



DCM050-10

Ed. 03/2024

HGH ELISA

Determinazione quantitativa dell'ormone della crescita umano (HGH) nel siero o plasma umano

per analisi di routine

IVD



LOT

Vedere etichetta esterna

2°C 8°C

 $\Sigma = 96$ test

REF

DKO050

DESTINAZIONE D'USO

Il kit HGH ELISA è un metodo immunoenzimatico diretto in fase solida per la determinazione quantitativa dell'ormone della crescita (HGH) nel siero o plasma umano.

Il kit HGH ELISA è destinato al solo uso di laboratorio.

1. SIGNIFICATO CLINICO

Il GH (growth hormone) è l'ormone dello sviluppo, è un polipeptide sintetizzato e secreto dalla ghiandola pituitaria anteriore che regola la rigenerazione cellulare e lo sviluppo negli animali vertebrati.

Il GH è liberato dalla ghiandola pituitaria nella circolazione sanguigna in un modo discontinuo sotto il controllo regolatore della somatostatina ipotalamica (ss) e del GH-releasing factor (GHRF). Gli stimolatori della secrezione di GH includono l'esercizio fisico, l'ipoglicemia, le proteine della dieta e l'estradiolo. Gli inibitori della secrezione di GH includono i carboidrati e i glucocorticoidi presenti nella dieta.

Quasi il 50% del GH nella circolazione è trasportato dalla GH binding protein (GHBP), che rappresenta il dominio extracellulare del recettore per il GH.

La concentrazione plasmatica del GH durante i picchi può variare da 5 a 30 ng/mL o più. I picchi durano tipicamente 10 - 30 minuti prima del ritorno ai livelli basali. Il più grande ed il più prevedibile di questi picchi di GH accade circa un'ora dopo l'inizio del sonno. Vi sono molte variazioni fra i giorni e gli individui. La quantità ed il modo in cui è secreto il GH cambiano durante vita. Livelli basali elevati sono tipici della prima infanzia. L'ampiezza e la frequenza dei picchi è massima durante lo sviluppo puberale. I bambini e gli adolescenti in buona salute hanno una media di circa 8 picchi nelle 24 ore. Gli adulti hanno una media di circa 5 picchi. I livelli basali, la frequenza e l'ampiezza dei picchi declinano durante vita dell'adulto.

Le azioni biologiche principali dell'ormone sono la promozione dello sviluppo. L'HGH ha effetto direttamente sugli organi bersaglio quali cartilagine, ossa e muscoli ed indirettamente, attraverso il rilascio di insulin-like del growth factor (IGF), prodotto nel fegato. In particolare, la somatotropina C (IGF-1) è essenziale per sviluppo dell'osso durante l'infanzia. Generalmente, il GH, aumenta la sintesi proteica e

stimola lo sviluppo di tutti gli organi interni tranne il cervello. Il GH riduce l'assorbimento di glucosio, ha un effetto opposto all'insulina sul fegato. Il GH inoltre contribuisce alla manutenzione ed alla funzione delle isole pancreatiche. Il GH stimola il sistema immunitario.

L'eccesso di GH può causare lo sviluppo eccessivo, noto come gigantismo pituitario.

La mancanza di GH causa problemi significativamente differenti in base all'età. Nei bambini, l'interruzione dello sviluppo e l'altezza minuta sono le manifestazioni principali della mancanza di GH. Negli adulti gli effetti della mancanza sono più sottili e possono includere la mancanza di resistenza, di energia e della massa ossea, così come l'aumento del rischio cardiovascolare.

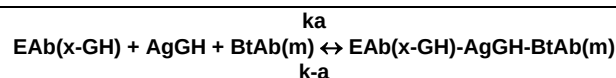
La diagnosi della mancanza di GH coinvolge un processo diagnostico multiplo, culminante solitamente nelle prove di stimolo di GH per vedere se la ghiandola pituitaria del paziente libererà un impulso del GH una volta provocata dai vari stimoli.

2. PRINCIPIO DEL METODO

In questo metodo, i calibratori e i campioni e/o controlli (contenenti l'antigene HGH nativo), sono aggiunti nei pozzetti della micropiastra coattati con streptavidina. Successivamente nei pozzetti vengono aggiunti sia anticorpi monoclonali biotinilati sia anticorpi coniugati all'enzima HRP (perossidasi di rafano); entrambi i tipi di anticorpi sono ad alta affinità e specificità e riconoscono epitopi diversi di HGH.

Nei pozzetti della micropiastra, la reazione tra l'antigene nativo HGH e gli anticorpi anti-HGH avviene senza competizione o impedimento sterico, e forma un complesso *sandwich* solubile.

L'interazione è illustrata dalla seguente equazione:



BtAb(m) = Anticorpo Biotinilato Monoclonale (in eccesso)

AgGH = Antigene Nativo (Quantità Variabile)

EnzAb(p) = Anticorpo Marcato con Enzima HRP (in eccesso)

EnzAb(x-GH)-AgGH-BtnAb(m) = Complesso

Sandwich Antigene-Anticorpi

ka = Costante di Associazione

k-a = Costante di Dissociazione

Contemporaneamente, il complesso viene immobilizzato nel pozzetto mediante la reazione ad alta affinità tra la streptavidina e l'anticorpo biotinilato. Tale interazione è illustrata qui:

EAb(x-GH)-AgGH-BtAb(m) + Strept.C.W. → complesso immobilizzato

Strept.C.W. = Streptavidina immobilizzata sul pozzetto

Complesso immobilizzato = Legame sandwich Anticorpo-Antigene

Una volta raggiunto l'equilibrio, la frazione legata dell'anticorpo si separa dall'antigene non reagito mediante lavaggio con apposito tampone (wash solution).

Infine l'attività dell'enzima HRP presente sulla superficie del pozzetto è quantificata mediante la reazione con il Substrato TMB che produce una colorazione.

L'attività enzimatica nella frazione legata all'anticorpo è direttamente proporzionale alla concentrazione dell'antigene nativo libero.

Utilizzando diversi calibratori a concentrazione nota di antigene, è possibile tracciare una curva dose-risposta, da cui si può determinare la concentrazione incognita dell'antigene.

3. REATTIVI, MATERIALI E STRUMENTAZIONE

3.1. Reattivi e materiali forniti nel kit

1. Calibrators (6 flaconi, 1 mL ciascuno)

CAL0	REF DCE002/5006-0
CAL1	REF DCE002/5007-0
CAL2	REF DCE002/5008-0
CAL3	REF DCE002/5009-0
CAL4	REF DCE002/5010-0
CAL5	REF DCE002/5011-0

2. Control (1 flacone, 1 mL)

La concentrazione del Controllo è indicata sul Certificato di Analisi **REF DCE045/5003-0**

3. Conjugate (1 flacone, 13 mL)

Anticorpi anti HGH coniugato a perossidasi di rafano (HRP) e anti HGH biotinilato **REF DCE002/5002-0**

4. Coated Microplate (1 micropiastre breakable)

Micropiastre coattate con streptavidina **REF DCE002/5003-0**

5. TMB Substrate (1 flacone, 15 mL)

H₂O₂-TMB (0,26 g/L) (evitare il contatto con la pelle) ProClin <0,0015% **REF DCE004-0**

6. Stop Solution (1 flacone, 15 mL)

Acido Solforico 0,15 mol/L (evitare il contatto con la pelle) **REF DCE005-0**

7. 50X Conc. Wash Solution (1 flacone, 20 mL)

NaCl 45 g/L; Tween-20 55 g/L. ProClin >0,0015% **REF DCE006-0**

3.2. Reattivi necessari non forniti nel kit

Acqua distillata.

3.3. Materiale e strumentazione ausiliare

Dispensatori automatici.

Lettore per micropiastre (450 nm, 620-630 nm)

Note

Conservare tutti i reattivi a 2÷8°C, al riparo dalla luce.

Aprire la busta del Reattivo 4 (Coated Microplate) solo dopo averla riportata a temperatura ambiente e chiuderla subito dopo il prelievo delle strip da utilizzare; una volta aperta è stabile fino alla data di scadenza del kit.

4. AVVERTENZE

- Questo test kit è per uso in vitro, da eseguire da parte di personale esperto. Non per uso interno o esterno su esseri Umani o Animali.
- Usare i previsti dispositivi di protezione individuale mentre si lavora con i reagenti forniti.
- Seguire le Buone Pratiche di Laboratorio (GLP) per la manipolazione di prodotti derivati da sangue.
- Alcuni reagenti (wash solution) contengono piccole quantità di ProClin™ 300 (>0,0015%, <0,06%) come conservante. Evitare il contatto con pelle o mucose.
- Classificazione secondo il regolamento (CE) n. 1272/2008 [CLP]

Sensibilizzazione cutanea, categoria 1



Attenzione

Contiene: ProClin 300

Indicazioni di pericolo:

H317 - Può provocare una reazione allergica cutanea.

Consigli di prudenza:

P261 - Evitare di respirare la polvere / i fumi / i gas / la nebbia / i vapori / gli aerosol.

P280 - Indossare guanti/indumenti protettivi / proteggere gli occhi / proteggere il viso / proteggere l'udito.

P321 - Trattamento specifico (vedere istruzioni supplementari di pronto soccorso su questa etichetta).

P333+P313 - In caso di irritazione o eruzione della pelle: Consultare un medico.

P362+P364 - Togliere tutti gli indumenti contaminati e lavarli prima di indossarli nuovamente.

- Il TMB Substrato contiene un irritante, che può essere dannoso se inalato, ingerito o assorbito attraverso la cute. Per prevenire lesioni, evitare l'inalazione, l'ingestione o il contatto con la cute e con gli occhi.
- La Stop Solution è costituita da una soluzione di acido solforico diluito. L'acido solforico è velenoso

e corrosivo e può essere tossico se ingerito. Per prevenire possibili ustioni chimiche, evitare il contatto con la cute e con gli occhi.

- Evitare l'esposizione del reagente TMB/H₂O₂ a luce solare diretta, metalli o ossidanti. Non congelare la soluzione.
- Questo metodo consente di determinare concentrazioni di HGH da 2 µIU/mL a 150 µIU/mL.

5. PRECAUZIONI

- Si prega di attenersi rigorosamente alla sequenza dei passaggi indicata in questo protocollo. I risultati presentati qui sono stati ottenuti usando specifici reagenti elencati in queste Istruzioni per l'Uso.
- Tutti i reattivi devono essere conservati a temperatura controllata di 2-8°C nei loro contenitori originali. Eventuali eccezioni sono chiaramente indicate. I reagenti sono stabili fino alla data di scadenza se conservati e trattati seguendo le istruzioni fornite.
- Prima dell'uso lasciare tutti i componenti dei kit e i campioni a temperatura ambiente (22-28°C) e mescolare accuratamente.
- Non scambiare componenti dei kit di lotti diversi. Devono essere osservate le date di scadenza riportate sulle etichette della scatola e di tutte le fiale. Non utilizzare componenti oltre la data di scadenza.
- Qualora si utilizzi strumentazione automatica, è responsabilità dell'utilizzatore assicurarsi che il kit sia stato opportunamente validato.
- Un lavaggio incompleto o non accurato dei pozzetti può causare una scarsa precisione e/o un'elevato background. Per migliorare le prestazioni del kit su strumentazione automatica, si consiglia di aumentare il numero di lavaggi.
- Per la riproducibilità dei risultati, è importante che il tempo di reazione di ogni pozzetto sia lo stesso. Per evitare il time shifting durante la dispensazione degli reagenti, il tempo di dispensazione dei pozzetti non dovrebbe estendersi oltre i 10 minuti. Se si protrae oltre, si raccomanda di seguire lo stesso ordine di dispensazione. Se si utilizza più di una piastra, si raccomanda di ripetere la curva di calibrazione in ogni piastra.
- L'aggiunta del TMB Substrato dà inizio ad una reazione cinetica, la quale termina con l'aggiunta della Stop Solution. L'aggiunta del TMB Substrato e della Stop Solution deve avvenire nella stessa sequenza per evitare tempi di reazione differenti.
- Osservare le linee guida per l'esecuzione del controllo di qualità nei laboratori clinici testando controlli e/o pool di sieri.
- Osservare la massima precisione nella ricostituzione e dispensazione dei reagenti.
- Non usare campioni microbiologicamente contaminati, altamente lipemici o emolizzati.
- I lettori di micropiastre leggono l'assorbanza verticalmente. Non toccare il fondo dei pozzetti.

6. PROCEDIMENTO

6.1. Preparazione dei Calibratori (C₀...C₅)

I Calibratori sono pronti all'uso ed hanno le seguenti concentrazioni:

	C ₀	C ₁	C ₂	C ₃	C ₄	C ₅
µIU/mL	0	2	10	25	50	150

Per campioni con concentrazione superiore a 150 µIU/mL diluite il campione con C₀.

Una volta aperti, i Calibratori sono stabili 6 mesi a 2-8°C.

6.2. Preparazione della Wash Solution

Prima dell'uso, diluire il contenuto di ogni fiala di "50X Conc. Wash Solution" con acqua distillata fino al volume di 1000 mL. Per preparare volumi minori rispettare il rapporto di diluizione di 1:50. La soluzione di lavaggio diluita è stabile a 2-8°C per almeno 30 giorni.

6.3. Preparazione del campione

Utilizzare campioni sierici o plasmatici umani, e osservare le consuete precauzioni nella raccolta di campioni provenienti da prelievo per via venosa.

Per un confronto approfondito che permetta di stabilire valori nella norma, raccogliere i campioni di siero al mattino e a digiuno.

Per ottenere il siero, il sangue deve essere raccolto in un tubo da prelievo per via venosa, senza additivi o anticoagulanti; lasciare coagulare il sangue; centrifugare il campione per separare il siero dalle cellule.

I campioni possono essere refrigerati a 2-8°C per un periodo massimo di 5 giorni. Qualora non fosse possibile testare i campioni entro tale periodo, essi possono essere conservati a temperature di -20°C fino a 30 giorni. Evitare ripetuti congelamenti e scongelamenti.

Se testati in duplicato, sono necessarie quantità di 0,100 mL dei campioni.

Il Controllo è pronto all'uso.

6.4. Procedimento

- **Portare tutti i reagenti a temperatura ambiente (22-28°C) per almeno 30 minuti.** Al termine del dosaggio riporre immediatamente tutti i reagenti a 2-8°C: evitare lunghi periodi a temperatura ambiente.
- Le strisce di pozzetti non utilizzate devono essere rimesse immediatamente nella busta richiudibile contenente il materiale essicante e conservate a 2-8°C.
- Per evitare potenziali contaminazioni microbiche e/o chimiche non rimettere i reagenti inutilizzati nei flaconi originali.
- Al fine di aumentare l'accuratezza dei risultati del test è necessario operare in doppio, allestendo due pozzetti per ogni punto della curva di calibrazione (C₀-C₅), due per ogni Controllo, due per ogni Campione ed uno per il Bianco.

Reagente	Calibratore	Campione /Controllo	Bianco
Calibratore C ₀ -C ₅	50 µL		
Campione /Controllo		50 µL	
Conjugate	100 µL	100 µL	
Incubare 1 h a temperatura ambiente (22÷28°C). Allontanare la miscela di reazione; lavare i pozzetti 3 volte con 0,3 mL di soluzione di lavaggio diluita. Nota importante: ad ogni step di lavaggio, agitare delicatamente la piastra per 5 secondi e successivamente rimuovere l'eccesso di soluzione di lavaggio sbattendo delicatamente la micropiastra capovolta su fogli di carta assorbente. Lavaggi automatici: se si utilizza strumentazione automatica effettuare almeno 5 lavaggi.			
TMB Substrate	100 µL	100 µL	100 µL
Incubare 15 minuti a temperatura ambiente (22÷28°C), al riparo dalla luce.			
Stop Solution	100 µL	100 µL	100 µL
Agitare delicatamente la micropiastra. Leggere l'assorbanza (E) a 450 nm contro una lunghezza d'onda di riferimento di 620-630 nm oppure contro il Bianco entro 5 minuti.			

7. CONTROLLO QUALITA'

Ogni laboratorio dovrebbe dosare i controlli interni livelli a concentrazione basso normale ed alto per monitorare le prestazioni del saggio. Questi controlli dovrebbero essere trattati come campioni incogniti e i valori determinati in ogni seduta.

Conservare le carte di controllo qualità, per seguire le prestazioni dei reagenti forniti.

Dovrebbero inoltre essere utilizzati pertinenti metodi statistici per verificare l'andamento.

Deviazioni significative rispetto alle prestazioni stabilite possono indicare un inosservato cambio di condizioni sperimentali o una degradazione dei reagenti kit. Devono essere usati reagenti freschi per determinare la ragione delle variazioni.

8. LIMITAZIONI DELLA PROCEDURA

8.1. Prestazioni dell'analisi

Pazienti con somministrazione di HGH possono sviluppare anticorpi all'HGH che possono interferire con il saggio e fornire risultati erroneamente bassi. Varianti genetiche o sottoprodotti di degradazione possono modificare le caratteristiche di legame con gli anticorpi e influenzare i risultati finali. Tali campioni possono mostrare risultati discordanti se testati con metodi diversi, basati su anticorpi per differenti epitopi.

La secrezione dell'HGH segue un ritmo circadiano che è caratterizzato da un rilascio discontinuo e

pulsatile con rialzi della concentrazione di ormone alternati a periodi durante il giorno nei quali le concentrazioni sono non rilevabili. Le concentrazioni più elevate, nei 2 maggiori picchi di secrezione, sono solitamente raggiunte entro una o due ore dall'inizio del sonno. Altri stimoli fisiologici dell'HGH sono lo stress, l'esercizio fisico, i pasti ad alto contenuto proteico e l'ipoglicemia.

L'iperglicemia inibisce la secrezione dell'ormone della crescita. L'età è un importante fattore che influenza la sua concentrazione. Alla nascita, l'HGH è elevato e generalmente diminuisce con l'età con l'eccezione di un picco nella fase di crescita dell'adolescenza. Le donne solitamente hanno un 50% di concentrazione maggiore rispetto ai loro coetanei maschi.

Poiché la concentrazione di HGH è pulsatile e discontinua nel corso del giorno e che l'emivita dell'ormone è molto breve, i livelli di HGH determinati su singoli prelievi casuali non forniscono informazioni di utilità clinica. Per aggirare questo problema, sono utilizzati test di stimolazione che impiegano stimoli farmacologici e fisiologici per indurre la secrezione o l'inibizione dell'HGH. Per questi motivi, la sola determinazione dell'ormone della crescita non è sufficiente per accertare lo stato clinico.

9. RISULTATI

9.1. Note

Le densità ottiche superiori a 2,0 potrebbero fuori dal range di misurazione di alcuni lettori di micropiastre. È necessario in questi casi eseguire anche una lettura a 405 nm (= lunghezza d'onda alla quale si trova la spalla del picco) oltre alla lettura a 450 nm (lunghezza d'onda del picco) e a 620 nm (filtro di riferimento per la sottrazione delle interferenze dovute alla plastica).

Se si utilizzano i lettori non in grado di leggere a 3 lunghezze d'onda contemporaneamente, si raccomanda di procedere come segue:

- leggere la micropiastra a 450 nm e a 620 nm.
- leggere di nuovo la micropiastra a 405 nm e 620 nm.
- selezionare i pozzetti le cui OD a 450 nm sono più alte di 2,0.

- selezionare le corrispondenti OD a 405 nm e moltiplicare questi valori a 405 nm per fattore di conversione 3,0 (dove $OD\ 450/OD\ 405 = 3,0$), cioè:
 $OD\ 450\ nm = OD\ 405\ nm \times 3,0$

Nota bene: il fattore 3,0 è solamente suggerito. Per migliore accuratezza, gli utilizzatori devono calcolare il fattore di conversione sul proprio lettore.

9.2. Estinzione Media

Calcolare l'estinzione media (Em) di ciascun punto della curva di calibrazione (C₀-C₅) e di ogni campione.

9.3. Calibration curve – Metodo automatico

Utilizzare i metodi: 4 parametri logistici - preferibilmente - o *smoothed cubic spline* come algoritmo di calcolo.

9.4. Calibration curve – Metodo manuale

Una curva dose-risposta è utilizzata per determinare le concentrazioni di ormone HGH in campioni incogniti.

Registrare le OD ottenute dalla stampa del lettore di micropiastre.

Riportare le OD per ciascun calibratore in duplicato contro la corrispondente concentrazione di ormone della crescita in $\mu\text{IU/mL}$ su carta millimetrata (non calcolare le medie dei duplicati prima di avere tracciato i valori dei duplicati dei calibratori sul grafico).

Tracciare la curva che passa per i punti.

Per determinare la concentrazione di ormone della crescita per un campione incognito, localizzare l'OD media dei duplicati corrispondenti sull'asse verticale del grafico, trovare il punto di intersezione sulla curva e leggere la concentrazione (in $\mu\text{IU/mL}$) sull'asse orizzontale del grafico (è possibile ricavare la media dei duplicati del campione incognito come indicato).

10. VALORI DI RIFERIMENTO

A causa della natura pulsatile e discontinua della secrezione dell'ormone della crescita, non ha senso definire gli intervalli di riferimento per i valori normali. Tuttavia raramente sono stati riportati valori al di sopra dei $150 \mu\text{IU/mL}$ in soggetti normali.

Tenendo presente questa premessa, sono stati analizzati 175 adulti apparentemente normali. I risultati sono riportati in tabella:

	N.	Media $\mu\text{IU/mL}$	Intervallo $\mu\text{IU/mL}$
Campioni	175	9,1	0-55

È importante tenere presente che la determinazione di un range di valori attesi in un dato metodo per una popolazione "normale" è dipendente da molteplici fattori, quali la specificità e sensibilità del metodo in uso, e la popolazione in esame. Perciò ogni laboratorio dovrebbe considerare i range indicati dal Fabbriante come un'indicazione generale e produrre range di valori attesi propri basati sulla popolazione indigena dove il laboratorio risiede.

I test di induzione della risposta all'HGH sono solitamente usati per testare la funzionalità dell'adenoipofisi. I test di induzione misurano la capacità dell'adenoipofisi di secernere l'HGH per cui bambini con sospetto ritardo nella crescita sono i soggetti classici per questi test. Molti test dinamici promuovono il rilascio dell'HGH: l'esercizio fisico, la somministrazione di L-Dopa, il test di tolleranza all'insulina e l'infusione di arginina. Ogni laboratorio dovrebbe determinare la risposta normale ma un picco di HGH anche superiore a $24 \mu\text{IU/mL}$ è probabilmente normale in tutti i casi.

I test di inibizione misurano la soppressione del rilascio di HGH dall'adenoipofisi. Questi test sono utili per costatare l'eccesso di ormone della crescita e le relative conseguenze: gigantismo e acromegalia.

Il test di tolleranza al glucosio è un test dinamico per la determinazione dell'eccesso di HGH.

L'impossibilità per la concentrazione di HGH di scendere al di sotto di $1 \mu\text{IU/mL}$ entro 60-120 minuti fa ipotizzare un'eccessiva secrezione di HGH.

11. PARAMETRI CARATTERISTICI

11.1. Precisione

11.1.1. Intra-Assay

La variabilità all'interno dello stesso kit è stata determinata replicando (24x) la misura di tre differenti sieri di controllo.

Campione	N.	X	σ	CV
Level1	24	10,38	0,33	3,13%
Level2	24	26,23	1,17	4,45%
Level3	24	61,80	3,40	5,50%

11.1.2. Inter-Assay

La variabilità tra kit differenti è stata determinata replicando (39x) la misura di tre differenti sieri di controllo con kit appartenenti a lotti diversi.

Campione	N.	X	σ	CV
Level1	39	10,48	0,48	4,58%
Level2	39	26,08	1,77	6,79%
Level3	39	64,61	4,58	7,09%

11.2. Sensibilità

La concentrazione minima di HGH misurabile che può essere distinta dal Calibratore 0 è $0,105 \mu\text{IU/mL}$ con un limite di confidenza del 95%.

11.3. Specificità

Al fine di testare la specificità della coppia di anticorpi per HGH Elisa kit sono state aggiunte massicce dosi dei relativi analiti ad un pool di sieri di pazienti:

Growth Hormone (HGH)	1,0000
Luteinizing Hormone (LH)	< 0,0001
Follicle Stimulating Hormone (FSH)	< 0,0001
Thyroid Stimulating Hormone (TSH)	< 0,0001
Prolactin Hormone (PRL)	< 0,0001
Chorionic gonadotropin (CG)	< 0,0001

11.4. Correlazione con metodo RIA

Il kit HGH ELISA Dia.Metra è stato comparato con un kit RIA disponibile in commercio. Sono stati testati i campioni di siero di 80 soggetti.

La curva di regressione è:

$(\text{HGH Dia.Metra}) = 0,091 + 0,98 \cdot (\text{HGH RIA})$

Coefficiente di correlazione = 0,985

12. DISPOSIZIONI PER LO SMALTIMENTO

Eseguire lo smaltimento dei rifiuti seguendo le leggi vigenti.

BIBLIOGRAFIA

- Lewis, U.J., et al, Acta Paediatr, 125, 399 (1994)
- Henry, J.D., W.B. Saunders Company, 324 (1996)
- Frasier, S.D., Pediatrics., 53, 929 (1978)
- Chevenne, D., et al, Horm. Res., 40, 168 (1993)
- Dattani, M.T., et al J Endocrinol, 133, 447 (1992)

6. Merimee, T.J., et al, N Eng J Med., 276, 434 ((967)
7. Kraemer RR, et al Res Q Exerc Sport 64:69-74 (1993)
8. C. Burtis et al Textbook of Clinical Chemistry, ed. W.B. Saunders Company (1999)
9. Ebdrup L., et al., Horm. Res., 51 Suppl. 1, 20 (1999)
10. Fisker S., et al., Scand J Clin Lab Invest , 58 (5), 373 (1998)
11. Winer LM, et al J Clin Endocrin Metab 70:1678-1686 (1990)
12. Van der Berg G, J Clin Endocrin Metab 81:2460-2467 (1996)
13. Albertsson-Wikland K, et al J Clin Endocrinol Metab 78:1195-1201 (1994)



DCM050-10
Ed. 03/2024

HGH ELISA

for routine analysis

Quantitative determination of Human Growth Hormone (HGH) in human serum or plasma

IVD



See external label

LOT

2°C 8°C



Σ = 96 tests

REF DKO050

INTENDED USE

Dia.Metra HGH ELISA kit is a direct solid phase enzyme immunoassay for the quantitative measurement of Growth Hormone in human serum or plasma.

HGH ELISA kit is intended for laboratory use only.

1. CLINICAL SIGNIFICANCE

Growth hormone is a polypeptide hormone synthesised and secreted by the anterior pituitary gland which stimulates growth and cell reproduction in humans and other vertebrate animals.

GH is released from the pituitary into the bloodstream in a pulsatile manner under the regulatory control of hypothalamic somatostatin (SS) and GH-releasing factor (GHRF).

Stimulators of GH secretion include, exercise, hypoglycemia, dietary protein, and estradiol. Inhibitors of GH secretion include dietary carbohydrate and glucocorticoids.

Almost 50% of GH in circulation is bound to a high affinity GH binding protein (GHBP), which represents the extracellular domain of the GH receptor.

The plasma concentration of GH during these peaks may range from 5 to 30 ng/mL or more. Peaks typically last from 10 to 30 minutes before returning to basal levels. The largest and most predictable of these GH peaks occurs about an hour after onset of sleep. Otherwise there is wide variation between days and individuals. Between the peaks, basal GH levels are low, usually less than 3 ng/mL for most of the day and night.

The amount and pattern of GH secretion change throughout life. Basal levels are highest in early childhood. The amplitude and frequency of peaks is greatest during the pubertal growth. Healthy children and adolescents average about 8 peaks per 24 hours. Adults average about 5 peaks. Basal levels and the frequency and amplitude of peaks decline throughout adult life.

The primary biological actions of the hormone are in direct growth promoting. HGH exerts its effect directly on target organs such as cartilage, bones and muscles and indirectly through the release of insulin-like growth factor (IGF), produced in the liver (2). In

particular, somatotropin C (IGF-1) is essential for bone growth during childhood.

Generally increases protein synthesis and stimulates the growth of all internal organs excluding the brain. GH reduces liver uptake of glucose, an effect that opposes that of insulin. GH also contributes to the maintenance and function of pancreatic islets. GH stimulates the immune system.

GH can cause excessive growth, traditionally referred to as pituitary gigantism.

Deficiency of GH produces significantly different problems at various ages. In children, growth failure and short stature are the major manifestations of GH deficiency. In adults the effects of deficiency are more subtle, and may include deficiencies of strength, energy, and bone mass, as well as increased cardiovascular risk.

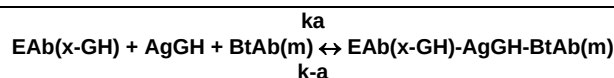
Diagnosis of GH deficiency involves a multiple step diagnostic process, usually culminating in GH stimulation test(s) to see if the patient's pituitary gland will release a pulse of GH when provoked by various stimuli.

2. PRINCIPLE OF THE METHOD

In this method, the calibrators and the patient specimens and/or controls (containing the native HGH antigen) are first added to streptavidin coated wells. Biotinylated monoclonal and enzyme labelled antibodies are then added: these antibodies have high affinity and specificity and are directed against distinct and different epitopes of HGH.

Reaction between the various HGH antibodies and native HGH occurs in the microwells without competition or steric hindrance, forming a soluble sandwich complex.

The interaction is illustrated by the following equation:



BtAb(m) = Biotinylated Monoclonal Antibody (Excess Quantity)

AgGH = Native Antigen (Variable Quantity)

EAb(p) = Enzyme labelled Antibody (Excess Quantity)

EAb(x-GH)-AgGH-BtAb(m)= Sandwich Complex

ka = Rate Constant of Association

k-a = Rate Constant of Dissociation

Simultaneously, the complex is immobilized in the well through the high affinity reaction of streptavidin and biotinylated antibody.

This interaction is illustrated below:

EAb(x-GH)-AgGH-BtAb(m)+Strept.C.W.→	immobilized complex
--	----------------------------

Strept.C.W. = Streptavidin immobilized on the well

Immobilized complex = sandwich complex bound to the well.

After equilibrium is attained, the antibody-bound fraction is separated from unbound antigen by decantation or aspiration.

Then the activity of the enzyme HRP present on the surface of the well is quantified by reaction with the TMB Substrate to produce colour.

The enzyme activity in the antibody-bound fraction is directly proportional to the native antigen concentration.

By utilizing several different serum references of known antigen values, a dose response curve is generated from which the antigen concentration of an unknown is ascertained.

3. REAGENTS, MATERIALS AND INSTRUMENTATION

3.1. Reagents and materials supplied in the kit

1. Calibrators (6 vials, 1 mL each)

CAL0	REF	DCE002/5006-0
CAL1	REF	DCE002/5007-0
CAL2	REF	DCE002/5008-0
CAL3	REF	DCE002/5009-0
CAL4	REF	DCE002/5010-0
CAL5	REF	DCE002/5011-0

2. Control (1 vial, 1 mL)

Concentration of Control is stated on the Certificate of Analysis

REF DCE045/5003-0

3. Conjugate (1 vial, 13 mL)

Antibodies anti HGH conjugated with horseradish peroxidase (HRP) and anti HGH biotinylated

REF DCE002/5002-0

4. Coated Microplate (1 breakable microplate)

Microplate coated with streptavidin

REF DCE002/5003-0

5. TMB Substrate (1 vial, 15 mL)

H₂O₂-TMB 0.26 g/L (avoid any skin contact). ProClin <0.0015%

REF DCE004-0

6. Stop Solution (1 vial, 15 mL)

Sulphuric acid 0.15 mol/L (avoid any skin contact)

REF DCE005-0

7. 50X Conc. Wash Solution (1 vial, 20 mL)

NaCl 45 g/L; Tween-20 55 g/L. ProClin >0.0015%

REF DCE006-0

3.2. Reagents necessary not supplied

Distilled water.

3.3. Auxiliary materials and instrumentation

Automatic dispenser.

Microplates reader (450 nm, 620-630 nm)

Note

Store all reagents between 2÷8°C in the dark.

Open the bag of reagent 4 (Coated Microplate) only when it is at room temperature and close it immediately after use; once opened, it is stable until the expiry date of the kit.

4. WARNINGS

- This kit is intended for in vitro use by professional persons only. Not for internal or external use in Humans or Animals.
- Use appropriate personal protective equipment while working with the reagents provided.
- Follow Good Laboratory Practice (GLP) for handling blood products.
- Some reagents (wash solution) contain small amounts of ProClin™ 300 (>0.0015%, <0.06%) as preservative. Avoid contact with skin or mucosa.
- Classification according to Regulation (EC) No. 1272/2008 [CLP]

Skin sensitivity, Category 1



Warning

Contains: ProClin 300

Hazard statements:

H317 - May cause an allergic skin reaction.

Precautionary statements:

P261 - Avoid breathing dust / fume / gas / mist / vapours / spray.

P280 - Wear protective gloves/ protective clothing / eye protection / face protection / hearing protection.

P321 - Specific treatment (see supplemental first aid instruction on this label).

P333+P313 - If skin irritation or rash occurs: Get medical advice/attention.

P362+P364 - Take off contaminated clothing and wash it before reuse.

- The TMB Substrate contains an irritant, which may be harmful if inhaled, ingested or absorbed through the skin. To prevent injury, avoid inhalation, ingestion or contact with skin and eyes.
- The Stop Solution consists of a diluted sulphuric acid solution. Sulphuric acid is poisonous and corrosive and can be toxic if ingested. To prevent chemical burns, avoid contact with skin and eyes.
- Avoid the exposure of reagent TMB/H₂O₂ to directed sunlight, metals or oxidants. Do not freeze the solution.
- This method allows the determination of HGH from 2 µIU/mL to 150 µIU/mL.

5. PRECAUTIONS

- Please adhere strictly to the sequence of pipetting steps provided in this protocol. The performance data represented here were obtained using specific reagents listed in this Instruction For Use.
- All reagents should be stored refrigerated at 2-8°C in their original container. Any exceptions are clearly indicated. The reagents are stable until the expiry date when stored and handled as indicated.
- Allow all kit components and specimens to reach room temperature (22-28°C) and mix well prior to use.
- Do not interchange kit components from different lots. The expiry date printed on box and vials labels must be observed. Do not use any kit component beyond their expiry date.
- If you use automated equipment, the user has the responsibility to make sure that the kit has been appropriately tested.
- The incomplete or inaccurate liquid removal from the wells could influence the assay precision and/or increase the background. To improve the performance of the kit on automatic systems, it is recommended to increase the number of washes.
- It is important that the time of reaction in each well is held constant for reproducible results. Pipetting of samples should not extend beyond ten minutes to avoid assay drift. If more than 10 minutes are needed, follow the same order of dispensation. If more than one plate is used, it is recommended to repeat the dose response curve in each plate
- Addition of the TMB Substrate solution initiates a kinetic reaction, which is terminated by the addition of the Stop Solution. Therefore, the TMB Substrate and the Stop Solution should be added in the same sequence to eliminate any time deviation during the reaction.
- Observe the guidelines for performing quality control in medical laboratories by assaying controls and/or pooled sera.
- Maximum precision is required for reconstitution and dispensation of the reagents.
- Samples microbiologically contaminated, highly lipemic or haemolysed should not be used in the assay.
- Plate readers measure vertically. Do not touch the bottom of the wells.

6. PROCEDURE

6.1. Preparation of the Calibrators (C₀...C₅)

The Calibrators are ready for use and have the following concentration:

	C ₀	C ₁	C ₂	C ₃	C ₄	C ₅
µIU/mL	0	2	10	25	50	150

For sample with concentration over 150 µIU/mL dilute the sample with the Calibrator 0.

Once opened, the Calibrators are stable 6 months at 2-8°C.

6.2. Preparation of Wash Solution

Dilute the content of each vial of the "50X Conc. Wash Solution" with distilled water to a final volume of 1000 mL prior to use. For smaller volumes respect the 1:50 dilution ratio. The diluted wash solution is stable for 30 days at 2÷8°C.

6.3. Preparation of the Sample

The specimens shall be human plasma or serum; the usual precautions in the collection of venipuncture samples should be observed.

For accurate comparison to establish normal values, a fasting morning serum sample should be obtained.

For serum preparation, the blood should be collected in a venipuncture tube without additives or anti-coagulants; allow the blood to clot; centrifuge the specimen to separate the serum from the cells.

Samples may be refrigerated at 2÷8°C for a maximum period of five (5) days. If the specimens cannot be assayed within this time, they may be stored -20°C for up to 30 days. Avoid repetitive freezing and thawing.

When assayed in duplicate, 0,100 mL of the specimen is required.

The Control is ready to use.

6.4. Procedure

- **Allow all reagents to reach room temperature (22-28°C) for at least 30 minutes.** At the end of the assay, store immediately the reagents at 2-8°C: avoid long exposure to room temperature.
- Unused coated microwell strips should be released securely in the foil pouch containing desiccant and stored at 2-8°C.
- To avoid potential microbial and/or chemical contamination, unused reagents should never be transferred into the original vials.
- As it is necessary to perform the determination in duplicate in order to improve accuracy of the test results, prepare two wells for each point of the calibration curve (C₀-C₄), two for each Control, two for each sample, one for Blank.

Reagent	Calibrator	Sample/ Control	Blank
Calibrator C ₀ -C ₅	50 µL		
Sample/ Control		50 µL	
Conjugate	100 µL	100 µL	
Incubate at room temperature (22÷28°C) for 1 hour. Remove the content from each well and wash the wells 3 times with 300 µL of Diluted Wash Solution. Important note: during each washing step, gently shake the plate for 5 seconds and remove excess solution by tapping the inverted plate on an absorbent paper towel. Automatic washer: if you use automated equipment, wash the wells at least 5 times.			
TMB Substrate	100 µL	100 µL	100 µL
Incubate at room temperature (22÷28°C) for 15 minutes in the dark .			
Stop Solution	100 µL	100 µL	100 µL
Shake the microplate gently. Read the absorbance (E) at 450 nm against a reference wavelength of 620-630 nm or against Blank within 5 minutes.			

7. QUALITY CONTROL

Each laboratory should assay controls at levels of a low, normal, and high range for monitoring assay performance.

These controls should be treated as unknowns and values determined in every test procedure performed. Quality control charts should be maintained to follow the performance of the supplied reagents.

Pertinent statistical methods should be employed to ascertain trends. Significant deviation from established performance can indicate unnoticed change in experimental conditions or degradation of kit reagents.

Fresh reagents should be used to determine the reason for the variations.

8. LIMITATIONS OF PROCEDURE

8.1. Assay Performance

The administration of HGH to patients may develop antibodies anti-HGH that may interfere with the test and give false low results. Genetic variants or degradation products may alter the binding characteristics of the antibodies and influence the final results. These samples may show discordant results when tested with different methods, based on antibodies binding to different epitopes.

The HGH secretion follows a circadian rhythm that is characterized by a discontinuous and pulsatile release of the hormone, with HGH concentration increase alternated to periods during the day in which the HGH concentration is undetectable. The highest

concentrations, in two major peaks of secretion, are usually reached within one or two hours after the onset of sleep. Other physiological HGH stimuli are stress, exercise, meals with high protein content and hypoglycaemia.

Hyperglycemia inhibits the secretion of growth hormone. Age is an important factor influencing its concentration. At birth, the HGH is high, and generally it decreases with age, with the exception of a peak in the growth phase of adolescence. Women usually have a 50% concentration than their male peers.

As the concentration of HGH is pulsatile and intermittent during the day and the hormone has a very short half-life, the levels of HGH determined on individual random tests do not provide information of clinical utility. To work around this problem, stimulation tests using pharmacological and physiological stimuli to induce the secretion or inhibition of HGH are used. For these reasons, the determination of growth hormone alone is not sufficient to establish the clinical conditions.

9. RESULTS

9.1. Note

Optical densities (O.D.) higher than 2.0 could be out of the measurement range of some microplate readers. It is therefore necessary, for O.D.s higher than 2.0, to perform a reading at 405 nm (=wavelength of peak shoulder) in addition to 450 nm (peak wavelength) and 620 (reference filter for the subtraction of interferences due to the plastic).

For microplate readers unable to read the plate at 3 wavelengths at the same time, it is advisable to proceed as follows:

- Read the microplate at 450 nm and at 620 nm.
- Read again the plate at 405 nm and 620 nm.
- Find out the wells whose ODs at 450 nm are higher than 2.0
- Select the corresponding ODs read at 405 nm and multiply these values at 405 nm by the conversion factor 3.0 (where $OD\ 450/OD\ 405 = 3.0$), that is: $OD\ 450\ nm = OD\ 405\ nm \times 3.0$

Warning: The conversion factor 3.0 is suggested only. For better accuracy, the user is advised to calculate the conversion factor specific for his reader.

9.2. Mean Absorbance

Calculate the mean of the absorbance (Em) for each point of the calibration curve (C₀-C₅) and of each sample.

9.3. Calibration curve – Automatic method

Use the 4 parameters logistic – preferred – or the smoothed cubic spline function as calculation algorithm.

9.4. Calibration curve – Manual method

A dose response curve is used to ascertain the concentration of growth hormone levels in unknown specimens.

Record the optical density (OD) obtained from the printout of the microplate reader.

Plot the OD for each duplicate calibrator versus the corresponding HGH concentration in $\mu\text{IU/mL}$ on linear graph paper (do not average the duplicates of the serum references before plotting).

Draw the best-fit curve through the plotted points.

To determine the concentration of HGH for an unknown, locate the average OD of the duplicates for each unknown on the vertical axis of the graph, find the intersecting point on the curve, and read the concentration (in $\mu\text{IU/mL}$) from the horizontal axis of the graph (the duplicates of the unknown may be averaged as indicated).

10. REFERENCE VALUES

Because of the pulsatile and sporadic nature of growth hormone secretion, reference intervals for basal values are without meaning. However, normal levels rarely have been reported above $150 \mu\text{IU/mL}$. Keeping in mind this premise, 175 apparently healthy adults were assayed the HGH immunoassay. The results are depicted in Table:

	N.	Mean $\mu\text{IU/mL}$	Range $\mu\text{IU/mL}$
Samples	175	9.1	0-55

Please pay attention to the fact that the determination of a range of expected values for a "normal" population in a given method is dependent on many factors, such as specificity and sensitivity of the method used and type of population under investigation. Therefore each laboratory should consider the range given by the Manufacturer as a general indication and produce their own range of expected values based on the indigenous population where the laboratory works.

Provocative tests for HGH response are normally used to assess the function of the anterior pituitary. Stimulatory procedures measure the secretion ability of the anterior pituitary to release HGH. Children suspected of growth retardation are common subjects for stimulatory testing. Several dynamic tests are available to induce HGH release: exercise, L-dopa administration, insulin tolerance test, and arginine infusion. Each laboratory should assess the normal response, but a peak HGH release in excess of $24 \mu\text{IU/mL}$ is probably normal in all cases.

Inhibitory testing measure the suppression of HGH release from the anterior pituitary. Inhibitory tests are useful in ascertaining growth hormone excess and the resulting conditions of gigantism and acromegaly. The glucose tolerance test is a dynamic test to measure growth hormone excess. The failure of HGH levels to fall below $1 \mu\text{IU/mL}$ within 60-120 minutes suggests excess HGH secretion.

11. PERFORMANCE AND CHARACTERISTICS

11.1. Precision

11.1.1. Intra Assay Variation

Within run variation was determined by replicate the measurements (24x) of three different control sera in one assay.

Sample	N.	X	σ	CV
Level 1	24	10.38	0.33	3.13%
Level 2	24	26.23	1.17	4.45%
Level 3	24	61.80	3.40	5.50%

11.1.2. Inter Assay Variation

Between run variations was determined by replicate (39x) the measurements of three different control sera in different lots of the kit.

Sample	N.	X	σ	CV
Level1	39	10.48	0.48	4.58%
Level2	39	26.08	1.77	6.79%
Level3	39	64.61	4.58	7.09%

11.2. Sensitivity

The lowest detectable concentration of HGH that can be distinguished from the Calibrator 0 is $0.105 \mu\text{IU/mL}$ at the 95% confidence limit.

11.3. Specificity

In order to assess the specificity of the antibody pair used for the HGH Elisa assay, massive doses of related analytes were spiked in a pool of patient sera:

Growth Hormone (HGH)	1.0000
Luteinizing Hormone (LH)	< 0.0001
Follicle Stimulating Hormone (FSH)	< 0.0001
Thyroid Stimulating Hormone (TSH)	< 0.0001
Prolactin Hormone (PRL)	< 0.0001
Chorionic gonadotropin (CG)	< 0.0001

11.4. Correlation with RIA method

The Dia.Metra HGH ELISA was compared to another commercially available HGH assay. Serum samples of 80 subjects were analysed according in both test systems. The linear regression curve was calculated:

$$(\text{HGH Dia.Metra}) = 0.091 + 0.98 * (\text{HGH RIA})$$

Correlation coefficient= 0.985

12. WASTE MANAGEMENT

Reagents must be disposed off in accordance with local regulations.

BIBLIOGRAPHY

1. Lewis, U.J., et al, Acta Paediatr, 125, 399 (1994).
2. Henry, J.D., Clinical Diagnosis and Management of Laboratory Methods, 324 (1996).
3. Frasier, S.D., Pediatrics., 53, 929 (1978).
4. Chevenne, D., et al, Horm. Res., 40, 168 (1993).
5. Dattani, M.T., et al J Endocrinol, 133, 447 (1992).
6. Merimee, T.J., et al, N Eng J Med., 276, 434 ((967).
7. Kraemer RR, et al Res Q Exerc Sport 64:69-74 (1993)
8. Tietz textbook of Clinical Chemistry (1999)
9. Ebdrup L., et al., Horm. Res., 51 Suppl. 1, 20 (1999)
- 10.Fisker S., et al., Scand J Clin Lab Invest , 58 (5), 373 (1998)
- 11.Winer LM, et al J Clin Endocrinol Metab 70:1678-1686 (1990)
- 12.Van der Berg G, J Clin Endocrinol Metab 81:2460-2467 (1996)
- 13.Albertsson-Wikland K, Analysis of 24-hour growth hormone profiles in healthy boys and girls of normal stature: relation to puberty

Ed. **03/2024**

DCM050-10

Dia.Metra S.r.l.

Via Pozzuolo 14,
06038 SPELLO (PG) Italy
Tel. +39-0742-24851
Fax +39-0742-316197
E-mail: info@diametra.com



DCM050-10
Ed. 03/2024

HGH ELISA

para análisis de rutina

Determinación inmunoenzimática directa de la hormona de crecimiento HGH en suero o plasma humano

IVD

LOT

Ver etiqueta externa

2°C 8°C

Σ = 96 ensayos

REF DKO050

USO PREVISTO

Método inmunoenzimático directo para la determinación cuantitativa de la concentración de la hormona de crecimiento HGH en suero y plasma.

El kit HGH ELISA está destinado al uso en laboratorio exclusivamente.

1. IMPORTANCIA CLÍNICA

La GH (hormona del crecimiento) es la hormona del desarrollo, es un polipéptido sintetizada y secretada por la glándula pituitaria anterior que regula la regeneración celular y el desarrollo de los vertebrados.

GH se libera en el torrente sanguíneo por la glándula pituitaria de manera discontinua bajo el control regulador de la somatostatina hipotalámica (SS) y el factor liberador de GH (GHRF). Estimuladores de la secreción de GH son el ejercicio, hipoglucemia, dieta rica en proteínas y estradiol. Los inhibidores de la secreción de GH son los hidratos de carbono en la dieta y los glucocorticoides.

Casi el 50% de la GH en la circulación se transporta desde la proteína de unión de GH (GHBP), que representa el dominio extracelular del receptor de GH.

La concentración plasmática de GH durante las pico puede variar de 5 a 30 ng/mL o más. Los picos suelen durar 10 a 30 minutos antes de regresar a los niveles basales. El mayor y el más predecible de estos picos de GH ocurre alrededor de una hora después del inicio del sueño. Hay muchas variaciones entre los días y las personas. La cantidad y la forma en que GH es secretada cambio durante toda la vida. Los altos niveles basales son típicas de la primera infancia. La amplitud y la frecuencia de los picos es mayor durante la pubertad. Los niños y adolescentes de buena salud tienen un promedio de alrededor de 8 picos por 24 horas. Los adultos tienen un promedio de alrededor de 5 picos. Los niveles basales, la frecuencia y la amplitud de la disminución de los picos a lo largo de la vida adulta.

Las principales acciones biológicas de la hormona es promover el desarrollo. La HGH tiene un efecto directo sobre los órganos diana como el cartílago, huesos y músculos, e indirectamente a través de la liberación de insulina-como factor de crecimiento (IGF), producida en el hígado. En particular, la

somatotropina C (IGF-1) es esencial para el crecimiento de los huesos durante la infancia. En general, la GH aumenta la síntesis de proteínas y estimula el desarrollo de todos los órganos internos, excepto el cerebro. GH reduce la absorción de la glucosa, la insulina tiene un efecto contrario en el hígado. GH también contribuye al mantenimiento y la función de los islotes pancreáticos. GH estimula el sistema inmunológico.

El exceso de GH puede causar un crecimiento excesivo, conocido como gigantismo hipofisario.

La falta de GH provoca problemas muy diferentes según la edad. En los niños, la interrupción del desarrollo y la altura son los pequeños eventos principales de la falta de GH. En los adultos, la falta de efectos son más sutiles y pueden incluir la falta de masa la fuerza, la energía y el hueso, así como el aumento del riesgo cardiovascular.

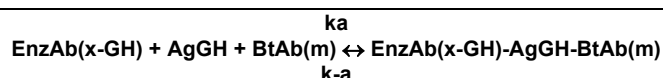
El diagnóstico de la falta de GH consiste en proceso de diagnóstico múltiple, por lo general culmina en las pruebas de estimulación de GH para ver si la glándula pituitaria del paciente va a lanzar un pulso de GH cuando provocada por diversos estímulos.

2. PRINCIPIO DEL MÉTODO

En este método, primero se añaden los calibradores, las muestras del paciente y/o los controles (conteniendo el antígeno de hGH nativo) a los pocillos sensibilizados con estreptavidina. Después se añaden los anticuerpos monoclonales biotinilados y marcados enzimáticamente, y se mezclan los reactivos: estos anticuerpos tienen alta afinidad y especificidad y están dirigidos contra varios determinantes antígenicos distintivos de hGH.

La reacción entre los distintos anticuerpos para hGH y la hGH nativa sucede en los micropocillos sin competencia ni interferencias estéricas, formando un complejo en 'sandwich' soluble.

La interacción se ilustra con la siguiente ecuación:



BtAb(m) = Anticuerpo monoclonal biotinilado (cantidad en exceso)

AgGH = Antígeno nativo (cantidad variable)

EnzAb(p) = Anticuerpo marcado enzimáticamente

(cantidad en exceso)

EnzAb(x-GH)-AgGH-BtnAb(m)= Complejo en sandwich

ka = Índice constante de asociación

k-a = Índice constante de disociación

Simultáneamente, el complejo se deposita en el pocillo debido a la reacción de alta afinidad entre la estreptavidina y el anticuerpo biotinilado. La interacción es la siguiente:

EnzAb(x-GH)-AgGH-BtAb(m) + Estrept.P. → Complejo inmovilizado

Estrept.P. = estreptavidina inmovilizada en el pocillo
Complejo inmovilizado = complejo en sandwich unido al pocillo.

Tras alcanzar el equilibrio, la fracción unida a anticuerpos se separa del antígeno sin unir por decantación o aspiración. La actividad de la enzima presente en la superficie del pocillo se cuantifica por la reacción con un sustrato adecuado para producir color.

La actividad enzimática de la fracción unida a anticuerpos es directamente proporcional a la concentración de antígeno nativo.

Con el uso de varias referencias de suero con valores antigénicos conocidos, se genera una curva de respuesta a dosis mediante la que se determina la concentración de antígeno desconocida.

3. REACTIVOS, MATERIALES E INSTRUMENTOS

3.1 Reactivos y materiales incluidos en el kit

1. Calibradores (6 frascos, 1 mL cada uno)

CAL0	REF DCE002/5006-0
CAL1	REF DCE002/5007-0
CAL2	REF DCE002/5008-0
CAL3	REF DCE002/5009-0
CAL4	REF DCE002/5010-0
CAL5	REF DCE002/5011-0

2. Control (1 frascos, 1 mL)

La concentración del Control se indica en el certificado de calidad (Certificate of Analysis)

REF DCE045/5003-0

3. Conjugado (1 frasco, 13 mL)

Anticuerpo anti HGH conjugado con peroxidasa de rábano (HRP) y anticuerpo anti-HGH biotinilado

REF DCE002/5002-0

4. Microplaca recubierta (1 microplaca divisible)

Microplaca sensibilizados con estreptavidina

REF DCE002/5003-0

5. Substrato TMB (1 frasco, 15 mL)

H₂O₂-TMB (0,26 g/L) (evítese el contacto con la piel).

ProClin <0,0015% REF DCE004-0

6. Solución de parada (1 frasco, 15 mL)

Ácido sulfúrico 0,15 mol/L (evítese el contacto con la piel)

REF DCE005-0

7. Solución de lavado conc. 50X (1 frasco, 20 mL)

NaCl 45 g/L; Tween-20 55 g/L ProClin >0,0015%

REF DCE006-0

3.2 Reactivos necesarios no incluidos en el kit

Agua destilada

3.3 Material e instrumental auxiliar

Dispensadores automáticos

Lector de microplacas (450 nm, 620-630 nm).

Notas

Conservar los reactivos a oscuras, a temperatura entre 2 y 8 °C.

Atemperar a temperatura ambiente la bolsa del reactivo 4 (microplaca recubierta) antes de abrirla; cerrarla de inmediato después de sacar las tiras que se han de utilizar; una vez abierta, permanece estable hasta la fecha de caducidad del kit.

4. ADVERTENCIAS

- Este kit de ensayo está previsto para usarse in vitro y por personal experto. No es para uso interno o externo en humanos o animales.
- Usar los equipos de protección individual previstos al trabajar con los reactivos suministrados.
- Siga las Buenas Prácticas de Laboratorio (GLP) en el manejo de las muestras sanguíneas y sus derivados.
- Algunos reactivos (solución de lavado) contienen pequeñas cantidades de ProClin™ 300 (>0,0015%, <0,06%) como conservante. Evite el contacto con la piel o las mucosas.
- Clasificación según Reglamento (UE) n° 1272/2008 [CLP]
Sensibilización cutánea, categoría 1



Atención

Contiene: ProClin 300

Indicaciones de peligro:

H317 - Puede provocar una reacción alérgica en la piel.

Consejos de prudencia:

P261 - Evitar respirar el polvo / el humo / el gas / la niebla / los vapores / el aerosol.

P280 - Llevar guantes / ropa de protección / equipo de protección para los ojos / la cara / los oídos.

P321 - Se necesita un tratamiento específico (ver instrucciones de primeros auxilios en esta etiqueta).

P333+P313 - En caso de irritación o erupción cutánea: Consultar a un médico.

P362+P364 - Quitar las prendas contaminadas y lavarlas antes de volver a usarlas.

- El cromógeno TMB contiene un irritante que puede ser dañino si se inhala, se ingiere o se absorbe a través de la piel. Para prevenir

lesiones, evitar la inhalación, la ingestión o el contacto con la piel y con los ojos.

- La solución de parada está formada por una solución de ácido sulfúrico diluido. El ácido sulfúrico es venenoso y corrosivo, y puede ser tóxico si se ingiere. Para prevenir posibles quemaduras químicas, evitar el contacto con la piel y con los ojos.
- Evite la exposición de los reactivos TMB/H₂O₂ a la luz solar directa, metales u oxidantes. No congelar la solución.
- Este método permite determinar concentraciones de HGH de 2 µIU/mL pg/mL a 150 µIU/mL.

5. PRECAUCIONES

- Respetar rigurosamente la secuencia de los pasos indicados en este protocolo. Los resultados aquí presentados se han obtenido utilizando los reactivos específicos que figuran en estas instrucciones de uso.
- Todos los reactivos deben conservarse a una temperatura controlada de 2-8°C en sus recipientes originales. Todas las excepciones están claramente marcados. Los reactivos son estables hasta la fecha de caducidad cuando se almacenan y manipulan de acuerdo con las instrucciones proporcionadas.
- Antes del uso, esperar hasta que todos los componentes del kit y las muestras se encuentren a temperatura ambiente (22-28°C) y mezclar cuidadosamente.
- No mezclar componentes de kits de lotes distintos. Se debe observar la fecha de caducidad indicada en la etiqueta de la caja y de todas las ampollas. No usar componentes después de la fecha de caducidad.
- Si utiliza un equipo automático, es responsabilidad del usuario asegurar que el equipo ha sido debidamente validada.
- Un lavado incompleto o impreciso y la aspiración insuficiente del líquido de los pocillos ELISA pueden causar una precisión pobre y/o un elevado fondo. Para mejorar el rendimiento del kit en los sistemas automatizados, se recomienda aumentar el número de lavados.
- Para la reproducibilidad de los resultados, es importante que el tiempo de reacción sea igual para cada pocillo. El tiempo de dispensación de los pocillos no debe superar los 10 minutos; si se prolongara más allá de los 10 minutos, respétese el orden de dispensación. Si utiliza más de una placa, se recomienda repetir la curva de calibración en cada plato.
- Al añadir el sustrato TMB inicia una reacción cinética que termina al agregar la solución de interrupción. Tanto el sustrato como la solución de interrupción deben agregarse en la misma secuencia para evitar diferentes tiempos de reacción.
- Observar las directrices para la ejecución del control de calidad en los laboratorios clínicos al comprobar controles y/o pool de sueros.
- Observar la máxima precisión en la reconstitución y dispensación de los reactivos.

- No use muestras con contaminación microbiana, altamente lipémicas o hemolizadas.
- Los lectores de microplacas leen las DO verticalmente, por tanto no debe tocarse el fondo de los pocillos.

6. PROCEDIMIENTO

6.1 Preparación de los Calibradores (C₀...C₅)

Los Calibradores son listo para usar y tienen las siguientes concentraciones:

	C ₀	C ₁	C ₂	C ₃	C ₄	C ₅
µIU/mL	0	2	10	25	50	150

Para muestras con una concentración superior a 150 µIU/mL, diluir la muestra con Calibrador 0.

Una vez abiertos, los Calibradores permanecen estables 6 meses conservados a 2-8°C.

6.2 Preparación de la solución de lavado.

Diluir el contenido de la botella de "Solución de lavado conc. 50X" con agua destilada o desionizada hasta obtener un volumen final de 1000 mL; utilizar un recipiente adecuado para la conservación. Para preparar volúmenes menores, respetar la relación de dilución de 1:50. La solución de lavado diluida se mantiene estable a 2-8°C durante al menos 30 días.

6.3 Preparación de la muestra

Las muestras deben ser de sangre en tipo sérico y es

necesario observar las precauciones usuales en las muestras obtenidas por venipunción.

Para una comparación precisa con los valores normales establecidos, las muestras de suero deben obtenerse en ayunas matinal.

Para el suero, la sangre debe recogerse en un tubo de venipunción sin aditivos o anticoagulantes. Deje que la sangre coagule. Centrifugue la muestra para separar el suero de las células.

Las muestras se pueden conservar refrigeradas a 2-8°C durante un máximo de (5) días. Si no es posible analizarlas en dicho periodo de tiempo, se pueden conservar a una temperatura de -20°C durante 30 días. Evite los ciclos de congelación y descongelación repetidos.

Para analizar duplicados se requiere 0,100 mL de la muestra. El Control está listo para usar.

6.4 Procedimiento

- **Esperar hasta que todos los reactivos se encuentren a temperatura ambiente (22-28°C) durante al menos 30 minutos.** Al final del ensayo inmediatamente poner todos los reactivos a 2-8°C para evitar largos periodos a temperatura ambiente.
- Las tiras de pocillos no utilizados se deben guardar de inmediato en la bolsa desechable que contiene desecantes y almacenarse a 2-8°C.
- Para evitar la contaminación microbiana y/o química no regrese porciones de reactivos no usados en los viales originales.
- Para aumentar la precisión de los resultados de la prueba es necesario trabajar en duplicado:

preparar dos pocillos para cada punto de la curva de calibración (C₀-C₅), dos para cada control, dos para cada muestra, uno para el blanco.

Reactivo	Calibrador	Muestra/ Control	Blanco
Calibrador C ₀ -C ₅	50 µL		
Muestra/ Control		50 µL	
Conjugado	100 µL	100 µL	
Incubar 1 h a temperatura ambiente (22÷28°C). Retirar la mezcla de reacción. Lave los pozos 3 veces con 0,3 mL de solución de lavado diluida. Nota importante: agite suavemente la placa durante 5 segundos en cada paso del lavado. Después del último lavado asegúrese haber eliminado completamente la solución de lavado de los pozos, invierta la placa y golpéela repetidas veces contra una servilleta de papel absorbente. Lavados automático: si está utilizando una lavadora automática, lavar los pocillos al menos 5 veces.			
TMB Substrato	100 µL	100 µL	100 µL
Incubar 15 minutos a temperatura ambiente (22÷28°C), protegida de la luz.			
Solución de parada	100 µL	100 µL	100 µL
Agitar suavemente la placa. Leer la absorbancia (E) a 450 nm frente una segunda lectura de referencia a 620-630 nm o frente al blanco entre 5 minutos.			

7. CONTROL DE CALIDAD

Cada laboratorio debe analizar las muestras a niveles de los rangos bajo, medio y alto de hGH para supervisar el rendimiento del análisis. Estas muestras deben tratarse como desconocidas y los valores deben determinarse en cada ensayo realizado. Se deben mantener los gráficos de control de calidad para seguir el rendimiento de los reactivos suministrados. Se deben emplear métodos estadísticos adecuados para determinar las tendencias. El laboratorio debe establecer los límites de aceptabilidad del rendimiento del análisis. Entre otros parámetros que se deben controlar, se incluyen las intersecciones de 80, 50 y 20% de la curva de calibración para evaluar la reproducibilidad. Además, la capacidad de absorción máxima debe ser constante con la experiencia anterior. Una desviación significativa del rendimiento establecido puede indicar un cambio inadvertido en las condiciones experimentales o la degradación de los reactivos del kit. Se deben usar reactivos frescos para determinar la causa de las variaciones.

8. LIMITACIONES DEL PROCEDIMIENTO

8.1 Rendimiento del análisis

Los pacientes con tratamiento sustitutivo de hGH pueden desarrollar anticuerpos para hGH que interfieren en el ensayo y producen valores falsos bajos. Las variaciones genéticas o los productos de desecho pueden alterar las características de unión de anticuerpos y tener efecto en los resultados finales.

Dichas muestras pueden ofrecer resultados incongruentes en distintos ensayos que utilicen anticuerpos y que no reconozcan los mismos determinantes antigénicos.

La secreción de la hormona de crecimiento sigue un ritmo circadiano que se caracteriza por descargas pulsátiles discontinuas con periodos de latencia durante el día en que los niveles de hGH son indetectables. Los niveles más altos se suelen alcanzar, en dos descargas principales, a la una o dos horas de sueño. Otros estímulos fisiológicos de la hormona de crecimiento son el estrés, el ejercicio, los alimentos de alto contenido proteico y la hipoglucemia.

La hiperglucemia inhibe la secreción de la hormona de crecimiento. La edad es un factor importante en su concentración. En el momento del nacimiento, la hGH es alta y suele declinar con la edad, a excepción de su incremento durante la fase de crecimiento de la adolescencia. Típicamente, las mujeres tienen un nivel el 50% más alto que los varones de la misma edad.

Como la concentración de hormona de crecimiento es pulsátil y esporádica durante el transcurso del día (además de tener una corta vida media), los niveles aleatorios en suero individuales no ofrecen información clínica útil. Para solucionar este problema, se utilizan pruebas de provocación con estimulación fisiológica o farmacológica para inducir la secreción o la inhibición de hGH. Por estos motivos, la determinación de la hormona de crecimiento no es suficiente, por sí misma, para evaluar el estado clínico del paciente.

9. RESULTADOS

9.1 Notas

Las densidades ópticas (DO) de más de 2,0 no están incluidas en el rango de medición de algunos lectores de microplaca. Por consiguiente, en tales casos es necesario realizar una lectura a 405 nm (= longitud de onda de entrada pico), además de a 450 nm (longitud de onda pico) y 620 (filtro de referencia para la disminución de interferencias debidas al plástico).

Cuando se utilizan lectores de microplaca no aptos para la lectura de placas a tres longitudes de onda simultáneamente, se aconseja realizar lo siguiente:

- Realice una lectura a 450 nm y a 620 nm.
- Vuelva a realizar la lectura de la placa a 405 nm y 620 nm.
- Identifique los pocillos cuya DO a 450 nm es superior a 2,0.
- Seleccione las densidades ópticas

correspondientes a 405 nm y multiplique estos valores por el factor de conversión 3,0 (donde $DO_{450}/DO_{405} = 3,0$) como sigue:
 $DO_{450\text{ nm}} = DO_{405\text{ nm}} \times 3,0$

Advertencia: Aunque el factor de conversión sugerido es 3,0 se recomienda calcular el factor específico del lector empleado para obtener resultados más precisos.

9.2 Absorbancia media

Calcular la extinción media (E_m) de cada punto de la curva de calibración (C_0 - C_5) y de cada muestra.

9.3 Curva de calibración - método automatizado

Utilice la logística de 4 Parameters (preferentemente), o la función spline cúbica de suavizado como algoritmo de cálculo.

9.4 Curva de calibración - método manual

Se utiliza una curva de respuesta de dosis para determinar la concentración de los niveles de hormona de crecimiento en muestras no conocidas.

Registre la densidad óptica (DO) obtenida del resultado impreso del lector de microplaca.

Trace la DO de cada calibrador por duplicado por comparación con la concentración de HGH en $\mu\text{IU/mL}$ respectiva en papel gráfico lineal (no promedie los duplicados de las referencias de suero antes de trazar la gráfica).

Dibuje la curva por los puntos trazados.

Para determinar la concentración de HGH de una muestra no conocida, localice la DO media de los duplicados de cada muestra no conocida en el eje vertical de la gráfica, encuentre el punto de intersección en la curva y lea la concentración (en $\mu\text{IU/mL}$) en el eje horizontal (los duplicados de la muestra no conocida se pueden promediar como se indica).

10. VALORES DE REFERENCIA

Debido a la naturaleza pulsátil y esporádica que tiene la secreción de la hormona de crecimiento, los intervalos de referencia para los valores basales no tienen significado real. Sin embargo, los niveles normales superiores a $150\text{ }\mu\text{IU/mL}$ se dan en raras ocasiones.

Con estos principios, se analizaron 75 adultos aparentemente sanos con el inmunoensayo de hGH. Los resultados se muestran en la tabla:

	N	Media $\mu\text{IU/mL}$	Rango $\mu\text{IU/mL}$
Muestras	175	9.1	0-55

Es importante señalar que la determinación de un rango de valores esperados en un método dado para una población "normal" depende de muchos factores, tales como la especificidad y sensibilidad del método en uso, y la población en estudio. Por lo tanto, cada laboratorio debe considerar el intervalo especificado por el fabricante como una guía general y producir su propio rango de valores calculados en base al

estadístico obtenido por el laboratorio, donde reside la población local.

Las pruebas provocadoras de respuesta hGH se utilizan normalmente para observar la función en la adenohipófisis. Los procedimientos de estimulación miden la capacidad de secreción de hGH. Los niños con sospecha de crecimiento retardado son candidatos usuales para las pruebas de estimulación.

Hay distintas pruebas dinámicas disponibles para inducir la liberación de HGH: ejercicio físico, administración de L-dopa, prueba de tolerancia a insulina e infusión de arginina. Cada laboratorio debe evaluar la respuesta normal, aunque una liberación pico de hGH superior a $24\text{ }\mu\text{IU/mL}$ será normal en casi todos los casos.

Las pruebas de inhibición miden la supresión de liberación de hGH en la adenohipófisis. Estas pruebas son útiles para detectar el exceso de hormona de crecimiento y las condiciones de gigantismo y acromegalia que resultan.

La prueba de tolerancia a glucosa es una prueba dinámica para medir el exceso de hormona de crecimiento. Si los niveles de hGH no caen por debajo de $1\text{ }\mu\text{IU/mL}$ en 60-120 minutos, esto puede sugerir una secreción de hGH excesiva.

11. CARACTERÍSTICAS DEL ENSAYO

11.1 Precisión

11.1.1 Intra ensayo

La variabilidad dentro del mismo kit se determinó repitiendo (24x) tres niveles diferentes de sueros de control.

Muestra	N.	X	σ	CV
1	24	10,38	0,33	3,13%
2	24	26,23	1,17	4,45%
3	24	61,80	3,40	5,50%

11.1.2 Entre ensayos

La variabilidad entre kits diferentes se determinó repitiendo (39x) tres niveles diferentes de suero de control con dos kit de lotes diferentes.

Muestra	N.	X	σ	CV
1	39	10,48	0,48	4,58%
2	39	26,08	1,77	6,79%
3	39	64,61	4,58	7,09%

11.2 Sensibilidad

La concentración mínima de HGH detectable que puede distinguirse del Calibrador 0 es de $0.105\text{ }\mu\text{IU/mL}$ con un límite de confianza del 95%.

11.3 Especificidad

La reactividad cruzada del método EIAgen hGH a distintas sustancias seleccionadas se evaluó con la adición de la sustancia interferente a una matriz de sueros en concentraciones distintas:

Hormona de crecimiento (HGH)	1,0000
Hormona luteneizante (LH)	< 0,0001
Hormona foliculoestimulante (FSH)	< 0,0001
Hormona estimuladora de tiroides (TSH)	< 0,0001
Hormona Prolactina (PRL)	< 0,0001
Gonadotropina corionica (CG)	< 0,0001

11.4 Correlación

El kit HGH ELISA Dia.Metra fue comparado con otro ensayo comercial de HGH. Se analizaron 80 muestras de suero.

Se calculó la curva de regresión lineal:

$$(\text{Dia.Metra}) = 0.98 \cdot (\text{RIA}) + 0.091$$

$$r^2 = 0,985$$

12. INDICACIONES PARA LA ELIMINACIÓN

Eliminar los reactivos conforme con la normativa local sobre la materia.

BIBLIOGRAFÍA

1. Lewis, U.J., et al, Acta Paediatr, 125, 399 (1994)
2. Henry, J.D., W.B. Saunders Company, 324 (1996)
3. Frasier, S.D., Pediatrics., 53, 929 (1978)
4. Chevenne, D., et al, Horm. Res., 40, 168 (1993)
5. Dattani, M.T., et al J Endocrinol, 133, 447 (1992)
6. Merimee, T.J., et al, N Eng J Med., 276, 434 (1967)
7. Kraemer RR, et al Res Q Exerc Sport 64:69-74 (1993)
8. C. Burtis et al Textbook of Clinical Chemistry, ed. W.B. Saunders Company (1999)
9. Ebdrup L., et al., Horm. Res., 51 Suppl. 1, 20 (1999)
10. Fisker S., et al., Scand J Clin Lab Invest , 58 (5), 373 (1998)
11. Winer LM, et al J Clin Endocrin Metab 70:1678-1686 (1990)
12. Van der Berg G, J Clin Endocrin Metab 81:2460-2467 (1996)
13. Albertsson-Wikland K, et al J Clin Endocrinol Metab 78:1195-1201 (1994)

	DE <i>In vitro</i> Diagnostikum ES Producto sanitario para diagnóstico <i>In vitro</i> FR Dispositif médical de diagnostic <i>in vitro</i> EN <i>In vitro</i> Diagnostic Medical Device IT Dispositivo medico-diagnostico <i>in vitro</i> PT Dispositivos medicos de diagnostico <i>in vitro</i>		DE Hergestellt von ES Elaborado por FR Fabriqué par EN Manufacturer IT Produttore PT Produzido por
	DE Achtung, Begleitdokumente ES Precaución, consulte los documentos adjuntos FR Attention, veuillez consulter les documents d'accompagnement EN Caution, consult accompanying documents IT Attenzione, consultare la documentazione allegata PT Atenção, consultar os documentos de acompanhamento	 yyyy-mm	DE Herstellungs datum ES Fecha de fabricacion FR Date de fabrication EN Date of manufacture IT Data di produzione PT Data de produção
 yyyy-mm-dd	DE Verwendbar bis ES Estable hasta (usar antes de último día del mes) FR Utiliser avant (dernier jour du mois indiqué) EN Use by (last day of the month) IT Utilizzare prima del (ultimo giorno del mese) PT Utilizar (antes ultimo dia do mês)		DE Biogefährdung ES Riesco biológico FR Risque biologique EN Biological risk IT Rischio biologico PT Risco biológico
	DE Gebrauchsanweisung beachten ES Consultar las instrucciones FR Consulter le mode d'emploi EN Consult instructions for use IT Consultare le istruzioni per l'uso PT Consultar instruções para uso		DE Chargenbezeichnung ES Código de lote FR Numero de lot EN Batch code IT Codice del lotto PT Código do lote
 $\Sigma = xx$	DE Ausreichend für "n" Tests ES Contenido suficiente para "n" tests FR Contenu suffisant pour "n" tests EN Contains sufficient for "n" tests IT Contenuto sufficiente per "n" saggi PT Contém o suficiente para "n" testes		DE Inhalt ES Contenido del estuche FR Contenu du coffret EN Contents of kit IT Contenuto del kit PT Conteúdo do kit
 Max Min	DE Temperaturbereich ES Limitación de temperatura FR Limites de température de conservation EN Temperature limitation IT Limiti di temperatura PT Temperaturas limites de conservação		DE Bestellnummer ES Número de catálogo FR Références du catalogue EN Catalogue number IT Numero di Catalogo PT Número do catálogo
	DE Vor direkter Sonneneinstrahlung schützen ES Mantener alejado de la luz solar FR Tenir à l'écart de la lumière du soleil EN Keep away from sunlight IT Tenere lontano dalla luce solare PT Mantenha longe da luz solar		