MEASUREMENT OF IGFBP-2 CONCENTRATIONS

Assay Principle:

IGFBP-2 levels are determined using the IGFBP-2 RIA kit manufactured by Diagnostic Systems Laboratories, Inc. (DSL, Webster, Texas). The theoretical sensitivity of the kit is 0.5 ng/mL. This is a double antibody RIA based on the competitive binding principle in which there is competition between a radioactive and non-radioactive antigen for a fixed number of antibody binding sites. The amount of ^{125}I-labeled IGFBP-2 bound to the antibody is inversely proportional to the concentration of unlabeled IGFBP-2 present. The separation of the free and bound antigen is achieved by using the double antibody system. The radioactivity is measured in a gamma counter. A standard curve based on the concurrent testing of the calibrators is generated and sample concentrations of IGFBP-2 are extrapolated from the curve.

Assay Procedure:

Frozen specimens are thawed and prepared for analysis by diluting 1:50 with Sample Diluent.

An in-house human control (QCV) is diluted 1:50 and analyzed simultaneously to verify the effectiveness of the assay.

Human control samples provided with the kit (Level I and II) are not diluted prior to assaying but are analyzed simultaneously with the samples.

Creation of the assay standard curve is achieved using undiluted standards (A-F). These contain know concentrations of IGFBP-2.

Controls, standards and diluted unknowns (200 µl) are pipetted in duplicate into RIA tubes.

IGFBP-2 Antiserum (100 µl) is added to each tube, except the “Non-Specific Binding” and “Total Counts” tubes.

The samples are vortexed and allowed to incubate at room temperature for 4 hours.

IGFBP-2 [I-125] Reagent (100 µl) is added to each tube.

Tubes are placed in a refrigerator (2-8°C) for 16-20 hours.

Precipitating Reagent (1.0 mL) is added to all tubes except “Total Counts”. The samples are allowed to incubate at room temperature for 30 minutes.

The assay tubes are centrifuged at 3740 rpm for 30 minutes (at 2-8°C).

The supernatant is decanted and the activity of the precipitate counted for one minute using a Packard RIAStar Gamma Counter model C5410.

Using software provided by Packard Instruments, a standard curve is constructed. The IGFBP-2 concentrations of the unknowns and controls are read from this curve (sample results are automatically multiplied by the dilution factor).

The IGFBP-2 data are transferred to a Dell computer and stored as a Microsoft Excel spreadsheet.

ENGLISH

IGFBP-2 RIA
DSL-7100

Revision date: March 15, 2004

Diagnostic Systems Laboratories, Inc.
Corporate Headquarters, 445 Medical Center Blvd.
Webster, Texas 77598-4217 USA
General Business: Tel: 281.332.9678
Customer Assistance Center: Tel: 800.231.7970 Fax: 281.338.1895
e-mail: info@dslabs.com
Website: http://www.dslabs.com

EC REP
OBI-DSL
Cherwell Innovation Centre
Upper Heyford
Oxon OX25 5HD UK
Tel: 018.6923.8077
Fax 018.6923.8078
Email: Info-uk@DSLabs.com

This Package Insert (IFU) is intended for Professional Use and must be read completely before product use.

For Illustrative Purposes Only

I. INTENDED USE

The DSL-7100 IGFBP-2 Radioimmunoassay Kit provides materials for the quantitative measurement of IGFBP-2 in serum. This assay is intended for *in vitro* diagnostic use.

II. SUMMARY AND EXPLANATION OF THE TEST

The insulin-like growth factors, IGF-I and IGF-II, are potent mitogenic and anabolic peptides with structural homology to insulin [1]. The IGFs are produced in many tissues under the control of growth hormone and regulatory factors and act as autocrine, paracrine and endocrine regulators of mitogenesis and metabolism. In serum and other biological fluids, the IGFs are complexed to specific, structurally homologous binding proteins (IGFBPs) [2,3]. Six IGFBPs have been identified in humans [4] and are numbered according to the sequence of their molecular characterization [4]. Human IGFBP-2 is a 289 amino acid peptide, with a 39-residue signal peptide, 18 cysteine residues and a predicted molecular mass of 31.3 kD [5]. The human IGFBP-2 gene has been localized to chromosome 2, region q31-q34 [6]. The binding affinity of IGFBP-2 for IGF-II is estimated to be significantly higher than for IGF-I [3], suggesting a role in regulation of IGF-II action. Studies in the fetal sheep indicate that IGFBP-2 is produced in many tissues, apparently coincident with IGF-II expression [7]. Recent studies of serum IGFBP-2 levels have shown that, unlike for IGFBP-1, there is negligible variability during the day [3] and, unlike IGFBP-1 and IGFBP-3, virtually no change during puberty [8]. IGFBP-2 has also been identified in other body fluids such as cerebrospinal [9], amniotic and coelomic fluids [10], urine [11] and seminal fluid [12].

III. PRINCIPLE OF THE TEST

The procedure follows the basic principle of radioimmunoassay where there is competition between a radioactive and a non-radioactive antigen for a fixed number of antibody binding sites [13]. The amount of [I-125]-labeled IGFBP-2 bound to the antibody is inversely proportional to the concentration of unlabeled IGFBP-2 present. The separation of the free and bound antigen is achieved by using a double antibody system.

IV. REAGENTS

The DSL-7100 IGFBP-2 RIA Kit contains sufficient reagents for 100 tubes. Each kit contains the following reagents:

A. IGFBP-2 Standard A/Sample Diluent:

One bottle, 55 mL, labeled A, containing 0 ng/mL of IGFBP-2 in a protein-based buffer with sodium azide as a preservative. Store at 2-8°C until expiration date.

B. IGFBP-2 Standards: (Lyophilized)

Five vials, labeled B-F, containing concentrations of approximately 2.5, 5.0, 15.0, 50.0, and 100.0 ng/mL of IGFBP-2 in a protein-based buffer with sodium azide as a preservative. Refer to vial label for exact concentrations. Store unopened at 2-8°C until expiration date. Reconstitute each vial with 1.0 mL of deionized water. Upon reconstitution, store at -20°C for lower or up to 2 weeks. Discard after use.

STANDARDIZATION NOTE: IGFBP-2, extracted and purified from human source materials, was used to make IGFBP-2 Standards and Controls via serial dilution. Due to the lack of universally accepted reference preparation, the DSL IGFBP-2 Standards & Controls were calibrated against DSL internal reference standards and performance verified by immunoassay.

C. IGFBP-2 [I-125] Reagent: (Lyophilized) (RED)

One bottle, containing < 5μCi (185kBq) of [I-125]-labeled IGFBP-2 in a protein-based buffer with sodium azide as a preservative. Store unopened at 2-8°C until expiration date. Refer to vial label for exact concentrations. Reconstitute with 11 mL of deionized water. Upon reconstitution, store at -20°C for up to 3 days. Discard after use.

D. IGFBP-2 Antiserum: (Lyophilized) (BLUE)

One vial, containing rabbit polyclonal anti-IGFBP-2 serum in a protein-based buffer with sodium azide as a preservative. Store unopened at 2-8°C until expiration date. Reconstitute with 10 mL of deionized water. Upon reconstitution, store at 2-8°C for up to 2 weeks. Discard after use.

E. Precipitating Reagent:
One bottle, 100 mL, containing goat polyclonal anti-rabbit gamma globulin serum in a buffer with polyethylene glycol as a precipitating aid and sodium azide as a preservative. Store at 2-8°C until expiration date.

F. IGFBP-2 Controls: (Lyophilized)
Two vials, Levels I and II, containing low and high levels of IGFBP-2 in a protein-based buffer with sodium azide as a preservative. Store unopened at 2-8°C until expiration date. Reconstitute each vial with 1.0 mL of deionized water. Refer to vial label for exact concentrations. Upon reconstitution, store at -20°C or lower for up to 2 weeks. Discard after use.

NOTE: All reagents and samples must be allowed to reach room temperature (~25 °C) and must be mixed thoroughly by gentle inversion before use.

V. PRECAUTIONS

For *in vitro* use only
Not for Internal or External Use in Humans or Animals
CAUTION: RADIOACTIVE MATERIAL
Refer to the radiation regulations, standards, and procedures applicable to your facility for handling, storage, and disposal of radioactive materials. For United States Customers: This radioactive material may be received, acquired, possessed, and used only by physicians, veterinarians, clinical laboratories, research institutions, or hospitals, and only for *in vitro* clinical or laboratory tests not involving internal or external administration of the material, or its radiation to human beings or animals. Its receipt, acquisition, possession, use, and transfer are subject to the regulations of the NRC and/or licensing agreement state. To minimize the risk of radiation exposure, handle radioactive materials as recommended by appropriate regulatory standards and in "Occupational Radiation Protection Safety Guide, Safety Standards Series No. RS-G-1.1," 1999, published by the International Atomic Entergy Agency.
The following universal Good Laboratory Practices should be observed:

- Do not eat, drink, smoke or apply cosmetics where immunodiagnostic materials are being handled.
- Do not pipet by mouth.
- Wear lab coats and disposable gloves when handling immunodiagnostic materials.
- Wash hands thoroughly afterwards.
- Cover working area with disposable absorbent paper.
- Wipe up all spills immediately and decontaminate affected surfaces.
- Avoid generation of aerosols.
- Provide adequate ventilation.
- Handle and dispose of reagents and materials in compliance with applicable regulations.

WARNING: POTENTIAL BIOHAZARDOUS MATERIAL
This kit may contain some reagents made with human source material (e.g. serum or plasma) or used in conjunction with human source materials. The material in this kit has been tested by FDA recommended methods and found to be non-reactive for HIV-1/2 Antibodies, HCV and HBsAg. No available test method can offer complete assurance of eliminating potential biohazardous risk. Handle all reagents and patient samples at a Biosafety Level 2 as recommended for any potentially infectious human serum or blood specimen in the Centers for Disease Control/National Institutes of Health manual "Biosafety in Microbiological and Biomedical Laboratories," 4th Edition, April 1999.
WARNING: POTENTIAL CHEMICAL HAZARD:
Some of the reagents in this kit contain sodium azide as a preservative at concentrations below the regulatory limit of < 0.1%. Although significantly diluted, concentrated sodium azide is an irritant to skin and mucous membranes and may react with lead and copper plumbing to form explosive metal azides, especially if accumulated. This substance is in diluted form, and therefore, may minimize exposure risks significantly but not completely. Avoid contact with skin, eyes, and clothing. In case of contact with any reagents, wash area thoroughly with water and seek medical advice. Dispose of all nonradioactive and nonhazardous reagents by flushing with large amounts of water to prevent buildup of chemical hazards in the plumbing system. For further information regarding hazardous substances in the kit, please refer to the component specific MSDS, either at www.DSLabs.com or by request.

VI. SPECIMEN COLLECTION AND PREPARATION

Serum should be used and the usual precautions for venipuncture should be observed. Specimens may be stored at 2-8°C for up to 24 hours and frozen at -20°C or lower for longer periods. Avoid repeated freezing and thawing of samples. Samples, which have been diluted for the assay, may be stored at 2-8°C for up to 24 hours or at -20°C for up to 4 weeks [14]. Do not use grossly hemolyzed or lipemic specimens. Typical serum samples should be diluted 1:50 with the IGFBP-2 Sample Diluent (0 ng/mL Standard A) prior to assay.

VII. PROCEDURAL NOTES

A thorough understanding of this package insert is necessary for successful use of the product. Reliable results will only be obtained by using precise laboratory techniques and accurately following the package insert. A standard curve must be included with each assay. Do not mix various lots of any kit component within an individual assay. Do not use any component beyond the expiration date shown on its label. After removing assay reagents from the refrigerator, allow them to reach room temperature (~25°C) before pipeting. Unused reagents should be stored as specified in the Reagent Section. Standards and Controls should be mixed before use by inverting or swirling gently rather than vortexing.

For Illustrative Purposes Only

To insure a homogeneous mixture of the reagents in each assay tube, gentle and thorough shaking or vortexing is essential. Failure to obtain the appropriate values for controls may indicate imprecise manipulations, improper sample handling or deterioration of reagents. Failure to blot tubes adequately following decantation may result in poor replication and spurious values.

VIII. TEST PROCEDURE

A. Materials Supplied:

Materials supplied in the DSL IGFBP-2 RIA Kit, Catalog No. DSL-7100

MATERIAL	QUANTITY	CATALOG #
IGFBP-2 Standard A	One Bottle	7101
IGFBP-2 Standard B	One Vial	7102
IGFBP-2 Standard C	One Vial	7103
IGFBP-2 Standard D	One Vial	7104
IGFBP-2 Standard E	One Vial	7105
IGFBP-2 Standard F	One Vial	7106
IGFBP-2 [I-125] Reagent	One Bottle	7120
IGFBP-2 Antiserum	One Vial	7110
Precipitating Reagent	One Bottle	1230
IGFBP-2 Control Level I	One Vial	7151
IGFBP-2 Control Level II	One Vial	7152

B. Materials Required But Not Supplied:

- 12 X 75 mm polypropylene test tubes
- Test tube rack for 12 X 75 mm tubes
- Precision pipette to deliver 200 μL
- Repeating pipette to deliver 100 μL and 1.0 mL
- Vortex mixer
- Centrifuge (1500 x g, preferably refrigerated)
- A sponge rack or similar device for decantation
- Deionized water
- Absorbent material for blotting tubes
- Gamma counter
- Semi-log (log-linear) graph paper or computer RIA data analysis program

C. Assay Procedure:

Allow all reagents to reach room temperature (~25°C) and mix thoroughly before use. Assay Standards, Controls and unknowns in duplicate.

1. Human serum samples should be diluted 1:50 with IGFBP-2 Sample Diluent prior to assay. (Example: 10 μL serum + 500 μL IGFBP-2 Sample diluent)
   Note: Standards and Controls should not be diluted prior to assay and results for the Standards and Controls should not be multiplied by the sample dilution factor.
2. Label and arrange tubes in duplicate for Total Counts, NSB, Standards, Controls and unknowns.
3. Pipet 200 μL of the Standards, Controls or unknowns to the appropriate tubes. To the NSB tubes add 300 μL of the 0 ng/mL IGFBP-2 Standard.
4. Immediately add 100 μL of IGFBP-2 Antiserum to each tube, except NSB and Total Count tubes.
5. Vortex gently for 1-2 seconds and incubate at room temperature (~25°C) for 4 hours.
6. Add 100 μL IGFBP-2 [I-125] Reagent to all tubes.
7. Vortex gently for 1-2 seconds.
8. Incubate all tubes for 16-20 hours at 2-8°C.
9. Add 1.0 mL of Precipitating Reagent to all tubes except the Total Count tubes and immediately vortex all tubes. The Precipitating Reagent must be shaken thoroughly before use.
10. Incubate all tubes at room temperature (~25°C) for 30 minutes.
11. Centrifuge all tubes, except the Total Count tubes, for 30 minutes at 1500 X g (approximately 3000 rpm).
12. Decant all tubes, except Total Count tubes, by simultaneous inversion with a sponge rack into a radioactive waste receptacle. Allow them to drain on absorbent material for 15 - 30 seconds and gently blot the tubes to remove any droplets adhering to the rim before returning them to the upright position. Failure to blot tubes adequately may result in poor replication and spurious values.
13. Count all tubes in a gamma counter for one minute.

IX. RESULTS

The results in this package insert were calculated using a log-linear curve fit. Other data reduction methods may give slightly different results.

For Illustrative Purposes Only

A. Calculate the mean counts per minute (cpm) for each Standard, Control and unknown. Subtract the mean cpm of the NSB tubes from all counts to obtain corrected counts. Calculate the % B/T or % B/Bo for each Standard, Control and unknown as follows:

$$\% \text{ B/T} = \frac{\text{Mean Sample Counts - NSB Counts}}{\text{Mean Total Counts}} \times 100$$

$$\% \text{ B/Bo} = \frac{\text{Mean Sample Counts - NSB Counts}}{\text{Mean Counts of 0 ng/mL Standard - NSB Counts}} \times 100$$

B. Plot a curve of % B/T or % B/Bo for the IGFBP-2 Standards (y-axis) against the IGFBP-2 concentration (x-axis) on log-linear (semi-log) graph paper. Draw a standard curve through the mean of the duplicate points.

C. Determine the IGFBP-2 concentration of the means of the duplicate counts of each control and unknown sample from the standard curve.

D. Any sample reading greater than the highest Standard should be diluted appropriately with the 0 ng/mL IGFBP-2 Standard and reassayed.

E. Any sample reading lower than the lowest Standard should be reported as such.

F. For the unknown samples, the values obtained from the standard curve must be multiplied by the approximate dilution factor to obtain the final IGFBP-2 value. (Example: Samples diluted 1:50, should be multiplied by 51). Control results should not be multiplied by sample dilution factor.

X. LIMITATIONS

- The reagents supplied in this kit are optimized to measure IGFBP-2 levels in serum.
- Avoid repeated freezing and thawing of reagents or samples.
- Hemolyzed and lipemic specimens may give false values and should not be used.
- The results of this assay should be used in conjunction with other pertinent clinical information.

XI. QUALITY CONTROL

- DSL Controls or other commercial controls should fall within established confidence limits. The confidence limits for DSL Controls are printed on the Control vial labels.
- Low and high level controls should be run with each assay.

TYPICAL IGFBP-2 RIA STANDARD CURVE DATA

TUBE NO.	TUBE LABEL	BOUND (cpm)	MEAN (cpm)	B/T (%)	B/Bo (%)	IGFBP-2 (ng/mL)
1, 2	TOTAL COUNTS	30761 33515	32138			
3, 4	NSB	1187 1286	1236	3.8		
	STANDARDS					
5, 6	A	13820 13970	13895	43.2	----	0.0
7, 8	B	12809 12926	12868	40.0	92.6	2.0
9, 10	C	10695 10695	10695	33.3	77.0	5.0
11, 12	D	7813 8039	7926	24.7	57.0	14.0
13, 14	E	4516 4539	4528	14.1	32.6	32.0
15, 16	F	1673 1681	1677	5.2	12.1	100.0
	CONTROLS					
17, 18	Level I	7471 7667	7569	23.6	54.5	15.3
19, 20	Level II	5602 5904	5753	17.9	41.4	23.8

ED_{50} = 17.8 ng/mL

CAUTION: The above data must not be employed in lieu of data obtained by the user in the laboratory.

XII. PERFORMANCE CHARACTERISTICS

All performance characteristics are stated in ng/mL. To convert to nmol/L:

ng/mL x 0.032 = nmol/L

A. Sensitivity:

The theoretical sensitivity, or minimum detection limit, calculated by the interpolation of the mean minus two standard deviations of 20 replicates of the 0 ng/mL IGFBP-2 Standard, is 0.5 ng/mL.

For Illustrative Purposes Only

B. Precision:

The intra-assay precision was determined from the mean of 12 replicates each.

SAMPLE	N	MEAN (ng/mL)	STANDARD DEVIATION (ng/mL)	COEFFICIENT OF VARIATION (%)
I	12	13.0	1.1	8.5
II	12	32.2	2.0	6.2
III	12	94.4	4.4	4.7

The inter-assay precision was determined from the mean of average duplicates for 5 separate runs.

SAMPLE	N	MEAN (ng/mL)	STANDARD DEVIATION (ng/mL)	COEFFICIENT OF VARIATION (%)
I	5	2.7	0.2	7.4
II	5	13.2	0.6	4.5
III	5	69.7	5.0	7.2

C. Recovery:

Three serum samples containing different levels of endogenous IGFBP-2 were spiked with known amounts of rhIGFBP-2 and assayed.

SAMPLE	ENDOGENOUS (ng/mL)	ADDED (ng/mL)	EXPECTED (ng/mL)	OBSERVED (ng/mL)	RECOVERY (%)
I	4.45	0.52	4.97	5.11	103
		2.98	7.43	8.30	112
		8.90	13.35	14.94	112
II	30.47	0.52	30.99	30.73	99
		2.98	33.98	33.72	99
		8.90	39.37	44.19	112
III	68.37	0.52	68.89	78.20	114
		2.98	71.35	71.58	100
		8.90	77.27	83.48	108

D. Linearity of Dilution:

Three serum samples were diluted with 0 ng/mL IGFBP-2 Standard and assayed.

SAMPLE	DILUTION FACTOR	EXPECTED (ng/mL)	OBSERVED (ng/mL)	RECOVERY (%)
I	---	---	71.67	---
	1:2	35.84	34.89	97
	1:4	17.92	15.13	84
	1:8	8.96	7.23	81
	1:16	4.48	3.52	79
II	---	---	71.91	---
	1:2	35.96	39.19	109
	1:4	17.98	18.79	105
	1:8	8.99	8.78	98
	1:16	4.49	3.63	81
III	---	---	94.91	---
	1:2	47.46	48.91	103
	1:4	23.73	24.40	103
	1:8	11.86	11.26	95
	1:16	5.93	4.80	81

E. Specificity:

The cross-reactivity of the IGFBP-2 antibody has been measured against various compounds with the DSL-7100 IGFBP-2 RIA. The percent cross-reactivity is expressed as the ratio of the IGFBP-2 concentration to the concentration of the reacting compound at 50% binding of the 0 ng/mL IGFBP-2 Standard.

COMPOUND	% CROSS-REACTIVITY
IGFBP-2	100
IGFBP-3 GLYCOSYLATED	ND
IGFBP-3 NON-GLYCOSYLATED	ND
IGFBP-4	ND
IGFBP-5	ND
IGFBP-6	ND

ND = Non-detectable at 0.5 μg/tube

The following substances did not interfere in the IGFBP-2 RIA: rhGH (1 μg/tube), IGF-I (1 μg/tube) and IGF-II (1 μg/tube).

For Illustrative Purposes Only

F. Inter-Species Animal Sera Comparisons:

REACTIVE SERA	NON-REACTIVE SERA
Donkey	Rabbit
Goat	
Guinea Pig	
Rat	
Calf	
Horse	
Pig	
Sheep	
Mouse	

XIII. REFERENCES

1. Daughaday W, Rotwein P: Insulin-like growth factors I and II. Peptide, messenger ribonucleic acid and gene structures, serum and tissue concentrations. Endocrin Rev 10:68-91, 1989.
2. Lamson F, Guidice L, Rosenfeld RG: Insulin-like growth factor binding proteins: structural and molecular relationships. Growth Factors 5:19-28, 1991.
3. Rechler M: Insulin-like growth factor binding proteins. Vit Horm 47:1-114, 1993.
4. Report on the nomenclature of the IGF binding proteins. Endocrinology 130:1736-1737, 1992.
5. Binkert C, Landwehr J, Mary L-L, Schwander J, Heinrich G: Cloning, sequence analysis and expression of a cDNA encoding a novel insulin-like growth factor binding protein (IGFBP-2). EMBO J 9:2496-2502, 1989.
6. Ehrenborg E, Vilhelmsdotter S, Bajalica S, Larsson C, Stern I, Koch J, Brøndum-Nielsen K, Luthman H: Structure and localization of the human insulin-like growth factor-binding protein 2 gene. Biochem Biophys Res Comm 176:1250-1255, 1991.
7. Delhanty PJD, Han VKM: The expression of insulin-like growth factor (IGF)-binding protein-2 and IGF-II genes in the tissue of the developing bovine fetus. Endocrinology 132:41-52, 1993.
8. Juul A, Dalgaard P, Blum W, Bang P, Hall K, Michaelsen KF, Müller J, Skakkebæk NF: Serum levels of insulin-like growth factor (IGF)-binding protein-3 (IGFBP-3) in healthy infants, children and adolescents: the relation to IGF-I, IGF-II, IGFBP-1, IGFBP-2, age, sex, body mass index and pubertal maturation. J Clin Endocrinol Metab 78: 744-52, 1994.
9. Müller HL, Oh Y, Lehrenbecher T, Blum WF, Rosenfeld RG: Insulin-like growth factor-binding protein-2 concentrations in cerebrospinal fluid and serum of children with malignant solid tumors or acute leukemia. J Clin Endocrinol Metab 79:428-434, 1994.
10. Chard T, Blum WF, Brunjes J, Campbell DJ, Wathen NC: Levels of insulin-like growth factor-binding protein-2 and insulin-like growth factor-II in maternal serum, amniotic fluid and extraembryonic coelomic fluid at 9-20 weeks of pregnancy. J Endocrinol 142:379-383, 1994.
11. Gargosky SE, Hasegawa T, Tapanainen P, MacGillivray M, Hasegawa Y, Rosenfeld RG: Urinary insulin-like growth factor (IGF) and IGF-binding protein in normal subjects, growth hormone deficiency, and renal disease. J Clin Endocrinol Metab 76:1631-1637, 1993.
12. Rosenfeld RG, Pham H, Oh Y, Lamson G, Giudice L: Identification of insulin-like growth factor-binding protein-2 (IGF-BP-2), a low molecular weight IGF-BP inhuman seminal plasma. J Clin Endocrinol Metab 70:551-553, 1990.
13. Yalow R, Berson S: Introduction and general considerations. IN: Odell WD, Daughaday WH (eds): *Principles of Competitive Protein Binding Assays*. J. B. Lippincott Co., Philadelphia, 1971, pp. 1-19.
14. Burtis CA, Ashwood ER: *Tietz Textbook of Clinical Chemistry, 2nd edition*. W.B. Saunders Company, Philadelphia, 1994, p.1821

For Illustrative Purposes Only

I. VERWENDUNGSZWECK

Der DSL-7100 IGFBP-2 Radioimmunoassay-Kit enthält Materialien zum quantitativen Nachweis von IGFBP-2 im Serum. Dieser Assay ist zur *in-vitro*-Diagnostik bestimmt.

II. ZUSAMMENFASSUNG UND ERLÄUTERUNG DES TESTS

Die Insulin-Like Growth Factors IGF-I und IGF-II sind hochwirksame mitogene und anabolische Peptide, deren Struktur mit der von Insulinhomolog ist [1]. Die Produktion von IGFs findet in zahlreichen Körpergeweben statt und wird durch Somatropin und Regulierungsfaktoren gesteuert. Sie wirken als autokrine, parakrine und endokrine Regulatoren der Mitogenese und des Metabolismus. In Serum und anderen biologischen Flüssigkeiten koppeln die IGFs an spezifische, strukturell homologe Bindungsproteine (IGFBPs) [2,3]. Beim Menschen wurden sechs IGFBPs identifiziert [4] und entsprechend der Reihenfolge ihrer molekularen Charakterisierung nummeriert [4]. Human-IGFBP-2 ist eine Peptid aus 289 Aminosäuren mit einem Signalpeptid aus 39 Resten, 18 Cysteinresten und einem erwarteten Molekulargewicht von 31,3 kD [5]. Das menschliche IGFBP-2-Gen wurde auf Chromosom 2, Bereich q31-q34 lokalisiert [6]. Die Bindungsaffinität von IGFBP-2 zu IGF-II wird wesentlich höher eingeschätzt als zu IGF-I [3], was auf eine Rolle bei der Regulierung der Wirkung von IGF-II schließen lässt. Studien and Schafföten belegen, dass IGFBP-2 in vielen Geweben produziert wird und die Produktion anscheinend mit der IGF-II-Expression einher geht [7]. Neuere Untersuchungen der IGFBP-2-Serumspiegel haben gezeigt, dass sie im Gegensatz zu IGFBP-I nur geringen tageszyklischen Schwankungen unterliegen [3] und im Gegensatz zu IGFBP-1 und IGFBP-3 während der Pubertät so gut wie unverändert bleiben [8]. IGFBP-2 wurde auch in anderen Körperflüssigkeiten, wie z.B. Gehirn- und Rückenmarksflüssigkeit [9], Fruchtwasser und Zölomflüssigkeit [10], Urin und Samenflüssigkeit [12] nachgewiesen.

III. TESTPRINZIP

Dem Verfahren liegt das Grundprinzip eines Radioimmunassays zugrunde, wobei radioaktive und nichtradioaktive Antigene um eine konstante Anzahl von Antikörper-Bindungsstellen konkurrieren [13]. Die an den Antikörper gebundene Menge des [1-125] IGFBP-2 ist umgekehrt proportional zur Konzentration des vorhandenen unmarkierten IGFBP-2. Die Trennung des freien und gebundenen Antigens erfolgt mittels eines Doppel-Antikörper-Systems.

IV. REAGENZIEN

Der DSL-7100 IGFBP-2 RIA-Kit enthält ausreichend Reagenzien für 100 Röhrchen. Jeder Kit enthält die folgenden Reagenzien:

A. IGFBP-2-Standard A/Proben-Diluent:

Eine Flasche à 55 ml mit der Aufschrift „A“ mit 0 ng/ml IGFBP-2 in einem Proteinpuffer mit Natriumazid als Konservierungsmittel. Bei 2-8 °C bis zum Verfallsdatum lagern.

B. IGFBP-2-Standards: (Lyophilisiert)

Fünf Fläschchen mit der Aufschrift „B“ – „F“ mit Konzentrationen von ca. 2,5, 5,0, 15,0, 50,0 und 100,0 ng/ml IGFBP-2 in einem Proteinpuffer mit Natriumazid als Konservierungsmittel. Die genauen Konzentrationen sind dem Fläschchenetikett zu entnehmen. Ungeöffnet bei 2-8 °C bis zum Verfallsdatum lagern. Jedes Fläschchen mit 1,0 ml deionisiertem Wasser rekonstituieren. Nach dem Rekonstituieren bis zu 2 Wochen bei –20 °C lagern. Nach Gebrauch verwerfen.

HINWEIS ZUR STANDARDISIERUNG: Zur Herstellung der IGFBP-2-Standards und Kontrollen mittels Reihenverdünnung wurde aus menschlichem Material extrahiertes und purifiziertes IGFBP-2 verwendet. Da keine allgemein akzeptierte Referenzsubstanz existiert, wurden die DSL IGFBP-2-Standards und -Kontrollen gegen interne Referenzstandards von DSL kalibriert und ihre Leistung per Immunassay geprüft.

C. [I-125] IGFBP-2-Reagens: (Lyophilisiert) (ROT)

Eine Flasche mit < 5µCi (185kBq) mit [I-125]-markiertem IGFBP-2 in einem Proteinpuffer mit Natriumazid als Konservierungsmittel. Ungeöffnet bei 2-8 °C bis zum Verfallsdatum lagern. Die genauen Konzentrationen sind dem Fläschchenetikett zu entnehmen. Mit 11 ml deionisiertem Wasser rekonstituieren. Nach dem Rekonstituieren bis zu 3 Tage bei –20 °C lagern. Nach Gebrauch verwerfen.

D. IGFBP-2-Antiserum: (Lyophilisiert) (BLAU)

Ein Fläschchen mit polyklonalem Kaninchen-anti-IGFBP-2-Serum in einem Proteinpuffer mit Natriumazid als Konservierungsmittel. Ungeöffnet bei 2-8 °C bis zum Verfallsdatum lagern. Mit 10 ml deionisiertem Wasser rekonstituieren. Nach dem Rekonstituieren bis zu 2 Wochen bei 2-8 °C lagern. Nach Gebrauch verwerfen.

E. Präzipitationsreagens:

Eine Flasche à 100 ml mit polyklonalem Ziegen-anti-Kaninchen-Gammaglobulinserum in einem Puffer mit Polyethylenglykol als Fällungsmittel und Natriumazid als Konservierungsmittel. Bei 2-8 °C bis zum Verfallsdatum lagern.

F. IGFBP-2-Kontrollen: (Lyophilisiert)

Zwei Fläschchen (Level I bzw. II) mit niedrigen bzw. hohen Konzentrationen an IGFBP-2 in einem Proteinpuffer mit Natriumazid als Konservierungsmittel. Ungeöffnet bei 2-8 °C bis zum Verfallsdatum lagern. Jedes Fläschchen ist mit 1,0 ml deionisiertem Wasser zu rekonstituieren. Die genauen Konzentrationen sind dem Fläschchenetikett zu entnehmen. Nach dem Rekonstituieren bis zu 2 Wochen bei –20 °C oder darunter lagern. Nach Gebrauch verwerfen.

HINWEIS: Alle Reagenzien und Proben müssen vor der Verwendung Raumtemperatur (~25 °C) erreichen und durch vorsichtiges Umkehren gut gemischt werden.

For Illustrative Purposes Only

V. WARNHINWEISE

Nur zum *in vitro*-Gebrauch.
Nicht zur internen oder externen Anwendung bei Menschen oder Tieren geeignet
WARNUNG: RADIOAKTIVES MATERIAL
Beachten Sie die in ihrem Betrieb geltenden Strahlungsvorschriften, Standards und Verfahren für die Handhabung, Lagerung und Entsorgung radioaktiven Materials. Für Kunden in den USA: Dieses radioaktive Material darf nur von Ärzten, Tierärzten, klinischen Labors, Forschungsinstituten oder Krankenhäusern bezogen, erworben, besessen und verwendet werden, und auch dann nur zum Zweck von *in-vitro* klinischen oder Labortests, bei denen das Material bzw. dessen Strahlung weder Menschen noch Tieren intern oder extern verabreicht wird. Für Bezug, Erwerb, Besitz, Verwendung und Weitergabe gelten die Vorschriften des NRC bzw. des lizenzgebenden Staats. Um das Strahlenrisiko möglichst gering zu halten, sollten alle radioaktiven Materialien in Übereinstimmung mit den Empfehlungen der entsprechenden behördlichen Vorgaben und des von der Internationalen Atomenergiebehörde veröffentlichten Leitfadens „ Occupational Radiation Protection Safety Guide, Safety Standards Series No. RS-G-1.1," 1999, gehandhabt werden.
Die folgenden universellen Regeln für gute Laborpraxis (GLP) sollten beachtet werden:

- In Bereichen, in denen immundiagnostische Materialien verwendet werden, nicht essen, trinken, rauchen oder Kosmetika auflegen.
- Nicht mit dem Mund pipettieren.
- Beim Umgang mit immundiagnostischen Materialien Laborkittel und Einweg-Handschuhe tragen.
- Anschließend die Hände gründlich waschen.
- Arbeitsbereich mit saugfähigem Einmalpapier abdecken.
- Alle Spritzer sofort abwischen und betroffene Flächen dekontaminieren.
- Bildung von Aerosolen vermeiden.
- Für ausreichende Belüftung sorgen.
- Reagenzien und Materialien unter Beachtung der entsprechenden Vorschriften handhaben und entsorgen.

WARNUNG: POTENTIELL INFEKTIÖSES MATERIAL:
Dieser Kit könnte Reagenzien enthalten, die aus Material menschlichen Ursprungs (z. B. Serum oder Plasma) hergestellt oder in Verbindung mit Material menschlichen Ursprungs verwendet werden. Das in diesem Kit enthaltene Material wurde mit von der FDA empfohlenen Verfahren getestet und für nicht reaktiv auf HIV-1/1-Antikörper, HCV und HBsAg befunden. Bei keiner der zur Verfügung stehenden Testmethoden kann ein potentielles Infektionsrisiko völlig ausgeschlossen werden. Alle Reagenzien und Patientenproben sollten in Übereinstimmung mit der Biologischen Sicherheitsstufe 2 behandelt werden, die in dem Handbuch „Biosafety in Microbiological and Biomedical Laboratories", 4th Edition, April 1999 der Centers for Disease Control/National Institutes of Health für potentiell infektiöse Serum- oder Blutproben menschlichen Ursprungs empfohlen wird.
WARNUNG: POTENTIELLE CHEMISCHE GEFAHREN
Einige der in diesem Kit enthaltenen Reagenzien enthalten als Konservierungsmittel Natriumazid in Konzentrationen unterhalb des vorschriftsmäßigen Grenzwerts von <0,1 %. Zwar ist es stark verdünnt, jedoch reizt Natriumazid in konzentrierter Form die Haut und Schleimhäute und kann, insbesondere bei Anhäufung, mit Blei- und Kupferrohren reagieren und explosive Metallazide bilden. Diese Substanz ist in verdünnter Form enthalten, wodurch die Risiken erheblich reduziert jedoch nicht völlig aufgehoben werden. Kontakt mit Haut, Augen und Kleidung vermeiden. Bei Kontakt mit einem Reagens die betroffene Stelle sofort mit Wasser abwaschen und einen Arzt konsultieren. Entsorgen Sie alle nicht radioaktiven und ungefährlichen Reagenzien durch Spülen mit reichlich Wasser, um eine Ansammlung chemischer Gefahrenstoffe im Abwasserrohrsystem zu verhindern. Weitere Informationen zu in diesem Kit enthaltenen Gefahrenstoffen entnehmen Sie bitte den entsprechenden Materialsicherheitsdatenblättern, die Sie im Internet unter www.DSLabs.com einsehen bzw. anfordern können.

VI. ENTNAHME UND VORBEREITUNG VON PROBEN

Es ist Serum zu verwenden und die üblichen Vorsichtsmaßnahmen für die Venenpunktion eingehalten werden. Proben lassen sich bei 2-8 °C bis zu 24 Stunden lang bzw. tiefgekühlt bei –20 °C oder darunter längerfristig lagern. Mehrmaliges Einfrieren und Auftauen der Proben vermeiden. Für den Assay verdünnte Proben lassen sich bei 2-8 °C bis zu 24 Stunden bzw. tiefgekühlt bei –20 °C bis zu 4 Wochen lagern [14]. Keine stark hämolysierten oder lipämischen Proben verwenden. Gewöhnliche Serumproben vor dem Assay im Verhältnis 1:50 mit dem IGFBP-2-Proben-Diluent (Standard A mit 0 ng/ml) verdünnen.

VII. VERFAHRENSHINWEISE

Für den erfolgreichen Einsatz dieses Produkts ist ein eingehendes Verständnis dieser Packungsbeilage erforderlich. Verlässliche Ergebnisse lassen sich nur erzielen, wenn exakte Labortechniken angewendet werden und die Anweisungen der Packungsbeilage genau befolgt werden . Jedem Assay muss eine Standardkurve beigefügt werden. Innerhalb eines bestimmten Assays niemals verschiedene Chargen einer Kitkomponente mischen. Testbestandteile dürfen nach Ablauf des auf dem Etikett angezeigten Verfallsdatums nicht mehr verwendet werden. Die Assayreagenzien nach der Entnahme aus dem Kühlschrank vor dem Pipettieren auf Raumtemperatur (~25 °C) erwärmen lassen. Unbenutzte Reagenzien wie im Abschnitt "Reagenzien" beschrieben lagern. Standard- und Kontrolllösungen vor Gebrauch durch vorsichtiges Umkehren oder Schwenken, und nicht mit Hilfe eines Vortex-Mixers mischen.

For Illustrative Purposes Only

Um eine homogene Mischung der Reagenzien in allen Teströhrchen zu gewährleisten, ist vorsichtiges, gründliches Schütteln oder Vortexen unerlässlich. Wenn nicht die richtigen Werte für Kontrollen ermittelt werden, könnte dies an ungenauem Arbeiten, unvorschriftsmäßigem Umgang mit den Proben oder am Verfall von Reagenzien liegen. Unvollständiges Entfernen der den Röhrchen noch anhaftenden Flüssigkeit nach dem Dekantieren kann ungenaue Doppelbestimmungen und falsche Meßwerte zur Folge haben.

VIII. TESTVERFAHREN

A. Mitgeliefertes Material:

Im Lieferumfang des DSL IGFBP-2 RIA-Kits, Bestell-Nr. DSL-7100, enthaltenes Material

MATERIAL	MENGE	BESTELL-NR.
IGFBP-2-Standard A	Eine Flasche	7101
IGFBP-2-Standard B	Ein Fläschchen	7102
IGFBP-2-Standard C	Ein Fläschchen	7103
IGFBP-2-Standard D	Ein Fläschchen	7104
IGFBP-2-Standard E	Ein Fläschchen	7105
IGFBP-2-Standard F	Ein Fläschchen	7106
[I-125] IGFBP-2-Reagens	Eine Flasche	7120
IGFBP-2-Antiserum	Ein Fläschchen	7110
Präzipitationsreagens	Eine Flasche	1230
IGFBP-2-Kontrolle, Level I	Ein Fläschchen	7151
IGFBP-2-Kontrolle, Level II	Ein Fläschchen	7152

B. Benötigtes, jedoch nicht mitgeliefertes Material:

- 12 x 75 mm Polypropylen-Teströhrchen
- Röhrchenständer für 12 x 75 mm Röhrchen
- Präzisionspipette zum Pipettieren von 200 µl
- Multipipette zum Pipettieren von 100 µl und 1,0 ml
- Vortex
- Zentrifuge (1500 x g, vorzugsweise gekühlt)
- Dekantierständer oder ähnliche Vorrichtung zum Dekantieren
- Deionisiertes Wasser
- Saugfähiges Material zum Entfernen noch an den Röhrchen anhaftender Flüssigkeit
- Gammazähler
- Halblogarithmisches Papier oder Computerprogramm zur RIA-Datenanalyse

C. Assay-Verfahren:

Alle Reagenzien vor der Verwendung auf Raumtemperatur (~25 °C) bringen und gründlich mischen. Standards, Kontrollen und Proben als Doppelbestimmung analysieren.

1. Serumproben menschlichen Ursprungs werden vor dem Assay im Verhältnis 1:50 mit dem IGFBP-2-Probendiluent verdünnt. (Beispiel: 10 µl Serum + 500 µl IGFBP-2-Probendiluent)
   HINWEIS: Die Standards und Kontrollen werden vor dem Assay nicht verdünnt und die Ergebnisse der Standards und Kontrollen werden nicht mit dem Verdünnungsfaktor multipliziert.
2. Röhrchen zur Bestimmung der Totalaktivität, NSB, Standards, Kontrollen und Proben in doppelter Ausfertigung beschriften und ordnen.
3. Je 200 µl der Standards, Kontrollen und Proben in die entsprechenden Röhrchen pipettieren. 300 µl Nullstandard in die NSB-Röhrchen pipettieren.
4. Jeweils 100 µl IGFBP-2-Antiserum in alle Röhrchen, mit Ausnahme der NSB-Röhrchen und Röhrchen zur Bestimmung der Totalaktivität, pipettieren.
5. 1-2 Sekunden vorsichtig vortexen und bei Raumtemperatur (~25 °C) 4 Stunden inkubieren.
6. Jeweils 100 µl [I-125] IGFBP-2-Reagens in alle Röhrchen pipettieren.
7. 1-2 Sekunden vorsichtig vortexen.
8. Alle Röhrchen 16-20 Stunden bei 2-8 °C inkubieren.
9. In alle Röhrchen, mit Ausnahme der Röhrchen zur Bestimmung der Totalaktivität, jeweils 1,0 ml Präzipitationsreagens pipettieren und unmittelbar danach alle Röhrchen vortexen. Das Präzipitationsreagens muss vor Gebrauch gut geschüttelt werden.
10. Bei Raumtemperatur (~25 °C) 30 Minuten inkubieren.
11. Alle Röhrchen, mit Ausnahme der Röhrchen zur Bestimmung der Totalaktivität, 30 Minuten bei 1500 x g (ca. 3000 rpm) zentrifugieren.
12. Alle Röhrchen, mit Ausnahme der Röhrchen zur Bestimmung der Totalaktivität, durch Umkehren des gesamten Dekantierständers simultan in einen Behälter für radioaktiven Abfall dekantieren. Die Röhrchen auf einer saugfähigen Unterlage 15-30 Sekunden austropfen lassen, und noch am Röhrchenrand anhaftende Tröpfchen vorsichtig auf der Unterlage abklopfen, bevor die Röhrchen wieder aufgerichtet werden. Unvollständiges Entfernen der den Röhrchen anhaftenden Flüssigkeit kann eine schwache Replikation and falsche Messwerte zur Folge haben.
13. Alle Röhrchen eine Minute in einem Gammazähler zählen.

IX. ERGEBNISSE

Die in dieser Packungsbeilage angegebenen Ergebnisse wurden mittels log-linearer Kurvenanpassung errechnet. Bei anderen Methoden der Datenauswertung können sich leicht unterschiedliche Ergebnisse ergeben.

For Illustrative Purposes Only

A. Die mittleren Counts pro Minute (cpm) für jeden Standard, jede Kontrolle und jede Probe berechnen. Durch Subtraktion der mittleren CPM der NSB-Röhrchen von allen Werten erhält man korrigierte Werte. % B/T bzw. % B/Bo für jeden Standard und jede Kontrolle und Probe wie folgt berechnen:

$$\% \, B/T = \frac{\text{Mittelwert Proben-Counts - NSB-Counts}}{\text{mittlere Totalaktivität}} \times 100$$

$$\% \, B/Bo = \frac{\text{Mittelwert Proben-Counts - NSB-Counts}}{\text{mittlere Counts des Nullstandards - NSB-Counts}} \times 100$$

B. Durch Auftragen von % B/T bzw. % B/Bo (y-Achse) der Standards gegen die IBFBP-2-Konzentration (x-Achse) auf halblogarithmischem Koordinatenpapier einen Graph erstellen. Eine Standardkurve durch die Mittelwerte der Doppelbestimmungspunkte zeichnen.

C. Anhand der Standardkurve die IGFBP-2-Konzentrationen der Mittelwerte der Doppelbestimmung jeder Kontrolle und Probe ermitteln.

D. Alle Proben mit Werten über dem höchsten Standard werden mit dem IGFBP-2-Nullstandard entsprechend verdünnt und erneut bestimmt.

E. Alle Proben mit Werten unter dem niedrigsten Standard entsprechend dokumentieren.

F. Bei den Proben ergibt sich der endgültige IGFBP-2-Wert durch Multiplikation der aus der Standardkurve ermittelten Werte mit dem ungefähren Verdünnungsfaktor. (Beispiel: 1:50 verdünnte Proben mit 51 multiplizieren). Die Ergebnisse der Kontrollen werden nicht mit dem Verdünnungsfaktor multipliziert.

X. VERFAHRENSBESCHRÄNKUNGEN

- Die im Lieferumfang dieses Kits enthaltenen Reagenzien wurden für die Bestimmung der IGFBP-2-Spiegel im Serum optimiert.
- Mehrmaliges Einfrieren und Auftauen der Reagenzien und Proben sollte vermieden werden.
- Hämolysierte und lipämische Proben können falsche Messwerte ergeben und sind zu vermeiden.
- Die Ergebnisses dieses Assays müssen in Verbindung mit anderen relevanten klinischen Daten verwendet werden.

XI. QUALITÄTSKONTROLLE

- Die DSL-Kontrollen bzw. andere handelsübliche Kontrollen müssen innerhalb der ermittelten Vertrauensgrenzen liegen. Die Vertrauensgrenzen für die DSL-Kontrollen sind auf die Etiketten der Kontrollfläschchen aufgedruckt.
- Bei jedem Ansatz müssen Kontrollen mit hoher und niedriger Konzentration mitgeführt werden.

TYPISCHE IGFBP-2-RIA-STANDARDKURVENDATEN

RÖHRCHEN-NR.	AUFSCHRIFT DES RÖHRCHENS	GEBUNDEN (CPM)	Mittelwert (CPM)	B/T (%)	B/Bo (%)	IGFBP-2 (ng/ml)
1, 2	TOTALAKTIVITÄT	30761 33515	32138			
3, 4	NSB	1187 1286	1236	3,8		
	STANDARDS					
5, 6	A	13820 13970	13895	43,2	----	0,0
7, 8	B	12809 12926	12868	40,0	92,6	2,0
9, 10	C	10695 10695	10695	33,3	77,0	5,0
11, 12	D	7813 8039	7926	24,7	57,0	14,0
13, 14	E	4516 4539	4528	14,1	32,6	32,0
15, 16	F	1673 1681	1677	5,2	12,1	100,0
	KONTROLLEN					
17, 18	Level I	7471 7667	7569	23,6	54,5	15,3
19, 20	Level II	5602 5904	5753	17,9	41,4	23,8

ED_{50} = 17,8 ng/ml

WARNUNG: Die oben angegebenen Daten dürfen nicht anstelle von Daten verwendet werden, die der Anwender im Labor ermittelt hat.

XII. LEISTUNGSMERKMALE

Alle Leistungsmerkmale werden in ng/ml angegeben. Die folgende Formel dient zur Umrechnung in nmol/l :

ng/ml x 0,032 = nmol/l

A. Empfindlichkeit:

Die theoretische Sensitivität bzw. untere Nachweisgrenze, die durch Interpolation des Mittelwerts minus zwei Standardabweichungen von 20 Replikaten des IGFBP-2-Nullstandards berechnet wird, beträgt 0,5 ng/ml.

For Illustrative Purposes Only

B. Präzision:

Die Intra-Assay-Präzision wurde anhand des Mittelwerts von 12 Replikaten ermittelt.

PROBE	N	MITTELWERT (ng/ml)	STANDARDABWEICHUNG (ng/ml)	VARIATIONSKOEFFIZIENT (%)
I	12	13,0	1,1	8,5
II	12	32,2	2,0	6,2
III	12	94,4	4,4	4,7

Die Inter-Assay-Präzision wurde anhand des Mittelwerts aus den für die Replikate erhaltenen Durchschnittswerten in 5 separaten Ansätzen ermittelt.

PROBE	N	MITTELWERT (ng/ml)	STANDARDABWEICHUNG (ng/ml)	VARIATIONSKOEFFIZIENT (%)
I	5	2,7	0,2	7,4
II	5	13,2	0,6	4,5
III	5	69,7	5,0	7,2

C. Wiederfindung:

Drei Serumproben mit jeweils verschiedenem endogenem IGFBP-2-Gehalt wurden mit bekannten Mengen IGFBP-2 aufgestockt und analysiert.

PROBE	ENDOGEN (ng/ml)	ZUGEGEBEN (ng/ml)	ERWARTET (ng/ml)	GEMESSEN (ng/ml)	WIEDERFINDUNG (%)
I	4,45	0,52	4,97	5,11	103
		2,98	7,43	8,30	112
		8,90	13,35	14,94	112
II	30,47	0,52	30,99	30,73	99
		2,98	33,98	33,72	99
		8,90	39,37	44,19	112
III	68,37	0,52	68,89	78,20	114
		2,98	71,35	71,58	100
		8,90	77,27	83,48	108

D. Verdünnungslinearität:

Drei Serumproben wurden mit dem IGFBP-2-Nullstandard verdünnt und analysiert.

PROBE	VERDÜNNUNGSFAKTOR	ERWARTET (ng/ml)	GEMESSEN (ng/ml)	WIEDERFINDUNG (%)
I	---	---	71,67	---
	1:2	35,84	34,89	97
	1:4	17,92	15,13	84
	1:8	8,96	7,23	81
	1:16	4,48	3,52	79
II	---	---	71,91	---
	1:2	35,96	39,19	109
	1:4	17,98	18,79	105
	1:8	8,99	8,78	98
	1:16	4,49	3,63	81
III	---	---	94,91	---
	1:2	47,46	48,91	103
	1:4	23,73	24,40	103
	1:8	11,86	11,26	95
	1:16	5,93	4,80	81

E. Spezifität:

Mit dem DSL-7100 IGFBP-2-RIA wurde die Kreuzreaktivität des IGFBP-2-Antikörpers mit zahlreichen Verbindungen bestimmt.

Die prozentuale Kreuzreaktivität wird als Verhältnis der IGFBP-2-Konzentration zur Konzentration der reagierenden Substanz bei 50%iger Bindung des IGFBP-2-Nullstandards angegeben.

VERBINDUNG	% KREUZREAKTIVITÄT
IGFBP-2	100
IGFBP-3 GLYKOSYLIERT	NN
IGFBP-3 NICHT-GLYKOSYLIERT	NN
IGFBP-4	NN
IGFBP-5	NN
IGFBP-6	NN

ND = nicht nachweisbar bei 0,5 µg/Röhrchen

Durch die folgenden Substanzen wurde der IGFBP-2-RIA nicht beeinträchtigt: rhGH (1 µg/Röhrchen), IGF-I (1 µg/Röhrchen) und IGF-II (1 µg/Röhrchen).

For Illustrative Purposes Only

F. Artenübergreifender Tierserenvergleich:

REAKTIVE SEREN	NICHTREAKTIVE SEREN
Esel Ziege Meerschweinchen Ratte Kalb Pferd Schwein Schaf Maus	Kaninchen

For Illustrative Purposes Only

I. USAGE PRÉVU

Le kit DSL-7100 de radio immunodosage pour IGFBP-2 fournit le matériel pour le dosage quantitatif d'IGFBP-2 dans le sérum. Ce dosage a été conçu pour usage diagnostique *in vitro*.

II. RÉSUMÉ ET EXPLICATION DU TEST

Les facteurs de croissance apparentés à l'insuline, IGF-I et IGF-II, sont des peptides mitogéniques et anaboliques forts présentant une homologie structurelle avec l'insuline [1]. Les IGF sont produites dans de nombreux tissus sous le contrôle d'hormone de croissance et de facteurs régulateurs ; ils agissent en tant que régulateurs autocrines, paracrines et endocrines de la mitogénèse et du métabolisme. Dans le sérum et autres liquides biologiques, les IGF forment des complexes avec des protéines de liaison spécifique et structurellement homologues (IGFBP) [2,3]. Six IGFBP ont été identifiées chez les êtres humains [4] et sont numérotées d'après leur séquence de caractérisation moléculaire [4]. L'IGFBP-2 humaine est un peptide de 289 acides aminés, avec une séquence-signal de 39 résidus, 18 résidus cystéine et une masse moléculaire anticipée de 31,3 kD [5]. Le gène de l'IGFBP-2 humaine a été localisé en région q31-q34 du chromosome 2 [6]. L'affinité de liaison d'IGFBP-2 pour l'IGF-II est estimée être considérablement plus élevée que pour l'IGF-I [3], évoquant un rôle de régulation de l'action d'IGF-II. Des études sur des fœtus de mouton indiquent qu'IGFBP-2 est produite dans de nombreux tissus, et coïncide apparemment avec l'expression d'IGF-II [7]. De récentes études ont montré que, contrairement à l'IGFBP-1, la variabilité des taux sériques d'IGFBP-2 est négligeable pendant le jour [3] et que, contrairement à l'IGFBP-1 et à IGFBP-3, ils ne montrent pratiquement pas de changement durant la puberté [8]. L'IGFBP-2 a aussi été identifiée dans d'autres liquides corporels tels que les liquides céphalorachidien [9], amniotique et cœlomique [10], l'urine [11] et le liquide séminal [12].

III. PRINCIPE DU TEST

La procédure suit le principe de base de radio-immunodosage où entrent en compétition des antigènes radioactifs et non radioactifs pour un nombre fixe de sites actifs d'anticorps [13]. La quantité d'IGFBP-2 marquée à [I^{125}] liée à l'anticorps est inversement proportionnelle à la concentration d'IGFBP-2 non marquée présente. La séparation d'antigène libre et lié s'effectue facilement et rapidement au moyen d'un système à double anticorps.

IV. RÉACTIFS

Le kit DSL-7100 de RID pour IGFBP-2 contient des réactifs en quantité suffisante pour 100 tubes. Chaque kit contient les réactifs suivants :

A. Standard d'IGFBP-2 /Diluant d'échantillon:

Une bouteille de 55 ml, étiquetée A, contenant 0 ng/l d'IGFBP-2 dans un tampon à base de protéines avec de l'azide de sodium comme agent de conservation. Conserver à 2-8 °C jusqu'à la date de péremption.

B. Standards d'IGFBP-2: (Lyophilisés)

Cinq flacons, étiquetés B-F, contenant des concentrations approximatives de 2,5, 5, 15, 50 et 100 ng/ml d'IGFBP-2 dans un tampon à base de protéines avec de l'azide de sodium comme agent de conservation. Se référer aux étiquettes des flacons pour connaître les concentrations exactes. Conserver non ouvert entre 2-8 °C jusqu'à la date de péremption. Reconstituer chaque flacon avec 1 ml d'eau désionisée. Après reconstitution, conserver à –20 °C ou plus bas jusqu'à 2 semaines. Jeter après usage.

NOTE DE STANDARDISATION : De l'IGFBP-2, extraite et purifiée à partir de sources matérielles humaines, a été utilisée pour produire les standards et contrôles d'IGFBP-2 par dilution en série. En raison du manque d'une préparation de référence universellement acceptée, les standards et contrôles d'IGFBP-2 de DSL ont été étalonnés en fonction de standards DSL de référence internes et leur performance a été vérifiée par immunodosage.

C. Réactif d'IGFBP-2 [I^{125}]: (Lyophilisés) (ROUGE)

Une bouteille contenant < 5μCi (185 kBq) d'IGFBP-2 marquée à [I^{125}] dans un tampon à base de protéines avec de l'azide de sodium comme agent de conservation. Conserver non ouvert entre 2-8 °C jusqu'à la date de péremption. Se référer aux étiquettes des flacons pour connaître les concentrations exactes. Reconstituer avec 11 ml d'eau désionisée. Après reconstitution, entreposer à –20 °C jusqu'à 3 jours. Jeter après usage.

D: Sérum anti-IGFBP-2: (Lyophilisés) (BLEU)

Un flacon contenant du sérum polyclonal de lapin anti-IGFBP-2 dans un tampon à base de protéines avec de l'azide de sodium comme agent de conservation. Conserver non ouvert entre 2-8 °C jusqu'à la date de péremption. Reconstituer avec 10 ml d'eau désionisée. Après reconstitution, entreposer entre 2-8 °C jusqu'à 2 semaines. Jeter après usage.

E. Réactif précipitant:

Une bouteille de 100 ml, contenant du sérum de chèvre anti-gamma globulines de lapin dans un tampon au polyéthylène glycol pour aider à la précipitation et de l'azide de sodium comme agent de conservation. Conserver à 2-8 °C jusqu'à la date de péremption.

F. Contrôles d'IGFBP-2: (Lyophilisés)

Deux flacons, niveaux I et II, contenant des taux bas et hauts d'IGFBP-2 dans un tampon à base de protéines avec de l'azide de sodium comme agent de conservation. Conserver non ouvert entre 2-8 °C jusqu'à la date de péremption. Reconstituer chaque flacon avec 1 ml d'eau désionisée. Se référer aux étiquettes des flacons pour connaître les concentrations exactes. Après reconstitution, conserver à –20 °C ou plus bas jusqu'à 2 semaines. Jeter après usage.

REMARQUE: Tous les réactifs et échantillons doivent arriver à température ambiante (~25 °C) et doivent être bien mélangés par inversion douce avant usage.

For Illustrative Purposes Only

V. PRÉCAUTIONS

Pour usage *in vitro* uniquement
N'est pas prévu pour l'usage interne ou externe chez l'homme ou l'animal
ATTENTION : MATÉRIEL RADIOACTIF
Se reporter aux réglementations, standards et procédures de radiation applicables à vos installations concernant la manipulation, la conservation, et la mise au rebut des matériaux radioactifs. Pour les États-Unis : ce matériel radioactif ne peut être reçu, acquis, possédé et utilisé que par des médecins, vétérinaires, laboratoires cliniques, instituts de recherches ou hôpitaux, et ce uniquement pour des essais cliniques ou en laboratoire *in vitro* n'entraînant pas l'administration interne ou externe du matériel ou de sa radiation chez l'humain ou l'animal. Sa réception, son acquisition, sa possession, son utilisation et son transfert sont soumis à la réglementation du NRC (Nuclear Regulatory Commission) et/ou de l'accord de permis. Pour réduire le risque d'exposition aux radiations, manipuler les matériaux radioactifs conformément aux recommandations des normes réglementaires appropriées et du guide « Occupational Radiation Protection Safety Guide, Safety Standards Series No.RS-G-1.1 », 1999, édité par l'Agence Internationale de l'Énergie Atomique.
Les Bonnes Pratiques de Laboratoires internationales suivantes doivent être observées :

- Ne pas manger, boire, fumer ou utiliser des cosmétiques lors de la manipulation de produits immunodiagnostiques.
- Ne pas pipeter avec la bouche.
- Porter une blouse de laboratoire et des gants jetables lors de la manipulation de produits immunodiagnostiques.
- Se laver soigneusement les mains après chaque manipulation.
- Recouvrir la surface de travail avec du papier absorbant jetable.
- Nettoyer immédiatement les éventuelles projections et décontaminer les surfaces touchées.
- Éviter l'utilisation d'aérosols.
- Maintenir une aération appropriée.
- Manipuler et jeter tous les réactifs et matériels conformément aux réglementations en vigueur.

MISE EN GARDE : RISQUE BIOLOGIQUE POTENTIEL
Ce kit est susceptible de contenir certains réactifs faits à partir de matériel humain (ex. : sérum ou plasma) ou utilisés en association avec des matériels humains. Le matériel contenu dans ce kit a été testé par des méthodes recommandées par la FDA et s'est révélé négatif aux anticorps du VIH-1/2, au VHC et à l'AgHBs. Aucune méthode de test ne peut offrir l'assurance totale de l'élimination du risque biologique potentiel. Les réactifs et échantillons des patients doivent être manipulés selon les normes de sécurité de niveau 2, de la même façon que tout matériel humain potentiellement infectieux, comme recommandé par le CDC (Center for Disease Control) et le NIH (National Institutes of Health) dans le manuel « Biosafety in Microbiological and Biomedical Laboratories », 4e édition, avril 1999.
MISE EN GARDE : RISQUE CHIMIQUE POTENTIEL
Certains des réactifs de ce kit contiennent de l'azide de sodium comme conservateur, à des concentrations inférieures à la limite réglementaire de <0,1 %. Bien qu'il soit fortement dilué, l'azide de sodium concentré est irritant pour la peau et les muqueuses, et il peut dégager des composants explosifs au contact de canalisations en plomb ou en cuivre, surtout lorsqu'il est en grande quantité. Ce produit se présente sous forme diluée, ce qui peut par conséquent réduire de façon significative le risque d'exposition, sans toutefois l'éliminer totalement. Éviter le contact avec la peau, les yeux et les vêtements. En cas de contact avec l'un de ces réactifs, laver abondamment à l'eau et demander un avis médical. Se débarrasser des réactifs non radioactifs et ne présentant aucun risque biologique en les rinçant à l'aide de grands volumes d'eau, de façon à éviter l'accumulation de produits présentant un risque chimique dans les canalisations. Pour plus d'informations sur les produits contenus dans le kit et présentant un risque, se reporter aux fiches toxicologiques de chaque composant, disponibles sur le site Internet www.DSLabs.com ou sur demande.

VI. PRÉLÈVEMENT ET PRÉPARATION DES ÉCHANTILLONS

Utiliser du sérum et observer les précautions habituelles de vénipuncture. Les spécimens peuvent être entreposés à 2-8 °C jusqu'à 24 heures et devront être congelés à –20 °C ou plus bas pour de plus longues périodes. Éviter congélation et décongélation répétées des échantillons. Les échantillons qui ont été dilués pour le dosage peuvent être entreposés à 2-8 °C jusqu'à 24 heures ou à –20 °C jusqu'à 4 semaines [14]. Ne pas utiliser de spécimens grossièrement hémolysés ou lipémiques. Les échantillons sériques types devront être dilués à 1:50 avec du diluant d'échantillon IGFBP-2 (Standard A à 0 ng/ml) avant dosage.

VII. NOTES RELATIVES AUX PROCÉDURES

Une pleine compréhension de cette notice est nécessaire pour une bonne utilisation du produit. L'obtention de résultats fiables repose sur l'utilisation de techniques de laboratoires précises et un respect scrupuleux de la notice. Une courbe standard doit être réalisée pour chaque dosage. Ne pas mélanger les composants, quels qu'ils soient, provenant de plusieurs lots au cours d'un même dosage. N'utiliser aucun des composants au-delà de la date de péremption indiquée sur l'étiquette. Après avoir retiré des réactifs de dosage du réfrigérateur, les laisser arriver à température ambiante (~25 °C) avant de pipeter. Les réactifs inutilisés doivent être stockés comme décrit dans la section Réactifs. Avant leur emploi, standards et contrôles devront être mélangés par inversion ou en les faisant tourbillonner doucement plutôt qu'en les agitant au vortex.

For Illustrative Purposes Only

Pour assurer un mélange homogène des réactifs dans chaque tube, il est indispensable les remuer ou de les passer doucement et complètement au vortex. L'obtention de valeurs inappropriées pour les contrôles peut indiquer des manipulations imprécises, des manipulations incorrectes de l'échantillon ou la détérioration de réactifs. Si les tubes ne sont pas épongés correctement après la décantation, cela peut entraîner des valeurs erronées et des réplications médiocres.

VIII. PROCÉDURE DU TEST

A. Matériel fourni:

Matériel fourni avec le kit DSL RID pour IGFBP-2, Réf. No. DSL-7100

MATÉRIEL	QUANTITÉ	N° de référence
IGFBP-2 Standard A	Une bouteille	7101
IGFBP-2 Standard B	Un flacon	7102
IGFBP-2 Standard C	Un flacon	7103
IGFBP-2 Standard D	Un flacon	7104
IGFBP-2 Standard E	Un flacon	7105
IGFBP-2 Standard F	Un flacon	7106
Réactif IGFBP-2 [I^{125}]	Une bouteille	7120
Sérum anti-IGFBP-2	Un flacon	7110
Réactif précipitant	Une bouteille	1230
Contrôle d'IGFBP-2 niveau I	Un flacon	7151
Contrôle d'IGFBP-2 niveau I	Un flacon	7152

B. Matériel requis mais non fourni:

- Tubes à essais en polypropylène de 12 X 75 mm
- Support pour tube à essais de 12 x 75 mm
- Pipette de précision pour délivrer 200 µl
- Pipette à répétition pour délivrer 100 µl et 1 ml
- Agitateur-mélangeur vortex
- Centrifugeuse (1500 X g, de préférence réfrigérée)
- Claie en éponge ou appareil similaire pour décantation
- Eau désionisée
- Matériel absorbant pour éponger les tubes
- Compteur gamma
- Papier quadrillé semi-log (log-linéaire) ou logiciel d'analyse de données RID

C. Procédure de dosage:

Permettre à tous les réactifs d'atteindre la température ambiante (~25 °C) et bien les mélanger avant de les utiliser. Doser les standards, contrôles et échantillons inconnus en double exemplaire.

1. Les échantillons de sérum humain devront être dilués à 1:50 avec du diluant d'échantillon d'IGFBP-2 avant dosage. (Exemple : 10 µl de sérum + 500 µl de diluant d'échantillon d'IGFBP-2)
   Remarque : Ne pas diluer les standards et les contrôles avant dosage ni multiplier les résultats pour les standards et contrôles par le facteur de dilution de l'échantillon.
2. Étiqueter et arranger des tubes en double exemplaire pour l'activité totale, NSB, standards, contrôles et inconnus.
3. Pipeter 200 µl de standards, contrôles ou échantillons inconnus dans les tubes appropriés. Ajouter 300 µl d'IGFBP-2 standard à 0 ng/ml aux tubes NSB.
4. Ajouter immédiatement 100 µl de sérum anti-IGFBP-2 à chaque tube, sauf aux tubes NSB et d'activité totale.
5. Passer doucement au vortex pendant 1-2 secondes et incuber à température ambiante (~25 °C) pendant 4 heures.
6. Ajouter 100 µl du réactif IGFBP-2 [I^{125}] à tous les tubes.
7. Passer doucement au Vortex pendant 1-2 secondes.
8. Incuber 16-20 heures entre 2-8 °C .
9. Ajouter 1 ml de réactif précipitant à tous les tubes, sauf aux tubes d'activité totale et passer immédiatement tous les tubes au vortex. Le réactif précipitant doit être bien secoué avant usage.
10. Incuber tous les tubes à température ambiante (~25 °C) pendant 30 minutes.
11. Centrifuger tous les tubes, sauf les tubes d'activité totale, pendant 30 min à 1 500 x g (environ 3 000 tr/min).
12. Décanter tous les tubes, sauf les tubes d'activité totale, par inversion simultanée avec une claie en éponge dans un récipient à déchets radioactifs. Laisser égoutter sur du matériel absorbant pendant 15-30 secondes puis éponger doucement les tubes pour éliminer toute gouttelette adhérant au bord avant de les remettre en position droite. Si les tubes ne sont pas épongés correctement des valeurs erronées et des réplications médiocres pourraient en résulter.
13. Mettre tous les tubes dans un compteur gamma pendant une minute.

IX. RÉSULTATS

Les résultats fournis par cette notice ont été calculés par ajustement de courbe log-linéaire. D'autres méthodes de traitement des données peuvent donner des résultats légèrement différents.

For Illustrative Purposes Only

A. Calculer les coups moyens par minute (cpm) pour chaque standard, contrôle et inconnu. Soustraire la moyenne CPM des tubes NSB de tous les comptages totaux pour obtenir des comptages corrigés. Calculer le % B/T ou % B/Bo pour chaque standard, contrôle et échantillon inconnu comme suit :

$$\% \text{ B/T} = \frac{\text{Moyenne coups d'échantillon - Coups NSB}}{\text{Moyenne d'activité totale}} \times 100$$

$$\% \text{ B/Bo} = \frac{\text{Moyenne coups d'échantillon - Coups NSB}}{\text{Moyenne coups de standard à 0 ng/ml - Coups NSB}} \times 100$$

B. Tracer une courbe du % B/T ou % B/Bo des IGFBP-2 standards (ordonnée) en fonction de la concentration en IGFBP-2 (abscisse) sur papier quadrillé linéaire-log (semi-log). Tracer une courbe standard passant par la moyenne des points de dosage en double.

C. Déterminer la concentration en IGFBP-2 en reportant la moyenne de comptages de doublons de chaque contrôle et échantillon inconnu sur la courbe standard.

D: Tout échantillon dont le résultat de dosage est supérieur au plus haut standard devra être dilué correctement avec de l'IGFBP-2 standard à 0 ng/ml et redosé.

E. Tout échantillon dont le résultat est inférieur au standard le plus bas devra être noté comme tel.

F. Pour les échantillons inconnus, les valeurs obtenues de la courbe standard doivent être multipliées par le facteur de dilution approximatif pour obtenir la valeur finale d'IGFBP-2. (Exemple : Les échantillons dilués à 1:50, devront être multipliés par 51). Les résultats de contrôle ne doivent pas être multipliés par facteur de dilution de l'échantillon.

X. LIMITES

- Les réactifs fournis dans ce kit sont optimisés pour mesurer des niveaux d'IGFBP-2 dans le sérum.
- Éviter la congélation et décongélation répétées des réactifs ou spécimens.
- Les spécimens hémolysés et lipémiques peuvent donner de valeurs erronées et sont à éviter.
- Les résultats de ce dosage devront être utilisés en conjonction avec d'autres informations cliniques pertinentes.

XI. CONTRÔLE DE LA QUALITÉ

- Des contrôles DSL et autres contrôles disponibles dans le commerce doivent tomber dans les limites de confiance établies. Les limites de confiance pour les contrôles DSL sont imprimées sur les étiquettes des flacons de contrôle.
- Des taux de contrôles bas et élevés devront être inclus dans chaque dosage.

DONNÉES DE COURBE STANDARD TYPE POUR RID D'IGFBP-2

NO. TUBE	ÉTIQUETTE DU TUBE	LIÉ (cpm)	MOYENNE (cpm)	B/T (%)	B/Bo (%)	IGFBP-2 (ng/ml)
1, 2	ACTIVITÉ TOTALE	30761 33515	32138			
3, 4	NSB	1187 1286	1236	3,8		
	STANDARDS					
5, 6	A	13820 13970	13895	43,2	----	0,0
7, 8	B	12809 12926	12868	40,0	92,6	2,0
9, 10	C	10695 10695	10695	33,3	77,0	5,0
11, 12	D	7813 8039	7926	24,7	57,0	14,0
13, 14	E	4516 4539	4528	14,1	32,6	32,0
15, 16	F	1673 1681	1677	5,2	12,1	100,0
	CONTRÔLES					
17, 18	Niveau I	7471 7667	7569	23,6	54,5	15,3
19, 20	Niveau II	5602 5904	5753	17,9	41,4	23,8

ED_{50} = 17,8 ng/ml

MISE EN GARDE: Les données ci-dessus ne doivent pas être utilisées à la place de celles obtenues en laboratoire par l'utilisateur.

XII. CARACTÉRISTIQUES DE PERFORMANCE

Toutes les caractéristiques de performance sont exprimées en ng/ml. Pour convertir en nmol/l:

ng/ml x 0,032 = nmol/l

A. Sensibilité:

La sensibilité théorique, ou limite de détection minimum, calculée par interpolation de la moyenne moins deux écarts types de 20 répétitions d'IGFBP-2 standard à 0 ng/ml, est de 0,5 ng/ml.

For Illustrative Purposes Only

B. Précision:

La précision intra-dosage a été déterminée à partir de la moyenne de 12 répétitions chacune.

ÉCHANTILLON	N	MOYENNE (ng/ml)	ÉCART TYPE (ng/ml)	COEFFICIENT DE VARIATION (%)
I	12	13,0	1,1	8,5
II	12	32,2	2,0	6,2
III	12	94,4	4,4	4,7

La précision inter-dosage a été déterminée à partir de la moyenne de doublons moyens sur 5 séries distinctes.

ÉCHANTILLON	N	MOYENNE (ng/ml)	ÉCART TYPE (ng/ml)	COEFFICIENT DE VARIATION (%)
I	5	2,7	0,2	7,4
II.	5	13,2	0,6	4,5
III	5	69,7	5,0	7,2

C. Récupération:

Trois échantillons de sérum contenant différents taux d'IGFBP-2 endogène ont été altérés avec des quantités connues de rhIGFBP-2 puis dosés.

ÉCHANTILLON	ENDOGÈNE (ng/ml)	AJOUTÉ (ng/ml)	ATTENDU (ng/ml)	OBSERVÉ (ng/ml)	RÉCUPÉRÉ (%)
I	4,45	0,52	4,97	5,11	103
		2,98	7,43	8,30	112
		8,90	13,35	14,94	112
II	30,47	0,52	30,99	30,73	99
		2,98	33,98	33,72	99
		8,90	39,37	44,19	112
III	68,37	0,52	68,89	78,20	114
		2,98	71,35	71,58	100
		8,90	77,27	83,48	108

D: Linéarité de la dilution:

Trois échantillons de sérum ont été dilués avec de l'IGFBP-2 standard à 0 ng/ml puis dosés.

ÉCHANTILLON	FACTEUR DE DILUTION	ATTENDU (ng/ml)	OBSERVÉ (ng/ml)	RÉCUPÉRÉ (%)
I	---	---	71,67	---
	1:2	35,84	34,89	97
	1:4	17,92	15,13	84
	1:8	8,96	7,23	81
	1:16	4,48	3,52	79
II	---	---	71,91	---
	1:2	35,96	39,19	109
	1:4	17,98	18,79	105
	1:8	8,99	8,78	98
	1:16	4,49	3,63	81
III	---	---	94,91	---
	1:2	47,46	48,91	103
	1:4	23,73	24,40	103
	1:8	11,86	11,26	95
	1:16	5,93	4,80	81

E. Spécificité:

La réactivité croisée du sérum anti-IGFBP-2 a été mesurée pour plusieurs composés au moyen du DSL-7100 de RID pour IGFBP-2. Le pourcentage de réactivité croisée est exprimé par le rapport de la concentration en IGFBP-2 et de la concentration du composé réagissant à 50 % de liaison d'IGFBP-2 standard à 0 ng/ml.

COMPOSÉ	% RÉACTIVITÉ CROISÉE
IGFBP-2	100
IGFBP-3 GLYCOSYLÉE	ND
IGFBP-3 NON-GLYCOSYLÉE	ND
IGFBP-4	ND
IGFBP-5	ND
IGFBP-6	ND

ND = Non détectable à 0,5 μg/tube

Les substances suivantes n'ont pas réagi lors du RID pour IGFBP-2 : rhGH (1 μg/tube), IGF-I (1 μg/tube) et IGF-II (1 μg/tube).

For Illustrative Purposes Only

F. Comparaison de sérum entre espèces animales :

SÉRUM RÉACTIF	SÉRUM NON RÉACTIF
Âne Chèvre Cobaye Rat Veau Cheval Porc Mouton Souris	Lapin

For Illustrative Purposes Only

I. USO PREVISTO

Il kit DSL-7100 IGFBP-2 Radioimmunoassay (dosaggio radioimmunologico dell'IGFBP-2) fornisce i materiali per la misurazione quantitativa dell'IBFBP-2 nel siero. Questo test è destinato all'uso diagnostico *in vitro*.

II. SOMMARIO E SPIEGAZIONE DEL TEST

I fattori di crescita insulino-simili IGF-I e IGF-II, sono potenti peptidi mitogeni e anabolici, strutturalmente omologhi all'insulina [1]. Gli IGF sono prodotti da numerosi tessuti corporei sotto il controllo dell'ormone della crescita e di fattori regolatori e agiscono come regolatori autocrini, paracrini ed endocrini della mitogenesi e del metabolismo. Nel siero e in altri fluidi biologici, gli IGF sono complessati con proteine leganti specifiche, strutturalmente omologhe (IGFBP) [2,3]. Nell'uomo, sono state identificate sei IGFBP [4], che vengono numerate secondo la sequenza della rispettiva caratterizzazione molecolare [4]. L'IGFBP-2 umana è un peptide composto da 289 aminoacidi, con un peptide segnale di 39 residui, 18 residui di cisteina e una massa molecolare attesa di 31,3 kDa [27]. Il gene dell'IGFBP-2 umana è stato localizzato sul cromosoma 2, regione q31-q34 [6]. L'affinità di legame di IGFBP-2 per IGF-II è ritenuta significativamente superiore a quella per IGF-I [3], possibile indicazione di un ruolo di IGFBP-2 nella regolazione dell'azione di IGF-II. Gli studi su feto di pecora indicano che la IGFBP-2 è prodotta in numerosi tessuti, apparentemente in coincidenza con l'espressione di IGF-II [7]. Studi recenti concernenti i livelli sierici di IGFBP-2 hanno dimostrato, a differenza di IGFBP-1, una variabilità giornaliera trascurabile [3] e, a differenza di IGFBP-1 e IGFBP-3, virtualmente nessuna variazione durante la pubertà [8]. IGFBP-2 è stata inoltre identificata in altri fluidi corporei come per esempio liquor cerebrospinale [9], liquido amniotico e celomico [10], urina [11] e liquido seminale [12].

III. PRINCIPIO DEL TEST

La procedura segue il principio fondamentale del dosaggio radioimmunologico, che comporta la competizione tra un antigene radioattivo e uno non radioattivo per un numero fisso di siti leganti l'anticorpo [13]. La quantità di IGFBP-2 marcata con [I-125] legata all'anticorpo è inversamente proporzionale alla concentrazione di IGFBP-2 non marcata presente. La separazione dell'antigene libero e legato si ottiene usando un sistema con doppio anticorpo.

IV. REAGENTI

Il kit DSL-7100 IGFBP-2 RIA contiene reagenti sufficienti per 100 provette. Ogni kit contiene i reagenti seguenti.

A. Standard IGFBP-2 A/Diluente per campione:

Un flacone da 55 mL, etichettato con la lettera "A", contenente 0 ng/mL di IGFBP-2 in tampone proteico con sodio azide come conservante. Conservare a 2-8°C fino alla data di scadenza.

B. Standard IGFBP-2: (liofilizzati)

Cinque flaconi, etichettati con le lettere "B", "C", "D", "E" ed "F", contenenti concentrazioni di circa 2,5, 5,0, 15,0, 50,0 e 100,0 ng/mL di IGFBP-2 in tampone proteico con sodio azide come conservante. Per le concentrazioni esatte, vedere le etichette dei flaconi. Conservare i flaconi sigillati a 2-8°C sino alla data di scadenza. Ricostituire ciascun flacone con 1,0 mL di acqua deionizzata. Dopo la ricostituzione, conservare ad almeno -20°C per un massimo di 2 settimane. Gettare dopo l'uso.

NOTA SULLA STANDARDIZZAZIONE: per realizzare gli standard e i controlli IGFBP-2 mediante diluizione seriale, è stata utilizzata IGFBP-2 estratta e purificata da materiali di origine umana. Data la mancanza di una preparazione di riferimento universalmente accettata, gli standard e i controlli DSL IGFBP-2 sono stati calibrati a fronte degli standard di riferimento interni DSL e le performance sono state verificate mediante immunodosaggio.

C. Reagente IGFBP-2 [I-125]: (liofilizzato) (ROSSO)

Un flacone contenente < 5µCi (185kBq) di IGFBP-2 marcata con [I-125] in tampone proteico con sodio azide come conservante. Conservare i flaconi sigillati a 2-8°C sino alla data di scadenza. Per le concentrazioni esatte, vedere le etichette dei flaconi. Ricostituire con 11 mL di acqua deionizzata. Dopo la ricostituzione, conservare a -20°C per un massimo di 3 giorni. Gettare dopo l'uso.

D. Antisiero anti-IGFBP-2: (liofilizzato) (BLU)

Un flacone contenente siero policlonale di coniglio anti-IGFBP-2 in tampone proteico con sodio azide come conservante. Conservare i flaconi sigillati a 2-8°C sino alla data di scadenza. Ricostituire con 10 mL di acqua deionizzata. Dopo la ricostituzione, conservare a 2-8°C per un massimo di 2 settimane. Gettare dopo l'uso.

E. Reagente precipitante:

Un flacone da 100 mL, contenente siero policlonale di gammaglobuline di capra anti-coniglio in tampone con polietilenglicole come reattivo precipitante e sodio azide come conservante. Conservare a 2-8°C fino alla data di scadenza.

F. Controlli IGFBP-2: (liofilizzati)

Due flaconi, Livello I e II, contenenti livelli bassi e alti di IGFBP-2 in tampone proteico con sodio azide come conservante. Conservare i flaconi sigillati a 2-8°C sino alla data di scadenza. Ricostituire ciascun flacone con 1,0 mL di acqua deionizzata. Per le concentrazioni esatte, vedere le etichette dei flaconi. Dopo la ricostituzione, conservare ad almeno -20°C per un massimo di 2 settimane. Gettare dopo l'uso.

NOTA: prima dell'uso, attendere che tutti i reagenti e i campioni si portino a temperatura ambiente (~25°C) e mescolarli con cura capovolgendoli delicatamente.

For Illustrative Purposes Only

V. PRECAUZIONI

Esclusivamente per uso *in vitro*.
Non per uso interno o esterno in soggetti umani o animali
ATTENZIONE: MATERIALE RADIOATTIVO
Per la manipolazione, la conservazione e lo smaltimento dei materiali radioattivi, attenersi alle procedure, alle normative e ai regolamenti vigenti in materia di radiazioni. Per clienti negli Stati Uniti: questo materiale radioattivo può essere ricevuto, acquistato, tenuto e usato soltanto da medici, veterinari, laboratori clinici, istituti di ricerca od ospedali e soltanto per test di laboratorio o clinici *in vitro* che non comportano la somministrazione per via interna o esterna del materiale stesso o la sua irradiazione sull'uomo o sugli animali. Ricevimento, acquisto, possesso, uso e trasferimento di tale materiale sono soggetti ai regolamenti dell'NCR e/o alle condizioni del contratto di licenza. Per minimizzare il rischio di esposizione alle radiazioni, manipolare i materiali radioattivi in conformità alle leggi vigenti e a quanto previsto dalla norma "Occupational Radiation Protection Safety Guide, Safety Standard Series No. RS-G-1.1," 1999, pubblicata dalla International Atomic Entergy Agency.
Osservare le seguenti norme di buona prassi di laboratorio (GLP, Good Laboratory Practices).

- Non mangiare, bere, fumare o usare cosmetici nei luoghi in cui si manipolano materiali immunodiagnostici.
- Non pipettare con la bocca.
- Indossare camici da laboratorio e guanti monouso quando si manipolano materiali immunodiagnostici.
- Al termine, lavare con cura le mani.
- Coprire l'area di lavoro con carta assorbente monouso.
- Pulire e rimuovere immediatamente le sostanze inavvertitamente versate e decontaminare le superfici interessate.
- Evitare la generazione di aerosol.
- Fornire una ventilazione adeguata.
- Manipolare e smaltire i reagenti e i materiali in conformità alle normative vigenti.

AVVERTENZA: MATERIALE A POTENZIALE RISCHIO BIOLOGICO
Questo kit può contenere alcuni reagenti derivati da materiale di origine umana (p.es. siero o plasma) o usati in combinazione con tale materiale. Il materiale di questo kit è stato testato con metodi approvati dalla FDA e risultato non reattivo per anticorpi anti HIV-1/2, HCV e antigene di superficie dell'epatite B (HBsAg). Nessun metodo di analisi attualmente conosciuto può garantire con certezza l'eliminazione di potenziali rischi biologici. Manipolare tutti i reagenti e i campioni in conformità alle procedure del Biosafety Level 2 (BSL, livello di sicurezza biologica), secondo quanto raccomandato per i campioni di sangue o materiale umano potenzialmente infettivi nel manuale dei Centers for Disease Control/National Institutes of Health intitolato "Biosafety in Microbiological and Biomedical Laboratories," 4th Edition, April 1999.
AVVERTENZA: POTENZIALE RISCHIO CHIMICO
Alcuni reagenti di questo kit contengono sodio azide come conservante a concentrazioni inferiori al limite regolamentare di < 0,1%. Seppure significativamente diluita, la sodio azide concentrata è irritante per gli occhi e le membrane mucose e può reagire con le tubature di piombo e rame formando azoturi esplosivi, soprattutto se accumulata. Questa sostanza è in forma diluita e può pertanto minimizzare i rischi di esposizione in modo significativo, seppure non completamente. Evitare il contatto con pelle, occhi e indumenti. In caso di contatto con un reagente, lavare l'area abbondantemente con acqua e rivolgersi a un medico. Smaltire tutti i reagenti non radioattivi e non pericolosi con grandi quantità d'acqua allo scopo di evitare l'accumulo di pericolose sostanze chimiche nelle tubazioni. Per maggiori informazioni sulle sostanze pericolose nel kit, consultare la scheda di sicurezza relativa al componente specifico, sul sito web www.DSLabs.com oppure facendone apposita richiesta.

VI. PRELIEVO E PREPARAZIONE DEI CAMPIONI

Usare siero e osservare le normali precauzioni per la venipuntura. I campioni possono essere conservati a 2-8°C per non più di 24 ore e congelati ad almeno -20°C per periodi più lunghi. Evitare cicli ripetuti di congelamento e scongelamento dei campioni. I campioni diluiti per il test possono essere conservati a 2-8°C per un massimo di 24 ore o a -20°C per non più di 4 settimane [14]. Non usare campioni macroscopicamente emolizzati o lipemici. I campioni di siero tipici devono essere diluiti 1:50 con il diluente per campione IGFBP-2 (0 ng/mL di standard A) prima del test.

VII. NOTE RELATIVE ALLA PROCEDURA

Ai fini del corretto uso del prodotto, è necessario comprendere a fondo ogni parte del presente foglietto illustrativo. Si otterranno risultati affidabili soltanto adottando tecniche di laboratorio appropriate e rispettando rigorosamente il foglietto illustrativo. Per ogni test deve essere determinata una curva standard. Non usare nello stesso test componenti di kit appartenenti a lotti diversi. Non usare componenti oltre la data di scadenza riportata sull'etichetta. Una volta rimossi dal refrigeratore, attendere che i reagenti per il test si portino a temperatura ambiente (~25°C) prima di iniziare a pipettare. Conservare i reagenti non utilizzati in conformità alle indicazioni fornite nella sezione Reagenti. Prima dell'uso, mescolare standard e controlli capovolgendoli o agitandoli delicatamente, anziché vortexandoli.

For Illustrative Purposes Only

Per garantire una miscela omogenea dei reagenti in ogni provetta, è essenziale agitare o vortexare delicatamente e con cura. Il mancato ottenimento di valori appropriati per i controlli, può indicare manipolazioni errate, trattamento inappropriato dei campioni o deterioramento dei reagenti. La mancanza di una asciugatura appropriata delle provette dopo la decantazione, può determinare una replicazione inadeguata e valori non attendibili.

VIII. PROCEDURA DEL TEST

A. Materiali forniti:

Materiali forniti nel kit DSL IGFBP-2 RIA, n. di catalogo DSL-7100

MATERIALE	QUANTITÀ	N. di CATALOGO
Standard IGFBP-2 A	Un flacone	7101
Standard IGFBP-2 B	Un flacone	7102
Standard IGFBP-2 C	Un flacone	7103
Standard IGFBP-2 D	Un flacone	7104
Standard IGFBP-2 E	Un flacone	7105
Standard IGFBP-2 F	Un flacone	7106
Reagente IGFBP-2 [I-125]	Un flacone	7120
Antisiero anti-IGFBP-2	Un flacone	7110
Reagente precipitante	Un flacone	1230
Controllo IGFBP-2, Livello I	Un flacone	7151
Controllo IGFBP-2, Livello II	Un flacone	7152

B. Materiali necessari ma non forniti:

- Provette in polipropilene da 12 x 75 mm
- Portaprovette per provette da 12 X 75 mm
- Pipetta di precisione in grado di erogare 200 μL
- Pipetta a ripetizione in grado di erogare 100 μL e 1,0 mL
- Vortex
- Centrifuga (1500 x g, preferibilmente refrigerata)
- Rack o dispositivo simile per la decantazione
- Acqua deionizzata
- Materiale assorbente per tamponare le provette
- Contatore gamma
- Carta semilogaritmica (log-lineare) oppure software adatto all'analisi dei dati del dosaggio radioimmunologico

C. Procedura del test:

Prima dell'uso, attendere che tutti i reagenti si portino a temperatura ambiente (~25°C) e mescolarli con cura. Analizzare standard, controlli e campioni sconosciuti in duplicato.

1. I campioni di siero umano devono essere diluiti 1:50 con il diluente per campione IGFBP-2 prima del test. Esempio: 10 μL di siero + 500 μL di diluente per campione IGFBP-2)
   Nota: non diluire gli standard e i controlli prima del test e non moltiplicare i risultati degli standard e dei controlli per il fattore di diluizione del campione.
2. Etichettare e disporre in duplicato le provette per conte totali, NSB, standard, controlli e campioni sconosciuti.
3. Pipettare 200 μL di standard, controlli o campioni sconosciuti nelle provette appropriate. Nelle provette NSB, versare 300 μL dello standard IGFBP-2 0 ng/mL.
4. Versare immediatamente 100 μL di antisiero anti-IGFBP-2 in ciascuna provetta, eccetto quelle per NSB e conte totali.
5. Vortexare delicatamente per 1-2 secondi e incubare a temperatura ambiente (~25°C) per 4 ore.
6. Versare 100 μL di reagente IGFBP-2 [I-125] in tutte le provette.
7. Vortexare delicatamente per 1-2 secondi.
8. Incubare tutte le provette per 16-20 ore a 2-8°C.
9. Versare 1,0 mL di reagente precipitante in tutte le provette, eccetto quelle per le conte totali e vortexare immediatamente tutte le provette. Agitare con cura il reagente precipitante prima dell'uso.
10. Incubare tutte le provette a temperatura ambiente (~25°C) per 30 minuti.
11. Centrifugare tutte le provette, eccetto quelle per le conte totali, per 30 minuti a 1500 x g (circa 3000 rpm).
12. Fare decantare tutte le provette, eccetto quelle per le conte totali, capovolgendo contemporaneamente il rack di decantazione in un recipiente per rifiuti radioattivi. Lasciarle svuotare su materiale assorbente per 15-30 secondi e tamponarle delicatamente per rimuovere eventuali gocce adese al bordo, prima di riportarle in posizione verticale. La mancanza di una asciugatura appropriata delle provette, può determinare una replicazione inadeguata e valori non attendibili.
13. Eseguire la conta di tutte le provette, in un contatore gamma, per un minuto.

IX. RISULTATI

I risultati presentati in questo foglietto illustrativo sono stati calcolati eseguendo un fit log-lineare della curva. Altri metodi di riduzione dei dati possono fornire risultati leggermente diversi.

For Illustrative Purposes Only

A. Calcolare le conte medie per minuto (CPM) per ogni standard, controllo e campione sconosciuto. Sottrarre la CPM media delle provette NSB da tutte le conte per ottenere le conte corrette. Calcolare i valori B/T% o B/Bo% per ogni standard, controllo e campione sconosciuto nel modo seguente:

$$\% \text{ B/T} = \frac{\text{Media conte campione - Conte NSB}}{\text{Media conte totali}} \times 100$$

$$\text{B/Bo} \% = \frac{\text{Media conte campione - Conte NSB}}{\text{Media conte di standard 0 ng/mL - Conte NSB}} \times 100$$

B. Tracciare una curva di B/T % o B/Bo % per gli standard IGFBP-2 (asse Y) rispetto alla concentrazione di IGFBP-2 (asse X) sulla carta log-lineare (semilogaritmica). Tracciare una curva standard attraverso la media dei punti duplicati.

C. Determinare la concentrazione di IGFBP-2 delle medie delle conte dei duplicati di ogni controllo e campione sconosciuto dalla curva standard.

D. Ogni campione con letture più elevate dello standard massimo deve essere adeguatamente diluito con lo standard IGFBP-2 0 ng/mL e rianalizzato.

E. Ogni campione con letture più basse dello standard minimo deve essere riportato come tale.

F. Per i campioni sconosciuti, moltiplicare i valori ottenuti dalla curva standard per il fattore di diluizione approssimativo allo scopo di ottenere il valore IGFBP-2. Esempio: i campioni diluiti 1:50 devono essere moltiplicati per 51). Non moltiplicare i risultati del controllo per il fattore di diluizione del campione.

X. LIMITAZIONI

- I reagenti forniti in questo kit sono ottimizzati per la misurazione dei livelli di IGFBP-2 nel siero.
- Evitare cicli ripetuti di congelamento e scongelamento dei reagenti o dei campioni.
- Non usare campioni emolizzati e lipemici in quanto possono dare valori falsi.
- Usare i risultati di questo dosaggio insieme ad altre informazioni cliniche pertinenti.

XI. CONTROLLO DI QUALITÀ

- I controlli DSL o altri controlli in commercio devono rientrare nei limiti di confidenza stabiliti. I limiti di confidenza per i controlli DSL sono stampati sulle etichette dei rispettivi flaconi.
- In ogni test devono essere inclusi controlli di alto e basso livello.

DATI TIPICI DELLA CURVA STANDARD IGFBP-2 RIA

N. PROVETTA	ETICHETTA PROVETTA	SOSTANZA LEGATA (cpm)	MEDIA (cpm)	B/T (%)	B/Bo (%)	IGFBP-2 (ng/mL)
1, 2	CONTE TOTALI	30761 33515	32138			
3, 4	NSB	1187 1286	1236	3,8		
	STANDARD					
5, 6	A	13820 13970	13895	43,2	----	0,0
7, 8	B	12809 12926	12868	40,0	92,6	2,0
9, 10	C	10695 10695	10695	33,3	77,0	5,0
11, 12	D	7813 8039	7926	24,7	57,0	14,0
13, 14	E	4516 4539	4528	14,1	32,6	32,0
15, 16	F	1673 1681	1677	5,2	12,1	100,0
	CONTROLLI					
17, 18	Livello I	7471 7667	7569	23,6	54,5	15,3
19, 20	Livello II	5602 5904	5753	17,9	41,4	23,8

ED_{50} = 17,8 ng/mL

ATTENZIONE: i dati sopra riportati non devono essere impiegati al posto di quelli ottenuti in laboratorio dall'utente.

XII. PERFORMANCE DEL TEST

Tutti i dati di performance del test sono espressi in ng/mL. Per la conversione in nmol/L:

ng/mL x 0,032 = nmol/L

A. Sensibilità:

La sensibilità teorica, o limite di rilevazione minimo, calcolata dall'interpolazione della media meno due deviazioni standard di 20 replicati dello standard IGFBP-2 0 ng/mL, è 0,5 ng/mL.

For Illustrative Purposes Only

B. Precisione:

La precisione intra-test è stata determinata dalla media di 12 replicati ciascuno.

CAMPIONE	n.	MEDIA (ng/mL)	DEVIAZIONE STANDARD (ng/mL)	COEFFICIENTE DI VARIAZIONE (%)
I	12	13,0	1,1	8,5
II	12	32,2	2,0	6,2
III	12	94,4	4,4	4,7

La precisione inter-test è stata determinata dalla media dei duplicati medi per 5 sessioni di analisi separate.

CAMPIONE	n.	MEDIA (ng/mL)	DEVIAZIONE STANDARD (ng/mL)	COEFFICIENTE DI VARIAZIONE (%)
I	5	2,7	0,2	7,4
II	5	13,2	0,6	4,5
III	5	69,7	5,0	7,2

C. Recupero:

Tre campioni di siero contenenti livelli diversi di IGFBP-2 endogena sono stati addizionati di quantità conosciute di rhIGFBP-2 e analizzati.

CAMPIONE	ENDOGENO (ng/mL)	AGGIUNTO (ng/mL)	ATTESO (ng/mL)	OSSERVATO (ng/mL)	RECUPERO (%)
I	4,45	0,52	4,97	5,11	103
		2,98	7,43	8,30	112
		8,90	13,35	14,94	112
II	30,47	0,52	30,99	30,73	99
		2,98	33,98	33,72	99
		8,90	39,37	44,19	112
III	68,37	0,52	68,89	78,20	114
		2,98	71,35	71,58	100
		8,90	77,27	83,48	108

D. Linearità di diluizione

Tre campioni di siero sono stati diluiti con lo standard di IGFBP-2 0 ng/mL e analizzati.

CAMPIONE	FATTORE DI DILUIZIONE	ATTESO (ng/mL)	OSSERVATO (ng/mL)	RECUPERO (%)
I	---	---	71,67	---
	1:2	35,84	34,89	97
	1:4	17,92	15,13	84
	1:8	8,96	7,23	81
	1:16	4,48	3,52	79
II	---	---	71,91	---
	1:2	35,96	39,19	109
	1:4	17,98	18,79	105
	1:8	8,99	8,78	98
	1:16	4,49	3,63	81
III	---	---	94,91	---
	1:2	47,46	48,91	103
	1:4	23,73	24,40	103
	1:8	11,86	11,26	95
	1:16	5,93	4,80	81

E. Specificità

La reattività crociata dell'anticorpo anti-IGFBP-2 è stata misurata a fronte di vari composti con il kit DSL-7100 IGFBP-2 RIA.

La percentuale di reattività crociata è espressa come rapporto tra concentrazione di IGFBP-2 e concentrazione del composto reagente a un legame del 50% dello standard IGFBP-2 0 ng/mL.

COMPOSTO	REATTIVITÀ CROCIATA %
IGFBP-2	100
IGFBP-3 GLICOSYLATA	ND
IGFBP-3 NON-GLICOSILATA	ND
IGFBP-4	ND
IGFBP-5	ND
IGFBP-6	ND

ND = non rilevabile a 0,5 μg/provetta

Le seguenti sostanze non hanno interferito nel kit IGFBP-2 RIA: rhGH (1 μg/provetta), IGF-I (1 μg/provetta) e IGF-II (1 μg/provetta).

For Illustrative Purposes Only

F. Comparazione di sieri animali inter-specie

SIERI REATTIVI	SIERI NON REATTIVI
Asino Capra Cavia Ratto Vitello Cavallo Maiale Pecora Topo	Coniglio

For Illustrative Purposes Only

I. USO PREVISTO DEL EQUIPO

El equipo de radioinmunoensayo (RIA) DSL-7100 IGFBP-2 RIA proporciona los materiales necesarios para la determinación cuantitativa de IGFBP-2 en suero. Este ensayo está concebido para uso diagnóstico *in vitro*.

II. RESUMEN Y EXPLICACION DE LA PRUEBA

Los factores de crecimiento similares a la insulina, IGF-I e IGF-II, son péptidos de potente capacidad mitógena y anabólica con una estructura homóloga a la de la insulina [1]. Los IGF se producen en numerosos tejidos del organismo, bajo el control de la hormona del crecimiento y otros factores de regulación, y actúan como reguladores autocrinos, paracrinos y endocrinos de la mitogénesis y el metabolismo. En el suero y otros fluidos biológicos, los IGF forman complejos con proteínas transportadores específicas y estructuralmente homólogas (IGFBP) [2,3]. Se han identificado seis IGFBP en seres humanos [4], que se numeran de acuerdo con el orden en el que se realizó su caracterización molecular [4]. La IGFBP-2 humana es un péptido de 289 aminoácidos, con un péptido señal de 39 residuos, 18 residuos de cisteína y una masa molecular pronosticada de 31,3 kDa [5]. El gen de la IGFBP-2 humana se ha localizado en la región q31-q34 del cromosoma 2 [6]. Se ha estimado que la afinidad de unión de la IGFBP-2 por el IGF-II es significativamente mayor que por el IGF-I [3],lo que sugiere que desempeña un papel en la regulación de las acciones del IGF-II. Estudios realizados con fetos de oveja indican que la IGFBP-2 se produce en numerosos tejidos, de una forma que parece coincidir con la expresión de IGF-II [7]. En estudios recientes sobre concentraciones séricas de IGFBP-2 se ha observado que, a diferencia de la IGFBP-1, la variabilidad a lo largo del día es insignificante [3] y que, a diferencia de la IGFBP-1 y la IGFBP-3, no se produce virtualmente ningún cambio durante la pubertad [8]. Se ha identificado la presencia de IGFBP-2 también en otros fluidos corporales como el líquido cefalorraquídeo [9],el líquido amniótico, los fluidos celómicos [10],la orina [11] y el líquido seminal [12].

III. PRINCIPIO DE LA PRUEBA

El procedimiento sigue el principio básico del radioinmunoensayo, que consiste en la competición entre un antígeno radiactivo y otro no radiactivo por un número fijo de lugares de unión a anticuerpos [13]. La cantidad de IGFBP-2 marcada con I-125 que se une al anticuerpo es inversamente proporcional a la concentración de IGFBP-2 no marcada presente. La separación del antígeno libre y el unido a anticuerpos se realiza mediante un sistema de dos anticuerpos.

IV. REACTIVOS

El equipo DSL-7100 IGFBP-2 RIA contiene reactivo suficiente para 100 tubos. Cada equipo contiene los siguientes reactivos:

A. Estándar de IGFBP-2 A / diluyente de muestras:

Un frasco de 55 mL, etiquetado con la letra A, que contiene 0 ng/mL de IGFBP-2 en un tampón constituido por proteínas con azida sódica como agente conservante. Consérvelo a 2-8°C hasta la fecha de caducidad.

B. Estándares de IGFBP-2: (liofilizados)

Cinco viales, etiquetados con las letras B-F, que contienen concentraciones de aproximadamente 2,5, 5,0, 15,0, 50,0 y 100,0 ng/mL de IGFBP-2 en un tampón constituido por proteínas con azida sódica como agente conservante. Consulte las etiquetas de los viales para conocer las concentraciones exactas. Consérvelos sin abrir a 2-8°C hasta la fecha de caducidad. Reconstituya cada vial con 1,0 mL de agua desionizada. Tras la reconstitución, consérvelos a una temperatura igual o inferior a -20°C durante un máximo de dos semanas. Deséchelos una vez usados.

NOTA CON RESPECTO A LA ESTANDARIZACIÓN: Para la fabricación de los estándares y controles de IGFBP-2 mediante dilución seriada se utilizó IGFBP-2 extraída y purificada a partir de materiales de origen humano. Debido a la falta de una preparación de referencia universalmente aceptada, los estándares y controles de IGFBP-2 de DSL se calibraron con respecto a los estándares de referencia internos de DSL y su rendimiento se verificó mediante inmunoensayo.

C. IGFBP-2 marcada con I-125: (liofilizada) (ROJO)

Un frasco que contiene < 5 μCi (185kBq) de IGFBP-2 marcada con I-125 en un tampón constituido por proteínas, con azida sódica como agente conservante. Consérvelo sin abrir a 2-8°C hasta la fecha de caducidad. Consulte la etiqueta del vial para conocer la concentración exacta. Reconstitúyalo con 11 mL de agua desionizada. Tras la reconstitución, consérvelo a -20°C durante un máximo de tres días. Deséchelo una vez usado.

D. Antisuero frente a IGFBP-2: (liofilizado) (AZUL)

Un vial que contiene antisuero policlonal de conejo frente a IGFBP-2 en un tampón constituido por proteínas, con azida sódica como agente conservante. Consérvelo sin abrir a 2-8°C hasta la fecha de caducidad. Reconstitúyalo con 10 mL de agua desionizada. Tras la reconstitución, consérvelo a 2-8°C durante un máximo de dos semanas. Deséchelo una vez usado.

E. Reactivo para la precipitación:

Un frasco de 100 mL que contiene suero con gammaglobulina policlonal de cabra frente a conejo en un tampón con polietilenglicol como agente precipitante y azida sódica como agente conservante. Consérvelo a 2-8°C hasta la fecha de caducidad.

For Illustrative Purposes Only

F. Controles de IGFBP-2: (liofilizados)
Dos viales, correspondientes a los niveles I y II, que contienen concentraciones bajas y altas de IGFBP-2 en un tampón constituido por proteínas, con azida sódica como agente conservante. Consérvelos sin abrir a 2-8°C hasta la fecha de caducidad. Reconstituya cada vial con 1,0 mL de agua desionizada. Consulte las etiquetas de los viales para conocer las concentraciones exactas. Tras la reconstitución, consérvelos a una temperatura igual o inferior a -20°C durante un máximo de dos semanas. Deséchelos una vez usados.
NOTA: antes de su empleo, se debe permitir que todos los reactivos y muestras alcancen la temperatura ambiente (~25°C) y mezclarlos completamente mediante inversión suave.

V. PRECAUCIONES

Sólo para uso *in vitro*
No indicado para su uso externo o interno en seres humanos ni animales
PRECAUCIÓN: MATERIAL RADIACTIVO
Consulte la reglamentación, normas y procedimientos acerca de radiación que sean pertinentes para su centro en lo que se refiere a la manipulación, conservación y desecho de materiales radiactivos. Para clientes de Estados Unidos: este material radiactivo sólo puede ser recibido, adquirido, utilizado y estar en posesión de médicos, veterinarios, laboratorios clínicos, centros de investigación u hospitales y únicamente para pruebas clínicas o de laboratorio in vitro que no conlleven la administración interna o externa del material o la irradiación del mismo a seres humanos ni animales. Su recepción, adquisición, posesión, utilización y transporte están sujetas a la reglamentación del NRC o del estado en que se haya efectuado el acuerdo de licencia. Para minimizar el riesgo de exposición a la radiación, manipule los materiales radiactivos tal como recomiendan las normas reglamentarias pertinentes y como se indica en las guías "Occupational Radiation Protection Safety Guide, Safety Standards Series No. RS-G-1.1," (Guías de seguridad para la protección frente a la radiación ocupacional, Serie de Pautas de Seguridad Nº RS-G-1.1)1999, publicadas por la International Atomic Energy Agency (Agencia Internacional de Energía Atómica).
Deben seguirse las Buenas Prácticas de Laboratorio universales que figuran a continuación:

- No ingiera alimentos, beba, fume ni aplique cosméticos en los lugares donde se manipulen materiales de inmunodiagnóstico.
- No pipetee con la boca.
- Use batas de laboratorio y guantes desechables cuando manipule materiales de inmunodiagnóstico.
- Lávese cuidadosamente las manos al terminar.
- Cubra la zona de trabajo con papel absorbente desechable.
- Limpie inmediatamente todo vertido de material y descontamine las superficies afectadas.
- Evite la formación de aerosoles.
- Facilite una ventilación adecuada.
- Manipule y deseche todos los reactivos y materiales de acuerdo con la reglamentación pertinente.

ADVERTENCIA: MATERIAL POTENCIALMENTE BIOPELIGROSO
Este equipo puede contener reactivos preparados a partir de materia de origen humano (como suero o plasma) o puede ser utilizado con materia de origen humano. El material empleado en este equipo ha sido analizado con métodos aprobados por la FDA y no ha presentado positividad para anticuerpos frente a VIH (tipos 1 y 2), VHC y Ag de superficie del VHB. Ninguno de los métodos analíticos disponibles puede garantizar por completo la eliminación de posibles riesgos biológicos. Manipule todos los reactivos y muestras de pacientes acatando las normas de bioseguridad de nivel 2, tal como se recomienda para toda muestra de sangre o suero humanos potencialmente infecciosos en el Manual « Biosafety in Microbiological and Biomedical Laboratories » (Bioseguridad en laboratorios médicos y microbiológicos), 4ª edición, abril de 1999.
ADVERTENCIA: POSIBLE PELIGRO QUÍMICO
Algunos de los reactivos del equipo contienen azida sódica como conservante a concentraciones por debajo del límite reglamentario: < 0.1%. Aunque se encuentra significativamente diluida, la azida sódica concentrada es una sustancia irritante para la piel y las membranas mucosas y puede reaccionar con el plomo y el cobre de las cañerías para formar azidas metálicas explosivas, especialmente si se acumula. Esta sustancia está diluida y, por tanto, los riesgos de exposición pueden estar significativamente disminuidos, pero no ausentes por completo. Evite el contacto con piel, ojos y ropa. En caso de contacto con cualquiera de los reactivos, lave la zona afectada con agua abundante y consulte a un médico. Deseche todos los reactivos no radiactivos que no sean peligrosos por el sistema de desagüe, diluyéndolos con grandes cantidades de agua para prevenir la acumulación de sustancias químicamente peligrosas en el sistema de tuberías. Si desea obtener más información acerca de las sustancias peligrosas presentes en el equipo, consulte la hoja de datos sobre seguridad del componente en particular, bien en el sitio web www.DSLabs.com o mediante solicitud a DSL.

VI. RECOGIDA Y PREPARACIÓN DE MUESTRAS

Se debe emplear suero, y deben seguirse todas las precauciones habituales para la realización de punciones venosas. Las muestras pueden conservarse a 2-8°C durante un máximo de 24 horas y congelarse a una temperatura igual o inferior a -20°C para periodos de tiempo más prolongados. Evite la congelación y descongelación repetida de las muestras. Las muestras que se hayan diluido para el ensayo se pueden conservar a 2-8°C durante un máximo de 24 horas o a -20°C durante un máximo de cuatro semanas [14]. No utilice muestras muy hemolizadas o lipémicas. Las muestras habituales de suero deben diluirse en una proporción 1:50 con el diluyente de muestras de IGFBP-2 (estándar A de 0 ng/mL) antes del ensayo.

For Illustrative Purposes Only

VII. NOTAS ACERCA DEL PROCEDIMIENTO

Es necesaria una total comprensión de lo explicado en este folleto para que la utilización del producto sea satisfactoria. Sólo se obtendrán resultados fiables si se emplean técnicas de laboratorio precisas y si se siguen con exactitud las indicaciones del folleto incluido en el envase. Se debe incluir una curva estándar con cada ensayo. No mezcle varios lotes de ningún componente del equipo en el seno de un mismo ensayo. No utilice ningún componente después de la fecha de caducidad indicada en su etiqueta. Una vez extraídos los reactivos del ensayo del refrigerador, permita que alcancen la temperatura ambiente (~25°C) antes de pipetear. Los reactivos que no hayan sido utilizados deben conservarse tal y como se indica en la sección "Reactivos". Los estándares y controles deben mezclarse antes de su uso, para lo cual es mejor invertirlos o removerlos ligeramente que emplear un vórtex. Para garantizar una mezcla homogénea de los reactivos en cada tubo de ensayo, es esencial agitarlos suave y uniformemente o mezclarlos con un vórtex. No obtener valores apropiados para los controles puede indicar que la manipulación ha sido imprecisa, que la muestra no se ha manejado de forma adecuada o que los reactivos se han deteriorado. La ausencia de un secado adecuado de los tubos tras la decantación puede tener como consecuencia una replicación deficiente y la obtención de valores falsos.

VIII. PROCEDIMIENTO PARA REALIZAR EL ENSAYO

A. Materiales suministrados:

Materiales suministrados con el equipo DSL IGFBP-2 RIA , referencia DSL-7100

MATERIAL	CANTIDAD	REFERENCIA
Estándar de IGFBP-2 A	Un frasco	7101
Estándar de IGFBP-2 B	Un vial	7102
Estándar de IGFBP-2 C	Un vial	7103
Estándar de IGFBP-2 D	Un vial	7104
Estándar de IGFBP-2 E	Un vial	7105
Estándar de IGFBP-2 F	Un vial	7106
IGFBP-2 marcada con I-125	Un frasco	7120
Antisuero frente a IGFBP-2	Un vial	7110
Reactivo para la precipitación	Un frasco	1230
Control de IGFBP-2, nivel I	Un vial	7151
Control de IGFBP-2, nivel II	Un vial	7152

B. Materiales necesarios pero no suministrados con el equipo:

- Tubos de ensayo de polipropileno de 12 x 75 mm
- Gradilla para tubos de ensayo de 12 x 75 mm
- Pipeta de precisión para la administración de 200 µL
- Pipeta de repetición para la administración de 100 µL y 1,0 mL
- Agitador vórtex
- Centrífuga (1500 x g, preferiblemente refrigerada)
- Gradilla de esponja o un dispositivo para decantación similar
- Agua desionizada
- Material absorbente para secado de los tubos
- Contador gamma
- Papel gráfico semilogarítmico (logarítmico – lineal) o programa informático de análisis de datos de RIA

C. Procedimiento de realización del ensayo:

Permita que todos los reactivos alcancen la temperatura ambiente (~25°C) y mézclelos completamente antes de su uso. Someta a ensayo por duplicado los estándares, controles y muestras problema.

1. Las muestras de suero humano deben diluirse en una proporción 1:50 con el diluyente de muestras de IGFBP-2 antes del ensayo. (Ejemplo: 10 µL de suero + 500 µL de diluyente de muestras de IGFBP-2) *NOTA: no se deben diluir los estándares y controles antes del ensayo, y los resultados de ambos no se deben multiplicar por el factor de dilución de la muestra.*
2. Etiquete y disponga los tubos por duplicado para cuentas totales, unión inespecífica, estándares, controles y muestras problema.
3. Pipetee 200 µL de los estándares, controles o muestras problema en los tubos correspondientes. Añada 300 µL de estándar de IGFBP-2 de 0 ng/mL a los tubos para unión inespecífica.
4. Añada inmediatamente 100 µL de antisuero frente a IGFBP-2 a cada tubo, excepto a los tubos para unión inespecífica y para cuentas totales.
5. Agite suavemente con el vórtex durante 1-2 segundos e incube a temperatura ambiente (~25°C) durante cuatro horas.
6. Añada 100 µL de IGFBP-2 marcada con I-125 a todos los tubos.
7. Agite suavemente con el vórtex durante 1-2 segundos.
8. Incube todos los tubos a 2-8°C durante 16-20 horas.
9. Añada 1,0 mL del reactivo para la precipitación a todos los tubos excepto a los tubos para cuentas totales y agite todos los tubos con el vórtex inmediatamente. Debe agitarse enérgicamente este reactivo antes de su uso en el ensayo.
10. Incube todos los tubos a temperatura ambiente (~25°C) durante 30 minutos.
11. Centrifugue todos los tubos, excepto los tubos para cuentas totales, durante 30 minutos a 1500 x g (aproximadamente 3000 rpm).

For Illustrative Purposes Only

12. Decante todos los tubos, excepto los tubos para cuentas totales, mediante inversión simultánea con una gradilla de esponja sobre un recipiente para residuos radiactivos. Deje que drenen sobre un material absorbente durante 15-30 segundos y toque suavemente con papel secante los tubos para eliminar toda gota que pueda estar adherida al borde antes de volver a colocarlos en posición vertical. La ausencia de un secado adecuado de los tubos puede tener como consecuencia una replicación deficiente y la obtención de valores falsos.
13. Introduzca todos los tubos en un contador gamma durante un minuto.

IX. RESULTADOS

Los resultados indicados en este folleto fueron calculados utilizando una curva de ajuste logarítmico - lineal. La utilización de otros métodos de reducción de datos puede dar lugar a resultados ligeramente diferentes.

A. Calcule la media de las cuentas por minuto (cpm) para cada estándar, control y muestra problema. Reste la media de las cpm de los tubos de unión inespecífica de todas las cuentas para obtener las cuentas corregidas. Calcule el porcentaje B/T o el porcentaje B/Bo para cada estándar, control y muestra problema, tal como se indica a continuación:

$$\% \text{ B/T} = \frac{\text{Media de cuentas de la muestra – cuentas de unión inespecífica}}{\text{Media de las cuentas totales}} \times 100$$

$$\% \text{ B/Bo} = \frac{\text{Media de cuentas de la muestra – cuentas de unión inespecífica}}{\text{Media de las cuentas para el estándar de 0 ng/mL - cuentas de unión inespecífica}} \times 100$$

B. Construya una curva con el % B/T o el % B/Bo de los estándares de IGFBP-2 (eje y) frente a la concentración de IGFBP-2 (eje x) en papel gráfico logarítmico - lineal (semilogarítmico). Trace una línea estándar a través de los valores medios de los duplicados.
C. Determine la concentración de IGFBP-2, mediante la media de las cuentas de los duplicados de cada control y muestra problema, a partir de la curva estándar.
D. Toda muestra cuyo resultado sea mayor que el estándar más alto debe diluirse apropiadamente con el estándar de IGFBP-2 de 0 ng/mL y someterse de nuevo a ensayo.
E. Toda muestra con un resultado menor que el estándar más bajo debe ser informada como tal.
F. En el caso de las muestras problema, los resultados obtenidos a partir de la curva estándar deben multiplicarse por el factor de dilución aproximado para obtener el valor de IGFBP-2 final. (Ejemplo: El resultado de muestras diluidas en una proporción 1:50 debe multiplicarse por 51). Los resultados de los controles no se deben multiplicar por el factor de dilución de la muestra.

X. LIMITACIONES

- Los reactivos suministrados con este equipo están optimizados para la medición de las concentraciones de IGFBP-2 en suero.
- Evite congelar y descongelar repetidamente los reactivos y las muestras.
- Las muestras hemolizadas y lipémicas pueden dar lugar a falsos resultados y, por tanto, no deben usarse en el ensayo.
- Los resultados de este ensayo se deben utilizar en combinación con el resto de la información clínica pertinente.

XI. CONTROLES DE CALIDAD

- Los controles de DSL o cualquier otro control disponible en el mercado deben presentar resultados comprendidos dentro de los límites de confianza establecidos. Los límites de confianza para los controles de DSL aparecen impresos en las etiquetas de los viales correspondientes.
- Se deben procesar con el equipo controles con niveles altos y bajos en todos los ensayos.

For Illustrative Purposes Only

DATOS TÍPICOS DE LA CURVA ESTÁNDAR DEL EQUIPO IGFBP-2 RIA

Nº DEL TUBO	ETIQUETA DEL TUBO	UNIÓN (cpm)	MEDIA (cpm)	B/T (%)	B/Bo (%)	IGFBP-2 (ng/mL)
1, 2	CUENTAS TOTALES	30761 33515	32138			
3, 4	UNIÓN INESPECÍFICA	1187 1286	1236	3,8		
	ESTÁNDARES					
5, 6	A	13820 13970	13895	43,2	----	0,0
7, 8	B	12809 12926	12868	40,0	92,6	2,0
9, 10	C	10695 10695	10695	33,3	77,0	5,0
11, 12	D	7813 8039	7926	24,7	57,0	14,0
13, 14	E	4516 4539	4528	14,1	32,6	32,0
15, 16	F	1673 1681	1677	5,2	12,1	100,0
	CONTROLES					
17, 18	Nivel I	7471 7667	7569	23,6	54,5	15,3
19, 20	Nivel II	5602 5904	5753	17,9	41,4	23,8

ED_{50} = 17,8 ng/mL

PRECAUCIÓN: los datos que figuran en esta tabla no deben ser utilizados en lugar de los datos obtenidos por el usuario en el laboratorio.

XII. CARACTERÍSTICAS DEL ENSAYO

Todas las características del ensayo están expresadas en ng/mL. Para su conversión a nmol/L:

ng/mL x 0,032 = nmol/L

A. Sensibilidad:

La sensibilidad teórica, o límite mínimo de detección, calculada mediante la interpolación de la media menos dos desviaciones estándar de 20 replicados del estándar de IGFBP-2 de 0 ng/mL, es 0,5 ng/mL.

B. Precisión:

La precisión intraensayo se determinó a partir de la media de doce replicados de cada muestra.

MUESTRA	N	MEDIA (ng/mL)	DESVIACIÓN ESTÁNDAR (ng/mL)	COEFICIENTE DE VARIACIÓN (%)
I	12	13,0	1,1	8,5
II	12	32,2	2,0	6,2
III	12	94,4	4,4	4,7

La precisión interensayo se determinó a partir de la media del promedio de los duplicados en cinco series independientes.

MUESTRA	N	MEDIA (ng/mL)	DESVIACIÓN ESTÁNDAR (ng/mL)	COEFICIENTE DE VARIACIÓN (%)
I	5	2,7	0,2	7,4
II	5	13,2	0,6	4,5
III	5	69,7	5,0	7,2

C. Recuperación:

Se añadieron cantidades conocidas de IGFBP-2 a tres muestras de suero con concentraciones distintas de rhIGFBP-2 endógena que, a continuación, se sometieron a ensayo.

MUESTRA	ENDÓGENA (ng/mL)	AÑADIDA (ng/mL)	ESPERADA (ng/mL)	OBSERVADA (ng/mL)	RECUPERACIÓN (%)
I	4,45	0,52	4,97	5,11	103
		2,98	7,43	8,30	112
		8,90	13,35	14,94	112
II	30,47	0,52	30,99	30,73	99
		2,98	33,98	33,72	99
		8,90	39,37	44,19	112
III	68,37	0,52	68,89	78,20	114
		2,98	71,35	71,58	100
		8,90	77,27	83,48	108

For Illustrative Purposes Only

D. Linealidad de la dilución:

Se diluyeron tres muestras de suero con el estándar de IGFBP-2 de 0 ng/mL y, a continuación, se sometieron a ensayo.

MUESTRA	FACTOR DE DILUCIÓN	ESPERADA (ng/mL)	OBSERVADA (ng/mL)	RECUPERACIÓN (%)
I	---	---	71,67	---
	1:2	35,84	34,89	97
	1:4	17,92	15,13	84
	1:8	8,96	7,23	81
	1:16	4,48	3,52	79
II	---	---	71,91	---
	1:2	35,96	39,19	109
	1:4	17,98	18,79	105
	1:8	8,99	8,78	98
	1:16	4,49	3,63	81
III	---	---	94,91	---
	1:2	47,46	48,91	103
	1:4	23,73	24,40	103
	1:8	11,86	11,26	95
	1:16	5,93	4,80	81

E. Especificidad:

La reactividad cruzada de los anticuerpos frente a IGFBP-2 ha sido medida con respecto a varios compuestos con el equipo DSL-7100 IGFBP-2 RIA.

El porcentaje de reactividad cruzada se expresa como el cociente de la concentración de IGFBP-2 entre la concentración del compuesto que presenta reactividad cuando la proporción de unión del estándar de IGFBP-2 de 0 ng/mL es del 50%.

COMPUESTO	% DE REACTIVIDAD CRUZADA
IGFBP-2	100
IGFBP-3 GLICOSILADA	ND
IGFBP-3 NO GLICOSILADA	ND
IGFBP-4	ND
IGFBP-5	ND
IGFBP-6	ND

ND = No detectable a 0,5 μg/tubo

Las siguientes sustancias no produjeron interferencias en el ensayo IGFBP-2 RIA: rhGH (1 μg/tubo), IGF-I (1 μg/tubo) e IGF-II (1 μg/tubo).

F. Comparaciones entre sueros de distintas especies animales:

SUEROS REACTIVOS	SUEROS NO REACTIVOS
Asno	Conejo
Cabra	
Cobaya	
Rata	
Ternero	
Caballo	
Cerdo	
Oveja	
Ratón	

For Illustrative Purposes Only

SYMBOL LEGEND

IVD In Vitro Diagnostic Device In Vitro Diagnostikum Matériel de diagnostic in vitro Dispositivo per uso diagnostico in vitro Dispositivo para diagnóstico in vitro	Manufacturer Hersteller Fabricant Fabbricante Fabricante	REF Reference Number Referenznummer Numéro de référence Numero di riferimento Número de referencia	CE European Conformity Europäische Übereinstimmung Conformité européenne Conformità europea Conformidad Europea
EXP Use By Verfallsdatum: Utiliser par Scade il Utilizar antes de	EC REP Authorized Representative Bevollmächtigter Représentant autorisé Rappresentante autorizzato Representante autorizado	LOT Batch Number Chargennummer Numéro de lot Numero di lotto Número de lote	Consult Instructions Gebrauchsanweisung zu Rate ziehen Se reporter aux instructions Consultare le istruzioni Consulte las instrucciones
2°c – 8°c Temperature Limitation Temperaturbegrenzung Limites de température Limiti di temperatura Limitación de temperatura	Caution Achtung Attention Attenzione Precaución	2°c – 30°c Temperature Limitation Temperaturbegrenzung Limites de température Limiti di temperatura Limitación de temperatura	SAMPLE DIL Sample Diluent Proben-Diluent Tampon de Diluant Diluente campione Diluyente de la Muestra
+1mL DIH$_2$O Reconstitute with Addition of 1mL of Deionized Water In 1 ml deionisiertem Wasser aufnehmen Reconstituer par ajout de 1 mL d'eau désionisée Ricostituire aggiungendo 1 mL di acqua deionizzata Reconstituir mediante adición de 1mL de agua desionizada		I-125 RGNT I-125 Tracer I-125- Tracer Marqueur I-125 Tracciante I-125 Marcador de I-125	Radioactive Material Radioaktives Material MATERIEL RADIOACTIF Materiale radioattivo Material radiactivo
+11mL DIH$_2$O Reconstitute with Addition of 11 mL of Deionized Water In 11 ml deionisiertem Wasser aufnehmen Reconstituer par ajout de 11 mL d'eau désionisée Ricostituire aggiungendo 11 mL di acqua deionizzata Reconstituir mediante adición de11 mL de agua desionizada		+10mL DIH$_2$O Reconstitute with Addition of 10 mL of Deionized Water In 10 ml deionisiertem Wasser aufnehmen Reconstituer par ajout de 10 mL d'eau désionisée Ricostituire aggiungendo 10 mL di acqua deionizzata Reconstituir mediante adición de 10 mL de agua desionizada	
GARG PPT RGNT Goat Anti-Rabbit IgG – Precipitating Reagent Ziegen-anti-Kaninchen-IgG - Präzipitationsreagenz IgG de chèvre anti-lapin - Réactif précipitant IgG di capra anti-coniglio Reagente precipitante Anticuerpos de cabra anti IgG de conejo-Reactivo para facilitar la precipitación			STD A-F Standard A-F Standard A-F Standard A-F Standard A-F Estándares A-F
CONTROL I-II Control I & II Kontrolle I & II Contrôle I & II Controllo I & II Control I & II	ANTISERUM Antiserum Antiserum Antisérum Antisiero Antisuero		

For Illustrative Purposes Only