as zero calibrator. Pipette 100 µl of each calibrator, control and diluted sample into the appropriate wells.
8. Pipette 50 µl of IGFBP-3-HRP conjugate solution into all the wells.
9. Incubate for 2 hours at room temperature.
10. Aspirate the liquid from each well.
11. Wash the plate 3 times
12. Pipette 100 µl of the Chromogenic solution into each well within 15 minutes following the washing step.
13. Incubate the microtiterplate for 30 minutes at room temperature, avoid direct sunlight
14. Pipette 100 µl of Stop Solution into each well.
15. Read at 450 nm (reference filter 630 nm or 650 nm) within 1 hour and calculate the results as described in section XI

XI. CALCULATION OF RESULTS

1. Read the plate at 450 nm against a reference filter set at 650 nm (or 630 nm).
2. Calculate the mean of duplicate determinations.
3. On semi-logarithmic or linear graph paper plot the OD values (ordinate) for each calibrator against the corresponding concentration of Hu IGFBP-3 (abscissa) and draw a calibration curve through the calibrator points by connecting the plotted points with straight lines.
4. Read the concentration for each control and sample by interpolation on the calibration curve.
5. Computer assisted data reduction will simplify these calculations. If automatic result processing is 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-EASIA			OD units
Calibrator	0	ng/ml	0.028
	460	ng/ml	0.114
	1270	ng/ml	0.311
	3020	ng/ml	0.778
	6710	ng/ml	1.403
	16070	ng/ml	2.588

XIII. PERFORMANCE AND LIMITATIONS**A. Detection Limit**

Sixteen zero calibrators were assayed along with a set of other calibrators. The detection limit, defined as the apparent concentration two standard deviations above the average OD at zero binding, was 10 ng/ml

B. Specificity

Some potentially interfering hormones have been tested. 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				INTER ASSAY			
Serum	N	<X> ± SD (ng/ml)	CV (%)	Serum	N	<X> ± SD (ng/ml)	CV (%)
A	22	827.2 ± 41.99	5.1	A	10	3074 ± 198.67	6.4
B	24	2081.6 ± 104.4	5.1	B	10	4951 ± 296.4	6

SD : Standard Deviation; CV: Coefficient of variation

D. Accuracy**RECOVERY TEST**

Sample	Added IGFBP-3 (ng/ml)	Recovered IGFBP-3 (ng/ml)	Recovery (%)
Serum 1	3700	3880	104.8%
	5940	6680	112.0%
	10680	11700	109.5%
Serum 2	3700	3760	101.6%
	5940	6620	111.0%
	10680	11620	108.8%

DILUTION TEST

Sample	Dilution	Theoretical Concent. (ng/ml)	Measured Concent. (ng/ml)
Serum A	1/1		6720
	1/2	3360	3510
	1/4	1680	1540
	1/8	840	760
	1/16	420	440
Serum B	1/1		6510
	1/2	3250	3190
	1/4	1620	1410
	1/8	810	710
	1/16	400	440

Serial dilutions were made after the initial dilution with dilution buffer as described in the procedure section X. B. 2-3 .

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 calibrators have been added to the coated wells.

TIME DELAY		
	0 min	30 min
	(ng/ml)	(ng/ml)
S1	4060	4800
S2	5930	5900

XIV. INTERNAL QUALITY CONTROL

- If the results obtained for Control 1 and/or Control 2 are not within the range specified on the vial label, the results cannot be used unless a satisfactory explanation for the discrepancy has been given.
- If desirable, each laboratory can make its own pools of control samples, which should be kept frozen in aliquots. Controls which contain azide will interfere with the enzymatic reaction and cannot be used.
- Acceptance criteria for the difference between the duplicate results of the samples should rely on Good Laboratory Practises
- It is recommended that Controls be routinely assayed as unknown samples to measure assay variability. The performance of the assay should be monitored with quality control charts of the controls.
- It is good practise to check visually the curve fit selected by the computer.

XV. REFERENCE INTERVALS

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

Age Group	MALES (ng/ml)			FEMALES (ng/ml)		
	Mean	Range	N	Mean	Range	N
0 - 2 years	2638	1481-4481	15	2348	1398-3485	12
3 - 5 years	2405	1478-3052	12	2752	2059-3325	13
6 - 8 years	3186	2506-4428	17	3282	2469-4495	13
9 - 11 years	3263	2020-4705	21	3298	2342-4640	11
12 - 14 years	3672	2238-5971	19	4241	3000-7022	14
15 - 17 years	4031	2710-5235	21	4181	2539-6607	20
18 - 20 years	3826	2303-5537	10	3709	2272-6102	9
21 - 30 years	3372	2092-4552	11	3766	2704-5594	10
31 - 40 years	2704	1190-4140	14	3372	2659-4533	12
41 -50 years	3885	2318-6896	18	3240	2322-4046	16
51 - 60 years	3175	2112-4625	16	3830	1602-5997	15
> 60 years	2826	1155-3876	23	3621	1995-6505	21

XVI. PRECAUTIONS AND WARNINGS

Safety

For *in vitro* diagnostic use only.

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 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 all reagents, Stop Solution contains HCl. In case of contact, wash thoroughly with water.

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

XVII. 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 DUIN CM.
A polymorphism in the gene for IGF-I : functional properties and risk for type 2 diabetes and myocardial infarction.
Diabetes 2001; 50:637-642.

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

XVIII.**SUMMARY OF THE PROTOCOL**

	CALIBRATORS CONTROLS µl	SAMPLE(S) µl
<u>DILUTION OF SAMPLES</u> Dilution buffer Sample	- -	1000 10
Shaking	Vortex	
<u>INCUBATION</u> Calibrators (0 to 5), controls Diluted Samples, Diluted Conjugate	100 - 50	- 100 50
Incubate for 2 hours at room temperature. Aspirate the contents of each well. Wash 3 times with 400 µl of Wash Solution and aspirate.		
Chromogenic Solution	100	100
Incubate for 30 min at room temperature		
Stop Solution	100	100
Read on a microtiterplate reader and record the absorbance of each well at 450 nm (versus 630 or 650 nm)		

DIAsource Catalogue Nr : KAP1171	P.I. Number : 1700773 /en	Revision nr : 160308/2
-------------------------------------	------------------------------	---------------------------

Revision date : 2016-03-08

Lire entièrement le protocole avant utilisation.

IGFBP-3-EASIA

I. BUT DU DOSAGE

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

II. INFORMATIONS GÉNÉRALES

- A. **Nom du produit :** DIAsource IGFBP-3-EASIA kit
- B. **Numéro de catalogue :** KAP1171 : 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 différenciation et l'apoptose cellulaires. De plus, le système IGF modifie la sensibilité à l'insuline et le métabolisme du glucose à long terme. Enfin, de nombreuses données épidémiologiques, expérimentales et cliniques indiquent que le système IGF est également impliqué dans le développement de différents cancers courants ainsi que dans des maladies fréquentes comme l'athérosclérose et le diabète de type 2.

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

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

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

La rotation des complexes ternaires est très lente et la concentration plasmatique en IGFBP-3 reste stable au cours de la journée, n'étant 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. PRINCIPES DU DOSAGE

La DIASource IGFBP-3-EASIA est une « Enzyme Amplified Sensitivity Immunoassay » en phase solide effectuée sur des micro-plaques. Les calibrateurs et les échantillons réagissent avec l’anticorps de capture monoclonal (AcM 1) recouvrant les puits et avec un anticorps monoclonal (AcM 2) marqué avec la peroxydase (HRP). Après une période d’incubation permettant la formation d’un sandwich: AcM 1 tapissé – IGFBP-3 humaine – AcM 2 – HRP, la micro-plaque est lavée afin d’enlever l’anticorps libre marqué enzymatiquement. L’anticorps lié marqué enzymatiquement est mesuré avec une réaction chromogénique. Une solution chromogénique (TMB) est ajoutée et incubée. La réaction est arrêtée avec l’addition de Solution d’arrêt et la micro-plaque est alors lue à la longueur d’onde appropriée. La quantité de remplacement de substrat est déterminée colorimétriquement par la mesure de l’absorbance, qui est proportionnelle à la concentration en IGFBP-3 humaine. Une courbe de calibration est dessinée et la concentration en IGFBP-3 dans les échantillons est déterminée par interpolation de la courbe de calibration.

V. RÉACTIFS FOURNIS

Réactifs			96 tests Kit	Code Couleur	Reconstitution
 Plaques de micro-titration sécable avec 96 puits recouvert d'anti IGFBP-3 (anticorps monoclonal)			96 puits	bleu	Prêt à l'emploi
Ab HRP CONC Conjugué: anti-IGFBP-3 marqué avec de l'HRP (anticorps monoclonal) dans un tampon citrate avec de la sérum albumine bovine et du Proclin			1 flacon 0,5 ml	Rouge	Diluer 20 x avec le tampon du conjugué
CONJ BUF Tampon du conjugué: un tampon TRIS avec de l'albumine bovine et du thymol			1 flacon 10 ml	Rouge	Prêt à l'emploi
CAL N Calibrateur N = 1 à 5, dans un tampon phosphate avec de la sérum albumine bovine et du thymol Valeurs exactes sur chaque flacon. Les calibrateurs sont prédilués. ! utiliser le tampon de dilution comme calibrateur zéro.			5 flacons lyophilisés	Jaune	Ajouter 1 ml d'eau distillée
DIL BUF Tampon de dilution: tampon phosphate avec de la sérum albumine bovine, du sérum bovin et du thymol.			1 flacon 100 ml	Noir	Prêt à l'emploi
CONTROL N Contrôles - N = 1 ou 2 dans du plasma humain et du thymol Les contrôles sont prédilués.			2 flacons lyophilisés	Gris	Ajouter 1 ml d'eau distillée
WASH SOLN CONC Solution de Lavage (Tris-HCl)			1 flacon 10 ml	Brun	Diluer 200 x avec de l'eau distillée (utiliser un agitateur magnétique).
CHROM TMB Solution Chromogène TMB (Tetramethylbenzidine)			1 flacon 12 ml	Blanc	Prêt à l'emploi
STOP SOLN Solution d'arrêt: HCl 1,0 N			1 flacon 12 ml	Noir	Prêt à l'emploi

Note: utiliser le tampon de dilution comme calibrateur zéro.
Les calibrateurs sont standardisés par rapport à l'IGFBP-3 recombinante, standard de référence NIBSC/WHO code 93/560.

VI. MATÉRIELS NON FOURNIS

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

- 1. Eau distillée d’une haute qualité
- 2. Pipettes pour distribuer: 50 µl, 100 µl et 1 ml (l’utilisation de pipettes précises et de pointes en plastique est recommandée)

- 3. Des tubes en plastique pour la dilution des échantillons
- 4. Agitateur vortex
- 5. Agitateur magnétique
- 6. Laveur de micro-plaques
- 7. Lecteur de micro-plaques capable de lire à 450 nm et 650 nm (lecture monochromatique)

VII. PRÉPARATION DES RÉACTIFS

- A. **Calibrateurs** : Reconstituer les calibrateurs avec 1 ml d’eau distillée.
! Utiliser le tampon de dilution comme calibrateur zéro
- B. **Contrôles** : Reconstituer les contrôles avec 1ml d’eau distillée.
- C. **Conjugué IGFBP-3-HRP de travail**: Préparer un volume adéquat de conjugué de travail en ajoutant, par exemple : 100 µl du conjugué IGFBP-3-HRP concentré (20x) à 2 ml de tampon du conjugué. Utiliser un agitateur magnétique pour homogénéiser. Il est recommandé de faire une dilution extemporanée.
- D. **Solution de Lavage** : Préparer un volume adéquat de Solution de Lavage en ajoutant 199 volumes d’eau distillée à 1 volume de Solution de Lavage (200x). 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.
- Des barrettes inutilisées doivent être gardées, à 2-8°C, dans un sachet cacheté contenant un dessiccateur jusqu’à la date d’expiration.
- Après reconstitution, les calibrateurs et les contrôles sont stables pendant 7 jours entre 2 et 8°C. Pour de plus longues périodes de stockage, des aliquots devront être réalisés et ceux-ci seront gardés à –20°C pendant 3 mois. Eviter des cycles de congélation et décongélation successifs.
- La Solution de Lavage concentrée est stable à température ambiante jusqu’à la date d’expiration.
- Le conjugué de travail IGFBP-3-HRP est stable pendant 4 heures à température ambiante. Éviter l'exposition directe au soleil.
- Des altérations dans l’apparence physique des réactifs de la trousse peuvent indiquer une instabilité ou une détérioration.

IX. PRÉPARATION ET STABILITÉ DE L’ÉCHANTILLON

- 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 en aliquots à -20°C est recommandé. Éviter des cycles de congélation et décongélation successifs.
- Avant l’utilisation des échantillons, ceux-ci doivent être à température ambiante. On recommande de vortexer les échantillons avant de les utiliser.
- Ne pas utiliser d’échantillons hémolysés

X. MODE OPÉRATOIRE

- 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 avant utilisation. Mélangez tous les réactifs et les échantillons sous agitation douce. Réaliser les calibrateurs, les contrôles et les échantillons en double. Un alignement vertical est recommandé.
Utiliser un récipient en plastic propre pour préparer la Solution de Lavage. Pour éviter toute contamination croisée, utiliser une nouvelle pointe de pipette pour l’addition de chaque réactif et échantillon. Pour la distribution de la solution du chromogène et de la solution d’arrêt, éviter des pipettes avec des parties en métal.
Des pipettes de haute précision ou un équipement de pipetage automatique permettent d’augmenter la précision.
Respecter les temps d’incubation.
Afin d’éviter des anomalies, le délai entre le pipetage du premier calibrateur et celui du dernier échantillon doit être limité au délai indiqué à la section XIII paragraphe E (Délai).
Préparer une courbe d’étalonnage pour chaque nouvelle série d’expériences, ne pas utiliser les données d’expériences précédentes.
Distribuer la solution du chromogène dans les 15 minutes après le lavage de la plaque de micro-titration.
Éviter exposition à la lumière du soleil lors de l’incubation avec la solution du chromogène.

B. Mode opératoire

- 1. Étiqueter un tube ordinaire en plastique pour chacun des échantillons.
- 2. Distribuer 1 ml de tampon de dilution dans chacun des tubes.
- 3. Ajouter 10 µl d'échantillon dans ces tubes.
- 4. Vortexer les échantillons prédilué, les calibrateurs reconstitués et les contrôles.
- 5. Sélectionner le nombre de barrettes nécessaires pour le test. Les barrettes inutilisées doivent être cachetées de nouveau dans le sachet avec un desiccateur et gardées à 2-8°C.
- 6. Placer les barrettes dans le support.
- 7. Pipeter 100 µl du tampon de dilution comme calibrateur zéro. Pipeter 100 µl de chaque Calibrateur, Contrôle et Échantillon dilué dans les puits appropriés.
- 8. Pipeter 50 µl du conjugué IGFBP-3-HRP de travail dans tous les puits.
- 9. Incuber pendant 2 heures à température ambiante.
- 10. Aspirer le liquide de chaque puits.
- 11. Laver la plaque 3 fois.
- 12. Pipeter 100 µl de la solution chromogène dans chaque puits dans les 15 minutes après la phase de lavage.
- 13. Incuber la micro-plaque pendant 30 minutes à température ambiante, éviter exposition à la lumière du soleil.
- 14. Pipeter 100 µl de la Solution d'arrêt dans chaque puits.
- 15. Lire les absorbances à 450 nm (filtre de référence 630 nm ou 650 nm) endéans l'heure et calculer les résultats comme décrits dans la section XI.

XI. CALCUL DES RÉSULTATS

- 1. Lire la plaque à 450 nm contre un filtre de référence mis à 650 nm (ou 630 nm).
- 2. Calculer la moyenne de chaque détermination réalisée en double.
- 3. Dessiner sur un graphique linéaire ou semi-logarithmique les DO (ordonnées) pour chaque calibrateur contre la concentration correspondante en IGFBP-3 humaine (abscisses) et dessiner une courbe de calibration à l'aide des points de calibration, en connectant les points avec des lignes droites.
- 4. Lire la concentration pour chaque contrôle et échantillon par interpolation sur la courbe de calibration.
- 5. 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. DONNÉES TYPES

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

IGFBP-3-EASIA			Unités OD
Calibrateur	0	ng/ml	0,028
	460	ng/ml	0,114
	1270	ng/ml	0,311
	3020	ng/ml	0,778
	6710	ng/ml	1,403
	16070	ng/ml	2,588

XIII. PERFORMANCE ET LIMITES

A. Sensibilité

Seize calibrateurs zéro ont été testés en parallèle avec un assortiment d'autres calibrateurs. La limite de détection, définie comme la concentration apparente située 2 déviations standards au-dessus de la moyenne DO déterminée à la fixation zéro, était de 10 ng/ml.

B. Spécificité

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

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

C. Précision

INTRA-ESSAI				INTER-ESSAI			
Sérum	N	<X> ± SD (ng/ml)	CV (%)	Sérum	N	<X> ± SD (ng/ml)	CV (%)
A	22	827,2 ± 41,99	5,1	A	10	3074 ± 198,67	6,4
B	24	2081,6 ± 104,4	5,1	B	10	4951 ± 296,4	6

SD : Déviation Standard; CV: Coefficient de variation

D. Exactitude

TEST DE RECUPERATION			
Échantillon	IGFBP-3 ajoutée (ng/ml)	IGFBP-3 récupérée (ng/ml)	Récupération (%)
Sérum 1	3700	3880	104,8%
	5940	6680	112,0%
	10680	11700	109,5%
Sérum 2	3700	3760	101,6%
	5940	6620	111,0%
	10680	11620	108,8%

TEST DE DILUTION			
Echantillon	Dilution	Concent. théorique (ng/ml)	Concent. Mesurée (ng/ml)
Sérum A	1/1		6720
	1/2	3360	3510
	1/4	1680	1540
	1/8	840	760
	1/16	420	440
Sérum B	1/1		6510
	1/2	3250	3190
	1/4	1620	1410
	1/8	810	710
	1/16	400	440

Des dilutions en série ont été faites, après la dilution initiale, avec le tampon de dilution comme décrit dans la section X. B. 2-3 de la procédure.

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

Comme montré ci-dessous, les résultats d'un essai restent précis même quand un échantillon est distribué 30 minutes après que le calibrateur a été ajouté aux tubes avec l'anticorps.

DELAÏ		
	0 min	30 min
	(ng/ml)	(ng/ml)
S1	4060	4800
S2	5930	5900

XIV. CÔNTROLE DE QUALITÉ 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 aliquotés. Des contrôles qui contiennent de l'azide influenceront la réaction enzymatique et ne peuvent pas être utilisés.
- Les critères d'acceptation pour les écarts des valeurs in duplo des échantillons doivent être basés sur les pratiques de laboratoire courantes.
- On recommande que les contrôles soient testés de façon routinière comme des échantillons inconnus pour mesurer la variabilité du test. La réalisation du test doit être suivie avec des fichiers de contrôle de qualité des contrôles.
- On recommande de vérifier visuellement la courbe sélectionnée par l'ordinateur.

XV. VALEURS ATTENDUES

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

Age	MASCULIN (ng/ml)			FEMININ (ng/ml)		
	Moyen	Portée	N	Moyen	Portée	N
0 - 2 ans	2638	1481-4481	15	2348	1398-3485	12
3 - 5 ans	2405	1478-3052	12	2752	2059-3325	13
6 - 8 ans	3186	2506-4428	17	3282	2469-4495	13
9 - 11 ans	3263	2020-4705	21	3298	2342-4640	11
12 - 14 ans	3672	2238-5971	19	4241	3000-7022	14
15 - 17 ans	4031	2710-5235	21	4181	2539-6607	20
18 - 20 ans	3826	2303-5537	10	3709	2272-6102	9
21 - 30 ans	3372	2092-4552	11	3766	2704-5594	10
31 – 40 ans	2704	1190-4140	14	3372	2659-4533	12
41 -50 ans	3885	2318-6896	18	3240	2322-4046	16
51 - 60 ans	3175	2112-4625	16	3830	1602-5997	15
> 60 ans	2826	1155-3876	23	3621	1995-6505	21

XVI. PRÉCAUTIONS ET AVERTISSEMENTS

Sécurité
Pour utilisation en diagnostic *in vitro* uniquement.
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 devront être conformes 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.
Éviter le contact de la peau avec tous les réactifs, la solution d’arrêt contient du HCl. En cas de contact, laver avec beaucoup d’eau.
Ne pas fumer, ni boire, ni manger ni appliquer de produits cosmétiques dans les laboratoires. Ne pas pipeter avec la bouche. Utiliser des vêtements protecteurs et des gants à usage unique.

XVII. BIBLIOGRAPHIE

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

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

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

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

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

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

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

XVIII. RÉSUMÉ DU PROTOCOLE

	CALIBRATEURS CONTRÔLES (µl)	ÉCHANTILLON(S) (µl)
<u>DILUTION DES ÉCHANTILLONS</u> Tampon de dilution Échantillon	- -	1000 10
Secouer	Vortex	
Calibrateurs (0-5), Contrôles Échantillons dilués, Conjugué dilué	100 - 50	- 100 50
Incuber pendant 2 heures à température ambiante. Aspirer le contenu de chaque puits. Laver 3 fois avec 400 µl de la Solution de Lavage et aspirer.		
Solution du chromogène	100	100
Incuber pendant 30 min à température ambiante.		
Solution d'arrêt	100	100
Lire sur un lecteur de micro-plaques et enregistrer l'absorbance de chaque puits à 450 nm (contre 630 ou 650 nm)		

DIAsource Catalogue Nr : KAP1171	P.I. Number : 1700773/fr	Revision nr : 160308/2
-------------------------------------	-----------------------------	---------------------------

Date de révision : 2016-03-08

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

IGFBP-3 -EASIA

I. USO DEL KIT

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

II. INFORMAZIONI DI CARATTERE GENERALE

- A. Nome commerciale: DIASource IGFBP-3-EASIA Kit
- B. Numero di catalogo: KAP1171: 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-EASIA è un immunosaggio a sensibilità amplificata a fase solida eseguito su piastre di microtitolazione. I calibratori e i campioni reagiscono con la cattura dell'anticorpo monoclonale (MAb 1) che riveste il pozzetto di microtitolazione e con un anticorpo monoclonale (MAb 2) marcato con horseradish perossidasi (HRP). Dopo un periodo di incubazione che consenta la formazione di un sandwich: MAb 1 di rivestimento – IGFBP-3 umano – MAb 2 – HRP, la piastra di microtitolazione viene lavata per rimuovere l'anticorpo marcato con enzima non legato. L'anticorpo marcato con enzima non legato viene misurato attraverso una reazione cromogenica. Si procede quindi con l'aggiunta della soluzione cromogena (TMB) e successiva incubazione. La reazione viene interrotta con l'aggiunta di Soluzione di arresto; quindi la piastra di microtitolazione viene letta alla lunghezza d'onda adeguata. La quantità di turnover del substrato viene determinata colorimetricamente misurando l'assorbanza che è proporzionale alla concentrazione di IGFBP-3 umano. Viene tracciata una curva di calibrazione e la concentrazione IGFBP-3 nei campioni viene determinata per interpolazione dalla curva di calibrazione.

V. REATTIVI FORNITI

Reattivi	Kit da 96 test	Codice colore	Volume di ricostituzione
 Piastra di microtitolazione con 96 pozzetti separabili, rivestiti anti IGFBP-3 (anticorpi monoclonali)	96 pozzetti	Blu	Pronte per l'uso
Ab HRP CONC Coniugato: marcato HRP anti-IGFBP-3 (Anticorpi monoclonali) in tampone citrato con albumina di siero bovino e Proclin	1 flacone 0,5 ml	Rosso	Diluire 20 x con tampone del coniugato
CONJ BUF Tampone del coniugato: tampone TRIS con albumina di siero bovino e timolo	1 flacone 10 ml	Rosso	Pronto per l'uso
CAL N Calibratore 1-5, in tampone fosfato con siero bovino e timolo. Le concentrazioni esatte degli calibratore sono riportate sulle etichette dei flaconi. I calibratori sono pre-diluiti. ! Usare il tampone di diluizione come calibratore zero.	5 flaconi liofiliz.	Giallo	Aggiungere 1 ml di acqua distillata
DIL BUF Tampone di diluizione: tampone fosfato con albumina bovina, siero bovino e timolo.	1 flacone 100 ml	Nero	Pronto per l'uso
CONTROL N Controlli: N = 1 o 2, in plasma umano con timolo I controlli sono pre-diluiti.	2 flaconi liofiliz.	Argento	Aggiungere 1 ml di acqua distillata
WASH SOLN CONC Tampone di lavaggio (TRIS HCl)	1 flacone 10 ml	Bruno	Diluire 200 x con acqua distillata (usando un agitatore magnetico)
CHROM TMB Soluzione Cromogena TMB (tetrametilbenzidina)	1 flacone 12 ml	Bianco	Pronto per l'uso
STOP SOLN Soluzione di arresto: HCl 1,0 N	1 flacone 12 ml	Nero	Pronto per l'uso

Note: usare il tampone di diluizione come calibratore zero. I calibratori sono standardizzati rispetto all'IGFBP-3 ricombinante, standard di riferimento NIBSC/WHO, codice 93/560

VI. REATTIVI NON FORNITI

- Il seguente materiale è richiesto per il dosaggio ma non è fornito nel kit.
1. Acqua distillata di qualità elevata
 2. Pipette per dispensare 50 µl, 100 µl e 1 ml (Si raccomanda di utilizzare pipette accurate con puntale in plastica monouso).
 3. Provette di plastica per la diluizione dei campioni.
 4. Agitatore tipo vortex.
 5. Agitatore magnetico.
 6. lavatrice per piastra di microtitolazione
 7. Lettore piastra di microtitolazione con una potenza di lettura di 450 nm e 650 nm (lettura monocromatica)

VII. PREPARAZIONE DEI REATTIVI

- A. Calibratore:** Ricostituire i calibratori con 1 ml di acqua distillata.
! Usare il tampone di diluizione come calibratore zero.
- B. Controlli:** Ricostituire i controlli con 1 ml di acqua distillata.
- C. Soluzione di lavoro del coniugato IGFBP-3-HRP:** Preparare la quantità necessaria di soluzione del coniugato aggiungendo ad esempio: 100 µl del coniugato IGFBP-3-HRP concentrato 20 x a 2 ml di tampone del coniugato. Utilizzare un vortex per omogeneizzare. Si raccomanda la preparazione estemporanea.
- D. Soluzione di lavoro del tampone di lavaggio:** Preparare la quantità necessaria di soluzione di lavoro del tampone di lavaggio aggiungendo 199 parti di acqua distillata ad una parte di tampone di lavaggio concentrato (200x). 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.
- Le strisce reattive inutilizzate devono essere conservate a 2-8°C, in un contenitore sigillato che contenga un essiccante fino alla data di scadenza.
- Dopo la ricostituzione, i calibratori e i controlli sono stabili 7 giorni a 2-8°C. Per periodi di conservazione molto lunghi, preparare e mantenere le aliquote a –20°C per un massimo di 3 mesi. Evitare ripetuti cicli di congelamento-scongelamento dei campioni.
- La soluzione di lavaggio concentrata è stabile a temperatura ambiente fino alla data di scadenza.
- Il coniugato IGFBP-3-HRP una volta pronto è stabile per 4 ore a temperatura ambiente. Evitare di esporre a luce diretta.
- 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.
- Prima dell'impiego, tutti i campioni devono essere a temperatura ambiente. Si raccomanda di vortexare i campioni prima di utilizzarli.
- Non usare campioni emolizzati.

X. METODO DEL DOSAGGIO

- A. Avvertenze generali**
Non usare il kit o suoi componenti oltre la data di scadenza.
Non mescolare reattivi di lotti diversi.
Prima dell'uso portare tutti i reattivi a temperatura ambiente.
Mescolare delicatamente i campioni per inversione o rotazione.
Eseguire calibratori, controlli e campioni in doppio. Si raccomanda l'allineamento verticale.
Utilizzare un contenitore di plastica pulito per preparare la soluzione di lavaggio.
Per evitare cross-contaminazioni, cambiare il puntale della pipetta ogni volta che si usi un nuovo reattivo o campione.
Per la distribuzione della soluzione cromogena e la Stop Solution evitare pipette con parti metalliche.
L'uso di pipette ben tarate e ripetibili o di sistemi di pipettamento automatici migliora la precisione del dosaggio.
Rispettare i tempi di incubazione.
Per evitare derive, l'intervallo tra il pipettaggio del primo calibratore e l'ultimo campione deve essere limitato ai tempi riportati nella sezione XIII, paragrafo E (Tempo Trascorso).
Allestire una curva di calibrazione per ogni seduta analitica, in quanto non è possibile utilizzare per un dosaggio curve di calibrazione di sedute analitiche precedenti.
Distribuzione della soluzione cromogena entro 15 minuti dopo il lavaggio della piastra di microtitolazione.
Durante l'incubazione con la soluzione cromogena evitare la luce diretta del sole sulla piastra di microtitolazione.

B. Metodo del dosaggio

- 1. Etichettare una provetta di plastica liscia per ogni campione.
- 2. In ciascuna provetta, dispensare 1 ml di tampone di diluizione.
- 3. Aggiungere a queste provette 10 µl di campione.
- 4. Vortexare i campioni pre-diluiti, i calibratori ricostituiti e i controlli.
- 5. Selezionare il numero di strisce reagenti necessario per il test. Le strisce reagenti inutilizzate devono essere risigillate nel contenitore con un essiccante e conservate a 2-8°C.
- 6. Assicurare le strisce reagenti nel telaio di supporto.
- 7. Pipettare 100 µl di tampone di diluizione come calibratore zero. Pipettare 100 µl di ogni calibratore, controllo e campione diluito nei pozzetti adeguati.
- 8. Pipettare 50 µl della soluzione di lavoro del coniugato IGFBP-3-HRP in tutti i pozzetti.
- 9. Incubare per 2 ore a temperatura ambiente.
- 10. Aspirare il liquido da ogni pozzetto.
- 11. Lavare la piastra 3 volte.
- 12. Pipettare in ogni pozzetto 100 µl di Soluzione Cromogena entro 15 minuti dal termine della fase di lavaggio.
- 13. Incubare la piastra di microtitolazione per 30 minuti a temperatura ambiente; evitare la luce diretta del sole.
- 14. Pipettare 100 µl di soluzione di arresto in ogni pozzetto.
- 15. Leggere le assorbanze a 450 nm (filtro di riferimento a 630 nm o 650 nm) entro un’ora e calcolare i risultati come descritto nella sezione XI.

XI. CALCOLO DEI RISULTATI

- 1. Leggere la piastra a 450 nm rispetto a un filtro di riferimento regolato a 650 nm (o 630 nm).
- 2. Calcolare la media delle determinazioni in duplicato.
- 3. Costruire la curva di calibrazione su carta millimetrata semilogaritmica o lineare ponendo in ordinata le medie dei OD dei replicati degli standard e in ascissa le rispettive concentrazioni di IGFBP-3 umano, collegando i punti tracciati con linee rette.
- 4. Determinare le concentrazioni e controlli per interpolazione sulla curva di taratura.
- 5. 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 dati che seguono sono esclusivamente a scopo illustrativo e non devono essere in nessun caso utilizzati al posto della curva di taratura "real time".

IGFBP-3-EASIA			Unità OD
Calibratore	0	ng/ml	0,028
	460	ng/ml	0,114
	1270	ng/ml	0,311
	3020	ng/ml	0,778
	6710	ng/ml	1,403
	16070	ng/ml	2,588

XIII. CARATTERISTICHE E LIMITI DEL METODO

A. Sensibilità

Sedici replicati dello standard zero sono stati dosati insieme agli altri standard. La sensibilità, calcolata come concentrazione apparente di un campione con OD pari alla media più 2 deviazioni standard di 16 replicati dello standard zero, è risultata essere 10 ng/ml.

B. Specificità

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

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

C. Precisione

INTRA SAGGIO				INTER SAGGIO			
Siero	N	<X> ± SD (ng/ml)	CV (%)	Siero	N	<X> ± SD (ng/ml)	CV (%)
A	22	827,2 ± 41,99	5,1	A	10	3074 ± 198,67	6,4
B	24	2081,6 ± 104,4	5,1	B	10	4951 ± 296,4	6

SD : Deviazione Standard; CV: Coefficiente di Variazione

D. Accuratezza

TEST DI RECUPERO			
Campione	IGFBP-3 aggiunta (ng/ml)	IGFBP-3 recuperata (ng/ml)	Recupero (%)
Siero 1	3700	3880	104,8%
	5940	6680	112,0%
	10680	11700	109,5%
Siero 2	3700	3760	101,6%
	5940	6620	111,0%
	10680	11620	108,8%

TEST DI DILUIZIONE			
Campione	Diluizione	Concentrazione teorica (ng/ml)	Concentrazione misurata (ng/ml)
Siero A	1/1		6720
	1/2	3360	3510
	1/4	1680	1540
	1/8	840	760
	1/16	420	440
Siero B	1/1		6510
	1/2	3250	3190
	1/4	1620	1410
	1/8	810	710
	1/16	400	440

Le diluizioni in serie sono state effettuate con il tampone di diluizione dopo la diluizione iniziale, come descritto nella sezione X. B. 2-3 della procedura.

E. Tempo trascorso tra l'aggiunta dell'ultimo calibratore e il campione

Come mostrato nella seguente tabella, il dosaggio si mantiene accurato anche quando un campione viene aggiunto nelle provette sensibilizzate 30 minuti dopo l'aggiunta del calibratore.

TEMPO TRASCORSO		
	0 min	30 min
	(ng/ml)	(ng/ml)
S1	4060	4800
S2	5930	5900

XIV. CONTROLLO DI QUALITA’ INTERNO

- Se i risultati ottenuti dosando il Controllo 1 e il Controllo 2 non sono all’interno dei limiti riportati sull’etichetta dei flaconi, non è opportuno utilizzare i risultati ottenuti per i campioni, a meno che non si trovi una giustificazione soddisfacente.
- Ogni laboratorio può preparare un proprio pool di sieri da utilizzare come controllo, da conservare congelato in aliquote. I controlli che contengono azide interferiscono con la reazione enzimatica e quindi non possono essere utilizzati.
- I criteri di accettazione delle differenze tra i risultati in duplicato dei campioni devono basarsi sulla buona prassi di laboratorio.
- Si raccomanda di saggiare i controlli con regolarità come campioni sconosciuti per misurare la variabilità del saggio. La resa del saggio deve essere monitorata con tabelle di controllo qualità dei controlli.
- È buona pratica verificare visivamente il modello di curva selezionato dal computer.

XV. INTERVALLI DI RIFERIMENTO

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

Gruppo di età	MASCHI(ng/ml)			FEMMINE (ng/ml)		
	Media	Intervallo	N	Media	Intervallo	N
0 - 2 anni	2638	1481-4481	15	2348	1398-3485	12
3 - 5 anni	2405	1478-3052	12	2752	2059-3325	13
6 - 8 anni	3186	2506-4428	17	3282	2469-4495	13
9 - 11 anni	3263	2020-4705	21	3298	2342-4640	11
12 - 14 anni	3672	2238-5971	19	4241	3000-7022	14
15 - 17 anni	4031	2710-5235	21	4181	2539-6607	20
18 - 20 anni	3826	2303-5537	10	3709	2272-6102	9
21 - 30 anni	3372	2092-4552	11	3766	2704-5594	10
31 - 40 anni	2704	1190-4140	14	3372	2659-4533	12
41 - 50 anni	3885	2318-6896	18	3240	2322-4046	16
51 - 60 anni	3175	2112-4625	16	3830	1602-5997	15
> 60 anni	2826	1155-3876	23	3621	1995-6505	21

XVI. PRECAUZIONI PER L'USO

Sicurezza
Il kit è solo per uso diagnostico in vitro.
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 qualsiasi contatto della cute con tutti i reagenti, la soluzione di arresto contiene HCl. In caso di contatto, lavare abbondantemente con acqua.
Non fumare, bere, mangiare o applicare cosmetici nell'area di lavoro. Non pipettare i reattivi con pipette a bocca. Utilizzare indumenti protettivi e guanti monouso.

XVII. RIFERIMENTI BIBLIOGRAFICI

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

XVIII. SCHEMA DEL DOSAGGIO

	CALIBRATORE CONTROLLI (µl)	CAMPIONI CONTROLLI (µl)
<u>DILUIZIONE DEI CAMPIONI</u> Tampone di diluizione Campione	- -	1000 10
Agitare	Su vortex	
<u>INCUBAZIONE</u> Calibratore (0 - 5), controlli Campioni diluiti Coniugato diluito	100 - 50	- 100 50
Incubare per 2 ore a temperatura ambiente. Aspirare il contenuto di ogni pozzetto. Lavare 3 volte con 400 µl di soluzione di lavaggio e aspirare.		
Soluzione chromogena	100	100
Incubare per 30 minuti a temperatura ambiente.		
Soluzione di arresto	100	100
Leggere su un lettore per piastra da microtitolazione e registrare l'assorbanza di ogni pozzetto a 450 nm (rispetto a 630 o 650 nm)		

Numero di catalogo di DIAsource: KAP1171	P.I. numero: 1700773/it	Revisione numero: 160308/2
--	----------------------------	-------------------------------

Data di revisione : 2016-03-08

Leer el protocolo completo antes de usar.

IGFBP-3-EASIA

I. INSTRUCCIONES DE USO

Ensayo inmunoenzimático para la determinación cuantitativa *in vitro* de la Proteína 3 enlazante del Factor humano de Crecimiento Similar a la Insulina, (IGFBP-3) en el suero,

II. INFORMACIÓN GENERAL

- A. Nombre:** DIASource IGFBP-3-EASIA Kit
- B. Número de Catálogo:** KAP1171 : 96 determinaciones
- C. Fabricado por:** DIASource ImmunoAssays S.A.
Rue du Bosquet 2, B-1348 Louvain-la-Neuve, Belgium.

Para asistencia técnica e información sobre pedidos contactar:

Tel: +32 (0)10 84.99.11

Fax : +32 (0)10 84.99.91

III. CONTEXTO CLÍNICO

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

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

De las proteínas que se unen al IGF, la IGFBP-3 es la más abundante, representa un 75% o más de la capacidad de unión con el IGF en la circulación de individuos sanos. La IGFBP-3 comparte propiedades funcionales con la IGFBP-5 en que ambos péptidos son capaces de formar complejos ternarios de alto peso molecular de ~150 kilo Dalton con ALS y también con el IGF-I o -II. Sin embargo, la IGFBP-5 circula en mucha menor concentración que la IGFBP-3, y en individuos sanos los complejos ternarios transportan hasta el 90% de la IGFBP-3 pero solo alrededor del 50% de la IGFBP-5.

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

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

IV. PRINCIPIOS DEL MÉTODO

El DIAsource IGFBP-3-EASIA es un Inmunoensayo de fase sólida Enzimático de Sensibilidad Amplificada efectuado en microplacas. Los calibradores y las muestras reaccionan con el anticuerpo de captura monoclonal (MAb 1) que recubre los pocillos de la microplaca y con un anticuerpo monoclonal (MAb 2) marcado con peroxidasa de rábano picante (HRP). Después de un periodo de incubación que permite la formación de un “sándwich”: MAb 1 recubierto – IGFBP-3 humana – MAb 2 – HRP, la microplaca se lava para eliminar los anticuerpos libres marcados con enzimas. Los anticuerpos marcados con enzimas que se han ligado se miden con una reacción cromogénica. La solución cromogénica (TMB) es añadida e incubada. La reacción se para con la adición de la Solución de Parada y después la microplaca se lee a la longitud de onda apropiada. La cantidad de recambio de sustrato es determinada de manera colorimétrica por la medición de la absorbancia, que es proporcional a la concentración de la IGFBP-3 humana. Una curva de calibración es elaborada y la concentración de la IGFBP-3 de las muestras es determinada por interpolación en la curva de calibración.

V. REACTIVOS SUMINISTRADOS

Reactivos			Kit de 96 determinaciones	Código de Color	Reconstitución
 Microplaca con anti IGFBP-3 (anticuerpos monoclonales) pocillos recubiertos desprendibles			96 pocillos	Azul	Listo para uso
Ab	HRP	CONC	1 vial 0,5 ml	Rojo	Diluir 20 x con tampón de conjugado
Conjugado: anti IGFBP-3 marcado con HRP (anticuerpos monoclonales) en tampón de citrato con albúmina de suero bovino y Proclin.					
CONJ BUF			1 vial 10 ml	Rojo	Listo para uso
Tampón de Conjugado: tampón TRIS con albúmina de suero bovino y timol.					
CAL N			5 viales liofilizados	amarillo	Añadir 1 ml de agua destilada
Calibradores N = 1 al 5, en tampón fosfato con albúmina de suero bovino y timol. Ver los valores exactos en las etiquetas de los viales. Los calibradores ya vienen diluidos. ¡Use el tampón de dilución como calibrador cero!					
DIL BUF			1 vial 100 ml	negro	Listo para uso
Tampón de dilución: Tampón de fosfato con albúmina de suero bovino y timol.					
CONTROL N			2 viales Liofilizados	plateado	Añadir 1 ml de agua destilada
Controles - N = 1 o 2 en plasma humano con timol. Los controles ya vienen diluidos.					
WASH	SOLN	CONC	1 vial 10 ml	marrón	Diluir 200 x con agua destilada (utilizar agitador magnético)
Solución de lavado (Tris-HCl)					
CHROM TMB			1 vial 12 ml	blanco	Listo para uso
Solución Cromogénica TMB (Tetrametilbencidina)					
STOP SOLN			1 vial 12 ml	negro	Listo para uso
Solución de Parada: HCl 1N					

Nota : use el tampón de dilución como calibrador cero.
Los calibradores se estandarizan contra el reactivo de referencia de NIBSC/WHO IGFBP-3 recombinante, código 93/560.

VI. MATERIAL NO SUMINISTRADO

- El material mencionado a continuación es necesario y no está incluido en el kit
1. Agua destilada de alta calidad
 2. Pipetas de 50 µl, 100µl y 1 ml (Se recomienda el uso de pipetas precisas con puntas desechables de plástico)
 3. Tubos plásticos para dilución de las muestras.
 4. Vortex
 5. Agitador magnético
 6. Lavador de microplacas
 7. Lector de microplacas capaz de leer a 450 nm y 650 nm (lectura monocromática)

VII. PREPARACIÓN DE REACTIVOS

- A. Calibradores:** Reconstituir los calibradores con 1 ml de agua destilada. **¡Use el tampón de dilución como calibrador cero!**
- B. Controles:** Reconstituir los controles con 1 ml de agua destilada.
- C. Conjugado de trabajo IGFBP-3 –HRP:** Prepare un volumen adecuado de solución de conjugado agregando por ejemplo: 100 µl del conjugado concentrado x 20 IGFBP-3–HRP a 2 ml de tampón de conjugado. Usar un agitador vortex para homogenizar. Se recomienda preparar en el momento de uso.
- D. Solución de lavado de trabajo:** Preparar el volumen necesario de Solución de lavado de trabajo mezclando 199 partes de agua destilada con 1 parte de Solución de lavado (200x). 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 o 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 pocillos que no han sido usados deben ser almacenados entre 2 y 8°C, en una bolsa sellada que contenga un desecante hasta la fecha de expiración.
- Después de reconstituidos, los calibradores y controles son estables por una semana de 2 a 8°C. Para periodos de almacenaje más largos, se deberán preparar alícuotas y almacenarlas a -20°C por un máximo de tres meses. Evitar congelar y descongelar sucesivamente.
- La Solución de Lavado concentrada es estable a temperatura ambiente hasta la fecha de caducidad.
- El conjugado de trabajo IGFBP-3-HRP es estable por cuatro horas a temperatura ambiente, evitar la luz solar directa.
- Las alteraciones de la apariencia física de los reactivos pueden indicar inestabilidad o deterioro.

IX. TOMA 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.
- Antes de usarlas todas las muestras deben estar a temperatura ambiente. Se recomienda agitar las muestras en un Vortex antes de usarlas.
- No utilizar muestras hemolizadas.

X. PROCEDIMIENTO

- A. Notas de manejo**
No utilizar el kit o componentes después de la fecha de caducidad. No mezclar reactivos de diferente número de lote. Llevar todos los reactivos a temperatura ambiente antes de su uso. Mezclar concienzudamente todos los reactivos y muestras, agitándolos o girándolos suavemente. Preparar los calibradores, controles y muestras en duplicado. Se recomienda la alineación vertical.
- Usar un envase plástico limpio para preparar la Solución de Lavado. Con el fin de evitar cualquier contaminación utilizar puntas de pipetas desechables y limpias para la adición de cada reactivo y muestra. Al dispensar la Solución Cromogénica y la Solución de Parada, evitar usar pipetas con partes metálicas. El uso de pipetas de precisión o equipamiento de dispensación automática mejorara la precisión. Respetar los tiempos de incubación. Para evitar deriva, el tiempo entre el pipeteo del primer calibrador y la última muestra debe estar limitado al tiempo mencionado en la sección XIII párrafo E (Demora en el tiempo). Preparar la curva de calibración para cada ensayo, no utilizar los datos de ensayos previos.

Dispensar la Solución Cromogénica dentro de los 15 minutos posteriores al lavado de las microplacas.
Durante la incubación con Solución Cromogénica, evitar exponer las microplacas la luz solar directa.

B. Procedimiento

1. Etiquetar un tubo plástico por cada muestra.
2. Dispensar 1 ml de Tampón de Dilución en cada tubo.
3. Agregar 10 µl de muestra a estos tubos.
4. Agitar en un vortex las muestras pre diluidas, los calibradores y controles reconstituidos.
5. Seleccionar el número requerido de pocillos para el ensayo. Los pocillos sin usar deben ser sellados en la bolsa con un desecante y guardados a 2-8°C.
6. Fijar los pocillos en el soporte.
7. Pipetear 100 µl de tampón de dilución como calibrador cero. Pipetear 100 µl de cada Calibrador, Control y Muestra diluida en el pocillo apropiado.
8. Pipetear 50 µl del conjugado de trabajo IGFBP-3-HRP en cada pocillo.
9. Incubar durante 2 horas a temperatura ambiente.
10. Aspirar el líquido de cada pocillo.
11. Lavar la placa 3 veces.
12. Pipetear 100 µl de la solución cromogénica en cada pocillo dentro de los de 15 minutos después de la fase de lavado.
13. Incubar la microplaca durante 30 minutos a temperatura ambiente en posición horizontal, evitar la luz solar directa.
14. Pipetear 100 µl del Reactivo de Parada en cada pocillo.
15. Leer las absorbancias a 450 nm (filtro de referencia 630 nm o 650 nm) en menos de 1 hora y calcular los resultados como se ha descrito en la sección XI

XI. CÁLCULO DE RESULTADOS

1. Leer la placa a 450 nm contra un filtro de referencia a 650 nm (o 630 nm).
2. Calcular el promedio de las determinaciones dobles.
3. Poner sobre un papel semi-logarítmico o linear los valores de la DO (ordenada) para cada calibrador contra la concentración de IGFBP-3 humana correspondiente (abscisa) y construir la curva de calibración conectando los puntos de calibración con líneas rectas.
4. Leer la concentración para cada control y muestra por interpolación en la curva de calibración.
5. La reducción de datos asistida por ordenador puede facilitar estos cálculos. Si se utiliza el procesamiento de resultados automático, recomendamos el ajuste de la curva dada por la función logística de 4 parámetros.

XII. EJEMPLO DE RESULTADOS

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

IGFBP-3-EASIA			unidades DO
Calibrador	0	ng/ml	0,028
	460	ng/ml	0,114
	1270	ng/ml	0,311
	3020	ng/ml	0,778
	6710	ng/ml	1,403
	16070	ng/ml	2,588

XIII. FUNCIONAMIENTO Y LIMITACIONES

A. Limite de detección

Dieciséis calibradores cero fueron medidos en una curva al mismo tiempo que un conjunto de otros calibradores.
El límite de detección, se definió como la concentración aparente dos desviaciones estándares sobre la DO promedio cuando la unión es cero, fue de 10 ng/ml.

B. Especificidad

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

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

C. Precisión

PRECISIÓN INTRA-ENSAYO				PRECISIÓN INTER-ENSAYO			
Suero	N	<X> ± DS (ng/ml)	CV (%)	Suero	N	<X> ± DS (ng/ml)	CV (%)
A	22	827,2 ± 41,99	5,1	A	10	3074 ± 198,67	6,4
B	24	2081,6 ± 104,4	5,1	B	10	4951 ± 296,4	6

DS : Desviación Estándar; CV: Coeficiente de Variación

D. Exactitud

PRUEBA DE RECUPERACIÓN			
Muestra	IGFBP-3 añadido (ng/ml)	IGFBP-3 recuperado (ng/ml)	Recuperación (%)
Suero 1	3700	3880	104,8%
	5940	6680	112,0%
	10680	11700	109,5%
Suero 2	3700	3760	101,6%
	5940	6620	111,0%
	10680	11620	108,8%

PRUEBA DE DILUCIÓN			
Muestra	Dilución	Concent. Teórica (ng/ml)	Concent. Medida (ng/ml)
Suero A	1/1		6720
	1/2	3360	3510
	1/4	1680	1540
	1/8	840	760
	1/16	420	440
Suero B	1/1		6510
	1/2	3250	3190
	1/4	1620	1410
	1/8	810	710
	1/16	400	440

Se prepararon diluciones seriadas a partir de la dilución inicial con tampón de dilución, como se ha descrito en la sección de procedimiento X. B. 2-3.

E. Demora entre dispensar el último calibrador y muestra.

Como se ve a continuación, los resultados de los ensayos siguen siendo precisos incluso cuando una muestra es dispensada 30 minutos después que los calibradores se han agregado a los pocillos recubiertos.

DEMORA EN EL TIEMPO		
	0 min	30 min
	(ng/ml)	(ng/ml)
S1	4060	4800
S2	5930	5900

XIV. CONTROL DE CALIDAD INTERNO

- Si los resultados obtenidos para el Control 1 y/o Control 2 no están dentro del rango especificado en la etiqueta del vial, los resultados obtenidos no podrán ser utilizados a no ser que se pueda dar una explicación convincente de dicha discrepancia
- Si es conveniente, cada laboratorio puede preparar sus propios grupos de muestras de control, las que deben almacenarse en alícuotas congeladas. Los controles que contienen azida interfieren con la reacción enzimática y no pueden ser utilizados.
- Los criterios de aceptación de las diferencias entre los resultados de los duplicados de las muestras deben depender de las Buenas Prácticas de Laboratorio.
- Recomendamos que los controles sean incluidos rutinariamente en los ensayos como muestras desconocidas para medir la variabilidad del ensayo. El funcionamiento del ensayo debe ser controlado con gráficos de control de calidad de los controles.
- Recomendamos un control visual de la curva seleccionada por el ordenador.

XV. INTERVALOS DE REFERENCIA

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

Edad	HOMBRES (ng/ml)			MUJERES (ng/ml)		
	Media	Rango		Media	Rango	
0 - 2 años	2638	1481-4481	15	2348	1398-3485	12
3 - 5 años	2405	1478-3052	12	2752	2059-3325	13
6 - 8 años	3186	2506-4428	17	3282	2469-4495	13
9 - 11 años	3263	2020-4705	21	3298	2342-4640	11
12 - 14 años	3672	2238-5971	19	4241	3000-7022	14
15 - 17 años	4031	2710-5235	21	4181	2539-6607	20
18 - 20 años	3826	2303-5537	10	3709	2272-6102	9
21 - 30 años	3372	2092-4552	11	3766	2704-5594	10
31 - 40 años	2704	1190-4140	14	3372	2659-4533	12
41 -50 años	3885	2318-6896	18	3240	2322-4046	16
51 - 60 años	3175	2112-4625	16	3830	1602-5997	15
> 60 años	2826	1155-3876	23	3621	1995-6505	21

XVI. PRECAUCIONES Y ADVERTENCIAS

Seguridad

Sólo para uso de diagnóstico in vitro.
Los componentes de sangre humana utilizados en este kit han sido examinados por métodos aprobados por la CEE y/o la FDA resultando negativos para HBsAg, anti-VHC, anti-VIH-1 y 2. No se conoce ningún método que asegure totalmente que los derivados de la sangre humana no transmitirán hepatitis, SIDA u otras infecciones. Por lo tanto el manejo de los reactivos y muestras de suero o plasma se hará de acuerdo con los procedimientos de seguridad locales.
Todos los productos animales y derivados han sido obtenidos a partir de animales sanos. Los componentes bovinos provienen de países donde la EEB (Encefalopatía Espongiforme Bovina) no ha sido informada. Sin embargo, los componentes que contienen sustancias animales deberán ser considerados como potencialmente infecciosos.
Evitar contacto de la piel con todos los reactivos, la Solución de Parada contiene HCl. En caso de contacto, lavar con abundante agua.
No fumar, beber, comer o utilizar cosméticos en el área de trabajo. No pipetear con la boca. Utilizar ropa de protección y guantes desechables.

XVII. BIBLIOGRAFIA

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

XVIII. RESUMEN DEL PROTOCOLO

	CALIBRADORES CONTROLES (µl)	MUESTRA(S) (µl)
<u>DILUCIÓN DE LAS MUESTRAS</u>	-	1000
Tampón de dilución	-	10
Muestra		
Agitar	Vortex	
<u>INCUBACIÓN</u>		
Calibradores (0 - 5), controles	100	-
Muestras Diluidas,	-	100
Conjugado Diluido	50	50
Incubar durante 2 horas a temperatura ambiente. Aspirar el contenido de cada pocillo. Lavar 3 veces con 400 µl de la Solución de Lavado y aspirar.		
Solución Cromogénica	100	100
Incubar durante 30 minutos a temperatura ambiente		
Solución de Parada	100	100
Leer con un lector de microplacas y registrar la absorbancia de cada pocillo a 450 nm (contra 630 o 650 nm).		

DIASource Catalogo Nro.: KAP1171	P.I. Numero: 1700773/es	Revisión nro.: 160308/2
-------------------------------------	----------------------------	----------------------------

Fecha de la revisión : 2016-03-08

Διαβάστε ολόκληρο το πρωτόκολλο πριν από τη χρήση.

IGFBP-3-EASIA

I. ΧΡΗΣΗ ΓΙΑ ΤΗΝ ΟΠΟΙΑ ΠΡΟΟΡΙΖΕΤΑΙ

Ανοσοενζυμομετρικός προσδιορισμός για την *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-EASIA της DIASource
- B. Αριθμός καταλόγου:** KAP1171 : 96 προσδιορισμοί
- Γ. Κατασκευάζεται από την:** DIASource ImmunoAssays S.A.
Rue du Bosquet, 2, B-1348 Louvain-la-Neuve, Belgium.

Για τεχνική βοήθεια ή πληροφορίες σχετικά με παραγγελίες επικοινωνήστε στα:
Τηλ.: +32 (0)10 84.99.11 Φαξ: +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 ευαισθησία στην ινсуλίνη και μακροπρόθεσμα τον μεταβολισμό της γλυκόζης. Τέλος, πολυάριθμα επιδημιολογικά, πειραματικά και κλινικά δεδομένα υποδεικνύουν συμμετοχή του συστήματος των IGF στην ανάπτυξη αρκετών, συχνών κακοήθων νεοπλασιών, όπως και συχνών ασθενειών, όπως η αρτηριοσκλήρυνση και ο σακχαρώδης διαβήτης τύπου 2.

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

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

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

Ο ρυθμός ανακύκλωσης των τριμερών συμπλόκων είναι εξαιρετικά αργός και η συγκέντρωση της IGFBP-3 στο πλάσμα παραμένει σταθερή κατά τη διάρκεια της ημέρας, χωρίς να επηρεάζεται από βραχυχρόνιες διατροφικές αλλαγές. Ως εκ τούτου, αρκεί μία και μόνο μέτρηση για τον καθορισμό των επιπέδων της IGFBP-3. Η GH (αυξητική ορμόνη) αποτελεί τον κύριο ρυθμιστή της IGFBP-3, όπως και των IGF-I και ALS. Για το λόγο αυτό, τα επίπεδα και των τριών πεπτιδίων αυξάνονται κατά την εφηβική ανάπτυξη, και μειώνονται κατόπιν σταδιακά με το πέρασμα 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

Ο προσδιορισμός IGFBP-3-EASIA της DIAsource είναι ένας ενζυμικός ανοσοπροσδιορισμός ενισχυμένης ευαισθησίας, στερεής φάσης, ο οποίος εκτελείται σε πλάκες μικροτιτλοδότησης. Οι βαθμονομητές και τα δείγματα αντιδρούν με το μονοκλωνικό αντίσωμα σύλληψης (MAb 1) που είναι επιστρωμένο στην υποδοχή της πλάκας μικροτιτλοδότησης και με ένα μονοκλωνικό αντίσωμα (MAb 2) σημασμένο με ραφανιδική υπεροξειδάση (HRP). Μετά από μια περίοδο επώασης που επιτρέπει το σχηματισμό ενός σάντουιτς: επιστρωμένο MAb 1 – ανθρόπινο IGFBP-3 – MAb 2 – HRP, η πλάκα μικροτιτλοδότησης υποβάλλεται σε πλύση για να απομακρυνθεί το σημασμένο με ένζυμο αδέσμευτο αντίσωμα. Το σημασμένο με ένζυμο δεσμευμένο αντίσωμα μετράται μέσω μιας χρωμογόνου αντίδρασης. Προστίθεται και επωάζεται χρωμογόνο διάλυμα (TMB). Η αντίδραση σταματά με την προσθήκη ανασχετικού διαλύματος και στη συνέχεια γίνεται ανάγνωση της πλάκας μικροτιτλοδότησης στο κατάλληλο μήκος κύματος. Η ποσότητα μετατροπής του υποστρώματος καθορίζεται χρωματομετρικά μετρώντας την απορρόφηση, η οποία είναι ανάλογη προς τη συγκέντρωση ανθρόπινο IGFBP-3. Παριστάνεται γραφικά μια καμπύλη βαθμονόμησης και προσδιορίζεται η συγκέντρωση της IGFBP-3 στα δείγματα με αναγωγή από την καμπύλη βαθμονόμησης.

V. ΠΑΡΕΧΟΜΕΝΑ ΑΝΤΙΔΡΑΣΤΗΡΙΑ

Αντιδραστήρια	Κιτ 96 προσδιορισμών	Χρωματικός κωδικός	Ανασύσταση
 Πλάκα μικροτιτλοδότησης με 96 αποσπώμενες υποδοχές επιστρωμένες με αντι-IGFBP-3 (μονοκλωνικά αντισώματα)	96 υποδοχές	μπλε	Έτοιμο για χρήση
Ab HRP CONC Σύζευγμα: αντι-IGFBP-3 (μονοκλωνικά αντισώματα) σημασμένα με HRP σε ρυθμιστικό διάλυμα κιτρικό με λευκωματίνη βόειου ορού και Proclin	1 φιαλίδιο 0,5 ml	κόκκινο	Αραιώστε 20X με ρυθμιστικό διάλυμα συζεύγματος
CONJ BUF Ρυθμιστικό διάλυμα συζεύγματος: ρυθμιστικό διάλυμα TRIS με βόεια ορολευκωματίνη και θυμόλη	1 φιαλίδιο 10 ml	κόκκινο	Έτοιμο για χρήση
CAL N Βαθμονομητής N = 1 έως 5, σε ρυθμιστικό διάλυμα φωσφορικών με βόειο ορό και θυμόλη. Δείτε τις ακριβείς τιμές πάνω στις ετικέτες των φιαλιδίων. Οι βαθμονομητές έχουν προαραιωθεί. ! Χρησιμοποιήστε το ρυθμιστικό διάλυμα αραιώσης ως μηδενικό βαθμονομητή	5 φιαλίδια λυοφιλοποιημένο	κίτρινο	Προσθέστε 1 ml απεσταγμένου νερού
DIL BUF Ρυθμιστικό διάλυμα αραιώσης: Διάλυμα φωσφορικών με βόεια λευκωματίνη, βόειο ορό και θυμόλη.	1 φιαλίδιο 100 ml	μαύρο	Έτοιμο για χρήση
CONTROL N Οροί ελέγχου - N = 1 ή 2 σε ανθρόπινο πλάσμα με θυμόλη Οι οροί ελέγχου έχουν προαραιωθεί.	2 φιαλίδια λυοφιλοποιημένο	ασημί	Προσθέστε 1 ml απεσταγμένου νερού
WASH SOLN CONC Διάλυμα πλύσης (Tris-HCl)	1 φιαλίδιο 10 ml	καφέ	Αραιώστε 200 x με απεσταγμένο νερό (χρησιμοποιήστε μαγνητικό αναδευτήρα).
CHROM TMB Χρωμογόνος TMB (τετραμεθυλβενζιδίνη)	1 φιαλίδιο 12 ml	λευκό	Έτοιμο για χρήση
STOP SOLN Ανασχετικό αντιδραστήριο: HCl 1,0 N	1 φιαλίδιο 12 ml	μαύρο	Έτοιμο για χρήση

Σημείωση: χρησιμοποιήστε το ρυθμιστικό διάλυμα αραιώσης ως μηδενικό βαθμονομητή.

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

VI. ΑΝΑΛΩΣΙΜΑ ΠΟΥ ΔΕΝ ΠΑΡΕΧΟΝΤΑΙ

Τα ακόλουθα υλικά απαιτούνται αλλά δεν παρέχονται στο κιτ:

- Απεσταγμένο νερό υψηλής ποιότητας
- Πιπέτες για διανομή: 50 μl, 100 μl και 1 ml (συνιστάται η χρήση πιπετών ακριβείας με αναλώσιμα πλαστικά ρύγχη)
- Πλαστικά σωληνάρια για την αραιώση δειγμάτων
- Αναμείκτης στροβιλισμού
- Μαγνητικός αναδευτήρας
- Συσκευή πλύσης για πλάκες μικροτιτλοδότησης
- Συσκευή ανάγνωσης πλακών μικροτιτλοδότησης με δυνατότητα ανάγνωσης στα 450 nm και 650 nm (μονοχρωματική ανάγνωση)

VII. ΠΑΡΑΣΚΕΥΗ ΑΝΤΙΔΡΑΣΤΗΡΙΟΥ

- A. Βαθμονομητές:** Ανασυστήστε τους βαθμονομητές με 1ml απεσταγμένου νερού.
! Χρησιμοποιήστε ρυθμιστικό διάλυμα αραιώσης ως μηδενικό βαθμονομητή
B. Οροί ελέγχου: Ανασυστήστε τους ορούς ελέγχου με 1 ml απεσταγμένου νερού.
C. IGFBP-3-HRP σύζευγμα εργασίας: Προετοιμάστε επαρκή όγκου διαλύματος συζεύγματος, προσθέτοντας για παράδειγμα: 100 μl του συμπυκνωμένου κατά 20 φορές συζεύγματος IGFBP-3-HRP σε 2 ml του ρυθμιστικού διαλύματος συζεύγματος. Χρησιμοποιήστε αναμεικτή στροβιλισμού (τύπου vortex) για να ομογενοποιησετε. Προτείνεται προετοιμασία τη στιγμή της χρήσης.
D. Διάλυμα πλύσης εργασίας: Προετοιμάστε επαρκή όγκο διαλύματος πλύσης εργασίας με προσθήκη 199 όγκων απεσταγμένου νερού σε 1 όγκο διαλύματος πλύσης (200x). Χρησιμοποιήστε μαγνητικό αναδευτήρα για την ομογενοποίηση. Απορρίψτε το μη χρησιμοποιημένο διάλυμα πλύσης εργασίας στο τέλος της ημέρας.

VIII. ΦΥΛΑΞΗ ΚΑΙ ΗΜΕΡΟΜΗΝΙΑ ΛΗΞΗΣ ΤΩΝ ΑΝΤΙΔΡΑΣΤΗΡΙΩΝ

- Πριν από το άνοιγμα ή την ανασύσταση, όλα τα συστατικά του κιτ παραμένουν σταθερά έως την ημερομηνία λήξης, η οποία αναγράφεται στην ετικέτα του φιαλιδίου, εφόσον διατηρούνται σε θερμοκρασία 2 έως 8° C.
- Οι μη χρησιμοποιημένες ταινίες πρέπει να φυλάσσονται στους 2-8° C, σε σφραγισμένη σακούλα που περιέχει αποξηραντικό παράγοντα, μέχρι την ημερομηνία λήξης.
- Μετά την ανασύσταση, οι βαθμονομητές και οι οροί ελέγχου παραμένουν σταθεροί για μία εβδομάδα σε θερμοκρασία 2 έως 8° C. Για μεγαλύτερες περιόδους φύλαξης, πρέπει να σχηματίζονται κλάσματα/δόσεις μιας χρήσης και να διατηρούνται στους – 20° C για 3 μήνες το ανώτερο. Αποφύγετε τους επανειλημμένους κύκλους απόψυξης-κατάψυξης.
- Το συμπυκνωμένο διάλυμα πλύσης είναι σταθερό σε θερμοκρασία δωματίου μέχρι την ημερομηνία λήξης.
- Το σύζευγμα εργασίας IGFBP-3-HRP παραμένει σταθερό για 4 ώρες σε θερμοκρασία δωματίου. Αποφύγετε το άμεσο ηλιακό φως.
- Τυχόν μεταβολές της φυσικής εμφάνισης των αντιδραστηρίων του κιτ ενδέχεται να υποδηλώνουν αστάθεια ή αλλοίωση.

IX. ΣΥΛΛΟΓΗ ΚΑΙ ΠΡΟΕΤΟΙΜΑΣΙΑ ΔΕΙΓΜΑΤΩΝ

- Ο ορός πρέπει να διατηρείται στους 2 - 8°C.
- Εάν η εξέταση δεν πραγματοποιηθεί εντός 24 ωρών, συνιστάται η φύλαξη σε κλάσματα/δόσεις μιας χρήσης στους -20° C. Αποφεύγετε τους επακόλουθους κύκλους κατάψυξης-απόψυξης.
- Φέρετε όλα τα δείγματα σε θερμοκρασία δωματίου πριν από τη χρήση. Συνιστάται η ανάμειξη των δειγμάτων σε συσκευή στροβιλισμού πριν από τη χρήση.
- Μην χρησιμοποιείτε δείγματα που έχουν υποστεί αιμόλυση.

X. ΔΙΑΔΙΚΑΣΙΑ

- A. Σημειώσεις σχετικά με το χειρισμό**
Μη χρησιμοποιείτε το κιτ ή τα συστατικά μετά την ημερομηνία λήξης. Μην αναμειγνύετε υλικά από διαφορετικές παρτίδες κιτ. Φέρετε όλα τα αντιδραστήρια σε θερμοκρασία δωματίου πριν από τη χρήση. Αναμείξτε καλά όλα τα αντιδραστήρια και τα δείγματα με απαλή ανακίνηση ή ανάδευση. Εκτελέστε εις διπλούν ανάληψη των βαθμονομητών, των ορών ελέγχου και των δειγμάτων. Συνιστάται κάθete ευθυγράμμιση. Χρησιμοποιήστε ένα καθαρό, πλαστικό δοχείο για να ετοιμάσετε το διάλυμα πλύσης. Χρησιμοποιείτε ένα καθαρό αναλώσιμο ρύγχος πιπέτας για την προσθήκη κάθε διαφορετικού αντιδραστηρίου και δείγματος προκειμένου να αποφύγετε την επιμόλυνση. Αποφύγετε πιπέτες με μεταλλικά μέρη για τη διανομή του Χρωμογόνου Διαλύματος και του Ανασχετικού Διαλύματος. Η ακρίβεια βελτιώνεται με χρήση πιπετών υψηλής ακρίβειας ή αυτοματοποιημένου εξοπλισμού διανομής με πιπέτες. Τηρείτε τους χρόνους επώασης. Για να αποφύγετε τη μετατόπιση, ο χρόνος μεταξύ της διανομής με πιπέτα του πρώτου βαθμονομητή και του τελευταίου δείγματος πρέπει να περιορίζεται στο χρόνο που αναφέρεται στην ενότητα XIII, παράγραφο Ε (μεσοδιάστημα). Προετοιμάστε μια καμπύλη βαθμονόμησης για κάθε ανάλυση και μη χρησιμοποιείτε δεδομένα από προηγούμενες αναλύσεις.

Διανείμετε το Χρωμογόνο Διάλυμα εντός 15 λεπτών από την πλύση της πλάκας μικροτιτλοδότησης.
Κατά τη διάρκεια επώασης με το Χρωμογόνο Διάλυμα, αποφύγετε την έκθεση της πλάκας μικροτιτλοδότησης σε άμεσο ηλιακό φως.

B. Διαδικασία

- Επισημάνετε ένα απλό πλαστικό σωληνάριο για κάθε δείγμα.
- Διανείμετε 1 ml του Ρυθμιστικού διαλύματος αραιώσης σε κάθε σωληνάριο.
- Προσθέστε 10 μl του δείγματος σε αυτά τα σωληνάρια.
- Αναμίξτε σε αναμεικτη στροβιλισμού (Vortex) τα προαραιωμένα δείγματα, τους ανασυσταμένους βαθμονομητές και τους ορούς ελέγχου.
- Επιλέξτε τον απαιτούμενο αριθμό ταινιών για την ανάλυση. Οι μη χρησιμοποιημένες ταινίες πρέπει να ξανασφραγιστούν μέσα στη σακούλα με τον αποξηραντικό παράγοντα και να φυλαχτούν σε θερμοκρασία 2-8° C.
- Ασφαλίστε τις ταινίες μέσα στο πλαίσιο στήριξης.
- Διανείμετε με πιπέτα 100 μl ρυθμιστικού διαλύματος αραιώσης ως μηδενικό βαθμονομητή. Διανείμετε με πιπέτα 100 μl από κάθε βαθμονομητή, ορό ελέγχου και δείγμα στις κατάλληλες υποδοχές.
- Διανείμετε με πιπέτα 50 μl IGFBP-3-HRP συζεύγματος εργασίας σε όλες τις υποδοχές.
- Επωάστε επί 2 ώρες σε θερμοκρασία δωματίου.
- Αναρροφήστε το υγρό από κάθε υποδοχή.
- Πλύνετε την πλάκα 3 φορές.
- Διανείμετε με πιπέτα 100 μl του χρωμογόνου διαλύματος σε κάθε υποδοχή, εντός 15 λεπτών από το βήμα πλύσης.
- Επωάστε επί 30 λεπτά σε θερμοκρασία δωματίου, αποφύγετε την άμεση έκθεση στην ηλιακή ακτινοβολία.
- Διανείμετε με πιπέτα 100 μl ανασχετικού διαλύματος σε κάθε υποδοχή.
- Κάντε ανάγνωση των απορροφήσεων στα 450 nm (φίλτρο αναφοράς 630 nm ή 650 nm) εντός 1 ώρας και υπολογίστε τα αποτελέσματα όπως περιγράφεται στην ενότητα XI.

XI. ΥΠΟΛΟΓΙΣΜΟΣ ΤΩΝ ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΩΝ

- Κάντε ανάγνωση της πλάκας στα 450 nm έναντι ενός φίλτρου αναφοράς που ρυθμίζεται στα 650 nm (ή τα 630 nm).
- Υπολογίστε τη μέση τιμή των διπλών προσδιορισμών.
- Σε ημιλογαριθμικό ή γραμμικό χαρτί γραφημάτων, παραστήστε γραφικά τις τιμές OD (τεταγμένη) για κάθε βαθμονομητή έναντι της αντίστοιχης συγκέντρωσης της IGFBP-3 (τετμημένη) και σχεδιάστε μια καμπύλη βαθμονόμησης μέσω των σημείων του βαθμονομητή, συνδέοντας με ευθείες γραμμές τα αποτυπωμένα σημεία.
- Διαβάστε τη συγκέντρωση για κάθε ορό ελέγχου και δείγμα με αναγωγή 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 παράδειγμα και δεν πρέπει να χρησιμοποιούνται ποτέ αντί της καμπύλης βαθμονόμησης πραγματικού χρόνου.

IGFBP-3-EASIA			Μονάδ ες OD
Βαθμονομητής	0	ng/ml	0,028
	460	ng/ml	0,114
	1270	ng/ml	0,311
	3020	ng/ml	0,778
	6710	ng/ml	1,403
	16070	ng/ml	2,588

XIII. ΑΠΟΔΟΣΗ ΚΑΙ ΠΕΡΙΟΡΙΣΜΟΙ

A. Όριο ανίχνευσης

Μετρήθηκαν δεκαέξι μηδενικοί βαθμονομητές μαζί με ένα σύνολο άλλων βαθμονομητών. Το όριο ανίχνευσης, οριζόμενο ως η φαινομενική συγκέντρωση δύο τυπικών αποκλίσεων πάνω από τις μέσες μετρήσεις OD σε μηδενική δέσμευση, ήταν 10 ng/ml.

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

Γ. Ακρίβεια

ΓΙΑ ΤΟΝ ΙΔΙΟ ΠΡΟΣΔΙΟΡΙΣΜΟ				ΜΕΤΑΞΥ ΔΙΑΦΟΡΕΤΙΚΩΝ ΠΡΟΣΔΙΟΡΙΣΜΩΝ			
Ορός	N	<X> ± T.A. (ng/ml)	Σ.Δ. (%)	Ορός	N	<X> ± T.A. (ng/ml)	Σ.Δ. (%)
A	22	827,2 ± 41,99	5,1	A	10	3074 ± 198,67	6,4
B	24	2081,6 ± 104,4	5,1	B	10	4951 ± 296,4	6

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

Δ. Ορθότητα

ΔΟΚΙΜΑΣΙΑ ΑΝΑΚΤΗΣΗΣ			
Δείγμα	Προστεθείσα IGFBP-3 (ng/ml)	Ανακτηθείσα IGFBP-3 (ng/ml)	Ανάκτηση (%)
Ορός 1	3700	3880	104,8%
	5940	6680	112,0%
	10680	11700	109,5%
Ορός 2	3700	3760	101,6%
	5940	6620	111,0%
	10680	11620	108,8%

ΔΟΚΙΜΑΣΙΑ ΑΡΑΙΩΣΗΣ			
Δείγμα	Αραίωση	Θεωρητική συγκέντρωση (ng/ml)	Μετρηθείσα συγκέντρωση (ng/ml)
Îñüð A	1/1		6720
	1/2	3360	3510
	1/4	1680	1540
	1/8	840	760
	1/16	420	440
Îñüð B	1/1		6510
	1/2	3250	3190
	1/4	1620	1410
	1/8	810	710
	1/16	400	440

Οι αραιώσεις σειρές έγιναν μετά την αρχική αραιώση με ρυθμιστικό διάλυμα αραιώσης, όπως περιγράφεται στην ενότητα διαδικασίας X. B. 2-3 .

E. Μεσοδιάστημα μεταξύ της διανομής τελευταίου βαθμονομητή και δείγματος

Όπως φαίνεται στη συνέχεια, τα αποτελέσματα του προσδιορισμού παραμένουν αξιόπιστα ακόμα και όταν διανέμεται ένα δείγμα 30 λεπτά μετά την προσθήκη των βαθμονομητών στα επιστρωμένα σωληνάρια.

ΜΕΣΟΔΙΑΣΤΗΜΑ		
	0 min	30 min
	(ng/ml)	(ng/ml)
S1	4060	4800
S2	5930	5900

XIV. ΕΣΩΤΕΡΙΚΟΣ ΠΟΙΟΤΙΚΟΣ ΕΛΕΓΧΟΣ

- Εάν τα αποτελέσματα που λαμβάνονται για τον ορό ελέγχου 1 ή/και τον ορό ελέγχου 2 δε βρίσκονται εντός του πεδίου τιμών που καθορίζεται στην ετικέτα του φιαλιδίου, τα αποτελέσματα δεν είναι δυνατό να χρησιμοποιηθούν, εκτός εάν έχει δοθεί ικανοποιητική εξήγηση για την ασυμφωνία.
- Εάν είναι επιθυμητό, κάθε εργαστήριο μπορεί να δημιουργήσει τα δικά του μείγματα δειγμάτων ελέγχου (pools), τα οποία πρέπει να διατηρούνται κατεψυγμένα σε κλάσματα/δόσεις μιας χρήσης. Οροί ελέγχου που περιέχουν αζίδιο θα επιδράσουν στην ενζυμική αντίδραση και δεν μπορούν να χρησιμοποιηθούν.
- Τα κριτήρια αποδοχής για τη διαφορά μεταξύ των διπλών αποτελεσμάτων των δειγμάτων θα πρέπει να βασίζονται σε ορθές εργαστηριακές πρακτικές.
- Συνιστάται οι οροί ελέγχου να υποβάλλονται σε προσδιορισμό τακτικά ως άγνωστα δείγματα για να μετράται η μεταβλητότητα του προσδιορισμού. Η απόδοση του προσδιορισμού πρέπει να παρακολουθείται με διαγράμματα ποιοτικού ελέγχου των οράν ελέγχου.
- Είναι καλό το να ελέγχετε οπτικά την προσαρμογή της καμπύλης που επιλέχθηκε από τον υπολογιστή.

XV. TIMEΣ ΑΝΑΦΟΡΑΣ

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

Ηλικιακή ομάδα	ΑΝΑΡΕΣ (ng/ml)			ΓΥΝΑΙΚΕΣ (ng/ml)		
	Μέση τιμή	Πεδίο τιμών		Μέση τιμή	Πεδίο τιμών	
0 - 2 ετών	2638	1481-4481	15	2348	1398-3485	12
3 - 5 ετών	2405	1478-3052	12	2752	2059-3325	13
6 - 8 ετών	3186	2506-4428	17	3282	2469-4495	13
9 - 11 ετών	3263	2020-4705	21	3298	2342-4640	11
12 - 14 ετών	3672	2238-5971	19	4241	3000-7022	14
15 - 17 ετών	4031	2710-5235	21	4181	2539-6607	20
18 - 20 ετών	3826	2303-5537	10	3709	2272-6102	9
21 - 30 ετών	3372	2092-4552	11	3766	2704-5594	10
31 - 40 ετών	2704	1190-4140	14	3372	2659-4533	12
41 - 50 ετών	3885	2318-6896	18	3240	2322-4046	16
51 - 60 ετών	3175	2112-4625	16	3830	1602-5997	15
> 60 ετών	2826	1155-3876	23	3621	1995-6505	21

XVI. ΠΡΟΦΥΛΑΞΕΙΣ ΚΑΙ ΠΡΟΕΙΔΟΠΟΙΗΣΕΙΣ

Ασφάλειας
Μόνο για διαγνωστική χρήση *in vitro*.
Τα συστατικά ανθρώπινου αίματος που περιλαμβάνονται στο kit αυτό έχουν ελεγχθεί με μεθόδους εγκεκριμένες στην Ευρώπη ή/και από τον FDA και έχει διαπιστωθεί ότι είναι αρνητικά ως προς την παρουσία HBsAg, αντι-HCV, αντι-HIV-1 και 2. Καμία γνωστή μέθοδος δεν είναι δυνατό να παρέχει πλήρη διασφάλιση ότι παράγωγα του ανθρώπινου αίματος δε θα μεταδώσουν ηπατίτιδα, AIDS ή άλλες λοιμώξεις. Επομένως, ο χειρισμός αντιδραστηρίων, δειγμάτων ορού ή πλάσματος θα πρέπει να γίνεται σύμφωνα με τις τοπικές διαδικασίες περί ασφάλειας.
Όλα τα ζωικά προϊόντα και παράγωγα έχουν συλλεχθεί από υγιή ζώα. Τα βόεια συστατικά προέρχονται από χώρες όπου δεν έχει αναφερθεί BSE. Παρ' όλ' αυτά, συστατικά που περιέχουν ζωικές ουσίες θα πρέπει να αντιμετωπίζονται ως δυνητικός μολυσματικός. Αποφύγετε κάθε επαφή με το δέρμα με όλα τα αντιδραστήρια, το ανασχετικό διάλυμα περιέχει HCl. Σε περίπτωση επαφής, πλύνετε σχολαστικά με νερό. 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 γάντια μιας χρήσης.

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

XVIII. ΠΕΡΙΛΗΨΗ ΤΟΥ ΠΡΩΤΟΚΟΛΛΟΥ

	ΒΑΘΜΟΝΟΜΗΤΕΣ ΟΡΟΙ ΕΛΕΓΧΟΥ (µl)	ΔΕΙΓΜΑ(ΤΑ) (µl)
ΑΡΑΙΩΣΗ ΔΕΙΓΜΑΤΩΝ Ρυθμιστικό διάλυμα αραιώσης Δείγμα	- -	1000 10
Ανάδευση	Ανάμειξη στροβιλισμού (vortex)	
ΕΠΩΑΣΗ Βαθμονομητές (0-5), οροί ελέγχου Αραιωμένα δείγματα, Αραιωμένο σύζευγμα	100 - 50	- 100 50
Επωάστε επί 2 ώρες σε θερμοκρασία δωματίου Αναρροφήστε το περιεχόμενο κάθε υποδοχής. Πλύνετε 3 φορές με 400 µl διαλύματος πλύσης και αναρροφήστε.		
Αποκαλυπτικό διάλυμα	100	100
Επωάστε επί 30 λεπτά σε θερμοκρασία δωματίου		
Ανασχετικό διάλυμα	100	100
Κάντε ανάγνωση σε συσκευή ανάγνωσης πλακών μικροτιτλοδότησης και καταγράψτε την απορρόφηση κάθε υποδοχής στα 450 nm (έναντι 630 ή 650 nm)		

Αρ. Καταλόγου DIASource: KAP1171	Αριθμός P.I.: 1700773/el	Αρ. αναθεώρησης: 160308/2
-------------------------------------	-----------------------------	------------------------------

ημερομηνία αναθεώρησης : 2016-03-08