



IVD

CE

hGH-ELISA

KAP1081

Version : 230123

Date of issue : 23/01/2023

Revision date: 23/01/2023

History

Summary of change:

Current Version: 230123
New logo

Read entire protocol before use.

hGH-ELISA

I. INTENDED USE

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

II. GENERAL INFORMATION

- A. **Proprietary name :** DIAsource hGH-ELISA Kit
- B. **Catalogue number :** KAP1081 : 96 tests
- C. **Manufactured by :** DIAsource ImmunoAssays S.A.
Rue du Bosquet, 2, B-1348 Louvain-la-Neuve, Belgium.

For technical assistance or ordering information contact :
Tel : +32 (0)10 84.99.11 Fax : +32 (0)10 84.99.91

III. CLINICAL BACKGROUND

A. Biological activities

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

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

B. Clinical application

Growth retardation

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

Hypopituitarism

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


Gigantism and acromegaly

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

IV. PRINCIPLES OF THE METHOD

The DIAsource HGH-ELISA is a solid phase Enzyme Amplified Sensitivity Immunoassay performed on a microtiterplate. Calibrators and samples react with the capture monoclonal antibody (MAb 1) coated on microtiter well and with a monoclonal antibody (MAb 2) labelled with horseradish peroxidase (HRP). After an incubation period allowing the formation of a sandwich: coated MAb 1 – hGH – MAb 2 – HRP, the microtiterplate is washed to remove unbound enzyme labelled antibody. Bound enzyme-labelled antibody is measured through a chromogenic reaction. The Chromogenic Solution (TMB – H₂O₂) is added and incubated. The reaction is stopped with the addition of Stop Solution and the microtiterplate is then read at the appropriate wavelength. The amount of substrate turnover is determined colourimetrically by measuring the absorbance, which is proportional to the hGH concentration. A calibration curve is plotted and hGH concentration in samples is determined by interpolation from the calibration curve.

V. REAGENTS PROVIDED

Reagents	96 tests Kit	Reconstitution			
 Breakable microtiterplate with 96 anti hGH (monoclonal antibodies) coated wells	96 wells	Ready to use			
<table border="1" data-bbox="124 779 347 824"> <tr> <td>Ab</td> <td>HRP</td> <td>CONC</td> </tr> </table> Conjugate: HRP labelled anti-hGH (monoclonal antibodies) in stabilizing buffer	Ab	HRP	CONC	1 vial 0,2 ml	Dilute 40X with conjugate buffer
Ab	HRP	CONC			
<table border="1" data-bbox="124 922 284 967"> <tr> <td>CONJ</td> <td>BUF</td> </tr> </table> Conjugate buffer: TRIS-HCl buffer with bovine serum albumin and thymol	CONJ	BUF	1 vial 6 ml	Ready to use	
CONJ	BUF				
<table border="1" data-bbox="114 1057 236 1102"> <tr> <td>CAL</td> <td>0</td> </tr> </table> Zero calibrator in sheep serum and thymol	CAL	0	1 vial lyophilized	Add 2 ml distilled water	
CAL	0				
<table border="1" data-bbox="114 1169 252 1214"> <tr> <td>CAL</td> <td>N</td> </tr> </table> Calibrator N = 1 to 5 (see exact values on vial labels) in sheep serum and thymol	CAL	N	5 vials lyophilized	Add 1 ml distilled water	
CAL	N				
<table border="1" data-bbox="114 1317 306 1361"> <tr> <td>WASH</td> <td>SOLN</td> <td>CONC</td> </tr> </table> Wash Solution (Tris-HCl)	WASH	SOLN	CONC	1 vial 10 ml	Dilute 200 x with distilled water (use a magnetic stirrer).
WASH	SOLN	CONC			
<table border="1" data-bbox="114 1415 274 1460"> <tr> <td>CONTROL</td> <td>N</td> </tr> </table> Controls - N = 1 or 2 in human serum with thymol	CONTROL	N	2 vials lyophilized	Add 1 ml distilled water	
CONTROL	N				
<table border="1" data-bbox="114 1527 258 1572"> <tr> <td>CHROM</td> <td>TMB</td> </tr> </table> Chromogen TMB Solution (Tetramethylbenzidine)	CHROM	TMB	1 vial 12 ml	Ready to use	
CHROM	TMB				
<table border="1" data-bbox="114 1639 252 1684"> <tr> <td>STOP</td> <td>SOLN</td> </tr> </table> Stop Solution: HCl 1N	STOP	SOLN	1 vial 12 ml	Ready to use	
STOP	SOLN				

Note: 1. Use the zero calibrator for sample dilutions.
2. 1 µIU of the calibrator preparation is equivalent to 1 µIU of the 2nd IS 98/574.

VI. SUPPLIES NOT PROVIDED

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

- High quality distilled water
- Pipettes for delivery of: 50 µl, 200 µl, 500 µl and 2 ml (the use of accurate pipettes with disposable plastic tips is recommended)
- Vortex mixer
- Magnetic stirrer
- Washer for microtiterplates

- Microtiterplate reader capable of reading at 450 nm and 650 nm (bichromatic reading)

VII. REAGENT PREPARATION

- Calibrators** : Reconstitute the zero calibrator with 2 ml distilled water and the other calibrators with 1 ml distilled water.
- Controls** : Reconstitute the controls with 1 ml distilled water.
- Working anti-hGH-HRP conjugate**: Prepare an adequate volume of conjugate solution by adding 25 µl of the concentrated anti-hGH-HRP conjugate to 1 ml of conjugate buffer. Use a vortex to homogenize. Extemporaneous preparation is recommended.
- Working Wash Solution** : Prepare an adequate volume of Working Wash Solution by adding 199 volumes of distilled water to 1 volume of Wash Solution (200x). Use a magnetic stirrer to homogenize. Discard unused Working Wash Solution at the end of the day.

VIII. STORAGE AND EXPIRATION DATING OF REAGENTS

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

IX. SPECIMEN COLLECTION AND PREPARATION

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

$$Y(\text{serum}) = 0.89 \times (\text{EDTA plasma}) + 0.14 \mu\text{IU/ml} \quad r=0.98 \quad n=46$$

$$Y(\text{serum}) = 1.02 \times (\text{Heparin plasma}) + 0.01 \mu\text{IU/ml} \quad r=0.98 \quad n=46$$
- Do not use haemolysed samples.

X. PROCEDURE

A. Handling notes

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

B. Procedure

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

XI. CALCULATION OF RESULTS

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

XII. TYPICAL DATA

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

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

XIII. PERFORMANCE AND LIMITATIONS

A. Detection Limit

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

B. Specificity

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

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

C. Precision

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

SD : Standard Deviation; CV: Coefficient of variation

D. Accuracy

RECOVERY TEST

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

DILUTION TEST

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

Samples were diluted with zero calibrator.

Conversion factor : 1µIU hGH-ELISA Calibrator = 0.33 ng

E. Time delay between last calibrator and sample dispensing

As shown hereafter, assay results remain accurate even when a sample is dispensed 30 minutes after the calibrators have been added to the coated wells.

	TIME DELAY		
	0 min	15 min	30 min
S1	1.83	1.71	1.60
S2	8.38	8.00	7.20

F. Hook effect

A sample spiked with hGH up to 4000 µIU/ml gives higher OD's than the last calibrator point.

XIV. INTERNAL QUALITY CONTROL

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

XV. REFERENCE INTERVALS

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

In normal subjects, growth hormone (hGH) secretion is pulsatile. During day-time, hGH concentrations range from <0.2-10 µIU/ml. During sleep, hGH concentrations increase consistently (± 30 µIU/ml).

hGH secretion is greatly stimulated by exercise and stress (venous puncture, hypoglycemia, ...), but is decreased by hyperglycemia.

In normal subjects (n=34), two hours after oral glucose load (75 g in adults), hGH levels were lower than 10 µIU/ml and the hGH response to stimulation tests (insulin, arginine, glucagon administration) exceeded 20 µIU/ml.

hGH levels were elevated (even after glucose load) in acromegaly (> 10 µIU/ml). In hGH deficiency, the response to stimulation test is absent or blunted (short stature by hGH deficiency; hypopituitarism from various origins).

XVI. PRECAUTIONS AND WARNINGS

Safety

For *in vitro* diagnostic use only.

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

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

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

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

XVII. BIBLIOGRAPHY

1. CAMANNI F., MASSARA F., BELFORTE L., ROSATELLO A., MOLENATTI G.M. (1977)
Effect of dopamine on plasma growth hormone and prolactin levels in normal and acromegalic subjects.
J. Clin. Endo. and Metab., 44:465.
2. DAUGHADAY W.H. (1981)
The adenohipophys
In : "Textbook of Endocrinology", R.H. Williams ed., W.B. Saunders, Philadelphia, p;73.

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

XVIII. SUMMARY OF THE PROTOCOL

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

Other translations of this Instruction for Use can be downloaded from our website: <https://www.diasource-diagnostics.com/>

Lire entièrement le protocole avant utilisation.

hGH-ELISA

I. BUT DU DOSAGE

Trousse de dosage immunoenzymatique pour la mesure quantitative *in vitro* de l'hormone de croissance (hGH) dans le sérum et le plasma humain.

II. INFORMATIONS GENERALES

- A. **Nom du produit :** DIAsource hGH-ELISA kit
- B. **Numéro de catalogue :** KAP1081 : 96 tests
- C. **Fabriqué par :** DIAsource ImmunoAssays S.A.
Rue du Bosquet, 2, B-1348 Louvain-la-Neuve, Belgium.

Pour une assistance technique ou une information sur une commande :

Tel : +32 (0)10 84.99.11

Fax : +32 (0)10 84.99.91

III. CONTEXTE CLINIQUE

A. Activités biologiques

La hGH est une hormone polypeptide (poids moléculaire 21,500 Da) produites par les cellules acidophiles de l'hypophyse antérieure sous contrôle de deux substances principales : le facteur de libération de l'hormone de croissance (GRF) et un agent inhibiteur, la somatostatine. Les voies neuro-endocrines dopaminergiques, adrénergiques et sérotoninergiques jouent également un rôle important dans le contrôle de la sécrétion de la hGH. Les stimulus excitateurs de la sécrétion en hGH sont provoqués par l'hypoglycémie, le sport, le jeûne, des repas hautement protéiques, le sommeil profond, le stress, glucagon, L Dopa, les acides aminés, etc. Les stimulus inhibiteurs sont provoqués par le glucose, le cortisol, la hGH et les acides gras libres. Du fait de sa courte demi-vie (± 25 minutes) et de la fréquence des stimulus excitateurs ou inhibiteurs, la concentration de la hGH varie fréquemment de façon irrégulière dans le sérum.

Une des principales fonctions physiologiques de la hGH est d'agir sur le foie et d'autres tissus pour produire la Somatomédine, qui induit alors la croissance par action directe sur les tissus cibles. En contraste avec la hGH, la concentration de somatomédine dans le sérum reste stable car la grande partie est liée aux protéines de plasma de circulation.

B. Application clinique

· **Retard de croissance**

L'hyposécrétion en hGH est une des causes différentes de la petite taille chez les enfants. Le dosage de la hGH sérique avec un test hautement sensible, particulièrement après un stimulus provocateur (absence de réponse), est important pour établir ce diagnostic car ce groupe de patients peut être traité par administration de hGH.

· **Hypopituitarisme**

Le dosage en hGH sérique est également un index de la fonction pituitaire lorsque l'hypopituitarisme est suspecté (soit idiopathique ou dû à une tumeur ou chirurgie).

· **Gigantisme et acromégalie**


Le dosage en hGH sérique, particulièrement après un test provocateur inhibiteur (absence de réponse), est important pour établir le diagnostic de l'hypersécrétion en hGH due à une tumeur pituitaire acidophile. Ceci résulte en un gigantisme chez les enfants et une acromégalie chez les adultes. Les deux dysfonctionnements peuvent être traités par chirurgie ou radiation.

IV. PRINCIPES DU DOSAGE

Le kit DIASource hGH-ELISA est un « Enzyme Amplified Sensitivity Immunoassay » en phase solide effectué sur des micro-plaques. Les calibrateurs et les échantillons réagissent avec l'anticorps de capture monoclonal (MAb 1) recouvrant les puits et avec un anticorps monoclonal (MAb 2) marqué avec la peroxydase (HRP). Après une période d'incubation permettant la formation d'un sandwich: MAb 1 recouvert – hGH – MAb 2 – HRP, la micro-plaque est lavée afin d'enlever l'anticorps libre marqué enzymatiquement. L'anticorps lié marqué enzymatiquement est mesuré avec une réaction chromogénique. Une solution chromogénique (TMB – H₂O₂) est ajoutée et incubée. La réaction est arrêtée avec l'addition de Solution d'arrêt et la micro-plaque est alors lue à la longueur d'onde appropriée. La quantité de remplacement de substrat est déterminée colorimétriquement par la mesure de l'absorbance, qui est proportionnelle à la concentration en hGH.

Une courbe de calibration est dessinée et la concentration en hGH dans les échantillons est déterminée par interpolation de la courbe de calibration.

V. REACTIFS FOURNIS

Reactifs	96 tests Kit	Reconstitution			
 Micro-plaque de titration sécable avec 96 puits recouvert d'anti hGH (anticorps monoclonal)	96 puits	Prêt à l'emploi			
<table border="1" data-bbox="119 817 343 862"> <tr> <td>Ab</td> <td>HRP</td> <td>CONC</td> </tr> </table> Conjugué: anti-hGH marqué avec de l'HRP (anticorps monoclonal) dans un tampon stabilisant	Ab	HRP	CONC	1 flacon 0,2 ml	Diluer 40 x avec le tampon du conjugué
Ab	HRP	CONC			
<table border="1" data-bbox="119 974 279 1019"> <tr> <td>CONJ</td> <td>BUF</td> </tr> </table> Tampon du conjugué: un tampon TRIS-HCl avec de l'albumine bovine et du thymol	CONJ	BUF	1 flacon 6 ml	Prêt à l'emploi	
CONJ	BUF				
<table border="1" data-bbox="119 1108 247 1153"> <tr> <td>CAL</td> <td>0</td> </tr> </table> Calibrateur zéro dans du sérum de brebis et du thymol	CAL	0	1 flacon lyophilisé	Ajouter 2 ml d'eau distillée	
CAL	0				
<table border="1" data-bbox="119 1220 263 1265"> <tr> <td>CAL</td> <td>N</td> </tr> </table> Calibrateur N = 1 à 5 (cfr. Valeurs exactes sur chaque flacon) dans du sérum de brebis et du thymol	CAL	N	5 flacons lyophilisés	Ajouter 1 ml d'eau distillée	
CAL	N				
<table border="1" data-bbox="119 1377 319 1422"> <tr> <td>WASH</td> <td>SOLN</td> <td>CONC</td> </tr> </table> Solution de Lavage (Tris-HCl)	WASH	SOLN	CONC	1 flacon 10 ml	Diluer 200 x avec de l'eau distillée (utiliser un agitateur magnétique).
WASH	SOLN	CONC			
<table border="1" data-bbox="119 1489 287 1534"> <tr> <td>CONTROL</td> <td>N</td> </tr> </table> Contrôles - N = 1 ou 2 dans du sérum humain et du thymol	CONTROL	N	2 flacons lyophilisés	Ajouter 1 ml d'eau distillée	
CONTROL	N				
<table border="1" data-bbox="119 1601 263 1646"> <tr> <td>CHROM</td> <td>TMB</td> </tr> </table> Solution Chromogène TMB (Tetramethylbenzidine)	CHROM	TMB	1 flacon 12 ml	Prêt à l'emploi	
CHROM	TMB				
<table border="1" data-bbox="119 1736 263 1780"> <tr> <td>STOP</td> <td>SOLN</td> </tr> </table> Solution d'arrêt: HCl 1N	STOP	SOLN	1 flacon 12 ml	Prêt à l'emploi	
STOP	SOLN				

Note: 1. Utiliser le calibrateur zéro pour la dilution des échantillons.
2. 1 µIU de la préparation du calibrateur est équivalent à 1 µIU de 2nd IS 98/574.

VI. MATERIEL NON FOURNI

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

1. Eau distillée d'une haute qualité
2. Pipettes pour distribuer: 50 µl, 200 µl, 500 µl et 2 ml (l'utilisation de pipettes précises et de pointes en plastique est recommandée)
3. Agitateur vortex
4. Agitateur magnétique

5. Laveur de micro-plaques
6. Lecteur de micro-plaques capable de lire à 450 nm et 650 nm (lecture bichromatique)

VII. PREPARATION DES REACTIFS

- A. Calibrateurs :** Reconstituer le calibrateur zéro avec 2 ml d'eau distillée et les autres calibrateurs avec 1 ml d'eau distillée.
- B. Contrôles :** Reconstituer les contrôles avec 1 ml d'eau distillée.
- C. Conjugué anti-hGH-HRP de travail:** Préparer un volume adéquat de conjugué anti-hGH-HRP de travail en ajoutant 25 µl du conjugué anti-hGH-HRP concentré (40x) à 1 ml de tampon du conjugué. Utiliser un agitateur magnétique pour homogénéiser. Il est recommandé de faire une dilution extemporanée.
- D. Solution de Lavage :** Préparer un volume adéquat de Solution de Lavage en ajoutant 199 volumes d'eau distillée à 1 volume de Solution de Lavage (200x). Utiliser un agitateur magnétique pour homogénéiser. Eliminer la Solution de Lavage non utilisée à la fin de la journée.

VIII. STOCKAGE ET DATE D'EXPIRATION DES REACTIFS

- Avant l'ouverture ou la reconstitution, tous les composants de la trousse sont stables jusqu'à la date d'expiration, indiquée sur l'étiquette, si la trousse est conservée entre 2 et 8°C.
- Des barrettes inutilisées doivent être gardées, à 2-8°C, dans un sachet cacheté contenant un dessiccant jusqu'à la date d'expiration.
- Après reconstitution, les calibrateurs et les contrôles sont stables pendant 7 jours entre 2 et 8°C. Pour de plus longues périodes de stockage, des aliquots devront être réalisés et ceux-ci seront gardés à -20°C pendant 3 mois. Eviter des cycles de congélation et décongélation successifs.
- La Solution de Lavage concentrée est stable à température ambiante jusqu'à la date d'expiration.
- La Solution de Lavage préparée doit être utilisée le jour même.
- Après la première utilisation, le conjugué est stable jusqu'à la date d'expiration, si celui-ci est conservé entre 2 et 8°C dans le flacon d'origine correctement fermé.
- Des altérations dans l'apparence physique des réactifs de la trousse peuvent indiquer une instabilité ou une détérioration.

IX. PREPARATION ET STABILITE DE L'ECHANTILLON

- Les échantillons de sérum ou de plasma doivent être gardés entre 2 et 8°C.
- Si le test n'est pas réalisé dans les 24 heures, un stockage en aliquots à -20°C est recommandé.
- Eviter des cycles de congélation et décongélation successifs.
- Avant l'utilisation des échantillons, ceux-ci doivent être à température ambiante. On recommande de vortexer les échantillons avant de les utiliser.
- Le sérum ou le plasma (hépariné ou EDTA) donne des résultats similaires.

$$Y(\text{sérum}) = 0,89 \times (\text{plasma EDTA}) + 0,14 \quad r=0,98 \quad n=46$$

$$Y(\text{sérum}) = 1,02 \times (\text{plasma hép.}) + 0,01 \quad r=0,98 \quad n=46$$
- Ne pas utiliser d'échantillons hémolysés

X. MODE OPERATOIRE

A. Notes de manipulation

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

B. Mode opératoire

- Sélectionner le nombre de barrettes nécessaires pour le test. Les barrettes inutilisées doivent être cachetées de nouveau dans le sachet avec un dessiccant et gardées à 2-8°C.
- Placer les barrettes dans le support.
- Pipeter 50 µl de chaque Calibrateur, Contrôle et Echantillon dans les puits appropriés.
- Pipeter 50 µl du conjugué anti-hGH-HRP de travail dans tous les puits.
- Incuber pendant 30 minutes à température ambiante. Il est obligatoire de respecter la durée de trente minutes pour cette incubation.
- Aspirer le liquide de chaque puits.
- Laver la plaque 3 fois en:
 - distribuant 0,4 ml de la Solution de Lavage dans chaque puits
 - aspirant le contenu de chaque puits
- Pipeter 100 µl de la solution chromogène dans chaque puits dans les 15 minutes après la phase de lavage.
- Incuber la micro-plaque pendant 30 minutes à température ambiante, éviter exposition à la lumière du soleil.
- Pipeter 100 µl de la Solution d'arrêt dans chaque puits.
- Lire les absorbances à 450 nm (filtre de référence 630 nm ou 650 nm) endéans l'heure et calculer les résultats comme décrits dans la section XI.

XI. CALCUL DES RESULTATS

- Lire la plaque à 450 nm contre un filtre de référence mis à 650 nm (ou 630 nm).
- Calculer la moyenne de chaque détermination réalisée en double.
- Dessiner sur un graphique linéaire ou semi-logarithmique les DO (ordonnées) pour chaque calibrateur contre la concentration correspondante en hGH (abscisses) et dessiner une courbe de calibration à l'aide des points de calibration, en connectant les points avec des lignes droites.
- Lire la concentration pour chaque contrôle et échantillon par interpolation sur la courbe de calibration.
- L'analyse informatique des données simplifiera les calculs. Si un système d'analyse de traitement informatique des données est utilisé, il est recommandé d'utiliser la fonction « 4 paramètres » du lissage de courbes.

XII. DONNEES TYPES

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

hGH-ELISA		Unités DO
Calibrateur	0 µIU/ml	0,030
	0,45 µIU/ml	0,062
	5,4 µIU/ml	0,226
	12,9 µIU/ml	0,501
	43,5 µIU/ml	1,429
	98,0 µIU/ml	2,330

XIII. PERFORMANCE ET LIMITES

A. Sensibilité

Vingt calibrateurs zéro ont été testés en parallèle avec un assortiment d'autres calibrateurs. La limite de détection, définie comme la concentration apparente située 2 déviations standards au-dessus de la DO moyenne déterminée à la fixation zéro, était de 0,17 µIU/ml.

B. Spécificité

Des hormones cross-réactives ont été ajoutées à un control de valeur haute en hGH et à un control de valeur basse. La réponse hGH apparente a été mesurée.

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

C. Précision

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

SD : Déviation Standard; CV: Coefficient de variation

D. Exactitude

TEST DE RECUPERATION

Echantillon	hGH ajoutée (µIU/ml)	hGH récupérée (µIU/ml)	Récupération (%)
Sérum	4,3	4,1	95
	13,5	12,8	95
	26,8	28,1	105
	52,1	58,9	113
Plasma	4,3	4,6	106
	13,5	13,2	98
	26,8	25,3	94
	52,1	53,0	102

TEST DE DILUTION

Echantillon	Dilution	Concent. théorique (µIU/ml)	Concent. Mesurée (µIU/ml)
Sérum 1	1/2	-	97,7
	1/4	48,8	57,0
	1/8	24,4	27,7
	1/16	12,2	13,6
	1/32	6,1	6,4
	1/64	3,1	3,0
Sérum 2	1/1	-	21,2
	1/2	10,6	9,3
	1/4	5,3	4,6
	1/8	2,7	2,2
	1/16	1,3	1,1
	1/32	0,7	0,6

Les échantillons ont été dilués avec le calibrateur zéro.

Facteur de conversion:

1µIU de la préparation du calibrateur hGH-ELISA = 0,33 ng

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

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

	Délai		
	0 min	15 min	30 min
S1	1.83	1.71	1.60
S2	8.38	8.00	7.20

F. Effet crochet

Un échantillon dopé avec de l'hGH jusqu'à 4000 µIU/ml donne des DO supérieures au dernier point de calibration.

XIV. CONTROLE DE QUALITE INTERNE

- Si les résultats obtenus pour le(s) contrôle(s) 1 et/ou 2 ne sont pas dans l'intervalle spécifié sur l'étiquette du flacon, les résultats ne peuvent pas être utilisés à moins que l'on ait donné une explication satisfaisante de la non-conformité.
- Chaque laboratoire est libre de faire ses propres stocks d'échantillons contrôles, lesquels doivent être congelés aliquotés. Des contrôles qui contiennent de l'azide influenceront la réaction enzymatique et ne peuvent pas être utilisés.

- Les critères d'acceptation pour les écarts des valeurs *in duplo* des échantillons doivent être basés sur les pratiques de laboratoire courantes.
- On recommande que les contrôles soient testés de façon routinière comme des échantillons inconnus pour mesurer la variabilité du test. La réalisation du test doit être suivie avec des fichiers de contrôle de qualité des contrôles.
- On recommande de vérifier visuellement le lissage de courbe sélectionné par l'ordinateur.

XV. VALEURS ATTENDUES

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

Chez les sujets normaux, la sécrétion de l'hormone de croissance (hGH) est pulsatile. Durant la journée, le domaine des concentrations en hGH est <0,2-10 µIU/ml. Pendant le sommeil, les concentrations en hGH augmentent constamment (± 30 µIU/ml).

La sécrétion en hGH est fortement stimulée par le sport et le stress (ponction veineuse, hypoglycémie, ...), mais décroît en hyperglycémie.

Chez les sujets normaux (n=34), deux heures après une prise orale de glucose (75 g pour les adultes), les taux en hGH étaient inférieurs à 10 µIU/ml et la réponse hGH aux tests de stimulation (administration d'insuline, arginine, glucagon) excédait 20 µIU/ml.

Les taux en hGH étaient élevés (même après prise de glucose) en acromégalie (> 10 µIU/ml).

En déficience de hGH, la réponse aux tests de stimulation est absente ou faible (petite taille par déficience en hGH; hypopituitarisme de différentes origines).

XVI. PRECAUTIONS ET AVERTISSEMENTS

Sécurité

Pour utilisation en diagnostic *in vitro* uniquement.

Les composants de sang humain inclus dans ce kit ont été évalués par des méthodes approuvées par l'Europe et/ou la FDA et trouvés négatifs pour HBsAg, l'anti-HCV, l'anti-HIV-1 et 2. Aucune méthode connue ne peut offrir l'assurance complète que des dérivés de sang humain ne transmettront pas d'hépatite, le sida ou toute autre infection. Donc, le traitement des réactifs, du sérum ou des échantillons de plasma devront être conformes aux procédures locales de sécurité. Tous les produits animaux et leurs dérivés ont été collectés d'animaux sains. Les composants bovins proviennent de pays où l'ESB n'a pas été détectée. Néanmoins, les composants contenant des substances animales devront être traités comme potentiellement infectieux.

Eviter le contact de la peau avec tous les réactifs. En cas de contact, laver avec beaucoup d'eau.

Ne pas fumer, ni boire, ni manger ni appliquer de produits cosmétiques dans les laboratoires. Ne pas pipeter avec la bouche. Utiliser des vêtements protecteurs et des gants à usage unique.

XVII. BIBLIOGRAPHIE

1. CAMANNI F., MASSARA F., BELFORTE L., ROSATELLO A., MOLENATTI G.M. (1977)
Effect of dopamine on plasma growth hormone and prolactin levels in normal and acromegalic subjects.
J. Clin. Endo. and Metab., 44:465.
2. DAUGHADAY W.H. (1981)
The adenohipophysis
In : "Textbook of Endocrinology", R.H. Williams ed., W.B. Saunders, Philadelphia, p;73.
3. DROBNY E.C., AMBURN K., BAUMANN G. (1983)
Circadian variation of basal plasma growth hormone in man.
J. Clin. Endo. and Metab., 57:524-528.
4. HASHIDA S., NAKAWAGA K., ISHIKAWA E., OHTAKI S. (1985)
Basal level of human growth hormone (hGH) in normal serum.
Clin. Chim. Acta, 151:185-186.
5. LEWIS V.J. et al. (1980)
Human growth hormone : A complex of proteins.
Rec. Progr. Horm. Res., 36:488.
6. LI C.H. (1974)
Human growth hormone : perspective on its chemistry and physiology.
In : "Advances in human growth hormone research", S. Raiti ed. U.S. Department of Health, Education and Welfare Publ. DMEW publ. no. (NJH) 74-612, p. 321.

7. REUTENS AT. (1995)
Evaluation and application of a highly sensitive assay for serum growth hormone (GH) in the study of adult GH deficiency.
J. Clin. Endocrinol. Metab., 80(2): 480-485
8. CROWLEY S. et al. (1995)
Growth and the growth hormone axis in prepubertal children with asthma.
J. Pediatr. 126(2): 297-303.
9. KELLY JT. et al. (1993)
Effect of different oral oestrogen formulations on insulin-like growth factor I, growth hormone and growth hormone binding protein in post-menopausal women.
Clin. Endocrinol. 39(5) : 561-567

XVIII. RESUME DU PROTOCOLE

	CALIBRATEURS (µl)	ECHANTILLON(S) CONTROLES (µl)
Calibrateurs (0-5) Echantillons, Contrôles Conjugué anti-hGH-HRP de travail	50 - 50	- 50 50
Incuber pendant 30 minutes à température ambiante. Aspirer le contenu de chaque puits. Laver 3 fois avec 400 µl de la Solution de Lavage et aspirer.		
Solution du chromogène	100	100
Incuber pendant 30 min à température ambiante.		
Solution d'arrêt	100	100
Lire sur un lecteur de micro-plaques et enregistrer l'absorbance de chaque puits à 450 nm (contre 630 ou 650 nm) et 490 nm (contre 630 ou 650 nm)		

Vor Gebrauch des Kits lesen Sie bitte diese Packungsbeilage.

hGH-ELISA

I. VERWENDUNGSZWECK

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

II. ALLGEMEINE INFORMATION

- A. **Handelsbezeichnung :** DIAsource hGH-ELISA Kit
- B. **Katalognummer :** KAP1081 : 96 Tests
- C. **Hergestellt von:** DIAsource ImmunoAssays S.A.
Rue du Bosquet, 2, B-1348 Louvain-la-Neuve, Belgien.

Für technische Unterstützung oder Bestellungen wenden Sie sich bitte an:

Tel : +32 (0)10 84.99.11 Fax : +32 (0)10 84.99.91

Für Deutschland : Kostenfreie Rufnummer : 0800 1 00 85 74 - Kostenfreie Faxnummer : 0800 1 00 85 75

E-mail Ordering : ordering@diasource.be

III. KLINISCHER HINTERGRUND

A. Biologische Aktivität

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

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

B. Klinische Anwendung

· **Minderwuchs**

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

· **Hypopituitarismus**

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


· **Gigantismus und Akromegalie**

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

IV. GRUNDSÄTZLICHES ZUR DURCHFÜHRUNG

Der DIASource hGH-ELISA ist ein solid phase-Enzyme Amplified Sensitive Immunoassay (ELISA) im Mikrotiterplattenformat. Kalibratoren und Proben reagieren mit dem primären monoklonalen Antikörper (MAK 1), mit dem die Wells der Mikrotiterplatte beschichtet sind, und mit einem monoklonalen Antikörper (MAK 2), der mit Meerrettich-Peroxidase (MRP) markiert ist. Nach einer Inkubationsphase bildet sich ein Sandwich-Komplex: MAK 1 - hGH - MAK 2 - MRP; nicht gebundene enzymbeschriebene Antikörper werden durch Waschen der Mikrotiterplatte entfernt. Gebundene enzymbeschriebene Antikörper werden durch eine Farbreaktion gemessen. Chromogene Lösung (TMB – H₂O₂) wird hinzugefügt und inkubiert. Die Reaktion wird durch Hinzufügen einer Stopplösung beendet und die Mikrotiterplatte wird bei adäquater Wellenlänge ausgewertet. Die Menge an Substratumsatz wird kolorimetrisch durch Messung der Absorption bestimmt, die proportional zur hGH-Konzentration ist. Es wird eine Kalibrationskurve erstellt und die hGH-Konzentration in den Proben wird durch Interpolation von der Kalibrationskurve bestimmt.

V. MITGELIEFERTE REAGENZIEN

Reagenzien	96 Tests Kit	Rekonstitution			
 Mikrotiterplatte mit 96 Anti-hGH beschichteten, abbrechbaren Wells (monoklonale Antikörper)	96 Wells	gebrauchsfertig			
<table border="1" data-bbox="119 840 335 884"> <tr> <td>Ab</td> <td>HRP</td> <td>CONC</td> </tr> </table> Konjugat: MRP beschriftete Anti-hGH (monoklonale Antikörper) in Stabilisierungspuffer	Ab	HRP	CONC	1 Gefäß 0,2 ml	40 fach mit Konjugatpuffer verdünnen
Ab	HRP	CONC			
<table border="1" data-bbox="119 974 279 1019"> <tr> <td>CONJ</td> <td>BUF</td> </tr> </table> Konjugatpuffer: TRIS-HCl Puffer mit Rinderserumalbumin und Thymol	CONJ	BUF	1 Gefäß 6 ml	gebrauchsfertig	
CONJ	BUF				
<table border="1" data-bbox="119 1108 247 1153"> <tr> <td>CAL</td> <td>0</td> </tr> </table> Null-Kalibrator in Schafserum und Thymol	CAL	0	1 Gefäß lyophilisiert	2 ml dest. Wasser zugeben	
CAL	0				
<table border="1" data-bbox="119 1220 247 1265"> <tr> <td>CAL</td> <td>N</td> </tr> </table> Kalibrator - N = 1 bis 5 (genaue Werte auf Gefäß-Etiketten) in Schafserum und Thymol	CAL	N	5 Gefäße lyophilisiert	1 ml dest. Wasser zugeben	
CAL	N				
<table border="1" data-bbox="119 1377 311 1422"> <tr> <td>WASH</td> <td>SOLN</td> <td>CONC</td> </tr> </table> Waschlösung (Tris-HCl)	WASH	SOLN	CONC	1 Gefäß 10 ml	200 x mit dest. Wasser verdünnen (Magnetrührer benutzen).
WASH	SOLN	CONC			
<table border="1" data-bbox="119 1489 279 1534"> <tr> <td>CONTROL</td> <td>N</td> </tr> </table> Kontrollen - N = 1 oder 2 Humanserum und Thymol	CONTROL	N	2 Gefäße lyophilisiert	1 ml dest. Wasser zugeben	
CONTROL	N				
<table border="1" data-bbox="119 1601 263 1646"> <tr> <td>CHROM</td> <td>TMB</td> </tr> </table> Chromogenes TMB (Tetramethylbenzidin)	CHROM	TMB	1 Gefäß 12 ml	gebrauchsfertig	
CHROM	TMB				
<table border="1" data-bbox="119 1713 263 1758"> <tr> <td>STOP</td> <td>SOLN</td> </tr> </table> Stopplösung: HCl 1N	STOP	SOLN	1 Gefäß 12 ml	gebrauchsfertig	
STOP	SOLN				

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

VI. ZUSÄTZLICH BENÖTIGTES MATERIAL

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

- Hochwertiges destilliertes Wasser
- Pipetten: 50 µl, 200 µl, 500 µl und 2 ml (Verwendung von Präzisionspipetten mit Einwegplastikspitzen wird empfohlen)
- Vortex Mixer
- Magnetrührer

- Waschgerät für Mikrotiterplatten
- Mikrotiterplatten-Lesegerät zur Auswertung bei 450 nm und 650 nm (bichromatischer Auswertung)

VII. VORBEREITUNG DER REAGENZIEN

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

VIII. AUFBEWAHRUNG UND LAGERUNG DER REAGENZIEN

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

IX. PROBENSAMMLUNG UND -VORBEREITUNG

- Serum- oder Plasmaproben müssen bei 2-8°C aufbewahrt werden.
- Falls der Test nicht innerhalb von 24 Std. durchgeführt wird, ist die Aufbewahrung bei -20°C erforderlich.
- Vermeiden Sie wiederholtes Einfrieren und Auftauen.
- Vor Gebrauch müssen alle Proben Raumtemperatur erreichen. Vortexmischen der Proben wird vor Gebrauch empfohlen.
- Serum-, Heparinisiertes Plasma- oder EDTA-Plasmaproben liefern ähnliche Ergebnisse.

$$Y(\text{Serum}) = 0,89 \times (\text{EDTA-Plasma}) + 0,14 \quad r=0,98 \quad n=46$$

$$Y(\text{Serum}) = 1,02 \times (\text{Hep. Plasma}) + 0,01 \quad r=0,98 \quad n=46$$
- Keine hämolytischen Proben benutzen

X. DURCHFÜHRUNG

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

Pipettieren Sie die chromogene Lösung innerhalb von 15 Minuten nach dem Waschen der Mikrotiterplatte.
Während der Inkubation mit der chromogene Lösung ist die Mikrotiterplatte vor direktem Sonnenlicht zu schützen.

B. Durchführung

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

XI. BERECHNUNG DER ERGEBNISSE

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

XII. TYPISCHE WERTE

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

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

XIII. LEISTUNGSMERKMALE UND GRENZEN DER METHODIK

A. Nachweisgrenze

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

B. Spezifität

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

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

C. Präzision

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

SD : Standardabweichung; CV: Variationskoeffizient

D. Genauigkeit

WIEDERFINDUNGSTEST			
Probe	Zugeg. hGH (µIU/ml)	Wiedergef. hGH (µIU/ml)	Wiedergefunden (%)
Serum	4,3	4,1	95
	13,5	12,8	95
	26,8	28,1	105
	52,1	58,9	113
Plasma	4,3	4,6	106
	13,5	13,2	98
	26,8	25,3	94
	52,1	53,0	102

VERDÜNNUNGSTEST			
Probe	Verdünn.	Theoret. Konzent. (µIU/ml)	Gemess. Konzent. (µIU/ml)
Serum 1	1/2	-	97,7
	1/4	48,8	57,0
	1/8	24,4	27,7
	1/16	12,2	13,6
	1/32	6,1	6,4
	1/64	3,1	3,0
Serum 2	1/1	-	21,2
	1/2	10,6	9,3
	1/4	5,3	4,6
	1/8	2,7	2,2
	1/16	1,3	1,1
	1/32	0,7	0,6

Die Proben wurden mit Null-Kalibrator verdünnt.

Umrechnungsfaktor:

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

E. Zeitverzögerung zwischen letzter Kalibrator- und Probenzugabe

Es wird im Folgenden gezeigt, dass die Genauigkeit der Tests selbst dann gewährleistet ist, wenn die Probe 30 Minuten nach Zugabe des Kalibrators in die beschichteten Wells zugegeben wird.

ZEITDIFFERENCE			
	0 min	15 min	30 min
S1	1.83	1.71	1.60
S2	8.38	8.00	7.20

F. Hook-Effekt

Eine Probe mit hGH bis zu 4000 µIU/ml liefert höhere Messwerte als der letzte Kalibratormaßwert.

XIV INTERNE QUALITÄTSKONTROLLE

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

XV. REFERENZINTERVALLE

Diese Werte sind nur Richtwerte; jedes Labor muss seinen eigenen Normalwertbereich ermitteln.

Bei gesunden Personen erfolgt die hGH-Ausschüttung pulsatil. Tagsüber variiert die hGH-Konzentration von < 0,2 bis 10 µIE/ml. Im Schlaf steigt die hGH-Konzentration kontinuierlich an (± 30 µIE/ml).

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

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

Patienten mit Akromegalie zeigten selbst nach Glucose-Gabe erhöhte hGH-Werte (> 10 µIU/ml).

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

XIII. VORSICHTSMASSNAHMEN UND WARNUNGEN

Sicherheit

Nur für diagnostische Zwecke.

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

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

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

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

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

XVII. LITERATUR

- CAMANNI F., MASSARA F., BELFORTE L., ROSATELLO A., MOLENATTI G.M. (1977)
Effect of dopamine on plasma growth hormone and prolactin levels in normal and acromegalic subjects.
J. Clin. Endo. and Metab., 44:465.
- DAUGHADAY W.H. (1981)
The adenohiphysis
In : "Textbook of Endocrinology", R.H. Williams ed., W.B. Saunders, Philadelphia, p;73.
- DROBNY E.C., AMBURN K., BAUMANN G. (1983)
Circadian variation of basal plasma growth hormone in man.

J. Clin. Endo. and Metab., 57:524-528.

- HASHIDA S., NAKAWAGA K., ISHIKAWA E., OHTAKI S. (1985)
Basal level of human growth hormone (hGH) in normal serum.
Clin. Chim. Acta, 151:185-186.
- LEWIS V.J. et al. (1980)
Human growth hormone : A complex of proteins.
Rec. Progr. Horm. Res., 36:488.
- LI C.H. (1974)
Human growth hormone : perspective on its chemistry and physiology.
In : "Advances in human growth hormone research", S. Raiti ed. U.S. Department of Health, Education and Welfare Publ. DMEW publ. no. (NJH) 74-612, p. 321.
- REUTENS AT. (1995)
Evaluation and application of a highly sensitive assay for serum growth hormone (GH) in the study of adult GH deficiency.
J. Clin. Endocrinol. Metab., 80(2): 480-485
- CROWLEY S. et al. (1995)
Growth and the growth hormone axis in prepubertal children with asthma.
J. Pediatr. 126(2): 297-303.
- KELLY JT. et al. (1993)
Effect of different oral oestrogen formulations on insulin-like growth factor I, growth hormone and growth hormone binding protein in post-menopausal women.
Clin. Endocrinol. 39(5) : 561-567

XVIII. ZUSAMMENFASSUNG DES PROTOKOLLS

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



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

hGH -ELISA

I. USO DEL KIT

Kit immunoenzimetrico per la determinazione quantitativa in vitro dell'Ormone della Crescita umano (hGH) in siero o plasma.

II. INFORMAZIONI DI CARATTERE GENERALE

- A. Nome commerciale:** DIAsource hGH-ELISA Kit
- B. Numero di catalogo:** KAP1081: 96 test
- C. Prodotto da:** DIAsource ImmunoAssays S.A.
Rue du Bosquet, 2, B-1348 Louvain-la-Neuve, Belgio.

Per informazioni tecniche o su come ordinare il prodotto contattare:

Tel: +32 (0) 10 84.99.11

Fax: +32 (0) 10 84.99.91

III. INFORMAZIONI CLINICHE

A. Attività biologiche

L'hGH è un ormone polipeptidico (peso molecolare 21.500 Da) la cui produzione da parte delle cellule acidofile della ghiandola pituitaria anteriore è controllata da due importanti sostanze prodotte dall'ipofisi mediana: il Fattore di Rilascio dell'Ormone della Crescita (GRF) e la somatostatina, un agente dall'effetto inibente. Un ruolo non meno importante nella secrezione dell'hGH è quello esercitato dalle vie dopaminergica, adrenergica e serotoninergica. La secrezione di hGH viene stimolata anche da altri fattori quali ipoglicemia, esercizio fisico, digiuno, assunzione di pasti ad alto contenuto proteico, sonno profondo, stress, glucagone, L-Dopa, aminoacidi e altro, mentre risulta inibita da glucosio, cortisolo, hGH, e acidi grassi liberi. La sua breve emivita plasmatica (+/-25 minuti) e i vari stimoli eccitatori o inibitori determinano ampie e frequenti variazioni del suo livello nel siero. L'azione dell'hGH a livello epatico e tissutale, una delle sue principali funzioni fisiologiche, induce la produzione di somatomedina che stimola la crescita attraverso un'azione diretta sui tessuti target. Al contrario di quanto accade per l'hGH, il livello di somatomedina nel siero si mantiene stabile grazie al legame di questa con le proteine circolanti nel plasma.

B. Applicazione clinica

Ritardo nella crescita

L'iposecrezione di hGH è una delle varie cause di ritardo nella crescita in età pediatrica. Il dosaggio dell'hGH nel siero mediante un test altamente sensibile, meglio ancora se effettuato in seguito a stimolo provocativo (assenza di risposta), rappresenta uno strumento importante per la formulazione di una corretta diagnosi per pazienti di questo tipo che possono essere trattati con somministrazioni di hGH.

Ipopituitarismo

La determinazione dei livelli di hGH nel siero è inoltre un indice della funzionalità ipofisaria in caso di sospetto ipopituitarismo (idiopatico o dovuto a neoplasia e intervento chirurgico).

Gigantismo e acromegalia


La determinazione dei livelli di hGH nel siero, specialmente dopo test provocativo di inibizione (assenza di risposta) è un mezzo importante per la formulazione diagnostica di ipersecrezione di hGH indotta da adenoma acidofilo. Le patologie che ne derivano, gigantismo nel bambino e acromegalia nell'adulto, possono essere trattate con intervento chirurgico o radioterapia.

IV. PRINCIPIO DEL METODO

DIASource hGH-ELISA è un immunosaggio a sensibilità amplificata a fase solida eseguito su piastre di microtitolazione. I calibratori e i campioni reagiscono con la cattura dell'anticorpo monoclonale (MAb 1) che riveste il pozzetto di microtitolazione e con un anticorpo monoclonale (MAb 2) marcato con horseradish perossidasi (HRP). Dopo un periodo di incubazione che consenta la formazione di un sandwich: MAb 1 di rivestimento – hGH – MAb 2 – HRP, la piastra di microtitolazione viene lavata per rimuovere l'anticorpo marcato con enzima non legato. L'anticorpo marcato con enzima non legato viene misurato attraverso una reazione cromogena. Si procede quindi con l'aggiunta della soluzione cromogena (TMB-H₂O₂) e successiva incubazione. La reazione viene interrotta con l'aggiunta di Soluzione di arresto; quindi la piastra di microtitolazione viene letta alla lunghezza d'onda adeguata. La quantità di turnover del substrato viene determinata colorimetricamente misurando l'assorbanza che è proporzionale alla concentrazione di hGH.

Viene tracciata una curva di calibrazione e la concentrazione hGH nei campioni viene determinata per interpolazione dalla curva di calibrazione.

V. REATTIVI FORNITI

Reattivi	Kit da 96 test	Volume di ricostituzione			
 Piastra di microtitolazione con 96 pozzetti separabili, rivestiti anti hGH (anticorpi monoclonali)	96 pozzetti	Pronte per l'uso			
<table border="1" data-bbox="156 891 379 936"> <tr> <td>Ab</td> <td>HRP</td> <td>CONC</td> </tr> </table> Coniugato: marcato HRP anti-hGH (Anticorpi monoclonali) in tampone stabilizzante	Ab	HRP	CONC	1 flacone 0,2 ml	Diluire 40 x con tampone del coniugato
Ab	HRP	CONC			
<table border="1" data-bbox="135 1025 295 1059"> <tr> <td>CONJ</td> <td>BUF</td> </tr> </table> Tampone del coniugato: tampone TRIS-HCl con albumina di siero bovino e timolo	CONJ	BUF	1 flacone 6 ml	Pronto per l'uso	
CONJ	BUF				
<table border="1" data-bbox="135 1171 263 1205"> <tr> <td>CAL</td> <td>0</td> </tr> </table> Calibratore zero in siero di pecora e timolo.	CAL	0	1 flacone liofiliz.	Aggiungere 2 ml di acqua distillata	
CAL	0				
<table border="1" data-bbox="135 1294 263 1328"> <tr> <td>CAL</td> <td>N</td> </tr> </table> Calibratore 1-5 (le concentrazioni esatte degli calibratore sono riportate sulle etichette dei flaconi), in siero di pecora e timolo.	CAL	N	5 flaconi liofiliz.	Aggiungere 1 ml di acqua distillata	
CAL	N				
<table border="1" data-bbox="135 1440 327 1473"> <tr> <td>WASH</td> <td>SOLN</td> <td>CONC</td> </tr> </table> Tampone di lavaggio (TRIS HCl)	WASH	SOLN	CONC	1 flacone 10 ml	Diluire 200 x con acqua distillata usando un agitatore magnetico..
WASH	SOLN	CONC			
<table border="1" data-bbox="135 1563 295 1597"> <tr> <td>CONTROL</td> <td>N</td> </tr> </table> Controlli: N = 1 o 2, in siero umano con timolo	CONTROL	N	2 flaconi liofiliz.	Aggiungere 1 ml di acqua distillata	
CONTROL	N				
<table border="1" data-bbox="135 1686 279 1720"> <tr> <td>CHROM</td> <td>TMB</td> </tr> </table> Soluzione Cromogena TMB (tetrametilbenzidina)	CHROM	TMB	1 flacone 12 ml	Pronto per l'uso	
CHROM	TMB				
<table border="1" data-bbox="135 1798 263 1832"> <tr> <td>STOP</td> <td>SOLN</td> </tr> </table> Soluzione di arresto: HCl 1N	STOP	SOLN	1 flacone 12 ml	Pronto per l'uso	
STOP	SOLN				

Note: 1. Usare lo standard zero per diluire i campioni.
2. 1 µUI della preparazione standard è equivalente a 1 µUI di 2nd IS 98/574.

VI. REATTIVI NON FORNITI

Il seguente materiale è richiesto per il dosaggio ma non è fornito nel kit.

1. Acqua distillata di qualità elevata

2. Pipette per dispensare 50 µl, 200 µl, 500 µl e 2 ml (Si raccomanda di utilizzare pipette accurate con puntale in plastica monouso).
3. Agitatore tipo vortex.
4. Agitatore magnetico.
5. lavatrice per piastra di microtitolazione
6. Lettore piastra di microtitolazione con una potenza di lettura di 450 nm e 650 nm (lettura bicromatica)

VII. PREPARAZIONE DEI REATTIVI

- A. Calibratore:** Ricostituire il calibratore zero con 2 ml di acqua distillata e gli altri calibratori con 1 ml di acqua distillata.
- B. Controlli:** Ricostituire i controlli con 1 ml di acqua distillata.
- C. Soluzione di lavoro del coniugato anti-hGH-HRP:** Preparare la quantità necessaria di soluzione del coniugato aggiungendo 25 µl del coniugato anti-hGH-HRP a 1 ml di tampone del coniugato. Utilizzare un vortex per omogeneizzare. Si raccomanda la preparazione estemporanea.
- D. Soluzione di lavoro del tampone di lavaggio:** Preparare la quantità necessaria di soluzione di lavoro del tampone di lavaggio aggiungendo 199 parti di acqua distillata ad una parte di tampone di lavaggio concentrato (200x). Usare un agitatore magnetico per rendere la soluzione omogenea. La soluzione di lavoro va scartata al termine della giornata.

VIII. CONSERVAZIONE E SCADENZA DEI REATTIVI

- I reattivi non utilizzati sono stabili a 2-8°C fino alla data riportata su ciascuna etichetta.
- Le strisce reattive inutilizzate devono essere conservate a 2-8°C, in un contenitore sigillato che contenga un essiccante fino alla data di scadenza.
- Dopo la ricostituzione, i calibratori e i controlli sono stabili 7 giorni a 2-8°C. Per periodi di conservazione molto lunghi, preparare e mantenere le aliquote a -20°C. Evitare ripetuti cicli di congelamento-scongelo dei campioni.
- La soluzione di lavaggio concentrata è stabile a temperatura ambiente fino alla data di scadenza.
- La soluzione di lavoro del tampone di lavaggio deve essere preparata fresca ogni volta e usata nello stesso giorno della preparazione.
- Dopo apertura del flacone, il coniugato è stabile fino alla data di scadenza riportata sull'etichetta, se conservato a 2-8°C nel flacone originale ben tappato.
- Alterazioni dell'aspetto fisico dei reattivi possono indicare una loro instabilità o deterioramento.

IX. RACCOLTA E PREPARAZIONE DEI CAMPIONI

- Conservare i campioni di siero o plasma a 2-8°C.
- Se non si desidera eseguire il dosaggio entro 24 ore dal prelievo, si raccomanda di conservare i campioni a -20°C. Evitare ripetuti cicli di congelamento-scongelo dei campioni.
- Prima dell'impiego, tutti i campioni devono essere a temperatura ambiente. Si raccomanda di vortexare i campioni prima di utilizzarli.
- Siero, plasma eparinato o plasma EDTA producono risultati simili.

$$Y(\text{siero}) = 0.89 \times (\text{plasma EDTA}) + 0.14 \mu\text{IU/ml} \quad r=0.98 \quad n=46$$

$$Y(\text{siero}) = 1.02 \times (\text{plasma eparinato}) + 0.01 \mu\text{IU/ml} \quad r=0.98 \quad n=46$$
- Non usare campioni emolizzati.

X. METODO DEL DOSAGGIO

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

Durante l'incubazione con la soluzione cromogena evitare la luce diretta del sole sulla piastra di microtitolazione.

B. Metodo del dosaggio

1. Selezionare il numero di strisce reagenti necessario per il test. Le strisce reagenti inutilizzate devono essere risigillate nel contenitore con un essiccante e conservate a 2-8°C.
2. Assicurare le strisce reagenti nel telaio di supporto.
3. Pipettare 50 µl di ogni calibratore, controllo e campione nei pozzetti adeguati.
4. Pipettare 50 µl della soluzione di lavoro del coniugato anti-hGH-HRP in tutti i pozzetti.
5. Incubare per 30 minuti a temperatura ambiente - Il rispetto della durata di 30 minuti di tale incubazione è indispensabile.
6. Aspirare il liquido da ogni pozzetto.
7. Lavare la piastra 3 volte :
 - versando 0,4 ml di soluzione di lavaggio in ogni pozzetto
 - aspirando il contenuto di ogni pozzetto
8. Pipettare in ogni pozzetto 100 µl di Soluzione Cromogena entro 15 minuti dal termine della fase di lavaggio.
9. Incubare la piastra di microtitolazione per 30 minuti a temperatura ambiente; evitare la luce diretta del sole.
10. Pipettare 100 µl di soluzione di arresto in ogni pozzetto.
11. Leggere le assorbanze a 450 nm (filtro di riferimento a 630 nm o 650 nm) entro un'ora e calcolare i risultati come descritto nella sezione XI.

XI. CALCOLO DEI RISULTATI

1. Leggere la piastra a 450 nm rispetto a un filtro di riferimento regolato a 650 nm (o 630 nm).
2. Calcolare la media delle determinazioni in duplicato.
3. Costruire la curva di calibrazione su carta millimetrata semilogaritmica o lineare ponendo in ordinata le medie dei OD dei replicati degli standard e in ascissa le rispettive concentrazioni di hGH, collegando i punti tracciati con linee rette.
4. Determinare le concentrazioni e controlli per interpolazione sulla curva di taratura.
5. E' possibile utilizzare un sistema di interpolazione dati automatizzato. Con un sistema automatico di interpolazione dati, utilizzare la curva a 4 parametri.

XII. CARATTERISTICHE TIPICHE

I sotto riportati sono forniti a titolo di esempio e non devono essere utilizzati per calcolare le concentrazioni di hGH in campioni e controlli al posto della curva standard, che va eseguita per ogni dosaggio.

hGH-ELISA		Unità OD
Calibratore	0 µIU/ml	0,030
	0,45 µIU/ml	0,062
	5,4 µIU/ml	0,226
	12,9 µIU/ml	0,501
	43,5 µIU/ml	1,429
	98,0 µIU/ml	2,330

XIII. CARATTERISTICHE E LIMITI DEL METODO

A. Sensibilità

Venti replicati dello standard zero sono stati dosati insieme agli altri standard. La sensibilità, calcolata come concentrazione apparente di un campione con OD pari alla media più 2 deviazioni standard di 20 replicati dello standard zero, è risultata essere 0,17 µIU/ml.

B. Specificità

Sono stati aggiunti ormoni cross-reattivi a un campione di controllo a basso livello di hGH e a un campione di controllo a livello elevato ed è stata quindi misurata la risposta apparente dell'hGH.

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

C. Precisione

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

SD : Deviazione Standard; CV: Coefficiente di Variazione

D. Accuratezza

TEST DI RECUPERO

Campione	hGH aggiunta (µIU/ml)	hGH recuperata (µIU/ml)	Recupero (%)
Siero	4,3	4,1	95
	13,5	12,8	95
	26,8	28,1	105
	52,1	58,9	113
Plasma	4,3	4,6	106
	13,5	13,2	98
	26,8	25,3	94
	52,1	53,0	102

TEST DI DILUIZIONE

Campione	Diluzione	Concentrazione teorica (µIU/ml)	Concentrazione misurata (µIU/ml)
Siero 1	1/2	-	97,7
	1/4	48,8	57,0
	1/8	24,4	27,7
	1/16	12,2	13,6
	1/32	6,1	6,4
	1/64	3,1	3,0
Siero 2	1/1	-	21,2
	1/2	10,6	9,3
	1/4	5,3	4,6
	1/8	2,7	2,2
	1/16	1,3	1,1
	1/32	0,7	0,6

I campioni sono stati diluiti con calibratore zero.

Fattore di conversione: 1µIU hGH ELISA Calibrator = 0,33ng

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

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

TEMPO TRASCORSO			
	0 min	15 min	30 min
S1	1.83	1.71	1.60
S2	8.38	8.00	7.20

D. Effetto hook

Un campione ha cui è stata aggiunta hGH fino a 4000 µIU/ml ha OD superiori a quello dello standard più concentrato.

XIV. CONTROLLO DI QUALITA' INTERNO

- Se i risultati ottenuti dosando il Controllo 1 e il Controllo 2 non sono all'interno dei limiti riportati sull'etichetta dei flaconi, non è opportuno

utilizzare i risultati ottenuti per i campioni, a meno che non si trovi una giustificazione soddisfacente.

- Ogni laboratorio può preparare un proprio pool di sieri da utilizzare come controllo, da conservare congelato in aliquote. I controlli che contengono azzide interferiscono con la reazione enzimatica e quindi non possono essere utilizzati.
- I criteri di accettazione delle differenze tra i risultati in duplicato dei campioni devono basarsi sulla buona prassi di laboratorio.
- Si raccomanda di saggiare i controlli con regolarità come campioni sconosciuti per misurare la variabilità del saggio. La resa del saggio deve essere monitorata con tabelle di controllo qualità dei controlli.
- È buona pratica verificare visivamente il modello di curva selezionato dal computer.

XV. INTERVALLI DI RIFERIMENTO

Questi valori vengono dati solo come guida; ogni laboratorio deve stabilire i propri intervalli normali di valori.

In soggetti normali la secrezione dell'ormone della crescita (hGH) è pulsatile. Durante il giorno, le concentrazioni di hGH variano da <0,2-10 µUI/ml, mentre durante il sonno aumentano sensibilmente (+/- 30 µUI/ml)

La secrezione di hGH viene fortemente stimolata dall'esercizio fisico e dallo stress (iniezione endovenosa, ipoglicemia...) e viene al contrario inibita dall'iperglicemia. In soggetti normali (n=34), a due ore dal test da carico di glucosio (75g. negli adulti), i livelli di hGH sono risultati inferiori a 10 µUI/ml, e la risposta dell'hGH ai test di stimolazione (insulina, arginina e glucagone) ha superato il livello di 20 µUI/ml.

Nei soggetti con acromegalia, i livelli di hGH sono risultati elevati anche dopo carico di glucosio (>10 µUI/ml).

Nei casi di deficit di hGH, la risposta ai test di stimolazione risulta assente o fortemente attenuata (bassa statura dovuta a deficit di hGH, ipopituitarismo di varia origine).

XVI. PRECAUZIONI PER L'USO

Sicurezza

Il kit è solo per uso diagnostico in vitro.

I reattivi di origine umana presenti nel kit sono stati dosati con metodi approvati da organismi di controllo europei o da FDA e si sono rivelati negativi per HBs Ag, anti HCV, anti HIV1 e anti HIV2. Non sono disponibili metodi in grado di offrire la certezza assoluta che derivati da sangue umano non possano provocare epatiti, AIDS o trasmettere altre infezioni. Manipolare questi reattivi o i campioni di siero o plasma secondo le procedure di sicurezza vigenti.

Tutti i prodotti di origine animale o loro derivati provengono da animali sani. I componenti di origine bovina provengono da paesi dove non sono stati segnalati casi di BSE. E' comunque necessario considerare i prodotti di origine animale come potenziali fonti di infezioni.

Evitare qualsiasi contatto della cute con tutti i reagenti. In caso di contatto, lavare abbondantemente con acqua.

Non fumare, bere, mangiare o applicare cosmetici nell'area di lavoro. Non pipettare i reattivi con pipette a bocca. Utilizzare indumenti protettivi e guanti monouso.

XVII. RIFERIMENTI BIBLIOGRAFICI

1. CAMANNI F., MASSARA F., BELFORTE L., ROSATELLO A., MOLENATTI G.M. (1977)
Effect of dopamine on plasma growth hormone and prolactin levels in normal and acromegalic subjects.
J. Clin. Endo. and Metab., 44:465.
2. DAUGHADAY W.H. (1981)
The adenohipophysis
In : "Textbook of Endocrinology", R.H. Williams ed., W.B. Saunders, Philadelphia, p;73.
3. DROBNY E.C., AMBURN K., BAUMANN G. (1983)
Circadian variation of basal plasma growth hormone in man.
J. Clin. Endo. and Metab., 57:524-528.
4. HASHIDA S., NAKAWAGA K., ISHIKAWA E., OHTAKI S. (1985)
Basal level of human growth hormone (hGH) in normal serum.
Clin. Chim. Acta, 151:185-186.
5. LEWIS V.J. et al. (1980)
Human growth hormone : A complex of proteins.
Rec. Progr. Horm. Res., 36:488.
6. LI C.H. (1974)

Human growth hormone : perspective on its chemistry and physiology.

In : "Advances in human growth hormone research", S. Raiti ed. U.S. Department of Health, Education and Welfare Publ. DMEW publ. no. (NJH) 74-612, p. 321.

7. REUTENS AT. (1995)
Evaluation and application of a highly sensitive assay for serum growth hormone (GH) in the study of adult GH deficiency.
J. Clin. Endocrinol. Metab., 80(2): 480-485
8. CROWLEY S. et al. (1995)
Growth and the growth hormone axis in prepubertal children with asthma.
J. Pediatr. 126(2): 297-303.
9. KELLY JT. et al. (1993)
Effect of different oral oestrogen formulations on insulin-like growth factor I, growth hormone and growth hormone binding protein in post-menopausal women.
Clin. Endocrinol. 39(5) : 561-567

XVIII. SCHEMA DEL DOSAGGIO

	CALIBRATORE (µl)	CAMPIONI CONTROLLI (µl)
Calibratore (0 - 5) Campioni, controlli Soluzione di lavoro del coniugato anti-hGH-HRP	50 - 50	- 50 50
Incubare per 30 minuti a temperatura ambiente. Aspirare il contenuto di ogni pozzetto. Lavare 3 volte con 400 µl di soluzione di lavaggio e aspirare.		
Soluzione cromogena	100	100
Incubare per 30 minuti a temperatura ambiente.		
Soluzione di arresto	100	100
Leggere su un lettore per piastra da microtitolazione e registrare l'assorbanza di ogni pozzetto a 450 nm (rispetto a 630 o 650 nm)		

Lea todo el protocolo antes de utilizar.

hGH-ELISA

I. INSTRUCCIONES DE USO

Ensayo inmunoenzimático para la medición cuantitativa *in vitro* de la Hormona de Crecimiento Humana (hGH) en suero o plasma.

II. INFORMACIÓN GENERAL

- A. **Nombre:** DIAsource hGH-ELISA Kit
- B. **Número de catálogo:** KAP1081 : 96 pruebas
- C. **Fabricado por :** DIAsource ImmunoAssays S.A.
Rue du Bosquet, 2, B-1348 Louvain-la-Neuve, Bélgica.

Para cuestiones técnicas y información sobre pedidos contactar :

Tel : +32 (0)10 84.99.11

Fax : +32 (0)10 84.99.91

III. INFORMACIÓN CLÍNICA

A. Actividades biológicas

La hGH es una hormona polipeptídica (peso molecular 21,500 Da) producida por las células acidófilas de la adenohipófisis bajo el control de dos sustancias principales de la eminencia media: factor de liberación de la hormona de crecimiento (GRF) y un agente inhibidor, somatostatina. Las vías dopaminérgica, adrenérgica serotoninérgica y neuroendocrina también juegan un papel importante en el control de la secreción de hGH. Estímulos excitatorios de la secreción de hGH incluyen hipoglicemia, ejercicio, ayuno, alimentos con un contenido proteico alto, sueño profundo, estrés, glucagón, L Dopa, aminoácidos etc. Estímulos inhibitorios incluyen glucosa, cortisol, hGH y ácidos grasos. Debido a su corta vida media plasmática (± 25 minutos) y los frecuentes estímulos excitatorios e inhibitorios, la hGH presenta variaciones frecuentes y prolongadas de concentración en el suero.

Una de las funciones fisiológicas principales de la hGH es de actuar en el hígado y otros tejidos para producir somatomedinas, la que a su vez induce el crecimiento por acción directa en tejidos diana. En contraste con la hGH, la concentración de somatomedinas séricas se mantiene estable gracias a que en su mayoría se encuentra unida a proteínas plasmáticas circulantes.

B. Aplicación clínica

· **Retardo en el crecimiento**

La hiposecreción de hGH es una de las varias causas de la baja estatura en niños. La medición de hGH en suero con un ensayo altamente sensible, especialmente después de un estímulo (ausencia de respuesta), constituye un modo muy importante de establecer este diagnóstico ya que este grupo de pacientes puede tratarse con la administración de hGH.

· **Insuficiencia adenohipofisaria**

La medición de la hGH sérica también es un índice de la función de la hipófisis cuando se sospecha de insuficiencia adenohipofisaria (ya sea idiopática o debida a un tumor y cirugía).

· **Gigantismo y acromegalia**


La medición de la hGH sérica, especialmente después de una prueba que provoca inhibición (ausencia de respuesta) constituye un modo muy importante de establecer el diagnóstico de hipersecreción de la hGH debido a un tumor acidófilo de la hipófisis. Esto resulta en gigantismo en niños y acromegalia en adultos. Ambos trastornos se pueden tratar con cirugía o irradiación.

IV. PRINCIPIOS DEL MÉTODO

El DÍAsource HGH-ELISA es un inmunoensayo de fase sólida enzimático de sensibilidad amplificada realizado en una microplaca. Los calibradores y muestras reaccionan con el anticuerpo monoclonal capturado (MAB 1) que recubre los pocillos de la microplaca y con un anticuerpo monoclonal (MAB 2) marcado con peroxidasa de rábano picante (HRP). Después de un periodo de incubación que permite la formación de un emparedado: MAB 1 capturado – hGH – MAB 2 – HRP, la microplaca se lava para eliminar los anticuerpos marcados con enzima que no se han unido. El anticuerpo marcado con enzima que se ha unido se mide a través de una reacción cromogénica. Se añade la solución cromogénica (TMB – H₂O₂) y se incubaba. La reacción se detiene añadiendo solución de parada y se lee la microplaca a la longitud de onda adecuada. La cantidad de sustrato utilizado se determina en forma colorimétrica midiendo la absorbancia, que es proporcional a la concentración de hGH.

Se hace un gráfico de la curva de calibración y la concentración de hGH en las muestras se determina interpolando a partir de la curva de calibración.

V. REACTIVOS SUMINISTRADOS

Reactivos	Kit de 96 pruebas	Reconstitución			
 Microplaca desprendible con 96 pocillos recubiertos con anti hGH (anticuerpos monoclonales)	96 pocillos	Listo para usar			
<table border="1" data-bbox="124 795 343 840"> <tr> <td>Ab</td> <td>HRP</td> <td>CONC</td> </tr> </table> Conjugado: anti hGH marcado con HRP (anticuerpos monoclonales) en tampón estabilizante	Ab	HRP	CONC	1 vial 0,2 ml	Diluya 40X con tampón de conjugado
Ab	HRP	CONC			
<table border="1" data-bbox="124 929 279 974"> <tr> <td>CONJ</td> <td>BUF</td> </tr> </table> Tampón de conjugado: Tampón TRIS-HCl con albúmina de suero bovino y timol	CONJ	BUF	1 vial 6 ml	Listo para usar	
CONJ	BUF				
<table border="1" data-bbox="124 1064 231 1108"> <tr> <td>CAL</td> <td>0</td> </tr> </table> Calibrador cero en suero de oveja y timol	CAL	0	1 vial liofilizado	Añada 2 ml de agua destilada	
CAL	0				
<table border="1" data-bbox="124 1187 247 1232"> <tr> <td>CAL</td> <td>N</td> </tr> </table> Calibrador N = 1 a 5 (ver los valores exactos en las etiquetas de los viales) en suero de oveja y timol	CAL	N	5 viales liofilizados	Añada 1 ml de agua destilada	
CAL	N				
<table border="1" data-bbox="124 1344 303 1388"> <tr> <td>WASH</td> <td>SOLN</td> <td>CONC</td> </tr> </table> Solución de lavado (Tris-HCl)	WASH	SOLN	CONC	1 vial 10 ml	Diluya 200 x con agua destilada (use un agitador magnético).
WASH	SOLN	CONC			
<table border="1" data-bbox="124 1444 279 1489"> <tr> <td>CONTROL</td> <td>N</td> </tr> </table> Controles - N = 1 o 2 en suero humano con timol	CONTROL	N	2 viales liofilizados	Añada 1 ml de agua destilada	
CONTROL	N				
<table border="1" data-bbox="124 1556 263 1601"> <tr> <td>CHROM</td> <td>TMB</td> </tr> </table> Solución cromogénica TMB (Tetrametilbencidina)	CHROM	TMB	1 vial 12 ml	Listo para usar	
CHROM	TMB				
<table border="1" data-bbox="124 1668 247 1713"> <tr> <td>STOP</td> <td>SOLN</td> </tr> </table> Solución de parada: HCl 1N	STOP	SOLN	1 vial 12 ml	Listo para usar	
STOP	SOLN				

Nota: 1. Utilice el calibrador cero para diluir muestras.
2. 1 µIU de la preparación del calibrador es equivalente a 1 µIU del 2nd IS 98/574.

VI. MATERIALES NO SUMINISTRADOS

El siguiente material es necesario pero no está suministrado en el kit:

1. Agua destilada de alta calidad
2. Pipetas para dispensar : 50 µl, 200 µl, 500 µl y 2 ml (se recomienda el uso de una pipeta precisa con puntas plásticas desechables)
3. Agitador Vortex
4. Agitador magnético
5. Lavadora de microplacas

6. Lector de microplacas capaz de leer a 450 nm y 650 nm (lectura bicromática)

VII. PREPARACIÓN DE REACTIVOS

- A. Calibradores :** Reconstituya el calibrador cero con 2 ml de agua destilada y otros calibradores con 1 ml de agua destilada.
- B. Controles :** Reconstituya los controles con 1 ml de agua destilada.
- C. Conjugado anti-hGH-HRP de trabajo:** Prepare un volumen adecuado de solución de conjugado añadiendo 25 µl del conjugado anti-hGH-HRP concentrado a 1 ml de tampón de conjugado. Use un Vortex para homogenizar. Se recomienda preparar inmediatamente antes de utilizar.
- D. Solución de lavado de trabajo :** Prepare un volumen adecuado de solución de lavado de trabajo añadiendo 199 volúmenes de agua destilada a 1 volumen de solución de lavado (200x). Utilice un agitador magnético para homogenizar. Elimine la solución de lavado de trabajo no utilizada al final del día.

VIII. ALMACENAJE Y CADUCIDADES DE LOS REACTIVOS

- Antes de abrir ó reconstituir todos los componentes de los kits son estables hasta la fecha de caducidad indicada en la etiqueta, si se guardan a 2-8°C.
- Los pocillos no utilizados deben almacenarse entre 2-8°C, en una bolsa sellada que contenga un desecante hasta la fecha de caducidad.
- Después de reconstituir, los calibradores y controles son estables por 1 semana entre 2 y 8°C. Para periodos de almacenaje más largos, se deben preparar alícuotas que se almacenan a -20°C. Evite ciclos sucesivos de congelamiento y descongelamiento.
- La solución de lavado concentrada es estable a temperatura ambiente hasta la fecha de caducidad.
- La solución de lavado de trabajo recién preparada debe ser utilizada el mismo día.
- Después del primer uso, el conjugado es estable hasta la fecha de caducidad si se mantiene en el vial original, bien cerrado entre 2 y 8°C.
- Alteraciones en la apariencia física de los reactivos del kit pueden indicar inestabilidad o deterioro.

IX. RECOGIDA Y PREPARACIÓN DE MUESTRAS

- Las muestras de suero ó plasma deben ser guardadas a 2-8°C.
- Si la prueba no se realiza dentro de las 24 horas, se recomienda almacenar en alícuotas a -20°C. Evite ciclos consecutivos de congelamiento y descongelamiento.
- Antes de utilizarlas, todas las muestras deben estar a temperatura ambiente. Se recomienda agitar las muestras en un Vortex antes de utilizar.
- El suero, el plasma heparinizado o el plasma EDTA dan resultados similares.

$$Y(\text{suero}) = 0,89 \times (\text{plasma EDTA}) + 0,14 \mu\text{IU/ml} \quad r=0,98 \quad n=46$$

$$Y(\text{suero}) = 1,02 \times (\text{plasma heparinizado}) + 0,01 \mu\text{IU/ml} \quad r=0,98 \quad n=46$$
- No utilice muestras hemolizadas.

X. PROTOCOLO

- A. Notas de manejo**
No utilice el kit o sus componentes después de la fecha de caducidad. No mezcle materiales de kits con números de lote diferentes. Antes de utilizar deje que todos los reactivos alcancen temperatura ambiente. Mezcle exhaustivamente todos los reactivos y muestras agitándolos suavemente o girándolos. Analice los calibradores, controles y muestras en duplicado. Se recomienda la alineación vertical. Utilice un envase de plástico limpio para preparar la solución de lavado. Para evitar contaminación cruzada, utilice una punta de pipeta desechable, limpia para añadir cada reactivo y muestra. Para dispensar la solución cromogénica y la solución de parada evite las pipetas con partes metálicas. Pipetas de alta precisión o equipo de pipeteo automático mejorará la precisión. Respete los tiempos de incubación. Para evitar la demora, el tiempo entre el pipeteo del primer calibrador y la última muestra debe limitarse al tiempo mencionado en la sección XIII párrafo E (Demora en el tiempo). Prepare una curva de calibración para cada serie, no utilice datos de series anteriores. Dispense la solución cromogénica dentro de 15 minutos después del lavado de la microplaca.

Durante la incubación con la solución cromogénica, evite la luz solar directa sobre la microplaca.

B. Procedimiento

1. Seleccione el número requerido de pocillos para la serie. Los pocillos no utilizados deben volver a almacenarse en la bolsa sellada con el desecante a 2-8°C.
2. Fije las tiras de pocillos en el marco de sostén.
3. Pipetee 50 µl de cada calibrador, control y muestra en los pocillos pertinentes.
4. Pipetee 50 µl de conjugado anti-hGH-HRP de trabajo en todos los pocillos.
5. Incube por 30 minutos a temperatura ambiente – Es obligatorio respetar los 30 minutos que dura esta incubación
6. Aspire el líquido de cada pocillo.
7. Lave la placa 3 veces:
 - Dispensando 0,4 ml de solución de lavado en cada pocillo
 - Aspirando el contenido de cada pocillo
8. Pipetee 100 µl de solución cromogénica en cada pocillo dentro de los 15 minutos después del paso de lavado.
9. Incube la microplaca por 30 minutos a temperatura ambiente, evitando la luz solar directa.
10. Pipetee 100 µl de solución de parada en cada pocillo.
11. Lea las absorbancias a 450 nm (filtro de referencia 630 nm o 650 nm) dentro de 1 hora y calcule los resultados como se describe en la sección XI.

XI. CALCULO DE RESULTADOS

1. Lea la placa a 450 nm contra un filtro de referencia a 650 nm (o 630 nm).
2. Calcule la media de las determinaciones en duplicado.
3. En papel semi logarítmico o lineal dibuje los valores de DO (ordenada) para cada calibrador contra la concentración de hGH correspondiente (abscisa) y dibuje una curva de calibración a través de los puntos de los calibradores conectando los puntos con líneas rectas.
4. Lea la concentración de cada control y muestra por interpolación en la curva de calibración.
5. La reducción de datos asistida por un ordenador simplificará estos cálculos. Si utiliza un procesamiento automático de los resultados, se recomienda un ajuste de la curva con una función logística de 4 parámetros.

XII. EJEMPLO DE RESULTADOS

Los siguientes datos son solo a modo de ilustración y nunca deben utilizarse en vez de la curva de calibración en tiempo real.

hGH-ELISA		Unidades DO
Calibrador	0,00 µIU/ml	0,030
	0,45 µIU/ml	0,062
	5,40 µIU/ml	0,226
	12,90 µIU/ml	0,501
	43,50 µIU/ml	1,429
	98,00 µIU/ml	2,330

XIII. REALIZACIÓN Y LIMITACIONES

A. Límite de detección

Se analizaron 20 calibradores cero en conjunto con un grupo de otros calibradores. El límite de detección, definido como la concentración aparente dos desviaciones estándar sobre la DO promedio cuando hay cero unión, fue 0,17 µIU/ml.

B. Especificidad

Se añadieron hormonas con reacción cruzada a una muestra de control con hGH alto y otro bajo. Se midió la respuesta hGH aparente.

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

C. Precisión

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

SD : Desviación estándar; CV: Coeficiente de variación

D. Exactitud

PRUEBA DE RECUPERACIÓN

Muestra	hGH añadido (µIU/ml)	hGH recuperado (µIU/ml)	Recuperación (%)
Suero	4,3	4,1	95
	13,5	12,8	95
	26,8	28,1	105
	52,1	58,9	113
Plasma	4,3	4,6	106
	13,5	13,2	98
	26,8	25,3	94
	52,1	53,0	102

PRUEBA DE DILUCIÓN

Muestra	Dilución	Concent. teórica (µIU/ml)	Concent. medida (µIU/ml)
Suero 1	1/2	-	97,7
	1/4	48,8	57,0
	1/8	24,4	27,7
	1/16	12,2	13,6
	1/32	6,1	6,4
	1/64	3,1	3,0
Suero 2	1/1	-	21,2
	1/2	10,6	9,3
	1/4	5,3	4,6
	1/8	2,7	2,2
	1/16	1,3	1,1
	1/32	0,7	0,6

Las muestras se diluyeron con calibrador cero.

Factor de conversión : 1µIU hGH-ELISA Calibrador = 0,33 ng

E. Tiempo de espera entre la dispensación del último calibrador y la de la muestra

Como se muestra a continuación, los resultados de los ensayos continúan siendo correctos aun cuando una muestra es dispensada 30 minutos después de que se han añadido los calibradores a los pocillos recubiertos.

DEMORA EN EL TIEMPO			
	0 min	15 min	30 min
S1	1.83	1.71	1.60
S2	8.38	8.00	7.20

F. Efecto de gancho

Una muestra a la que se le ha añadido hGH hasta 4000 µU/ml resulta en una DO más alta que el punto del último calibrador.

XIV. CONTROL DE CALIDAD INTERNO

- Si los resultados obtenidos para el Control 1 y/o el Control 2 no están dentro el rango especificado en la etiqueta del vial, los resultados no se pueden utilizar a no ser que se encuentre una explicación satisfactoria para la discrepancia.
- Si así lo desean, cada laboratorio puede hacer su propio conjunto de muestras de control, que deben mantenerse congelados en alícuotas. Los controles que contienen azida, interferirán con la reacción enzimática y no se pueden utilizar.
- Los criterios de aceptación para la diferencia entre los resultados en duplicado de las muestras deben basarse en las buenas prácticas de laboratorio.
- Se recomienda que los controles sean analizados rutinariamente como muestras desconocidas para medir la variabilidad del ensayo. El rendimiento del ensayo debe controlarse con gráficos de control de calidad de los controles.
- Es buena práctica revisar visualmente el ajuste de la curva seleccionada por el ordenador.

XV. INTERVALOS DE REFERENCIA

Estos valores son solo una guía; cada laboratorio debe establecer su propio rango normal de valores.

En sujetos normales, la secreción de la hormona de crecimiento (hGH) es pulsátil. Durante el día, las concentraciones de hGH varían entre <0,2-10 µUI / ml. Durante el sueño, las concentraciones de hGH aumentan constantemente (± 30 µUI / ml).

La secreción de hGH se estimula en gran medida por el ejercicio y el estrés (punción venosa, hipoglucemia, ...), pero disminuye por la hiperglucemia.

En sujetos normales (n = 34), dos horas después de la carga de glucosa oral (75 g en adultos), los niveles de hGH fueron inferiores a 10 µUI y la respuesta de la hGH a pruebas de estimulación (insulina, arginina, administración de glucagón) aumentaron por sobre 20 µUI / ml.

Los niveles de hGH estaban elevados (incluso después de carga de glucosa) en la acromegalia (> 10 µUI / ml).

En la deficiencia de hGH, la respuesta a la prueba de estimulación está ausente o disminuida (baja estatura por la deficiencia de hGH; hipopituitarismo de diversos orígenes)

XVI. PRECAUCIONES Y ADVERTENCIAS

Seguridad

Solo para uso de diagnóstico *in vitro*.

Los componentes de sangre humana incluidos en este kit han sido analizados con métodos aprobados en Europa y/o por la FDA y fueron negativos para HBsAg, anti-VHC, anti-VIH-1 y 2. Ningún método conocido puede garantizar totalmente que los derivados de la sangre humana no transmitan hepatitis, SIDA u otras infecciones. Por lo tanto, el manejo de reactivos, suero o plasma deben cumplir con los procedimientos de seguridad locales.

Todos los productos de origen animal y derivados son de animales sanos. Los componentes bovinos son originarios de países donde no se ha informado la presencia de EEB. Sin embargo, los componentes que contienen sustancias animales deben ser tratados como potencialmente infecciosos.

Evite el contacto de la piel con todos los reactivos. En caso de contacto, lave con abundante agua.

No fume, beba, ingiera alimentos o aplique cosméticos en el área de trabajo. No pipete con la boca. Use ropa protectora y guantes desechables.

XVII. BIBLIOGRAFÍA

- CAMANNI F., MASSARA F., BELFORTE L., ROSATELLO A., MOLENATTI G.M. (1977)
Effect of dopamine on plasma growth hormone and prolactin levels in normal and acromegalic subjects.
J. Clin. Endo. and Metab., 44:465.
- DAUGHADAY W.H. (1981)
The adenohypophysis
In : "Textbook of Endocrinology", R.H. Williams ed., W.B. Saunders, Philadelphia, p:73.

- DROBNY E.C., AMBURN K., BAUMANN G. (1983)
Circadian variation of basal plasma growth hormone in man.
J. Clin. Endo. and Metab., 57:524-528.
- HASHIDA S., NAKAWAGA K., ISHIKAWA E., OHTAKI S. (1985)
Basal level of human growth hormone (hGH) in normal serum.
Clin. Chim. Acta, 151:185-186.
- LEWIS V.J. et al. (1980)
Human growth hormone : A complex of proteins.
Rec. Progr. Horm. Res., 36:488.
- LI C.H. (1974)
Human growth hormone : perspective on its chemistry and physiology.
In : "Advances in human growth hormone research", S. Raiti ed. U.S. Department of Health, Education and Welfare Publ. DMEW publ. no. (NJH) 74-612, p. 321.
- REUTENS AT. (1995)
Evaluation and application of a highly sensitive assay for serum growth hormone (GH) in the study of adult GH deficiency.
J. Clin. Endocrinol. Metab., 80(2): 480-485
- CROWLEY S. et al. (1995)
Growth and the growth hormone axis in prepubertal children with asthma.
J. Pediatr. 126(2): 297-303.
- KELLY JT. et al. (1993)
Effect of different oral oestrogen formulations on insulin-like growth factor I, growth hormone and growth hormone binding protein in post-menopausal women.
Clin. Endocrinol. 39(5) : 561-567

XVIII. RESUMEN DEL PROTOCOLO

	CALIBRADORES (µl)	MUESTRA(S) CONTROLES (µl)
Calibradores (0-5) Controles, Muestras Conjugado Anti-hGH-HRP de trabajo	50 - 50	- 50 50
Incube por 30 minutos a temperatura ambiente Aspire el contenido de cada pocillo. Lave 3 veces con 400 µl de solución de lavado y aspire.		
Solución cromogénica	100	100
Incube por 30 minutos a temperatura ambiente		
Solución de parada	100	100
Lea en un lector de microplacas y registre la absorbancia de cada pocillo a 450 nm (versus 630 o 650 nm).		

Διαβάστε ολόκληρο το πρωτόκολλο πριν από τη χρήση.

hGH-ELISA

I. ΧΡΗΣΗ ΓΙΑ ΤΗΝ ΟΠΟΙΑ ΠΡΟΟΡΙΖΕΤΑΙ

Ανοσοενζυμομετρικός προσδιορισμός για την *in vitro* ποσοτική μέτρηση της ανθρώπινης αυξητικής ορμόνης (hGH) στον ορό και το πλάσμα.

II. ΓΕΝΙΚΕΣ ΠΛΗΡΟΦΟΡΙΕΣ

- A. **Εμπορική ονομασία:** Κιτ hGH-ELISA της DIAsource
- B. **Αριθμός καταλόγου:** KAP1081: 96 προσδιορισμοί
- Γ. **Κατασκευάζεται από την:** DIAsource ImmunoAssays S.A.
Rue du Bosquet, 2, B-1348 Louvain-la-Neuve, Belgium.

Για τεχνική βοήθεια ή πληροφορίες σχετικά με παραγγελίες επικοινωνήστε στα:
Τηλ.: +32 (0)10 84.99.11 Φαξ: +32 (0)10 84.99.91

III. ΚΛΙΝΙΚΟ ΥΠΟΒΑΘΡΟ

A. Βιολογική δράση της hGH

Η hGH είναι μια πολυπεπτιδική ορμόνη (μοριακό βάρος 21.500 Da) που παράγεται από τα οξεόφιλα κύτταρα της πρόσθιας υπόφυσης υπό τον έλεγχο των δύο κυρίων ουσιών από το μέσο έπαρμα: του παράγοντα απελευθέρωσης της αυξητικής ορμόνης (GRF) και ενός ανασταλτικού παράγοντα, της σωματοστατίνης. Οι ντοπαμινεργικοί, αδρενεργικοί και σεροτονινεργικοί νευροενδοκρινικοί οδοί παίζουν επίσης σημαντικό ρόλο στον έλεγχο της έκκρισης της hGH. Στα ερεθίσματα που διεγείρουν την έκκριση της hGH περιλαμβάνονται η υπογλυκαιμία, η άσκηση, η νηστεία, τα γεύματα με υψηλή περιεκτικότητα πρωτεΐνης, ο βαθύς ύπνος, το στρες, η γλυκαγόνη, η L Dopa, τα αμινοξέα κ.λπ. Στα ανασταλτικά ερεθίσματα περιλαμβάνονται η γλυκόζη, η κορτιζόλη, η hGH και τα ελεύθερα λιπαρά οξέα. Λόγω της σύντομης ημιζωής της στο πλάσμα (± 25 λεπτά) και των συχνών διεγερτικών ή ανασταλτικών ερεθισμάτων, η hGH εμφανίζει συχνές και μεγάλες διακυμάνσεις ως προς τη συγκέντρωση στο πλάσμα. Μια από τις κύριες φυσιολογικές λειτουργίες της hGH είναι να δρα στο ήπαρ και άλλους ιστούς για την παραγωγή σωματομεδινών, οι οποίες με τη σειρά τους επιφέρουν αύξηση με άμεση δράση επί των ιστών-στόχων. Σε αντίθεση με την hGH, η συγκέντρωση της σωματομεδίνης στον ορό διατηρείται σταθερή συνεπεία του μεγάλου βαθμού δέσμευσής της στις κυκλοφορούσες πρωτεΐνες του πλάσματος.

B. Κλινική εφαρμογή του προσδιορισμού hGH-ELISA

· Καθυστέρηση της ανάπτυξης

Η μειωμένη έκκριση hGH είναι μιας από τις διάφορες αιτίες για το μικρό ανάστημα στα παιδιά. Μέτρηση της hGH στον ορό με έναν προσδιορισμό υψηλής ευαισθησίας, ειδικά μετά από ένα προκλητό ερέθισμα (έλλειψη απόκρισης), αποτελεί σημαντικό τρόπο για να τεκμηριωθεί η διάγνωση αυτή διότι η συγκεκριμένη ομάδα ασθενών μπορεί να αντιμετωπισθεί θεραπευτικά με τη χορήγηση hGH.

· Υποϋποφυσισμός

Η μέτρηση της hGH στον ορό αποτελεί επίσης ένα δείκτη της λειτουργίας της υπόφυσης όταν υπάρχει υποψία υποϋποφυσισμού (είτε ιδιοπαθούς είτε λόγω όγκου ή χειρουργικής επέμβασης).

· Γιγαντισμός και μεγαλακρία


Η μέτρηση της hGH στον ορό, ειδικά μετά από μια προκλητή εξέταση αναστολής (απουσία απόκρισης), αποτελεί σημαντικό τρόπο για την τεκμηρίωση της διάγνωσης υπερβολικής έκκρισης hGH λόγω οξεόφιλου όγκου της υπόφυσης. Αυτό έχει ως αποτέλεσμα γιγαντισμό στα παιδιά και μεγαλακρία στους ενήλικους. Και οι δύο αυτές διαταραχές μπορούν να αντιμετωπισθούν με χειρουργική επέμβαση ή ακτινοβολία.

IV. ΒΑΣΙΚΕΣ ΑΡΧΕΣ ΤΗΣ ΜΕΘΟΔΟΥ

Ο προσδιορισμός hGH-ELISA της DIALsource είναι ένας ενζυμικός ανοσοπροσδιορισμός ενισχυμένης ευαισθησίας, στερεής φάσης, ο οποίος εκτελείται σε πλάκες μικροτιτλοδότησης. Οι βαθμονομητές και τα δείγματα αντιδρούν με το μονοκλωνικό αντίσωμα σύλληψης (Mab 1) που είναι επιστρωμένο στην υποδοχή της πλάκας μικροτιτλοδότησης και με ένα μονοκλωνικό αντίσωμα (Mab 2) σημασμένο με ραφινιδική υπεροξειδάση (HRP). Μετά από μια περίοδο επώασης που επιτρέπει το σχηματισμό ενός σάντουιτς: επιστρωμένο Mab 1 – hGH – Mab 2 – HRP, η πλάκα μικροτιτλοδότησης υποβάλλεται σε πλύση για να απομακρυνθεί το σημασμένο με ένζυμο αδέσμευτο αντίσωμα. Το σημασμένο με ένζυμο δεσμευμένο αντίσωμα μετράται μέσω μιας χρωμογόνου αντίδρασης. Προστίθεται και επωάζεται χρωμογόνο διάλυμα (TMB – H₂O₂). Η αντίδραση σταματά με την προσθήκη ανασχετικού διαλύματος και στη συνέχεια γίνεται ανάγνωση της πλάκας μικροτιτλοδότησης στο κατάλληλο μήκος κύματος. Η ποσότητα μετατροπής του υποστρώματος καθορίζεται χρωματομετρικά μετρώντας την απορρόφηση, η οποία είναι ανάλογη προς τη συγκέντρωση hGH.

Παριστάνεται γραφικά μια καμπύλη βαθμονόμησης και προσδιορίζεται η συγκέντρωση της hGH στα δείγματα με αναγωγή από την καμπύλη βαθμονόμησης.

V. ΠΑΡΕΧΟΜΕΝΑ ΑΝΤΙΔΡΑΣΤΗΡΙΑ

Αντιδραστήρια	Κιτ 96 προσδιορισμών	Ανασύσταση			
 Πλάκα μικροτιτλοδότησης με 96 αποσπώμενες υποδοχές επιστρωμένες με	96 υποδοχές	Έτοιμο για χρήση			
<table border="1" data-bbox="119 817 343 862"> <tr> <td>Ab</td> <td>HRP</td> <td>CONC</td> </tr> </table> Σύζευγμα: αντι- hGH (μονοκλωνικά αντισώματα) σημασμένα με HRP σε ρυθμιστικό διάλυμα σταθεροποίησης	Ab	HRP	CONC	1 φ ιαλίδιο 0,2 ml	Αραιώστε 40X με ρυθμιστικό διάλυμα συζεύγματος
Ab	HRP	CONC			
<table border="1" data-bbox="119 985 279 1030"> <tr> <td>CONJ</td> <td>BUF</td> </tr> </table> Ρυθμιστικό διάλυμα συζεύγματος: ρυθμιστικό διάλυμα TRIS-HCl με βόεια ορολευκοματίνη και θυμόλη	CONJ	BUF	1 φ ιαλίδιο 6 ml	Έτοιμο για χρήση	
CONJ	BUF				
<table border="1" data-bbox="119 1120 247 1164"> <tr> <td>CAL</td> <td>0</td> </tr> </table> Μηδενικός βαθμονομητής σε ορό προβάτου και θυμόλη	CAL	0	1 φιαλίδιο λυοφιλοποιημένο	Προσθέστε 2 ml απεσταγμένου νερού	
CAL	0				
<table border="1" data-bbox="119 1254 247 1299"> <tr> <td>CAL</td> <td>N</td> </tr> </table> Βαθμονομητής N = 1 έως 5 (δείτε τις ακριβείς τιμές πάνω στις ετικέτες των φιαλιδίων) σε ορό προβάτου και θυμόλη	CAL	N	5 φιαλίδια λυοφιλοποιημένο	Προσθέστε 1 ml απεσταγμένου νερού	
CAL	N				
<table border="1" data-bbox="119 1422 327 1467"> <tr> <td>WASH</td> <td>SOLN</td> <td>CONC</td> </tr> </table> Διάλυμα πλύσης (Tris-HCl)	WASH	SOLN	CONC	1 φιαλίδιο 10 ml	Αραιώστε 200 x με απεσταγμένο νερό (χρησιμοποιήστε μαγνητικό αναδευτήρα).
WASH	SOLN	CONC			
<table border="1" data-bbox="119 1534 279 1579"> <tr> <td>CONTROL</td> <td>N</td> </tr> </table> Οροί ελέγχου - N = 1 ή 2 σε ανθρώπινο ορό με θυμόλη	CONTROL	N	2 φιαλίδια λυοφιλοποιημένο	Προσθέστε 1 ml απεσταγμένου νερού	
CONTROL	N				
<table border="1" data-bbox="119 1646 263 1691"> <tr> <td>CHROM</td> <td>TMB</td> </tr> </table> Χρωμογόνος TMB (τετραμεθυλβενζιδίνη)	CHROM	TMB	1 φιαλίδιο 12 ml	Έτοιμο για χρήση	
CHROM	TMB				
<table border="1" data-bbox="119 1758 263 1803"> <tr> <td>STOP</td> <td>SOLN</td> </tr> </table> Ανασχετικό αντιδραστήριο: HCl 1N	STOP	SOLN	1 φιαλίδιο 12 ml	Έτοιμο για χρήση	
STOP	SOLN				

Σημείωση: 1. Χρησιμοποιείτε το μηδενικό βαθμονομητή για αραιώσεις δειγμάτων.
2.1 μIU του παρασκευάσματος του βαθμονομητή είναι ισοδύναμο με 1 μIU του 2^ο IS 98/574

VI. ΑΝΑΛΩΣΙΜΑ ΠΟΥ ΔΕΝ ΠΑΡΕΧΟΝΤΑΙ

Τα ακόλουθα υλικά απαιτούνται αλλά δεν παρέχονται στο κιτ:

1. Απεσταγμένο νερό υψηλής ποιότητας
2. Πιπέτες για διανομή: 50 μl, 200 μl, 500 μl και 2 ml (συνιστάται η χρήση πιπέτων ακριβείας με αναλώσιμα πλαστικά ρύγχη)
3. Αναμεικτής στροβιλισμού
4. Μαγνητικός αναδευτήρας
5. Συσκευή πλύσης για πλάκες μικροτιτλοδότησης
6. Συσκευή ανάγνωσης πλακών μικροτιτλοδότησης με δυνατότητα ανάγνωσης στα 450 nm και 650 nm (διχρωματική ανάγνωση)

VII. ΠΑΡΑΣΚΕΥΗ ΑΝΤΙΔΡΑΣΤΗΡΙΩΝ

- A. Βαθμονομητές:** Ανασυστήστε το μηδενικό βαθμονομητή με 2 ml απεσταγμένου νερού και άλλους βαθμονομητές με 1 ml απεσταγμένου νερού.
- B. Οροί ελέγχου:** Ανασυστήστε τους ορούς ελέγχου με 1 ml απεσταγμένου νερού.
- C. Αντι-hGH-HRP σύζευγμα εργασίας:** Προετοιμάστε επαρκή όγκο διαλύματος συζεύγματος προσθέτοντας 25 μl του συμπυκνωμένου συζεύγματος αντι-hGH-HRP σε 1 ml ρυθμιστικού διαλύματος συζεύγματος. Χρησιμοποιήστε αναμεικτική στροβιλισμού (τύπου vortex) για να ομογενοποιήσετε. Προτείνεται προετοιμασία τη στιγμή της χρήσης.
- D. Διάλυμα πλύσης εργασίας:** Προετοιμάστε επαρκή όγκο διαλύματος πλύσης εργασίας με προσθήκη 199 όγκων απεσταγμένου νερού σε 1 όγκο διαλύματος πλύσης (200x). Χρησιμοποιήστε μαγνητικό αναδευτήρα για την ομογενοποίηση. Απορρίψτε το μη χρησιμοποιημένο διάλυμα πλύσης εργασίας στο τέλος της ημέρας.

VIII. ΦΥΛΑΞΗ ΚΑΙ ΗΜΕΡΟΜΗΝΙΑ ΛΗΞΗΣ ΤΩΝ ΑΝΤΙΔΡΑΣΤΗΡΙΩΝ

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

IX. ΣΥΛΛΟΓΗ ΚΑΙ ΠΡΟΕΤΟΙΜΑΣΙΑ ΔΕΙΓΜΑΤΩΝ

- Τα δείγματα ορού και πλάσματος πρέπει να φυλάσσονται σε θερμοκρασία 2-8° C.
- Εάν η εξέταση δεν πραγματοποιηθεί εντός 24 ωρών, συνιστάται η φύλαξη σε κλάσματα/δόσεις μιας χρήσης στους -20° C. Αποφύγετε τους επακόλουθους κύκλους κατάψυξης-απόψυξης.
- Φέρετε όλα τα δείγματα σε θερμοκρασία δωματίου πριν από τη χρήση. Συνιστάται η ανάμιξη των δειγμάτων σε συσκευή στροβιλισμού πριν από τη χρήση.
- Ορός, ηπαρηνισμένο πλάσμα ή πλάσμα με EDTA παρέχουν παρόμοια αποτελέσματα.

Y (ορός) = 0,89 x (πλάσμα με EDTA) + 0,14	r=0,98	n=46
Y (ορός) = 1,02 x (πλάσμα με ηπαρίνη) + 0,01	r=0,98	n=46
- Μην χρησιμοποιείτε δείγματα που έχουν υστερεί αιμόλυση.

X. ΔΙΑΔΙΚΑΣΙΑ

- A. Σημειώσεις σχετικά με το χειρισμό**
Μη χρησιμοποιείτε το κιτ ή τα συστατικά μετά την ημερομηνία λήξης. Μην αναμειγνύετε υλικά από διαφορετικές παρτίδες κιτ. Φέρετε όλα τα αντιδραστήρια σε θερμοκρασία δωματίου πριν από τη χρήση. Αναμειξτε καλά όλα τα αντιδραστήρια και τα δείγματα με απαλή ανακίνηση ή ανάδευση. Εκτελέστε εις διπλούν ανάληψη των βαθμονομητών, των ορών ελέγχου και των δειγμάτων. Συνιστάται κάθετη ευθυγράμμιση. Χρησιμοποιήστε ένα καθαρό, πλαστικό δοχείο για να ετοιμάσετε το διάλυμα πλύσης. Χρησιμοποιείτε ένα καθαρό αναλώσιμο ρύγχος πιπέτας για την προσθήκη κάθε διαφορετικού αντιδραστηρίου και δείγματος προκειμένου να αποφύγετε την επιμόλυνση. Αποφύγετε πιπέτες με μεταλλικά μέρη για τη διανομή του Χρωμογόνου Διαλύματος και του Ανασχετικού Διαλύματος. Η ακρίβεια βελτιώνεται με χρήση πιπέτων υψηλής ακριβείας ή αυτοματοποιημένου εξοπλισμού διανομής με πιπέτες. Τηρείτε τους χρόνους επώασης. Για να αποφύγετε τη μετατόπιση, ο χρόνος μεταξύ της διανομής με πιπέτα του πρώτου βαθμονομητή και του τελευταίου δείγματος πρέπει να περιορίζεται στο χρόνο που αναφέρεται στην ενότητα XIII, παράγραφο E (μεσοδιάστημα). Προετοιμάστε μια καμπύλη βαθμονόμησης για κάθε ανάλυση και μη χρησιμοποιείτε δεδομένα από προηγούμενες αναλύσεις. Διανείμετε το Χρωμογόνο Διάλυμα εντός 15 λεπτών από την πλύση της πλάκας μικροτιτλοδότησης.

Κατά τη διάρκεια επώασης με το Χρωμογόνο Διάλυμα, αποφύγετε την έκθεση της πλάκας μικροτιτλοδότησης σε άμεσο ηλιακό φως.

B. Διαδικασία

- Επιλέξτε τον απαιτούμενο αριθμό ταινιών για την ανάλυση. Οι μη χρησιμοποιημένες ταινίες πρέπει να ξανασφραγιστούν μέσα στη σακούλα με τον αποξηραντικό παράγοντα και να φυλαχτούν σε θερμοκρασία 2-8° C.
- Ασφαλίστε τις ταινίες μέσα στο πλαίσιο στήριξης.
- Διανείμετε με πιπέτα 50 μl από κάθε βαθμονομητή, ορό ελέγχου και δείγμα στις κατάλληλες υποδοχές.
- Διανείμετε με πιπέτα 50 μl αντι-hGH-HRP συζεύγματος εργασίας σε όλες τις υποδοχές.
- Επωάστε επί 30 λεπτά σε θερμοκρασία δωματίου - Η τήρηση 30 λεπτών ως διάρκεια για αυτήν την επώαση είναι υποχρεωτική.
- Αναρροφήστε το υγρό από κάθε υποδοχή.
- Πλύνετε την πλάκα 3 φορές:
 - διανέμοντας 0,4 ml διαλύματος πλύσης σε κάθε υποδοχή.
 - αναρροφώντας το περιεχόμενο κάθε υποδοχής.
- Διανείμετε με πιπέτα 100 μl του χρωμογόνου διαλύματος σε κάθε υποδοχή, εντός 15 λεπτών από το βήμα πλύσης.
- Επωάστε επί 30 λεπτά σε θερμοκρασία δωματίου, αποφύγετε την άμεση έκθεση στην ηλιακή ακτινοβολία.
- Διανείμετε με πιπέτα 100 μl ανασχετικού διαλύματος σε κάθε υποδοχή.
- Κάντε ανάγνωση των απορροφήσεων στα 450 nm (φίλτρο αναφοράς 630 nm ή 650 nm) εντός 1 ώρας και υπολογίστε τα αποτελέσματα όπως περιγράφεται στην ενότητα XI.

XI. ΥΠΟΛΟΓΙΣΜΟΣ ΤΩΝ ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΩΝ

- Κάντε ανάγνωση της πλάκας στα 450 nm έναντι ενός φίλτρου αναφοράς που ρυθμίζεται στα 650 nm (ή τα 630 nm).
- Υπολογίστε τη μέση τιμή των διπλών προσδιορισμών.
- Σε ημιλογαριθμικό ή γραμμικό χαρτί γραφημάτων, παραστήστε γραφικά τις τιμές OD (τεταγμένη) για κάθε βαθμονομητή έναντι της αντίστοιχης συγκέντρωσης της hGH (τετμημένη) και σχεδιάστε μια καμπύλη βαθμονόμησης μέσω των σημείων του βαθμονομητή, συνδέοντας με ευθείες γραμμές τα αποτυπωμένα σημεία.
- Διαβάστε τη συγκέντρωση για κάθε ορό ελέγχου και δείγμα με αναγωγή στην καμπύλη βαθμονόμησης.
- Αναγωγή δεδομένων με τη βοήθεια ηλεκτρονικού υπολογιστή θα απλοποιήσει αυτούς τους υπολογισμούς. Εάν χρησιμοποιείται αυτόματη επεξεργασία αποτελεσμάτων, συνιστάται προσαρμογή καμπύλης λογιστικής συνάρτησης 4 παραμέτρων.

XII. ΤΥΠΙΚΑ ΔΕΔΟΜΕΝΑ

Τα ακόλουθα δεδομένα προορίζονται μόνο ως παράδειγμα και δεν πρέπει να χρησιμοποιούνται ποτέ αντί της καμπύλης βαθμονόμησης πραγματικού χρόνου.

hGH-ELISA		Μονάδες OD
Βαθμονομητής	0 μIU/ml	0,030
	0,45 μIU/ml	0,062
	5,4 μIU/ml	0,226
	12,9 μIU/ml	0,501
	43,5 μIU/ml	1,429
	98,0 μIU/ml	2,330

XIII. ΑΠΟΔΟΣΗ ΚΑΙ ΠΕΡΙΟΡΙΣΜΟΙ

A. Όριο ανίχνευσης

Μετρήθηκαν είκοσι μηδενικοί βαθμονομητές μαζί με ένα σύνολο άλλων βαθμονομητών. Το όριο ανίχνευσης, οριζόμενο ως η φαινομενική συγκέντρωση δύο τυπικών αποκλίσεων πάνω από τις μέσες μετρήσεις OD σε μηδενική δέσμευση, ήταν 0,17 μIU/ml.

B. Ειδικότητα

Ορμόνες διασταυρούμενης αντιδραστικότητας προστέθηκαν σε ένα δείγμα ορού ελέγχου hGH χαμηλής και υψηλής τιμής. Μετρήθηκε η φαινομενική απόκριση της hGH.

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

Γ. Ακρίβεια

ΓΙΑ ΤΟΝ ΙΔΙΟ ΠΡΟΣΔΙΟΡΙΣΜΟ				ΜΕΤΑΞΥ ΔΙΑΦΟΡΕΤΙΚΩΝ ΠΡΟΣΔΙΟΡΙΣΜΩΝ			
Ορός	N	<X> ± T.A. (μIU/ml)	Σ.Δ. (%)	Ορός	N	<X> ± T.A. (μIU/ml)	Σ.Δ. (%)
A	20	6,90 ± 0,34	4,9	A	8	11,4 ± 0,9	8,1
B	20	16,61 ± 0,90	5,4	B	8	23,5 ± 1,2	5,1

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

Δ. Ορθότητα

ΔΟΚΙΜΑΣΙΑ ΑΝΑΚΤΗΣΗΣ

Δείγμα	Προσθεθείσα hGH (μIU/ml)	Ανακτηθείσα hGH (μIU/ml)	Ανάκτηση (%)
Ορός	4,3	4,1	95
	13,5	12,8	95
	26,8	28,1	105
	52,1	58,9	113
Πλάσμα	4,3	4,6	106
	13,5	13,2	98
	26,8	25,3	94
	52,1	53,0	102

ΔΟΚΙΜΑΣΙΑ ΑΡΑΙΩΣΗΣ

Δείγμα	Αραίωση	Θεωρητική συγκέντρωση (μIU/ml)	Μετρηθείσα συγκέντρωση (μIU/ml)
Ορός 1	1/2	-	97,7
	1/4	48,8	57,0
	1/8	24,4	27,7
	1/16	12,2	13,6
	1/32	6,1	6,4
	1/64	3,1	3,0
Ορός 2	1/1	-	21,2
	1/2	10,6	9,3
	1/4	5,3	4,6
	1/8	2,7	2,2
	1/16	1,3	1,1
	1/32	0,7	0,6

Τα δείγματα αραιώθηκαν με μηδενικό βαθμονομητή.

Συντελεστής μετατροπής:

1 μIU του βαθμονομητή ισοδυναμεί με 0,33 ng

E. Μεσοδιάστημα μεταξύ της διανομής τελευταίου βαθμονομητή και δείγματος

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

ΜΕΣΟΔΙΑΣΤΗΜΑ			
	0 λεπτά	15 λεπτά	30 λεπτά
S1	1.83	1.71	1.60
S2	8.38	8.00	7.20

ΣΤ. Φαινόμενο αγκίστρου (hook)

Δείγμα που εμβολιάστηκε με hGH έως 4000 μIU/ml δίνει υψηλότερες μετρήσεις οπτικής πυκνότητας (OD) από το σημείο του τελευταίου βαθμονομητή.

XIV. ΕΣΩΤΕΡΙΚΟΣ ΠΟΙΟΤΙΚΟΣ ΕΛΕΓΧΟΣ

- Εάν τα αποτελέσματα που λαμβάνονται για τον ορό ελέγχου 1 ή/και τον ορό ελέγχου 2 δε βρίσκονται εντός του πεδίου τιμών που καθορίζεται στην ετικέτα του φιαλιδίου, τα

αποτελέσματα δεν είναι δυνατό να χρησιμοποιηθούν, εκτός εάν έχει δοθεί ικανοποιητική εξήγηση για την ασυμφωνία.

- Εάν είναι επιθυμητό, κάθε εργαστήριο μπορεί να δημιουργήσει τα δικά του μείγματα δειγμάτων ελέγχου (pools), τα οποία πρέπει να διατηρούνται κατεψυγμένα σε κλάσματα/δόσεις μιας χρήσης. Οροί ελέγχου που περιέχουν αζίδιο θα επιδράσουν στην ενζυμική αντίδραση και δεν μπορούν να χρησιμοποιηθούν.
- Τα κριτήρια αποδοχής για τη διαφορά μεταξύ των διπλών αποτελεσμάτων των δειγμάτων θα πρέπει να βασίζονται σε ορθές εργαστηριακές πρακτικές.
- Συνιστάται οι οροί ελέγχου να υποβάλλονται σε προσδιορισμό τακτικά ως άγνωστα δείγματα για να μετράται η μεταβλητότητα του προσδιορισμού. Η απόδοση του προσδιορισμού πρέπει να παρακολουθείται με διαγράμματα ποιοτικού ελέγχου των ορών ελέγχου.
- Είναι καλό το να ελέγχετε οπτικά την προσαρμογή της καμπύλης που επιλέχθηκε από τον υπολογιστή.

XV. ΤΙΜΕΣ ΑΝΑΦΟΡΑΣ

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

Σε φυσιολογικά υποκείμενα, η έκκριση της αυξητικής ορμόνης (hGH) είναι παλμικού τύπου. Κατά τη διάρκεια της ημέρας, οι συγκεντρώσεις της hGH κυμαίνονται από <math><0,2-10 \mu\text{U/ml}</math>. Κατά τη διάρκεια του ύπνου, οι συγκεντρώσεις της hGH αυξάνονται σταθερά ($\pm 30 \mu\text{U/ml}$). Η έκκριση της hGH διεγείρεται κατά πολύ από την άσκηση και το στρες (φλεβική παρακέντηση, υπογλυκαιμία, ...), αλλά μειώνεται από την υπεργλυκαιμία.

Σε φυσιολογικά υποκείμενα (n=34), δύο ώρες μετά από του στόματος λήψη γλυκόζης (75 g σε ενήλικους), τα επίπεδα της hGH ήταν χαμηλότερα από $10 \mu\text{U/ml}$ και η απόκριση της hGH σε δοκιμασίες διέγερσης (χορήγηση ινσουλίνης, αργινίνης, γλυκαγόνης) υπερέβαινε τα $20 \mu\text{U/ml}$.

Τα επίπεδα της hGH ήταν αυξημένα (ακόμη και μετά τη χορήγηση γλυκόζης) στη μεγαλακρία ($> 10 \mu\text{U/ml}$).

Σε ανεπάρκεια hGH, η απόκριση στη δοκιμασία διέγερσης είτε δεν υπάρχει είτε έχει αμβλυνθεί (μικρό ανάστημα λόγω ανεπάρκειας hGH, υποϋποφυσισμός προερχόμενος από διάφορα αίτια).

XVI. ΠΡΟΦΥΛΑΞΕΙΣ ΚΑΙ ΠΡΟΕΙΔΟΠΟΙΗΣΕΙΣ

Ασφάλειας

Μόνο για διαγνωστική χρήση *in vitro*.

Τα συστατικά ανθρώπινου αίματος που περιλαμβάνονται στο κιτ αυτό έχουν ελεγχθεί με μεθόδους εγκεκριμένες στην Ευρώπη ή/και από τον FDA και έχει διαπιστωθεί ότι είναι αρνητικά ως προς την παρουσία HBsAg, αντι-HCV, αντι-HIV-1 και 2. Καμία γνωστή μέθοδος δεν είναι δυνατό να παρέχει πλήρη διασφάλιση ότι παράγωγα του ανθρώπινου αίματος δε θα μεταδώσουν ηπατίτιδα, AIDS ή άλλες λοιμώξεις. Επομένως, ο χειρισμός αντιδραστηρίων, δειγμάτων ορού ή πλάσματος θα πρέπει να γίνεται σύμφωνα με τις τοπικές διαδικασίες περί ασφάλειας.

Όλα τα ζωικά προϊόντα και παράγωγα έχουν συλλεχθεί από υγιή ζώα. Τα βόεια συστατικά προέρχονται από χώρες όπου δεν έχει αναφερθεί BSE. Παρ' όλ' αυτά, συστατικά που περιέχουν ζωικές ουσίες θα πρέπει να αντιμετωπίζονται ως δυνητικώς μολυσματικά.

Αποφύγετε κάθε επαφή με το δέρμα με όλα τα αντιδραστήρια. Σε περίπτωση επαφής, πλύνετε σχολαστικά με νερό.

Μην καπνίζετε, μην πίνετε, μην τρώτε και μη χρησιμοποιείτε καλλυντικά στο χώρο εργασίας. Μην διανέμετε με πιπέτα χρησιμοποιώντας το στόμα σας. Χρησιμοποιείτε προστατευτικό ρουχισμό και γάντια μιας χρήσης.

XVII. ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ

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

J. Pediatr. 126(2): 297-303.

- KELLY JT. et al. (1993)
Effect of different oral oestrogen formulations on insulin-like growth factor I, growth hormone and growth hormone binding protein in post-menopausal women.
Clin. Endocrinol. 39(5) : 561-567

XVIII. ΠΕΡΙΛΗΨΗ ΤΟΥ ΠΡΩΤΟΚΟΛΛΟΥ

	ΒΑΘΜΟΝΟΜΗΤΕΣ (μl)	ΔΕΙΓΜΑ(ΤΑ) ΟΡΟΙ ΕΛΕΓΧΟΥ (μl)
Βαθμονομητές (0-5) Δείγματα, οροί ελέγχου Αντι-hGH-HRP σύζευγμα εργασίας	50 - 50	- 50 50
Επλώστε επί 30 λεπτά σε θερμοκρασία δωματίου Αναρροφήστε το περιεχόμενο κάθε υποδοχής. Πλύνετε 3 φορές με 400 μl διαλύματος πλύσης και αναρροφήστε.		
Αποκαλυπτικό διάλυμα	100	100
Επλώστε επί 30 λεπτά σε θερμοκρασία δωματίου		
Ανασχετικό διάλυμα	100	100
Κάντε ανάγνωση σε συσκευή ανάγνωσης πλακών μικροτιτλοδότησης και καταγράψτε την απορρόφηση κάθε υποδοχής στα 450 nm (έναντι 630 ή 650 nm)		