



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 du Bosquet, 2, B-1348 Louvain-la-Neuve, Belgium.

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

III. CLINICAL BACKGROUND

A. Biological activities

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

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

B. Clinical application

- **Growth retardation**

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

- **Hypopituitarism**

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

- **Gigantism and acromegaly**

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

IV. PRINCIPLES OF THE METHOD

The DIIAsource 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 1 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 1 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

- A. Calibrators :** Reconstitute the zero calibrator with 2.0 ml distilled water and the other calibrators with 1 ml distilled water.
- B. Controls :** Reconstitute the controls with 1 ml distilled water.
- C. 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.
- D. 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

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

B. Procedure

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

XI. CALCULATION OF RESULTS

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

XII. TYPICAL DATA

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

hGH-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 : 120315/1
-------------------------------------	-----------------------------	---------------------------

Revision date : 2012-03-15

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 du Bosquet, 2, B-1348 Louvain-la-Neuve, Belgium.

Pour une assistance technique ou une information sur une commande :

Tel : +32 (0)10 84.99.11

Fax : +32 (0)10 84.99.91

III. CONTEXTE CLINIQUE

A. Activités biologiques

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

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

B. Application clinique

• Retard de croissance

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

• Hypopituitarisme

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

• Gigantisme et acromégalie

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

IV. PRINCIPES DU DOSAGE

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

VIII. STOCKAGE ET DATE D’EXPIRATION DES REACTIFS

- Avant l’ouverture ou la reconstitution, tous les composants de la trousse sont stables jusqu’à la date d’expiration, indiquée sur l’étiquette, si la trousse est conservée entre 2 et 8°C.
- Des barrettes inutilisées doivent être gardées, à 2-8°C, dans un sachet cacheté contenant un 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.

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

XI. CALCUL DES RESULTATS

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

XII. DONNEES TYPES

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

hGH-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 dilué 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 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. 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 : 120315/2
-------------------------------------	-----------------------------	---------------------------

Date de révision : 2015-07-06

Vor Gebrauch des Kits lesen Sie bitte diese Packungsbeilage.

hGH-EASIA

I. VERWENDUNGSZWECK

Ein immunenzymatisches 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 du Bosquet, 2, B-1348 Louvain-la-Neuve, Belgien.

Für technische Unterstützung oder Bestellungen wenden Sie sich bitte an:

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

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

E-mail Ordering : ordering@diasource.be

III. KLINISCHER HINTERGRUND

A. Biologische Aktivität

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

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

B. Klinische Anwendung

· **Minderwuchs**

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

· **Hypopituitarismus**

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

· **Gigantismus und Akromegalie**

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

IV. GRUNDSÄTZLICHES ZUR DURCHFÜHRUNG

Der DIASource hGH-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	1 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	1 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:

1. Hochwertiges destilliertes Wasser
2. Pipetten: 50 µl, 200 µl, 500 µl und 2 ml (Verwendung von Präzisionspipetten mit Einwegplastikspitzen wird empfohlen)
3. Vortex Mixer
4. Magnetrührer
5. Waschgerät für Mikrotiterplatten
6. 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 1 ml dest. Wasser.
- B. **Kontrollen:** Rekonstituieren Sie die Kontrollen mit 1 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	Beipackzettelnnummer: 1700573/de	Nummer der Originalausgabe: 120315/1

Revisionsdatum : 2012-03-15

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 du Bosquet, 2, B-1348 Louvain-la-Neuve, Belgio.

Per informazioni tecniche o su come ordinare il prodotto contattare:

Tel: +32 (0) 10 84.99.11

Fax: +32 (0) 10 84.99.91

III. INFORMAZIONI CLINICHE

A. Attività biologiche

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

B. Applicazione clinica

Ritardo nella crescita

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

Ipopituitarismo

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

Gigantismo e acromegalia

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

IV. PRINCIPIO DEL METODO

DIAsource hGH-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
Ab HRP CONC Coniugato: marcato HRP anti-hGH (Anticorpi monoclonali) in tampone stabilizzante	1 flacone 0,2 ml	Giallo	Diluire 40 x con tampone del coniugato
CONJ BUF Tampone del coniugato: tampone TRIS-HCl con albumina di siero bovino e timolo	1 flacone 6 ml	Rosso	Pronto per l’uso
CAL 0 Calibratore zero in siero di pecora e timolo.	1 flacone liofiliz.	Giallo	Aggiungere 2,0 ml di acqua distillata
CAL N Calibratore 1-5 (le concentrazioni esatte degli calibratore sono riportate sulle etichette dei flaconi), in siero di pecora e timolo.	5 flaconi liofiliz.	Giallo	Aggiungere 1 ml di acqua distillata
WASH SOLN CONC Tampone di lavaggio (TRIS HCl)	1 flacone 10 ml	Bruno	Diluire 200 x con acqua distillata usando un agitatore magnetico)..
CONTROL N Controlli: N = 1 o 2, in siero umano con timolo	2 flaconi liofiliz.	Argento	Aggiungere 1 ml di acqua distillata
CHROM TMB Soluzione Cromogena TMB (tetrametilbenzidina)	1 flacone 12 ml	Bruno	Pronto per l’uso
STOP SOLN Soluzione di arresto: HCl 1N	1 flacone 12 ml	bianco	Pronto per l’uso

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

VIII. CONSERVAZIONE E SCADENZA DEI REATTIVI

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

IX. RACCOLTA E PREPARAZIONE DEI CAMPIONI

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

Y(siero) = 0.89 x (plasma EDTA) + 0.14 µIU/ml

r=0.98 n=46

Y(siero) = 1.02 x (plasma eparinato) + 0.01 µIU/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 OD dei replicati degli standard e in ascissa le rispettive concentrazioni di hGH, collegando i punti tracciati con linee rette.
4. Determinare le concentrazioni e controlli per interpolazione sulla curva di taratura.
5. E’ possibile utilizzare un sistema di interpolazione dati automatizzato. Con un sistema automatico di interpolazione dati, utilizzare la curva a 4 parametri.

XII. CARATTERISTICHE TIPICHE

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

hGH-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 azide 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: 120315/2
--	----------------------------	-------------------------------

Data di revisione : 2015-07-06

Lea todo el protocolo antes de utilizar.

hGH-EASIA

I. INSTRUCCIONES DE USO

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

II. INFORMACIÓN GENERAL

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

Para cuestiones técnicas y información sobre pedidos contactar :

Tel : +32 (0)10 84.99.11

Fax : +32 (0)10 84.99.91

III. INFORMACIÓN CLÍNICA

A. Actividades biológicas

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

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

B. Aplicación clínica

• Retardo en el crecimiento

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

• Insuficiencia adenohipofisiaria

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

• Gigantismo y acromegalia

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

IV. PRINCIPIOS DEL MÉTODO

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

V. REACTIVOS SUMINISTRADOS

Reactivos			Kit de 96 pruebas	Código de colores	Reconstitución
 Microplaca desprendible con 96 pocillos recubiertos con anti hGH (anticuerpos monoclonales)			96 pocillos	azul	Listo para usar
Ab HRP CONC Conjugado: anti hGH marcado con HRP (anticuerpos monoclonales) en tampón estabilizante			1 vial 0,2 ml	amarillo	Diluya 40X con tampón de conjugado
CONJ BUF Tampón de conjugado: Tampón TRIS-HCl con albúmina de suero bovino y timol			1 vial 6 ml	rojo	Listo para usar
CAL 0 Calibrador cero en suero de oveja y timol			1 vial liofilizado	amarillo	Añada 2,0 ml de agua destilada
CAL N Calibrador N = 1 a 5 (ver los valores exactos en las etiquetas de los viales) en suero de oveja y timol			5 viales liofilizados	amarillo	Añada 1 ml de agua destilada
WASH SOLN CONC Solución de lavado (Tris-HCl)			1 vial 10 ml	marrón	Diluya 200 x con agua destilada (use un agitador magnético).
CONTROL N Controles - N = 1 o 2 en suero humano con timol			2 viales liofilizados	plata	Añada 1 ml de agua destilada
CHROM TMB Solución cromogénica TMB (Tetrametilbencidina)			1 vial 12 ml	marrón	Listo para usar
STOP SOLN Solución de parada: HCl 1N			1 vial 12 ml	blanco	Listo para usar

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

VI. MATERIALES NO SUMINISTRADOS

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

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

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

VII. PREPARACIÓN DE REACTIVOS

- A. **Calibradores** : Reconstituya el calibrador cero con 2,0 ml de agua destilada y otros calibradores con 1 ml de agua destilada.
- B. **Controles** : Reconstituya los controles con 1 ml de agua destilada.
- C. **Conjugado anti-hGH-HRP de trabajo**: Prepare un volumen adecuado de solución de conjugado añadiendo 25 µl del conjugado anti-hGH-HRP concentrado a 1 ml de tampón de conjugado. Use un Vortex para homogenizar. Se recomienda preparar inmediatamente antes de utilizar.
- D. **Solución de lavado de trabajo** : Prepare un volumen adecuado de solución de lavado de trabajo añadiendo 199 volúmenes de agua destilada a 1 volumen de solución de lavado (200x). Utilice un agitador magnético para homogenizar. Elimine la solución de lavado de trabajo no utilizada al final del día.

VIII. ALMACENAJE Y CADUCIDADES DE LOS REACTIVOS

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

IX. RECOGIDA Y PREPARACIÓN DE MUESTRAS

- Las muestras de suero ó plasma deben ser guardadas a 2-8°C.
- Si la prueba no se realiza dentro de las 24 horas, se recomienda almacenar en alícuotas a -20°C. Evite ciclos consecutivos de congelamiento y descongelamiento.
- Antes de utilizarlas, todas las muestras deben estar a temperatura ambiente. Se recomienda agitar las muestras en un Vortex antes de utilizar.
- El suero, el plasma heparinizado o el plasma EDTA dan resultados similares.
 $Y(\text{suero}) = 0,89 \times (\text{plasma EDTA}) + 0,14 \mu\text{IU/ml}$ r=0,98 n=46
 $Y(\text{suero}) = 1,02 \times (\text{plasma heparinizado}) + 0,01 \mu\text{IU/ml}$ r=0,98 n=46
- No utilice muestras hemolizadas.

X. PROTOCOLO

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

B. Procedimiento

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

XI. CALCULO DE RESULTADOS

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

XII. EJEMPLO DE RESULTADOS

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

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

XIII. REALIZACIÓN Y LIMITACIONES

A. Límite de detección

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

B. Especificidad

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

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

C. Precisión

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

SD : Desviación estándar; CV: Coeficiente de variación

D. Exactitud

PRUEBA DE RECUPERACIÓN

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

PRUEBA DE DILUCIÓN

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

Las muestras se diluyeron con calibrador cero.

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

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

Como se muestra a continuación, los resultados de los ensayos continúan siendo correctos aun cuando una muestra es dispensada 60 minutos después de que se han añadido los calibradores a los pocillos recubiertos.

DEMORA EN EL TIEMPO						
	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. Efecto de gancho

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

XIV. CONTROL DE CALIDAD INTERNO

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

XV. INTERVALOS DE REFERENCIA

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

En sujetos normales, la secreción de la hormona de crecimiento (hGH) es pulsátil. Durante el día, las concentraciones de hGH varían entre <0,2-10 µUI / ml. Durante el sueño, las concentraciones de hGH aumentan constantemente (± 30 µUI / ml). La secreción de hGH se estimula en gran medida por el ejercicio y el estrés (punción venosa, hipoglucemia, ...), pero disminuye por la hiperglucemia. En sujetos normales (n = 34), dos horas después de la carga de glucosa oral (75 g en adultos), los niveles de hGH fueron inferiores a 10 µUI y la respuesta de la hGH a pruebas de estimulación (insulina, arginina, administración de glucagón) aumentaron por sobre 20 µUI / ml. Los niveles de hGH estaban elevados (incluso después de carga de glucosa) en la acromegalia (> 10 µUI / ml). En la deficiencia de hGH, la respuesta a la prueba de estimulación está ausente o disminuida (baja estatura por la deficiencia de hGH; hipopituitarismo de diversos orígenes)

XVI. PRECAUCIONES Y ADVERTENCIAS

Seguridad
Solo para uso de diagnóstico *in vitro*.

Los componentes de sangre humana incluidos en este kit han sido analizados con métodos aprobados en Europa y/o por la FDA y fueron negativos para HBsAg, anti-VHC, anti-VIH-1 y 2. Ningún método conocido puede garantizar totalmente que los derivados de la sangre humana no transmitan hepatitis, SIDA u otras infecciones. Por lo tanto, el manejo de reactivos, suero o plasma deben cumplir con los procedimientos de seguridad locales. Todos los productos de origen animal y derivados son de animales sanos. Los componentes bovinos son originarios de países donde no se ha informado la presencia de EEB. Sin embargo, los componentes que contienen sustancias animales deben ser tratados como potencialmente infecciosos. Evite el contacto de la piel con todos los reactivos. En caso de contacto, lave con abundante agua. No fume, beba, ingiera alimentos o aplique cosméticos en el área de trabajo. No pipetee con la boca. Use ropa protectora y guantes desechables.

XVII. BIBLIOGRAFÍA

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

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

XVIII. RESUMEN DEL PROTOCOLO

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

DIASource Catalogue No : KAP1081	Número P.I. : 1700573/en	Revisión No : 120315/1
-------------------------------------	-----------------------------	---------------------------

Fecha de revisión: 2012-03-15

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 du Bosquet, 2, B-1348 Louvain-la-Neuve, Belgium.

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

III. ΚΛΙΝΙΚΟ ΥΠΟΒΑΘΡΟ

A. Βιολογική δράση της hGH

Η hGH είναι μια πολυπεπτιδική ορμόνη (μοριακό βάρος 21.500 Da) που παράγεται από τα οξεόφιλα κύτταρα της πρόσθιας υπόφυσης υπό τον έλεγχο των δύο κύριων 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.

- Α. Σημειώσεις σχετικά με το χειρισμό**
Μην χρησιμοποιείτε το κιτ ή τα συστατικά μετά την ημερομηνία λήξης.
Μην αναμιγνύετε υλικά από διαφορετικές παρτίδες.
Φέρετε όλα τα αντιδραστήρια σε θερμοκρασία δωματίου πριν από τη χρήση.
Αναμειξτε καλά όλα τα αντιδραστήρια και τα δείγματα με ασαλή 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 ακριβείας ή αυτοματοποιημένου εξοπλισμού διανομής με πιπέτες.
Τηρείτε τους χρόνους επώασης.
Για να αποφύγετε τη μετατόπιση, ο χρόνος μεταξύ της διανομής με πιπέτα του πρώτου βαθμονομητή και του τελευταίου δείγματος πρέπει να περιορίζεται στο χρόνο που αναφέρεται στην ενότητα XIII, παράγραφο Ε (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 του Χρωμογόνου Διαλύματος, αποφύγετε την έκθεση της πλάκας μικροτιτλοδότησης σε άμεσο ηλιακό φως.

B. Διαδικασία

1. Επιλέξετε τον απαιτούμενο αριθμό ταινιών για την ανάλυση. Οι μη χρησιμοποιημένες ταινίες πρέπει να ξανασφραγιστούν μέσα στη σακούλα με τον αποξηραντικό παράγοντα και να φυλάζονται 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 κατάλληλες 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

- CAMANNI F., MASSARA F., BELFORTE L., ROSATELLO A., MOLENATTI G.M. (1977)
Effect of dopamine on plasma growth hormone and prolactin levels in normal and acromegalic subjects.
J. Clin. Endo. and Metab., 44:465.
- DAUGHADAY W.H. (1981)
The adenohypophysis
In : "Textbook of Endocrinology", R.H. Williams ed., W.B. Saunders, Philadelphia, p;73.
- DROBNY E.C., AMBURN K., BAUMANN G. (1983)
Circadian variation of basal plasma growth hormone in man.
J. Clin. Endo. and Metab., 57:524-528.
- HASHIDA S., NAKAWAGA K., ISHIKAWA E., OHTAKI S. (1985)
Basal level of human growth hormone (hGH) in normal serum.
Clin. Chim. Acta, 151:185-186.
- LEWIS V.J. et al. (1980)
Human growth hormone : A complex of proteins.
Rec. Progr. Horm. Res., 36:488.
- LI C.H. (1974)
Human growth hormone : perspective on its chemistry and physiology.
In : "Advances in human growth hormone research", S. Raiti ed. U.S. Department of Health, Education and Welfare Publ. DMEW publ. no. (NJH) 74-612, p. 321.
- REUTENS AT. (1995)
Evaluation and application of a highly sensitive assay for serum growth hormone (GH) in the study of adult GH deficiency.
J. Clin. Endocrinol. Metab., 80(2): 480-485
- CROWLEY S. et al. (1995)
Growth and the growth hormone axis in prepubertal children with asthma.
J. Pediatr. 126(2): 297-303.
- KELLY JT. et al. (1993)
Effect of different oral oestrogen formulations on insulin-like growth factor I, growth hormone and growth hormone binding protein in post-menopausal women.
Clin. Endocrinol. 39(5) : 561-567

XVIII. 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: 120315/1
-------------------------------------	-----------------------------	------------------------------

ημερομηνία αναθεώρησης : 2012-03-15

	Used symbols
	Consult instructions for use
	Storage temperature
	Use by
LOT	Batch code
REF	Catalogue number
CONTROL	Control
IVD	In vitro diagnostic medical device
	Manufacturer
	Contains sufficient for <n> tests
WASH SOLN CONC	Wash solution concentrated
CAL 0	Zero calibrator
CAL N	Calibrator #
CONTROL N	Control #
Ag 125I	Tracer
Ab 125I	Tracer
Ag 125I CONC	Tracer concentrated
Ab 125I CONC	Tracer concentrated
	Tubes
INC BUF	Incubation buffer
ACETONITRILE	Acetonitrile
SERUM	Serum
DIL SPE	Specimen diluent
DIL BUF	Dilution buffer
ANTISERUM	Antiserum
IMMUNOADSORBENT	Immunoadsorbent
DIL CAL	Calibrator diluent
REC SOLN	Reconstitution solution
PEG	Polyethylene glycol
EXTR SOLN	Extraction solution
ELU SOLN	Elution solution
GEL	Bond Elut Silica cartridges
PRE SOLN	Pre-treatment solution
NEUTR SOLN	Neutralization solution
TRACEUR BUF	Tracer buffer
µT	Microtiterplate
Ab HRP	HRP Conjugate
Ag HRP	HRP Conjugate
Ab HRP CONC	HRP Conjugate concentrate
Ag HRP CONC	HRP Conjugate concentrate
CONJ BUF	Conjugate buffer
CHROM TMB CONC	Chromogenic TMB concentrate
CHROM TMB	Chromogenic TMB solution
SUB BUF	Substrate buffer
STOP SOLN	Stop solution
INC SER	Incubation serum
BUF	Buffer
Ab AP	AP Conjugate
SUB PNPP	Substrate PNPP
BIOT CONJ CONC	Biotin conjugate concentrate
PREC AGENT	Precipitating Agent
AVID HRP CONC	Avidine HRP concentrate
ASS BUF	Assay buffer
Ab BIOT	Biotin conjugate
Ab	Specific Antibody
SAV HRP CONC	Streptavidin HRP concentrate
NSB	Non-specific binding
2nd Ab	2nd Antibody
ACID BUF	Acidification Buffer
DIST	Distributor
TRAY	Incubation trays
PMSF	PMSF solution
	Protect from light
STRIP	Dot Strip
SUB	Substrate
EXTR SOLN CONC	Extraction Buffer Concentrate
CART	Cartridge
SAV HRP	Streptavidin HRP
PIPETTE	Pipette
WASH SOLN	Wash buffer

	Symboles utilisés
	Consulter les instructions d'utilisation
	Température de conservation
	Utiliser jusqu'à
LOT	Numéro de lot
REF	Référence de catalogue
CONTROL	Contrôle
I V D	Dispositif médical de diagnostic in vitro
	Fabricant
	Contenu suffisant pour <n> tests
WASH SOLN CONC	Solution de lavage concentrée
CAL 0	Calibrateur zéro
CAL N	Calibrateur #
CONTROL N	Contrôle #
Ag 125I	Traceur
Ab 125I	Traceur
Ag 125I CONC	Traceur concentré
Ab 125I CONC	Traceur concentré
	Tubes
INC BUF	Tampon d'incubation
ACETONITRILE	Acétonitrile
SERUM	Sérum
DIL SPE	Diluant du spécimen
DIL BUF	Tampon de dilution
ANTISERUM	Antisérum
IMMUNOADSORBENT	Immunoabsorbant
DIL CAL	Diluant de calibrateur
REC SOLN	Solution de reconstitution
PEG	Glycol Polyéthylène
EXTR SOLN	Solution d'extraction
ELU SOLN	Solution d'élution
GEL	Cartouches Bond Elut Silica
PRE SOLN	Solution de pré-traitement
NEUTR SOLN	Solution de neutralisation
TRACEUR BUF	Tampon traceur
	Microplaque de titration
Ab HRP	HRP Conjugué
Ag HRP	HRP Conjugué
Ab HRP CONC	HRP Conjugué concentré
Ag HRP CONC	HRP Conjugué concentré
CONJ BUF	Tampon conjugué
CHROM TMB CONC	Chromogène TMB concentré
CHROM TMB	Solution chromogène TMB
SUB BUF	Tampon substrat
STOP SOLN	Solution d'arrêt
INC SER	Sérum d'incubation
BUF	Tampon
Ab AP	AP Conjugué
SUB PNPP	Tampon PNPP
BIOT CONJ CONC	Biotine conjugué concentré
PREC AGENT	Agent de précipitation
AVID HRP CONC	Avidine HRP concentré
ASS BUF	Tampon de test
Ab BIOT	Biotine conjugué
Ab	Anticorps spécifique
SAV HRP CONC	Concentré streptavidine HRP
NSB	Liant non spécifique
2nd Ab	Second anticorps
ACID BUF	Tampon d'acidification
DIST	Distributeur
TRAY	Plaque d'incubation
PMSF	Solution PMSF
	Conserver à l'abri de la lumière
STRIP	Bandelette de dots
SUB	Substrat
EXTR SOLN CONC	Tampon d'extraction concentré
CART	Cartouche
SAV HRP	Streptavidine-peroxydase de renfort
PIPETTE	Pipette
WASH SOLN	Tampon de lavage

	<u>Benutzte Symbole</u>
	Gebrauchsanweisung beachten
	Lagern bei
	Verwendbar bis
LOT	Chargenbezeichnung
REF	Bestellnummer
CONTROL	Kontrolle
I V D	In Vitro Diagnostikum
	Hersteller
	Ausreichend für <n> Ansätze
WASH SOLN CONC	Waschlösung-Konzentrat
CAL 0	Null kalibrator
CAL N	Kalibrator #
CONTROL N	Kontrolle #
Ag 125I	Tracer
Ab 125I	Tracer
Ag 125I CONC	Tracer Konzentrat
Ab 125I CONC	Tracer Konzentrat
	Röhrchen
INC BUF	Inkubationspuffer
ACETONITRILE	Azetonitril
SERUM	Humanserum
DIL SPE	Probenverdünner
DIL BUF	Verdünnungspuffer
ANTISERUM	Antiserum
IMMUNOADSORBENT	Immunadsorbens
DIL CAL	Kalibratorverdünnung
REC SOLN	Rekonstitutionslösung
PEG	Polyethylenglykol
EXTR SOLN	Extraktionslösung
ELU SOLN	Eluierungslösung
GEL	Bond Elut Silikakartuschen
PRE SOLN	Vorbehandlungslösung
NEUTR SOLN	Neutralisierungslösung
TRACEUR BUF	Tracer-Puffer
	Mikrotiterplatte
Ab HRP	HRP Konjugat
Ag HRP	HRP Konjugat
Ab HRP CONC	HRP Konjugat Konzentrat
Ag HRP CONC	HRP Konjugat Konzentrat
CONJ BUF	Konjugatpuffer
CHROM TMB CONC	Chromogenes TMB Konzentrat
CHROM TMB	Farblösung TMB
SUB BUF	Substratpuffer
STOP SOLN	Stopplösung
INC SER	Inkubationsserum
BUF	Puffer
Ab AP	AP Konjugat
SUB PNPP	Substrat PNPP
BIOT CONJ CONC	Biotin-Konjugat-Konzentrat
PREC AGENT	Fällungsreagenz
AVID HRP CONC	Avidin-HRP-Konzentrat
ASS BUF	Assaypuffer
Ab BIOT	Biotin-Konjugat
Ab	Spezifischer Antikörper
SAV HRP CONC	HRP Streptavidinkonzentrat
NSB	Unspezifische Bindung
2nd Ab	Sekundärer Antikörper
ACID BUF	Ansäuerungspuffer
DIST	Vertreiber
TRAY	Inkubationsschale
PMSF	PMSF Lösung
	Vor Licht schützen
STRIP	Tüpfelstreifen
SUB	Substrat
EXTR SOLN CONC	Konzentrat Extraktionspuffer
CART	Kassette
SAV HRP	Streptavidin HRP
PIPETTE	Pipet
WASH SOLN	Waschpuffer

		Simboli utilizzati			
		Consultare le istruzioni per l'uso			
		Limitazioni di temperatura			
		Utilizzare entro			
LOT		Numero di lotto			
REF		Numero di catalogo			
CONTROL		Controllo			
I V D		Dispositivo medico-diagnostico in vitro			
		Fabbricante			
		Contenuto sufficiente per <n> saggi			
<table><tr><td>WASH</td><td>SOLN</td><td>CONC</td></tr></table>	WASH	SOLN	CONC		Tampone di lavaggio concentrato
WASH	SOLN	CONC			
<table><tr><td>CAL</td><td>0</td></tr></table>	CAL	0		Calibratore zero	
CAL	0				
<table><tr><td>CAL</td><td>N</td></tr></table>	CAL	N		Standard #	
CAL	N				
<table><tr><td>CONTROL</td><td>N</td></tr></table>	CONTROL	N		Controllo #	
CONTROL	N				
<table><tr><td>Ag</td><td>125I</td></tr></table>	Ag	125I		Marcato	
Ag	125I				
<table><tr><td>Ab</td><td>125I</td></tr></table>	Ab	125I		Marcato	
Ab	125I				
<table><tr><td>Ag</td><td>125I</td><td>CONC</td></tr></table>	Ag	125I	CONC		Marcato concentrato
Ag	125I	CONC			
<table><tr><td>Ab</td><td>125I</td><td>CONC</td></tr></table>	Ab	125I	CONC		Marcato concentrato
Ab	125I	CONC			
		Provette			
<table><tr><td>INC</td><td>BUF</td></tr></table>	INC	BUF		Tampone incubazione	
INC	BUF				
ACETONITRILE		Acetonitrile			
SERUM		Siero			
<table><tr><td>DIL</td><td>SPE</td></tr></table>	DIL	SPE		Diluyente campione	
DIL	SPE				
<table><tr><td>DIL</td><td>BUF</td></tr></table>	DIL	BUF		Tampone diluizione	
DIL	BUF				
ANTISERUM		Antisiero			
IMMUNOADSORBENT		Immunoassorbente			
<table><tr><td>DIL</td><td>CAL</td></tr></table>	DIL	CAL		Diluyente calibratore	
DIL	CAL				
<table><tr><td>REC</td><td>SOLN</td></tr></table>	REC	SOLN		Soluzione di ricostituzione	
REC	SOLN				
PEG		Polietilenglicole			
<table><tr><td>EXTR</td><td>SOLN</td></tr></table>	EXTR	SOLN		Soluzione di estrazione	
EXTR	SOLN				
<table><tr><td>ELU</td><td>SOLN</td></tr></table>	ELU	SOLN		Soluzione di eluizione	
ELU	SOLN				
GEL		Cartucce di silice bond elut			
<table><tr><td>PRE</td><td>SOLN</td></tr></table>	PRE	SOLN		Soluzione di pretrattamento	
PRE	SOLN				
<table><tr><td>NEUTR</td><td>SOLN</td></tr></table>	NEUTR	SOLN		Soluzione di neutralizzazione	
NEUTR	SOLN				
<table><tr><td>TRACEUR</td><td>BUF</td></tr></table>	TRACEUR	BUF		Tracer Buffer	
TRACEUR	BUF				
		Piastra di microtitolazione			
<table><tr><td>Ab</td><td>HRP</td></tr></table>	Ab	HRP		HRP Coniugato	
Ab	HRP				
<table><tr><td>Ag</td><td>HRP</td></tr></table>	Ag	HRP		HRP Coniugato	
Ag	HRP				
<table><tr><td>Ab</td><td>HRP</td><td>CONC</td></tr></table>	Ab	HRP	CONC		HRP Coniugato concentrato
Ab	HRP	CONC			
<table><tr><td>Ag</td><td>HRP</td><td>CONC</td></tr></table>	Ag	HRP	CONC		HRP Coniugato concentrato
Ag	HRP	CONC			
<table><tr><td>CONJ</td><td>BUF</td></tr></table>	CONJ	BUF		Buffer coniugato	
CONJ	BUF				
<table><tr><td>CHROM</td><td>TMB</td><td>CONC</td></tr></table>	CHROM	TMB	CONC		Cromogena TMB concentrato
CHROM	TMB	CONC			
<table><tr><td>CHROM</td><td>TMB</td></tr></table>	CHROM	TMB		Soluzione cromogena TMB	
CHROM	TMB				
<table><tr><td>SUB</td><td>BUF</td></tr></table>	SUB	BUF		Tampone substrato	
SUB	BUF				
<table><tr><td>STOP</td><td>SOLN</td></tr></table>	STOP	SOLN		Soluzione di arresto	
STOP	SOLN				
<table><tr><td>INC</td><td>SER</td></tr></table>	INC	SER		Incubazione con siero	
INC	SER				
BUF		Buffer			
<table><tr><td>Ab</td><td>AP</td></tr></table>	Ab	AP		AP Coniugato	
Ab	AP				
<table><tr><td>SUB</td><td>PNPP</td></tr></table>	SUB	PNPP		Substrato PNPP	
SUB	PNPP				
<table><tr><td>BIOT</td><td>CONJ</td><td>CONC</td></tr></table>	BIOT	CONJ	CONC		Concentrato coniugato con biotina
BIOT	CONJ	CONC			
<table><tr><td>PREC</td><td>AGENT</td></tr></table>	PREC	AGENT		Agente precipitante	
PREC	AGENT				
<table><tr><td>AVID</td><td>HRP</td><td>CONC</td></tr></table>	AVID	HRP	CONC		Concentrato avidina HRP
AVID	HRP	CONC			
<table><tr><td>ASS</td><td>BUF</td></tr></table>	ASS	BUF		Soluzione tampone per test	
ASS	BUF				
<table><tr><td>Ab</td><td>BIOT</td></tr></table>	Ab	BIOT		Coniugato con biotina	
Ab	BIOT				
Ab		Anticorpo Specifico			
<table><tr><td>SAV</td><td>HRP</td><td>CONC</td></tr></table>	SAV	HRP	CONC		Streptavidina-HRP concentrata
SAV	HRP	CONC			
NSB		Legame non-specifico			
2nd Ab		2° Anticorpo			
<table><tr><td>ACID</td><td>BUF</td></tr></table>	ACID	BUF		Tampone Acidificante	
ACID	BUF				
DIST		Distributore			
TRAY		Vassoi di incubazione			
PMSF		Soluzione di PMSF			
		Proteggere dalla luce			
STRIP		Dot strip			
SUB		Substrato			
<table><tr><td>EXTR</td><td>SOLN</td><td>CONC</td></tr></table>	EXTR	SOLN	CONC		Concentrato del tampone di estrazione
EXTR	SOLN	CONC			
CART		Cartuccia			
<table><tr><td>SAV</td><td>HRP</td></tr></table>	SAV	HRP		HRP coniugata a streptavidina	
SAV	HRP				
PIPETTE		Pipetta			
<table><tr><td>WASH</td><td>SOLN</td></tr></table>	WASH	SOLN		Tampone di lavaggio	
WASH	SOLN				

	Símbolos utilizados
	Consultar las instrucciones de uso
	Limitación de temperatura
	Fecha de caducidad
LOT	Código de lote
REF	Número de catálogo
CONTROL	Control
I V D	Producto sanitario para diagnóstico in vitro
	Fabricante
	Contenido suficiente para <n> ensayos
WASH SOLN CONC	Solución de lavado concentrada
CAL 0	Calibrador cero
CAL N	Calibrador #
CONTROL N	Control #
Ag 125I	Trazador
Ab 125I	Trazador
Ag 125I CONC	Trazador concentrada
Ab 125I CONC	Trazador concentrada
	Tubos
INC BUF	Tampón de incubación
ACETONITRILE	Acetonitrilo
SERUM	Suero
DIL SPE	Diluyente de Muestra
DIL BUF	Tampón de dilución
ANTISERUM	Antisuero
IMMUNOADSORBENT	Inmunoadsorbente
DIL CAL	Diluyente de calibrador
REC SOLN	Solución de Reconstitución
PEG	Glicol Polietileno
EXTR SOLN	Solución de extracción
ELU SOLN	Solución de elución
GEL	Cartuchos Bond Elut Silica
PRE SOLN	Solución de Pre-tratamiento
NEUTR SOLN	Solución de Neutralización
TRACEUR BUF	Tampón de trazador
	Placa de microvaloración
Ab HRP	HRP Conjugado
Ag HRP	HRP Conjugado
Ab HRP CONC	HRP Conjugado concentrada
Ag HRP CONC	HRP Conjugado concentrada
CONJ BUF	Tampón de Conjugado
CHROM TMB CONC	Cromógeno TMB concentrada
CHROM TMB	Solución Cromógeno TMB
SUB BUF	Tampón de sustrato
STOP SOLN	Solución de Parada
INC SER	Suero de Incubación
BUF	Tampón
Ab AP	AP Conjugado
SUB PNPP	Sustrato PNPP
BIOT CONJ CONC	Concentrado de conjugado de biotina
PREC AGENT	Agente de precipitación
AVID HRP CONC	Concentrado avidina-HRP
ASS BUF	Tampón de ensayo
Ab BIOT	Conjugado de biotina
Ab	Anticuerpo específico
SAV HRP CONC	Estreptavidina-HRP Concentrado
NSB	Unión no específica
2nd Ab	Segundo anticuerpo
ACID BUF	Tampón de Acidificación
DIST	Distribuidor
TRAY	Bandejas de incubación
PMSF	Solución de PMSF
	Proteger de la luz
STRIP	Test Dot
SUB	Sustrato
EXTR SOLN CONC	Concentrado de tampón de extracción
CART	Cartucho
SAV HRP	Estreptavidina HRP
PIPETTE	Pipeta
WASH SOLN	Tampón de lavado

	<u>Χρησιμοποιούμενα σύμβολα</u>
	Συμβουλευτείτε τις οδηγίες χρήσης
	Θερμοκρασία αποθήκευσης
	Ημερομηνία λήξης
LOT	Αριθμός παρτίδας
REF	Αριθμός καταλόγου
CONTROL	Πρότυπο ελέγχου
IVD	In Vitro Διαγνωστικό Ιατροτεχνολογικό προϊόν
	Κατασκευαστής
	Περιεχόμενο επαρκές για «ν» εξετάσεις
WASH SOLN CONC	Συμπυκνωμένο διάλυμα έκπλυσης
CAL 0	Μηδενικός βαθμονομητής
CAL N	Βαθμονομητής #
CONTROL N	Ορός ελέγχου #
Ag 12SI	Ιχνηθέτης
Ab 12SI	Ιχνηθέτης
Ag 12SI CONC	Χρωμογόνος Ιχνηθέτης
Ab 12SI CONC	Χρωμογόνος Ιχνηθέτης
	Σωληνάρια
INC BUF	Ρυθμιστικό διάλυμα επώασης
ACETONITRILE	Ακετονιτρίλιο
SERUM	Ορός
DIL SPE	Διάλυμα αραιώσης δειγμάτων
DIL BUF	Ρυθμιστικό διάλυμα αραιώσης
ANTISERUM	Αντιορός
IMMUNOADSORBENT	Ανοσοπροσροφητικό
DIL CAL	Αραιωτικό βαθμονομητών
REC SOLN	Διάλυμα ανασύστασης
PEG	Πολυαιθυλενογλυκόλη
EXTR SOLN	Διάλυμα εκχύλισης
ELU SOLN	Διάλυμα έκλουσης
GEL	Φύσιγγες πυριτίου Bond Elut
PRE SOLN	Διάλυμα προεπεξεργασίας
NEUTR SOLN	Διάλυμα εξουδετέρωσης
TRACEUR BUF	Ρυθμιστικό διάλυμα
	Πλάκα μικροτιτλοδότησης
Ab HRP	HRP Σύζευγμα
Ag HRP	HRP Σύζευγμα
Ab HRP CONC	Χρωμογόνος HRP Σύζευγμα
Ag HRP CONC	Χρωμογόνος HRP Σύζευγμα
CONJ BUF	Ρυθμιστικό διάλυμα συζεύγματος
CHROM TMB CONC	Χρωμογόνος TMB
CHROM TMB	Διάλυμα χρωμογόνου TMB
SUB BUF	Ρυθμιστικό διάλυμα υποστρώματος
STOP SOLN	Ανασχετικό αντιδραστήριο
INC SER	Ορός επώασης
BUF	Ρυθμιστικό διάλυμα
Ab AP	AP Σύζευγμα
SUB PNPP	PNPP υποστρώματος
BIOT CONJ CONC	Συμπυκνωμένο αντιδραστήριο συζευγμένο με βιοτίνη
PREC AGENT	Παράγοντας καθίζησης
AVID HRP CONC	Συμπυκνωμένο διάλυμα αβιδίνης-HRP
ASS BUF	Ρυθμιστικό διάλυμα προσδιορισμού
Ab BIOT	αντιδραστήριο συζευγμένο με βιοτίνη
Ab	Ειδικό Αντίσωμα
SAV HRP CONC	Συμπυκνωμένη στρεπταβιδίνη συνεζευγμένη με HRP
NSB	μη-ειδική δέσμευση
2nd Ab	2ο Αντίσωμα
ACID BUF	Ρυθμιστικό Διάλυμα οξίνου
DIST	Διανομέας
TRAY	Δίσκοι επώασης
PMSF	Διάλυμα PMSF
	Προστατεύετε από το φως
STRIP	Ταινία κουκκίδων
SUB	Υπόστρωμα
EXTR SOLN CONC	Συμπύκνωμα ρυθμ. διαλύματος εκχύλισης
CART	Φύσιγγα
SAV HRP	Στρεπταβιδίνη HRP
PIPETTE	πιπέτα
WASH SOLN	Ρυθμιστικό διάλυμα πλύσης