

# Product information

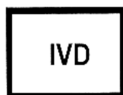
Information about other products is available at: [www.demeditec.com](http://www.demeditec.com)



## User's Manual

# hGH ELISA

Immunoenzymetric assay for the in vitro quantitative measurement of human Growth Hormone (hGH) in serum and plasma



DE3552



96 tests

## I. INTENDED USE

Immunoenzymetric assay for the in vitro quantitative measurement of human Growth Hormone (hGH) in serum and plasma.

## II. CLINICAL BACKGROUND

### A. Biological activities

hGH is a polypeptide hormone (molecular weight 21,500 Da) produced by the acidophil cells of the anterior pituitary under the control of two main substances from the median eminence: Growth-hormone Releasing Factor (GRF) and an inhibitory agent, somatostatin. Dopaminergic, adrenergic and serotonergic neuroendocrine pathways also play an important role in the control of hGH secretion. Excitatory stimuli of hGH secretion include hypoglycemia, exercise, fasting, meals with a high protein content, deep sleep, stress, glucagon, L Dopa, amino acids, etc. Inhibitory stimuli include glucose, cortisol, hGH and free fatty acids. Because of its short plasma half life ( $\pm 25$  minutes) and of the frequent excitatory or inhibitory stimuli, hGH displays frequent and large variations of concentration in serum.

One of the main physiological functions of hGH is to act on the liver and other tissues to produce somatomedins, which in turn induce growth by direct action on target tissues. In contrast to hGH, the concentration of somatomedins in serum is kept stable by virtue of being largely bound to circulating plasma proteins.

### B. Clinical application

#### • Growth retardation

hGH hyposecretion is one of the various causes of small stature in children. Serum hGH measurement with a highly sensitive assay, especially following a provocative stimulus (absence of response), is an important way to establish this diagnosis because this group of patients can be treated by administration of hGH.

#### • Hypopituitarism

Serum hGH measurement is also an index of pituitary function when hypopituitarism (either idiopathic or due to tumour and surgery) is suspected.

#### • Gigantism and acromegaly

Serum hGH measurement, especially following a provocative inhibitory test (absence of response), is an important way to establish the diagnosis of hGH hypersecretion due to acidophilic pituitary tumour. This results in gigantism in children and acromegaly in adults. Both of these disorders may be treated by surgery or radiation.

## III. PRINCIPLES OF THE METHOD

The Demeditec HGH-EASIA is a solid phase Enzyme Amplified Sensitivity Immunoassay performed on a microtiterplate. Calibrators and samples react with the capture monoclonal antibody (MAb 1) coated on microtiter well and with a monoclonal antibody (MAb 2) labelled with horseradish peroxidase (HRP). After an incubation period allowing the formation of a sandwich: coated MAb 1 – hGH – MAb 2 – HRP, the microtiterplate is washed to remove unbound enzyme labelled antibody. Bound enzyme-labelled antibody is measured through a chromogenic reaction. The Chromogenic Solution (TMB – H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>) is added and incubated. The reaction is stopped with the addition of Stop Solution and the microtiterplate is then read at the appropriate wavelength. The amount of substrate turnover is determined colourimetrically by measuring the absorbance, which is proportional to the hGH concentration.

A calibration curve is plotted and hGH concentration in samples is determined by interpolation from the calibration curve.

**IV. REAGENTS PROVIDED**

Reagents	96 tests Kit	Reconstitution
<b>SORB</b> <b>MT</b> Breakable microtiterplate with 96 anti hGH (monoclonal antibodies) coated wells	96 wells	<b>Ready to use</b>
<b>CONJ</b> <b>40x</b> Conjugate: HRP labelled anti-hGH (monoclonal antibodies) in stabilizing buffer	1 vial 0,2 ml	<b>Dilute 40x</b> with conjugate buffer
<b>CONJ</b> <b>BUF</b> Conjugate buffer: TRIS-HCl buffer with bovine serum albumin and thymol	1 vial 6 ml	<b>Ready to use</b>
<b>CAL</b> Zero calibrator in sheep serum and thymol	1 vial lyophilized	<b>Add 2.0 ml</b> distilled water
<b>CAL</b> Calibrator N = 1 to 5 (see exact values on QC datasheet) in sheep serum and thymol	5 vials lyophilized	<b>Add 1 ml</b> distilled water
<b>WASH</b> <b>SOLN</b> <b>200x</b> Wash Solution (Tris-HCl)	1 vial 10 ml	<b>Dilute 200x</b> with distilled water (use a magnetic stirrer).
<b>CONTROL</b> Controls - N = 1 or 2 in human serum with thymol	2 vials lyophilized	<b>Add 1 ml</b> distilled water
<b>SUB</b> <b>TMB</b> Chromogen TMB Solution (Tetramethylbenzidine)	1 vial 12 ml	<b>Ready to use</b>
<b>STOP</b> <b>SOLN</b> Stop Solution: HCl 1N	1 vial 12 ml	<b>Ready to use</b>

- Note:**
1. Use the zero calibrator for sample dilutions.
  2. 1 µU of the calibrator preparation is equivalent to 1 µU of the 2<sup>nd</sup> IS 98/574.

**V. SUPPLIES NOT PROVIDED**

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

1. High quality distilled water
2. Pipettes for delivery of: 50 µl, 200 µl, 500 µl and 2 ml (the use of accurate pipettes with disposable plastic tips is recommended)
3. Vortex mixer
4. Magnetic stirrer
5. Washer for microtiterplates
6. Microtiterplate reader capable of reading at 450 nm and 650 nm (bichromatic reading)

**VI. REAGENT PREPARATION**

- A. Calibrators:** Reconstitute the zero calibrator with 2.0 ml distilled water and the other calibrators with 1 ml distilled water.
- B. Controls:** Reconstitute the controls with 1 ml distilled water.
- C. Working anti-hGH-HRP conjugate:** Prepare an adequate volume of conjugate solution by adding 25 µl of the concentrated anti-hGH-HRP conjugate to 1 ml of conjugate buffer. Use a vortex to homogenize. Extemporaneous preparation is recommended.
- D. Working Wash Solution:** Prepare an adequate volume of Working Wash Solution by adding 199 volumes of distilled water to 1 volume of Wash Solution (200x). Use a magnetic stirrer to homogenize. Discard unused Working Wash Solution at the end of the day.

## VII. STORAGE AND EXPIRATION DATING OF REAGENTS

- Before opening or reconstitution, all kits components are stable until the expiry date, indicated on the vial label, if kept at 2 to 8 °C.
- Unused wells must be stored, at 2-8 °C, in a sealed bag containing a desiccant until expiration date.
- After reconstitution, calibrators and controls are stable for 1 week at 2 to 8 °C. For longer storage periods, aliquots should be made and kept at -20 °C. Avoid successive freeze thaw cycles.
- The concentrated Wash Solution is stable at room temperature until expiration date.
- Freshly prepared Working Wash Solution should be used on the same day.
- After its first use, the conjugate is stable until expiry date, if kept in the original well-closed vial at 2-8 °C.
- Alterations in physical appearance of kit reagents may indicate instability or deterioration.

## VIII. SPECIMEN COLLECTION AND PREPARATION

- Serum and plasma must be kept at 2-8 °C.
- If the test is not run within 24 hours, storage in aliquots at -20 °C is recommended. Avoid subsequent freeze thaw cycles.
- Prior to use, all samples should be at room temperature. It is recommended to vortex the samples before use.
- Serum, heparinized plasma or EDTA plasma provide similar results.  
$$Y(\text{serum}) = 0.89 \times (\text{EDTA plasma}) + 0.14 \mu\text{IU/ml} \quad r=0.98 \quad n=46$$
$$Y(\text{serum}) = 1.02 \times (\text{Heparin plasma}) + 0.01 \mu\text{IU/ml} \quad r=0.98 \quad n=46$$
- Do not use haemolysed samples.

## IX. PROCEDURE

### A. Handling notes

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

**B. Procedure**

1. Select the required number of wells for the run. The unused wells should be resealed in the bag with a desiccant and stored at 2-8 °C.
2. Secure the wells into the holding frame.
3. Pipette 50 µl of each Calibrator, Control and Sample into the appropriate wells.
4. Pipette 50 µl of working anti-hGH-HRP conjugate into all the wells.
5. Incubate for 30 minutes at room temperature – It is mandatory to respect the 30 minute-duration of this incubation
6. Aspirate the liquid from each well.
7. Wash the plate 3 times by:
  - Dispensing 0.4 ml of Wash Solution into each well
  - Aspirating the content of each well
8. Pipette 100 µl of the Chromogenic Solution into each well within 15 minutes following the washing step.
9. Incubate the microtiterplate for 30 minutes at room temperature, avoid direct sunlight.
10. Pipette 100 µl of Stop Solution into each well.
11. Read the absorbencies at 450 nm (reference filter 630 nm or 650 nm) within 1 hour and calculate the results as described in section X.

**X. CALCULATION OF RESULTS**

1. Read the plate at 450 nm against a reference filter set at 650 nm (or 630 nm).
2. Calculate the mean of duplicate determinations.
3. On semi-logarithmic or linear graph paper plot the OD values (ordinate) for each calibrator against the corresponding concentration of hGH (abscissa) and draw a calibration curve through the calibrator points by connecting the plotted points with straight lines.
4. Read the concentration for each control and sample by interpolation on the calibration curve.
5. Computer assisted data reduction will simplify these calculations. If automatic result processing is used, a 4-parameter logistic function curve fitting is recommended.

**XI. TYPICAL DATA**

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

hGH-EASIA		OD units
Calibrator	0.00 µIU/ml	0.030
	0.45 µIU/ml	0.062
	5.40 µIU/ml	0.226
	12.90 µIU/ml	0.501
	43.50 µIU/ml	1.429
	98.00 µIU/ml	2.330

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

Twenty zero calibrators were assayed along with a set of other calibrators. The detection limit, defined as the apparent concentration two standard deviations above the average OD at zero binding, was 0.17 µIU/ml.

**B. Specificity**

Cross-reactive hormones were added to a low and to a high hGH value Control sample. The apparent hGH response was measured.

added Hormone	hGH C1 µIU/ml	hGH C2 µIU/ml
-	1.9	13.5
CG 100000 mIU/ml	2.0	14.3
hPL 10000 ng/ml	1.4	13.0
PRL 12500 ng/ml	1.8	12.6

**C. Precision**

INTRA ASSAY				INTER ASSAY			
Serum	N	<X> ± SD ( $\mu$ U/ml)	CV (%)	Serum	N	<X> ± SD ( $\mu$ U/ml)	CV (%)
A	20	6.90 ± 0.34	4.9	A	8	11.4 ± 0.9	8.1
B	20	16.61 ± 0.90	5.4	B	8	23.5 ± 1.2	5.1

SD: Standard Deviation; CV: Coefficient of variation

**D. Accuracy**

RECOVERY TEST			
Sample	Added hGH ( $\mu$ U/ml)	Recovered hGH ( $\mu$ U/ml)	Recovery (%)
Serum	4.3	4.1	95
	13.5	12.8	95
	26.8	28.1	105
	52.1	58.9	113
Plasma	4.3	4.6	106
	13.5	13.2	98
	26.8	25.3	94
	52.1	53.0	102

DILUTION TEST			
Sample	Dilution	Theoretical Conc. ( $\mu$ U/ml)	Measured Conc. ( $\mu$ U/ml)
Serum 1	1/2	-	97.7
	1/4	48.8	57.0
	1/8	24.4	27.7
	1/16	12.2	13.6
	1/32	6.1	6.4
Serum 2	1/64	3.1	3.0
	1/1	-	21.2
	1/2	10.6	9.3
	1/4	5.3	4.6
	1/8	2.7	2.2
	1/16	1.3	1.1
	1/32	0.7	0.6

Samples were diluted with zero calibrator.

Conversion factor:1 $\mu$ U hGH-EASIA Calibrator = 0.33 ng**E. Time delay between last calibrator and sample dispensing**

As shown hereafter, assay results remain accurate even when a sample is dispensed 60 minutes after the calibrators have been added to the coated wells.

TIME DELAY						
	0 min	10 min	20 min	30 min	45 min	60 min
S1	4.0	3.6	3.3	3.3	3.0	3.8
S2	13.5	15.0	13.8	13.0	12.6	13.0

**F. Hook effect**A sample spiked with hGH up to 4000  $\mu$ U/ml gives higher OD's than the last calibrator point.

## XVIII. INTERNAL QUALITY CONTROL

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

## VII. REFERENCE INTERVALS

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

In normal subjects, growth hormone (hGH) secretion is pulsatile. During day-time, hGH concentrations range from <math>0.2-10 \mu\text{IU/ml}</math>. During sleep, hGH concentrations increase consistently ( $\pm 30 \mu\text{IU/ml}</math>). hGH secretion is greatly stimulated by exercise and stress (venous puncture, hypoglycemia, ...), but is decreased by hyperglycemia. In normal subjects (n=34), two hours after oral glucose load (75 g in adults), hGH levels were lower than 10  $\mu\text{IU/ml}$  and the hGH response to stimulation tests (insulin, arginine, glucagon administration) exceeded 20  $\mu\text{IU/ml}$ . hGH levels were elevated (even after glucose load) in acromegaly ( $> 10 \mu\text{IU/ml}$ ). In hGH deficiency, the response to stimulation test is absent or blunted (short stature by hGH deficiency; hypopituitarism from various origins).$

## XV. PRECAUTIONS AND WARNINGS

### Safety

For in vitro diagnostic use only.

The human blood components included in this kit have been tested by European approved and/or FDA approved methods and found negative for HBsAg, anti-HCV, anti-HIV-1 and 2. No known method can offer complete assurance that human blood derivatives will not transmit hepatitis, AIDS or other infections. Therefore, handling of reagents, serum or plasma specimens should be in accordance with local safety procedures.

All animal products and derivatives have been collected from healthy animals. Bovine components originate from countries where BSE has not been reported. Nevertheless, components containing animal substances should be treated as potentially infectious.

Avoid any skin contact with all reagents. In case of contact, wash thoroughly with water.

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

**XVI. BIBLIOGRAPHY**

1. CAMANNI F., MASSARA F., BELFORTE L., ROSATELLO A., MOLENATTI G.M. (1977) Effect of dopamine on plasma growth hormone and prolactin levels in normal and acromegalic subjects. J. Clin. Endo. and Metab., 44:465.
2. DAUGHADAY W.H. (1981) The adenohypophysis In: "Textbook of Endocrinology", R.H. Williams ed., W.B. Saunders, Philadelphia, p;73.
3. DROBNY E.C., AMBURN K., BAUMANN G. (1983) Circadian variation of basal plasma growth hormone in man. J. Clin. Endo. and Metab., 57:524-528.
4. HASHIDA S., NAKAWAGA K., ISHIKAWA E., OHTAKI S. (1985) Basal level of human growth hormone (hGH) in normal serum. Clin. Chim. Acta, 151:185-186.
5. LEWIS V.J. et al. (1980) Human growth hormone: A complex of proteins. Rec. Progr. Horm. Res., 36:488.
6. LI C.H. (1974) Human growth hormone: perspective on its chemistry and physiology. In: "Advances in human growth hormone research", S. Raiti ed. U.S. Department of Health, Education and Welfare Publ. DMEW publ. no. (NJH) 74-612, p. 321.
7. REUTENS AT. (1995) Evaluation and application of a highly sensitive assay for serum growth hormone (GH) in the study of adult GH deficiency. J. Clin. Endocrinol. Metab., 80(2): 480-485
8. CROWLEY S. et al. (1995) Growth and the growth hormone axis in prepubertal children with asthma. J. Pediatr. 126(2): 297-303.
9. KELLY JT. et al. (1993) Effect of different oral oestrogen formulations on insulin-like growth factor I, growth hormone and growth hormone binding protein in post-menopausal women. Clin. Endocrinol. 39(5): 561-567

**XVII. SUMMARY OF THE PROTOCOL**

	<b>CALIBRATORS (<math>\mu</math>l)</b>	<b>SAMPLE(S) CONTROLS (<math>\mu</math>l)</b>
Calibrators (0-5)	50	-
Controls, Samples	-	50
Working Anti-hGH-HRP conjugate	50	50
Incubate for <b>30 minutes</b> at room temperature Aspirate the contents of each well. Wash 3 times with 400 $\mu$ l of Wash Solution and aspirate.		
Chromogenic Solution	100	100
Incubate for 30 minutes at room temperature		
Stop Solution	100	100
Read on a microtiterplate reader and record the absorbance of each well at 450 nm (versus 630 or 650 nm).		



## I. VERWENDUNGSZWECK

Ein immunenzymetrisches Assay für die quantitative in vitro Bestimmung von humanem Wachstumshormon (hGH) in Serum und Plasma.

## II. KLINISCHER HINTERGRUND

### A. Biologische Aktivität

hGH ist ein Polypeptid mit einem Molekulargewicht von 21.500 Da. Synthetisiert in den azidophilen Zellen des Hypophysenvorderlappens (HVL) erfolgt die Ausschüttung unter der Kontrolle von Somatotropin-Releasing-Faktor (GRF) und Somatostatin als inhibierendem Agens. Neurotransmitter wie Dopamin, Adrenalin und Serotonin spielen ebenfalls eine wichtige Rolle in der hGH-Sekretion. Stimulierend auf die hGH-Ausschüttung wirken Hypoglykämie, Sport, Fasten, Nahrung mit hohem Proteingehalt, Schlaf, Stress, Glucagon, L-Dopa, Aminosäuren, usw. Glucose, Cortisol, hGH und freie Fettsäuren hingegen hemmen die Freisetzung von hGH. Neben der kurzen Halbwertszeit von hGH ( $\pm$  25 Minuten) ist die Vielzahl der die Ausschüttung beeinflussenden Faktoren für die häufige und große Variationsbreite der hGH-Spiegel im Serum verantwortlich.

Eine der Hauptwirkungen von hGH ist die Induktion der Somatomedin-Produktion in Leber und anderen Geweben. Somatomedine beeinflussen das Wachstum durch direkte Wirkung auf die entsprechenden Zielorgane. Im Gegensatz zu hGH bleibt die Somatomedin-Konzentration im Serum durch die weit gehende Bindung an zirkulierende Plasmaproteine stabil.

### B. Klinische Anwendung

#### • Minderwuchs

Zu geringe hGH-Ausschüttung ist eine der möglichen Ursachen für Minderwuchs bei Kindern. Die Bestimmung von hGH im Serum nach einem Provokationstest (ausbleibende Reaktion) mittels eines sehr sensitiven Tests ist eine wichtige Methode zur Identifizierung solcher Patientengruppen, da diese Patienten durch Gabe von hGH sehr gut therapiert werden können.

#### • Hypopituitarismus

Die Bestimmung von hGH im Serum gibt auch einen Hinweis auf die Hypophysenfunktion, falls eine Hypophysenunterfunktion (entweder idiopathisch oder bedingt durch einen Tumor oder chirurgischen Eingriff) vermutet wird.

#### • Gigantismus und Akromegalie

Die hGH-Bestimmung im Serum vor allem nach einem Inhibitionstest (ausbleibende Reaktion) ist wesentlicher Bestandteil der Diagnose einer tumorbedingten hGH-Überproduktion. hGH-Überproduktion führt bei Kindern zu Riesenwuchs, bei Erwachsenen zu Akromegalie. Beide Erkrankungen können durch einen chirurgischen Eingriff oder Bestrahlung therapiert werden.

## III. GRUNDSÄTZLICHES ZUR DURCHFÜHRUNG

Der Demeditec hGH-EASIA ist ein solid phase-Enzyme Amplified Sensitive Immunoassay (EASIA) im Mikrotiterplattenformat. Kalibratoren und Proben reagieren mit dem primären monoklonalen Antikörper (MAk 1), mit dem die Wells der Mikrotiterplatte beschichtet sind, und mit einem monoklonalen Antikörper (MAk 2), der mit Meerrettich-Peroxidase (MRP) markiert ist. Nach einer Inkubationsphase bildet sich ein Sandwich-Komplex: MAk 1 - hGH - MAk 2 - MRP; nicht gebundene enzymbeschriftete Antikörper werden durch Waschen der Mikrotiterplatte entfernt. Gebundene enzymbeschriftete Antikörper werden durch eine Farbreaktion gemessen. Chromogene Lösung (TMB - H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>) wird hinzugefügt und inkubiert. Die Reaktion wird durch Hinzufügen einer Stopplösung beendet und die Mikrotiterplatte wird bei adäquater Wellenlänge ausgewertet. Die Menge an Substratumsatz wird kolorimetrisch durch Messung der Absorption bestimmt, die proportional zur hGH-Konzentration ist.

Es wird eine Kalibrationskurve erstellt und die hGH-Konzentration in den Proben wird durch Interpolation von der Kalibrationskurve bestimmt.

**IV. MITGELIEFERTE REAGENZIEN**

Reagenzien	96 Test Kit	Rekonstitution
<b>SORB MT</b> Mikrotiterplatte mit 96 Anti-hGH beschichteten, abbrechbaren Wells (monoklonale Antikörper)	96 Wells	<b>gebrauchsfertig</b>
<b>CONJ 40x</b> Konjugat: MRP beschriftete Anti-hGH (monoklonale Antikörper) in Stabilisierungspuffer	1 Gefäß 0,2 ml	40 fach mit Konjugatpuffer verdünnen
<b>CONJ BUF</b> Konjugatpuffer: TRIS-HCl Puffer mit Rinderserumalbumin und Thymol	1 Gefäß 6 ml	<b>gebrauchsfertig</b>
<b>CAL</b> Null-Kalibrator in Schafserum und Thymol	1 Gefäß lyophilisiert	2,0 ml dest. Wasser <b>zugeben</b>
<b>CAL</b> Kalibrator - N = 1 bis 5; (genaue Werte auf QC Datenblatt) in Schafserum und Thymol	5 Gefäße lyophilisiert	1 ml dest. Wasser <b>zugeben</b>
<b>WASH SOLN 200x</b> Waschlösung (Tris-HCl)	1 Gefäß 10 ml	200 x mit dest. Wasser <b>verdünnen</b> (Magnetrührer benutzen).
<b>CONTROL</b> Kontrollen - N = 1 oder 2 Humanserum und Thymol	2 Gefäße lyophilisiert	1 ml dest. Wasser <b>zugeben</b>
<b>SUB TMB</b> Chromogenes TMB (Tetramethylbenzidin)	1 Gefäß 12 ml	<b>gebrauchsfertig</b>
<b>STOP SOLN</b> Stopplösung: HCl 1N	1 Gefäß 12 ml	<b>gebrauchsfertig</b>

**Bemerkung:** 1. Benutzen Sie den Null-Kalibrator zur Probenverdünnung.  
2. 1 µIU der Kalibratorzubereitung ist äquivalent zu 1 µIU 2<sup>nd</sup> IS 98/574.

**V. ZUSÄTZLICH BENÖTIGTES MATERIAL**

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

1. Hochwertiges destilliertes Wasser
2. Pipetten: 50 µl, 200 µl, 500 µl und 2 ml (Verwendung von Präzisionspipetten mit Einwegplastikspitzen wird empfohlen)
3. Vortex Mixer
4. Magnetrührer
5. Waschgerät für Mikrotiterplatten
6. Mikrotiterplatten-Lesegerät zur Auswertung bei 450 nm und 650 nm (bichromatischer Auswertung)

**VI. VORBEREITUNG DER REAGENZIEN**

- E. Kalibratoren:** Rekonstituieren Sie den Null-Kalibrator mit 2,0 ml dest. Wasser, die anderen Kalibratoren mit 1 ml dest. Wasser.
- F. Kontrollen:** Rekonstituieren Sie die Kontrollen mit 1 ml dest. Wasser.
- G. Anti-hGH-HRP Konjugat Gebrauchslösung:** Bereiten Sie eine geeignete Menge Konjugatlösung zu indem Sie 25 µl des Anti-hGH-HRP Konzentrats zu 1 ml Konjugatpuffer geben. Benutzen Sie einen Vortex zum Homogenisieren. Es ist die spontane Zubereitung gefordert.
- H. Waschlösung:** Bereiten Sie ein angemessenes Volumen Waschlösung aus einem Anteil Waschlösung (200x) mit 199 Anteilen dest. Wasser zu. Verwenden Sie einen Magnetrührer zum gleichmäßigen Durchmischen. Werfen Sie die nicht benutzte Waschlösung am Ende des Tages weg.

## VII. AUFBEWAHRUNG UND LAGERUNG DER REAGENZIEN

- Vor dem Öffnen oder der Rekonstitution sind die Reagenzien des Kits bis zum Ablaufdatum (Angaben auf Etikett) bei Lagerung bei 2°C bis 8°C stabil.
- Nicht verwendete Mikrotiterstreifen sollten bis zum Verfallsdatum dicht in der Folie verschlossen mit Trockenmittel bei 2° bis 8°C gelagert werden.
- Nach der Rekonstitution sind die Kalibratoren und Kontrollen bei 2-8°C 7 Tage stabil. Aliquots müssen bei längerer Aufbewahrung bei -20°C eingefroren werden, dann sind Sie 3 Monate haltbar. Vermeiden Sie wiederholtes Einfrieren und Auftauen.
- Die konzentrierte Waschlösung ist bei Raumtemperatur bis zum Verfallsdatum haltbar.
- Frisch zubereitete Waschlösung sollte am selben Tag benutzt werden.
- Nach der ersten Benutzung ist das Konjugat bei Aufbewahrung im Originalgefäß und bei 2-8°C bis zum Ablaufdatum stabil.
- Veränderungen im Aussehen der Kitkomponenten können ein Anzeichen für Instabilität oder Zerfall sein.

## VIII. PROBENSAMMLUNG UND -VORBEREITUNG

- Serum- oder Plasmaproben müssen bei 2-8°C aufbewahrt werden.
- Falls der Test nicht innerhalb von 24 Std. durchgeführt wird, ist die Aufbewahrung bei -20°C erforderlich.
- Vermeiden Sie wiederholtes Einfrieren und Auftauen.
- Vor Gebrauch müssen alle Proben Raumtemperatur erreichen. Vortexmischen der Proben wird vor Gebrauch empfohlen.
- Serum-, Heparinisieretes Plasma- oder EDTA-Plasmaproben liefern ähnliche Ergebnisse.  
$$Y(\text{Serum}) = 0,89 \times (\text{EDTA-Plasma}) + 0,14 \quad r=0,98 \quad n=46$$
$$Y(\text{Serum}) = 1,02 \times (\text{Hep. Plasma}) + 0,01 \quad r=0,98 \quad n=46$$
- Keine hämolytischen Proben benutzen

## IX. DURCHFÜHRUNG

### A. Bemerkungen zur Durchführung

- Verwenden Sie den Kit oder dessen Komponenten nicht nach Ablaufdatum.
- Vermischen Sie Materialien von unterschiedlichen Kit-Chargen nicht. Bringen Sie alle Reagenzien vor der Verwendung auf Raumtemperatur.
- Mischen Sie alle Reagenzien und Proben gründlich durch sanftes Schütteln oder Rühren.
- Führen Sie Kalibratoren, Kontrollen und Proben doppelt aus. Vertikale Ausrichtung wird empfohlen.
- Verwenden Sie zur Zubereitung der Waschlösung reinen Kunststoffbehälter.
- Verwenden Sie saubere Einwegpipettenspitzen, um Kreuzkontamination zu vermeiden.
- Verwenden Sie zur Pipettierung der chromogene Lösung und der Stopplösung keine Pipetten mit Metallteilen.
- Präzisionspipetten oder ein automatisches Pipettiersystem erhöhen die Präzision.
- Achten Sie auf die Einhaltung der Inkubationszeiten.
- Zur Vermeidung von Drift muss die Zeit zwischen dem Pipettieren des ersten Kalibrators und der letzten Probe auf die Zeit beschränkt werden, die in Abschnitt XIII Absatz E (Zeitverzögerung) erwähnt wird.
- Erstellen Sie für jeden Durchlauf eine Kalibrationskurve, verwenden Sie nicht die Daten von früheren Durchläufen.
- Pipettieren Sie die chromogene Lösung innerhalb von 15 Minuten nach dem Waschen der Mikrotiterplatte.
- Während der Inkubation mit der chromogene Lösung ist die Mikrotiterplatte vor direktem Sonnenlicht zu schützen.

**B. Durchführung**

1. Wählen Sie die erforderliche Anzahl der Streifen für den Lauf aus. Nicht verwendete Mikrotiterstreifen sollten wieder dicht in der Folie verschlossen mit Trockenmittel bei 2° bis 8°C gelagert werden.
2. Befestigen Sie die Streifen im Halterahmen.
3. Pipettieren Sie jeweils 50 µl Kalibrator, Kontrolle und Probe in die entsprechenden Wells.
4. Pipettieren Sie 50 µl Anti-hGH-HRP Gebrauchslösung in alle Wells.
5. Inkubieren Sie 30 Minuten bei Raumtemperatur - Es ist zwingend notwendig, die 30 Minuten Inkubationszeit einzuhalten.
6. Saugen Sie die Flüssigkeit aus jedem Well ab.
7. Waschen Sie die Platte dreimal:
  - pipettieren Sie 0,4 ml Waschlösung in jeden Well
  - saugen Sie der Inhalt jedes Wells ab
8. Pipettieren Sie 100 µl der chromogene Lösung innerhalb von 15 Minuten nach dem Waschvorgang in jeden Well.
9. Inkubieren Sie die Mikrotiterplatte 30 Minuten bei Raumtemperatur; vermeiden Sie direktes Sonnenlicht.
10. Pipettieren Sie 100 µl der Stopplösung in jeden Well.
11. Werten Sie die Absorptionen bei 450 nm (Referenzfilter 630 nm oder 650 nm) innerhalb 1 Stunde aus und berechnen Sie die Resultate wie in Abschnitt X beschrieben.

**X. BERECHNUNG DER ERGEBNISSE**

6. Werten Sie die Platte bei 450 nm gegen einen Referenzfilter auf 650 nm (oder 630 nm) aus.
7. Berechnen Sie den Durchschnitt aus den Doppelbestimmungen.
8. Tragen Sie auf semilogarithmischem oder linearem Millimeterpapier den c.p.m. (Ordinate) für jeden Standard gegen die entsprechende Konzentration hGH (Abszisse) und zeichnen Sie eine Kalibrationskurve durch die Kalibrationspunkte, indem Sie die eingetragenen Punkte durch gerade Linien verbinden.
9. Berechnen Sie die Konzentration für jede Kontrolle und Probe durch Interpolation aus der Kalibrationskurve.
10. Computergestützte Methoden können ebenfalls zur Erstellung der Kalibrationskurve verwendet werden. Falls die Ergebnisberechnung mit dem Computer durchgeführt wird, empfehlen wir die Berechnung mit einer "4 Parameter"-Kurvenfunktion.

**XI. TYPISCHE WERTE**

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

	<b>hGH-EASIA</b>	<b>OD Einheiten</b>
Kalibrator	0 µIU/ml	0,030
	0,45 µIU/ml	0,062
	5,4 µIU/ml	0,226
	12,9 µIU/ml	0,501
	43,5 µIU/ml	1,429
	98,0 µIU/ml	2,330

**XII. LEISTUNGSMERKMALE UND GRENZEN DER METHODIK****A. Nachweisgrenze**

Zwanzig Null-Kalibratoren wurden zusammen mit einem Satz anderer Kalibratoren gemessen. Die Nachweisgrenze, definiert als die scheinbare Konzentration bei zwei Standardabweichungen über dem gemessenen Durchschnittswert bei Nullbindung, entsprach 0,17 µIU/ml.

**B. Spezifität**

Kreuzreaktive Hormone wurden zu einem minderwertigen und zu einem hochwertigen Kontrolle zugegeben. Das Scheinbare hGH Ergebnis wurde gemessen.

Zugeg. Hormon	hGH C1 µIU/ml	hGH C2 µIU/ml
-	1,9	13,5
hCG 100000 mIU/ml	2,0	14,3
hPL 10000 ng/ml	1,4	13,0
PRL 12500 ng/ml	1,8	12,6

**C. Präzision**

INTRA ASSAY				INTER ASSAY			
Serum	N	<X> ± SD (µIU/ml)	CV (%)	Serum	N	<X> ± SD (µIU/ml)	CV (%)
A	20	6,90 ± 0,34	4,9	A	8	11,4 ± 0,9	8,1
B	20	16,61 ± 0,90	5,4	B	8	23,5 ± 1,2	5,1

SD: Standardabweichung; CV: Variationskoeffizient

**D. Genauigkeit**

WIEDERFINDUNGSTEST			
Probe	Zugeg. hGH (µIU/ml)	Wiedergef. hGH (µIU/ml)	Wiedergefunden (%)
Serum	4,3	4,1	95
	13,5	12,8	95
	26,8	28,1	105
	52,1	58,9	113
Plasma	4,3	4,6	106
	13,5	13,2	98
	26,8	25,3	94
	52,1	53,0	102
VERDÜNNUNGSTEST			
Probe	Verdünn.	Theoret. Konz. (µIU/ml)	Gemess. Konz. (µIU/ml)
Serum 1	1/2	-	97,7
	1/4	48,8	57,0
	1/8	24,4	27,7
	1/16	12,2	13,6
	1/32	6,1	6,4
Serum 2	1/64	3,1	3,0
	1/1	-	21,2
	1/2	10,6	9,3
	1/4	5,3	4,6
	1/8	2,7	2,2
	1/16	1,3	1,1
	1/32	0,7	0,6

Die Proben wurden mit Null-Kalibrator verdünnt.

Umrechnungsfaktor:

1µIU der Standardzubereitung  
hGH-ELISA = 0,33 ng

**E. Zeitverzögerung zwischen letzter Kalibrator- und Probenzugabe**

Es wird im Folgenden gezeigt, dass die Genauigkeit der Tests selbst dann gewährleistet ist, wenn die Probe 60 Minuten nach Zugabe des Kalibrators in die beschichteten Röhrchen zugegeben wird.

ZEITDIFFERENZ						
	0 min	10 min	20 min	30 min	45 min	60 min
S1	4,0	3,6	3,3	3,3	3,0	3,8
S2	13,5	15,0	13,8	13,0	12,6	13,0

**F. Hook-Effekt**

Eine Probe mit hGH bis zu 4000  $\mu$ IU/ml liefert höhere Messwerte als der letzte Kalibratormesswert.

**XIII. INTERNE QUALITÄTSKONTROLLE**

- Entsprechen die Ist-Werte nicht den auf den Fläschchen angegebenen Soll-Werten, können die Werte, ohne treffende Erklärung der Abweichungen, nicht weiterverarbeitet werden.
- Falls zusätzliche Kontrollen erwünscht sind, kann jedes Labor seinen eigenen Pool herstellen, der in Aliquots eingefroren werden sollte. Kontrollen mit erhöhten Azidkonzentrationen stören die Enzymreaktion und können nicht verwendet werden.
- Akzeptanzkriterien für die Differenz zwischen den Resultaten der Wiederholungstests anhand der Proben müssen auf Guter Laborpraxis beruhen.
- Es wird empfohlen, Kontrollen im Assay routinemäßig wie unbekannte Proben zu behandeln, um die Assayvarianz zu messen. Die Leistung des Assay muss mit den Qualitätskontrollkarten der Kontrollen überprüft werden.
- Es hat sich bewährt, die durch den Computer ausgewählte Kurvenanpassung visuell zu überprüfen.

**XIV. REFERENZINTERVALLE**

Diese Werte sind nur Richtwerte; jedes Labor muss seinen eigenen Normalwertbereich ermitteln. Bei gesunden Personen erfolgt die hGH-Ausschüttung pulsatil. Tagsüber variiert die hGH-Konzentration von < 0,2 bis 10  $\mu$ IU/ml. Im Schlaf steigt die hGH-Konzentration kontinuierlich an ( $\pm$  30  $\mu$ IU/ml).

Nach sportlichen Aktivitäten oder Stress (Blutentnahme, Hypoglykämie) werden hohe Werte, bei Hyperglykämie niedrige hGH-Spiegel gefunden.

Zwei Stunden nach Glucose-Belastung (75 g bei Erwachsenen) wurden bei gesunden Personen (n = 34) hGH-Spiegel < 10  $\mu$ IU/ml, nach einem Stimulationstest (Insulin, Arginin, Glucagon) hGH-Spiegel > 20  $\mu$ IU/ml gefunden.

Patienten mit Akromegalie zeigten selbst nach Glucose-Gabe erhöhte hGH-Werte (> 10  $\mu$ IU/ml).

Bei hGH-Mangel kann keine oder nur verminderte Erhöhung der hGH-Spiegel nach Stimulation detektiert werden (Minderwuchs durch hGH-Mangel; Hypopituitarismus verschiedener Ursachen).

**XV. VORSICHTSMASSNAHMEN UND WARNUNGEN**Sicherheit

Nur für diagnostische Zwecke.

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

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

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

Vermeiden Sie Hautkontakt mit allen Reagenzien. Bei Kontakt gründlich mit Wasser spülen.

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







**XVI. LITERATUR**

1. CAMANNI F., MASSARA F., BELFORTE L., ROSATELLO A., MOLENATTI G.M. (1977) Effect of dopamine on plasma growth hormone and prolactin levels in normal and acromegalic subjects. J. Clin. Endo. and Metab., 44:465.
2. DAUGHADAY W.H. (1981) The adenohypophysis In: "Textbook of Endocrinology", R.H. Williams ed., W.B. Saunders, Philadelphia, p;73.
3. DROBNY E.C., AMBURN K., BAUMANN G. (1983) Circadian variation of basal plasma growth hormone in man. J. Clin. Endo. and Metab., 57:524-528.
4. HASHIDA S., NAKAWAGA K., ISHIKAWA E., OHTAKI S. (1985) Basal level of human growth hormone (hGH) in normal serum. Clin. Chim. Acta, 151:185-186.
5. LEWIS V.J. et al. (1980) Human growth hormone: A complex of proteins. Rec. Progr. Horm. Res., 36:488.
6. LI C.H. (1974) Human growth hormone: perspective on its chemistry and physiology. In: "Advances in human growth hormone research", S. Raiti ed. U.S. Department of Health, Education and Welfare Publ. DMEW publ. no. (NJH) 74-612, p. 321.
7. REUTENS AT. (1995) Evaluation and application of a highly sensitive assay for serum growth hormone (GH) in the study of adult GH deficiency. J. Clin. Endocrinol. Metab., 80(2): 480-485
8. CROWLEY S. et al. (1995) Growth and the growth hormone axis in prepubertal children with asthma. J. Pediatr. 126(2): 297-303.
9. KELLY JT. et al. (1993) Effect of different oral oestrogen formulations on insulin-like growth factor I, growth hormone and growth hormone binding protein in post-menopausal women. Clin. Endocrinol. 39(5): 561-567

## XVII. ZUSAMMENFASSUNG DES PROTOKOLLS

	KALIBRATOREN ( $\mu$ l)	PROBE(N) KONTROLLEN ( $\mu$ l)
Kalibratoren (0-5)	50	-
Proben, Kontrollen	-	50
Anti-hGH-HRP Gebrauchslösung	50	50
<b>30 Minuten</b> bei Raumtemperatur inkubieren. Inhalt jedes Wells absaugen. Dreimal mit 400 $\mu$ l Waschlösung waschen und absaugen.		
chromogene Lösung	100	100
30 Minuten bei Raumtemperatur inkubieren.		
Stopplösung	100	100
Auf einem Mikrotiterplatten-Lesegerät auswerten und Absorption jedes Wells bei 450 nm (gg. 630 oder 650 nm) vermerken.		

## SYMBOLS USED WITH DEMEDITEC ELISAS

Symbol	English	Deutsch	Français	Español	Italiano
	European Conformity	CE-Konformitätskennzeichnung	Conforme aux normes européennes	Conformidad europea	Conformità europea
	Consult instructions for use	Gebrauchsanweisung beachten	Consulter les instructions d'utilisation	Consulte las Instrucciones	Consultare le istruzioni per l'uso
<b>IVD</b>	In vitro diagnostic device	In-vitro-Diagnostikum	Usage Diagnostic in vitro	Para uso Diagnóstico in vitro	Per uso Diagnostica in vitro
<b>RUO</b>	For research use only	Nur für Forschungszwecke	Seulement dans le cadre de recherches	Sólo para uso en investigación	Solo a scopo di ricerca
<b>REF</b>	Catalogue number	Katalog-Nr.	Référence	Número de catálogo	No. di Cat.
<b>LOT</b>	Lot. No. / Batch code	Chargen-Nr.	No. de lot	Número de lote	Lotto no
	Contains sufficient for <n> tests/	Ausreichend für "n" Ansätze	Contenu suffisant pour "n" tests	Contenido suficiente para <n> ensayos	Contenuto sufficiente per "n" saggi
	Storage Temperature	Lagerungstemperatur	Température de conservation	Temperatura de conservación	Temperatura di conservazione
	Expiration Date	Mindesthaltbarkeitsdatum	Date limite d'utilisation	Fecha de caducidad	Data di scadenza
	Legal Manufacturer	Hersteller	Fabricant	Fabricante	Fabbricante
<i>Distributed by</i>	Distributor	Vertreiber	Distributeur	Distribuidor	Distributore
<i>Content</i>	Content	Inhalt	Contenu	Contenido	Contenuto
<i>Volume/No.</i>	Volume / No.	Volumen/Anzahl	Volume/Numéro	Volumen/Número	Volume/Quantità
<i>Microtiterwells</i>	Microtiterwells	Mikrotiterwells	Plaques de microtitration	Placas multipocillo	Micropozzetti
<i>Antiserum</i>	Antiserum	Antiserum	Antisérum	Antisero	Antisiero
<i>Enzyme Conjugate</i>	Enzyme Conjugate	Enzymkonjugat	Conjugué enzymatique	Conjugado enzimático	Tracciante enzimatico
<i>Enzyme Complex</i>	Enzyme Complex	Enzymkomplex	Complexe enzymatique	Complex enzimático	Complesso enzimatico
<i>Substrate Solution</i>	Substrate Solution	Substratlösung	Solution substrat	Solución de sustrato	Soluzione di substrato
<i>Stop Solution</i>	Stop Solution	Stopplösung	Solution d'arrêt	Solución de parada	Soluzione d'arresto
<i>Zero Standard</i>	Zero Standard	Nullstandard	Zero Standard	Estándar cero	Standard zero
<i>Standard</i>	Standard	Standard	Standard	Estándar	Standard
<i>Control</i>	Control	Kontrolle	Contrôle	Control	Controllo
<i>Assay Buffer</i>	Assay Buffer	Assaypuffer	Tampon d'essai	Tampón de ensayo	Tampone del test
<i>Wash Solution</i>	Wash Solution	Waschlösung	Solution de lavage	Solución de lavado	Soluzione di lavaggio
<i>1N NaOH</i>	1N NaOH	1N NaOH	1N NaOH	1N NaOH	1N NaOH (idrossido di sodio 1N)
<i>1 N HCl</i>	1 N HCl	1 N HCl	1N HCl	1 N HCl	
<i>Sample Diluent</i>	Sample Diluent	Probenverdünnungsmedium	Solution pour dilution de l'échantillon	Solución para dilución de la muestra	Diluyente dei campioni
<i>Conjugate Diluent</i>	Conjugate Diluent	Konjugatverdünnungsmedium	Solution pour dilution du conjugué	Solución para dilución del conjugado	Diluyente del tracciante