



Instructions for Use

Human Growth Hormone (HGH) ELISA

IVD

CE

REF EIA-1787

Σ 96



DRG Instruments GmbH, Germany
Frauenbergstraße. 18, D-35039 Marburg
Phone: +49 (0)6421-1700 0, Fax: +49 (0)6421-1700 50
Website: www.drg-diagnostics.de
E-mail: drg@drg-diagnostics.de



DRG International, Inc., USA
841 Mountain Ave., Springfield, NJ 07081
Phone: (973) 564-7555, Fax: (973) 564-7556
Website: www.drg-international.com
E-mail: corp@drg-international.com

***Please use only the valid version of the Instructions for Use provided with the kit.
Verwenden Sie nur die jeweils gültige, im Testkit enthaltene, Gebrauchsanweisung.***

Table of Contents / Inhaltsverzeichnis

1	INTENDED USE.....	2
2	EXPLANATION OF THE TEST.....	2
3	PRINCIPLE OF THE ASSAY	2
4	REAGENTS AND MATERIALS PROVIDED	3
5	MATERIALS REQUIRED BUT NOT PROVIDED.....	3
6	WARNINGS AND PRECAUTIONS	3
7	STORAGE CONDITIONS	3
8	INSTRUMENTATION.....	4
9	SPECIMEN COLLECTION AND PREPARATION.....	4
10	REAGENT PREPARATION	4
11	PROCEDURAL NOTES	4
12	ASSAY PROCEDURE	4
13	CALCULATION OF RESULTS.....	5
14	STANDARDIZATION OF ASSAY.....	5
15	EXAMPLE OF STANDARD CURVE	5
16	EXPECTED VALUES.....	5
17	QUALITY CONTROL	6
18	PERFORMANCE CHARACTERISTICS.....	6
19	LIMITATIONS OF THE PROCEDURE.....	8
1	ZWECKBESTIMMUNG	9
2	ERLÄUTERUNG DES TESTS	9
3	TESTPRINZIP	9
4	IM KIT MITGELIEFERTE MATERIALIEN	10
5	ERFORDERLICHE, ABER NICHT ENTHALTENE MATERIALIEN.....	10
6	WARNUNGEN UND VORSICHTSMAßNAHMEN.....	10
7	LAGERUNG DES KITS	10
8	INSTRUMENTE	11
9	ENTNAHME UND VORBEREITUNG DER PROBEN	11
10	VORBEREITUNG DER REAGENZIEN.....	11
11	ALLGEMEINE HINWEISE ZUR TESTDURCHFÜHRUNG	11
12	TESTDURCHFÜHRUNG	11
13	ERGEBNISERMITTlung	12
14	STANDARDISIERUNG DES TESTS	12
15	BEISPIEL FÜR EINE STANDARDKURVE.....	12
16	ERWARTETE WERTE.....	12
17	QUALITÄTSKONTROLLE.....	13
18	LEISTUNGSMERKMALE	13
19	GRENZEN DES TESTS.....	15
20	REFERENCES / LITERATUR	16
	SYMBOLS USED.....	17

1 INTENDED USE

The HGH ELISA is intended for the quantitative determination of human growth hormone (HGH) concentration in human serum.

The test is useful in the diagnosis and treatment of disorders involving the anterior pituitary gland.

2 EXPLANATION OF THE TEST

Human Growth Hormone (hGH, somatotropin) is a polypeptide secreted by the anterior pituitary. It is 191 amino acids in length, has a molecular mass of approximately 22,000 daltons, and its metabolic effects are primarily anabolic.¹ HGH promotes protein conservation and is engaged in a wide range of mechanisms for protein synthesis. It also enhances glucose transport and facilitates glycogen storage. Its cascade of growth-promoting action is mediated by another family of peptide hormones, the somatomedins.² HGH measurement is primarily of interest in the diagnosis and treatment of various forms of abnormal growth hormone secretion. Disorders caused by hyposecretion include dwarfism and unattained growth potential. Hypersecretion is associated with gigantism and acromegaly.³

Caution must be exercised in the clinical interpretation of growth hormone levels. These vary throughout the day, making it difficult to define a normal range or to judge an individual's status based on a single determination. Many factors are known to influence the rate of growth hormone secretion, including periods of sleep and wakefulness, exercise, stress, hypoglycemia, estrogens, corticosteroids and L-dopa. Because of its similarity to prolactin and placental lactogen, earlier GH immunoassays were often plagued with falsely high values in pregnant and lactating women.^{2,3,6}

Growth hormone-deficient individuals have fasting and resting levels similar to those found in normal individuals. Various challenge tests have therefore been devised to differentiate them. For example, with the onset of deep sleep or after 15 to 20 minutes of vigorous exercise, growth hormone levels normally rise.⁴

Other tests of growth hormone responsiveness are based on the administration of L-dopa, arginine and insulin. Propanolol or estrogen are sometimes given in conjunction with the primary stimulus to accentuate the response.^{4,5}

A small number of dwarfism cases have been documented in which both the basal level of HGH and the responses to challenge testing were normal. Such cases may involve tissue insensitivity to either growth hormone or the somatomedins, or immunoreactive but biologically inactive growth hormone.⁴

The Human Growth Hormone Enzyme Immunoassay provides a rapid, sensitive, and reliable test for GH measurement. There is no cross-reactivity with hCG, TSH, LH, FSH and prolactin.

3 PRINCIPLE OF THE ASSAY

The HGH ELISA is based on the principle of a solid phase enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA). The assay system utilizes a sheep anti-HGH antibody for solid phase (microtiter wells) immobilization and a mouse monoclonal anti-HGH antibody in the antibody-enzyme (horseradish peroxidase) conjugate solution. The test sample is allowed to react simultaneously with the antibodies, resulting in HGH molecules being sandwiched between the solid phase and enzyme-linked antibodies.

After a 45 minute incubation at room temperature, the wells are washed with water to remove unbound labeled antibodies. A solution of TMB is added and incubated for 20 minutes, resulting in the development of a blue color. The color development is stopped with the addition of 1N HCl, and the color is changed to yellow and measured spectrophotometrically at 450 nm. The concentration of HGH is directly proportional to the color intensity of the test sample.

4 REAGENTS AND MATERIALS PROVIDED

1. **Antibody-Coated Wells** (1 plate, 96 wells)
Microtiter wells coated with sheep anti-hGH.
2. **Enzyme Conjugate Reagent** (13 mL)
Contains mouse monoclonal anti-hGH conjugated to horseradish peroxidase.
3. **Reference Standard Set** (1 mL/vial)
Contains 0, 2.5, 5, 10, 25 and 50 ng/mL human growth hormone, ready to use.
4. **TMB Reagent** (1 bottle, 11 mL)
Contains 3, 3', 5, 5' tetramethylbenzidine (TMB) stabilized in buffer solution.
5. **Stop Solution** (1N HCl) (1 bottle, 11 mL)
Contains diluted hydrochloric acid.

5 MATERIALS REQUIRED BUT NOT PROVIDED

- Deionized water
- Precision pipettes: 0.05, 1.0, 0.2, and 1 mL
- Disposable pipette tips
- Microtiter well reader capable of reading abs. at 450 nm.
- Absorbent paper
- Graph paper
- Vortex mixer or equivalent
- Quality control material (e.g., BioRad Lyphochek Control sera)

6 WARNINGS AND PRECAUTIONS

1. **CAUTION:** This kit contains human material. The source material used for manufacture of this kit tested negative for HBsAg, HIV 1/2 and HCV by FDA-approved methods. However, no method can completely assure absence of these agents. Therefore, all human blood products, including serum samples, should be considered potentially infectious. Handling and disposal should be as defined by an appropriate national biohazard safety guideline or regulation, where it exists.
2. Do not use reagents after expiration date and do not mix or use components from kits with different lot numbers.
3. Do not use the reagent when it becomes cloudy or contamination is suspected.
4. Do not use the reagent if the vial is damaged.
5. Replace caps on reagents immediately. Do not switch caps.
6. Each well can be used only once.
7. Do not pipette reagents by mouth.
8. Solutions containing additives or preservatives, such as sodium azide, should not be used in the enzyme reaction.
9. Avoid contact with 1N HCl. It may cause skin irritation and burns. If contact occurs, wash with copious amounts of water and seek medical attention if irritation persists.
10. For in vitro diagnostic use.

7 STORAGE CONDITIONS

1. Store the unopened kit at 2 °C - 8 °C upon receipt and when it is not in use, until the expiration shown on the kit label. Refer to the package label for the expiration date.
2. The opened and used reagents are stable until the expiration date if stored properly at 2 °C - 8 °C.
3. Keep microtiter plate in a sealed bag with desiccant to minimize exposure to damp air.

8 INSTRUMENTATION

A microtiter well reader with a bandwidth of 10 nm or less and an optical density range of 0 to 2 OD or greater at 450 nm wavelength is acceptable for absorbance measurement.

9 SPECIMEN COLLECTION AND PREPARATION

1. Serum should be prepared from a whole blood specimen obtained by acceptable medical techniques. Avoid use of additives. Avoid grossly hemolytic, lipemic, or turbid samples.
2. Specimens should be capped and may be stored for up to 48 hours at 2 °C - 8 °C prior to assaying. Specimens held for a longer time (up to 6 months) should be frozen only once at -20 °C prior to assay. Thawed samples should be inverted several times prior to testing.

10 REAGENT PREPARATION

All reagents should be allowed to reach room temperature (18 °C - 25 °C) before use, and should be mixed by gentle inversion or swirling. Do not induce foaming.

11 PROCEDURAL NOTES

1. Manual Pipetting: It is recommended that no more than 32 wells be used for each assay run. Pipetting of all standards, samples, and controls should be completed within 3 minutes. A multi-channel pipette is recommended.
2. Automated Pipetting: A full plate of 96 wells may be used in each assay run. However, it is recommended that pipetting of all standards, samples, and controls be completed within 3 minutes.
3. All standards, samples, and controls should be run in duplicate concurrently so that all conditions of testing are the same.
4. It is recommended that the wells be read within 15 minutes following addition of Stop Solution.

12 ASSAY PROCEDURE

1. Secure the desired number of coated wells in the holder.
2. Pipette **50 µL** of **standards, specimens, and controls** into appropriate wells.
3. Add **100 µL** of **Enzyme Conjugate Reagent** into each well.
4. Mix thoroughly for 30 seconds.
5. Incubate at **room temperature** (18 °C - 25 °C) for **45 minutes**.
6. Remove the incubation mixture by flicking plate contents into a waste container.
7. Rinse and flick the microtiter wells **5 times** with deionized water.
8. Strike the wells sharply onto absorbent paper or paper towels to remove all residual water droplets.
9. Dispense **100 µL** of **TMB Reagent** into each well. Gently mix for 10 seconds.
10. Incubate at **room temperature, in the dark**, for **20 minutes**.
11. Stop the reaction by adding **100 µL** of **Stop Solution** to each well.
12. Gently mix for 30 seconds. Ensure that all of the blue color changes completely to yellow.
13. Read absorbance at 450 nm with a microtiter plate reader **within 15 minutes**.

13 CALCULATION OF RESULTS

- Calculate the mean absorbance value (OD_{450}) from the duplicate set of reference standards, controls and samples.
- Construct a standard curve by plotting the mean absorbance obtained for each reference standard against its concentration in ng/mL on linear graph paper, with absorbance on the vertical (Y) axis and concentration on the horizontal (X) axis.
- Using the mean absorbance value for each sample, determine the corresponding concentration of HGH in ng/mL from the standard curve. Depending on experience and/or the availability of computer capability, other methods of data reduction may be employed.

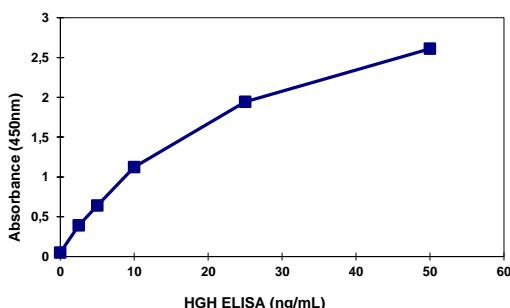
14 STANDARDIZATION OF ASSAY

The HGH Reference Standards are calibrated against the World Health Organization's First International Reference Preparation (WHO 1st IRP 66/217).

15 EXAMPLE OF STANDARD CURVE

Results of a typical standard run with optical density readings at 450 nm shown on the Y-axis against HGH (ng/mL) shown on the X-axis, are presented below. **NOTE:** the standard curve is for illustration only, and should not be used to calculate unknowns.

HGH (ng/mL)	Absorbance (450 nm)
0	0.052
2.5	0.392
5	0.641
10	1.125
25	1.946
50	2.610



16 EXPECTED VALUES

Each laboratory must establish its own normal ranges based on patient population.

A normal range for human growth hormone levels is difficult to define because of the normal physiological fluctuations in HGH concentration.⁶ In most adult subjects at rest, after an overnight fast, the HGH level in serum is 7 ng/mL or less.

Changes in HGH levels in response to various stimuli give a more accurate assessment of pituitary dysfunction.

17 QUALITY CONTROL

Good laboratory practice requires that low, medium and high quality control specimens (controls) be run with each calibration curve to verify assay performance. To assure proper performance, a statistically significant number of controls should be assayed to establish mean values and acceptable ranges.

18 PERFORMANCE CHARACTERISTICS

18.1 Accuracy

A statistical study using patient samples demonstrated good correlation of results with the commercially available kits as shown below:

- a. Comparisons between DRG and DPC kits provide the following data:

N = 134
Correlation coefficient = 0.962
Slope = 1.041
Intercept = 0.115
DRG Mean = 1.780 ng/mL
DPC Mean = 1.970 ng/mL

- b. Comparisons between DRG and Nichols Institute kits provide the following data:

N = 134
Correlation coefficient = 0.985
Slope = 0.860
Intercept = 0.119
DRG Mean = 1.780 ng/mL
Nichols Mean = 1.650 ng/mL

18.2 Sensitivity

The minimal detectable concentration of human growth hormone (HGH) by this assay is estimated to be 0.5 ng/mL.

18.3 Precision

- a. Intra-Assay Precision

Within-run precision was determined by replicate determinations of three different control sera in one assay. Within-assay variability is shown below:

Serum Sample	1	2	3
Number of Replicates	28	28	28
Mean HGH (ng/mL)	6.93	12.92	31.17
Standard Deviation	0.20	0.32	0.67
Coefficient of Variation (%)	2.9%	2.5%	2.2%

- b. Inter-Assay Precision

Between-run precision was determined by replicate measurements of three different control sera in several different assays. Between-assay variability is shown below:

Serum Sample	1	2	3
Number of Replicates	28	28	28
Mean HGH (ng/mL)	6.55	11.90	30.85
Standard Deviation	0.21	0.52	0.91
Coefficient of Variation (%)	3.2%	4.4%	3.0%

18.4 Recovery Studiesa. Recovery

Various patient serum samples of known HGH levels were mixed and assayed in duplicate. The average recovery was 95.8%.

	Expected Concentration (ng/mL)	Observed Concentration (ng/mL)	% Recovery
1.	2.10	2.13	101.4%
	3.17	2.88	90.9%
	3.44	3.51	102.0%
	0.97	10.5	108.2%
	1.57	1.50	95.5%
Average Recovery =			99.6%
2.	3.70	3.16	85.4%
	9.02	8.38	92.9%
	3.74	5.59	96.0%
	4.94	4.41	89.3%
Average Recovery =			90.9%

18.5 Linearity Studiesb. Linearity

Two patient samples were serially diluted with the zero standard in a linearity study. The average recovery was 105.1%.

#	Dilution	Expected Conc. (ng/mL)	Observed Conc. (ng/mL)	% Recovery
1.	Undiluted	--	66.53	--
	1:2	33.27	32.76	98.5
	1:4	13.63	14.37	105.4
	1:8	8.32	8.49	102.0
	1:16	4.16	4.23	101.7
	1:32	2.08	1.92	92.3
Avg. =			100.0%	
2.	Undiluted	--	57.50	--
	1:2	28.75	29.18	101.5
	1:4	14.38	15.00	104.3
	1:8	7.19	7.98	111.0
	1:16	3.59	4.39	122.2
	1:32	1.80	2.01	111.9
Avg. =			110.2%	

18.6 Specificity

The following substances were tested for cross-reactivity:

Hormone Tested	Concentration	Intensity Equivalent to hGH (ng/mL)
HCG (WHO 1 st IRP 75/537)	100 mIU/mL	0
	62,000 mIU/mL	0
	500,000 mIU/mL	0
TSH (WHO 2 nd IRP 80/558)	125 µIU/mL	0
	250 µIU/mL	0
	500 µIU/mL	0
LH (WHO 1 st IRP 68/40)	125 mIU/mL	0
	250 mIU/mL	0
	500 mIU/mL	0
FSH (WHO 2 nd IRP HMG)	125 mIU/mL	0
	250 mIU/mL	0
	500 mIU/mL	0
Prolactin (WHO 1 st IRP 75/504)	50 ng/mL	0
	100 ng/mL	0
	500 ng/mL	0.5

18.7 Hook Effect

No hook effect is observed in this assay at hGH concentrations up to 1,000 ng/mL.

19 LIMITATIONS OF THE PROCEDURE

1. Reliable and reproducible results will be obtained when the assay procedure is carried out with good laboratory practice and adherence to the package insert instructions.
2. For professional use only. The results obtained from the use of this kit should be used only as an adjunct to other diagnostic procedures and information available to the physician.
3. The wash procedure is critical. Insufficient washing will result in poor precision and falsely elevated absorbance readings.
4. If the device fails to perform, use alternative diagnostic procedure or consult manufacturer.

1 ZWECKBESTIMMUNG

Der HGH-ELISA dient der quantitativen Bestimmung der Konzentration des menschlichen Wachstumshormons (HGH) im Humanserum.

Der Test ist nützlich für die Diagnose und Behandlung von Erkrankungen des Hypophysenvorderlappens.

2 ERLÄUTERUNG DES TESTS

Das menschliche Wachstumshormon (hGH, Somatotropin) ist ein Polypeptid, das vom Hypophysenvorderlappen ausgeschüttet wird. Es hat eine Länge von 191 Aminosäuren, eine Molekülmasse von etwa 22.000 Dalton und seine metabolischen Wirkungen sind primär anabol.¹ hGH fördert die Proteinkonservierung und ist an einer Vielzahl von Mechanismen der Proteinsynthese beteiligt. Außerdem verbessert es den Glukosetransport und erleichtert die Glykogenspeicherung. Seine wachstumsfördernde Wirkungskaskade wird durch eine andere Familie von Peptidhormonen, die Somatomedine, vermittelt.² Die Messung von hGH ist in erster Linie für die Diagnose und Behandlung verschiedener Formen einer abnormen Wachstumshormonsekretion von Interesse. Zu den durch Hyposekretion verursachten Störungen gehören Zwergwuchs und unerreichtes Wachstumspotenzial. Eine Hypersekretion wird mit Gigantismus und Akromegalie in Verbindung gebracht.³

Bei der klinischen Interpretation des Wachstumshormonspiegels ist Vorsicht geboten. Diese schwanken im Laufe des Tages, so dass es schwierig ist, einen Normalbereich zu definieren oder den Status einer Person anhand einer einzigen Bestimmung zu beurteilen. Es ist bekannt, dass viele Faktoren die Geschwindigkeit der Wachstumshormonausschüttung beeinflussen, darunter Schlaf- und Wachphasen, Bewegung, Stress, Hypoglykämie, Östrogene, Kortikosteroide und L-Dopa. Aufgrund seiner Ähnlichkeit mit Prolaktin und Plazenta-Laktogen waren frühere GH-Immunoassays bei schwangeren und stillenden Frauen häufig mit falsch hohen Werten behaftet.^{2,3,6}

Bei Personen mit Wachstumshormonmangel sind die Nüchtern- und Ruhewerte ähnlich wie bei normalen Personen. Daher wurden verschiedene Tests entwickelt, um sie voneinander zu unterscheiden. So steigt der Wachstumshormonspiegel bei Beginn des Tiefschlafs oder nach 15 bis 20 Minuten intensiver körperlicher Betätigung normalerweise an.⁴

Andere Tests der Wachstumshormonempfindlichkeit basieren auf der Verabreichung von L-Dopa, Arginin und Insulin. Propanolol oder Östrogen werden manchmal in Verbindung mit dem primären Stimulus verabreicht, um die Reaktion zu verstärken.^{4,5}

Es wurde eine kleine Anzahl von Fällen von Zwergenwuchs dokumentiert, bei denen sowohl der Basalwert von HGH als auch die Reaktionen auf Challenge-Tests normal waren. In solchen Fällen kann es sich um eine Unempfindlichkeit des Gewebes gegenüber dem Wachstumshormon oder den Somatomedinen oder um ein immunreaktives, aber biologisch inaktives Wachstumshormon handeln.⁴

Der ELISA für menschliches Wachstumshormon (HGH) ist ein schneller, empfindlicher und zuverlässiger Test zur Messung von GH. Es gibt keine Kreuzreaktivität mit hCG, TSH, LH, FSH und Prolaktin.

3 TESTPRINZIP

Der HGH-ELISA basiert auf dem Prinzip eines Festphasen-ELISA (enzyme-linked immunosorbent assay). Das Testsystem verwendet einen Anti-HGH-Antikörper vom Schaf für die Festphasenimmobilisierung (Mikrotitervertiefungen) und einen monoklonalen Anti-HGH-Antikörper von der Maus in der Antikörper-Enzym-Konjugatlösung (Meerrettichperoxidase). Die Testprobe reagiert gleichzeitig mit den Antikörpern, so dass die HGH-Moleküle zwischen der festen Phase und den enzymgebundenen Antikörpern eingeschlossen werden.

Nach einer 45-minütigen Inkubation bei Raumtemperatur werden die Vertiefungen mit Wasser gewaschen, um ungebundene markierte Antikörper zu entfernen. Eine TMB-Lösung wird zugegeben und 20 Minuten lang inkubiert, wodurch sich eine blaue Farbe entwickelt. Die Farbentwicklung wird durch Zugabe von 1N HCl gestoppt, die Farbe wechselt zu gelb und wird spektrophotometrisch bei 450 nm gemessen. Die Konzentration von HGH ist direkt proportional zur Farbintensität der Testprobe.

4 IM KIT MITGELIEFERTE MATERIALIEN

1. **Antikörper beschichtete Wells** (1 Platte, 96 Wells)
Mikrotiterplatte beschichtet mit Schaf-anti-hGH.
2. **Enzyme Konjugat Reagenz** (13 mL)
Enthält monoklonales Anti-hGH der Maus, konjugiert mit Meerrettichperoxidase.
3. **Referenz Standards** (1 mL/Fläschchen)
Enthält 0, 2.5, 5, 10, 25 und 50 ng/mL menschliches Wachstumshormon (hGH), gebrauchsfertig.
4. **TMB Reagenz** (1 Flasche, 11 mL)
Enthält 3, 3', 5, 5' tetramethylbenzidine (TMB) stabilisiert in Pufferlösung.
5. **Stop Lösung** (1N HCl) (1 Flasche, 11 mL)
Enthält verdünnte Salzsäure.

5 ERFORDERLICHE, ABER NICHT ENTHALTENE MATERIALIEN

- Aqua dest.
- Kalibrierte variable Präzisions-Mikropipetten: 0.05, 1.0, 0.2, und 1 mL
- Einwegpipettenspitzen
- Kalibriertes Mikrotiterplattenlesegerät mit 450 ± 10 nm Filter.
- Saugfähiges Papier
- Millimeterpapier
- Vortex Schüttler
- Qualitätskontrollmaterial (z.B., BioRad Lyphochek Kontrollserum)

6 WARNUNGEN UND VORSICHTSMAßNAHMEN

1. **VORSICHT:** Dieser Kit enthält menschliches Material. Das für die Herstellung dieses Kits verwendete Ausgangsmaterial wurde mit FDA-zugelassenen Methoden negativ auf HBsAg, HIV 1/2 und HCV getestet. Keine Methode kann jedoch eine vollständige Abwesenheit dieser Erreger gewährleisten. Daher sollten alle menschlichen Blutprodukte, einschließlich Serumproben, als potenziell infektiös betrachtet werden. Die Handhabung und Entsorgung sollte gemäß den entsprechenden nationalen Sicherheitsrichtlinien oder -vorschriften für Biogefährdung erfolgen, sofern diese existieren.
2. Reagenzien nicht nach Ablauf des Verfallsdatums verwenden und keine Komponenten aus Kits mit unterschiedlichen Chargennummern mischen oder verwenden.
3. Verwenden Sie das Reagenz nicht, wenn es trübe wird oder der Verdacht auf eine Verunreinigung besteht.
4. Verwenden Sie das Reagenz nicht, wenn das Fläschchen beschädigt ist.
5. Verschlüsse der Reagenzien sofort wieder aufsetzen. Kappen nicht vertauschen.
6. Jede Vertiefung kann nur einmal verwendet werden.
7. Reagenzien nicht mit dem Mund pipettieren.
8. Lösungen, die Zusatzstoffe oder Konservierungsmittel wie Natriumazid enthalten, sollten nicht für die Enzymreaktion verwendet werden.
9. Vermeiden Sie den Kontakt mit 1N HCl. Sie kann Hautreizungen und Verbrennungen verursachen. Bei Kontakt mit der Haut ist diese mit reichlich Wasser zu waschen und bei anhaltender Reizung ein Arzt aufzusuchen.
10. Zur Verwendung in der In-vitro-Diagnostik.

7 LAGERUNG DES KITS

1. Lagern Sie das ungeöffnete Kit nach Erhalt und bei Nichtgebrauch bis zu dem auf dem Kit-Etikett angegebenen Verfallsdatum bei 2°C bis 8°C . Das Verfallsdatum ist auf dem Verpackungsetikett angegeben.
2. Die geöffneten und verwendeten Reagenzien sind bei sachgemäßer Lagerung bei 2°C bis 8°C bis zum Verfallsdatum haltbar.
3. Bewahren Sie die Mikrotiterplatte in einem versiegelten Beutel mit Trockenmittel auf, um die Exposition gegenüber Luftfeuchtigkeit zu minimieren.

8 INSTRUMENTE

Für die Absorptionsmessung ist ein Mikrotiterplatten-Lesegerät mit einer Bandbreite von 10 nm oder weniger und einem optischen Dichtebereich von 0 bis 2 OD oder mehr bei einer Wellenlänge von 450 nm akzeptabel.

9 ENTNAHME UND VORBEREITUNG DER PROBEN

1. Das Serum sollte aus einer Vollblutprobe hergestellt werden, die mit akzeptablen medizinischen Verfahren gewonnen wurde. Die Verwendung von Zusatzstoffen ist zu vermeiden. Grob hämolytische, lipämische oder trübe Proben sind zu vermeiden.
2. Die Proben sollten verschlossen werden und können vor der Untersuchung bis zu 48 Stunden bei 2 °C bis 8 °C gelagert werden. Proben, die länger aufbewahrt werden (bis zu 6 Monate), sollten vor der Untersuchung nur einmal bei -20 °C eingefroren werden. Aufgetauten Proben sollten vor dem Test mehrmals durchgemengt werden.

10 VORBEREITUNG DER REAGENZIEN

Alle Reagenzien sollten vor der Verwendung Raumtemperatur (18 °C bis 25 °C) erreicht haben und durch leichtes Umdrehen oder Schwenken gemischt werden. Es darf keine Schaumbildung verursacht werden.

11 ALLGEMEINE HINWEISE ZUR TESTDURCHFÜHRUNG

1. Manuelles Pipettieren: Es wird empfohlen, nicht mehr als 32 Vertiefungen für jeden Testlauf zu verwenden. Das Pipettieren aller Standards, Proben und Kontrollen sollte innerhalb von 3 Minuten abgeschlossen sein. Es wird eine Mehrkanalpipette empfohlen.
2. Automatisches Pipettieren: Für jeden Testdurchlauf kann eine vollständige Platte mit 96 Kavitäten verwendet werden. Es wird jedoch empfohlen, dass das Pipettieren aller Standards, Proben und Kontrollen innerhalb von 3 Minuten abgeschlossen ist.
3. Alle Standards, Proben und Kontrollen sollten gleichzeitig in doppelter Ausführung durchgeführt werden, damit alle Testbedingungen gleich sind.
4. Es wird empfohlen, dass die Vertiefungen innerhalb von 15 Minuten nach Zugabe der Stopplösung abgelesen werden.

12 TESTDURCHFÜHRUNG

1. Die gewünschte Anzahl von beschichteten Vertiefungen im Halter befestigen.
2. Pipettieren Sie **50 µL der Standards, Proben und Kontrollen** in die entsprechenden Mikrotitervertiefungen.
3. Geben Sie **100 µL des Enzymkonjugat-Reagenzes** in jede Vertiefung.
4. 30 Sekunden lang gründlich mischen.
5. Bei **Raumtemperatur** (18 °C bis 25 °C) **45 Minuten** lang inkubieren.
6. Die inkubierte Mischung entfernen, indem der Platteninhalt in einen Abfallbehälter geschleudert wird.
7. Die Mikrotitervertiefungen **5-mal** mit deionisiertem Wasser spülen und ausschwenken.
8. Schlagen Sie die Vertiefungen kräftig auf saugfähigem Papier oder Papiertüchern aus, um alle restlichen Wassertröpfchen zu entfernen.
9. Geben Sie **100 µL des TMB-Reagenzes** in jede Vertiefung. Vorsichtig 10 Sekunden lang mischen.
10. Bei **Raumtemperatur** und im **Dunkeln 20 Minuten** lang inkubieren.
11. Stoppen Sie die Reaktion durch Zugabe von **100 µL Stopplösung** in jede Vertiefung.
12. Vorsichtig 30 Sekunden lang mischen. Vergewissern Sie sich, dass die blaue Farbe vollständig in Gelb übergeht.
13. Die Absorption bei 450 nm **innerhalb von 15 Minuten** mit einem Mikrotiterplatten-Lesegerät ablesen.

13 ERGEBNISERMITTLUNG

1. Berechnen Sie den mittleren Absorptionswert (OD_{450}) aus den Doppelbestimmungen der Referenzstandards, Kontrollen und Proben.
2. Erstellen Sie eine Standardkurve, indem Sie die mittlere Absorption für jeden Referenzstandard gegen seine Konzentration in ng/ml auf linearem Millimeterpapier auftragen, wobei die Absorption auf der vertikalen (Y-) Achse und die Konzentration auf der horizontalen (X-) Achse liegt.
3. Bestimmen Sie anhand des mittleren Absorptionswertes für jede Probe die entsprechende HGH-Konzentration in ng/ml aus der Standardkurve. Je nach Erfahrung und/oder Verfügbarkeit von Computerkapazitäten können auch andere Methoden der Datenreduktion angewandt werden.

14 STANDARDISIERUNG DES TESTS

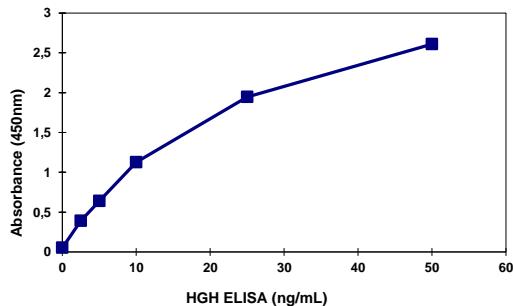
Die HGH-Referenzstandards werden anhand des ersten internationalen Referenzpräparats der Weltgesundheitsorganisation (WHO 1st IRP 66/217) kalibriert.

15 BEISPIEL FÜR EINE STANDARDKURVE

Nachfolgend sind die Ergebnisse eines typischen Standardlaufs dargestellt, bei dem die optische Dichte bei 450 nm auf der Y-Achse gegen HGH (ng/ml) auf der X-Achse aufgetragen ist.

HINWEIS: Die Standardkurve dient nur zur Veranschaulichung und sollte nicht zur Berechnung unbekannter Werte verwendet werden.

HGH (ng/mL)	Absorption (450 nm)
0	0,052
2,5	0,392
5	0,641
10	1,125
25	1,946
50	2,610



16 ERWARTETE WERTE

Jedes Labor muss seine eigenen Normalbereiche auf der Grundlage der Patientenpopulation festlegen.

Ein Normalbereich für den menschlichen Wachstumshormonspiegel ist aufgrund der normalen physiologischen Schwankungen der HGH-Konzentration schwer zu definieren.⁶ Bei den meisten erwachsenen Personen liegt der HGH-Spiegel im Serum in Ruhe, nach einer nächtlichen Nüchternheit, bei 7 ng/ml oder weniger.

Veränderungen des HGH-Spiegels als Reaktion auf verschiedene Reize ermöglichen eine genauere Beurteilung der Hypophysenfunktionsstörung.

17 QUALITÄTSKONTROLLE

Die gute Laborpraxis erfordert, dass mit jeder Kalibrierungskurve Kontrollproben von niedriger, mittlerer und hoher Qualität (Kontrollen) durchgeführt werden, um die Leistungsfähigkeit des Assays zu überprüfen. Um eine ordnungsgemäße Leistung zu gewährleisten, sollte eine statistisch signifikante Anzahl von Kontrollen untersucht werden, um Mittelwerte und akzeptable Bereiche zu ermitteln.

18 LEISTUNGSMERKMALE

18.1 Genauigkeit

Eine statistische Studie mit Patientenproben zeigte eine gute Korrelation der Ergebnisse mit den im Handel erhältlichen Kits (siehe unten):

- a. Vergleiche zwischen DRG- und DPC-Kits liefern die folgenden Daten:

N = 134

Korrelation coefficient = 0,962

Steigung = 1,041

Achsenabschnitt = 0,115

DRG-Mittelwert = 1,780 ng/mL

DPC-Mittelwert = 1,970 ng/mL

- b. Vergleiche zwischen DRG und Nichols Institute Kits liefern die folgenden Daten:

N = 134

Korrelation coefficient = 0,985

Steigung = 0,860

Achsenabschnitt = 0,119

DRG-Mittelwert = 1,780 ng/mL

Nichols Institute-Mittelwert = 1,650 ng/mL

18.2 Sensitivität

Die mit diesem Test minimal nachweisbare Konzentration von menschlichem Wachstumshormon (HGH) wird auf 0,5 ng/ml geschätzt.

18.3 Präzision

- a. Intra-Assay Präzision

Die Präzision innerhalb der Testreihe wurde durch Wiederholungsbestimmungen von drei verschiedenen Kontrollseren in einem Assay bestimmt. Die Variabilität innerhalb des Assays ist unten dargestellt:

Serum Probe	1	2	3
n	28	28	28
Mittelwert HGH (ng/mL)	6,93	12,92	31,17
Standardabweichung	0,20	0,32	0,67
Variationskoeffizient (%)	2,9 %	2,5 %	2,2 %

- b. Inter-Assay Präzision

Die Präzision zwischen den Testdurchläufen wurde durch Wiederholungsmessungen von drei verschiedenen Kontrollseren in mehreren verschiedenen Assays bestimmt. Die Variabilität zwischen den Assays ist unten dargestellt:

Serum Probe	1	2	3
n	28	28	28
Mittelwert HGH (ng/mL)	6,55	11,90	30,85
Standardabweichung	0,21	0,52	0,91
Variationskoeffizient (%)	3,2 %	4,4 %	3,0 %

18.4 Wiederfindunga. Wiederfindung

Verschiedene Patientenserumproben mit bekannten HGH-Werten wurden gemischt und in Doppelbestimmung untersucht. Die durchschnittliche Wiederfindung betrug 95,8 %.

	Erwartete Konzentration (ng/mL)	Gemessene Konzentration (ng/mL)	% Wiederfindung
1.	2,10	2,13	101,4%
	3,17	2,88	90,9%
	3,44	3,51	102,0%
	0,97	10,5	108,2%
	1,57	1,50	95,5%
Durchschnittliche Wiederfindung =			99,6%
2.	3,70	3,16	85,4%
	9,02	8,38	92,9%
	3,74	5,59	96,0%
	4,94	4,41	89,3%
Durchschnittliche Wiederfindung =			90,9%

18.5 Linearitätb. Linearität

Zwei Patientenproben wurden in einer Linearitätsstudie seriell mit dem Nullstandard verdünnt. Die durchschnittliche Wiederfindung betrug 105,1 %.

#	Verdünnung	Erwartete Konzentration (ng/mL)	Gemessene Konzentration (ng/mL)	% Wiederfindung
1.	Unverdünnt	--	66,53	--
	1:2	33,27	32,76	98,5
	1:4	13,63	14,37	105,4
	1:8	8,32	8,49	102,0
	1:16	4,16	4,23	101,7
	1:32	2,08	1,92	92,3
Durchschnitt =			100,0%	
2.	Unverdünnt	--	57,50	--
	1:2	28,75	29,18	101,5
	1:4	14,38	15,00	104,3
	1:8	7,19	7,98	111,0
	1:16	3,59	4,39	122,2
	1:32	1,80	2,01	111,9
Durchschnitt =			110,2%	

18.6 Spezifität (Kreuzreaktivität)

Die folgenden Substanzen wurden auf Kreuzreaktivität getestet:

Getestetes Hormon	Konzentration	Kreuzreaktion zu hGH (ng/mL)
HCG (WHO 1 st IRP 75/537)	100 mIU/mL	0
	62.000 mIU/mL	0
	500.000 mIU/mL	0
TSH (WHO 2 nd IRP 80/558)	125 µIU/mL	0
	250 µIU/mL	0
	500 µIU/mL	0
LH (WHO 1 st IRP 68/40)	125 mIU/mL	0
	250 mIU/mL	0
	500 mIU/mL	0
FSH (WHO 2 nd IRP HMG)	125 mIU/mL	0
	250 mIU/mL	0
	500 mIU/mL	0
Prolactin (WHO 1 st IRP 75/504)	50 ng/mL	0
	100 ng/mL	0
	500 ng/mL	0.5

18.7 High-Dose-Hook Effekt

Bei diesem Test wird bei hGH-Konzentrationen von bis zu 1.000 ng/ml kein Hook-Effekt beobachtet.

19 GRENZEN DES TESTS

- Zuverlässige und reproduzierbare Ergebnisse werden erzielt, wenn das Testverfahren nach guter Laborpraxis und unter Beachtung der Anweisungen auf der Packungsbeilage durchgeführt wird.
- Nur für den professionellen Gebrauch. Die mit diesem Kit erzielten Ergebnisse sollten nur als Ergänzung zu anderen diagnostischen Verfahren und Informationen, die dem Arzt zur Verfügung stehen, verwendet werden.
- Das Waschverfahren ist entscheidend. Unzureichendes Waschen führt zu ungenauer Präzision und falsch erhöhten Absorptionsmesswerten.
- Wenn das Kit nicht funktioniert, verwenden Sie ein anderes Diagnoseverfahren oder wenden Sie sich an den Hersteller.

20 REFERENCES / LITERATUR

1. Van Wyk, J.J. and Underwood, L.E. Growth Hormone Somatomedins and Growth Failure. Hospital Practice, 13:57; 1978.
2. Fisher, D.A., Evaluation of Anterior Pituitary Function in: Radioimmunoassay Manual. Ed. Nicholas, A.L. and Nelson, J.C.P. 3498 Nichols Institute, 1977.
3. Goldfine, I.D., Medical Treatment of Acromegaly. Annual Review of Medicine. 29:407; 1978.
4. Reichlin, S. et al. Hypothalamic Hormones. Annual Review of Medicine. 27:359; 1976.
5. Rimoin, D.L. and Horton, W.A. Short Stature. J. Pediatrics. 92:523; 1978.
6. Reiter, E., et. at., Variable estimates of serum growth hormone concentrations by different radioassay systems. J. Clin Endocrin. Metab., 66:68; 1988.
7. USA Center for Disease Control/National Institute of Health Manual, "Biosafety in Microbiological and Biomedical Laboratories", 1984.

SYMBOLS USED

Symbol	English	Deutsch	Italiano	Español	Français
	European Conformity	CE-Konformitäts-kennzeichnung	Conformità europea	Conformidad europea	Conformité normes européennes
	Consult instructions for use *	Gebrauchsanweisung beachten *	Consultare le istruzioni per l'uso	Consulte las instrucciones de uso	Consulter les instructions d'utilisation
	In vitro diagnostic medical device *	In-vitro-Diagnostikum *	Dispositivo medico-diagnóstico in vitro	Producto sanitario para diagnóstico in vitro	Dispositif médical de diagnostic in vitro
	Catalogue number *	Artikelnummer *	No. di Cat.	No de catálogo	Référence
	Batch code *	Fertigungslosnummer, Charge *	Lotto no	Número de lote	No. de lot
	Contains sufficient for <n> tests *	Ausreichend für <n> Prüfungen *	Contenuto sufficiente per "n" saggi	Contenido suficiente para <n> ensayos	Contenu suffisant pour "n" tests
	Temperature limit *	Temperaturbegrenzung *	Temperatura di conservazione	Temperatura de conservación	Température de conservation
	Use-by date *	Verwendbar bis *	Data di scadenza	Fecha de caducidad	Date limite d'utilisation
	Manufacturer *	Hersteller *	Fabbricante	Fabricante	Fabricant
	Distributed by	Vertreiber	Distributore	Distribuidor	Distributeur
	Biological risks *	Biologische Risiken *	Rischi biologici	Riesgos biológicos	Risques biologiques
	Caution *	Achtung *	Attenzione	Precaución	Attention
RUO	For research use only	Nur für Forschungszwecke	Solo a scopo di ricerca	Sólo para uso en investigación	Seulement dans le cadre de recherches
<i>Content</i>	Content	Inhalt	Contenuto	Contenido	Conditionnement
<i>Volume/No.</i>	Volume / No.	Volumen / Anzahl	Volume / Quantità	Volumen / Número	Volume / Quantité
<i>Microtiterwells</i>	Microtiterwells	Mikrotiterwells	Micropozzetti	Placas multipocillo	Microplaques
<i>Antiserum</i>	Antiserum	Antiserum	Antisiero	Antisuero	Antisérum
<i>Enzyme Conjugate</i>	Enzyme Conjugate	Enzymkonjugat	Tracciante enzimatico	Conjugado enzimático	Conjugué enzymatique
<i>Enzyme Complex</i>	Enzyme Complex	Enzymkomplex	Complesso enzimatico	Complejo enzimático	Complexe enzymatique
<i>Substrate Solution</i>	Substrate Solution	Substratlösung	Soluzione di substrato	Solución de sustrato	Solution substrat
<i>Stop Solution</i>	Stop Solution	Stoplösung	Soluzione d'arresto	Solución de parada	Solution d'arrêt
<i>Zero Standard</i>	Zero Standard	Nullstandard	Standard zero	Estándar cero	Zero Standard
<i>Standard</i>	Standard	Standard	Standard	Estándar	Standard
<i>Control</i>	Control	Kontrolle	Controllo	Control	Contrôle
<i>Assay Buffer</i>	Assay Buffer	Assaypuffer	Tampone del test	Tampón de ensayo	Tampon d'essai
<i>Wash Solution</i>	Wash Solution	Waschlösung	Soluzione di lavaggio	Solución de lavado	Solution de lavage
<i>1N NaOH</i>	1N NaOH	1N NaOH	1N NaOH (idrossido di sodio 1N)	1N NaOH	1N NaOH
<i>1 N HCl</i>	1 N HCl	1 N HCl		1 N HCl	1N HCl
<i>Sample Diluent</i>	Sample Diluent	Probenverdünnungs-medium	Diluente dei campioni	Solución para dilución de la muestra	Solution pour dilution de l'échantillon
<i>Conjugate Diluent</i>	Conjugate Diluent	Konjugatverdünnungs-medium	Diluente del tracciante	Solución para dilución del conjugado	Solution pour dilution du conjugué