



hGH-EASIA

KAP1081

Read entire protocol before use.

hGH-EASIA

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-EASIA Kit
- B. **Catalogue number :** KAP1081 : 96 tests
- C. **Manufactured by :** DIAsource ImmunoAssays S.A.
Rue de l'Industrie, 8, B-1400 Nivelles, Belgium.

For technical assistance or ordering information contact :
Tel : +32 (0)67 88.99.99 Fax : +32 (0)67 88.99.96

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-EASIA is a solid phase Enzyme Amplified Sensitivity Immunoassay performed on a microtiterplate. Calibrators and samples react with the capture monoclonal antibody (MAb 1) coated on microtiter well and with a monoclonal antibody (MAb 2) labelled with horseradish peroxidase (HRP). After an incubation period allowing the formation of a sandwich: coated MAb 1 – hGH – MAb 2 – HRP, the microtiterplate is washed to remove unbound enzyme labelled antibody. Bound enzyme-labelled antibody is measured through a chromogenic reaction. The Chromogenic Solution (TMB – 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	Color Code	Reconstitution			
 Breakable microtiterplate with 96 anti hGH (monoclonal antibodies) coated wells	96 wells	blue	Ready to use			
<table border="1"><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	yellow	Dilute 40X with conjugate buffer
Ab	HRP	CONC				
<table border="1"><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	red	Ready to use	
CONJ	BUF					
<table border="1"><tr><td>CAL</td><td>0</td></tr></table> Zero calibrator in sheep serum and thymol	CAL	0	1 vial lyophilized	yellow	Add 2.0 ml distilled water	
CAL	0					
<table border="1"><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	yellow	Add 0.5 ml distilled water	
CAL	N					
<table border="1"><tr><td>WASH</td><td>SOLN</td><td>CONC</td></tr></table> Wash Solution (Tris-HCl)	WASH	SOLN	CONC	1 vial 10 ml	brown	Dilute 200 x with distilled water (use a magnetic stirrer).
WASH	SOLN	CONC				
<table border="1"><tr><td>CONTROL</td><td>N</td></tr></table> Controls - N = 1 or 2 in human serum with thymol	CONTROL	N	2 vials lyophilized	silver	Add 0.5 ml distilled water	
CONTROL	N					
<table border="1"><tr><td>CHROM</td><td>TMB</td></tr></table> Chromogen TMB Solution (Tetramethylbenzidine)	CHROM	TMB	1 vial 12 ml	brown	Ready to use	
CHROM	TMB					
<table border="1"><tr><td>STOP</td><td>SOLN</td></tr></table> Stop Solution: HCl 1N	STOP	SOLN	1 vial 12 ml	white	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 2.0 ml distilled water and the other calibrators with 0.5 ml distilled water.
- Controls** : Reconstitute the controls with 0.5 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.
 $Y(\text{serum}) = 0.89 \times (\text{EDTA plasma}) + 0.14 \text{ µIU/ml}$ r=0.98 n=46
 $Y(\text{serum}) = 1.02 \times (\text{Heparin plasma}) + 0.01 \text{ µIU/ml}$ r=0.98 n=46
- § Do not use haemolysed samples.

X. PROCEDURE

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

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-EASIA Calibrator = 0.33 ng

E. Time delay between last calibrator and sample dispensing

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

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

F. Hook effect

A sample spiked with hGH up to 4000 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 adenohypophysis
In : "Textbook of Endocrinology", R.H. Williams ed., W.B. Saunders, Philadelphia, p;73.

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

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).		

DIAsource Catalogue Nr : KAP1081	P.I. Number : 1700573/en	Revision nr : 090504/1
-------------------------------------	-----------------------------	---------------------------

Revision date : 2009-05-04

Lire entièrement le protocole avant utilisation.

hGH-EASIA

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-EASIA kit
- B. **Numéro de catalogue :** KAP1081 : 96 tests
- C. **Fabriqué par :** DIAsource ImmunoAssays S.A.
Rue de l'Industrie, 8 B-1400 Nivelles Belgium.

Pour une assistance technique ou une information sur une commande :

Tel : +32 (0)67 88.99.99

Fax : +32 (0)67 88.99.96

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

La DIASource hGH-EASIA est une « Enzyme Amplified Sensitivity Immunoassay » en phase solide effectuée 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	Code Couleur	Reconstitution
 Micro-plaque de titration sécable avec 96 puits recouvert d'anti hGH (anticorps monoclonal)			96 puits	bleu	Prêt à l'emploi
Ab	HRP	CONC	1 flacon 0,2 ml	Jaune	Diluer 40 x avec le tampon du conjugué
Conjugué: anti-hGH marqué avec de l'HRP (anticorps monoclonal) dans un tampon stabilisant					
CONJ BUF			1 flacon 6 ml	Rouge	Prêt à l'emploi
Tampon du conjugué: un tampon TRIS-HCl avec de l'albumine bovine et du thymol					
CAL	0		1 flacon lyophilisé	Jaune	Ajouter 2,0 ml d'eau distillée
Calibrateur zéro dans du sérum de brebis et du thymol					
CAL	N		5 flacons lyophilisés	Jaune	Ajouter 0,5 ml d'eau distillée
Calibrateur N = 1 à 5 (cfr. Valeurs exactes sur chaque flacon) dans du sérum de brebis et du thymol					
WASH	SOLN	CONC	1 flacon 10 ml	Brun	Diluer 200 x avec de l'eau distillée (utiliser un agitateur magnétique).
Solution de Lavage (Tris-HCl)					
CONTROL	N		2 flacons lyophilisés	Gris	Ajouter 0,5 ml d'eau distillée
Contrôles - N = 1 ou 2 dans du sérum humain et du thymol					
CHROM	TMB		1 vial 12 ml	Brun	Prêt à l'emploi
Solution Chromogène TMB (Tetramethylbenzidine)					
STOP	SOLN		1 vial 12 ml	Blanc	Prêt à l'emploi
Solution d'arrêt: HCl 1N					

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. MATERIELS NON FOURNIS

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

- Eau distillée d’une haute qualité
- Pipettes pour distribuer: 50 µl, 200 µl, 500 µl et 2 ml (l’utilisation de pipettes précises et de pointes en plastique est recommandée)
- Agitateur vortex
- Agitateur magnétique
- Laveur de micro-plaques
- 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 2,0 ml d’eau distillée et les autres calibrateurs avec 0,5 ml d’eau distillée..
- B. Contrôles** : Reconstituer les contrôles avec 0,5 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 desiccant 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 (héparnés ou EDTA) donne des résultats similaires.
 $Y(\text{sérum}) = 0,89 \times (\text{plasma EDTA}) + 0,14$ r=0.98 n=46
 $Y(\text{sérum}) = 1,02 \times (\text{plasma hép.}) + 0,01$ r=0.98 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. Réaliser les calibrateurs, les contrôles et les échantillons en double. Un alignement vertical est recommandé.
Utiliser un récipient en plastic 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 desiccant et gardées à 2-8°C.

2.

Placer les barrettes dans le support.
3.

Pipeter 50 µl de chaque Calibrateur, Contrôle et Echantillon dans les puits appropriés.
4.

Pipeter 50 µl du conjugué anti-hGH-HRP de travail dans tous les puits.
5.

Incuber pendant 30 minutes à température ambiante Il est obligatoire de respecter la durée de trente minutes pour cette incubation.
6.

Aspirer le liquide de chaque puits.
7.

Laver la plaque 3 fois en:
§ distribuant 0,4 ml de la Solution de Lavage dans chaque puits
§ aspirant le contenu de chaque puits
8.

Pipeter 100 µl de la solution chromogène dans chaque puits dans les 15 minutes après la phase de lavage.
9.

Incuber la micro-plaque pendant 30 minutes à température ambiante, éviter exposition à la lumière du soleil.
10.

Pipeter 100 µl de la Solution d'arrêt dans chaque puits.
11.

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

1.

Lire la plaque à 450 nm contre un filtre de référence mis à 650 nm (ou 630 nm).
2.

Calculer la moyenne de chaque détermination réalisée en double.
3.

Dessiner sur un graphique linéaire ou semi-logarithmique les cpm (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.
4.

Lire la concentration pour chaque contrôle et échantillon par interpolation sur la courbe de calibration.
5.

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-EASIA		Unités OD
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 moyenne DO 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-EASIA = 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 60 minutes après que le calibrateur a été ajouté aux tubes avec l'anticorps.

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

F. Effet crochet

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

XIV. CÔNTROLE 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 la courbe sélectionnée par l'ordinateur.

XV. VALEURS ATTENDUES

Les valeurs sont donnés 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)		

DIAsource Catalogue Nr : KAP1081	P.I. Number : 1700573/fr	Revision nr : 090504/1
-------------------------------------	-----------------------------	---------------------------

Date de révision : 2009-05-04

Vor Gebrauch des Kits lesen Sie bitte diese Packungsbeilage.

hGH-EASIA

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-EASIA Kit
- B. **Katalognummer :** KAP1081 : 96 Tests
- C. **Hergestellt von:** DIAsource ImmunoAssays S.A.
Rue de l'Industrie, 8, B-1400 Nivelles, Belgien.

Für technische Unterstützung oder Bestellungen wenden Sie sich bitte an:

Tel : +32 (0)67 88.99.99 Fax : +32 (0)67 88.99.96

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-EASIA ist ein solid phase-Enzyme Amplified Sensitive Immunoassay (EASIA) im Mikrotiterplattenformat. Kalibratoren und Proben reagieren mit dem primären monoklonalen Antikörper (MAk 1), mit dem die Wells der Mikrotiterplatte beschichtet sind, und mit einem monoklonalen Antikörper (MAk 2), der mit Meerrettich-Peroxidase (MRP) markiert ist. Nach einer Inkubationsphase bildet sich ein Sandwich-Komplex: MAk 1 - hGH - MAk 2 - MRP; nicht gebundene enzymschriebene Antikörper werden durch Waschen der Mikrotiterplatte entfernt. Gebundene enzymschriebene 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 Test Kit	Farb-Code	Rekonstitution
 Mikrotiterplatte mit 96 Anti-hGH beschichteten, abbrechbaren Wells (monoklonale Antikörper)			96 Wells	Blau	gebrauchsfertig
Ab HRP CONC Konjugat: MRP beschriftete Anti-hGH (monoklonale Antikörper) in Stabilisierungspuffer			1 Gefäß 0,2 ml	Gelb	40 fach mit Konjugatpuffer verdünnen
CONJ BUF Konjugatpuffer: TRIS-HCl Puffer mit Rinderserumalbumin und Thymol			1 Gefäß 6 ml	Rot	gebrauchsfertig
CAL 0 Null-Kalibrator in Schafserum und Thymol			1 Gefäß lyophilisiert	Gelb	2,0 ml dest. Wasser zugeben
CAL N Kalibrator - N = 1 bis 5 (genaue Werte auf Gefäß-Etiketten) in Schafserum und Thymol			5 Gefäße lyophilisiert	Gelb	0,5 ml dest. Wasser zugeben
WASH SOLN CONC Waschlösung (Tris-HCl)			1 Gefäß 10 ml	Braun	200 x mit dest. Wasser verdünnen (Magnetrührer benutzen).
CONTROL N Kontrollen - N = 1 oder 2 Humanserum und Thymol			2 Gefäße lyophilisiert	Silber	0,5 ml dest. Wasser zugeben
CHROM TMB Chromogenes TMB (Tetramethylbenzidin)			1 Gefäß 12 ml	Braun	gebrauchsfertig
STOP SOLN Stopplösung: HCl 1N			1 Gefäß 12 ml	weiß	gebrauchsfertig

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

- A. Kalibratoren:** Rekonstituieren Sie den Null-Kalibrator mit 2,0 ml dest. Wasser, die anderen Kalibratoren mit 0,5 ml dest. Wasser.
- B. Kontrollen:** Rekonstituieren Sie die Kontrollen mit 0,5 ml dest. Wasser.
- C. 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.
- D. 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

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

B. Durchführung

- 1. Wählen Sie die erforderliche Anzahl der Streifen für den Lauf aus. Nicht verwendete Mikrotiterstreifen sollten wieder dicht in der Folie verschlossen mit Trockenmittel bei 2° bis 8°C gelagert werden.
- 2. Befestigen Sie die Streifen im Halterahmen.
- 3. Pipettieren Sie jeweils 50 µl Kalibrator, Kontrolle und Probe in die entsprechenden Wells.
- 4. Pipettieren Sie 50 µl Anti-hGH-HRP Gebrauchslösung in alle Wells.
- 5. Inkubieren Sie 30 Minuten bei Raumtemperatur - Es ist zwingend notwendig, die 30 Minuten Inkubationszeit einzuhalten.
- 6. Saugen Sie die Flüssigkeit aus jedem Well ab.
- 7. Waschen Sie die Platte dreimal:
§ pipettieren Sie 0,4 ml Waschlösung in jeden Well
§ saugen Sie der Inhalt jedes Wells ab
- 8. Pipettieren Sie 100 µl der chromogene Lösung innerhalb von 15 Minuten nach dem Waschvorgang in jeden Well.
- 9. Inkubieren Sie die Mikrotiterplatte 30 Minuten bei Raumtemperatur; vermeiden Sie direktes Sonnenlicht.
- 10. Pipettieren Sie 100 µl der Stopplösung in jeden Well.
- 11. Werten Sie die Absorptionen bei 450 nm (Referenzfilter 630 nm oder 650 nm) innerhalb 1 Stunde aus und berechnen Sie die Resultate wie in Abschnitt 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-EASIA		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. Konz. (µIU/ml)	Gemess. Konz. (µIU/ml)
Serum 1	1/2	-	97,7
	1/4	48,8	57,0
	1/8	24,4	27,7
	1/16	12,2	13,6
	1/32	6,1	6,4
	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-EASIA = 0,33 ng

E. Zeitverzögerung zwischen letzter Kalibrator- und Probenzugabe

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

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

F. Hook-Effekt

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

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

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

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

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

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.		

DIAsource Katalognummer : KAP1081	Beipackzettelnummer: 1700573/de	Nummer der Originalausgabe: 090504/1
--------------------------------------	------------------------------------	--

Revisionsdatum : 2009-05-04

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

hGH -EASIA

I. USO DEL KIT

Kit immunoenzimatico 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-EASIA Kit
- B. Numero di catalogo:** KAP1081: 96 test
- C. Prodotto da:** DIASource ImmunoAssays S.A.
Rue de l'Industrie, 8, B-1400 Nivelles, Belgio.

Per informazioni tecniche o su come ordinare il prodotto contattare:

Tel: +32 (0) 67 88.99.99

Fax: +32 (0) 67 88.99.96

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-EASIA 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 cromogenica. 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	Codice colore	Volume di ricostituzione			
 Piastra di microtitolazione con 96 pozzetti separabili, rivestiti anti hGH (anticorpi monoclonali)	96 pozzetti	Blu	Pronte per l'uso			
<table><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	Giallo	Diluire 40 x con tampone del coniugato
Ab	HRP	CONC				
<table><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	Rosso	Pronto per l'uso	
CONJ	BUF					
<table><tr><td>CAL</td><td>0</td></tr></table> Calibratore zero in siero di pecora e timolo.	CAL	0	1 flacone liofiliz.	Giallo	Aggiungere 2,0 ml di acqua distillata	
CAL	0					
<table><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.	Giallo	Aggiungere 0,5 ml di acqua distillata	
CAL	N					
<table><tr><td>WASH</td><td>SOLN</td><td>CONC</td></tr></table> Tampone di lavaggio (TRIS HCl)	WASH	SOLN	CONC	1 flacone 10 ml	Bruno	Diluire 200 x con acqua distillata usando un agitatore magnetico)..
WASH	SOLN	CONC				
<table><tr><td>CONTROL</td><td>N</td></tr></table> Controlli: N = 1 o 2, in siero umano con timolo	CONTROL	N	2 flaconi liofiliz.	Argento	Aggiungere 0,5 ml di acqua distillata	
CONTROL	N					
<table><tr><td>CHROM</td><td>TMB</td></tr></table> Soluzione Cromogena TMB (tetrametilbenzidina)	CHROM	TMB	1 flacone 12 ml	Bruno	Pronto per l'uso	
CHROM	TMB					
<table><tr><td>STOP</td><td>SOLN</td></tr></table> Soluzione di arresto: HCl 1N	STOP	SOLN	1 flacone 12 ml	bianco	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 2,0 ml di acqua distillata e gli altri calibratori con 0,5 ml di acqua distillata.
- B. Controlli:** Ricostituire i controlli con 0,5 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.
 $Y(\text{siero}) = 0.89 \times (\text{plasma EDTA}) + 0.14 \mu\text{IU/ml}$ $r=0.98$ $n=46$
 $Y(\text{siero}) = 1.02 \times (\text{plasma eparinato}) + 0.01 \mu\text{IU/ml}$ $r=0.98$ $n=46$
- § Non usare campioni emolizzati.

X. METODO DEL DOSAGGIO

- A. Avvertenze generali**
Non usare il kit o i 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, paagrafo 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 colpi per minuto (cpm) 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-EASIA		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 cros-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 100000 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	Diluizione	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 EASIA 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 provette sensibilizzate 60 minuti dopo l’aggiunta del calibratore.

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

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 azeit 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 adenohypophysis
In : "Textbook of Endocrinology", R.H. Williams ed., W.B. Saunders, Philadelphia, p;73.

3. DROBNY E.C., AMBURN K., BAUMANN G. (1983)
Circadian variation of basal plasma growth hormone in man.
J. Clin. Endo. and Metab., 57:524-528.

4. HASHIDA S., NAKAWAGA K., ISHIKAWA E., OHTAKI S. (1985)
Basal level of human growth hormone (hGH) in normal serum.
Clin. Chim. Acta, 151:185-186.

5. LEWIS V.J. et al. (1980)
Human growth hormone : A complex of proteins.
Rec. Progr. Horm. Res., 36:488.

6. LI C.H. (1974)
Human growth hormone : perspective on its chemistry and physiology.
In : "Advances in human growth hormone research", S. Raiti ed. U.S. Department of Health, Education and Welfare Publ. DMEW publ. no. (NJH) 74-612, p. 321.

7. REUTENS AT. (1995)
Evaluation and application of a highly sensitive assay for serum growth hormone (GH) in the study of adult GH deficiency.
J. Clin. Endocrinol. Metab., 80(2): 480-485

8. CROWLEY S. et al. (1995)
Growth and the growth hormone axis in prepubertal children with asthma.
J. Pediatr. 126(2): 297-303.

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

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 chromogena	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)		

Numero di catalogo di DIAsource: KAP1081	P.I. numero: 1700573/it	Revisione numero: 090504/1
--	----------------------------	-------------------------------

Data di revisione : 2009-05-04

Διαβάστε ολόκληρο το πρωτόκολλο πριν από τη χρήση.

hGH-EASIA

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:** Kit hGH-EASIA της DIAsource
- B. **Αριθμός καταλόγου:** KAP1081: 96 προσδιορισμοί
- Γ. **Κατασκευάζεται από την:** DIAsource ImmunoAssays S.A.
Rue de l'Industrie, 8, B-1400 Nivelles, Belgium.

Για τεχνική βοήθεια ή πληροφορίες σχετικά με παραγγελίες επικοινωνήστε στα:

Τηλ.: +32 (0)67 88.99.99

Φαξ: +32 (0)67 88.99.96

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-EASIA

· 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 οξεόφилου 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-EASIA της DIAsource είναι ένας ενζυμικός ανοσοπροσδιορισμός ενισχυμένης εναισθησίας, 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 ραφανιδική 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	Χρωματικός κωδικός	Ανασύσταση
Πλάκα μικροτιτλοδότησης με 96 αποσπώμενες υποδοχές επιστρωμένες με			96 υποδοχές	μπλε	Έτοιμο για χρήση
Ab	HRP	CONC	1 φ ιαλίδιο 0,2 ml	κίτρινο	Αραιώστε 40X με ρυθμιστικό διάλυμα συζεύγματος
Σύζευγμα: αντι- hGH (μονοκλωνικά αντισώματα) σημασμένα με HRP σε ρυθμιστικό διάλυμα σταθεροποίησης					
CONJ BUF			1 φ ιαλίδιο 6 ml	κόκκινο	Έτοιμο για χρήση
Ρυθμιστικό διάλυμα συζεύγματος: ρυθμιστικό διάλυμα TRIS-HCl με βόεια ορολευκωματίνη και θυμόλη					
CAL	0		1 φιαλίδιο λυοφιλοποιημένο	κίτρινο	Προσθέστε 2,0 ml απεσταγμένου νερού
Μηδενικός βαθμονομητής σε ορό προβάτου και θυμόλη					
CAL	N		5 φιαλίδια λυοφιλοποιημένο	κίτρινο	Προσθέστε 0,5 ml απεσταγμένου νερού
Βαθμονομητής N = 1 έως 5 (δείτε τις ακριβείς τιμές πάνω στις ετικέτες των φιαλιδίων) σε ορό προβάτου και θυμόλη					
WASH	SOLN	CONC	1 φιαλίδιο 10 ml	καφέ	Αραιώστε 200 x με απεσταγμένο νερό (χρησιμοποιήστε μαγνητικό αναδευτήρα).
Διάλυμα πλύσης (Tris-HCl)					
CONTROL	N		2 φιαλίδια λυοφιλοποιημένο	ασημί	Προσθέστε 0,5 ml απεσταγμένου νερού
Οροί ελέγχου - N = 1 ή 2 σε ανθρώπινο ορό με θυμόλη					
CHROM	TMB		1 φιαλίδιο 12 ml	καφέ	Έτοιμο για χρήση
Χρωμογόνος TMB (τετραμεθυλβενζυδίνη)					
STOP	SOLN		1 φιαλίδιο 12 ml	λευκό	Έτοιμο για χρήση
Ανασχετικό αντιδραστήριο: HCl 1N					

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

VI. ΑΝΑΛΩΣΙΜΑ ΠΟΥ ΔΕΝ ΠΑΡΕΧΟΝΤΑΙ

Τα ακόλουθα υλικά απαιτούνται αλλά δεν παρέχονται στο κιτ:

- Απεσταγμένο νερό υψηλής ποιότητας
- Πιπέτες για διανομή: 50 μl, 200 μl, 500 μl και 2 ml (συνιστάται η χρήση πιπετών ακριβείας με αναλώσιμα πλαστικά ρύγχη)
- Αναμεικτής στροβιλισμού
- Μαγνητικός αναδευτήρας

- Συσκευή πλύσης για πλάκες μικροτιτλοδότησης
- Συσκευή ανάγνωσης πλακών μικροτιτλοδότησης με δυνατότητα ανάγνωσης στα 450 nm και 650 nm (διχρωματική ανάγνωση)

VII. ΠΑΡΑΣΚΕΥΗ ΑΝΤΙΔΡΑΣΤΗΡΙΟΥ

- A. Βαθμονομητές:** Ανασυστήστε το μηδενικό βαθμονομητή με 2,0 ml απεσταγμένου νερού και άλλους βαθμονομητές με 0,5 ml απεσταγμένου νερού.
- B. Οροί ελέγχου:** Ανασυστήστε τους ορούς ελέγχου με 0,5 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 επαναληψιμένους 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. Αποφεύγετε τους επακόλουθους κύκλους κατάψυξης-απόψυξης.
- § Φέρετε όλα τα δείγματα σε θερμοκρασία δωματίου πριν από τη χρήση. Συνιστάται η ανάμειξη των δειγμάτων σε συσκευή στροβιλισμού πριν από τη χρήση.
- § Ορός, ηπαρινισμένο 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 υποστεί 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 πιπετών υψηλής ακρίβειας 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

- 1. 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.
- 2. Ασφαλίστε τις ταινίες μέσα στο πλαίσιο στήριξης.
- 3. Διανείμετε με πιπέτα 50 μl από κάθε βαθμονομητή, ορό ελέγχου και δείγμα στις κατ'άλληλες υποδοχές.
- 4. Διανείμετε με πιπέτα 50 μl αντι-hGH-HRP συζεύγματος εργασίας σε όλες τις υποδοχές.
- 5. Επωάστε επί 30 λεπτά σε θερμοκρασία δωματίου - Η τήρηση 30 λεπτών ως διάρκεια για αυτήν την επώαση είναι υποχρεωτική.
- 6. Αναρροφήστε το υγρό από κάθε υποδοχή.
- 7. Πλύνετε την πλάκα 3 φορές:
§ διανέμοντας 0,4 ml διαλύματος πλύσης σε κάθε υποδοχή.
§ αναρροφώντας το περιεχόμενο κάθε υποδοχής.
- 8. Διανείμετε με πιπέτα 100 μl του χρωμογόνου διαλύματος σε κάθε υποδοχή, εντός 15 λεπτών από το βήμα πλύσης.
- 9. Επωάστε επί 30 λεπτά σε θερμοκρασία δωματίου, αποφύγετε την άμεση έκθεση στην ηλιακή ακτινοβολία.
- 10. Διανείμετε με πιπέτα 100 μl ανασχετικού διαλύματος σε κάθε υποδοχή.
- 11. 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

- 1. Κάντε ανάγνωση της πλάκας στα 450 nm έναντι ενός φίλτρου αναφοράς που ρυθμίζεται στα 650 nm (ή τα 630 nm).
- 2. Υπολογίστε τη μέση τιμή των διπλών προσδιορισμών.
- 3. 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.
- 4. Διαβάστε τη συγκέντρωση για κάθε ορό ελέγχου και δείγμα με αναγωγή στην καμπύλη βαθμονόμησης.
- 5. 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-EASIA		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. ΑΠΟΛΟΣΗ 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 60 λεπτά μετά την προσθήκη των βαθμονομητών στα επιστρωμένα σωληνάρια.

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

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. TIMEΣ 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 <0,2-10 μIU/ml. Κατά τη διάρκεια του ύπνου, οι συγκεντρώσεις της hGH αυξάνονται σταθερά (± 30 μIU/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 μIU/ml και η απόκριση της hGH σε δοκιμασίες διέγερσης (χορήγηση ινσουλίνης, αργινίνης, γλυκαγόνης) υπερέβαινε τα 20 μIU/ml.
Τα επίπεδα της hGH ήταν αυξημένα (ακόμη και μετά τη χορήγηση γλυκόζης) στη μεγαλακρία (> 10 μIU/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 kit 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

1. CAMANNI F., MASSARA F., BELFORTE L., ROSATELLO A., MOLENATTI G.M. (1977)
Effect of dopamine on plasma growth hormone and prolactin levels in normal and acromegalic subjects.
J. Clin. Endo. and Metab., 44:465.

2. DAUGHADAY W.H. (1981)
The adenohypophysis
In : "Textbook of Endocrinology", R.H. Williams ed., W.B. Saunders, Philadelphia, p:73.

3. DROBNY E.C., AMBURN K., BAUMANN G. (1983)
Circadian variation of basal plasma growth hormone in man.
J. Clin. Endo. and Metab., 57:524-528.

4. HASHIDA S., NAKAWAGA K., ISHIKAWA E., OHTAKI S. (1985)
Basal level of human growth hormone (hGH) in normal serum.
Clin. Chim. Acta, 151:185-186.

5. LEWIS V.J. et al. (1980)
Human growth hormone : A complex of proteins.
Rec. Progr. Horm. Res., 36:488.

6. LI C.H. (1974)
Human growth hormone : perspective on its chemistry and physiology.
In : "Advances in human growth hormone research", S. Raiti ed. U.S. Department of Health, Education and Welfare Publ. DMEW publ. no. (NJH) 74-612, p. 321.

7. REUTENS AT. (1995)
Evaluation and application of a highly sensitive assay for serum growth hormone (GH) in the study of adult GH deficiency.
J. Clin. Endocrinol. Metab., 80(2): 480-485

8. CROWLEY S. et al. (1995)
Growth and the growth hormone axis in prepubertal children with asthma.
J. Pediatr. 126(2): 297-303.

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

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
Επωάστε 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
Επωάστε 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)		

Αρ. καταλόγου DIASource: KAP1081	Αριθμός P.I.: 1700573/el	Αρ. αναθεώρησης: 090504/1
-------------------------------------	-----------------------------	------------------------------

ημερομηνία αναθεώρησης : 2009-05-04

	<u>Used symbols</u>	<u>Symboles utilisés</u>
	Consult instructions for use	Consulter les instructions d'utilisation
	Storage temperature	Température de conservation
	Use by	Utiliser jusque
	Batch code	Numéro de lot
	Catalogue number	Référence de catalogue
	Control	Contrôle
	In vitro diagnostic medical device	Dispositif médical de diagnostic in vitro
	Manufacturer	Fabricant
	Contains sufficient for <n> tests	Contenu suffisant pour <n> tests
	Wash solution concentrated	Solution de lavage concentrée
	Zero calibrator	Calibrateur zéro
	Calibrator #	Calibrateur #
	Control #	Contrôle #
	Tracer	Traceur
	Tracer	Traceur
	Tracer concentrated	Traceur concentré
	Tracer concentrated	Traceur concentré
	Tubes	Tubes
	Incubation buffer	Tampon d'incubation
	Acetonitrile	Acétonitrile
	Serum	Sérum
	Specimen diluent	Diluant du spécimen
	Dilution buffer	Tampon de dilution
	Antiserum	Antisérum
	Immunoabsorbent	Immunoabsorbant
	Calibrator diluent	Diluant de calibrateur
	Reconstitution solution	Solution de reconstitution
	Polyethylene glycol	Glycol Polyéthylène
	Extraction solution	Solution d'extraction
	Elution solution	Solution d'élution
	Bond Elut Silica cartridges	Cartouches Bond Elut Silica
	Pre-treatment solution	Solution de pré-traitement
	Neutralization solution	Solution de neutralisation
	Tracer buffer	Tampon traceur
	Microtiterplate	Microplaque de titration
	HRP Conjugate	HRP Conjugué
	HRP Conjugate	HRP Conjugué
	HRP Conjugate concentrate	HRP Conjugué concentré
	HRP Conjugate concentrate	HRP Conjugué concentré
	Conjugate buffer	Tampon conjugué
	Chromogenic TMB concentrate	Chromogène TMB concentré
	Chromogenic TMB solution	Solution chromogène TMB
	Substrate buffer	Tampon substrat
	Stop solution	Solution d'arrêt
	Incubation serum	Sérum d'incubation
	Buffer	Tampon
	AP Conjugate	AP Conjugué
	Substrate PNPP	Tampon PNPP
	Biotin conjugate concentrate	Biotine conjugué concentré
	Avidine HRP concentrate	Avidine HRP concentré
	Assay buffer	Tampon de test
	Biotin conjugate	Biotine conjugué
	Specific Antibody	Anticorps spécifique
	Streptavidin HRP concentrate	Concentré streptavidine HRP
	Non-specific binding	Liant non spécifique
	2nd Antibody	Second anticorps
	Acidification Buffer	Tampon d'acidification

	<u>Gebruikte symbolen</u>	<u>Gebrauchte Symbolen</u>
	Raadpleeg de gebruiksaanwijzing	Gebrauchsanweisung beachten
	Bewaartemperatuur	Lagern bei
	Houdbaar tot	Verwendbar bis
	Lotnummer	Chargenbezeichnung
	Catalogusnummer	Bestellnummer
	Controle	Kontrolle
	Medisch hulpmiddel voor in-vitro diagnostiek	In Vitro Diagnostikum
	Fabrikant	Hersteller
	Inhoud voldoende voor <n> testen	Ausreichend für <n> Ansätze
	Wasoplossing, geconcentreerd	Waschlösung-Konzentrat
	Nulkalibrator	Null kalibrator
	Kalibrator #	Kalibrator #
	Controle #	Kontrolle #
	Tracer	Tracer
	Tracer	Tracer
	Tracer geconcentreerd	Tracer Konzentrat
	Tracer geconcentreerd	Tracer Konzentrat
	Buisjes	Röhrchen
	Incubatiebuffer	Inkubationspuffer
	Acetonitrile	Azetonitril
	Serum	Humanserum
	Specimen diluent	Probenverdünner
	Verdunningsbuffer	Verdünnungspuffer
	Antiserum	Antiserum
	Immunoabsorbent	Immunadsorbens
	Kalibratorverdunner	Kalibratorverdünnung
	Reconstitutieoplossing	Rekonstitutionslösung
	Polyethyleen glycol	Polyethylenglykol
	Extractieoplossing	Extraktionslösung
	Elutieoplossing	Eluierungslösung
	Bond Elut Silica kolom	Bond Elut Silikakartuschen
	Pre-behandelingsoplossing	Vorbehandlungslösung
	Neutralisatieoplossing	Neutralisierungslösung
	Tracerbuffer	Tracer-Puffer
	Microtiterplaat	Mikrotiterplatte
	HRP Conjugaat	HRP Konjugat
	HRP Conjugaat	HRP Konjugat
	HRP Conjugaat geconcentreerd	HRP Konjugat Konzentrat
	HRP Conjugaat geconcentreerd	HRP Konjugat Konzentrat
	Conjugaat buffer	Konjugatpuffer
	Chromogene TMB geconcentreerd	Chromogenes TMB Konzentrat
	Chromogene Oplossing TMB	Farblösung TMB
	Substraatbuffer	Substratpuffer
	Stopoplossing	Stopplösung
	Incubatieserum	Inkubationsserum
	Buffer	Puffer
	AP Conjugaat	AP Konjugat
	Substraat PNPP	Substrat PNPP
	Geconcentreerd Biotine conjugaat	Biotin-Konjugat-Konzentrat
	Geconcentreerd Avidine-HRP conjugaat	Avidin-HRP-Konzentrat
	Assay buffer	Assaypuffer
	Biotine conjugaat	Biotin-Konjugat
	Specifiek antilichaam	Spezifischer Antikörper
	Streptavidine-HRP concentraat	HRP Streptavidinkonzentrat
	Aspecifieke binding	Unspezifische Bindung
	2de antilichaam	Sekundärer Antikörper
	Verzuringbuffer	Ansäuerungspuffer

	<u>Simboli utilizzati</u>	<u>Símbolos utilizados</u>
	Consultare le istruzioni per l'uso	Consultar las instrucciones de uso
	Limitazioni di temperatura	Limitación de temperatura
	Utilizzare entro	Fecha de caducidad
	Numero di lotto	Código de lote
	Numero di catalogo	Número de catálogo
	Controllo	Control
	Dispositivo medico-diagnostico in vitro	Producto sanitario para diagnóstico in vitro
	Fabbricante	Fabricante
	Contenuto sufficiente per <n> saggi	Contenido suficiente para <n> ensayos
	Tampone di lavaggio concentrato	Solución de lavado concentrada
	Calibratore zero	Calibrador cero
	Standard #	Calibrador #
	Controllo #	Control #
	Marcato	Trazador
	Marcato	Trazador
	Marcato concentrato	Trazador concentrada
	Marcato concentrato	Trazador concentrada
	Provette	Tubos
	Tampone incubazione	Tampón de incubación
	Acetonitrile	Acetonitrilo
	Siero	Suero
	Diluente campione	Diluyente de Muestra
	Tampone diluizione	Tampón de dilución
	Antisiero	Antisuero
	Immunoassorbente	Inmunoadsorbente
	Diluente calibratore	Diluyente de calibrador
	Soluzione di ricostituzione	Solución de Reconstitución
	Polietilenglicole	Glicol Polietileno
	Soluzione di estrazione	Solución de extracción
	Soluzione di eluizione	Solución de elución
	Cartucce di silice bond elut	Cartuchos Bond Elut Silica
	Soluzione di pretrattamento	Solución de Pre-tratamiento
	Soluzione di neutralizzazione	Solución de Neutralización
	Tracer Buffer	Tampón de trazador
	Piastra di microtitolazione	Placa de microvaloración
	HRP Coniugato	HRP Conjugado
	HRP Coniugato	HRP Conjugado
	HRP Coniugato concentrato	HRP Conjugado concentrada
	HRP Coniugato concentrato	HRP Conjugado concentrada
	Buffer coniugato	Tampón de Conjugado
	Cromogena TMB concentrato	Cromógena TMB concentrada
	Soluzione cromogena TMB	Solución Cromógena TMB
	Tampone substrato	Tampón de sustrato
	Soluzione di arresto	Solución de Parada
	Incubazione con siero	Suero de Incubación
	Buffer	Tampón
	AP Coniugato	AP Conjugado
	Substrato PNPP	Sustrato PNPP
	Concentrato coniugato con biotina	Concentrado de conjugado de biotina
	Concentrato avidina HRP	Concentrado avidina-HRP
	Soluzione tampone per test	Tampón de ensayo
	Coniugato con biotina	Conjugado de biotina
	Anticorpo Specifico	Anticuerpo específico
	Streptavidina-HRP concentrata	Estreptavidina-HRP Concentrado
	Legame non-specifico	Unión no específica
	2° Anticorpo	Segundo anticuerpo
	Tampone Acidificante	Tampón de Acidificación

	<u>Símbolos utilizados</u>	<u>Använda symboler</u>
	Consulte instruções de utilização	Läs instruktionerna före användning
	Temperatura de conservação	Förvaringstemperatur
	Utilizar antes de	Används av
	Código de lote	Lotnummer
	Número de catálogo	Katalognummer
	Controlo	Kontroll
	Dispositivo médico de diagnóstico in vitro	In vitro diagnostiskt kit
	Fabricante	Tillverkare
	Conteúdo suficiente para <n> testes	Innehållet räcker till <n> prover
	Solução de lavagem concentrada	Tvättlösning, koncentrerad
	Calibrador zero	Nollkalibrerare
	Calibrador #	Kalibrator #
	Controlo #	Kontroll #
	Marcador	Radioisotop, antigen
	Marcador	Radioisotop, antikropp
	Marcador concentrada	Radioisotop, antigen koncentrerad
	Marcador concentrada	Radioisotop, antikropp koncentrerad
	Tubos	Rör
	Tampão de incubação	Inkuberingsbuffert
	Acetonitrilo	Acetonitril
	Soro	Serum
	Diluidor de espécimes	Spädningsbuffert för prover
	Tampão de diluição	Spädningsbuffert
	Anti-soro	Antiserum
	Imunoadsorvente	Immunoadsorberare
	Diluyente do calibrador	Kalibratordiluent
	Solução de Reconstituição	Rekonstitutionslösning
	Polietileno-glicol	Polyetylglykol
	Solução de Extracção	Extraktionslösning
	Solução de Eluição	Elueringslösning
	Cartuchos de sílica Bond Elut	Silikonpatroner för elueringsbindning
	Solução de pré-tratamento	Förbehandlingslösning
	Solução de neutralização	Neutraliseringslösning
	Tampão Marcador	Tracerbuffert
	Placa de micro titulação	Microtiterplatta
	HRP Conjugação	HRP-konjugat
	HRP Conjugação	HRP-konjugat
	HRP Conjugação concentrada	HRP-konjugat-koncentrat
	HRP Conjugação concentrada	HRP-konjugat-koncentrat
	Conjuge o tampão	Konjugatbuffert
	Cromogénica TMB concentrada	Kromogeniskt TMB-koncentrat
	Solução Cromogénica TMB	Kromogenisk TMB-lösning
	Tampão de substrato	Substratbuffert
	Solução de Paragem	Stopplösning
	Soro de incubação	Inkubationsserum
	Tampão	Buffert
	AP Conjugação	AP-konjugat
	Substrato PNPP	Substrat-PNPP
	Concentrado conjugado de biotina	Biotinkonjugat koncentrat
	Concentrado HRP de avidina	Avidin HRP-koncentrat
	Tampão de ensaio	Provbuffert
	Conjugado de biotina	Biotinkonjugat
	Anticorpo específico	-
	Estreptavidina HRP concentrado	-
	Ligações não específicas	-
	Anticorpo secundário	-
	Tampão de acidificação	-

	<u>Επεξήγηση συμβόλων</u>	<u>Anvendte symboler</u>
	Συμβουλευτείτε τις οδηγίες χρήσης	Læs brugsvejledningen
	Θερμοκρασία αποθήκευσης	Opbevaringstemperatur
	Ημερομηνία λήξης	Anvend inden
	Αριθμός παρτίδας	Batchkode
	Αριθμός καταλόγου	Katalognummer
	Πρότυπο ελέγχου	Kontrol
	In Vitro Διαγνωστικό Ιατροτεχνολογικό προϊόν	Medicinsk udstyr til in vitro-diagnosticering
	Κατασκευαστής	Fabrikant
	Περιεχόμενο επαρκές για «n» εξετάσεις	Indeholder nok til <n> test
	Συμπυκνωμένο διάλυμα έκπλυσης	Koncentreret vaskeopløsning
	Μηδενικός βαθμονομητής	Nul-kalibrator
	Βαθμονομητής #	Kalibrator nr.
	Ορός ελέγχου #	Kontrol nr.
	Ιχνηθέτης	Markør
	Ιχνηθέτης	Markør
	Χρωμογόνος Ιχνηθέτης	Koncentreret markør
	Χρωμογόνος Ιχνηθέτης	Koncentreret markør
	Σοληνάρια	Tuber
	Ρυθμιστικό διάλυμα επώασης	Inkubationsbuffer
	Ακετονιτρίλιο	Acetonitril
	Ορός	Serum
	Διάλυμα αραίωσης δειγμάτων	Prøvediluent
	Ρυθμιστικό διάλυμα αραίωσης	Fortyndingsbuffer
	Αντιορός	Antiserum
	Ανοσοπροσροφητικό	Immonoadsorbent
	Αραιωτικό βαθμονομητών	Kalibratordiluent
	Διάλυμα ανασύστασης	Rekonstitueringsopløsning
	Πολυαιθυλενογλυκόλη	Polyetylglykol
	Διάλυμα εκχύλισης	Ekstraktionsopløsning
	Διάλυμα έκλουσης	Elueringsopløsning
	Φύσιγγες πυριτίου Bond Elut	Patroner med bindingselueringssilica
	Διάλυμα προεπεξεργασίας	Forbehandlingsopløsning
	Διάλυμα εξουδετέρωσης	Neutraliseringsopløsning
	Ρυθμιστικό διάλυμα	Markørbuffer
	Πλάκα μικροτιτλοδότησης	Mikrotiterplade
	HRP Σύζευγμα	HRP-konjugat
	HRP Σύζευγμα	HRP-konjugat
	Χρωμογόνος HRP Σύζευγμα	HRP-konjugat-koncentreret
	Χρωμογόνος HRP Σύζευγμα	HRP-konjugat-koncentreret
	Ρυθμιστικό διάλυμα συζεύγματος	Konjugatbuffer
	Χρωμογόνος TMB	Kromogen TMB-koncentreret
	Διάλυμα χρωμογόνου TMB	Kromogen TMB-opløsning
	Ρυθμιστικό διάλυμα υποστρώματος	Substratbuffer
	Ανασχετικό αντιδραστήριο	Stopopløsning
	Ορός επώασης	Inkubationsserum
	Ρυθμιστικό διάλυμα	Buffer
	AP Σύζευγμα	AP-konjugat
	PNPP υποστρώματος	Substrat PNPP
	Συμπυκνωμένο αντιδραστήριο συζευγμένο με βιοτίνη	Biotin konjugat koncentrat
	Συμπυκνωμένο διάλυμα αβιδίνης-HRP	Avidin HRP koncentrat
	Ρυθμιστικό διάλυμα προσδιορισμού	Prøvebuffer
	αντιδραστήριο συζευγμένο με βιοτίνη	Biotin konjugat
	Ειδικό Αντίσωμα	-
	Συμπυκνωμένη στρεπταβιδίνη συνεξευγμένη με HRP	-
	μη-ειδική δέσμευση	-
	2ο Αντίσωμα	-
	Ρυθμιστικό Διάλυμα όξινο	-

	<u>Stosowane symbole</u>	<u>Használt szimbólumok</u>
	Przed zastosowaniem zapoznać się z instrukcją	Olvassa el a használati útmutatót
	Temperatura przechowywania	Tárolási hőmérséklet
	Zużyć przed	Lejáratí idő
	Kod serii	Gyártási kód
	Numer katalogowy	Katalógus szám
	Kontrola	Kontrol
	Urządzenie medyczne do diagnostyki in vitro	In vitro diagnosztikai eszköz
	Producent	Gyártó
	Zawartość wystarczająca do <n> testów	Tartalma <n> teszt elvégzésére elegendő
	Roztwór płuczący stężony	Mosó folyadék koncentrátum
	Kalibrator zerowy	Zero kalibrátor
	Kalibrator nr	Kalibrátor #
	Kontrola nr	Kontrol #
	Znacznik izotopowy	Nyomjelző izotóp
	Znacznik izotopowy	Nyomjelző izotóp
	Znacznik izotopowy stężony	Nyomjelző izotóp koncentrátum
	Znacznik izotopowy stężony	Nyomjelző izotóp koncentrátum
	Probówki	Csővek
	Wymagana inkubacja buforu	Inkubáló puffer
	Acetonitryl	Acetonitril
	Surowica	Szérum
	Rozcieńczalnik próbki	Mintahígító
	Bufor do rozcieńczania	Hígító puffer
	Antysurowica	Antiszérum
	Immunoabsorbent	Immunadszorbens
	Rozcieńczalnik kalibratora	Kalibrátor hígító
	Roztwór do rozcieńczania	Mintaelőkészítő oldat
	Glikol poli(oksy)etylenowy	Polietilén glikol
	Roztwór ekstrakcyjny	Extrakciós oldat
	Roztwór elucyjny	Eluáló oldat
	Kolumny krzemionkowe Bond Elut	Bond Elut Silica szilikagél patronok
	Roztwór do przygotowania wstępnego	Előkezelő oldat
	Roztwór neutralizujący	Semlegesítő oldat
	Bufor znacznika	Nyomjelző izotóp hígító puffer
	mikro płytki	Mikrotiter lemez
	Koniugat peroksydazy chrzanowej	HRP konjugátum
	Koniugat peroksydazy chrzanowej	HRP konjugátum
	Koncentrat koniugatu peroksydazy chrzanowej	HRP konjugátum koncentrátum
	Koncentrat koniugatu peroksydazy chrzanowej	HRP konjugátum koncentrátum
	Bufor do koniugacji	Konjugátum puffer
	Koncentrat chromogenu TMB (czterometylobenzodyny)	Kromogén TMB koncentrátum
	Roztwór chromogenu TMB (czterometylobenzodyny)	Kromogén TMB oldat
	Bufor substratu	Szubsztrát puffer
	Roztwór zatrzymujący reakcję	Stop oldat
	Wymagana inkubacja surowicy	Inkubációs szérum
	Bufor	Puffer
	Koniugat AP (fosfatazy alkalicznej)	AP konjugátum
	p-nitrofenylofosforan substratowy	Szubsztrát PNPP
	Koncentrat koniugatu biotyny	Biotin konjugátum koncentrátum
	Koncentrat peroksydazy chrzanowej z awidyną	Avidin HRP koncentrátum
	Bufor do oznaczania	Vizsgálati puffer
	Koniugatu biotyny	Biotin konjugátum
	Przeciwciało swoiste	Specifikus ellenanyag
	Koncentrat streptawidyny HRP	Sztreptawidin HRP koncentrátum
	Wiązanie nieswoiste	Nem-specifikus kötődés
	Drugie przeciwciało	Másodlagos ellenanyag
	Bufor zakwaszający	Savas puffer

	<u>Използвани символи</u>
	Вижте инструкцията за работа
	Температура на съхранение
	Използвайте с
LOT	Партиден код
REF	Каталожен номер
CONTROL	Контрол
IVD	Ин витро диагностично медицинско изделие
	Производител
	Съдържание достатъчно за <n> теста
WASH SOLN CONC	Концентриран измиващ разтвор
CAL 0	Нулев калибратор
CAL N	Калибратор #
CONTROL N	Контрол #
Ag 125I	Трейсър
Ab 125I	Трейсър
Ag 125I CONC	Концентриран маркер
Ab 125I CONC	Концентриран маркер
	Епруветки
INC BUF	Инкубационен буфер
ACETONITRILE	Ацетонитрил
SERUM	Серум
DIL SPE	Разредител за пробите
DIL BUF	Буфер за разреждане
ANTISERUM	Антисерум
IMMUNOABSORBENT	Имуноабсорбент
DIL CAL	Разредител за калибратора
REC SOLN	Пресъздаващ разтвор
PEG	Полиетилен гликол
EXTR SOLN	Екстрактов разтвор
ELU SOLN	Разтвор за елюиране
GEL	Силикагелни пълнители
PRE SOLN	Пред-лечебен разтвор
NEUTR SOLN	Неутрализиращ разтвор
TRACEUR BUF	Маркерен буфер
	Микротитърна пластина
Ab HRP	HRP конюгат / Конюгат на хрянова пероксидаза
Ag HRP	HRP конюгат / Конюгат на хрянова пероксидаза
Ab HRP CONC	HRP конюгиран концентрат
Ag HRP CONC	HRP конюгиран концентрат
CONJ BUF	Буфер за конюгата
CHROM TMB CONC	Хромогенен ТМВ концентрат
CHROM TMB	Хромогенен ТМВ разтвор
SUB BUF	Субстратен буфер
STOP SOLN	Стоп разтвор
INC SER	Инкубационен серум
BUF	Буфер
Ab AP	AP конюгат / конюгат на алкална фосфатаза
SUB PNPP	Субстрат PNPP / пара нитрофенил фосфат
BIOT CONJ CONC	Биотин конюгиран концентрат
AVID HRP CONC	Авидин HRP концентрат
ASS BUF	Буфер за пробите
Ab BIOT	Биотин конюгат
Ab	специфично антитяло
SAV HRP CONC	стрептавидин HRP концентрат
NSB	не специфично свързване
2nd Ab	второ антитяло
ACID BUF	киселинизиращ буфер