

hGH Sensitiv/-e ELISA

Enzymimmunoassay für die quantitative Bestimmung von

humanem Wachstumshormon (hGH)

Deutsch

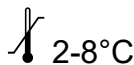
Enzyme Immunoassay for Quantitative Determination of

human Growth Hormone (hGH)

English

Europäische Union / European Union,
für In-vitro-Diagnostik / For In Vitro Diagnostic Use
IVD zum Gebrauch durch Fachpersonal! / IVD for professional use!

Alle anderen Länder / All other countries:
Nur für Forschungszwecke. Nicht für diagnostische Anwendungen geeignet.
For Research Use Only. Not for use in diagnostic procedures.



REF **E022**

 **mediagnost**[®]








Gesellschaft für Forschung und Herstellung von Diagnostika GmbH

 : Aspenhastr. 25 • D-72770 Reutlingen / Germany
Telefon: + 49 - (0) 7121 51484-0 • Fax: + 49 - (0) 7121 51484-10
E-Mail: contact@mediagnost.de • <http://www.mediagnost.de>

EN/ DE/ FR/ IT/ ES/ PT/ NL/ DK/ SE/ PL/ HU/ SK/ CZ/ BG/ EE/ GR/ RO/ SI/ FI

Symbols/ Symbole /Symboles/ Simboli/ Símbolos/ Símbolos/ Symbolen/ Symboler/ Symboler/ Symbole/ Szimbólumok/ Symboly/ Symboly/ Символи/ Símbolid/ Σύμβολα/ Simboluri/ Simboli/ Symbolit

DIN EN ISO 15223-1

	Expiry date/ Verfallsdatum/ Date de péremption/ Data di scadenza/ Fecha de caducidad/ Data de validade/ Uiterste gebruiksdatum/ Udløbsdato/ Bäst före-datum/ Termin ważności/ Lejárati idő/ Čas expirácie/ Doba expirace/ Срок на годност/ Αεγυμίσκυυρπäv/ Ημερομηνία λήξης/ Data de expirare/ Rok uporabe/ Viimeinen käyttöpäivä
	Consider instructions for use/ Bitte Gebrauchsanweisung beachten/ Consultez la notice d'utilisation/ Consultare le istruzioni per l'uso/ Consulte las instrucciones de uso/ Respeitar as instruções de utilização/ A.u.b de gebruiksaanwijzing volgen/ Se brugsanvisningen/ Läs anvisningarna före användning/ Proszę przeczytać instrukcję obsługi/ Vegye figyelembe a használati utasításban foglaltakat/ Postupujte podľa pokynov na použitie/ Dodržujte návod k použití/ Моля, спазвайте инструкцията за употреба/ Palun järgige kasutusjuhendi/ Λάβετε υπόψη σας τις οδηγίες χρήσης/ Vá rugám sá respectați instrucțiunile de utilizare/ Upoštečajte navodila za uporabo/ Lue käyttöohje huolellisesti!
IVD	In vitro Diagnostic Medical Device (for in vitro diagnostic use)/ In-vitro-Diagnostikum (zur In-vitro-Diagnostik)/ Dispositif médical de diagnostic in vitro (Pour usage diagnostique in vitro)/ Dispositivo medico per diagnostica in vitro (per uso diagnostico in vitro)/ Dispositivo médico de diagnóstico in vitro (para uso diagnóstico in vitro)/ Dispositivo Médico para Diagnóstico in vitro (Para Utilização de Diagnóstico in vitro)/ Medisch hulpmiddel voor diagnostiek in vitro (voor diagnostisch gebruik in vitro)/ Medicinsk udstyr til in vitro-diagnostik (Udelukkende til in vitro diagnostisk anvendelse)/ Medicinteknisk produkt avsedd för in vitro-diagnostik (för in vitro-diagnostiskt bruk)/ Wyrób medyczny do diagnostyki in vitro/ In vitro orvosi diagnosztikai termék (in vitro diagnosztikai használatához)/ In vitro diagnostický zdravotnícký materiál (určené na diagnostiku „in vitro“)/ In vitro diagnostický zdravotnícký materiál (určeno pro diagnostiku „in vitro“)/ Медицинско устройство за ин-витро диагностика (за ин-витро диагностика)/ in vitro diagnostikaseade (in vitro diagnostika tegemiseks)/ In vitro διαγνωστικό (για διάγνωση in vitro)/ Dispozitiv de diagnosticare in vitro (pentru diagnosticarea in-vitro)/ In vitro diagnostika (o in vitro diagnostiki)/ in vitro-diagnostiikkakäyttö
LOT	Lot-Batch Number/ Charge-Chargennummer/ Lot-Code du lot/ Lotto-Numero di lotto/ Lote-Código de lote/ Lote-Código do Lote/Lot-Partijnummer/ Lot-Batchkode/ Partisatskod/ Numer serii/ Tétel-sarzs szám/ Číslo šarže/ Číslo šarže/ Партиден номер/Partii number/ Παρτίδα-αριθμός παρτίδας/ Lot-număr lot/ Številka serije/ Erä
	Manufactured by/ Hergestellt von/ Fabriqué par/ Prodotto da/ Fabricado por/ Fabricado por/ Vervaardigd doo/ Fabrikation af/ Tillverkad av/ Wyprodukowane przez/ Gyártotta/ Vyrobené/ Vyrobeno v/ Производител/ Tootja/ Κατασκευάζεται από/ Produs de/ Proizvajalec/ Valmistaja
REF	Catalogue Number/ Bestellnummer/ Numéro de référence/ Numero di riferimento/ Número de referencia/ Número de Referência/ Referentienummer/ Referencenummer/ Beställningsnummer/ Numer katalogowy/ Rendelési szám/ Katalógové číslo/ Objednací číslo/ Каталоген номер/ Tellimisnumber/ Αρ. παραγγελίας/Număr comandă/ Številka naročila/ Viite tai tilausnumero
	Store at between/ Lagerung bei zwischen/ Conserver à entre/ Conservare a tra/ Conservar a temp. entre/ Armazenar entre/ Bewaar bij tussen/ Opbevares mellem/ Förvaras vid/ Przechowywać w/ Tárolási tartomány/ Skladujte v rozsahu / Skladujte v rozmezí/ Температурно ограничение/ Säilätä temperatuuridel/ Φύλαξη σε θερμοκρασία/ Depozitare între/ Skladiščenje med/ Säilytys x-y Celsiusasteen lämpötilassa
	Contains sufficient for x tests/ Inhalt ausreichend für x Tests/ Contient suffisant pour x tests/ Contenuto sufficiente per x test/ Contenido suficiente para x pruebas/ Conteúdo suficiente para x testes/ Bevat voldoende voor x bepalingen/ Indeholder tilstrækkeligt til x prøver/ Innehållet räcker till x analyser/ Zawartość na x testów/ Tartalma x teszt elvégzésére elegendő/ Obsahuje materiál pre x testov/ Obsah dostačuje pro x testů/ Съдържание достатъчно за x тестове/ Sisust jätkub x katse jaoks/ Το περιεχόμενο επαρκεί για x δοκιμές/ Conținut suficient pentru x teste/ Vsebina zadostuje za x preizkusov/ Sisältö riittää x testille
	Incubation time/ Inkubationszeit/ Temps d'incubation/ Tempo d'incubazione/ Tiempo de incubación/ Tempo de incubação/ incubatietijd/ Inkubationstid/ inkubationstid/ Czas inkubacji/ Inkubációs idő/ Inkubačná lehota/ Inkubační doba/ Инкубационен период/ Inkubatsiooniaeg/ Χρόνος επώασης/ Timp de incubare/ Inkubacijska doba/ inkubaatioaika
°C	Incubate at/ Inkubation bei/ Incuber à/ Incubare a/ incubar a/ Incubar a/ incubatietemperatuur/ Inkubation ved/ inkubation vid/ Inkubacja przy/ Inkubáció hőmérséklete/ Inkubácia pri/ Inkubace při/ Инкубира се при/ Inkubatsioon temperatuuril/ Επώαση στους/ Incubare la/ Inkubacija pri/ Inkubaatiolämpötila
	Shaking/ Schütteln/ Mélanger/ Agitare/ Agitar/ Agitação/ Schudden/ Ryster/ Skaka/ Wstrząsanie/ Rázás/ Pretrepat/ Protferpat/ Разклатяване/ Raputada/ Ανακινήστε/ Vibrare/ Stresite/ Sekoita
MTP	Mikrotiterplate/ Mikrotiterplatte/ plaque de microtitrage/ Piastra di microtitolazione/ Placa de microtitulación/ Placa de Microtitulação/ Microtiterplaat/ Mikrotiterplade/ mikrotiterplatta/ microtiterplaat/ Płytko microtiter/ Mikrotiter lap/ Mikrotitračná podložka/ Mikrotitrační podložka/ Микротитърна плака/ Mikrotiterplaat/ Τρυβλίο μικροτιτλοδότησης/ Microplacă/ Mikrotitrská plošča/ Mikrotitruslevy
Rec in	Reconstitute in/ Rekonstituieren in/ Reconstituer dans/ Ricostituire nel/ Reconstituier en/ Reconstituier em/ Reconstituieren in/ Rekonstituér i/ Rekonstituera/ Rekonstituować w/ Helyreállítás/ Znovu připravit za/ Znovu pripravit za/ Разтваряне в/ Moodustada uuesti/ Ανασυστήστε σε/ Reconstituire în/ Predelava v/ Rekonstituoi
SPE	Sample/ Probe/ Echantillon/ Campione/ Muestra/ Amostra/ Monster/ Prøve/ prov/ Próbka/ Minta/ Vzorka/ Vzorek/ Проба/ Proov/ Δείγμα/ Probă/ Vzorec/ Näyte

DET	Antibody Conjugate/ Antikörperkonjugat/ Anticorps conjugué/ Coniugato di anticorpo/ Conjugado de anticuerpos/ Conjugado anticorpo/ Antilichaamconjugaat/ Antistoffer-konjugat/ Antikroppskonjugat/ Koniugat antycial/ Antitest páros/ Protilátkový konjugát/ Protilátkový konjugát/ Αντιταπο конюгат/ Antikehad konjugaat/ Σύμπλοκο αντισώματος/ Compuși din anticorpi/ Antitelesa konjugat/ Vasta-aine konjugaatti
EC	Enzyme Conjugate/ Enzymkonjugat/ Conjué enzymatique/ Coniugato di enzima/ Conjugado de enzimas/ Conjugado Enzima/ Enzymconjugaat/ Enzym-konjugat/ Enzymkonjugat/ Koniugat enzymów/ Enzim páros/ Enzymatický konjugát/ Enzymatický konjugát/ ензим конюгат/ Ensüümi konjugaat/ Σύμπλοκο –εζύμου/ Compuși din enzime/ Encima konjugat/ Entsymi konjugaatti
DIL	Dilution Buffer/ Verdünnungspuffer/ Tampon de dilution/ Tampone di diluizione/ Tampón de dilución/ / Tampão de diluição / Verdunningsbuffer/ / Fortyndingsbuffer/ Utspädningsbuffert / Bufor rozcieńczający/ / Hígító puffer/ Riediaci pufor/ Ředící pufr / Буфер за разреждане/ Lahjenduspuhver/ Ρυθμιστικό διάλυμα αραιώσης / Tampon de diluare/ Puffer za redčenie/ Laimennuspuskuri
X:X	Dilute / Verdünnen / Diluer / Diluire / Diluir / Diluir / Verdunnen / Fortyndes / Späd / Rozcieńczanie / Hígítás / Riedit' / Ředit / Разреждане / Lahjendada / Αραιώστε / Diluați / Razredčiti / Laimennetaan
CAL A-E	Calibrator X/ Kalibrator X/ calibreteur X/ calibreto X/ calibrador X/ calibrador X/ kalibrator X/ kalibrator X/ kalibrator X/ kalibrátor X/ kalibrátor X/ kalibrátor X/ калибратор X/ kalibraator X/ Βαθμονομητής X/ calibrator X/ kalibrator X/ kalibraattori X
CTR	Control/ Kontrolle/ Contôle/ controllo/ control/ Controle/ controle/ Kontroll/ Kontroll/ kontrolne/ Ellenőrző/ Kontrolné/ Kontrolní/ Контролен/ Kontroll/ ελέγχου/ control/ Kontrolni/ Kontrolli
WB	Washing Buffer Concentrate/ Waschpufferkonzentrat/ Tampon de lavage conc./ Tampone di lavaggio concentrato/ Tampón de lavado concentrado/ Tampão de Lavagem Concentrado/ wasbuffer, geconcentreerd/ Vaskebufferkoncentrat/ Vaskebufferkoncentrat/ tvättbuffertkoncentrat/ Bufor płukania koncentrat/ Mosópuffer koncentrátum/ Koncentrát vymývacieho pufru/ Концентрат на промивен буфер/ Pesurpuhver kontsentraat/ Συμπύκνωμα ρυθμιστικού διαλύματος έκπλυσης/ Concentrat pentru tamponul de spălare/ Koncentrat izpiralnega pufru/ Pesuliuositiiviste
WB 1:20	Washing Buffer/ Waschpuffer/ Tampon de lavage/ Tampone di lavaggio/ Tampón de lavado/Tampão de Lavagem/ wasbuffer/ Vaskebuffer/ tvättbuffert/ Bufor płukania/ Mosópuffer/ Vymývací pufr/ Vymývací pufr/ Промивен буфер/ Pesurpuhver/ Ρυθμιστικό διάλυμα έκπλυσης/ Tampon pentru spălare /Izpiralni pufer/ Pesuliuos
S	Substrate/ Substrat/ Substrat/ Substrato/ Substrato/ Substrato/ substraat/ Substrat/ Substrat/ Substrat/ Substrátum/ Substrát/ Substrát/ Субстрат Substraat/ Υπόστρωμα/ Substrat/ Substrat/ Substraatiliuos
STP	Stop Solution/ Stopplösung/ Stop Solution/ Soluzione di stop/ Stop Solución/ Solução Stop/ stopoplossing/ Stopopløsning/ Stopplösning/ Stop roztwór/ Megállító oldat/ Roztok na ukončenie/ Roztok pro ukončeni/ Стопираци разтвор/ Stopp-lahus/ Διάλυμα διακοπής/ Soluție de oprire/ Stop raztopina/ Pysäytysliuos
TAPE	Cover Plate with sealing tape/ Platte abkleben/ Recouvrir la microplaque avec bande adhésive/ Coprire la piastra con nastro adesivo/ Cubrir la placa con una cinta adhesiva/ Cobrir a Placa com fita adesiva/ plaatje met tape afdekken/ Afdækningsplade med tape/ maskera platta/ Odkleic plytkę/ Tányér leragasztása/ Oblepit' podložku lepiacou páskou/ Olepiti podložku lepici páskou/ Плака с лента за запечатване/ Katta plaat isoleerklleerplindiga/ Κολλήστε το πλακίδιο με κολλητική ταινία/ Αοπεριți placa cu o bandă adezivă/ Prelepiti ploščo/ Peitä mikrotitrauslevy oheisella teipillä
MEASURE	Measure plate within 30 min at 450 nm (Referencefilter ≥590 nm)/ Ausmessung innerhalb von 30 min bei 450 nm (Referenzfilter ≥ 590 nm)/ Measure lábsorbance en l'espac de 30 min à 450 nm avec ≥590 nm longueur d'onde pour référence/ Misurazione entro 30 min. a 450 nm (filtro di riferimento ≥ 590 nm)/ Medición de la placa dentro de los siguientes 30 min a 450 nm (filtro de referencia ≥ 590nm)/ Medir a placa dentro de 30 min a 450 nm (Filtro de referència ≥ 590 nm)/ Binnen 30 minuten bij 450 nm meten (referentiefilter ≥ 590 nm)./ Mål plate i løbet af 30 min ved nm (referencefilter ≥590 nm)/ Mät inom 30 min vid 450 nm (referensfilter ≥ 590 nm)./ Pomiar w ciągu 30 min przy 450 nm (filtr odniesienia ≥ 590 nm)/ Ki mérés 30 percen belül 450 nm-nél (referenciaszűrő ≥ 590 nm)/ Merať 30 minút pri 450 nm (Referenčný filter ≥590 nm)/ Měřit 30 minut při 450 nm (Referenční filtr ≥ 590 nm)/ Отчитане в рамките на 30 min при 450 nm (референтен филтър ≥ 590 nm)/ Mõõtmise 30 min jooksul 450 nm korral (võrdlusfilter ≥ 590 nm)/ Μέτρηση εντός 30 min στα 450 nm (φίλτρο αναφοράς ≥ 590 nm)/ Măsurare în decurs de 30 min la 450 nm (filtru de referință ≥ 590 nm)/ Izmerite ploščico v 30 min pri 450 nm (referenčni filter ≥590nm)/ Mittaa 30 minuutin aikana 450 nm:ssä (referenssi suodatin ≥ 590 nm)
Literature	Literature/ Literatur/ Bibliographie/ Letterario/ Bibliografía/ Literatura documentação/ literatuur/ Litteratur/ litteratur/ Literatura/ Irodalom/ Literatúra/ Literatura/ Литература/ Kirjandus/ Βιβλιογραφία/ Bibliografie/ literatura/ Lähdeluettelo
International Test description	International test description/ internationale Testanleitung/ description internationale de test/ Istruzioni per il test internazionali/ Descripción de ensayo internacional/ Descrição internacional do teste/ internationale testbeskriving/ internationell testbeskrivning/ Opis testu międzynarodowego/ nemzetközi teszt-útmutató/ Mezinárodní návod k testu/ Mezinárodní návod k testu/ rahvusvaheline katse kirjeldus/ Διεθνείς οδηγίες για εργαστηριακές δοκιμές/ instrucțiuni internaționale pentru testare/ mednarodna navodila za preizkus/ Kansainvälinen käyttöohje
End	in all required wells/ in allen benötigten Vertiefungen/ dans tous les godets requis/ in tutti i pozzetti richiesti/ en todos los pozos requeridos/ em todos os tubos necessários/ in alle nodige putjes/ i alle nødvendige brønde/ i alla nödvändiga brunnar/ we wszystkich potrzebnych wgłębieniach/ minden szükséges forrásban/ vo všetkých potrebných miestach/ ve všech potřebných místech/ във всички необходими ямки/ kõigis vajalikes süvendites/ σε όλες τις απαραίτητες κοιλότητες/ în toate cavitățile necesare/ v vseh zahtevanih vdolbinah/ kaikkein tarvittaviin mikrotitrauslevyn syvennyksiin

INHALTSVERZEICHNIS / TABLE OF CONTENTS

INHALTSVERZEICHNIS / TABLE OF CONTENTS.....	4
DEUTSCH Gebrauchsanweisung.....	5
1 ZWECKBESTIMMUNG.....	5
2 EINFÜHRUNG	5
3 TESTPRINZIP	6
4 WARNHINWEISE UND VORSICHTSMAßNAHMEN.....	7
5 PROBEN	8
6 MATERIALIEN.....	9
7 TECHNISCHE HINWEISE	10
8 TESTDURCHFÜHRUNG	11
9 QUALITÄTSKONTROLLE.....	12
10 AUSWERTUNG	12
11 ASSAY EIGENSCHAFTEN UND VALIDIERUNG	15
12 VERGLEICHSTUDIEN	18
Gebrauchsinformation für wissenschaftliche Anwendungen.....	19
13 WISSENSCHAFTLICHE ANWENDUNGEN	19
ENGLISH Instructions for use.....	21
14 LITERATUR / REFERENCES.....	36
15 Internationale Assay Description.....	39
16 ASSAY PROCEDURE	40

DEUTSCH Gebrauchsanweisung

hGH sensitiv ELISA E022	96 Bestimmungen
CE	DE/CA40/00809/15/2
Testprinzip	Sandwich ELISA
Dauer (Inkubationszeit)	3,25 h
Antikörperkonjugat	gebrauchsfertig
Enzymkonjugat	gebrauchsfertig
Puffer & Substrat	gebrauchsfertig
Referenzmaterial	2. Internationaler Standard WHO/ NIBSC 98/574, rekombinant hGH
Kalibratoren	5 Einzelkalibratoren: 0,05 - 1 ng/mL, gefriergetrocknet, rekombinant hGH
Assay Range	0,0115 ng/mL - 26 ng/mL
Kontrolle	1 Kontrolle, gefriergetrocknet
Proben	humanes Serum / Plasma
Erforderliches Probenvolumen	10 µL
Probenverdünnung	1:26
Analytische Sensitivität	0,0115 ng/mL
Intra- / Interassay Varianz	< 10%

1 ZWECKBESTIMMUNG

Quantitative Messung von humanem Wachstumshormon (hGH) in menschlichem Serum oder Plasma.

1 EINFÜHRUNG

Das System des Wachstumshormons [GH] (Synonyme: Somatotropin, Growth Hormone) ist durch eine außerordentliche Komplexität gekennzeichnet. Das Gen für das Wachstumshormon ist das GH-1 Gen auf Chromosom 17, die Expression erfolgt in der Hypophyse. 80% des humanen GH liegt als 22kDa (191 Aminosäuren) Form vor. Über alternatives Splicing entsteht eine weitere, 20kDa große, Isoform. Darüber hinaus gibt es verschiedene kleinere Varianten, sowie posttranslational modifizierte und aggregierte Formen. Im Blut wird das GH von einem spezifischen Bindungsprotein (GHBP) gebunden. Das Bindungsprotein besteht aus der extrazellulären Domäne des GH-Rezeptors und wird durch proteolytische Spaltung des Rezeptors gebildet. Durch die Bindung des GH an das Bindungsprotein kann die Halbwertszeit des Hormons ebenso verändert werden wie seine zelluläre Interaktion. Die Sekretion des GH ist vielfältigen Einflüssen unterworfen. Spontan erfolgt die Sekretion pulsatil (1 Puls alle 3 Stunden) mit einem Maximum während des Nachtschlafs. Eine Reihe physiologischer (körperliche Belastung) und pharmakologischer (Hypoglykaemie, Aminosäuren) Stimuli führt zur GH-Sekretion. Die endokrine Regulation der GH-Sekretion erfolgt durch die hypothalamischen Hormone Somatostatin und GH-Releasing Hormon (GHRH). Die sezernierte Menge des GH wird beeinflusst durch Alter, Sexualsteroid, Ernährungszustand, Krankheiten und psychischen Zustand des Probanden. Aufgrund dieser vielfältigen Einflussfaktoren besteht keine eindeutige Klarheit über das normale quantitative Sekretionsverhalten (vergl. Literatur 2 – 5).

Die physiologischen Funktionen von GH sind gleichermaßen vielfältig. Diese Funktionen werden zum Teil durch die vom GH abhängigen Insulin-ähnlichen Wachstumsfaktoren (IGFs), teils unabhängig davon vermittelt. Im Kindes- und Jugendalter ist das GH-System der Hauptregulator des Wachstums. Bei einem völligen Fehlen des GH wird der Mensch nur etwa 120 cm groß. Darüber hinaus hat GH einen ausgeprägten anabolen Effekt auf Muskulatur, Bindegewebe, Knochen und verschiedene spezifische Organe (z.B. Herz, Darm) und wirkt lipolytisch. Die Extreme der GH-Sekretion bestimmen die klinische Pathologie.

Im Kindesalter ist es der Mangel an Wachstumshormon – angeboren oder erworben – welcher zu einem dauerhaften Kleinwuchs führt. Beim klinischen Verdacht muss der GH-Mangel mittels GH Stimulationstest oder durch Untersuchung der spontanen GH-Sekretion bewiesen werden.

Im Erwachsenenalter ist der GH-Mangel meist durch Hypophysenadenome (und ihre chirurgische Entfernung) bedingt. Der GH-Mangel des Erwachsenen kann assoziiert sein mit Adipositas, Muskelschwäche, Atherosklerose, Osteoporose und Adynamie. Die Ersatzbehandlung ist beim schweren GH-Mangel des Erwachsenen eine anerkannte, effektive Therapieform. Die Wirkung der Behandlung wird direkt oder indirekt durch IGF-Messungen im Blut überprüft.

Eine exzessive GH-Sekretion durch ein Hypophysenadenom führt (selten) beim Kind zum Gigantismus, beim Erwachsenen zur sogenannten Akromegalie, welche zur Vergrößerung der Akren sowie langfristig zum Diabetes mellitus, einer Herzinsuffizienz und Tumoren führen kann. Die Therapie besteht in der operativen Entfernung des Tumors. Falls diese nicht oder nur teilweise gelingt, erfolgt eine medikamentöse Therapie mittels Somatostatinpräparaten, welche die GH-Produktion des Tumors beeinträchtigen, oder mittels GH-Analoga wie Pegvisomant (Handelsname Somavert), die mit dem GH-Rezeptor interagieren, jedoch keine Wirkung ausüben.

Die Bestimmung von humanem Wachstumshormon (hGH, Somatotropin) erfolgt im Rahmen der Diagnostik zum Nachweis des Wachstumshormon-Mangels oder des Wachstumshormon-Exzesses (Akromegalie). Während bzw. nach der chirurgischen und/oder medikamentösen Therapie einer Akromegalie werden GH (und IGF-I) Messungen zur Kontrolle eingesetzt.

2 TESTPRINZIP

Der Mediagnost **hGH - SENSITIV ELISA E022** ist ein sogenannter Sandwich-Assay. Er verwendet ein spezifisches, hochaffines polyklonales Kaninchen-Antiserum. Das an die Mikrotiterplatte gekoppelte Antiserum bindet das hGH aus der Probe, welches im nachfolgenden Schritt vom Biotin-konjugierten anti-hGH-Antikörper erkannt wird. Danach bindet ein Streptavidin-Peroxidase-Enzymkonjugat hochspezifisch am Biotin und katalysiert in der abschließenden Substratreaktion den Farbumschlag, quantitativ abhängig vom hGH-Gehalt der Proben.

3 WARNHINWEISE UND VORSICHTSMAßNAHMEN

Der Mediagnost Kit ist nur zur In-vitro-Diagnostik und nicht zur inneren Anwendung bei Menschen und Tier geeignet. Dieses Produkt darf nur exakt wie in der mitgelieferten Anleitung beschrieben eingesetzt werden. Mediagnost GmbH kann nicht für einen eventuellen Verlust oder Schaden haftbar gemacht werden, der durch Nichtbeachtung der Instruktionen entsteht, soweit keine gesetzliche Regelung anderes besagt.

VORSICHT: Dieser Kit enthält Material humanen und/oder tierischen Ursprungs. Die Bestandteile des Kits sind so zu handhaben, als ob sie infektiös wären.

Bitte verwenden Sie keine abgelaufenen, offensichtlich beschädigten, mikrobiell kontaminierten oder ausgelaufenen Reagenzien.

Angemessene Vorsichtsmaßnahmen und die Regeln der guten Laborpraxis müssen bei Lagerung, Gebrauch und Entsorgung der Bestandteile des Kits eingehalten werden. Die Entsorgung der Bestandteile des Kits muss nach den örtlichen Vorschriften erfolgen.

Menschliches Serum:

in folgenden Komponenten enthalten: **Kontrolle CTR**

Das humane Material, das für die Präparation dieses Produktes verwendet wird, wurde mit negativem Ergebnis auf Humanen Immundefizienz-Virus (HIV I und II), Hepatitis B-Oberflächenantigen und Hepatitis C Virus getestet. Da kein Test das Vorhandensein von infektiösen Erregern völlig ausschließen kann, sollten die Reagenzien wie potentiell infektiöses Material gehandhabt werden.

Reagenzien CAL A-E, DET, EC, DIL, WB

enthalten als Konservierungsmittel eine Mischung aus **5-chloro-2-methyl-4-isothiazolin-3-one** und **2-methyl-4-isothiazolin-3-one** (<0,015%)

H317	Kann allergische Hautreaktionen verursachen.
P280	Schutzhandschuhe/ Schutzkleidung/ Augenschutz/ Gesichtsschutz tragen.
P272	Kontaminierte Arbeitskleidung nicht außerhalb des Arbeitsplatzes tragen.
P261	Einatmen von Dampf vermeiden.
P333+P313	Bei Hautreizung oder –ausschlag: Ärztlichen Rat einholen/ ärztliche Hilfe hinzuziehen.
P302+P352	BEI KONTAKT MIT DER HAUT: Mit viel Wasser und Seife waschen.
P501	Entsorgung des Inhalts /des Behälters gemäß den örtlichen / regionalen / nationalen / internationalen Vorschriften.

Substrat S

Das TMB-Substrat S enthält 3,3',5,5' Tetramethylbenzidin (<0.05%)

H315	Verursacht Hautreizungen.
H319	Verursacht schwere Augenreizung.
H335	Kann Atemwege reizen.
P261	Einatmen von Staub/ Rauch/ Gas/ Nebel/ Dampf/ Aerosol vermeiden.
P305+P351+	BEI KONTAKT MIT DEN AUGEN: einige Minuten lang behutsam mit Wasser spülen.
P338	Vorhandene Kontaktlinsen nach Möglichkeit entfernen. Weiter spülen.

Stopplösung STP

Die Stopplösung enthält 0,2 M Schwefelsäure (H₂SO₄)

H290	Kann gegenüber Metallen korrosiv sein.
H314	Verursacht schwere Verätzung der Haut und schwere Augenschäden.
P280	Schutzhandschuhe/ Schutzkleidung/ Augenschutz/ Gesichtsschutz tragen.
P301+P330+	BEI VERSCHLUCKEN: Mund ausspülen.
P331	KEIN Erbrechen herbeiführen.
P305+P351+	BEI KONTAKT MIT DEN AUGEN: einige Minuten lang behutsam mit Wasser spülen.
P338	Vorhandene Kontaktlinsen nach Möglichkeit entfernen. Weiter spülen.
P309+P310	BEI Exposition oder Unwohlsein: Sofort GIFTINFORMATIONSZENTRUM oder Arzt anrufen.

3.1 Erste-Hilfe Maßnahmen:

Nach Hautkontakt: Nach Berührung mit der Haut mindestens 15 Minuten lang mit genügend Wasser abwaschen. Kontaminierte Kleidung und Schuhe wechseln.

Nach Augenkontakt: Nach Berührung mit den Augen mindestens 15 Minuten lang mit genügend Wasser spülen. Ausreichende Spülung durch Spreizung der Augenlider sicherstellen.

Nach Verschlucken: Mund mit Wasser ausspülen, vorausgesetzt die Person ist bei Bewusstsein. Sofort einen Arzt zuziehen.

4 PROBEN

4.1 Probenmaterial

Serum und Plasma

Serum und Heparin/EDTA-Plasma ergeben vergleichbare Werte. In Citrat-Plasma-Proben sind die hGH-Werte wegen der relativ hohen Menge an Antikoagulantien entsprechend reduziert.

4.2 Probenentnahme

Die GH-Sekretion erfolgt pulsatil im Laufe des Tages / der Nacht. Daher ist es klinische Praxis mittels Stimulationstests den Sekretionspeak von GH zu bestimmen.

Das Blut zur Probengewinnung mittels standardmäßiger Venenpunktion entnehmen. Hämolytische Reaktionen sind zu vermeiden.

4.3 Erforderliches Probenvolumen: 10 µL

4.4 Probenstabilität

In fest verschließbaren, geeigneten Probengefäßen

- Lagerung bei 20-25°C 3 Tage
- Lagerung bei -20°C mind. 2 Jahre
- Gefrier-Auftau-Zyklen max. 5

Die Lagerung von Proben über einen Zeitraum von 2 Jahren bei -20°C zeigte keinen Einfluss auf den Messwert. Einfrieren und Auftauen der Proben sollte minimiert werden. 5 Frier-Tauzyklen zeigten keinen Einfluss auf die Proben.

4.5 Interferenz

Triglyceride und Bilirubin in der Probe stören nicht bis zu einer Konzentration von **100 mg/mL** bzw. **200 µg/mL**. Der Einsatz hämolytischer, lipämischer oder ikterischer Proben sollte trotzdem zuvor vom Anwender validiert werden.


4.6 Probenverdünnung

- Verdünnung: **1:26** mit Verdünnungspuffer **DIL**
- Beispiel: **10 µL Probe** werden zu **250 µL** Verdünnungspuffer **DIL** gegeben (Verdünnungsfaktor 26).
- Die verdünnte Probe ist für mindestens eine Stunde stabil.

5 MATERIALIEN

5.1 Inhalt der Testpackung

Die im Kit gelieferten Reagenzien sind ausreichend für 96 Tests einschließlich der Kalibrationskurve.

MTP	Mikrotiterplatte , gebrauchsfertig, beschichtet mit Kaninchen-anti-hGH-Antikörper. Die Vertiefungen sind einzeln abbrechbar.	(8x12) Vertiefungen
A-E	Kalibratoren , lyophilisiert (rekombinantes humanes hGH), die Konzentrationen sind auf den Etiketten und auf dem Qualitätszertifikat in ng/mL angegeben.	5 x 750 µL
CTR	Kontrolle , lyophilisiert, (humanes Serum), die Konzentration ist auf dem Qualitätszertifikat in ng/mL angegeben.	1 x 500 µL
DET	Antikörperkonjugat , gebrauchsfertig, Kaninchen-anti-hGH-Antikörper biotinyliert.	1 x 12 mL
EC	Enzymkonjugat (POD) , gebrauchsfertig, Streptavidin-Peroxidase-Konjugat.	1 x 12 mL
DIL	Verdünnungspuffer , gebrauchsfertig	1 x 120 mL
WB	Waschpuffer 20fach konzentrierte Lösung	1 x 50 mL
S	Substrat , gebrauchsfertig, Meerrettich-Peroxidase (POD)-Substrat, stabilisiertes Tetramethylbenzidin.	1 x 12 mL
STP	Stopplösung , gebrauchsfertig, 0,2 M Schwefelsäure.	1 x 12 mL
-	Abdeckfolie für die Mikrotiterplatte	2 x
	Packungsbeilage	1 x
-	Qualitätszertifikat	1 x

5.2 Nicht mitgelieferte, benötigte Materialien

- Entmineralisiertes Wasser oder destilliertes Wasser (Aqua destillata) (**A. dest.**), 950 mL.
- Mikropipetten und Mehrkanal-Pipetten mit auswechselbaren Einmalspitzen
- Einmalröhrchen aus Polyethylen PE/ Polypropylen PP Röhrchen zum Verdünnen der Proben
- Vortex-Mixer
- Mikrotiterplattenschüttler (350 rpm)
- Mikrotiterplattenwisher (empfohlen)
- Photometer für Mikrotiterplatten ("ELISA-Reader"), Filter bei 450 und. ≥ 590 nm

6 TECHNISCHE HINWEISE

Lagerbedingungen

Nach Erhalt sollte der Test-Kit bei 2 - 8°C (rekonstituierte Reagenzien bei -20°C) bis zum Verfallsdatum gelagert werden. Wiederholtes Einfrieren und Auftauen ist zu vermeiden.

Haltbarkeit

Die Haltbarkeit der Reagenzien **nach Öffnung** beträgt 4 Wochen. Nicht verwendete Streifen **der Testplatte** sind zusammen mit dem Trockenkissen **luftdicht** in dem wiederverschließbaren Klippbeutel bei 2° - 8°C zu lagern. Die Streifen bitte nur in dem mitgelieferten Rahmen verwenden. **Rekonstituierte Komponenten** (Kalibratoren **A – E** und Kontrolle **CTR**) sollten bei -20°C aufbewahrt werden. Zur weiteren Verwendung schnell aber schonend Auftauen (keine Temperaturerhöhung über Raumtemperatur und kein übermäßiges Vortexen), bis zu 3 dieser Einfrier-Auftauzyklen zeigten keinen Einfluss auf den Test. Der 1:20 gebrauchsfertig verdünnte Waschpuffer **WB** ist nur 4 Wochen haltbar.

Vorbereitung der Reagenzien

Alle Komponenten des Kits müssen **vor Gebrauch auf Raumtemperatur** 20-25°C gebracht werden, die evtl. in manchen Puffern vorhandenen Präzipitate müssen vor Gebrauch durch Mischen und Erwärmen wieder gelöst werden. Reagenzien aus Kits mit unterschiedlichen Chargen-Nummern sollten nicht vermischt werden.

Rekonstitution

Die Kalibratoren **A – E** und Kontrolle **CTR** werden mit dem im Kit enthaltenen Verdünnungspuffer **DIL** rekonstituiert. Es empfiehlt sich zum Rekonstituieren die Reagenzien 15 Minuten bei Raumtemperatur stehen zu lassen und sie anschließend kräftig mit einem Vortex-Mixer zu mischen. Schaumbildung sollte jedoch vermieden werden.

Verdünnung

Nach der Rekonstitution wird die Kontrolle **CTR** im gleichen Verhältnis (1:26) wie die Proben mit dem Verdünnungspuffer **DIL** verdünnt.

Das benötigte Volumen des Waschpuffers **WB** wird vorbereitet, indem das 20fach Konzentrat im Verhältnis 1:20 mit Aqua dest. verdünnt wird.

Inkubation

Inkubation bei Raumtemperatur bedeutet: **Inkubation bei 20 - 25°C**. Das Substrat **S**, stabilisiertes Tetramethylbenzidin, ist lichtempfindlich–Aufbewahrung und Inkubation bitte vor Licht geschützt.

Testdurchführung

Die Messungen (Leerwert, Kalibratoren **A-E**, Kontrolle **CTR** und Proben) sollten stets in Doppelbestimmung durchgeführt werden. Um optimale Ergebnisse zu erhalten, ist auf genaues Pipettieren und strikte Befolgung des Testprotokolls zu achten. Bei der Testdurchführung sollten Kalibratoren **A-E**, Kontrolle **CTR** und die jeweiligen Proben möglichst schnell pipettiert werden z.B. in 15 Minuten). Das Enzymkonjugat **EC** sowie nachfolgend das Substrat **S** und die Stopplösung **STP** sollten in der gleichen Reihenfolge und in dem gleichen Zeitintervall auf die Platte zugegeben werden. Dies verhindert Variationen in der Konzentrationsbestimmung durch unterschiedliche Inkubationszeiten.

Schütteln

Die Inkubationen sollen geschüttelt bei mittlerer Umdrehungsfrequenz eines für Mikrotiterplatten geeigneten Schüttlers erfolgen. Wir empfehlen 350 rpm. Bauartbedingt können individuell Abweichungen von diesem Wert möglich sein, dann muss die Umdrehungsfrequenz angepasst werden. Zu geringes Schütteln kann durch ungenügende Vermischung der Lösungen zu verringerten optischen Dichten, hohen Streuungen und/oder falschen Werten führen, zu starkes Schütteln dagegen zu erhöhten optischen Dichten und/oder falschen Werten.

Waschen

Korrektes Waschen ist von grundlegender Bedeutung für den sicheren, richtigen und präzisen Ablauf des Testes. Ungenügendes Waschen ist eine häufige Ursache für nicht valide Testdurchführungen. Mögliche Folgen sind unkontrollierte unspezifische Variationen der gemessenen optischen Dichten, die zu falschen Ergebnisberechnungen der Proben führen können. Mögliche Hinweise darauf sind z.B. hohe Leerwerte und variabel streuende Messwerte. Zum Waschen muss der mitgelieferte und auf Gebrauchskonzentration verdünnte Waschpuffer verwendet werden. Das Waschvolumen pro Waschzyklus und Vertiefung muss mindestens 300 µL betragen.

Bei Gebrauch eines speziellen **automatischen Mikrotiterplattenwashers** ist unbedingt dessen Gebrauchsanweisung zu befolgen. Die Geräteeinstellungen müssen u.a. der Mikrotiterplattengeometrie und den Parametern der Waschspezifikation angepasst werden. Es ist zu beachten, dass die Dispensier- und Absaugkapillaren des Gerätes nicht die Oberfläche der Vertiefungen der Mikrotiterplatte beschädigen. Die verbleibende Restflüssigkeit nach jedem Absaugen muss minimiert werden. Nach Ende des gesamten Waschvorganges sollte die Menge der verbleibenden Restflüssigkeit überprüft und ggfs. verringert werden durch mehrmaliges Ausklopfen der Mikrotiterplatte auf nicht fuselndem Zellstoff.

Manuelles Waschen ist eine gute Alternative. Die Waschflüssigkeit kann dabei per Multistepper, Mehrkanalpipette oder auch mit einer Spritzflasche dispensiert werden. Die Waschflüssigkeit kann durch schwingvolles Ausschwenken der Mikrotiterplatte über einem Becken entfernt werden. Falls Absaugvorrichtungen eingesetzt werden, ist darauf zu achten, dass die Oberflächen der Vertiefungen der Mikrotiterplatte nicht beschädigt werden. Nach jedem einzelnen Waschzyklus sollte die verbleibende Restflüssigkeit durch Ausklopfen der Mikrotiterplatte auf nicht fuselndem Zellstoff gründlich entfernt werden.

7 TESTDURCHFÜHRUNG

Vorbereitung der Reagenzien

Reagenzpräparation:		Rekonstitution:	Verdünnung:
A-E	Kalibratoren	in 750 µL Verdünnungspuffer DIL	-
CTR	Kontrolle	in 500 µL Verdünnungspuffer DIL	1:26 mit Verdünnungspuffer DIL
WB	Waschpuffer Konzentrat	-	1:20 mit Aqua dest. → WB 1:20
Proben mit Verdünnungspuffer DIL 1:26 verdünnen.			
Vor der Testdurchführung alle Reagenzien auf Raumtemperatur (20-25°C) bringen.			
Testdurchführung in Doppelbestimmung:			
Pipettieren	Reagenzien		Position
100 µL	Verdünnungspuffer DIL (Leerwert)		A1/A2
100 µL	Standard A (0,05 ng/mL)		B1/B2
100 µL	Kalibrator B (0,15 ng/mL)		C1/C2
100 µL	Kalibrator C (0,30 ng/mL)		D1/D2
100 µL	Kalibrator D (0,60 ng/mL)		E1/E2
100 µL	Kalibrator E (1,00 ng/mL)		F1/F2
100 µL	Kontrolle CTR (1:26 verdünnt)		G1/G2
100 µL	Probe SPE (1:26 verdünnt)		in die restlichen Vertiefungen nach Bedarf pipettieren
Mit Klebefolie die Vertiefungen dicht abdecken.			
Proben-Inkubation: 2 h bei RT, 350 rpm			
5x 300 µL	Absaugen und die Platte 5x mit je 300 µL Waschpuffer WB 1:20 / Vertiefung waschen.		In jede Vertiefung
100 µL	Antikörperkonjugat DET		In jede Vertiefung
Mit Klebefolie die Vertiefungen dicht abdecken.			
Inkubation: 30 Minuten bei RT, 350 rpm			
100 µL	Enzymkonjugat EC, ohne waschen der Vertiefungen (!) - zur darin befindlichen DET-Lösung dazu pipettieren . Inhalte der Vertiefungen durch leichtes Klopfen auf die Seite der MTP kurz mischen. Achtung: hohes Füllvolumen der Vertiefungen!		In jede Vertiefung
Mit Klebefolie die Vertiefungen dicht abdecken.			
Inkubation: 30 Minuten bei RT, ohne schütteln			
5x 300 µL	Absaugen und die Platte 5x mit je 300 µL Waschpuffer WB 1:20 / Vertiefung		In jede Vertiefung
100 µL	Substrat S		In jede Vertiefung
Substrat S Inkubation: 15 Minuten im Dunklen bei RT			
100 µL	Stopplösung STP		In jede Vertiefung
Messung der Absorption innerhalb von 30 min bei 450 nm (Referenzfilter ≥ 590 nm).			

8 QUALITÄTSKONTROLLE

GLP erfordert, dass mit jeder Kalibrationskurve Kontrollen mitgeführt werden. Um eine ordnungsgemäße Durchführung zu gewährleisten, sollte eine statistisch signifikante Anzahl der Kontrollen untersucht werden, um Mittelwerte und akzeptable Bereiche zu ermitteln. Die Kit-Kontrolle muss innerhalb des zulässigen Bereichs, der auf dem QC-Zertifikat angegeben worden ist, gefunden werden. Wenn die Kriterien nicht erfüllt sind, ist der Test ungültig und sollte wiederholt werden.

8.1 Qualitätskriterien

Zur Auswertung des Testes sollte gewährleistet sein, dass die Extinktionen des Leerwertes 0,25 Einheiten nicht überschreiten, der Kalibrator E sollte dagegen Extinktionen über 1,0 Einheiten erreichen. Proben, die höhere Extinktionen als der Kalibrator E erzielen, liegen außerhalb der Kalibrationskurve, zur sicheren Bestimmung sollten diese Proben in einer zweiten Testdurchführung bei höherer Verdünnung nochmals bestimmt werden.

9 AUSWERTUNG

9.1 Erstellung der Kalibrationskurve

Als Kalibrationsmaterial wurde der 2. Internationaler Standard für hGH, NIBSC Code 98/574 (6), verwendet. Dieser wurde in einer internationalen Studie mit 3 Internationalen Einheiten pro mg Protein (3 IU/mg) definiert. Die ausschließliche Anwendung dieses Kalibrationsmaterials wird im Einklang mit den Standardisierungsbemühungen für hGH-Immunoassays empfohlen (7,8). Die bereitgestellten Kalibratoren enthalten folgende hGH-Konzentrationen:

Kalibrator	A	B	C	D	E
ng/mL	0,05	0,15	0,30	0,60	1,0
pg/mL	50	150	300	600	1000
µIU/mL	0,15	0,45	0,9	1,8	3,0

- 1) Ermittlung des **Mittelwertes** der optischen Dichte des Leerwertes aus den Doppelbestimmungen (Vertiefung A1/A2).
- 1) Von den Mittelwerten der optischen Dichte der Kalibratoren, Kontrollen und der Proben wird der mittlere Leerwert abgezogen.
- 2) Die Kalibratorkonzentrationen (x-Achse) werden gegen die gemessene optische Dichte (y-Achse) aufgetragen.
- 3) Die Berechnung der Kalibrationskurve sollte durch ein statistisches Programm erfolgen, da die Kurve i. Allg. nicht ideal durch eine lineare Regression beschrieben wird. **Ein höhergradiges Polynom, 4-Parameter-Anpassungen** oder **nicht-lineare Regression** sind zur Auswertung geeignet, in manchen Fällen kann eine Spline oder Punkt-zu-Punkt Anpassung angebracht sein.
- 4) Die **Multiplikation** des jeweiligen für die Proben berechneten hGH-Gehaltes mit dem entsprechenden **Verdünnungsfaktor** der Proben ergibt die **hGH-Konzentration in ng/mL** (oder pg/mL, oder µIU/mL, je nach gewählter Einheit der Kalibratoren).

9.2 Beispiel einer typische Kalibrationskurve

Die exemplarischen Daten und die Kalibrationskurve in der Abbildung 1 können **nicht** für die Berechnung der Testergebnisse genutzt werden! Für jeden Test muss eine eigene Kalibrationskurve mitgeführt werden.

Kalibratoren	Leerwert	A	B	C	D	E
ng/mL	0,0	0,05	0,15	0,3	0,6	1,0
OD (450-620 nm)	0,08	0,2955	0,5885	1,1045	1,9935	2,761

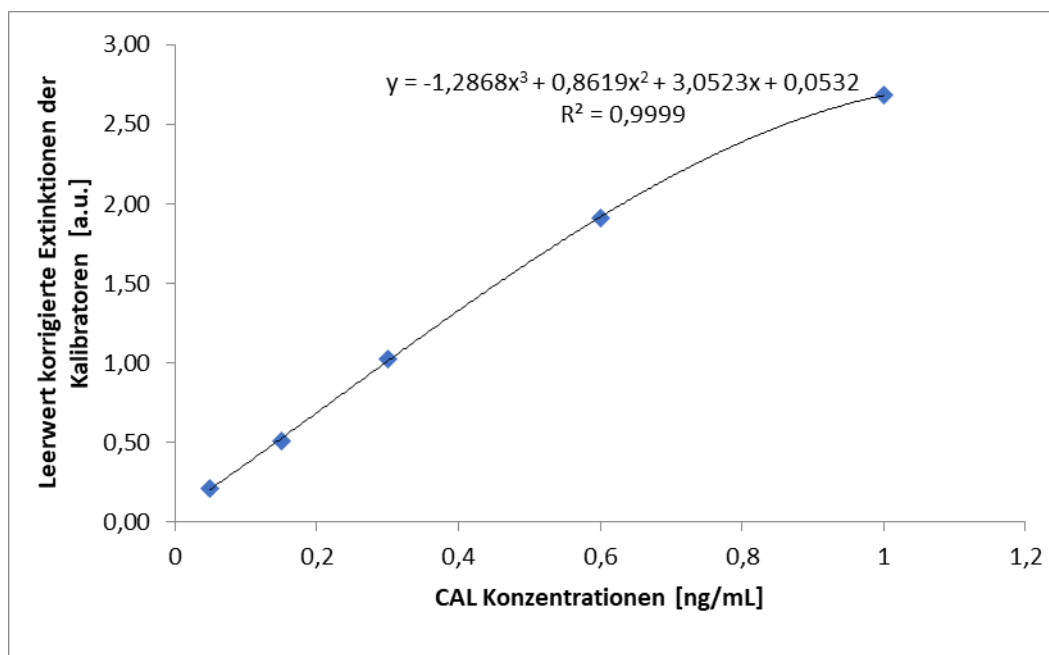


Abbildung 1: Exemplarische Kalibrationskurve

9.3 Beispielhafte Berechnung der hGH-Konzentration

Probenverdünnung: 1:26

Gemessene Extinktion der Probe: 0,25
 Gemessene Extinktion des Leerwertes: 0,08

Aus der Differenz der Proben-Extinktion und der Extinktion des Leerwertes (0,17) **berechnet Ihr Auswertungsprogramm** mit der entsprechenden Kurvenanpassung (hier: Polynom 3. Grades) die hGH-Konzentration der verdünnten Probe durch Auflösen der Gleichung aus Abb. 1 nach x. In diesem Fall ergibt sich eine hGH-Konzentration in der verdünnten Probe von

$$0,17 = -1,2868x^3 + 0,8619x^2 + 3,0523x + 0,0532$$

$$0,035 = x$$

und unter Berücksichtigung des Verdünnungsfaktors (**1:26**) somit eine hGH-Konzentration in der unverdünnten Probe von

$$0,035 \text{ ng/mL} \times 26 = 0,91 \text{ ng/mL}$$

9.4 Interpretation der Ergebnisse

Das Testergebnis allein sollte nicht der einzige Grund für therapeutische Entscheidungen sein. Die Ergebnisse sollten in Bezug auf die Anamnese, weitere klinische Beobachtungen und den Resultaten anderer diagnostischer Untersuchungen interpretiert werden. Darüber hinaus empfehlen wir, dass jedes Labor seine eigenen Referenz-Bereiche ermittelt. Der Grenzwert wird als maximale Wachstumshormonsekretion in mindestens zwei unabhängigen Stimulationsversuchen bestimmt (bspw. Insulin- oder Arginin-Stimulation).

Ein möglicher Wachstumshormonmangel kann bei einem Sekretions-Peak von $< 8 \mu\text{g/L}$ vorliegen, wenn das Testsystem am WHO Standard 98/574 kalibriert wurde.

Es wird empfohlen die internationalen und nationalen Leitlinien zur Diagnostik des Wachstumshormonmangels bzw. der Akromegalie zu beachten.

9.5 Einschränkungen

Die Mediagnost sensitive hGH ELISA E022 basiert auf polyklonalen Kaninchen-Antikörpern. Im Allgemeinen kann diese Technik durch heterophile Antikörper in der Probe beeinflusst werden. Der Einfluss der heterophilen Antikörper wird durch das Assay-Design reduziert, aber kann nicht vollständig ausgeschlossen werden. Die Interferenz von verschiedenen physiologischen und pharmazeutischen Substanzen wurde für die angegebenen Konzentrationen getestet. Höhere Konzentrationen oder andere Substanzen können die Messung stören. Aufgrund der pulsatilen GH-Sekretion ist es klinische Praxis, den GH-Sekretionspeak nach einem Stimulationstest zu bestimmen. Bei der Anwendung eines Cut-off Wertes von $8 \mu\text{g/L}$ im Wachstumshormon-Stimulationstest zur Diagnose eines Wachstumshormonmangels ist in der Literatur eine diagnostische Sensitivität und Spezifität etwa 80 % beschrieben [10], wenn das Testsystem am WHO 98/574 kalibriert wurde.

9.6 Referenzwerte

Aufgrund der pulsatilen Sekretion des humanen Wachstumshormons während des Schlafes können valide Referenzwerte nur schwer bestimmt werden. Hier wurden die hGH-Serumkonzentrationen von 104 gesunden Blutspendern im Alter von 18-69 Jahren ohne eine vorhergehende Stimulation gemessen.

Tabelle 1: Referenzwerte hGH-Serumkonzentrationen von 104 gesunden Blutspendern im Alter von 18-69 Jahren.

	weiblich	männlich
Anzahl	54	50
Median [ng/mL]	0,81	0,28
minimale Konzentration [ng/mL]	0,19	0,15
maximale Konzentration [ng/mL]	10,45	4,34

10 ASSAY EIGENSCHAFTEN UND VALIDIERUNG

10.1 Sensitivität

Die **analytische Sensitivität** des E022 beträgt **0,0115 µg/L** (zweifache Standardabweichung des Null-Kalibrators in 16facher Bestimmung).

10.2 Spezifität

Die Kreuzreaktion mit rekombinatem humanem Prolaktin [200 µg/L] wurde getestet, es wurde keine signifikante Kreuzreaktivität gemessen.

Ferner wurde die Kreuzreaktivität von Pegvisomant (Handelsname Somavert), ein Wachstumshormon-Analogen und Arzneimittel, verwendet in der Therapie der Akromegalie, in unterschiedlichen Konzentrationen getestet. Dazu wurde Pegvisomant in unterschiedlichen Konzentrationen im Verdünnungspuffer (DIL) verdünnt und als Probe eingesetzt. Aus Tabelle 2 wird deutlich, dass kein signifikanter Einfluss von Pegvisomant nachgewiesen werden kann.

Tabelle 2: Zur Ermittlung der **Spezifität** wurde Pegvisomant (Handelsname Somavert) in den angegebenen Konzentrationen im Verdünnungspuffer (DIL) verdünnt und als Probe in E022 eingesetzt. Die Kreuzreaktivität von Pegvisomant wird dargestellt.

Pegvisomant [mg/L]	Konzentration gemessen in E022 [mg/L]	% Kreuzreaktivität
100	0,0114	0,0114
10	0,00845	0,0845
1	0,00436	0,436
0,1	0,00103	1,03
0,01	0,00017	1,7
0,001	0,00006	6
0,0001	0,00004	40

In einer Studie (9) wurde jedoch gezeigt, dass nach Zugabe von Pegvisomant (100 mg/L) zu mit hGH angereicherten Serumproben (2,6 und 10,1 g/L) die gemessenen hGH-Konzentrationen 154% bzw. 108 % der erwarteten Werten betragen.

10.3 Präzision

Intra-Assay-Varianz

Zur Bestimmung der Intra-Assay Variabilität wurde eine Probe 16-mal im gleichen Test eingesetzt. Die Ergebnisse sind in Tabelle 3 dargestellt. Der Variationskoeffizient (VK) ist im Durchschnitt 5,46 %. Die Intra-Assay-Varianz wurde auch extern ermittelt (9). In der Studie wurden zwei Serumproben mit 0,45 und 5,94 µg/L hGH 10-mal innerhalb des gleichen Assays gemessen. Die ermittelten Variationskoeffizienten betragen 3,65 % und 2,16 %

Tabelle 3: Intra Assay Variation

	Anzahl Bestimmungen	Mittelwert (µg/L)	Standardabweichung (µg/L)	VK (%)
Probe 1	16	2,41	0,19	7,99
Probe 2	16	5,84	0,27	4,70
Probe 3	16	14,98	0,55	3,70

Inter-Assay-Varianz

Zur Bestimmung der Inter-Assay Variabilität wurden Serumproben an unterschiedlichen Tagen in unabhängigen Tests gemessen. Im Durchschnitt betrug der Variationskoeffizient **4,34%**. Die Ergebnisse sind im Detail in der Tabelle 4 gezeigt. Auch hier stehen extern

gewonnenen Daten zur Verfügung: Der mittlere Variationskoeffizient für die Inter-Assay-Varianz bei 2,39; 5,37 und 14,33 g/L hGH betrug hier 5,98%, 3,93% und 3,12% (9).

Tabelle 4: Inter Assay Variation

	Anzahl Bestimmungen	Mittelwert (µg/L)	Standardabweichung (µg/L)	VK (%)
Probe 1	14	5,37	0,21	3,93
Probe 2	10	2,39	0,14	5,98
Probe 3	11	14,33	0,45	3,12

10.4 Linearität

Die Linearität wurde durch die Verdünnung von zwei Seren getestet. Die Ergebnisse sind in **Abbildung 2** dargestellt. Die Proben wurden in einem Bereich von 1:10 bis 1:76800 verdünnt. Mittels linearer Regression lässt sich eine Linearität der Probenverdünnung für den Bereich von 1:10 – 1:9600 zeigen.

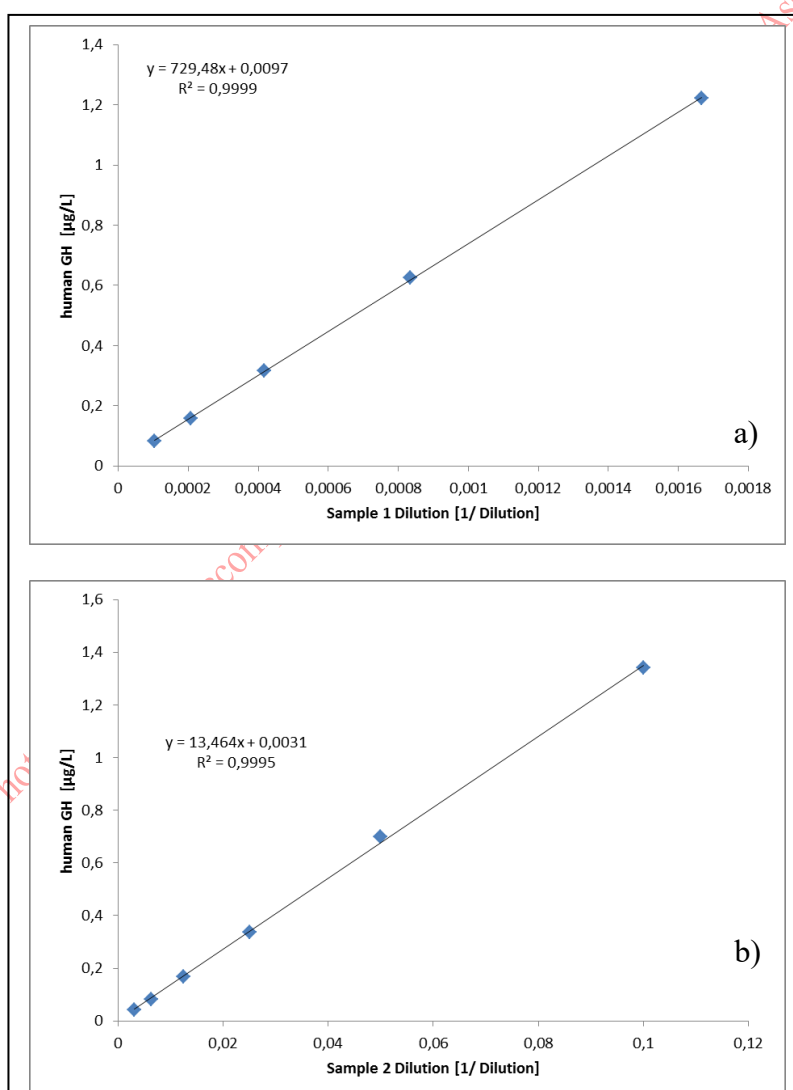


Abbildung 2: Linearität Probenverdünnung. Zwei Proben mit unterschiedlichen hGH-Konzentrationen wurden verdünnt a) 1:600 - 1:9600 b) 1:10 – 1:320 und die hGH-Konzentrationen wurden neu berechnet.

10.5 Wiederfindung und Richtigkeit

Rekombinantes hGH (NIBSC 98/574) wurde in unterschiedlichen Mengen zu humanem Serum zugesetzt. Der hGH-Gehalt der so angereicherten Proben wurde gemessen und mit der hGH-Konzentration in Verdünnungspuffer (DIL) verglichen. Die Ergebnisse sind in der Tabelle 5 gezeigt.

Tabelle 5: Wiederfindung von rekombinantem hGH in Verdünnungspuffer (DIL) und Serum.

NIBSC Rek. hGH ng/mL	DIL		Serum 1		Serum 2	
	ng/mL	%	ng/mL	%	ng/mL	%
20	19,34	96,7	17,51	83,2	17,53	81,9
10	9,81	98,1	9,28	84,0	9,18	80,4
5	5,34	106,7	4,99	82,67	5,9	92,0
0	0	-	1,04	-	1,41	-

10.6 Interferenz

Die Interferenz von Bilirubin und Triglyceriden wurde in [9] (Tabelle 6). Hier zeigten weder Bilirubin (bis zu 200 mg/L) noch Triglyceride (bis 100 g/L) eine signifikante Interferenz mit der hGH-Messung. Die Autoren prüften auch den Einfluss von Wachstumshormon-Bindungsprotein bis zu 10 µg/L auf hGH-Messung. Kein signifikanter Effekt konnte nachgewiesen werden (Mittelwert Wiederfindung 98%). Mediagnost Messergebnisse sind in der Tabelle 7 gezeigt.

Tabelle 6: Interferenz von GHBP auf GH-Messungen. Humanes Serum wurde mit 2, 8 und 20 ng/mL hGH sowie mit jeweils 1, 5 und 10 ng/mL GHBP versetzt und der hGH-Gehalt der Proben bestimmt.

	hGH [µg/L]		
	2	8	20
GHBP [µg/L]	1	1	1
hGH Wiederfindung [%]	95	95	99
GHBP [µg/L]	5	5	5
hGH Wiederfindung [%]	87	95	97
GHBP [µg/L]	10	10	10
hGH Wiederfindung [%]	87	93	95

Tabelle 7: Interferenz von Bilirubin und Triglyceride auf hGH-Messungen.

Bilirubin [mg/L]	hGH Wiederfindung [%]	Triglyceride [g/L]	hGH Wiederfindung [%]
25	111	12,5	89
50	116	25	109
100	112	50	85
200	108	100	110

11 VERGLEICHSTUDIEN

Der Vergleich des Mediagnost hGH ELISA E022 mit einem In house-RIA der Universitätsklinik für Kinder- und Jugendmedizin Tübingen zeigt eine sehr gute Korrelation zwischen den beiden Testsystemen (9) (Abbildung 3).

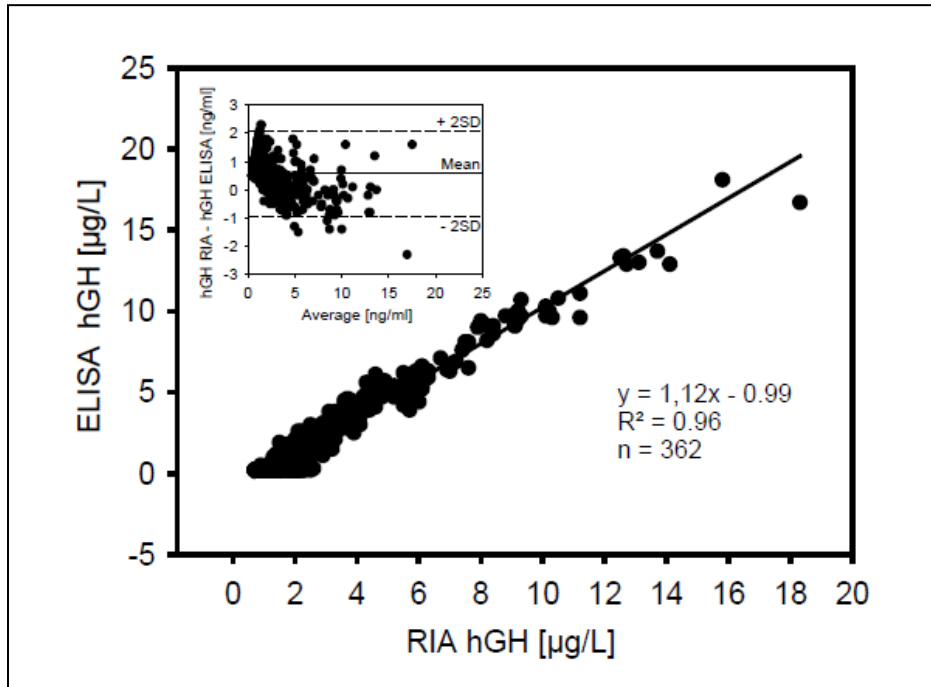


Abbildung 3: Assay Vergleich

Gebrauchsinformation für wissenschaftliche Anwendungen

12 WISSENSCHAFTLICHE ANWENDUNGEN

Neben Serum- und Plasmaproben kann hGH in anderen humanen Körperflüssigkeiten und in **Zellkulturüberständen** verschiedener humaner Zelllinien für wissenschaftliche Zwecke bestimmt werden. Darüber hinaus ist der Mediagnost hGH sensitiv ELISA E022 einsetzbar zur Messung von hGH in getrocknetem Vollblut aus Filterpapier (9).

12.1 Geeignete Proben für Forschungszwecke

Serum, Plasma, Speichel, Vollblutspots auf Filterpapier, Zellkulturüberstand verschiedener humaner **Zelllinien, Urin** (z.B. als hGH-Urin-Ausscheidungstest).

Empfohlene Probenverdünnung von Serum und Plasma in Verdünnungspuffer **DIL: 1:26**.

In den anderen Proben können die hGH-Werte stark variieren, die optimale Verdünnung muss vom Kunden herausgefunden werden.

12.2 Kreuzreaktivität

Die Kreuzreaktivitäten von mehreren handelsüblichen tierischen Seren wurden in diesem Assay getestet.

Dazu wurden die Seren in verschiedenen Verdünnungen (z.B. 1:5 oder 1:26) als Probe in den Mediagnost hGH Sensitiv E022 eingesetzt.

In den Seren der folgenden Arten wurde **KEIN SIGNAL** detektiert:

Esel, Hund, Ziege, Meerschweinchen, Pferd, Ratte, Maus, Kaninchen, Schaf, Katze, Huhn und Pferd.

Aufgrund der pulsativen hGH-Sekretion ist es möglich, dass trotz der vorliegenden Messergebnisse eine Kreuzreaktivität des Testsystems existiert, da keine Informationen zum Abnahmezeitpunkt der Proben vorliegen.

Aus diesem Grund sollte jeder Kunde Proben des von ihm gewählten Tiermodells auf Kreuzreaktivität testen. So konnte ein externes Labor gut messbare Signale in Rinderserum detektieren.

ENGLISH	Instructions for use	21
1	INTENDED USE	21
2	INTRODUCTION	21
3	ASSAY PRINCIPLE	22
4	WARNINGS AND PRECAUTIONS	23
5	SAMPLES	24
6	MATERIALS	25
7	TECHNICAL NOTES	26
8	ASSAY PROCEDURE	27
9	QUALITY CONTROL	28
10	EVALUATION OF RESULTS	28
11	PERFORMANCE CHARACTERISTICS	31
12	COMPARISON STUDIES	34
	Instructions for use for scientific application	35
13	SCIENTIFIC APPLICATION	35
14	LITERATUR / REFERENCES	36
15	Internationale Assay Description	39
16	ASSAY PROCEDURE	40

Exemplary Version - do not use for assay accomplishment / Exemplarische Version nicht zur Assaydurchführung benutzen

hGH sensitive ELISA	96 Determinations
CE	DE/CA40/00809/15/2
Principle of the test	Sandwich ELISA
Duration (incubation period)	3.25 h
Antibody Conjugate	ready for use
Enzyme Conjugate	ready for use
Buffer and Substrate	ready for use
Reference material	2. Internationaler Standard WHO/ NIBSC 98/574, recombinant hGH
Calibrators	5 single calibrators: 0.05 - 1 ng/mL, lyophilized, recombinant hGH
Assay Range	0.0115 - 26 ng/mL
Control	1 control , freeze-dried
Sample	human serum / plasma
Required sample volume	10 µL
Sample dilution	1:26
Analytical sensitivity	0.0115 ng/mL
Intra- / Inter-Assay Variance	< 10%

1 INTENDED USE

The ELISA E022 is intended to be used for quantitative measurement of human growth hormone in human serum and plasma samples.

2 INTRODUCTION

The endocrine system of human Growth Hormone (hGH), also named Somatropin, is characterized by an extreme complexity. hGH is the product of the GH-1 gene located on chromosome 17 and expressed in pituitary cells. 80% of the hGH is a non-glycosylated 22 kDa protein consisting of 191 amino acids. About 20% is a variant form of 20 kDa resulting from alternative splicing. Additionally, several smaller variants can be found in circulation as well as translational modified proteins and different degrees of protein aggregation. Bioactivity of Growth Hormone is regulated by a specific binding protein (GHBP) formed by the extra cellular part of the cellular transmembran GH-receptor. These modifications allow a tight control of the half-life period hGH and of its bioactivity.

Not only synthesis and posttranslational modification but also secretion of hGH is tightly regulated. Spontaneous pulsatile secretion takes place with a single pulse every three hours and a maximal secretion during night's sleep. Several different stimuli as physiologic stress or hypoglycaemia result in additional hGH secretion, induced by the hypothalamic hormones Somatostatin and GH-Releasing Hormone (GHRH). Age, sexual steroids, nutritional status, illness and emotions influence the amount of secreted hGH. Because of the multitude of influencing factors, the normal quantitative secretion is not known (see References 2-5).

Physiological functions are partially exerted by Insulin-like Growth Factors (IGFs). In children and adolescent, the hGH system is the main regulator of growth. If the hGH system fails totally, human growth will end at 120 cm. Beside regulation of growth hGH exerts an anabolic effect on muscle and connective tissue as well as on bone and different other organs (heart, intestine). Further hGH was proved to have a lipolytic effect.

Growth Hormone pathology is characterized by extreme high or extreme low hGH secretion. During childhood it is the Growth Hormone deficiency congenital or acquired, which leads to microsomia. For diagnosis of Growth Hormone deficiency an hGH stimulation test has to be done or the spontaneous excretion must be investigated. The therapy consists of substitution of endogenous Growth Hormone by recombinant hGH resulting in normalization of growth.

In adulthood hGH deficiency is mostly caused by pituitary adenoma (and their surgical excision). hGH deficiency is associated with adipositas, muscle dystrophy, arteriosclerosis, osteoporosis, adynamia. Substitutional therapy is a well-known, approved and efficient therapy of severe Growth Hormone deficiency in adulthood. Therapeutic success is directly as well as indirectly proved by measurement of IGF in serum.

Excessive hGH secretion, mostly caused by pituitary adenoma, results in childhood in gigantism, in adulthood in acromegaly, leading to enlarged extremities, diabetes, heart insufficiency and tumor growth. Surgical excision of the adenoma is the therapy of choice. If tumor excision is not possible or incomplete, a medicinal therapy with somatostatin preparation will be conducted, resulting in inhibition of hGH production. Alternatively, hGH analoga (e.g. Pegvisomat) are used to block the hGH receptor and thereby inhibit action of endogenous hGH. Measurement of human Growth Hormone (hGH, Somatropin) is done for diagnostic of Growth Hormone deficiency or Growth Hormone excess (arcomegaly). During medicinal and/or after surgical therapy of arcomegaly Growth Hormone (and IGF-I) measurement is used for therapy control.

3 ASSAY PRINCIPLE

The Mediagnost hGH SENSITIVE ELISA E022 is a so-called sandwich-assay. It utilizes a specific, high affinity polyclonal rabbit antiserum coated on the wells of a microtiter plate. The hGH in the samples binds quantitatively to the immobilized antiserum. In the following step, the biotinylated antibody in turn binds hGH. After washing, a streptavidin-peroxidase-enzyme conjugate will be added, which will bind highly specific to the biotin of the antibody and will catalyze the substrate to change the color quantitatively depending on the hGH level of the sample.

4 WARNINGS AND PRECAUTIONS

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

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

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

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

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

Human Serum

Following components contain human serum: **Control CTR**

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

Reagents CAL A-E, DET, EC, DIL, WB

Contain as preservative a mixture of **5-chloro-2-methyl-4-isothiazolin-3-one and 2-methyl-4-isothiazolin-3-one** (<0.015%)

H317	May cause an allergic skin reaction.
P280	Wear protective gloves/ protective clothing/ eye protection/ face protection.
P272	Contaminated work clothing should not be allowed out of the workplace.
P261	Avoid breathing dust/ fume/ gas/ mist/ vapours/ spray.
P333+P313	If skin irritation or rash occurs: Get medical advice/ attention.
P302+P352	IF ON SKIN: Wash with plenty of soap and water.
P501	Dispose of contents/ container in accordance with local/ regional/ national/ international regulations.

Substrate S

The TMB-Substrate (S) contains 3,3',5,5' Tetramethylbencidine (<0.05%)

H315	Causes skin irritation.
H319	Causes serious eye irritation.
H335	May cause respiratory irritation.
P261	Avoid breathing dust/ fume/ gas/ mist/ vapours/ spray.
P305+P351+	IF IN EYES: Rinse cautiously with water for several minutes.
P338	Remove contact lenses, if present and easy to do. Continue rinsing.

Stop Solution STP

The Stop Solution contains 0.2 M acid sulphuric acid (H₂SO₄)

H290	May be corrosive to metals.
H314	Causes severe skin burns and eye damage.
P280	Wear protective gloves/ protective clothing/ eye protection/ face protection.
P301+P330+	IF SWALLOWED: rinse mouth.
P331	Do NOT induce vomiting.
P305+P351+	IF IN EYES: Rinse cautiously with water for several minutes.
P338	Remove contact lenses, if present and easy to do. Continue rinsing.
P309+P310	IF exposed or if you feel unwell: Immediately call a POISON CENTER or doctor/physician.

4.1 General first aid procedures:

Skin contact: Wash affected area rinse immediately with plenty of water at least 15 minutes. Remove contaminated cloths and shoes.

Eye contact: In case of contact with eyes, rinse immediately with plenty of water at least 15 minutes. In order to assure an effectual rinsing, spread the eyelids.

Ingestion: After swallowing the product, if the affected person is conscious, rinse out the mouth with plenty of water: seek medical advice immediately.

5 SAMPLES

5.1 Sample type

Serum and Plasma

Serum and Heparin/EDTA Plasma yield comparable values. The hGH levels are reduced in citrate plasma samples, because of the relatively high amount of anticoagulant.

5.2 Specimen collection

Human GH is secreted pulsatile during the day/night. Therefore, in clinical application stimulation test are used to measure peak GH concentrations.

Use standard venipuncture for the blood sampling. Haemolytic reactions are to be avoided.

5.3 Required sample volume: 10 µL

5.4 Sample stability

In firmly closable sample vials

- Storage at 20-25°C: 3 days
- Storage at -20° C: min. 2 years
- Freeze-thaw cycles max. 5

The storage of samples over a period of 2 years at -20°C, showed no influence on the reading. Freezing and thawing of samples should be minimized. 5 Freezing-Thawing showed no effect on samples.

5.5 Interference

Triglyceride and bilirubin in the sample do not interfere to a concentration of 100 mg/mL and 200 µg/mL. However, the use of hemolytic, lipemic or icteric samples should be validated by the user.


5.6 Sample dilution

- Dilution: **1:26** with Dilution Buffer **DIL**
- Pipette **250 µL** Dilution Buffer **DIL** in PE-/PP-Tubes (application of a multi-stepper is recommended in larger series); add **10 µL sample** (dilution 1:26). After mixing use 2 x 100 µL of this dilution in the assay.
- Sample stability after dilution of the sample: at least 1 hour at 20-25°C.

6 MATERIALS

6.1 Materials provided

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

MTP	Microtiter plate , ready for use, coated with rabbit-anti-hGH-antibody. Wells are separately breakable.	(8x12) wells
CAL A-E	Calibrators , lyophilised, (recombinant human hGH), concentrations are given on vial labels and on quality certificate in ng/mL.	5 x 750 µL
CTR	Control , lyophilised, (human serum), concentration is given on quality certificate in ng/mL.	1 x 500 µL
DET	Antibody Conjugate , ready for use, contains rabbit biotinylated anti-hGH antibody.	1 x 12 mL
EC	Enzyme Conjugate , ready for use, contains HRP (Horseradish-Peroxidase)-labelled Streptavidin.	1 x 12 mL
DIL	Dilution Buffer , ready for use	1 x 120 mL
WB	Washing Buffer , 20-fold concentrated solution	1 x 50 mL
S	Substrate , ready for use, horseradish-peroxidase-(HRP) substrate, stabilised Tetramethylbencidine.	1 x 12 mL
STP	Stop Solution , ready for use, 0.2 M sulphuric acid.	1 x 12 mL
-	Sealing Tape , for covering the microtiter plate .	2 x
	Instructions for use	1 x
-	Quality Certificate	1 x

6.2 Materials required, but not provided

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

7 TECHNICAL NOTES

Storage Conditions

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

Storage Life

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

Preparation of reagents

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

Reconstitution

The Calibrators **A – E** and Control **CTR** are reconstituted with the Dilution Buffer **DIL**. It is recommended to keep reconstituted reagents at room temperature for 15 minutes and then to mix them thoroughly but gently (no foam should result) with a Vortex mixer.

Dilution

After reconstitution dilute the Control **CTR** with the Dilution Buffer **DIL** in the same ratio (1:26) as the sample. The required volume of Washing Buffer **WB** is prepared by 1:20 dilution of the provided 20fold concentrate with Aqua dest.

Assay Procedure

When performing the assay, Blank, Calibrators **A-E**, Control **CTR** and the samples should be pipette as fast as possible (e.g. <15 minutes). To avoid distortions due to differences in incubation times, Antibody Conjugate **DET** and the Enzyme Conjugate **EC** as well as the succeeding Substrate **S** should be added to the plate in the same order and in the same time interval as the samples. Stop Solution **STP** should be added to the plate in the same order as Substrate **S**.

All determinations (Blank, Calibrators **A-E**, Control **CTR** and samples) should be assayed in duplicate. For optimal results, accurate pipetting and adherence to the protocol are recommended.

Incubation

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

Shaking

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

Washing

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

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

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

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

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

8 ASSAY PROCEDURE

Preparation of reagents		Reconstitution:	Dilution
CAL A-E	Calibrators	in 750 µL Dilution Buffer DIL	-
CTR	Control	in 500 µL Dilution Buffer DIL	1:26 with DIL
WB	Washing Buffer concentrate	-	1:20 with Aqua dest. → WB 1:20
Sample dilution: with Dilution Buffer DIL 1:26			
Before assay procedure bring all reagents to room temperature 20-25°C .			
Assay Procedure in Double Determination:			
Pipette	Reagents	Position	
100 µL	Dilution Buffer DIL (Blank)	A1/A2	
100 µL	Calibrator A (0.05 ng/mL)	B1/B2	
100 µL	Calibrator B (0.15 ng/mL)	C1/C2	
100 µL	Calibrator C (0.30 ng/mL)	D1/D2	
100 µL	Calibrator D (0.6 ng/mL)	E1/E2	
100 µL	Calibrator E (1.0 ng/mL)	F1/F2	
100 µL	Control CTR (1:26 diluted)	G1/G2	
100 µL	Sample SPE (1:26 diluted)	in the rest of the wells according the requirements	
Cover the wells with the sealing tape.			
Sample Incubation: 2 h at 20-25°C, 350 rpm			
5 x 300 µL	Aspirate the contents of the wells and wash 5 x with 300 µL each Washing Buffer WB 1:20 / well	In each well	
100 µL	Antibody Conjugate DET	In each well	
Cover the wells with the sealing tape.			
Incubation: 30 Minutes at 20-25°C, 350 rpm			
100 µL	Enzyme Conjugate EC , without washing the wells (!) – add to the previously pipetted Antibody Conjugate DET -solution thereto mix shortly through cautious tapping on the side of the MTP . Attention: high filled volume of the wells!	In each well	
Cover the wells with the sealing tape.			
Incubation: 30 Minutes at 20-25°C, without shaking			
5 x 300 µL	Aspirate the contents of the wells and wash 5 x with 300 µL each Washing Buffer WB 1:20 / well	In each well	
100 µL	Substrate S	In each well	
Incubation: 15 Minutes in the Dark at 20-25°C			
100 µL	Stop Solution STP	In each well	
Measure the absorbance within 30 min at 450 nm with ≥ 590 nm as reference wavelength.			

9 QUALITY CONTROL

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

9.1 Quality criteria

For the evaluation of the assay, it is required that the absorbance values of the blank should be below 0.25, and the absorbance of Calibrator E should be above 1.00.

Samples, which yield higher absorbance values than Calibrator E, should be re-tested with a higher dilution.

10 EVALUATION OF RESULTS

10.1 Establishing of the calibration curve

The 2nd International Standard for hGH, NIBSC Code 98/574 (6), was used as calibration material. This was defined in an international study in the year 2001 with 3 International units per mg Protein (3 IU/mg). The exclusive application of this calibration material is recommended in line with the current standardisation efforts for hGH Immunoassays. (7,8)

Calibrator	A	B	C	D	E
ng/mL	0.05	0.15	0.30	0.60	1.0
pg/mL	50	150	300	600	1000
μIU/mL	0.15	0.45	0.9	1.8	3.0

- 1) Calculate the **mean absorbance** value for the blank from the duplicated determination (well A1/A2).
- 2) Subtract the mean absorbance of the blank from the mean absorbances of all other samples, calibrators and control.
- 3) Plot the calibrator concentrations on the x-axis versus the mean value of the absorbance of the calibrators on the y-axis.
- 4) Recommendation: Calculation of the calibration curve should be done by using a computer program, because the curve is in general (without respective transformation) not ideally described by linear regression. **A higher-grade polynomial, or four parametric logistic (4-PL) curve fit or non-linear regression** are usually suitable for the evaluation (as might be spline or point-to-point alignment in individual cases).
- 5) The hGH concentration in ng/mL (or pg/mL, or μIU/mL, according the chosen unit for the calibrators) of the samples can be calculated by **multiplication** with the respective **dilution factor**.

10.2 Example of a typical calibration curve

The following data is for demonstration only and cannot be used in place of data generation at the time of assay.

Calibrator	Blank	A	B	C	D	E
ng/mL	0.0	0.05	0.15	0.3	0.6	1.0
OD(450-620 nm)	0.08	0.2955	0.5885	1.1045	1.9935	2.761

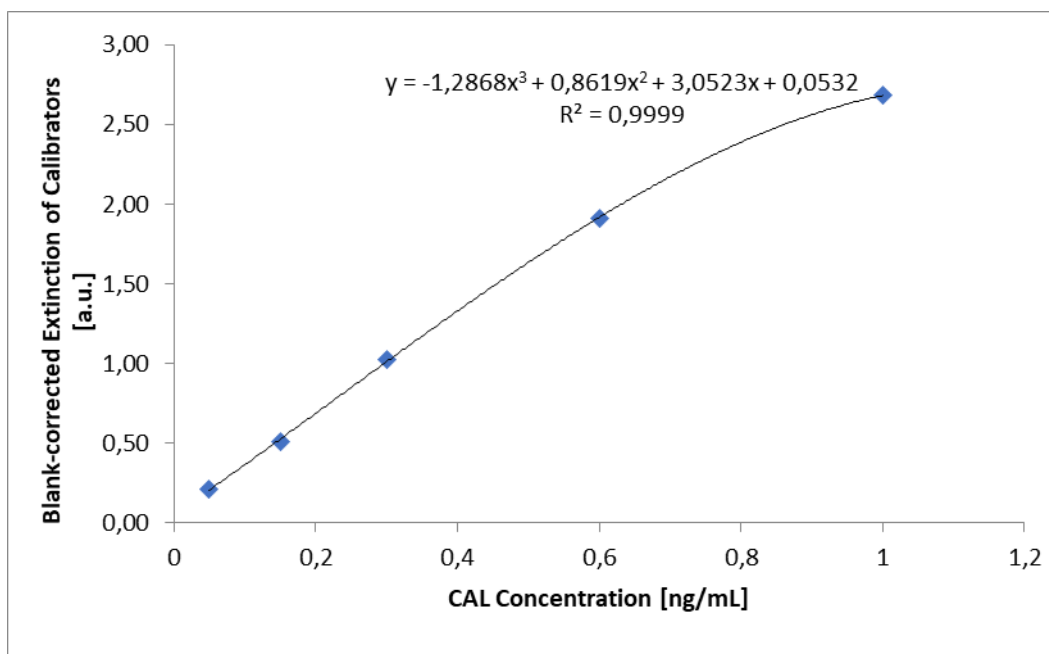


Figure 1: Exemplary calibration curve

The exemplary shown calibration curve in Figure 1 **cannot** be used for calculation of your test results. You have to establish a calibration curve for each test you conduct!

10.3 Exemplary calculation of GH concentrations

Sample dilution: 1:26

Measured extinction of your sample	0.25
Measured extinction of the blank	0.08

Your measurement programm will calculate the hGH concentration of the diluted sample automatically by using the difference of sample and blank for the calculation. You only have to determine the most suitable curve fit (here: polynomial 3rd degree).

In this exemplary case the following equation is solved by the program to calculate the hGH concentration in the sample:

$$0.17 = -1.2868x^3 + 0.8619x^2 + 3.0523x + 0.0532$$

$$0.035 = x$$

If the dilution factor (**1:26**) is taken into account the hGH concentration of the undiluted sample is

$$0.035 \text{ ng/mL} \times 26 = 0.91 \text{ ng/mL}$$

10.4 Interpretation of results

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

Usually, the cut-off value is determined as a maximal peak of growth hormone secretion in at least 2 independent stimulation assays (e.g., insulin or arginine stimulation). If the used test system is calibrated to WHO standard 98/574 a secretion peak of less than **8 ng/mL indicates** a possible growth hormone deficiency. But as growth hormone secretion is continuous between normal and pathological any cut-off is only a non-binding benchmark.

It is recommended to consider the international and national guidelines for diagnosis and treatment of growth hormone deficiency / acromegaly.

10.5 Limitation of procedure

The Mediagnost sensitive human Growth-Hormone ELISA, E022 is based on polyclonal rabbit antibodies. Generally, this technique is sensible to heterophilic antibodies in the sample. The influence of heterophilic antibodies is reduced by assay design, but cannot be excluded completely.

Interference of several physiological and pharmaceutical substances has been tested for the indicated concentrations. Higher concentrations or other substances may interfere with the measurement.

If a cut-off of 8 µg/L is used in the growth hormone stimulation test for diagnosis of growth hormone deficiency and the test system is calibrated against the WHO 98/574 standard, literature states a diagnostic sensitivity and specificity about 80%, if all clinical preconditions for testing are fulfilled (10).

10.6 Reference values

As growth hormone is secreted pulsatile mainly enduring the night sleep valid normal values can hardly be determined. Standard procedures are arginine or insulin stimulation tests, after injection of stimulating substance growth hormone concentration is measured over a period of time. We investigated hGH serum concentration of 104 healthy blood donors in the age of 18-69 years without any stimulation and undefined sampling time.

Table 1: Reference values hGH serum concentration of 104 healthy blood donors

	female	male
number	54	50
median [ng/mL]	0.81	0.28
minimal concentration [ng/mL]	0.19	0.15
maximal concentration [ng/mL]	10.45	4.34

The results alone should not be the only reason for any therapeutic consequences. The results should be correlated to other clinical observations and diagnostic tests. Furthermore, we recommend that each laboratory determine its own range for the population tested.

11 PERFORMANCE CHARACTERISTICS

11.1 Sensitivity

Sensitivity was assessed by measuring the blank and calculating the theoretical concentration of the blank + 2SD. The analytical sensitivity of the E022 is 0.0115 µg/L.

11.2 Specificity

Cross reactivity with recombinant human Prolactin has been tested and no significant signal was measured in an enriched serum sample containing 200 µg/L Prolactin.

Further, Pegvisomant (trade name Somavert), a growth hormone analogue and drug used in acromegaly therapy, has been tested for cross-reactivity in assay buffer in different concentrations. Here no significant influence of Pegvisomant was detected (Table 2).

Table 2: To determine the **specificity** Pegvisomant (trade name Somavert) was diluted in the Dilution Buffer (DIL) at the indicated concentrations and used as a sample in E022. The cross-reactivity of Pegvisomant is presented.

Pegvisomant [mg/L]	Concentration measured in E022 [mg/L]	% Cross-reactivity
100	0.0114	0.0114
10	0.00845	0.0845
1	0.00436	0.436
0.1	0.00103	1.03
0.01	0.00017	1.7
0.001	0.00006	6
0.0001	0.00004	40

However, a study (9) showed that, after the addition of Pegvisomant (100 mg/L) to serum samples with enriched with hGH (2.6 and 10.1 g/L), the measured concentrations of hGH were 154% and 108% of the expected values.

11.3 Precision

Intra-Assay-Variation

One sample has been measured 14 times in the same assay. The results are shown in Table 3. The measured coefficient of variation (CV) is 5.46%. Intra assay variance has also been evaluated externally (9), two serum samples with 0.45 and 5.94 µg/L hGH were measured 10 times within the same assay. The resulting coefficients of variation were 3.65% and 2.16%

Table 3: Intra-Assay Variation

	Number of determinations	Mean value (µg/L)	Standard deviation (µg/L)	VC (%)
Sample 1	16	2.41	0.19	7.99
Sample 2	16	5.84	0.27	4.70
Sample 3	16	14.98	0.55	3.70

Inter Assay Variance

Serum samples were measured in independent assays. On average the coefficient of variation was 4.34%. Results are shown in detail in table 4. Here also externally acquired data are available: The mean coefficient of variation for inter-assay variance at 2.39; 5.37 and 14.33 µg/L hGH was 5.98%; 3.93% and 3.12%, respectively (9).

Table 4: Inter-Assay Variation

	Number of single determinations	Mean value (µg/L)	Standard deviation (µg/L)	VC (%)
Sample 1	14	5.37	0.21	3.93
Sample 2	10	2.39	0.14	5.98
Sample 3	11	14.33	0.45	3.12

11.4 Linearity

Linearity of the E022 was tested by dilution of 2 different serum samples. The samples were diluted in the range of 1:10 to 1:76800. Linearity of sample dilution was shown by linear regression in the dilution range of 1:10 - 1:9600 (Figure 2).

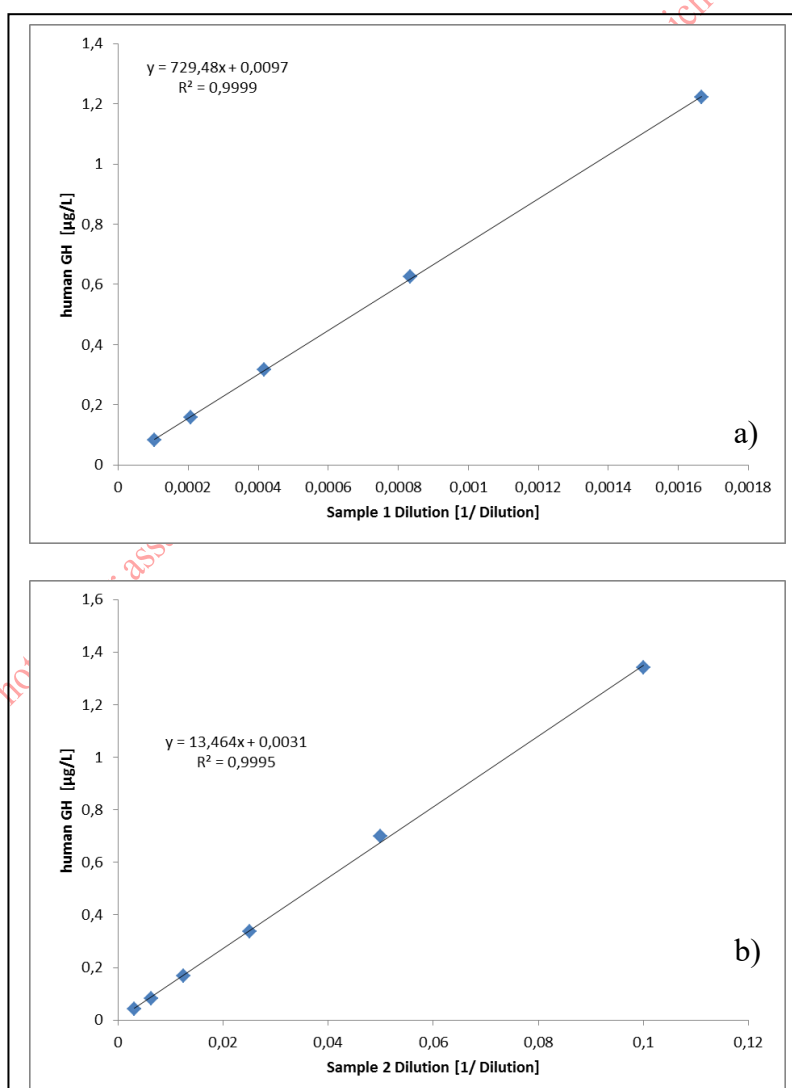


Figure 2: Linearity sample dilution. Two samples with different hGH concentrations were diluted a) 1:600 - 1:9600 b) 1:10 - 1:320. The hGH concentrations were recalculated.

11.5 Recovery and Accuracy

Recombinant human Growth Hormone (NIBSC 98/574) was added in different amounts to human serum. The hGH content of the so enriched samples was measured and recovery in comparison to enriched Dilution Buffer (DIL) calculated. Results are shown in table 5.

Table 5: Recovery of recombinant human GH in Serum

NIBSC Rec. hGH	DIL		Serum 1 PAA539		Serum 2 PAA 574	
	ng/mL	%	ng/mL	%	ng/mL	%
20	19.34	96.7	17.51	83.2	17.53	81.9
10	9.81	98.1	9.28	84.0	9.18	80.4
5	5.34	106.7	4.99	82.67	5.9	92.0
0	0	-	1.04	-	1.41	-

11.6 Interference

Interference of bilirubin and triglycerides has been tested in [9]. Here neither bilirubin (up to 200 mg/L) nor triglycerides (up to 100 g/L) showed a significant interference with hGH measurement (Table 6). The authors also tested the influence of growth hormone binding protein up to 10 µg/L on hGH measurement and haven't seen a significant effect (mean recovery 98%). Mediagnost data are shown in Table 7.

Table 6: Interference of GHBP on GH measurement

	hGH [µg/L]		
	2	8	20
GHBP [µg/L]	1	1	1
hGH Recovery [%]	95	95	99
GHBP [µg/L]	5	5	5
hGH Recovery [%]	87	95	97
GHBP [µg/L]	10	10	10
hGH Recovery [%]	87	93	95

Table 7: Interference of Bilirubin and Triglycerides on GH measurement

Bilirubin [mg/L]	hGH Recovery [%]	Triglycerides [g/L]	hGH Recovery [%]
25	111	12.5	89
50	116	25	109
100	112	50	85
200	108	100	110

12 COMPARISON STUDIES

Langkamp et al Growth Horm IGF Res 18 (2008) 526-532 compared an in-house assay used for hGH measurements for years with the Mediagnost E022 (9). Results show a very good comparability and thus cut-off values established by the in house-assay can also be used with the Mediagnost E022 (see Figure 3).

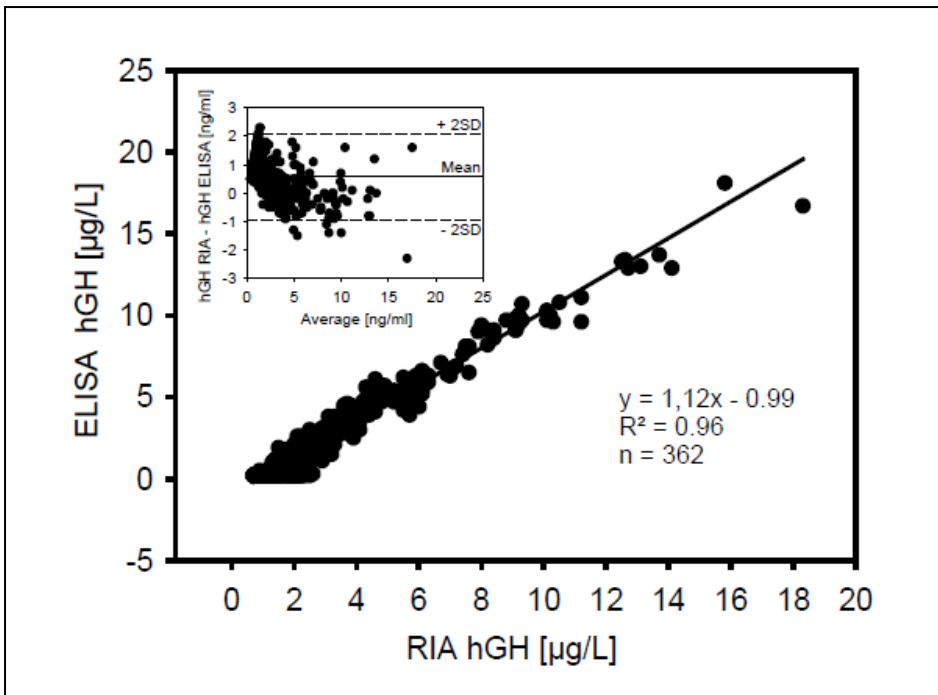


Figure 3: Assay Comparison

ht zur Assaydurchführung benutzen

Exemplary Version - do not use for assay accomplishment / Exemplary

Instructions for use for scientific application

13 SCIENTIFIC APPLICATION

In addition to serum and plasma samples hGH can be determined in other human body fluids and in cell culture supernatants of various human cell lines for research purposes. Additionally this hGH Sensitive ELISA E022 can be used for measurement of hGH in filter paper samples, which has been validated externally (9).

13.1 Samples suitable for scientific application

Serum, plasma, saliva, whole blood spots on filter paper, cell culture supernatant of different human cell lines and urine (e.g. hGH urine–excretion test)

The recommended dilution for serum and plasma samples in Dilution Buffer **DIL: (1:26)**.

In the other samples, the hGH levels can vary considerable, the optimal dilution must be found out by the customer.

13.2 Species Cross-Reactivity

Several commercially available animal sera have been tested as samples in different dilutions (1:5 or 1:26) in this assay.

No signal was detected in serum of the following species: donkey, dog, goat, guinea pig, horse, rat, mouse, rabbit, sheep, cat, chicken and horse.

Whether this obvious non-reactivity is species specific should be assessed individually by each customer. We remind each customer that hGH secretion is pulsatile and thus commercially available animal serum samples may not be taken at the ideal daytime. An external laboratory was able to find good measurable signals in bovine serum.

14 LITERATUR / REFERENCES

Literature

- 1) Hauffa BP, Lehmann N, Bettendorf M, Mehls O, Dörr H-G, Partsch C-J, Schwarz HP, Stahnke N, Steinkamp H, Said E, Sander S, Ranke MB and participating Members of the German KIGS/IGLU Study Group (2004); Central reassessment of growth hormone concentrations measured at local treatment centers in children with impaired growth: consequences for patient management. *European Journal of Endocrinology* 150: 291 – 297
- 2) Baumann G (1991) Growth hormone heterogeneity: Genes, Isohormones, variants and binding protein. *Endocr Rev* 12:424-449
- 3) Clemmons DR, Chihara K, Freda PU, Ho KKY, Klibanski A, Melmed S, Shalet S, Strasburger CJ, Trainer PJ, Thorner MO (2003) Optimizing control of acromegaly: Integrating a growth hormone receptor antagonist into the treatment algorithm. *J Clin Endocrinol Metab* 88:4759-4767
- 4) Ranke, MB, Örskov H, Bristow AF, Seth J, Baumann (1999) Consensus on how to measure growth hormone in serum. *Horm res* 51 (Suppl.1):27-29
- 5) Ranke MB (2003) Diagnosis of growth hormone deficiency and growth hormone stimulation tests. In: *Diagnostics of Endocrine Function in Children and Adolescents* (3rd ed., Michael B Ranke, Herausg.) Basel, Karger pp 107-128
- 6) Adresse NIBSC: National Institute for Biological Standards and Controls, Blanche Lane, South Mimms, Potters Bar, Hertfordshire EN6 3QG, Great Britain
- 7) Strasburger CJ (2004) Taking one step at a time *Clin. Endocrinology* 60, 540
- 8) Wieringa GE, Barth JH, Trainer PJ (2004) Growth Hormone assay standardization: a biased view ? *Clin. Endocrinology* 60, 538 – 539
- 9) Langkamp M, Weber K, Ranke MB. Human growth hormone measurement by means of a sensitive ELISA of whole blood spots on filter paper. *Growth Horm IGF Res.* 2008 Dec;18(6):526-32. Epub 2008 Jun 24
- 10) S3-Leitlinie. Diagnostik des Wachstumshormonmangels im Kindes- und Jugendalter *Endokrinologie Informationen* 33 (2009) 3

Exemplary Version - do not use for assay accomplishment / Exemplarische Version nicht zur Assaydurchführung benutzen

15 Internationale Assay Description

International Test description

CAL A-E	Rec in 750 µL DIL	-
CTR	Rec in 500 µL DIL	1:26 DIL
WB 20x	-	1:20 A. dest. → WB 1:20
SPE		1:26 DIL
°C 20-25°C		
100 µL	DIL	A1/A2
100 µL	CAL A (0.05 ng/mL)	B1/B2
100 µL	CAL B (0.15 ng/mL)	C1/C2
100 µL	CAL C (0.30 ng/mL)	D1/D2
100 µL	CAL D (0.60 ng/mL)	E1/E2
100 µL	CAL E (1.00 ng/mL)	F1/F2
100 µL	CTR 1:26 DIL	G1/G2
100 µL	SPE 1:26 DIL	
TAPE		
 2 h °C 20-25°C  350 rpm		
5x 300 µL		5x WB 1:20
100 µL		DET
TAPE		
 0.5 h °C 20-25°C  350 rpm		
100 µL		EC
TAPE		
 0.5 h °C 20-25°C		
5x 300 µL		5x WB 1:20
100 µL		S
 0.25 h °C 20-25°C 		
STP		
MEASURE		

Exemplary Version - do not use for assay accomplishment / Exemplarische Version nicht zur Assaydurchführung benutzen

16 ASSAY PROCEDURE

Preparation of reagents		Reconstitution:	Dilution
CAL A-E	Calibrators	in 750 µL Dilution Buffer DIL	-
CTR	Control	in 500 µL Dilution Buffer DIL	1:26 with DIL
WB	Washing Buffer concentrate.	-	1:20 with Aqua dest. → WB 1:20
Sample dilution: with Dilution Buffer DIL 1:26			
Before assay procedure bring all reagents to room temperature 20-25°C .			
Assay Procedure in Double Determination:			
Pipette	Reagents	Position	
100 µL	Dilution Buffer DIL (Blank)	A1/A2	
100 µL	Calibrator A (0.05 ng/mL)	B1/B2	
100 µL	Calibrator B (0.15 ng/mL)	C1/C2	
100 µL	Calibrator C (0.30 ng/mL)	D1/D2	
100 µL	Calibrator D (0.6 ng/mL)	E1/E2	
100 µL	Calibrator E (1.0 ng/mL)	F1/F2	
100 µL	Control CTR (1:26 diluted)	G1/G2	
100 µL	Sample SPE (1:26 diluted)	in the rest of the wells according the requirements	
Cover the wells with the sealing tape.			
Sample Incubation: 2 h at 20-25°C, 350 rpm			
5 x 300 µL	Aspirate the contents of the wells and wash 5 x with 300 µL each Washing Buffer WB 1:20 / well	In each well	
100 µL	Antibody Conjugate DET	In each well	
Cover the wells with the sealing tape.			
Incubation: 30 Minutes at 20-25°C, 350 rpm			
100 µL	Enzyme Conjugate EC , without washing the wells (!) – add to the previously pipetted Antibody Conjugate DET -solution thereto mix shortly through cautious tapping on the side of the MTP . Attention: high filled volume of the wells!	In each well	
Cover the wells with the sealing tape.			
Incubation: 30 Minutes at 20-25°C, without shaking			
5 x 300 µL	Aspirate the contents of the wells and wash 5 x with 300 µL each Washing Buffer WB 1:20 / well	In each well	
100 µL	Substrate S	In each well	
Incubation: 15 Minutes in the Dark at 20-25°C			
100 µL	Stop Solution STP	In each well	
Measure the absorbance within 30 min at 450 nm with ≥ 590 nm as reference wavelength.			