

hGH - ELISA

(human Growth Hormone; humanes Wachstumshormon; Somatropin)

**Enzymimmunoassay für die quantitative Bestimmung
von
humanem Wachstumshormon**

**Produkt-Nr.: E02
(96 Bestimmungen)**



DE/CA40/809/19

für In-vitro-Diagnostik
IVD zum Gebrauch durch Fachpersonal!



Gesellschaft für Forschung und Herstellung von Diagnostika GmbH

Aspenhastr. 25 • D-72770 Reutlingen / Germany
Telefon: + 49 - (0) 7121 51484-0 • Fax: + 49 - (0) 7121 51484-10
E-Mail: contact@mediagnost.de • <http://www.mediagnost.de>

Inhaltsverzeichnis

KLINISCHE BEDEUTUNG	3
TECHNISCHE EIGENSCHAFTEN + EINSATZMÖGLICHKEITEN	3
EINFÜHRUNG	4
METHODIK	6
Assay Eigenschaften und Validierung	6
Proben: Eignung, Vorbereitung und Lagerung	8
MATERIALIEN	9
Inhalt der Testpackung	9
TECHNISCHE HINWEISE	11
Zusätzlich benötigte Materialien	10
SICHERHEITSHINWEISE	13
Allgemein	13
TESTDURCHFÜHRUNG	15
AUSWERTUNG	16
Berechnung der Standardkurve	16
Interpretation der Ergebnisse	18
Referenzwerte	18
LITERATUR	19
KURZANLEITUNG – Mediagnost hGH-ELISA E02	20

Vor Gebrauch ist die gesamte Packungsbeilage zu lesen!

KLINISCHE BEDEUTUNG

Die Bestimmung von humanem Wachstumshormon (hWH; hGH, Somatotropin) erfolgt im Rahmen der Diagnostik zum Nachweis des Wachstumshormon-Mangels oder des Wachstumshormon-Exzess (Akromegalie). Während bzw. nach der chirurgischen und/oder medikamentösen Therapie einer Akromegalie werden GH (und IGF-I) Messungen zur Erfolgssicherung eingesetzt.

TECHNISCHE EIGENSCHAFTEN + EINSATZMÖGLICHKEITEN

Der Mediagnost **hGH ELISA E02** -

- ist geeignet für hGH-Bestimmungen in **Serum**- und **Plasma**proben (native Proben, hGH Profilmessungen, Proben aus Stimulations- bzw. Suppressionstesten)
- ist gegen den **Referenzassay** der KIGS/IGLU Studie, in house-RIA der Kinderklinik Tübingen, kalibriert (vergl. Lit. 1.)
- ist durch die hohe **Sensitivität** (0,25 ng/ml \cong 250 pg/ml) auch geeignet z.B. für Messungen in Zellkulturen oder in Nicht-Serumproben (z.B. hGH-Urin-Ausscheidungsteste). Bei Bedarf steht für hoch-sensitive Messungen der Mediagnost ELISA hGH SENSITIV E022 zur Verfügung (Sensitivität 0,0016 ng/ml \approx 1,6 pg/ml)
- ist schnell: Inkubationszeit insgesamt nur 2,25 Stunden und verwendet hochaffine polyklonale Antikörper gegen 22kDA rekombinantes hGH
- ist kalibriert mit rekombinantem hGH (2. Internationaler Standard, **NIBSC 98/574**; vergl. Lit. 6.):
Einzel-Standards mit **1, 5, 10, 15 bzw. 25 ng/ml** sind im Kit enthalten, die Kontrollseren KS1 und KS2 bestehen aus humanem Serum.

EINFÜHRUNG

(vergl. Literatur 2 – 5)

Das System des Wachstumshormons (Synonyme: Somatotropin, Growth Hormone [GH]) ist durch eine außerordentliche Komplexität gekennzeichnet. Wachstumshormon ist das Genprodukt des GH-1 Gens auf Chromosom 17 der somatotropen Hypophysenzellen. Das Genprodukt (80%) ist ein nicht-glycolysiertes Protein von 22kDa (191 Aminosäuren). Durch einen alternativen Syntheseweg wird auch eine 20 kDa große GH-Variante (20%) gebildet. Darüber hinaus gibt es eine Vielfalt kleinerer Varianten, posttranslationale Veränderungen und Aggregate in der Zirkulation. Im Blut liegt GH zudem auch an ein GH-Bindungsprotein (GHBP) gebunden vor, welches die extrazelluläre Domäne des membranständigen GH-Rezeptors ist. Hierdurch kann die Halbwertszeit des Hormons ebenso verändert werden wie seine zelluläre Interaktion. Wachstumshormon ist spezies-spezifisch.

Die Sekretion des GH ist ebenso vielfältigen Einflüssen unterworfen. Spontan erfolgt die Sekretion pulsatil (1 Puls alle 3 Stunden) mit einem Maximum während des Nachtschlafs. Eine Reihe physiologischer (körperliche Belastung) und artifizierlicher (Hypoglykaemie, Aminosäuren) Reize führt zur GH-Sekretion, vermittelt durch die hypothalamischen Hormone Somatostatin und GH-Releasing Hormon (GHRH). Die sezernierte Menge des GH wird beeinflusst durch das Alter, Sexualsteroiden, den Ernährungszustand, Krankheitszustände und Emotionalität. Wegen dieser vielfältigen Einflussvarianten besteht keine eindeutige Klarheit über das normale quantitative Sekretionsverhalten.

Die physiologischen Funktionen von GH sind gleichermaßen vielfältig. Diese Funktionen werden zum Teil durch die vom GH abhängigen Insulin-ähnlichen Wachstumsfaktoren (IGFs), teils unabhängig davon vermittelt. Im Kindes- und Jugendalter ist das GH-System der Hauptregulator des Wachstums. Bei einem völligen Fehlen des GH wird der Mensch nur etwa 120 cm groß. Darüber hinaus hat GH einen ausgeprägten anabolen Effekt auf Muskulatur, Bindegewebe, Knochen und

verschiedene spezifische Organe (z.B. Herz, Darm) und wirkt lipolytisch.

Die Extreme der GH Sekretion bestimmen die klinische Pathologie. Im Kindesalter ist es der Mangel an Wachstumshormon – angeboren oder erworben – welcher zu einem dauerhaften Kleinwuchs führt. Beim klinischen Verdacht muss der GH Mangel mittels GH Stimulationstest oder durch Untersuchung der spontanen GH Sekretion bewiesen werden. Die Ersatztherapie mit rekombinantem menschlichen GH führt zur Normalisierung des Wachstums. Im Erwachsenenalter ist der GH Mangel meist durch Hypophysenadenome (und ihre chirurgische Entfernung) bedingt. Der GH Mangel des Erwachsenen führt zu einem typischen Krankheitsbild, welches einem vorgezogenen Alterungsprozess entspricht (Adipositas, Muskelschwäche, Atherosklerose, Osteoporose, Adynamie). Die Ersatzbehandlung ist beim schweren GH Mangel des Erwachsenen eine anerkannte, effektive Therapieform. Die Wirkung der Behandlung wird direkt oder indirekt durch IGF-Messungen im Blut überprüft.

Eine exzessive GH Sekretion durch ein Hypophysenadenom führt (selten) beim Kind zum Gigantismus, beim Erwachsenen zur sogenannten Akromegalie, welche zur Vergrößerung der Akren sowie langfristig zum Diabetes mellitus, einer Herzinsuffizienz und Tumoren führen kann. Die Therapie besteht in der operativen Entfernung des Tumors. Falls diese nicht oder nur inkomplett gelingt, erfolgt eine medikamentöse Therapie mittels Somatostatinpräparaten, welche die GH Produktion des Tumors beeinträchtigen, oder neuerdings mittels GH Analogen wie Pegvisomant, welche mit dem GH Rezeptor interagieren, jedoch keine Wirkung ausüben.

METHODIK

Assay Eigenschaften und Validierung

Der Mediagnost ELISA für hGH E02 ist ein sogenannter Sandwich-Assay. Er verwendet ein spezifisches, hochaffines polyklonales Kaninchen Antiserum. Das an die Mikrotiterplatte gekoppelte Antiserum bindet das hGH aus der Probe, welches im nachfolgenden Schritt vom biotinylierten anti-hGH-Antiserum erkannt wird. Danach bindet ein Streptavidin-Peroxidase-Enzymkonjugat hochspezifisch am Biotin des anti-hGH-Antiserums und katalysiert in der abschließenden Substratreaktion den Farbumschlag, quantitativ abhängig vom hGH-Gehalt der Proben.

Die Standards des ELISA E02 bestehen aus rekombinantem humanem Wachstumshormon in Konzentrationen von **1, 5, 10, 15 und 25 ng/ml** (nano Gramm/ml, entsprechend **3, 15, 30, 45 und 75 µIU/ml**, s. u.).

Als Standardmaterial wurde der 2. Internationale Standard für hGH, **NIBSC Code 98/574 (6)** verwendet. Der Internationale Standard wurde in einer internationalen Studie im Jahre 2001 mit 3 Internationalen Einheiten pro mg Protein (3 IU/mg) definiert. Im Rahmen aktueller Standardisierungsbemühungen für hGH Immunoassays wird neuerdings dessen ausschließliche Verwendung empfohlen (7,8) !

Die **Wiederfindung** des rekombinanten hGH betrug in einer Puffermatrix 100%. In verschiedenen Human-Seren und humanen Urin-Proben wurden zwischen 94 % und 110 % der theoretisch zu erwartenden Menge gefunden.

Der Mediagnost hGH ELISA E02 ist über einen sehr weiten Bereich verdünnungsecht. Die Linearität von Serenverdünnungen ist hervorragend:

Tabelle 1: Verdünnungslinearität

(hier: typische Ergebnisse dreier verschiedener Seren,
Werte in ng/ml)

Verdünnung:	Probe 1:	Probe 2:	Verdünnung:	Probe 3:
unverdünnt	14,1	11,0	1:30	845,3
1:2	16,5	12,0	1:60	778,5
1:4	16,2	12,2	1:120	732,4
1:8	16,0	12,2	1:240	664,1
1:16	15,1	13,9	1:480	738,0
1:32	14,5	12,8	1:960	733,4
1:64	14,9	12,8		
MW / 1 SA	15,3 / 0,92	12,4 / 0,88	MW / 1 SA	748,6 / 60,0
VK %	5,98	7,07	VK %	8,01

MW = Mittelwert, SA = Standardabweichung, VK = Variationskoeffizient %

Die **analytische Sensitivität** des ELISA E02 beträgt **0,25 ng/ml** (250 pg/ml, entsprechend 30 pg pro Vertiefung; zweifache Standardabweichung des Null-Standards in 16facher Bestimmung).

Die **Inter- und Intra-Assay** Variationskoeffizienten sind **kleiner als 7,0% bzw. 5,0%**. Beispielhafte Bestimmungen sind in Tabelle 2 und Tabelle 3 dargestellt.

Tabelle 2 : Inter-Assay-Varianz

	Anzahl der unabh. Durchführungen	Mittelwert (ng/ml)	Standardabweichung (ng/ml)	VK (%)
Probe 1	10	2,57	0,15	5,68
Probe 2	10	5,80	0,31	5,38
Probe 3	10	10,86	0,72	6,62

Tabelle 3: Intra-Assay-Varianz

	Anzahl der Bestimmungen	Mittelwert (ng/ml)	Standardabweichung (ng/ml)	VK (%)
Probe 1	16	5,84	0,27	4,70
Probe 2	16	14,92	0,55	3,68

Proben: Eignung, Vorbereitung und Lagerung

Geeignet sind Serum- und Plasmaproben (in korrespondierenden Serum-, Heparinplasma-, EDTA- bzw. Citrat-Plasma-Proben wurden keine signifikanten Abweichungen im hGH-Gehalt gefunden). Übliches Zellkulturmedium wurde als geeignet gefunden. Eine spezielle externe Probenvorbehandlung ist nicht nötig.

Generell sollten Proben so schnell wie möglich nach der Abnahme gekühlt werden. Falls zwischen Abnahme und Bestimmung ein längerer Zeitraum liegt, sollten die unverdünnten Proben bei -20°C oder kälter in fest verschließbaren Plastikgefäßen aufbewahrt werden. Wiederholtes Einfrieren und Auftauen von Serum/Plasma sollte prinzipiell vermieden werden (gegebenenfalls subaliquotieren) einige Zyklen (5x) haben in unseren Versuchen jedoch auf die messbare hGH Konzentration keine Auswirkungen gehabt.

Für die meisten Untersuchungen (Serum- oder Plasmaproben und keine Extremwerte zu erwarten) ist der **Einsatz von 20 µl unverdünnter Probe** optimal geeignet. Die hGH-Konzentrationen in anderen humanen Körperflüssigkeiten und in Kulturüberständen können stark von den Serumwerten abweichen.

Gegebenenfalls können Proben in Verdünnungspuffer VP verdünnt werden. Für die Bestimmung von Proben mit sehr geringem hGH-Konzentrationen kann der Mediagnost hGH-SENSITIV ELISA E022 besser geeignet sein (Sensitivität 0,0016 ng/ml \approx 1,6 pg/ml)!

MATERIALIEN

Inhalt der Testpackung

- 1) **Mikrotiterplatte**, gebrauchsfertig, Mikrotiterplatte mit **96 Vertiefungen**, die in 12 abnehmbare Streifen à 8 Vertiefungen (**einzeln abbrechbar**) aufgeteilt ist. Die Platte ist mit einem Antikörper gegen humanes Wachstumshormon beschichtet.
- 2) **Standards A-E, 750 µl** gebrauchsfertig, enthalten rekombinantes hGH (NIBSC 98/574). Die Standardkurve deckt einen Bereich von **1 bis 25 ng/ml** (1, 5, 10, 15 und 25 ng/ml) hGH ab. Für den Assay werden jeweils 20 µl pro Vertiefung eingesetzt.
- 3) **Verdünnungspuffer VP, 30 ml**, gebrauchsfertig, bitte für die Verdünnung der Proben verwenden.
- 4) **Kontrollseren KS1 und KS2**, je **750 µl**, gebrauchsfertig, enthalten humanes Serum. Die hGH Soll-Konzentrationen und die Schwankungsbereiche sind auf dem jeweiligen Etikett angegeben. Sie sollten im Assay in der gleichen Verdünnung wie die jeweiligen Proben bestimmt werden, i.a. also unverdünnt mit je 20 µl pro Vertiefung.
- 5) **Antikörperkonjugat AK, 12 ml**, gebrauchsfertige Lösung, enthält biotinylierten anti-hGH Antikörper.
Es werden 100 µl pro Vertiefung eingesetzt.

- 6) **Enzymkonjugat EK, 12 ml**, gebrauchsfertige Lösung, enthält POD(Meerrettich-Peroxidase)-markiertes Streptavidin
Es werden 100 µl pro Vertiefung eingesetzt.
- 7) **Waschpuffer WP, 50 ml**, 20-fach konzentrierte Lösung, bitte **vor Gebrauch 1:20 mit A.dest.** oder entmineralisiertem Wasser verdünnen (z.B. den gesamten Flascheninhalt von 50 ml im Standzylinder auf 1000 ml auffüllen). Achtung: Endverdünnt ist der Waschpuffer nur 4 Wochen bei 4°C haltbar, bitte nur nach Bedarf ansetzen.
- 8) **Substrat S, 12 ml**, gebrauchsfertig, Meerrettich-Peroxidase-(POD)-Substrat, stabilisiertes H₂O₂-Tetramethylbenzidin. Es werden 100 µl pro Vertiefung eingesetzt.
- 9) **Stopplösung SL, 12 ml**, gebrauchsfertig, 0,2 M Schwefelsäure. Es werden 100 µl pro Vertiefung eingesetzt.
- 10) **Abdeckfolie** für Mikrotiterplatten, 2 Stück, selbstklebend.

Zusätzlich benötigte Materialien

Destilliertes oder entmineralisiertes Wasser zum Verdünnen des Waschpuffers WP

Mikropipetten und Mehrkanal-Pipetten mit auswechselbaren Einmalspitzen

Vortex-Mischgerät

Mikrotiterplattenschüttler (350 rpm)

Mikrotiterplattenwasher (empfohlen)

Photometer für Mikrotiterplatten ("ELISA-Reader"), Filter bei 450 und ≥590 nm

TECHNISCHE HINWEISE

Der Assay ist strikt nach dem Testprotokoll durchzuführen.

Reagenzien mit unterschiedlichen Lot-Nummern sollten nicht vermischt werden. Die Testplatte und alle Reagenzien sind ungeöffnet lichtgeschützt und bei 2° - 8°C gelagert mindestens haltbar bis zum Verfallsdatum (s. Etikett).

Bei sachgemäßer Handhabung ist die **Haltbarkeit der Reagenzien nach Öffnung** nicht beeinträchtigt. Nicht verwendete Streifen der Testplatte sind zusammen mit dem Trockenkissen luftdicht bei 2° - 8°C zu lagern.

Der 1:20 gebrauchsfertig verdünnte Waschpuffer WP ist nur 4 Wochen bei 4°C haltbar, bitte nur nach Bedarf ansetzen.

Alle Komponenten des Kits müssen **vor Gebrauch auf Raumtemperatur** gebracht werden, die evtl. in manchen Puffern vorhandenen Präzipitate müssen ggfs. vor Gebrauch durch Mischen und Erwärmen wieder gelöst werden.

Inkubation bei Raumtemperatur bedeutet: Inkubation bei 20 - 25°C.

Die Inkubationen sollen geschüttelt bei mittlerer Umdrehungsfrequenz eines für Mikrotiterplatten geeigneten Schüttlers erfolgen. Wir empfehlen 350 rpm. Bauartbedingt können individuell Abweichungen von diesem Wert möglich sein, dann muss die Umdrehungsfrequenz angepasst werden. Zu geringes Schütteln kann durch ungenügende Vermischung der Lösungen zu verringerten optischen Dichten, hohen Streuungen und/oder falschen Werten führen, zu starkes Schütteln dagegen zu erhöhten optischen Dichten und/oder falschen Werten.

Korrektes Waschen ist von grundlegender Bedeutung für den sicheren, richtigen und präzisen Ablauf des Testes. Ungenügendes Waschen ist eine häufige Ursache für nicht valide Testdurchführungen.

Mögliche Folgen sind unkontrollierte unspezifische Variationen der gemessenen optischen Dichten, die zu falschen Ergebnisberechnungen der Proben führen können. Mögliche Hinweise darauf sind z.B. hohe Leerwerte und variabel streuende Messwerte.

Zum Waschen muss der mitgelieferte und auf Gebrauchskonzentration verdünnte Waschpuffer verwendet werden. Das Waschvolumen pro Waschzyklus und Vertiefung muss mindestens 300 µl betragen.

Die mögliche Gefährdung durch den Umgang mit zumindest potentiell infektiösem Material muss beachtet werden.

Bei Gebrauch eines speziellen automatischen Mikrotiterplattenwashers ist unbedingt dessen Gebrauchsanweisung zu befolgen. Die Geräteeinstellungen müssen u.a. der Mikrotiterplattengeometrie und den Parametern der Waschspezifikation angepasst werden. Es ist zu beachten, dass die Dispensier- und Absaugkapillaren des Gerätes nicht die Oberfläche der Vertiefungen der Mikrotiterplatte beschädigen. Die verbleibende Restflüssigkeit nach jedem Absaugen muss minimiert werden. Nach Ende des gesamten Waschvorganges sollte die Menge der verbleibenden Restflüssigkeit überprüft und ggfs. verringert werden durch mehrmaliges Ausklopfen der Mikrotiterplatte auf nicht fusselem Zellstoff.

Manuelles Waschen ist eine gute Alternativoption. Die Waschflüssigkeit kann dabei per Multistepper, Mehrkanalpipette oder auch mit einer Spritzflasche dispensiert werden. Die Waschflüssigkeit kann durch schwungvolles Ausschwenken der Mikrotiterplatte über einem Becken entfernt werden. Falls Absaugvorrichtungen eingesetzt werden, ist darauf zu achten, dass die Oberflächen der Vertiefungen der Mikrotiterplatte nicht beschädigt werden. Nach jedem einzelnen Waschzyklus sollte die verbleibende Restflüssigkeit durch Ausklopfen der Mikrotiterplatte auf nicht fusselem Zellstoff gründlich entfernt werden.

Die Substratlösung S, stabilisiertes H₂O₂-Tetramethylbenzidin, ist lichtempfindlich – Aufbewahrung und Inkubation bitte vor Licht geschützt.

Bei der **Testdurchführung** sollten Standards A-E, Kontrollsera KS1, KS2 und die jeweiligen Proben möglichst schnell pipettiert werden z.B. in 15 Minuten). Das Antikörperkonjugat AK, das Enzymkonjugat EK sowie nachfolgend die Substratlösung S sollten in der gleichen Reihenfolge und in dem gleichen Zeitintervall auf die Platte zugegeben werden. Ebenso sollte die Stopplösung SL in der gleichen Reihenfolge und im gleichen Zeitintervall wie die Substratlösung auf die Testplatte gegeben werden. Dies verhindert Variationen in der Konzentrationsbestimmung durch unterschiedliche Inkubationszeiten.

SICHERHEITSHINWEISE

Allgemein

Sämtliche Reagenzien dürfen ausschließlich für In-vitro-Zwecke verwendet werden!

Der Erwerb, Besitz und die Verwendung des Kits unterliegen den Bestimmungen der nationalen Aufsichtsbehörden.

Folgenden Komponenten enthalten < 0,01% 2-Methyl-4-isothiazolin-3-one Solution als Konservierungsmittel: **AK, EK, VP**

R34	Verursacht Verätzungen
R43	Kann bei Hautkontakt zur Sensibilisierung führen
S26	Im Falle von Augenkontakt sofort mit viel Wasser spülen und Arzt aufsuchen
S36/37	Bei der Arbeit geeignete Schutzkleidung und –handschuhe tragen.
S45	Bei Unfall oder Unwohlsein sofort Arzt zuziehen

Folgende Komponenten enthalten < 0,01% (w/w) 5-chloro-2-methyl 2H isothiazol-3-one und 2-methyl-2H-isothiazol-3-one als Konservierungsmittel: **AK, EK, VP, WP**

R36/38	Reizend für Augen und Haut
R43	Kann bei Hautkontakt zur Sensibilisierung führen
S26	Im Falle von Augenkontakt sofort mit viel Wasser spülen und Arzt aufsuchen
S28.1	Im Falle von Hautkontakt sofort mit viel Wasser waschen

Substratlösung (S)

Das TMB-Substrat (S) enthält 3,3',5,5' Tetramethylbenzidin.

R20/21/R22	Gesundheitsschädlich bei Inhalation, Berührung mit der Haut und beim Verschlucken
R36/37/38	Reizend/Irritierend für Augen, Haut und Atmungssystem
S26	Im Falle von Augenkontakt, sofort mit viel Wasser spülen und Arzt aufsuchen
S36/37	Geeignete Schutzhandschuhe und Schutzkleidung tragen.

Stopplösung (SL)

Die Stopplösung enthält 0,2 M Schwefelsäure (H₂SO₄)

R36/38	Reizt die Augen und die Haut
S26	Im Falle von Augenkontakt sofort mit viel Wasser spülen und einen Arzt aufsuchen.
S36/37	Geeignete Schutzhandschuhe und Schutzkleidung tragen.

Erste-Hilfe Maßnahmen:

Nach Hautkontakt: Nach Berührung mit der Haut während mindestens 15 Minuten mit genügend Wasser abwaschen. Kontaminierte Kleidung und Schuhe wechseln.

Nach Augenkontakt: Nach Berührung mit den Augen während mindestens 15 Minuten mit genügend Wasser spülen. Ausreichende Spülung durch Spreizung der Augenlider sicherstellen.

Nach Verschlucken: Mund mit Wasser ausspülen, vorausgesetzt die Person ist bei Bewusstsein. Sofort einen Arzt zuziehen.

Beim Umgang mit **potentiell human-infektiösem Material** (im Kit sind dies die Kontrollseren KS1/ KS2, sie wurden negativ getestet auf HBsAg, anti-HIV-1 und -2, sowie die jeweiligen individuellen Proben) müssen folgende allgemeine Richtlinien befolgt werden:

Essen, Trinken und Rauchen ist in diesem Bereich verboten!

Niemals mit dem Mund pipettieren!

Direkter Kontakt mit diesem Material muss vermieden werden! Deshalb Laborkleidung und Einmalhandschuhe tragen.

Verschüttete Reagenzien müssen sofort aufgewischt und kontaminierte Flächen und Geräte mit einem geeigneten Detergenz gereinigt werden.

Die Stopplösung SL ist ätzend! Direkten Kontakt durch Schutzkleidung vermeiden, falls die Lösung in Körperkontakt kommt, möglichst schnell und gründlich mit fließendem Wasser ausspülen und gegebenenfalls einen Arzt aufsuchen.

TESTDURCHFÜHRUNG

Die Messungen (Standards, Kontrollen und Proben) sollten stets in Doppelbestimmung durchgeführt werden. Um optimale Ergebnisse zu erhalten, ist auf genaues Pipettieren und strikte Befolgung des Testprotokolls zu achten. Der Test muss bei Raumtemperatur durchgeführt werden.

In alle benötigten Vertiefungen werden 100 µl Verdünnungspuffer VP vorgelegt.

- 1) In die Vertiefungen A1/A2 werden **20 µl Verdünnungspuffer VP** dazu pipettiert (Leerwert).
- 2) In die Positionen B1/2 werden je **20 µl Standard A (1 ng/ml)** gegeben, sowie
in die Positionen C1/2 je **20 µl Standard B (5 ng/ml)**,
in die Positionen D1/2 je **20 µl Standard C (10 ng/ml)**,
in die Positionen E1/2 je **20 µl Standard D (15 ng/ml)**,
in die Positionen F1/2 je **20 µl Standard E (25 ng/ml)**.
Zur Kontrolle der korrekten Durchführung des Tests können je **20 µl** der unverdünnten (oder ggfs. im jeweiligen Verdünnungsverhältnis der Proben verdünnten) **Kontrolle KS1** in die Positionen G1/2 und **Kontrolle KS2** in die Positionen H1/2 gegeben werden. In die restlichen Vertiefungen können je **20 µl der unverdünnten Proben** pipettiert werden.
- 3) Die Vertiefungen der Platte werden mit Klebefolie dicht abgedeckt und **1 Stunde bei Raumtemperatur** inkubiert (unter Schütteln **350 rpm**).
- 4) Nach Ablauf der Inkubationszeit werden die Lösungen abgesaugt und die Platte mit **300 µl Waschpuffer WP** / Vertiefung **dreimal** gewaschen.

- 5) Nach dem letzten Waschschrift werden **100 µl** des **Antikörperkonjugates AK** in jede Vertiefung pipettiert und **30 Minuten bei Raumtemperatur inkubiert** (unter Schütteln **350 rpm**).
- 6) Danach werden – ohne Waschschrift! – **100 µl** des **Enzymkonjugates EK** in jede Vertiefung dazu pipettiert und **30 Minuten ohne Schütteln weiter bei Raumtemperatur inkubiert**.

Durch die Zugabe sollen die Lösungen gemischt werden, leichtes Schütteln bzw. Anschlagen am Rahmen der Mikrotiterplatte kann dies unterstützen. Achtung: durch das hohe Füllvolumen der Vertiefungen steigt die Gefahr von Kreuzkontaminationen!

- 7) Nach Abschluss dieser Inkubation wird die Platte wie in Schritt 4) beschrieben 3x gewaschen
- 8) In jede Vertiefung werden **100 µl der Substratlösung S** pipettiert. Die Platte wird **15 Minuten im Dunkeln bei Raumtemperatur** inkubiert.
- 9) Nach Ablauf der Inkubationszeit wird in jede Vertiefung **100 µl Stopplösung SL** pipettiert.
- 10) Die Ausmessung der Farbreaktion erfolgt **innerhalb von 30 Minuten bei 450 nm (Referenzfilter ≥590nm)**.

AUSWERTUNG

Berechnung der Standardkurve

Zur Auswertung des Testes sollte gewährleistet sein, dass die Extinktionen des Leerwertes 0,25 Einheiten nicht überschreiten, Standard E sollte dagegen Extinktionen über 1,0 Einheiten erreichen.

Proben, die höhere Extinktionen als der Standard E erzielen, liegen außerhalb der Standardkurve, zur sicheren Bestimmung sollten die-

se Proben in einer zweiten Testdurchführung bei höherer Verdünnung nochmals bestimmt werden.

Die bereitgestellten Standards enthalten folgende hGH-Konzentrationen:

(2. Internationaler Standard, NIBSC Code 98/574, 3 IU/mg) **(6)**:

Standard	A	B	C	D	E
ng/ml	1	5	10	15	25
µIU/ml	3	15	30	45	75

- 1) Ermittlung des Mittelwerts (MW) der optischen Dichte des Leerwertes aus den Doppelbestimmungen (Vertiefung A1/A2).
- 2) Von den Mittelwerten der optischen Dichte der Standardkonzentrationen und der Proben wird der mittlere Leerwert abgezogen.
- 3) Die Standardkonzentrationen (x-Achse) werden gegen die gemessene optische Dichte (y-Achse) aufgetragen.
- 4) Die Berechnung der Standardkurve sollte durch ein statistisches Programm erfolgen, da die Kurve i. Allg. nicht ideal durch eine lineare Regression beschrieben wird. **Ein höhergradiges Polynom, 4-Parameter-Anpassungen oder nicht-lineare Regression** sind zur Auswertung geeignet, in manchen Fällen kann eine Spline oder Punkt-zu-Punkt Anpassung angebracht sein.
- 5) Die Multiplikation des jeweiligen für die Proben berechneten hGH-Gehaltes mit dem entsprechenden Verdünnungsfaktor der Proben ergibt die hGH-Konzentration in ng/ml (oder µIU/ml, je nach gewählter Einheit der Standards).

Interpretation der Ergebnisse

Der Grenzwert wird als maximale Wachstumshormonsekretion in mindestens zwei unabhängigen Stimulationsversuchen bestimmt (bspw. Insulin- oder Arginin- Stimulation).

Ein möglicher Wachstumshormonmangel liegt bei einem Sekretions-Peak von < 8 ng/ml oder einer integrierten Gesamtsekretion von durchschnittlich < 3 ng/ml vor, wenn der WHO Standard 98/574, der äquivalent zum Standard dieses Testes ist, genutzt wird.

Die Ergebnisse dieses Testes sollten durch weitere diagnostische Untersuchungen bestätigt werden. Jedes Labor muss seinen eigenen Grenzwert in Abhängigkeit der Patientengruppen festlegen.

Referenzwerte

Aufgrund der pulsatilen Sekretion des humanen Wachstumshormons während des Schlafes können valide Referenzwerte nur schwer bestimmt werden. Hier wurden die hGH Serumkonzentrationen von 104 gesunden Blutspendern im Alter von 18-69 Jahren ohne eine vorhergehende Stimulation gemessen.

	weiblich	männlich
Anzahl	54	50
Median [ng/ml]	0,81	0,28
minimale Konzentration [ng/ml]	0,19	0,15
maximale Konzentration [ng/ml]	10,15	4,34

LITERATUR

- 1) **Hauffa BP, Lehmann N, Bettendorf M, Mehls O, Dörr H-G, Partsch C-J, Schwarz HP, Stahnke N, Steinkamp H, Said E, Sander S, Ranke MB and participating Members of the German KIGS/IGLU Study Group (2004); Central reassessment of growth hormone concentrations measured at local treatment centers in children with impaired growth: consequences for patient management. *European Journal of Endocrinology* 150: 291 – 297**
- 2) **Baumann G (1991) Growth hormone heterogeneity: Genes, Isohormones, variants and binding protein. *Endocr Rev* 12:424-449**
- 3) **Clemmons DR, Chihara K, Freda PU, Ho KKY, Klibanski A, Melmed S, Shalet S, Strasburger CJ, Trainer PJ, Thorner MO (2003) Optimizing control of acromegaly: Integrating a growth hormone receptor antagonist into the treatment algorithm. *J Clin Endocrinol Metab* 88:4759-4767**
- 4) **Ranke, MB, Örskov H, Bristow AF, Seth J, Baumann (1999) Consensus on how to measure growth hormone in serum. *Horm res* 51:27-29**
- 5) **Ranke MB (2003) Diagnosis of growth hormone deficiency and growth hormone stimulation tests. In: *Diagnostics of Endocrine Function in Children and Adolescents* (3rd ed., Michael B Ranke, Herausg.) Basel, Karger pp 107-128**
- 6) **Adresse NIBSC: National Institute for Biological Standards and Controls, Blanche Lane, South Mimms, Potters Bar, Hertfordshire EN6 3QG, Great Britain.**
- 7) **Strasburger CJ (2004) Taking one step at a time *Clin. Endocrinology* 60, 540**
- 8) **Wieringa GE, Barth JH, Trainer PJ (2004) Growth Hormone assay standardization: a biased view ? *Clin. Endocrinology* 60, 538 - 539**

KURZANLEITUNG – Mediagnost hGH-ELISA E02

Vorbereitung der Reagenzien	
Die gebrauchsfertigen Reagenzien: Standards A – E (je 750 µl); Kontrollsera KS1/KS2 (750 µl), Antikörperkonjugat AK (12 ml) Enzymkonjugat EK (12 ml)	Auf Raumtemperatur bringen
Waschpuffer (50 ml)	1:20 mit Aqua. dest. (z.B. den gesamten Flascheninhalt von (50 ml) im Standzylinder auf 1000 ml auffüllen)
Proben	Verdünnung ist i.a. nicht notwendig , einfach 20 µl pro Bestimmung einsetzen.

Testdurchführung in Doppelbestimmungen:

Pipettieren	Reagenzien	Position
100 µl	Verdünnungspuffer VP	in die gesamte benötigte Anzahl von Vertiefungen pipettieren
20 µl	Verdünnungspuffer VP als Leerwert	A1 und A2
20 µl	Standard A (1 ng/ml)	B1 und B2
20 µl	Standard B (5 ng/ml)	C1 und C2
20 µl	Standard C (10 ng/ml)	D1 und D2
20 µl	Standard D (15 ng/ml)	E1 und E2
20 µl	Standard E (25 ng/ml)	F1 und F2
20 µl	Kontrollserum KS1	G1 und G2
20 µl	Kontrollserum KS2	H1 und H2
20 µl	Probe	in die restlichen Vertiefungen nach Bedarf pipettieren (Pipettierkontrolle = Farbumschlag nach Rot !),
Mit Klebefolie die Vertiefungen dicht abdecken.		
Inkubation: 1 h bei RT, 350 rpm		
3x 300 µl	Absaugen und die Platte 3x mit je 300 µl Waschpuffer WP / Vertiefung waschen.	In jede Vertiefung
100 µl	Antikörperkonjugat AK	In jede Vertiefung
Inkubation: 30 min bei RT, 350 rpm		
100 µl	Enzymkonjugat EK , ohne waschen der Vertiefungen (!) - zur darin befindlichen AK-Lösung dazu pipettieren , dadurch gleichzeitig mischen bzw. MTP durch vorsichtiges Klopfen kurz mischen. Achtung: hohes Füllvolumen der Vertiefungen !	In jede Vertiefung
Inkubation: 30 min bei RT, ohne Schütteln		
3x 300 µl	Absaugen und die Platte mit 300 µl Waschpuffer WP / Vertiefung dreimal waschen.	In jede Vertiefung
100 µl	Substratlösung S	In jede Vertiefung
Inkubation: 15 min im Dunklen bei RT		
100 µl	Stopplösung SL	In jede Vertiefung
Ausmessung innerhalb von 15 min bei 450 nm (Referenzfilter ≥ 590nm).		