

hGH - SENSITIVE ELISA

Enzymimmunoassay für die hochsensitive quantitative Bestimmung von
humanem Wachstumshormon

Deutsch

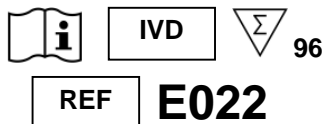
Enzyme Immunoassay for high sensitive quantitative Determination of
human Growth Hormone

English

Europäische Union / European Union* ;
United States of America** ;
für In-vitro-Diagnostik / for in-vitro diagnostics
Rest of the world: for research use only!



DE/CA40/00809/15-1





























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>

Symbols / Symbole

according to DIN EN 980 and EDMA recommendations Standard News 6 2001

	Expiry date / Verfallsdatum / Date de péremption / Data di scadenza / Fecha de caducidad / Data de validade / Uiterste gebruiksdatum / Udløbsdato / Utgångsdatum / Termin Wažności / Lejárati idő / Doba expirácie / Doba expirace
	Consider instructions for use / Bitte Gebrauchsanweisung beachten / Consultez la notice d'utilisation / Consultare le istruzioni per l'uso / Consulte las instrucciones de utilización / Consulte as instruções de utilização / Raadpleeg de gebruiksaanwijzing / Se brugsanvisningen / Läs anvisningarna före användning / Proszę przeczytać instrukcję wykonania / Vegyük figyelembe a használati utasításban foglaltakat / Postupujte podľa pokynov na použitie / Postupujte dle návodu k použití
	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 orvosdiagnosztikai termék / In vitro diagnostický zdravotnícký materiál (určené pre diagnostiku „in vitro“) / In vitro diagnostický zdravotnícký materiál (určeno pro diagnostiku „in vitro“)
	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 / Lot-Satskod / Numer serii / Lot-Batch szám / Číslo šarže / Číslo šarže
	Manufactured by / Hergestellt von / Fabriqué par / Prodotto da / Fabricado por / Fabricado por / Vervaardigd door / Fabrikation af / Tillverkad av / Wyprodukowane pr / Gyártotta / Vyrobene / Vyrobeno
	Catalogue Number / Bestellnummer / Numéro de référence / Numero di riferimento / Número de referencia / Número de referência / Referentienummer / Referencenummer / Katalognummer / Numer katalogowy / Katalógusszám / Katalógové číslo / Katalogové číslo
	Store at between / Lagerung bei zwischen / Conservare a tra / Conservar a temp. entre / Armazene a entre / Bewaar bij tussen / Opbevares mellem / Förvaras vid / Przechowywać w / Tároljuk ő ő között / Skladujte v rozsahu / Skladujte v rozmezí
	Contains sufficient for x tests / Inhalt ausreichend für x Tests / Contient suffisant pour x tests / Contenuto sufficiente per x test / Contiene suficiente para x pruebas / Contém 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 / Obsahuje materiál pro x testů
	Keep away from sunlight / Nicht dem Sonnenlicht aussetzen
	Incubation time / Inkubationszeit
	Incubate at / Inkubation bei
	Shaking / schütteln
	Mikrotiter plate/Mikrotiterplatte
	Reconstitute in / Rekonstituieren in
	Sample / Probe
	AK Antibody Conjugate / Antikörperkonjugat
	EK Enzyme Conjugate / Enzymkonjugat
	VP Dilute in Buffer X / Verdünnen in Puffer X
	A-E Standard X / Standard X
	KS Control Serum / Kontrollserum
	WP Washing Buffer Concentrate / Waschpufferkonzentrat
	Washing Buffer / Waschpuffer
	S Substrate / Substrat
	SL Stop Solution / Stopplösung
	Cover Plate with sealing tape / Platte abkleben
	Measure plate within 30 min at 450 nm (Referencefilter ≥590nm) / Ausmessung innerhalb von 30 min bei 450 nm (Referenzfilter ≥ 590 nm).

Packungsbeilage Deutsch

Inhaltsverzeichnis

Symbols / Symbole	2
TECHNISCHE EIGENSCHAFTEN + EINSATZMÖGLICHKEITEN	4
EINFÜHRUNG	4
METHODIK	5
Assay Eigenschaften und Validierung	5
Proben: Eignung, Vorbereitung und Lagerung	6
MATERIALIEN	6
Inhalt der Testpackung	6
Zusätzlich benötigte Materialien	7
TECHNISCHE HINWEISE	7
WARNHINWEISE UND VORSICHTSMAßNAHMEN	8
TESTDURCHFÜHRUNG	9
AUSWERTUNG	9
Berechnung der Standardkurve	9
Interpretation der Ergebnisse	10
Referenzwerte	10

Package Insert

Table of Contents

Symbols / Symbole	2
INTRODUCTION	11
PRINCIPLE	12
WARNINGS AND PRECAUTIONS	12
REAGENTS PROVIDED	13
MATERIALS REQUIRED BUT NOT PROVIDED	14
REAGENT PREPARATION	14
STORAGE CONDITIONS	14
SPECIMEN COLLECTION, PREPARATION, AND STORAGE	14
ASSAY PROCEDURE	15
QUALITY CONTROL	15
CALCULATION OF RESULTS	16
Establishing the Standard Curve	16
INTERPRETATION OF RESULTS	16
EXPECTED NORMAL VALUES	16
PERFORMANCE CHARACTERISTICS	17
LITERATUR / LITERATURE	17
KURZANLEITUNG – Mediagnost hGH-SENSITIV-ELISA E022	18
SUMMARY – MEDIAGNOST hGH-SENSITIVE ELISA E022	19
REF E022 International Test description	20

* please ask for package inserts in your national language

** please ask for special package insert

PACKUNGSBEILAGE DEUTSCH

KLINISCHE BEDEUTUNG

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

TECHNISCHE EIGENSCHAFTEN + EINSATZMÖGLICHKEITEN

Der Mediagnost **hGH ELISA E022**

- ist geeignet für hGH-Bestimmungen in **Serum-** und **Plasmaproben** (native Proben, hGH Profilmessungen, Proben aus Stimulations- bzw. Suppressionstesten)
- ist durch die hohe **Sensitivität** (0,0016 ng/ml \cong 1,6 pg/ml) sehr geeignet für Messungen in **Zellkulturen** und in **Nicht-Serumproben (z.B. hGH-Urin-Ausscheidungsteste)**
- ist gegen den **Referenzassay** der KIGS/IGLU Studie, in house-RIA der Kinderklinik Tübingen, kalibriert (vergl. Lit. 1.)
- ist schnell: Inkubationszeit insgesamt nur 3,5 Stunden
- ist kalibriert mit rekombinantem hGH (Internationaler Standard, **NIBSC 98/574**; vergl. Lit. 6.):
- Einzel-Standards mit **50, 150, 300, 600 bzw. 1000 pg/ml** sind im Kit enthalten
Kontrollserum KS besteht aus humanem Serum
- verwendet hochaffine polyklonale Antikörper gegen 22kDa rekombinantes hGH

EINFÜHRUNG

(vergl. Literatur 2 – 5)

Das System des Wachstumshormons (Synonyme: Somatropin, Growth Hormone [GH]) ist durch eine außerordentliche Komplexität gekennzeichnet. Wachstumshormon ist das Genprodukt des GH-1 Gens auf Chromosom 17 der somatotropen Hypophysenzellen. Das Genprodukt (80%) ist ein nicht-glycosyliertes Protein von 22kDa (191 Aminosäuren). Durch einen alternativen Syntheseweg wird auch eine 20 kDa große GH-Variante (20%) gebildet. Darüber hinaus gibt es eine Vielfalt kleinerer Varianten, posttranslationale Veränderungen und Aggregate in der Zirkulation. Im Blut liegt GH zudem auch an ein GH-Bindungsprotein (GHBP) gebunden vor, welches die extrazelluläre Domäne des membranständigen GH-Rezeptors ist. Hierdurch kann die Halbwertszeit des Hormons ebenso verändert werden wie seine zelluläre Interaktion. Wachstumshormon ist spezie-spezifisch. Die Sekretion des GH ist ebenso 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 artifizierlicher (Hypoglykaemie, Aminosäuren) Reize führt zur GH-Sekretion, vermittelt durch die hypothalamischen Hormone Somatostatin und GH-Releasing Hormon (GHRH). Die sezernierte Menge des GH wird beeinflusst durch das Alter, Sexualsterioide, den Ernährungszustand, Krankheitszustände und Emotionalität. Wegen dieser vielfältigen Einflussvarianten besteht keine eindeutige Klarheit über das normale quantitative Sekretionsverhalten.

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. Die Ersatztherapie mit rekombinantem menschlichen GH führt zur Normalisierung des Wachstums. Im Erwachsenenalter ist der GH Mangel meist durch Hypophysenadenome (und ihre chirurgische Entfernung) bedingt. Der GH Mangel des Erwachsenen führt zu einem typischen Krankheitsbild, welches einem vorgezogenen Alterungsprozess entspricht (Adipositas, Muskelschwäche, Atherosklerose, Osteoporose, 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 inkomplett gelingt, erfolgt eine medikamentöse Therapie mittels Somatostatinpräparaten, welche die GH Produktion des Tumors beeinträchtigen, oder neuerdings mittels GH Analogen wie Pegvisomant, welche mit dem GH Rezeptor interagieren, jedoch keine Wirkung ausüben.

METHODIK

Assay Eigenschaften und Validierung

Der Mediagnost SENSITIV ELISA für hGH 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 biotinylierten anti-hGH-Antiserum erkannt wird. Danach bindet ein Streptavidin-Peroxidase-Enzymkonjugat hochspezifisch am Biotin des anti-hGH-Antiserums und katalysiert in der abschließenden Substratreaktion den Farbumschlag, quantitativ abhängig vom hGH-Gehalt der Proben. Die Standards des SENSITIV ELISA E022 bestehen aus rekombinantem humanem Wachstumshormon in Konzentrationen von 50, 150, 300, 600 bis 1000 pg/ml (pico Gramm/ml, entspricht 0,05 bis 1 ng/ml). Als Standardmaterial wurde der Internationale Standard für hGH, **NIBSC Code 98/574** verwendet (6). Dieser wurde in einer internationalen Studie im Jahre 2001 mit 3 Internationalen Einheiten pro mg Protein (3 IU/mg) definiert. **Im Rahmen aktueller Standardisierungsbemühungen für hGH Immunoassays wird neuerdings dessen ausschließliche Verwendung empfohlen (7,8) !**

Die **Wiederfindung** des rekombinanten hGH betrug in einer Puffermatrix 100%. In verschiedenen Human-Seren wurden serum-abhängig davon abweichend im Durchschnitt 94 % der theoretisch zu erwartenden Menge gefunden.

Der Mediagnost hGH ELISA E022 ist über einen sehr weiten Bereich verdünnungsecht. Die Linearität von Serenverdünnungen ist hervorragend:

Tabelle 1: Verdünnungslinearität (hier: typische Ergebnisse zweier verschiedener Seren)

Verdünnung:	Probe 1	Verdünnung:	Probe 2
1:10	13,40	1:600	733,0
1:20	13,96	1:1200	749,8
1:40	13,50	1:2400	759,8
1:80	13,47	1:4800	756,7
1:160	13,35	1:9600	797,3
1:320	13,50		
MW / 1SA	13,53 / 0,219	MW / 1SA	759,3 / 23,6

MW = Mittelwert, SA = Standardabweichung

Die **analytische Sensitivität** des hGH SENSITIV ELISA E022 beträgt **0,0016 ng/ml** (entsprechend 1,6 pg/ml, entsprechend 0,16 pg pro Vertiefung; zweifache Standardabweichung des Null-Standards in 16facher Bestimmung).

Die **Inter-** und **Intra-Assay** Variationskoeffizienten sind **kleiner als 6,0% bzw. 4,0%**. Beispielhafte Bestimmungen sind in Tabelle 2 und Tabelle 3 dargestellt.

Tabelle 2 : Inter-Assay-Varianz

	Anzahl der unabh. Durchführungen	Mittelwert (ng/ml)	Standardabweichung (ng/ml)	VK (%)
Probe 1	10	2,39	0,14	5,98
Probe 2	14	5,37	0,21	3,93
Probe 3	11	14,33	0,45	3,12

Tabelle 3: Intra-Assay-Varianz

	Anzahl der Bestimmungen	Mittelwert (ng/ml)	Standardabweichung (ng/ml)	VK (%)
Probe 1	16	0,45	0,02	3,65
Probe 2	22	5,94	0,13	2,16

Proben: Eignung, Vorbereitung und Lagerung

Geeignet sind Serum- und Plasmaproben (in korrespondierenden Serum-, Heparinplasma-EDTA-Plasma-Proben wurden keine signifikanten Abweichungen im hGH-Gehalt gefunden). Übliches Zellkulturmedium wurde als geeignet gefunden. Eine spezielle externe Probenvorbereitung ist nicht nötig.

Generell sollten Proben so schnell wie möglich nach der Abnahme gekühlt werden. Falls zwischen Abnahme und Bestimmung ein längerer Zeitraum liegt, sollten die unverdünnten Proben bei -20°C oder kälter in fest verschließbaren Plastikgefäßen aufbewahrt werden. Wiederholtes Einfrieren und Auftauen von Serum/Plasma sollte prinzipiell vermieden werden (gegebenenfalls subaliquotieren) einige Zyklen (5x) haben in unseren Versuchen jedoch auf die messbare hGH Konzentration keine Auswirkungen gehabt.

Die hohe Sensitivität des Assays erlaubt hGH Messungen in kleinen Probenvolumina. Für die meisten Untersuchungen (Serum- oder Plasmaproben und keine Extremwerte zu erwarten) sollten **Verdünnungen von 1:10 bis 1:50 in Verdünnungspuffer VP** geeignet sein. Gegebenenfalls kann, je nach erwarteten hGH-Werten, geringer oder stärker in Verdünnungspuffer VP verdünnt werden. Im Allgemeinen ist eine Serum- oder Plasma-**Verdünnung von 1:26 optimal geeignet**. Die hGH-Konzentrationen in anderen humanen Körperflüssigkeiten und in Kulturüberständen können stark von den Serumwerten abweichen.

Vorschlag Verdünnungsprotokoll:

250 µl Verdünnungspuffer VP in PE-/PP-Gefäße vorlegen (bei größeren Serien empfiehlt sich hierfür die Verwendung eines Multi-Steppers), dazu 10 µl Serum- oder Plasma pipettieren (Verdünnung 1:26). Nach dem Mischen werden von dieser Lösung 2 x 100 µl im Assay eingesetzt.

MATERIALIEN

Inhalt der Testpackung

1)	MTP	Mikrotiterplatte , gebrauchsfertig, Mikrotiterplatte mit 96 Vertiefungen , die in 12 abnehmbare Streifen à 8 Vertiefungen (einzeln abbrechbar) aufgeteilt ist. Die Platte ist mit einem Antikörper gegen humanes Wachstumshormon beschichtet
2)	CAL	Standards A-E , lyophilisiert, enthalten rekombinantes hGH (NIBSC 98/574). Die Verdünnungen der Standardkurve decken einen Bereich von 0,05 bis 1 ng/ml (50, 150, 300, 600 und 1000 pg/ml) hGH ab und werden mit je 750 µl Verdünnungspuffer VP rekonstituiert. Für den Assay werden jeweils 100 µl pro Vertiefung eingesetzt.
3)	DILU VP	Verdünnungspuffer VP , 120 ml, gebrauchsfertig, bitte zum Rekonstituieren der Standards A – E, des Kontrollserums KS sowie für die Verdünnung der Proben verwenden
4)	Control	Kontrollserum KS , lyophilisiert, enthält humanes Serum und muss in 500 µl Verdünnungspuffer VP rekonstituiert werden. Die hGH Soll-Konzentration und der Schwankungsbereich ist auf dem Etikett angegeben. Es sollte im Assay in der gleichen Verdünnung wie die jeweiligen Proben bestimmt werden.

5)	Ab	Antikörperkonjugat AK , 12 ml, gebrauchsfertige Lösung, enthält biotinylierten anti-hGH Antikörper. Für den Assay werden 100 µl pro Vertiefung eingesetzt.
6)	CONJ	Enzymkonjugat EK , 12 ml, gebrauchsfertige Lösung, enthält POD(Meerrettich-Peroxidase)-markiertes Streptavidin Für den Assay werden 100 µl pro Vertiefung eingesetzt.
7)	WASHBUF 20x	Waschpuffer WP , 50 ml, 20-fach konzentrierte Lösung, bitte vor Gebrauch 1:20 mit A.dest. oder entmineralisiertem Wasser verdünnen (z.B. den gesamten Flascheninhalt von 50 ml im Standzylinder auf 1000 ml auffüllen). Achtung: Endverdünnt ist der Waschpuffer max. 4 Wochen haltbar, nur nach Bedarf ansetzen.
8)	SUBST	Substrat S , 12 ml, gebrauchsfertig, Meerrettich-Peroxidase-(POD)-Substrat, stabilisiertes H ₂ O ₂ -Tetramethylbenzidin
9)	H ₂ SO ₄	Stopplösung SL , 12 ml, gebrauchsfertig, 0,2 M Schwefelsäure
10)		2x Abdeckfolie für die Mikrotiterplatte, selbklebend

Zusätzlich benötigte Materialien

Destilliertes oder entmineralisiertes Wasser zum Verdünnen des Waschpuffers WP

Mikropipetten und Mehrkanal-Pipetten mit auswechselbaren Einmalspitzen

Vortex-Mischgerät

Vorrichtung zum Absaugen der Proben-Lösungen aus den Vertiefungen der Platte (empfohlen wegen potentieller Infektionsgefahr bei humanen Proben)

Mikrotiterplatten-Waschgerät (empfohlen)

Photometer für Mikrotiterplatten ("ELISA-Reader"), Filter bei 450 und 620 nm (bzw. ≥590 nm).

Folienschweißgerät für Alubeutel (empfohlen)

TECHNISCHE HINWEISE

Der Assay ist strikt nach dem Testprotokoll durchzuführen.

Reagenzien mit unterschiedlichen Lot-Nummern sollten nicht vermischt werden. Die Testplatte und alle Reagenzien sind ungeöffnet lichtgeschützt und bei 2° - 8°C gelagert mindestens haltbar bis zum Verfallsdatum (s. Etikett).

Für die **Rekonstitution** der lyophilisierten Komponenten (**Standards A - E** und **Kontrollserum KS**) muss der im Kit erhaltene **Verdünnungspuffer VP** verwendet werden. 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.

Bei sachgemäßer Handhabung ist die **Haltbarkeit der Reagenzien nach Öffnung** nicht beeinträchtigt. Nicht verwendete Streifen der Testplatte sind zusammen mit dem Trockenkissen luftdicht bei 2° - 8°C zu lagern. Rekonstituierte Komponenten (Standards A – E und Kontrollserum KS) können bis zu einer Woche bei 2-8°C aufbewahrt werden. Falls eine längere Lagerungszeit benötigt wird, sollten die Komponenten bei -20°C (oder kälter) aufbewahrt werden, dies verlängert die Haltbarkeit auf mind. 3 Monate. Wiederholtes Einfrieren und Auftauen sollte vermieden werden. Wenn mehrere unabhängige hGH-Messungen über eine längere Periode mit einem Kit geplant sind, wird vorherige Aliquotierung der Komponenten in passende Volumina empfohlen.

Der 1:20 gebrauchsfertig verdünnte **Waschpuffer WP** ist max. **4 Wochen bei 4°C** haltbar, bitte nur nach Bedarf ansetzen.

Alle Komponenten des Kits müssen **vor Gebrauch auf Raumtemperatur** gebracht werden, die evtl. in manchen Puffern vorhandenen Präzipitate müssen vor Gebrauch durch Mischen und Erwärmen wieder gelöst werden. Inkubation bei Raumtemperatur bedeutet: Inkubation bei 20 - 25°C.

Die Substratlösung S, stabilisiertes H₂O₂-Tetramethylbenzidin, ist lichtempfindlich – Aufbewahrung und Inkubation bitte vor Licht geschützt.

Bei der **Testdurchführung** sollten Standards A-E, Kontrollserum KS und die jeweiligen Proben möglichst schnell pipettiert werden z.B. in 15 Minuten). Das Antikörperkonjugat AK, das Enzymkonjugat EK sowie nachfolgend die Substratlösung S sollten in der gleichen Reihenfolge und in dem gleichen Zeitintervall auf die Platte zugegeben werden. Ebenso sollte die Stopplösung SL in der gleichen Reihenfolge und im gleichen Zeitintervall wie die Substratlösung auf die Testplatte gegeben werden. Dies verhindert Variationen in der Konzentrationsbestimmung durch unterschiedliche Inkubationszeiten.

WARNHINWEISE UND VORSICHTSMAßNAHMEN

Der Mediagnost E022 Kit ist nur zur In-vitro Diagnostik und nicht zur inneren Anwendung bei Mensch 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 seien.

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: **KS**

Das humane Material, das für die Präparation dieses Produktes verwendet wird, ist durch von der US-amerikanischen Arzneimittelzulassungsbehörde FDA empfohlene Nachweisverfahren auf die Präsenz von Antikörpern gegen Humanes Immundefizienz-Virus (HIV I und II), gegen Hepatitis B-Oberflächenantigen und gegen Hepatitis C Virus geprüft und für negativ befunden worden. Da kein Test das Vorhandensein von infektiösen Erregern völlig ausschließen kann, sollten die Reagenzien gemäß der Vorgaben der Biosicherheitsstufe 2 gehandhabt werden.

Folgenden Komponenten enthalten < 0,01% 2-Methyl-4-isothiazolin-3-one Solution als Konservierungsmittel:

AK, EK, VP

R34	Verursacht Verätzungen
R43	Kann bei Hautkontakt zur Sensibilisierung führen
S26	Im Falle von Augenkontakt sofort mit viel Wasser spülen und Arzt aufsuchen
S36/37	Bei der Arbeit geeignete Schutzkleidung und –handschuhe tragen.
S45	Bei Unfall oder Unwohlsein sofort Arzt zuziehen

Folgende Komponenten enthalten < 0,01% (w/w) 5-chloro-2-methyl 2H isothiazol-3-one und 2-methyl-2H-isothiazol-3-one als Konservierungsmittel: **AK, EK, VP, WP**

R36/38	Reizend für Augen und Haut
R43	Kann bei Hautkontakt zur Sensibilisierung führen
S26	Im Falle von Augenkontakt sofort mit viel Wasser spülen und Arzt aufsuchen
S28.1	Im Falle von Hautkontakt sofort mit viel Wasser waschen

Substratlösung (S)

Das TMB-Substrat (S) enthält 3,3',5,5' Tetramethylbenzidin.

R20/21/R22	Gesundheitsschädlich bei Inhalation, Berührung mit der Haut und beim Verschlucken
R36/37/38	Reizend/Irritierend für Augen, Haut und Atmungssystem
S26	Im Falle von Augenkontakt, sofort mit viel Wasse spülen und Arzt aufsuchen
S36/37	Geeignete Schutzhandschuhe und Schutzkleidung tragen.

Stopplösung (SL)

Die Stopplösung enthält 0,2 M Schwefelsäure (H₂SO₄)

R36/38	Reizt die Augen und die Haut
S26	Im Falle von Augenkontakt sofort mit viel Wasser spülen und einen Arzt aufsuchen.
S36/37	Geeignete Schutzhandschuhe und Schutzkleidung tragen.

Erste-Hilfe Maßnahmen:

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

Nach Augenkontakt: Nach Berührung mit den Augen während mindestens 15 Minuten 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.

TESTDURCHFÜHRUNG

Die Messungen (Standards, Kontrolle und Proben) sollten stets in Doppelbestimmung durchgeführt werden. Um optimale Ergebnisse zu erhalten, ist auf genaues Pipettieren und strikte Befolgung des Testprotokolls zu achten.

- 1) In die Vertiefungen A1/A2 werden **100µl Verdünnungspuffer VP** pipettiert (Leerwert).
- 2) In die Positionen B1/2 werden je **100µl Standard A (0,05 ng/ml)** gegeben, sowie in die Positionen C1/2 je **100 µl Standard B (0,15 ng/ml)**, in die Positionen D1/2 je **100 µl Standard C (0,3 ng/ml)**, in die Positionen E1/2 je **100 µl Standard D (0,6 ng/ml)**, in die Positionen F1/2 je **100 µl Standard E (1 ng/ml)**.
Zur Kontrolle der korrekten Durchführung des Tests können je **100 µl** der 1:26 (oder im jeweiligen Verdünnungsverhältnis der Proben) verdünnten **Kontrolle KS** in die Positionen G1/2 gegeben werden.
In die restlichen Vertiefungen können je **100 µl der verdünnten Proben** (i.a. 1:26 in Verdünnungspuffer VP verdünnt) pipettiert werden.
- 3) Die Vertiefungen der Platte werden mit Klebefolie dicht abgedeckt und **2 Stunden** bei **Raumtemperatur** inkubiert (wenn möglich unter Schütteln ≥ 350 upm).
- 4) Nach Ablauf der Inkubationszeit werden die Lösungen abgesaugt und die Platte mit **250 µl Waschpuffer WP** / Vertiefung dreimal gewaschen.
- 5) Nach dem letzten Waschschrift werden **100 µl des Antikörperkonjugats AK** in die Vertiefungen der Platte pipettiert. Die Vertiefungen der Platte werden mit Klebefolie dicht abgedeckt und **30 Minuten** bei **Raumtemperatur** inkubiert (wenn möglich unter Schütteln ≥ 350 upm).
- 6) Danach werden – ohne Waschschrift ! – **100 µl des Enzymkonjugates EK** in jede Vertiefung dazu pipettiert und **30 Minuten ohne schütteln weiter inkubiert**
- 7) Nach Abschluss dieser Inkubation wird die Platte wie in Schritt 4) beschrieben gewaschen
- 8) In jede Vertiefung werden **100 µl der Substratlösung S** pipettiert.
- 9) Die Platte wird **15 Minuten im Dunkeln** bei **Raumtemperatur** inkubiert.
- 10) Nach Ablauf der Inkubationszeit wird in jede Vertiefung **100 µl Stopplösung SL** pipettiert.
- 11) Die Ausmessung der Farbreaktion erfolgt **innerhalb von 30 Minuten bei 450 nm (Referenzfilter 620 nm)**.

AUSWERTUNG

Berechnung der Standardkurve

Für valide Ergebnisse sollte die Extinktion des Leerwertes $< 0,2$ Einheiten und des Standard E $\geq 1,0$ Einheiten erreichen. Proben, die höhere Extinktionen als der Standard E erzielen, liegen außerhalb der Standardkurve, zur sicheren Bestimmung sollten diese Proben in einer zweiten Testdurchführung bei höherer Verdünnung nochmals bestimmt werden. Die bereitgestellten Standards enthalten folgende hGH-Konzentrationen (Internationaler Standard, NIBSC Code 98/574, 3 IU/mg):

Standard	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 **Mittelwerts** der optischen Dichte des Leerwertes aus den Doppelbestimmungen (Vertiefung A1/A2).
- 2) Von den Mittelwerten der optischen Dichte der Standardkonzentrationen und der Proben wird der mittlere Leerwert abgezogen.
- 3) Die Standardkonzentrationen (x-Achse) werden gegen die gemessene optische Dichte (y-Achse) aufgetragen.
- 4) Die Berechnung der Standardkurve 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.
- 5) Die **Multiplikation** des jeweiligen für die Proben berechneten hGH-Gehaltes mit dem entsprechenden **Verdünnungsfaktor** der Proben ergibt die hGH-Konzentration **Konzentration in ng/ml** (oder pg/ml, oder μ U/ml, je nach gewählter Einheit der Standards).

Interpretation der Ergebnisse

Der Grenzwert wird als maximale Wachstumshormonsekretion in mindestens zwei unabhängigen Stimulationsversuchen bestimmt (bspw. Insulin- oder Arginin- Stimulation).

Ein möglicher Wachstumshormonmangel liegt bei einem Sekretions-Peak von $< 8\text{ng/ml}$ oder einer integrierten Gesamtsekretion von durchschnittlich $< 3\text{ng/ml}$ vor, wenn der WHO Standard 98/574, der äquivalent zum Standard dieses Testes ist, genutzt wird.

Die Ergebnisse dieses Testes sollten durch weitere diagnostische Untersuchungen bestätigt werden. Jedes Labor muss seinen eigenen Grenzwert in Abhängigkeit der Patientengruppen festlegen.

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.

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

PACKAGE INSERT ENGLISH

CLINICAL RELEVANCE

Determination 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.

TECHNICAL PROPERTIES AND APPLICATIONS

Mediagnost hGH ELISA E022

- is well suited for determination of hGH in **serum** and **plasma** (native samples, hGH profiling, samples of stimulation and suppression tests)
- due to its high **sensitivity** (0,0016 ng/ml \cong 1,6 pg/ml) it is also very well suited to measure hGH in **cell culture supernatants** and other **non-serum samples (e.g. hGH urine – excretion test)**
- is calibrated against **the reference assay** of the KIGS/IGLU study, in house-RIA of University Children Hospital Tübingen (see literature 1)
- is fast: total incubation time is only 3.5 hours
- is calibrated against recombinant hGH (International Standard, **NIBSC 98/574**; see literature 6)
- Single Standards of **50, 150, 300, 600 bzw. 1000 pg/ml** are supplied within our kit, control serum consisting of human serum is also provided
- applies high affine polyclonal antibodies against 22 kDa recombinant hGH

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 gene expression results in a non-glycosylated 22 kDa protein consisting of 191 amino acids. The other 20% of gene expression results in a variant form of 20 kDa by alternative splicing. Additionally, several more smaller variants can be found in circulation as well as translational modified proteins and different degrees of protein aggregation. Further on, 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. GH is species specific.

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 attractions as physiologic stress or hypoglycaemia and amino acids 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. 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 wells 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 shows typical disease pattern, equivalent to advanced aging (adipositas, muscle dystrophy, arteriosclerosis, osteoporosis, adynamia). Substitutional therapy is a well-known, approved and efficient therapy of severe Growth Hormone deficiency in adulthood. Therapeutical success is directly as well as indirectly proved by measurement of IGF in serum.

Excessive hGH secretion, mostly causes by pituitary adenoma, results in childhood in gigantism, in adulthood in acromegalie, 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. Determination 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.

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 antiserum in turn binds hGH. After washing, a streptavidin-peroxidase-enzyme conjugate will be added, which will bind highly specific to the biotin of the antiserum and will catalyze the substrate to change the color quantitatively depending on the hGH level of the sample.

WARNINGS AND PRECAUTIONS

For in-vitro diagnostic use only. For professional use only.

Before starting the assay, read the instructions completely and carefully. Use the valid version of the package insert provided with the kit. Be sure that everything is understood.

Before use, all kit components should be brought **to room temperature at 20 - 25°C**. Precipitates in buffers should be dissolved before use by thorough mixing and warming. **Temperature WILL affect the absorbance readings of the assay.** However, Values for the patient samples will not be affected.

Do not mix reagents of different lots. Do not use expired reagents.

The microplate contains snap-off strips. Unused wells must be stored at 2 - 8°C in the sealed foil pouch and used in the frame provided.

Caution: This kit contains material of human and/or animal origin. Source human serum for the Control Serum provided in this kit was tested by FDA recommended methods and found non-reactive for Hepatitis-B surface antigen (HBsAg), Hepatitis C virus (HCV), and Human Immunodeficiency Virus 1 and 2 (HIV) antibody. No known test methods can offer total assurance of the absence of infectious agents; therefore all components and patient's specimens should be treated as potentially infectious.

Stop solution contains 0.2 M Sulfuric Acid (H₂SO₄)

R36/38 Irritating to eyes and skin

S26 In case of contact with eyes, rinse immediately with plenty of water and seek medical advice

S28.1 After contact with skin, wash immediately with plenty of water

S36/37 Wear suitable protective clothing and gloves.

Pipetting of samples and reagents must be done as quickly as possible and in the same sequence for each step. Use separate pipette tips for each sample, control and reagent to avoid cross contamination. Use

reservoirs only for single reagents. This especially applies to the substrate reservoirs. Using a reservoir for dispensing a substrate solution that had previously been used for the conjugate solution may turn solution colored. Do not pour reagents back into vials as reagent contamination may occur. Mix the contents of the microplate wells thoroughly to ensure good test results. Do not reuse microwells. Do not let wells dry during assay; add reagents immediately after completing the rinsing steps.

Following components contain < 0,01% 2-Methyl-4-isothiazolin-3-one Solution: **AK, EK, VP**

R34 Irritating to eyes and skin

R43 Sensibilisation through skin contact possible

S26 In case of contact with eyes, rinse immediately with plenty of water and seek medical advice

S36/37 Wear suitable protective clothing and gloves

S45 In case of accident or if you feel unwell seek medical advice

Following components contain < 0,01% (w/w) 5-chloro-2-methyl 2H isothiazol-3-one and 2-methyl-2H-isothiazol-3-one: **AK, EK, VP, WP**

R36/38 Irritating to eyes and skin

R43 Sensibilisation through skin contact possible

S26 In case of contact with eyes, rinse immediately with plenty of water and seek medical advice

S28.1 S28.1 After contact with skin, wash immediately with plenty of water

TMB-Substrate (S) contains 3,3',5,5' Tetramethylbenzidine.

R20/21/R22 Harmful by inhalation, in contact with skin and if swallowed

R36/37/38 Irritating to eyes, respiratory system and skin

S26 In case of contact with eyes, rinse immediately with plenty of water and seek medical advice

S28.1 After contact with skin, wash immediately with plenty of water

S36/37 Wear suitable protective clothing and gloves

General first aid procedures:

Skin contact: Wash affected area thoroughly with water. Discard 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: If swallowed, wash out mouth thoroughly with water. Immediately see a physician.

Do not eat, drink or smoke in these areas.

Never pipette the materials with the mouth.

Spilled material must be wiped off immediately and should become disinfected. Clean contaminated areas and equipment with a suitable detergent.

REAGENTS PROVIDED

1)	MTP	Microtiter plate , ready for use: Microtiter plate with 96 wells , divided into 12 strips with 8 break-apart wells coated with human Growth Hormone
2)	CAL	Standards (A-E) , lyophilized: Contain recombinant hGH (NIBSC 98/574). Standard values are between 0.05 - 1 ng/ml (50, 150, 300, 600 and 1000 pg/ml) hGH. Each vial must be reconstituted with 750 µL of Dilution Buffer (VP) .
3)	DILU VP	Dilution Buffer (VP) , 120 ml, ready for use, please use for the reconstitution of Standards A – E and of Control Serum (KS) as well as for the sample dilution
4)	Control	Control Serum (KS) , lyophilized, contains human serum and must be reconstituted with 500 µL Dilution Buffer VP . The hGH target value concentration and the respective range are given on the vial label. The dilution of the KS should be according to the dilution of the respected samples
5)	Ab	Antibody Conjugate (AK) , 12 ml, ready-made solution, contains rabbit biotinylated anti-hGH antibody.. Use 100 µl per Well in the Assay.
6)	CONJ	Enzyme Conjugate (EK) , 12 ml, ready-made solution, contains HRP (Horseradish-Peroxidase)-labelled Streptavidin. Use 100 µl per Well in the Assay.
7)	WASHBUF 20x	Washing Buffer (WP) , 50 ml, 20 X concentrated solution. Washing buffer has to diluted 1:20 with A.dest. or demineralised water before use (e.g. add the complete contents of the flask 50 ml into graduated flask and fill with A.dest to 1000 ml). Attention: After dilution the Washing Buffer is only 4 weeks stable, dilute only according to requirements.
8)	SUBST	Substrate (S) , 12 ml, ready for use, horseradish-peroxidase-(HRP)-substrate, stabilised H ₂ O ₂ Tetramethylbenzidine.
9)	H₂SO₄	Stopping Solution (SL) , 12 ml, ready for use, 0.2 M sulphuric acid, Caution acid!
10)		Sealing tape for covering of the microtiter plate, 2 x, adhesive.

MATERIALS REQUIRED BUT NOT PROVIDED

Precision pipettes (100 and 200µl) micropipettes and multichannel pipettes with disposable plastic tips

Distilled or Deionized water for dilution of the Washing Buffer (WP)

Vortex-mixer

Device to aspirate the standards and the samples from the wells (recommended because of the potential danger of infection by human samples)

Timer (120 min. range)

Reservoirs (disposable)

Plate washer and plate shaker (recommended)

Calibrated Micro plate reader ("ELISA-Reader") with filter for 450 and 620nm (or ≥ 590 nm)

Foil welding device for laminate bags (recommended)

REAGENT PREPARATION

Bring all reagents to room temperature (20 - 25°C) before use.

Washing Buffer (WP) has to be diluted 1:20 with distilled or demineralised water before use (e.g. add the complete contents of the flask (50 ml) into a graduated flask and fill up with A.dest. to 1000 ml). The required volume of washing buffer is prepared by 1:20 dilution of the provided 20-fold concentrate with deionised water. The diluted Washing Buffer is stable for max. 4 weeks at 2-8°C.

The **Dilution Buffer (VP)** must be used for the reconstitution of the lyophilized components (**Standards A – E and Control Serum KS**). Each bottle of Standards must be reconstituted with 750 µl Dilution Buffer. Control Serum (KS) must be reconstituted with 100µL of Dilution Buffer. It is recommended to keep reconstituted reagents at room temperature for 15 minutes and then to mix them thoroughly but gently (no foam should result) with a Vortex mixer. The shelf life of the components after opening is not affected, if used appropriately.

STORAGE CONDITIONS

The microtiter plate wells and all undiluted reagents are stable until the expiry date, if stored in the dark at 2-8°C.

Store the unused microtiter wells airtight together with the desiccant at 2° to 8°C.

The Substrate Solution (S), stabilised H₂O₂-Tetramethylbencidine, is photosensitive – store and incubate in the dark.

Reconstituted components (Standards (A – E) and Control Serum (KS)) should be stored at 2-8°C for up to 1 week. If longer storage time is needed, store the components frozen at -20°C or below. Freezing extends the expiry at least 3 months. Avoid repeated freeze-thaw cycles. In case you plan to perform multiple independent hGH determinations over a longer period with one kit, you should aliquot the components prior to freezing into suitable smaller volumes. This is strongly recommended.

SPECIMEN COLLECTION, PREPARATION, AND STORAGE

Serum as well as plasma samples are suitable (significant deviation of hGH levels in corresponding Serum, Heparin-, or EDTA-Plasma samples were not found). Common cell culture medium was found to be suitable. An external sample preparation prior to assay is not required (see below). Samples should be handled as recommended in general: collected and refrigerated as fast as possible. In case there will be a longer period (>24 hours) between the sample withdrawal and determination, store the undiluted samples frozen at -20°C or below in tightly closable plastic tubes. Avoid on principal repeated freeze-thaw cycles of serum/plasma (if required, please sub-aliquot) although hGH levels were found to be unaffected by a few cycles, (5x) in our experiments. The high sensitivity of the assay allows hGH measurement of hGH in small sample volumes. In most determinations (serum or plasma samples, and no extreme values expected) a dilution from 1:10 to 1:50 with Dilution Buffer (VP) should be suitable. According to expected hGH levels, the dilution with Buffer can be higher or lower. In general, a dilution of 1:26 for serum- or plasma samples is appropriate.

The hGH concentrations may be completely different in body fluids of human origin other than serum or cell culture supernatants.

Suggestion for dilution protocol:

Pipette 250 µL Dilution Buffer VP in PE-/PP-Tubes (application of a multi-stepper is recommended in larger series); add 10 µL serum- or plasma samples (dilution 1:26). After mixing use 2 x 100 µL of this dilution in the assay.

ASSAY PROCEDURE

NOTES: All determinations (Standards, Control Serum and samples) should be assayed in duplicate. For optimal results, accurate pipetting and adherence to the protocol are recommended.

When performing the assay, the Standards, Control Serum 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 and the Enzyme Conjugate as well as the succeeding Substrate Solution should be added to the plate in the same order and in the same time interval as the samples. Stop Solution should be added to the plate in the same order as the Substrate Solution.

- 1) Add **100µL Dilution Buffer VP** in wells A1/A2 (blank).
- 2) Pipette in positions **B1/2 100µL of Standard A (0.05 ng/ml)**
Pipette in positions **C1/2 100 µL Standard B (0.15 ng/ml)**,
Pipette in positions **D1/2 100 µL Standard C (0.3 ng/ml)**,
Pipette in positions **E1/2 100 µL Standard D (0.6 ng/ml)**,
Pipette in positions **F1/2 100 µL Standard E (1 ng/ml)**.
For control purpose pipette 100 µL of the 1:26 (or respective dilution as the sample) diluted Control Serum in positions G1/2.
Pipette **100 µL of each of the diluted samples** (e.g. diluted 1:26 or other) into the rest of the wells.
- 3) Cover the wells with sealing tape and incubate the plate for **2 hours at room temperature** (if possible, shake at approx. 350 rpm).
- 4) After incubation aspirate the contents of the wells and wash the wells 3 times with 250 µL Washing Buffer / well. Aspirate wells after each washing. Following the last washing step, bang the plate inverted onto a paper towel to remove residual liquid.
- 5) Pipette **100 µL of the Antibody Conjugate** into each well.
- 6) Cover the wells with sealing tape and incubate the plate for **0.5 hour** at room temperature (if possible, shake at approx. 350 rpm).
- 7) Subsequently –**without a washing step!** - pipette **100 µl** of the **Enzyme-Conjugate** in each well and incubate additional **30 minutes without shaking**
- 8) After incubation wash the wells 3 times with Washing Buffer as described in step 4.
- 9) Pipette **100 µL of the TMB Substrate** Solution in each well.
- 10) Incubate the plate for **15 minutes in the dark at room temperature (20 - 25°C)**.
- 11) Stop the reaction by adding **100 µL of Stopping Solution**.
- 12) Measure the colour reaction within 30 minutes at 450nm (reference filter 620nm).

QUALITY CONTROL

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

CALCULATION OF RESULTS

Establishing the Standard Curve

The 2nd International Standard for hGH, NIBSC Code 98/574, was used as standard material(6). 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 standard material is recommended in line with the current standardisation efforts for hGH Immunoassays. (7,8)

For the evaluation of the assay it is required that the absorbance values of the blank < 0.2, and of standard E \geq 1.00. Samples, which yield higher absorbance values than Standard E should be re-tested with a higher dilution.

Standard	A	B	C	D	E
ng/ml	0.05	0.15	0.30	0.60	1.0
pg/ml	50	150	300	600	1000
μ IU/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 values.
- 3) Plot the standard concentrations on the x-axis versus the mean value of the absorbance of the standards on the y-axis.
- 4) Recommendation: Calculation of the standard 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 μ IU/ml, according the chosen unit for the standards) of the samples can be calculated **by multiplication** with the respective **dilution factor**.

INTERPRETATION OF RESULTS

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). Using WHO standard 98/574, which is equivalent to standard material used in this assay, 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. **Further diagnostic measurements** should be carried out to approve the results of this test. And every laboratory should establish its own cut-off values corresponding to the relevant group of patients.

EXPECTED NORMAL VALUES

As growth hormone is secreted pulsatile mainly enduring the night sleep valid normal values can hardly be determined. Standard procedures are arginin 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.

	female	male
number	54	50
median [ng/ml]	0.81	0.28
minimal concentration [ng/ml]	0.19	0.15
maximal concentration [ng/ml]	10.15	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.

PERFORMANCE CHARACTERISTICS

Sensitivity

The analytical sensitivity of the hGH SENSITIVE ELISA E022 yields 0.0016 ng/ml (equal to 1.6 pg/ml, equal to 0.16 pg per well; 2x SD of zero standards in 16-fold determination).

Specificity

The only human protein with significant sequence similarities to growth hormone is prolactin. Testing a 200ng/ml prolactin solution in this assay, no cross reactivity was detected.

Intra-Assay-Variation

	Number of determinations	Mean value (ng/ml)	Standard deviation (ng/ml)	CV (%)
Sample 1	16	0.45	0.02	3.65
Sample 2	22	5.94	0.13	2.16

Inter-Assay-Variation

	Number of determinations	Mean value (ng/ml)	Standard deviation (ng/ml)	CV (%)
Sample 1	10	2.39	0.14	5.98
Sample 2	14	5.37	0.21	3.93
Sample 3	11	14.33	0.45	3.12

Linearity

Dilution:	Sample 1 (calculated, ng/ml)	Dilution:	Sample 2 (calculated, ng/ml)
1:10	13.40	1:600	733.0
1:20	13.96	1:1200	749.8
1:40	13.50	1:2400	759.8
1:80	13.47	1:4800	756.7
1:160	13.35	1:9600	797.3
1:320	13.50		
AV / 1SD	13.53 / 0.219	AV / 1SD	759.3 / 23.6

AV = Average Value , SD = Standard Deviation

Recovery

The recovery of the recombinant hGH yielded in a buffer matrix 100%. In different human-sera the recovery was on average 94 % of the hypothetical expected amount. Recovery of 10ng/ml recombinant hGH in serum matrices in referred to buffer.

	Sample 1	Sample 2	Sample 3
Recovery [%]	96.46	92.03	91.4

LITERATUR / 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 51:27-29
- 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

KURZANLEITUNG – Mediagnost hGH-SENSITIV-ELISA E022

Reagenz:	Rekonstitution:	Verdünnung/ Mischung:
Standards A-E	in 750 µl Verdünnungspuffer VP	
Kontrollserum KS	in 500 µl Verdünnungspuffer VP	1:26 mit Verdünnungspuffer VP
Waschpuffer WP		1:20 mit Aqua. dest. (z.B. den gesamten Flascheninhalt von (50 ml) im Standzylinder auf 1000 ml auffüllen)
Probenverdünnung: z.B. 1:26 (10 µl Serum werden mit 250 µl Verdünnungspuffer VP verdünnt, von dieser 1:26 Verdünnung 100 µl/ Vertiefung einsetzen).		
Vor der Testdurchführung alle Reagenzien auf Raumtemperatur bringen.		

Vorschlag zur Testdurchführung in Doppelbestimmung:

Pipettieren	Reagenzien	Position
100 µl	Verdünnungspuffer VP (Leerwert)	A1/2
100 µl	Standard A (0,05 ng/ml)	B1/2
100 µl	Standard B (0,15 ng/ml)	C1/2
100 µl	Standard C (0,30 ng/ml)	D1/2
100 µl	Standard D (0,6 ng/ml)	E1/2
100 µl	Standard E (1,0 ng/ml)	F1/2
100 µl	Kontrollserum KS (1:26 verdünnt)	G1/2
100 µl	Probenverdünnung	in die restlichen Vertiefungen nach Bedarf pipettieren
Mit Klebefolie die Vertiefungen dicht abdecken.		

Proben-Inkubation: 2 h bei RT, ≥ 350 upm

3x 250 µl	Absaugen und die Platte 3x mit je 250 µl Waschpuffer WP / Vertiefung waschen.	In jede Vertiefung
100 µl	Antikörperkonjugat AK	In jede Vertiefung

Inkubation: 30 Minuten bei RT, ≥350 upm

100µl	Enzymkonjugat EK , ohne waschen der Vertiefungen (!) - zur darin befindlichen AK-Lösung dazu pipettieren , dadurch gleichzeitig mischen bzw. MTP durch vorsichtiges Klopfen kurz mischen. Achtung: hohes Füllvolumen der Vertiefungen !	In jede Vertiefung
-------	--	--------------------

Inkubation: 30 Minuten bei RT, ohne schütteln

3x 250 µl	Absaugen und die Platte 3x mit je 250 µl Waschpuffer WP / Vertiefung waschen.	In jede Vertiefung
100 µl	Substratlösung S	In jede Vertiefung

Substrat S Inkubation: 15 min. im Dunklen bei RT

100 µl	Stopplösung SL	In jede Vertiefung
Ausmessung innerhalb von 30 min bei 450 nm (Referenzfilter ≥ 590 nm).		

SUMMARY – MEDIAGNOST hGH-SENSITIVE ELISA E022

Reagents:	Reconstitution:	Dilution/ Mixing:
Standards A-E	in 750 µL Dilution Buffer VP	
Control Serum KS	in 500 µL Dilution Buffer VP	1:26 with Dilution Buffer VP
Washing Buffer WP		1:20 with Aqua. dest. (e.g. add the complete contents of the flask (50 ml) into a graduated flask and fill with A.dest. to 1000 ml).
Sample dilution: with Dilution Buffer VP generally dilution of 1:26 (e.g. dilute 10 µL serum with 250 µL Dilution Buffer VP). Use 100 µL per determination.		
Before assay procedure bring all reagents to room temperature.		

Proposal of Assay Procedure for double determinations

Pipette	Reagents	Position
100 µL	Dilution Buffer VP (blank)	A1/2
100 µL	Standard A (0.05 ng/ml)	B1/2
100 µL	Standard B (0.15 ng/ml)	C1/2
100 µL	Standard C (0.30 ng/ml)	D1/2
100 µL	Standard D (0.6 ng/ml)	E1/2
100 µL	Standard E (1.0 ng/ml)	F1/2
100 µL	Control Serum KS (1:26 diluted)	G1/2
100 µL	Sample Dilution	Pipette sample in the rest of the wells according the requirements
Cover the wells with the sealing tape.		

Sample Incubation: 2 h at RT, ≥ 350 rpm

3x 250 µL	Aspirate the contents of the wells and wash 3x with 250 µL each Wash Buffer WP/well	in each well
100 µL	Antibody Conjugate AK	in each well

AK Incubation 0.5h at RT, ≥350 rpm

100µl	Enzyme conjugate EK, without washing the wells (!) – add to the previously pipetted AK-solution <u>thereto</u> , thereby simultaneously mixing or mix shortly through cautious tapping on the MTP. Attention: high filled volume of the wells!	in each well
-------	---	--------------

EK Incubation 0.5h at RT, without shaking

3x 250 µL	Aspirate the contents of the wells and wash 3x with 250 µL each Wash Buffer WP/well	in each well
100 µL	Substrate Solution S	in each well



Substrate S Incubation: 15 min. in the dark at RT

100 µL	Stopping Solution SL	in each well
Measure the absorbance within 30 min at 450 nm with ≥ 590 nm as reference wavelength.		



CAL A-E	STD A -E	Rec in 750 µl VP	
Control	KS	Rec in 500 µl VP	1:26 DILU VP
WASHBUF 20x	WP		1:20 DILU A. dest.


SPE	1:26 DILU VP
°C 20-25 °C	

100 µl	VP	A1/2
100 µl	CAL A (0.05 ng/ml)	B1/2
100 µl	CAL B (0.15 ng/ml)	C1/2
100 µl	CAL C (0.30 ng/ml)	D1/2
100 µl	CAL D (0.6 ng/ml)	E1/2
100 µl	CAL E (1.0 ng/ml)	F1/2
100 µl	CONTROL KS 1:26 DILU VP	G1/2
100 µl	SPE 1:26 DILU VP	
TAPE		

 2 h **°C** 20-25  ≥ 350 rpm

250 µl	3x WASHBUF WP
100 µl	Ab
TAPE	

 0.5 h **°C** 20-25  ≥ 350 rpm

100µl	CONJ EK
	 0.5 h °C 20-25
3x 250 µl	3x WASHBUF WP
100 µl	SUBST TMB S

 0.25 h **°C** 20-25 

100 µl	H₂SO₄ SL
MEASURE	