

# **hGH**

**DOUBLE ANTIBODY**

**DPC®**

# Double Antibody hGH

## English

**Intended Use:** Double Antibody Human Growth Hormone (hGH) is an  $^{125}\text{I}$  radioimmunoassay designed for the quantitative measurement of human growth hormone in serum or plasma. It is intended strictly for *in vitro* diagnostic use.

Catalog numbers: **KGHD1** (70 tubes), **KGHD2** (140 tubes).



The 70-tube kit contains less than 3 microcuries (111 kilobecquerels) of radioactive  $^{125}\text{I}$  growth hormone, and the 140-tube kit contains less than 6 microcuries (222 kilobecquerels).

### Summary and Explanation of the Test

Human growth hormone (hGH, somatotropin) is a polypeptide originating in the anterior pituitary. It is 191 amino acids in length and has a molecular mass of approximately 22,000 daltons. Its metabolic effects are primarily anabolic. It promotes protein conservation and engages a wide range of mechanisms for protein synthesis. It also enhances glucose transport and facilitates the buildup of glycogen stores. Another family of peptide hormones, the somatomedins, mediates its cascade of growth-promoting actions.

Measurement of hGH is primarily of interest in the diagnosis and treatment of various forms of inappropriate growth hormone secretion. Clinical disorders of hyposecretion include dwarfism and unattained growth potential. Hypersecretion is associated with gigantism and acromegaly.

Caution must be exercised in the clinical interpretation of growth hormone levels. These vary throughout the day, making it difficult to define a reference range or to judge an individual's status based on single determinations. Many factors are known to influence the rate of growth hormone secretion, including periods of sleep and wakefulness, exercise, stress, hypoglycemia, estrogens, corticosteroids, L-dopa, and others. Because of its

similarity to prolactin and placental lactogen, earlier growth hormone immunoassays were often plagued with falsely high values in pregnant and lactating women.

Because not all acromegalic individuals have elevated baseline levels, suppression tests based on glucose loading are of value in this context. In spite of the induced hyperglycemia, there is rarely a decrease from baseline levels in acromegaly.

Growth hormone-deficient individuals have fasting/resting levels similar to those found in normal individuals. Various challenge tests have therefore been devised to differentiate these groups. Thus, with the onset of deep sleep or after 15 to 20 minutes of vigorous exercise, growth hormone levels normally show a rise. Other tests of growth hormone responsiveness are based on the administration of L-dopa, arginine and insulin. Propanolol or estrogen is sometimes given in conjunction with the primary stimulus to accentuate the response.

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

### Principle of the Procedure

In the Double Antibody hGH procedure,  $^{125}\text{I}$ -labeled growth hormone competes with growth hormone in the patient sample for sites on growth hormone-specific antibody. After incubation for a fixed time, separation of bound from free is achieved by the PEG-accelerated double-antibody method. The tube is then counted in a gamma counter, the counts being inversely related to the amount of growth hormone present in the patient sample.

**Reagents to Pipet:** 3

**Total Incubation Time:** 2 Hours

**Separation:** The ready-to-use Precipitating Solution combines second antibody and dilute PEG.

**Total Counts at Iodination:**  
approximately 60,000 cpm

## Warnings and Precautions

For *in vitro* diagnostic use.

**Reagents:** Store at 2–8°C in a refrigerator designated for incoming radioactive materials. Dispose of in accordance with applicable laws.

Do not use reagents beyond their expiration dates.

Some components supplied in this kit may contain human source material and/or other potentially hazardous ingredients which necessitate certain precautions.

Follow universal precautions, and handle all components as if capable of transmitting infectious agents. Source materials derived from human blood were tested and found nonreactive for syphilis; for antibodies to HIV 1 and 2; for hepatitis B surface antigen; and for antibodies to hepatitis C.

Sodium azide, at concentrations less than 0.1 g/dL, has been added as a preservative. On disposal, flush with large volumes of water to prevent the buildup of potentially explosive metal azides in lead and copper plumbing.

**Water:** Use distilled or deionized water.

## Radioactivity

A copy of any radioisotope license certificate (Specific or General) issued to a US customer must be on file with Diagnostic Products Corporation before kits or components containing radioactive material can be shipped. These radioactive materials may be acquired by any customer with the appropriate Specific license. Under a General license these radioactive materials may be acquired only by physicians, veterinarians in the practice of veterinary medicine, clinical laboratories and hospitals — and strictly for *in vitro* clinical or laboratory tests not involving external or internal administration of the radioactive material or its radiation to human beings or other animals. Its acquisition, receipt, storage, use, transfer and disposal are all subject to the regulations and a (General or

Specific) license of the U.S. Nuclear Regulatory Commission or a State with which the NRC has entered into an agreement for the exercise of regulatory control.

Handle radioactive materials according to the requirements of your General or Specific license. To minimize exposure to radiation, the user should adhere to guidelines set forth in the National Bureau of Standards publication on the *Safe Handling of Radioactive Materials* (Handbook No. 92, issued March 9, 1964) and in subsequent publications issued by State and Federal authorities.

Wipe up spills promptly and decontaminate affected surfaces. Avoid generation of aerosols. Dispose of solid radioactive waste according to license requirements. General licensees (holders of NRC Form 483) may dispose of solid radioactive waste as nonradioactive waste, after removing labeling. Specific licensees (NRC Form 313) should refer to Title 10, Code of Federal Regulations, Part 20. Licensees in Agreement States should refer to the appropriate regulations of their own state. General licensees may dispose of liquid radioactive waste of the type contained in this product through a laboratory sink drain. Licensees must remove or deface labels from empty containers of radioactive materials before disposal of solid waste. Specific licensees may dispose of small quantities of liquid radioactive waste of the type used in this product through a laboratory sink drain. Refer to the appropriate regulations applicable to your laboratory.

## Materials Supplied: Initial Preparation

Prepare all components at least 10 minutes before use.

### hGH Antiserum (GHD1)

Lyophilized growth hormone antiserum, with preservative. Reconstitute each vial by adding **7.7 mL** distilled or deionized water. Mix by *gentle* inversion. Stable at 2–8°C for 30 days after reconstitution. Color: blue.

**KGHD1:** 1 vial. **KGHD2:** 2 vials.

#### <sup>125</sup>I hGH (GHD2)

Lyophilized iodinated growth hormone, with preservative. Reconstitute each vial by adding **7.7 mL** distilled or deionized water. Mix by *gentle* inversion. Stable at 2–8°C for 30 days after reconstitution, or until the expiration date marked on the vial. Color: yellow.

**KGHD1:** 1 vial. **KGHD2:** 2 vials.

#### hGH Calibrators (GHD3–9)

Seven vials, labeled A through G, of lyophilized calibrators. At least 30 minutes before use, reconstitute the zero calibrator **A with 5.0 mL** distilled or deionized water, and each of the remaining calibrators **B through G with 2.0 mL** distilled or deionized water. Use volumetric pipets and mix by *gentle* inversion. Stable at 2–8°C for 30 days after reconstitution. For longer storage, aliquot and freeze: stable at –20°C for 6 months.

**KGHD1:** 1 set. **KGHD2:** 1 set.

The calibrators have *lot-specific* values of *approximately* 0, 1, 2, 5, 10, 20 and 30 ng/mL *in a human serum matrix*. The assay is standardized in terms of the World Health Organization's International Reference Preparations of human Growth Hormone for immunoassay, numbers 66/217 and 80/505, and the National Institute of Health's reference preparation for hGH NIAMDD-hGH-RP-1. *Refer to the vial labels for exact concentrations in ng/mL*. Intermediate calibration points can be obtained by mixing calibrators in suitable proportions.

#### Precipitating Solution (ACGG)

Goat anti-rabbit gamma globulin (GARGG) and dilute polyethylene glycol (PEG) in saline. The Precipitating Solution is supplied in liquid form, ready to use. Stable at 2–8°C for 30 days after opening. The Precipitating Solution should be thoroughly mixed before use, since a fine precipitate may form after storage at 2–8°C. Color: blue.

**KGHD1:** 1 vial. **KGHD2:** 2 vials.

#### Materials Required But Not Provided

Gamma counter

Centrifuge — preferably refrigerated and capable of at least 3000×g

Vortex mixer

#### Reagent Preparation

Distilled or deionized water

Volumetric pipets: 2.0, 5.0 and 7.7 mL

#### Radioimmunoassay

Plain 12x75 mm polypropylene tubes — available from DPC

Micropipets: 100 µL and 1.0 mL.

Foam decanting rack — available from DPC

Logit-log graph paper — available from DPC (catalog number: ZP797)

A tri-level human serum-based immunoassay control, containing hGH as one of over 25 assayed constituents, is available from DPC (catalog number: CON6).

#### Specimen Collection

Patient must be fasting and at complete rest 30 minutes before blood collection.<sup>6,7</sup>

Collect blood by venipuncture<sup>5</sup> into plain, heparinized or EDTA tubes, avoiding hemolysis, and separate the serum or plasma from the cells. The time of collection should be noted.

The use of an ultracentrifuge is recommended to clear lipemic samples.

Lipemic, hemolyzed or grossly contaminated samples may give erroneous results.

Blood collection tubes from different manufacturers may yield differing values, depending on materials and additives, including gel or physical barriers, clot activators and/or anticoagulants. Double Antibody hGH has not been tested with all possible variations of tube types. Consult the section on Alternate Sample Types for details on tubes that have been tested.

**Volume Required:** 100 µL of serum or plasma per tube.

**Storage:** Refrigerate immediately. Stable at 2–8°C for 8 hours,<sup>6,7</sup> or for 2 months (aliquotted) at –20°C. (Avoid repeated thawing and freezing.)

Before assay, allow the samples to come to room temperature and mix by *gentle* swirling or inversion. *Do not* attempt to thaw frozen specimens by heating them in a waterbath.

## Radioimmunoassay Procedure

All components except the Precipitating Solution must be at room temperature (15–28°C) before use.

- 1 Label eighteen tubes in duplicate: T (total counts), NSB (nonspecific binding), A (maximum binding) and B through G. Label additional tubes, also in duplicate, for patient samples and controls.

| Calibrator | Approximate ng/mL |
|------------|-------------------|
| A (MB)     | 0                 |
| B          | 1                 |
| C          | 2                 |
| D          | 5                 |
| E          | 10                |
| F          | 20                |
| G          | 30                |

**Note:** The calibrators are *lot-specific*. Refer to the vial labels for values in ng/mL.

- 2 Pipet **100 µL** of the zero calibrator A into the NSB and A tubes, and **100 µL** of each of the remaining calibrators B through G into correspondingly labeled tubes. Pipet **100 µL** of each patient sample (serum or plasma) and **100 µL** of each control into the tubes prepared.

Patient samples expected to contain hGH concentrations greater than the highest calibrator (30 ng/mL) should be diluted in the zero calibrator before assay.

It is good practice to use a *disposable-tip* micropipet, changing the tip between samples, in order to avoid carryover contamination.

- 3 Add **100 µL** of hGH Antiserum (Blue) to all tubes except the NSB and T tubes. Vortex.

All tubes except the NSB and T tubes should be blue-green. A repeating dispenser is recommended for the 100 µL additions of antiserum and tracer.

- 4 Incubate for **1 hour** at room temperature (15–28°C).  
The incubation may be extended up to 90 minutes at room temperature providing the second incubation (step 6) is similarly modified.

- 5 Add **100 µL** of <sup>125</sup>I hGH (Yellow) to all tubes. Vortex.

All tubes except the NSB and T tubes should be green. Remove the T tubes for counting at step 10; they require no further processing.

- 6 Incubate for **1 hour** at room temperature (15–28°C).

This incubation step should be handled in the same fashion as step 4 above.

- 7 Add **1.0 mL** of *cold* Precipitating Solution (Blue) to all tubes. Vortex.

All tubes should be blue, except for the T tubes which should be yellow. Before dispensing, the Precipitating Solution should be thoroughly mixed (without foaming) until all visible precipitate has disappeared.

- 8 Centrifuge for **15 minutes** at 3000xg.

- 9 Decant (or aspirate) the supernatant, retaining the precipitate for counting.

Using a foam decanting rack, gently tap the tubes on absorbant paper and blot the rims, to remove residual droplets.

- 10 Count each tube for **1 minute**.

## Calculation of Results

To calculate growth hormone concentrations from a logit-log representation of the calibration curve, first calculate for each pair of tubes the average NSB-corrected counts per minute:

Net Counts = (Average CPM) minus (Average **NSB** CPM)

Then determine the binding of each pair of tubes as a percent of maximum binding (MB), with the NSB-corrected counts of the A tubes taken as 100%:

Percent Bound = (Net Counts / Net **MB** Counts) × 100

Using logit-log graph paper, plot Percent Bound on the vertical (probability) axis against Concentration on the horizontal (logarithmic) axis for each of the nonzero calibrators, and draw a straight line approximating the path of these points. Results for the unknowns may then be read from the line by interpolation.

It is good practice to inspect results for agreement within replicates, and to construct a graph of the calibration curve (even if the calculations are handled by computer) as a visual check on the appropriateness of the transformation used and as a way to detect deviant calibration points. We also recommend keeping track of these data reduction parameters:

$T$  = Total Counts (as counts per minute)

$\%NSB = 100 \times (\text{Average NSB Counts} / \text{Total Counts})$

$\%MB = 100 \times (\text{Net Counts} / \text{Total Counts})$

And the 20, 50 and 80 percent "intercepts," where

20% = Concentration at 20 Percent Bound, etc.

Note that other approaches, e.g. a sound implementation of the 4-parameter logistic, are also acceptable. See Dudley RA, et al. Guidelines for immunoassay data reduction. Clin Chem 1985;31:1264-71.

**Example Run:** For illustration only, not for calculating results from another run. Because the calibrator values are *lot-specific*, concentrations listed in the right-most column may not match the values of the calibrators supplied in your shipment. (See "Example Run" table.)

## Quality Control

Controls or serum pools with at least two hGH concentration levels — low and high — should routinely be assayed as unknowns.

Report patient results only if the control results for that assay meet your laboratory's established criteria for acceptability.

It is good laboratory practice to record for each assay the lot numbers of the components used, as well as the dates when they were first reconstituted or opened. We also recommend charting control results from day to day — as described, for example, in Westgard JO, et al. A multi-rule chart for quality control. Clin Chem 1981;27:493-501. Note that repeat samples can serve as a valuable additional tool for monitoring interassay precision, and that pairs of control tubes can be spaced throughout the assay to help verify the absence of significant drift.

**Centrifugation:** The procedure calls for centrifuging at 3000xg for 15 minutes. Lower accelerations are satisfactory only if the centrifugation time is increased appropriately — for example, to 30 minutes at 1500xg. A high-speed, refrigerated centrifuge is desirable but not essential. Use the formulas below to calculate the acceleration of your centrifuge at a given speed, or the speed (in revolutions per minute) required to achieve a desired g force.

$g \text{ force} = 28.38 \times (\text{rpm} / 1,000)^2 \times \text{radius [inches]}$

$\text{rpm} = 187.7 \times \sqrt{(g \text{ force} / \text{radius [inches]})}$

or

$g \text{ force} = 11.18 \times (\text{rpm} / 1,000)^2 \times \text{radius [cm]}$

$\text{rpm} = 299.07 \times \sqrt{(g \text{ force} / \text{radius [cm]})}$

## Expected Values

A reference range study was performed at a large hospital laboratory in which fasting samples from 72 adult volunteers were assayed by the Double Antibody hGH procedure. The results of the study suggest a reference range for adults of:

Nondetectable to 7 ng/mL.

Laboratories should consider these results *as guidelines only*. Each laboratory should establish its own reference ranges.

## Performance Data

See Tables and Graphs for data *representative* of the Double Antibody hGH kit's performance. Results are expressed in ng/mL.

### Conversion Factor:

$\text{ng/mL} \times 2 \rightarrow \text{mIU/L [WHO IRP 66/217]}$

$\text{ng/mL} \times 2.6 \rightarrow \text{mIU/L [WHO 1<sup>st</sup> IRP 80/505]}$

### Calibration Range:

Approximately 1–30 ng/mL.

The calibrator values are *lot-specific*.

**Analytical Sensitivity:** 0.9 ng/mL

### Intraassay Precision (Within-Run):

Statistics were calculated for each of six samples from the results of 20 pairs of tubes in a single assay. (See "Intraassay Precision" table.)

### Interassay Precision (Run-to-Run):

Statistics were calculated for each of six samples from the results of pairs of tubes

in 20 different assays. (See "Interassay Precision" table.)

**End-of-Run Effect:** None up to approximately 150 tubes. (See "End-of-Run Effect" table.)

**Specificity:** The antibody is highly specific for human growth hormone. (See "Specificity" table.)

**Linearity:** Samples were assayed under various dilutions. (See "Linearity" table for representative data.)

**Recovery:** Samples spiked 1 to 19 with four hGH solutions (50, 100, 200 and 400 ng/mL) were assayed. (See "Recovery" table for representative data.)

**Bilirubin:** Presence of bilirubin in concentrations up to 100 mg/L has no effect on results, within the precision of the assay.

**Hemolysis:** Results obtained on hemolyzed samples should be interpreted with caution, since there is a trend — though not a uniform one — towards lower values as a function of increasing hemoglobin concentration. (See "Hemolysis" table.)

**Free Fatty Acid:** Presence of oleic acid in concentrations up to 10 mmol/L has no clinically significant *in vitro* effect on the results.

**Alternate Sample Type:** To determine whether anticoagulants interfere with the assay, blood was collected from 20 healthy volunteers into plain, heparinized and EDTA vacutainer tubes. All samples were assayed by the Double Antibody hGH procedure. By linear regression:

(Heparin) =  $1.02 (\text{Serum}) + 0.04 \text{ ng/mL}$   
 $r = 0.998$

(EDTA) =  $0.97 (\text{Serum}) + 0.09 \text{ ng/mL}$   
 $r = 0.995$

Means:

3.8 ng/mL (Heparin)  
3.7 ng/mL (Serum)  
3.7 ng/mL (EDTA)

**Method Comparison:** The assay was compared to a commercially available radioimmunoassay (Kit A) on 145 patient serum samples. (Concentration range: nondetectable to approximately 7.4 ng/mL by the Double Antibody procedure.) By linear regression:

(Kit A) =  $1.13 (\text{DAb}) + 0.13 \text{ ng/mL}$   
 $r = 0.985$

Means:

1.72 ng/mL (Double Antibody)  
2.07 ng/mL (Kit A)

The slightly lower results obtained with the Double Antibody kit are probably due to the fact that it employs calibrators in a human serum matrix for maximal compatibility with typical patient samples, whereas Kit A makes use of a bovine-buffer matrix.

## References

1) Daughaday WM, Cryer PE. Growth hormone hypersecretion and acromegaly. Hospital Practice. no. 8 August 1978;13:75-80. 2) Raite S. The standards for human growth hormone assays. In: Laron Z, Butenandt O, editors. Evaluation of Growth Hormone Secretion. Basel: Karger, 1983: 162-9. 3) Van Wyk JJ. Diagnosis of growth hormone deficiency and other causes of growth failure. The Endocrine Society: Syllabus for the 35th Annual Postgraduate Assembly October 1983: 90-106. 4) Van Wyk JJ, Underwood L. Growth hormone, somatomedins and growth failure. Hospital Practice no. 8 August 1978;13:57-67. 5) National Committee for Clinical Laboratory Standards. Procedures for the collection of diagnostic blood specimens by venipuncture; approved standard. 4th ed. NCCLS Document H3-A4, Wayne, PA: NCCLS, 1998. 6) Tietz NW, editor. Clinical guide to laboratory tests. 3rd ed. Philadelphia: W.B. Saunders, 1995: 300. 7) Burtis CA, Ashwood ER, editors. Tietz textbook of clinical chemistry. 2nd ed. Philadelphia: W.B. Saunders, 1994: 1670.

## Technical Assistance

In the United States, contact DPC's Technical Services department.  
Tel: 800.372.1782, 310.645.8200  
Fax: 310.645.9999. To place an order:  
Tel: 800.372.1782. Fax: 800.234.4372.  
Outside the United States, contact your National Distributor.

The Quality System of Diagnostic Products Corporation is registered to ISO 13485:2003.

## Tables and Graphs

### Example Run

| Tube <sup>1</sup>      | Duplicate CPM <sup>2</sup> | Average CPM <sup>3</sup> | Net CPM <sup>4</sup> | Percent Bound <sup>5</sup> | Approx. hGH ng/mL <sup>6</sup> |
|------------------------|----------------------------|--------------------------|----------------------|----------------------------|--------------------------------|
| T <sup>7</sup>         | 51,017<br>51,434           | 51,226                   |                      |                            |                                |
| NSB <sup>8</sup>       | 829<br>986                 | 908                      | 0                    |                            |                                |
| A<br>(MB) <sup>9</sup> | 23,511<br>23,725           | 23,618                   | 22,710               | 100%                       | 0                              |
| B                      | 21,961<br>22,020           | 21,991                   | 21,083               | 92.8%                      | 1                              |
| C                      | 20,094<br>20,325           | 20,210                   | 19,302               | 85.0%                      | 2                              |
| D                      | 15,001<br>15,108           | 15,055                   | 14,147               | 62.3%                      | 5                              |
| E                      | 8,910<br>9,030             | 8,971                    | 8,063                | 35.5%                      | 10                             |
| F                      | 4,630<br>4,724             | 4,678                    | 3,770                | 16.6%                      | 20                             |
| G                      | 3,400<br>3,490             | 3,446                    | 2,538                | 11.2%                      | 30                             |
| Unknowns <sup>10</sup> |                            |                          |                      |                            |                                |
| X1                     | 21,826<br>22,009           | 21,918                   | 21,010               | 92.5%                      | 1.2                            |
| X2                     | 13,733<br>13,785           | 13,760                   | 12,852               | 56.6%                      | 5.7                            |
| X3                     | 8,717<br>8,794             | 8,756                    | 7,848                | 34.6%                      | 10.6                           |

Quality Control Parameters:<sup>11</sup>

T<sup>7</sup> = 51,226 cpm

%NSB<sup>8</sup> = 1.8%

%MB<sup>9</sup> = 44%

20% Intercept<sup>12</sup> = 17.7 ng/mL

50% Intercept = 6.8 ng/mL

80% Intercept = 2.6 ng/mL

### Intraassay Precision (ng/mL)

|   | Mean <sup>1</sup> | SD <sup>2</sup> | CV <sup>3</sup> |
|---|-------------------|-----------------|-----------------|
| 1 | 1.1               | 0.065           | 5.9%            |
| 2 | 1.7               | 0.048           | 2.8%            |
| 3 | 2.3               | 0.070           | 3.0%            |
| 4 | 5.3               | 0.086           | 1.6%            |
| 5 | 6.0               | 0.092           | 1.5%            |
| 6 | 10.9              | 0.167           | 1.5%            |

### Interassay Precision (ng/mL)

|   | Mean <sup>1</sup> | SD <sup>2</sup> | CV <sup>3</sup> |
|---|-------------------|-----------------|-----------------|
| 1 | 1.1               | 0.091           | 8.3%            |
| 2 | 1.6               | 0.084           | 5.3%            |
| 3 | 2.3               | 0.101           | 4.4%            |
| 4 | 5.3               | 0.122           | 2.3%            |
| 5 | 5.7               | 0.102           | 1.8%            |
| 6 | 10.7              | 0.365           | 3.4%            |

### End-of-Run Effect (ng/mL)

|   | Tube's<br>31–42 | Tubes<br>83–94 | Tubes<br>135–146 | Tubes<br>187–198 |
|---|-----------------|----------------|------------------|------------------|
| 1 | 1.6             | 1.6            | 1.7              | 1.8              |
| 2 | 1.6             | 1.6            | 1.8              | 1.8              |
| 3 | 2.5             | 2.5            | 2.5              | 2.7              |
| 4 | 3.9             | 3.9            | 4.2              | 4.1              |
| 5 | 8.7             | 8.9            | 8.7              | 8.8              |
| 6 | 12.6            | 12.7           | 13.1             | 12.8             |

### Specificity

| Compound <sup>1</sup> | ng/mL<br>Added <sup>2</sup> | % Cross-<br>reactivity <sup>3</sup> |
|-----------------------|-----------------------------|-------------------------------------|
| Prolactin             | 40,000                      | ND                                  |
|                       | 10,000                      | ND                                  |
|                       | 1,000                       | ND                                  |
|                       | 200                         | ND                                  |
| HPL                   | 100,000                     | ND                                  |
| TSH                   | 80,000                      | 0.006%                              |
| FSH                   | 5,340                       | ND                                  |
| LH                    | 5,340                       | ND                                  |
| HCG, $\beta$ -subunit | 10,000                      | ND                                  |

ND: not detectable<sup>4</sup> (crossreactivity of less than 0.006%<sup>5</sup>).

### Hemolysis

| Packed Red Blood Cells <sup>1</sup> |                       |               |               |               |
|-------------------------------------|-----------------------|---------------|---------------|---------------|
|                                     | Unspiked <sup>2</sup> | 10 $\mu$ L/mL | 20 $\mu$ L/mL | 30 $\mu$ L/mL |
| 1                                   | 2.2                   | 1.8           | 1.7           | 1.5           |
| 2                                   | 5.1                   | 4.6           | 4.5           | 4.2           |
| 3                                   | 4.9                   | 5.1           | 4.9           | 4.5           |



## Linearity (ng/mL)

|   | Dilution <sup>1</sup> | Observed <sup>2</sup> | Expected <sup>3</sup> | %O/E <sup>4</sup> |
|---|-----------------------|-----------------------|-----------------------|-------------------|
| 1 | 8 in 8 <sup>5</sup>   | 3.2                   | —                     | —                 |
|   | 4 in 8                | 1.7                   | 1.6                   | 106%              |
|   | 2 in 8                | 0.9                   | 0.8                   | 113%              |
|   | 1 in 8                | 0.4                   | 0.4                   | 100%              |
| 2 | 8 in 8                | 8.5                   | —                     | —                 |
|   | 4 in 8                | 4.2                   | 4.3                   | 98%               |
|   | 2 in 8                | 2.2                   | 2.1                   | 105%              |
|   | 1 in 8                | 1.1                   | 1.1                   | 100%              |
| 3 | 8 in 8                | 8.8                   | —                     | —                 |
|   | 4 in 8                | 4.5                   | 4.4                   | 102%              |
|   | 2 in 8                | 2.3                   | 2.2                   | 105%              |
|   | 1 in 8                | 1.2                   | 1.1                   | 109%              |

## Recovery (ng/mL)

|   | Solution <sup>1</sup> | Observed <sup>2</sup> | Expected <sup>3</sup> | %O/E <sup>4</sup> |
|---|-----------------------|-----------------------|-----------------------|-------------------|
| 1 | —                     | 0.0                   | —                     | —                 |
|   | A                     | 2.5                   | 2.5                   | 100%              |
|   | B                     | 4.9                   | 5.0                   | 98%               |
|   | C                     | 9.8                   | 10.0                  | 98%               |
|   | D                     | 22.6                  | 20.0                  | 113%              |
| 2 | —                     | 0.0                   | —                     | —                 |
|   | A                     | 2.5                   | 2.5                   | 100%              |
|   | B                     | 4.9                   | 5.0                   | 98%               |
|   | C                     | 10.2                  | 10.0                  | 102%              |
|   | D                     | 20.2                  | 20.0                  | 101%              |
| 3 | —                     | 2.9                   | —                     | —                 |
|   | A                     | 5.3                   | 5.3                   | 100%              |
|   | B                     | 7.8                   | 7.8                   | 100%              |
|   | C                     | 12.0                  | 12.8                  | 94%               |
|   | D                     | 22.3                  | 22.8                  | 98%               |

**Deutsch. Example Run:** <sup>1</sup>Röhrchen, <sup>2</sup>Duplikat CPM, <sup>3</sup>Mittelwert CPM, <sup>4</sup>Netto CPM, <sup>5</sup>Prozent Bindung, <sup>6</sup>ca. hGH, ng/mL, <sup>7</sup>Total, <sup>8</sup>%NSB, <sup>9</sup>%MB, <sup>10</sup>Unbekannte, <sup>11</sup>Qualitätskontrollparameter, <sup>12</sup>20% Intercept.  
**Intraassay Precision:** <sup>1</sup>Mittelwert, <sup>2</sup>SD (Standardabweichung), <sup>3</sup>CV (Variationskoeffizient). **Interassay Precision:** <sup>1</sup>Mittelwert, <sup>2</sup>SD (Standardabweichung), <sup>3</sup>CV (Variationskoeffizient). **Linearity:** <sup>1</sup>Verdünnung, <sup>2</sup>Beobachtet (B), <sup>3</sup>Erwartet (E), <sup>4</sup>% B/E, <sup>5</sup>8 in 8. **Recovery:** <sup>1</sup>Lösung, <sup>2</sup>Beobachtet (B), <sup>3</sup>Erwartet (E), <sup>4</sup>% B/E. **Specificity:** <sup>1</sup>Verbindung, <sup>2</sup>zugesetzte Menge, <sup>3</sup>% Kreuzreaktivität, <sup>4</sup>NN: Nicht nachweisbar, <sup>5</sup>Kreuzreaktivität niedriger

als 0,006%. **Specificity:** <sup>1</sup>Verbindung, <sup>2</sup>zugesetzte Menge, <sup>3</sup>Gemessene Konzentration, <sup>4</sup>% Kreuzreaktivität, <sup>5</sup>NN: Nicht nachweisbar.

**End-of-Run Effect:** <sup>1</sup>Röhrchen. **Hemolysis:** <sup>1</sup>Erythrozytenkonzentrat<sup>2</sup>Ohne Zugabe von.

**Español. Example Run:** <sup>1</sup>Tubo, <sup>2</sup>Duplicado CPM, <sup>3</sup>Media CPM, <sup>4</sup>CPM Netas, <sup>5</sup>Porcentaje de unión, <sup>6</sup>hGH, aprox., ng/mL, <sup>7</sup>Total, <sup>8</sup>%NSB, <sup>9</sup>%MB, <sup>10</sup>Desconocido, <sup>11</sup>Parámetros del control de calidad, <sup>12</sup>Corte al 20%. **Intraassay Precision:** <sup>1</sup>Media, <sup>2</sup>DS, <sup>3</sup>CV. **Interassay Precision:** <sup>1</sup>Media, <sup>2</sup>DS, <sup>3</sup>CV. **Linearity:** Dilución, <sup>2</sup>Observado (O), <sup>3</sup>Esperado (E), <sup>4</sup>%O/E, <sup>5</sup>8 en 8. **Recovery:** <sup>1</sup>Solución, <sup>2</sup>Observado (O), <sup>3</sup>Esperado (E), <sup>4</sup>%O/E. **Specificity:** <sup>1</sup>Compuesto, <sup>2</sup>Cantidad añadida, <sup>3</sup>% Reacción cruzada, <sup>4</sup>ND: no detectable, <sup>5</sup>Reactividad cruzada menor de 0,006%. **Specificity:** <sup>1</sup>Compuesto, <sup>2</sup>Cantidad añadida, <sup>3</sup>Concentración aparente, <sup>4</sup>% Reacción cruzada, <sup>5</sup>ND: no detectable. **End-of-Run Effect:** <sup>1</sup>Tubos. **Hemolysis:** <sup>1</sup>Eritrocitos, <sup>2</sup>Sin añadir.

**Français. Example Run:** <sup>1</sup>Tube, <sup>2</sup>Duplicate CPM, <sup>3</sup>CPM moyen, CPM corrigé, <sup>5</sup>Pourcentage lié, <sup>6</sup>Approx. hGH, ng/mL, <sup>7</sup>Total, <sup>8</sup>%NSB, <sup>9</sup>%MB, <sup>10</sup>Patients, <sup>11</sup>Paramètres Contrôle de Qualité, <sup>12</sup>20% Intercept. **Intraassay Precision:** <sup>1</sup>Moyenne, <sup>2</sup>SD, <sup>3</sup>CV. **Interassay Precision:** <sup>1</sup>Moyenne, <sup>2</sup>SD, <sup>3</sup>CV. **Linearity:** <sup>1</sup>Dilution, <sup>2</sup>Observé (O), <sup>3</sup>Attendu (A), <sup>4</sup>%O/A, <sup>5</sup>8 dans 8. **Recovery:** <sup>1</sup>Solution, <sup>2</sup>Observé (O), <sup>3</sup>Attendu (A), <sup>4</sup>%O/A. **Specificity:** <sup>1</sup>Composé, <sup>2</sup>ajouté, <sup>3</sup>Réaction croisée%. <sup>4</sup>ND: non détectable, <sup>5</sup>Réaction croisée inférieure à 0.006%. **Specificity:** <sup>1</sup>Composé, <sup>2</sup>ajouté, <sup>3</sup>Concentration apparente, <sup>4</sup>Réaction croisée %. <sup>5</sup>ND: non détectable. **End-of-Run Effect:** <sup>1</sup>Tubes. **Hemolysis:** <sup>1</sup>Culot érythrocytaire, <sup>2</sup>Non chargés.

**Italiano. Example Run:** <sup>1</sup>Provetta, <sup>2</sup>CPM in duplicato, <sup>3</sup>CPM Medio, <sup>4</sup>CPM Netti, <sup>5</sup>Percentuale di Legato, <sup>6</sup>Appross. hGH, ng/mL, <sup>7</sup>Totale, <sup>8</sup>%NSB, <sup>9</sup>%MB, <sup>10</sup>Campioni Non Noti, <sup>11</sup>Parametri per il Controllo di Qualità, <sup>12</sup>Intercetta al 20%. **Intraassay Precision:** <sup>1</sup>Media, <sup>2</sup>SD (Deviazione Standard), <sup>3</sup>CV (Coefficiente di Variazione). **Interassay Precision:** <sup>1</sup>Media, <sup>2</sup>SD (Deviazione Standard), <sup>3</sup>CV (Coefficiente di Variazione). **Linearity:** <sup>1</sup>Diluizione, <sup>2</sup>Osservato (O), <sup>3</sup>Atteso (A), <sup>4</sup>%O/A, <sup>5</sup>8 in 8. **Recovery:** <sup>1</sup>Soluzione, <sup>2</sup>Osservato (O), <sup>3</sup>Atteso (A), <sup>4</sup>%O/A. **Specificity:** <sup>1</sup>Composto, <sup>2</sup>quantità aggiunta, <sup>3</sup>Percentuale di Crossreattività, <sup>4</sup>ND: non determinabile, <sup>5</sup>Crossreattività inferiore a 0.006%. **Specificity:** <sup>1</sup>Composto, <sup>2</sup>quantità aggiunta, <sup>3</sup>Concentrazione apparente, <sup>4</sup>Percentuale di Crossreattività, <sup>5</sup>ND: non determinabile. **End-of-Run Effect:** <sup>1</sup>Provette. **Hemolysis:** <sup>1</sup>Globuli Rossi Impaccati, <sup>2</sup>Semplice.

**Português Exemplo de ensaio:** <sup>1</sup>Tubo, <sup>2</sup>Duplicado CPM, <sup>3</sup>Média de CPM, <sup>4</sup>CPM Líquida, <sup>5</sup>Porcentagem de Ligação, <sup>6</sup>hGH Aprox., ng/mL, <sup>7</sup>Total, <sup>8</sup>%NSB (Ligação Não Específica), <sup>9</sup>%MB (Ligação Máxima),

<sup>10</sup> Amostras desconhecidas, <sup>11</sup> Parâmetros do controle de qualidade, <sup>12</sup> 20% Intercepção.  
**Precisão Intra-ensaio:** <sup>1</sup> Média, <sup>2</sup> Desvio padrão, <sup>3</sup> Coeficiente de variação. **Precisão Inter-ensaio:** <sup>1</sup> Média, <sup>2</sup> Desvio padrão, <sup>3</sup> Coeficiente de variação. **Linearidade:** <sup>1</sup> Diluição, <sup>2</sup> Observado (O), <sup>3</sup> Esperado (E), <sup>4</sup> %O/E, <sup>5</sup> 8 em 8.  
**Recuperação:** <sup>1</sup> Solução, <sup>2</sup> Observado (O), <sup>3</sup> Esperado (E), <sup>4</sup> %O/E. **Especificidade:** <sup>1</sup> Composto, <sup>2</sup> Quantidade adicionada, <sup>3</sup> Percentagem de reação cruzada, <sup>4</sup> ND: não detectável, <sup>5</sup> Reactividade cruzada inferior a 0,006%. **Especificidade:** <sup>1</sup> Composto, <sup>2</sup> Quantidade adicionada, <sup>3</sup> Concentração Aparente, <sup>4</sup> Percentagem de reação cruzada, <sup>5</sup> ND: não detectável. **Efeito Fim-de-Série:** <sup>1</sup> Tubos. **Hemólise:** <sup>1</sup> Concentração de eritrócitos, <sup>2</sup> Não adicionada.

## Deutsch

### hGH Doppelantikörper RIA

**Anwendung:** Radioimmunoassay zur quantitativen Bestimmung von humanem Wachstumshormon (hGH) im Serum oder Plasma. Der Assay ist ausschließlich in der *In-vitro*-Diagnostik einzusetzen.

Artikelnummern: **KGHD1** (70 Tests), **KGHD2** (140 Tests).



Die Packung mit 70 Röhrchen enthält weniger als 3 Mikrocurie (111 Kilobecquerel) an radioaktivem <sup>125</sup>I-markiertem hGH; die Packung mit 140 Röhrchen enthält weniger als 6 Mikrocurie (222 Kilobecquerel).

### Klinische Relevanz

Humanes Wachstumshormon, Somatotropes Hormon (STH) oder Human-Growth-Hormon (hGH), ist ein einkettiges Proteohormon, das aus 191 Aminosäuren und 2 Disulfidbrücken besteht. Seine Molmasse beträgt ca. 22 000 Da. Die Synthese des Wachstumshormons findet in den Ribosomen der azidophilen somatotropen Zellen des Hypophysen-Vorderlappens statt. Dies geschieht unter dem stimulierenden Einfluss des im Hypothalamus gebildeten Growth-Hormon-Releasing-Hormons (GH-RH) über einen negativen Rückkoppelungsmechanismus. Die tägliche Produktionsrate beträgt beim

Erwachsenen etwa 350 µg/24 Stunden. Das hGH besitzt einen proteinanabolen Effekt. Es beeinflusst den Protein-, den Kohlenhydrat- und den Fettstoffwechsel, aber auch den Elektrolyt- und Wasserhaushalt. hGH führt zur Verminderung der Stickstoffausscheidung und dadurch zur positiven Stickstoffbilanz. Der Aminosäuretransport in die Zelle und der Einbau der Aminosäuren in Proteine werden gefördert. Es stimuliert zudem die RNA-Polymeraseaktivität. Mediatoren der wachstumsfördernden Wirkung des hGH sind die Somatomedine, eine andere Gruppe von Peptidhormonen.

Die Bestimmung der Serum-hGH-Spiegel ist insbesondere von Bedeutung für Diagnose und Therapiekontrolle von Störungen der hGH-Sekretion. Klinische Bilder einer hGH-Hyposekretion sind Zwergwuchs und Minderwuchs. Resultat einer Hypersekretion von hGH sind Gigantismus und Akromegalie.

Die klinische Interpretation von basalen hGH-Spiegeln kann nur mit äußerster Vorsicht erfolgen. Infolge des circadianen Rhythmus des hGH ist es äußerst schwierig, Referenzwerte zu definieren bzw. einzelne Basalwertbestimmungen zu interpretieren. Zahlreiche Faktoren, wie Schlaf, Schlaflosigkeit, körperliche Belastung, Stress, Hypoglykämie, Östrogene, Kortikosteroide, L-Dopa u.a. können die hGH-Sekretion beeinflussen. Wegen der Ähnlichkeit des hGH zu Prolaktin und HPL wurden mit älteren hGH-Assays bei schwangeren und stillenden Frauen oft falsch erhöhte hGH-Spiegel bestimmt.

Da nicht alle akromegalen Patienten erhöhte hGH-Basalwerte aufweisen, sind in diesen Fällen Glukose-Suppressionsteste von klinischer Bedeutung. Bei Gesunden kommt es nach oraler Glukosezufuhr zu einem Abfall der hGH-Konzentrationen auf nicht nachweisbare Werte. Bei Patienten mit Akromegalie ist hGH entweder nicht supprimierbar, oder es findet sich ein paradoxer Anstieg.

Patienten mit hGH-Mangel haben basale hGH-Spiegel, die denen von Gesunden gleichen. Zur Differentialdiagnostik des hGH-Mangels werden daher verschiedene Funktionsteste eingesetzt. So führt zum Beispiel eine körperliche Belastung von

15–20 Minuten bei Gesunden zu einem Anstieg der hGH-Spiegel. Andere Funktionsteste zur Überprüfung der hGH-Antwort basieren auf der Verabreichung von L-Dopa, Arginin oder Insulin. In manchen Fällen werden Propanolol oder Östrogene in Kombination mit dem primären Stimulus verabreicht, um die hGH-Antwort zu verstärken.

Es ist eine kleine Zahl von Patienten mit Zwergwuchs dokumentiert, die sowohl normale hGH-Basalwerte, als auch eine normale Antwort auf Funktionsteste zeigten. In solchen Fällen kann eine Unempfindlichkeit der Gewebe auf hGH oder die Somatomedine (IGFs) vorliegen, es können Antikörper vorhanden sein oder das gebildete hGH ist immunreaktiv, aber biologisch inaktiv.

## Methodik

Im Doppelantikörper hGH RIA konkurriert <sup>125</sup>I-markiertes hGH mit dem hGH in der Patientenprobe um eine limitierte Zahl von Antikörpern. Nach einer definierten Inkubationszeit werden die gebundenen Komponenten von den freien durch die PEG-vermittelte Doppelantikörper Methode getrennt. Am Ende wird die Antikörper-gebundene Fraktion in einem Gammacounter gemessen. Die Zählrate ist der Konzentration umgekehrt proportional.

### Zu pipettierende Reagenzien: 3

**Testdauer:** 2 Stunden

**Trennung:** Die gebrauchsfertige Präzipitationslösung enthält eine Kombination aus 2. Antikörper und PEG.

**Totalaktivität zum Zeitpunkt der Markierung:** ca. 60 000 cpm

## Hinweise und Vorsichtsmaßnahmen

Zur *In-vitro*-Diagnostik.

**Reagenzien:** Die Packung mit den Reagenzien sollte bei 2–8°C in einem Kühlschrank gelagert werden, der für radioaktives Material ausgewiesen ist. Die Entsorgung muss nach den jeweils gültigen Gesetzen erfolgen.

Die Reagenzien dürfen nur bis zum Verfallsdatum verwendet werden.

Einige Komponenten des Kits können Material humanen Ursprungs und/oder in anderer Weise gefährliche Inhaltsstoffe enthalten, die es unbedingt notwendig machen die folgenden Vorsichtsmaßnahmen einzuhalten.

Die generell geltenden Vorsichtsmaßnahmen sind einzuhalten und alle Komponenten als potenziell infektiös zu behandeln. Alle aus menschlichem Blut gewonnenen Materialien wurden auf Syphilis, Antikörper gegen HIV-1 und HIV-2, Hepatitis-B-Oberflächenantigen und Hepatitis-C-Antikörper untersucht und negativ befundet.

Bestimmten Komponenten wurde Natriumazid (<0,1 g/dl) hinzugefügt. Um die Bildung von explosiven Metallaziden in Blei- und Kupferrohren zu vermeiden, sollten die Reagenzien nur zusammen mit großen Wassermengen in die Kanalisation gespült werden.

**Wasser:** Destilliertes bzw. deionisiertes Wasser benutzen.

## Radioaktivität

Der Umgang mit radioaktivem Material ist in Deutschland genehmigungspflichtig. Deshalb muss der DPC eine Kopie der aktuellen gültigen Umgangsgenehmigung des Kunden vorliegen, bevor radioaktive Reagenzien versendet werden dürfen. Die Strahlenschutzverordnung ist zu beachten.

Das radioaktive Material ist gemäß der jeweiligen Umgangsgenehmigung zu handhaben.

Die Strahlenexposition ist zu minimieren. Spritzer sind sofort aufzuwischen und die betroffene Oberfläche zu dekontaminieren. Aerosolbildung ist zu vermeiden. Flüssiger und fester radioaktiver Abfall sind unter Beachtung der gültigen Richtlinien zu entsorgen.

## Bestandteile der Testpackung: Vorbereitung

Die Vorbereitung der einzelnen Komponenten sollte mindestens 10 Minuten vor dem Testansatz erfolgen.

## hGH Antiserum (GHD1)

Lyophilisiertes hGH Antiserum, mit Konservierungsmitteln. Jede Flasche mit

**7,7 ml** destilliertem oder deionisiertem Wasser rekonstituieren. Durch vorsichtiges Umdrehen mischen. Bei 2–8°C für 30 Tage nach der Rekonstitution haltbar. Farbe: Blau.  
**KGHD1:** 1 Flasche. **KGHD2:** 2 Flaschen.

#### <sup>125</sup>I hGH (GHD2)

Lyophilisiertes, jodiertes hGH, mit Konservierungsmitteln. Jede Flasche mit **7,7 ml** destilliertem oder deionisiertem Wasser rekonstituieren. Durch vorsichtiges Umdrehen mischen. Lagerung bei 2–8°C. Haltbar bis 30 Tage nach der Rekonstitution oder bis zum Verfallsdatum auf der Flasche. Farbe: gelb.  
**KGHD1:** 1 Flasche. **KGHD2:** 2 Flaschen.

#### hGH Standards (GHD3–9)

7 Flaschen, A – G, lyophilisierte Standards. Mindestens 30 Minuten vor dem Testbeginn, den 0-Standard **A mit 5,0 ml** destilliertem oder deionisiertem Wasser und die restlichen Standards **B – G mit 2,0 ml** destilliertem oder deionisiertem Wasser rekonstituieren. Volumetrische Pipetten verwenden und durch vorsichtiges Umdrehen mischen. Bei 2–8°C für 30 Tage nach der Rekonstitution haltbar. Für eine längere Lagerung portionieren und einfrieren. Bei –20°C für 6 Monate haltbar.  
**KGHD1:** 1 Set. **KGHD2:** 1 Set.

Die Standards haben chargenspezifische Werte von ca. 0, 1, 2, 5, 10, 20 und 30 ng/ml hGH in einer humanen Serum Matrix. Der Assay wurde kalibriert an den "World Health Organization's International Reference Preparations of human Growth Hormone for immunoassay", Nr. 66/217 und 80/505, und dem "National Institute of Health's reference preparation for hGH NIAMDD-hGH-RP-1". *Die exakten Konzentrationen entnehmen Sie bitte den Etiketten der Standardflaschen.* Weitere Standardkurvenpunkte können durch Mischen der Standards hergestellt werden.

#### Präzipitierendes Reagenz (ACGG)

Ziege-Anti-Kaninchen Gamma Globulin (GARGG) und verdünntes Polyethylenglykol (PEG) in Kochsalzlösung. Das präzipitierende Reagenz wird in flüssiger Form, gebrauchsfertig geliefert. Bei 2–8°C bis 30 Tage nach dem Öffnen haltbar. Falls nach

der Kühlung feine Präzipitate auftreten, ist das Reagenz gründlich, ohne Schaumbildung, zu schütteln. Farbe: Blau.  
**KGHD1:** 1 Flasche. **KGHD2:** 2 Flaschen.

#### Erforderliche Laborgeräte und Hilfsmittel

Gamma Counter

Zentrifuge – vorzugsweise gekühlt für 3000xg

Wirbelmischer

#### Reagenz Vorbereitung

Destilliertes oder deionisiertes Wasser

Volumetrische Pipetten: für 2,0, 5,0 und 7,7 ml

#### Radioimmunoassay

Unbeschichtete 12x75 mm Polypropylen-Röhrchen – erhältlich bei DPC

Mikropipetten – 100 µl und 1,0 ml.

Dekantierständer – erhältlich bei DPC.

Logit-Log-Papier – erhältlich bei DPC (Artikelnummer: ZP797)

DPC Immunoassay-Kontrolle (> 25 Parameter, 3 Konzentrationen) (Artikelnummer: CON6).

#### Probengewinnung

Der Patient sollte 30 Minuten vor der Blutentnahme nüchtern und vollständig ausgeruht sein.<sup>6,7</sup>

Blutentnahme durch Venenpunktion<sup>5</sup> in unbeschichtete, heparinisierte oder EDTA-Röhrchen, Hämolyse vermeiden, Trennung des Serums oder Plasma von den Blutzellen, Zeitpunkt der Blutentnahme notieren.

Der Einsatz einer Ultrazentrifuge wird zur Klärung von lipämischen Proben empfohlen.

Lipämische, hämolytische oder stark kontaminierte Proben können zu fehlerhaften Resultaten führen.

Blutentnahmeröhrchen von verschiedenen Herstellern können differierende Werte verursachen. Dies hängt von den verwendeten Materialien und Additiven (Gel oder physische Trennbarrieren, Gerinnungsaktivatoren und /oder Antikoagulantien) ab. Doppelantikörper hGH sind nicht mit allen möglichen Röhrchenvariationen ausgetestet worden.

Details der getesteten Röhrchenarten sind dem Kapitel "Alternative Probenarten" zu entnehmen.

**Erforderliche Menge:** 100 µl Serum oder Plasma pro Röhrchen.

**Lagerung:** Bevorzugt gekühlt. Bei 2–8°C für 8 Stunden,<sup>6,7</sup> oder bei –20°C für 2 Monate (portioniert) haltbar. (Wiederholtes Auftauen und Einfrieren vermeiden.)

Die Proben vor Testbeginn auf Raumtemperatur (15–28°C) bringen und durch vorsichtiges Umdrehen und Wirbeln mischen. (Gefrorene Proben dürfen *nicht* durch Erhitzen im Wasserbad aufgetaut werden.)

## Testansatz und Durchführung

Alle Testkomponenten, mit Ausnahme des präzipitierenden Reagenz, vor Testbeginn auf Raumtemperatur (15–28°C) bringen.

- 1 Jeweils zwei Röhrchen mit T (Totalaktivität), NSB (Unspezifische Bindung), A (Maximale Bindung) und B bis G beschriften. Jeweils 2 Röhrchen pro Patient und Kontrolle beschriften.

| Standard | ca. ng/ml |
|----------|-----------|
| A (MB)   | 0         |
| B        | 1         |
| C        | 2         |
| D        | 5         |
| E        | 10        |
| F        | 20        |
| G        | 30        |

**Beachte:** Die Standards sind *chargenspezifisch*. Die Werte können den Flaschenetiketten entnommen werden.

- 2 **100 µl** des 0-Standards A in die NSB und A Röhrchen, und **100 µl** der restlichen Standards B – G in die entsprechend beschrifteten Röhrchen pipettieren. **100 µl** von jeder Patientenprobe (Serum oder Plasma) und **100 µl** von jeder Kontrolle in die entsprechend vorbereiteten Röhrchen pipettieren.

Patientenproben, in denen Konzentrationen oberhalb des höchsten Standards (30 ng/ml) erwartet werden, sind mit 0-Standard

vor dem Einsatz in den Test zu verdünnen.

Es ist gute Laborpraxis Pipetten mit Einmalspitzen zu verwenden und die Spitze von Probe zu Probe zu wechseln um Verschleppung zu vermeiden.

- 3 **100 µl** hGH Antiserum (Blau) in alle Röhrchen, außer NSB und T Röhrchen hinzufügen. Mischen.

Alle Röhrchen, außer die NSB und T Röhrchen sollten sich blau-grün färben. Für die 100 µl Antiserum und Tracer Zugabe wird die Verwendung eines Dispenser empfohlen.

- 4 Für **1 Stunde** bei Raumtemperatur (15–28°C) inkubieren.

Die Inkubation kann bis auf 90 Minuten bei Raumtemperatur verlängert werden, vorausgesetzt die 2. Inkubation (Schritt 6) wird genauso modifiziert.

- 5 **100 µl** <sup>125</sup>I hGH (Gelb) in alle Röhrchen hinzufügen. Mischen.

Alle Röhrchen, außer die NSB und T Röhrchen sollten grün sein. Die T-Röhrchen bis zur Messung (siehe Schritt 10) beiseite stellen; sie bedürfen keiner weiteren Behandlung.

- 6 Für **1 Stunde** bei Raumtemperatur (15–28°C) inkubieren.

Dieser Inkubationsschritt sollte, wie Schritt 4 behandelt werden.

- 7 **1.0 ml** kaltes präzipitierendes Reagenz (Blau) in jedes Röhrchen hinzufügen. Mischen.

Vor dem Verteilen sollte die Präzipitationslösung gründlich durchmischt werden (ohne Schaumbildung) bis alle eventuell sichtbaren Präzipitate verschwunden sind.

- 8 **15 Minuten** bei 3000xg zentrifugieren

- 9 Mit Hilfe eines Dekantierständers alle Röhrchen (außer die T-Röhrchen) dekantieren oder absaugen, das Präzipitat zur Messung zurückhalten.

Röhrchen für 10 Minuten umgedreht auf Fließpapier stehen lassen. Anschließend werden die Röhrchen vorsichtig ausgeklopft und der Rand abgewischt, um alle restlichen Tröpfchen zu entfernen.

**10** Jedes Röhrchen für **1 Minute** messen.

### Berechnung der Ergebnisse

Um die Konzentrationen aus der Logit-Log Darstellung der Standardkurve abzulesen werden zunächst der Mittelwert der zwei Röhrchen, bereinigt um den Mittelwert der NSB Counts pro Minute (cpm), berechnet:

Netto Counts = (Mittelwert CPM) minus (Mittelwert **NSB** CPM)

Anschließend wird die Bindung jedes Röhrchenpaars als Prozent der Maximalbindung (MB, B0) bestimmt. Hierzu werden die mittleren CPM des A-Standards korrigiert um die mittlere NSB als 100% gesetzt:

Prozentbindung = (Netto Counts / Netto **MB** Counts) × 100

Die so ermittelten B/B0 aller Standards, außer dem des 0-Standards, werden auf der y-Achse auf Logit-Log Papier gegen die Konzentration auf der x-Achse (logarithmisch) aufgetragen. Die Punkte werden mit bestmöglicher Annäherung durch eine gerade Linie verbunden. Die Ergebnisse der unbekannten Proben können dann durch Interpolation an der Kurve abgelesen werden.

Es ist gute Laborpraxis die Ergebnisse der Doppelbestimmung auf Übereinstimmung zu prüfen und eine Grafik der Standardkurve darzustellen (auch wenn die eigentliche Berechnung durch ein Computerprogramm erfolgt), um visuell zu überprüfen, ob für die Standardkurve die geeignete Transformation verwendet wurde und um eventuell abweichende Standardkurvenpunkte zu entdecken. Es wird weiterhin empfohlen, folgende Parameter der Berechnung zu protokollieren:

T = Totalaktivität (als Counts pro Minute)

%NSB =  $100 \times (\text{Mittelwert NSB Counts} / \text{Total Counts})$

%MB =  $100 \times (\text{Netto Counts} / \text{Total Counts})$

und die 20, 50 und 80 Prozent "intercepts", wobei

20% = Konzentration bei 20 Prozent Bindung, etc.

Bitte beachten Sie, dass auch andere Auswertungen z. B. nach der 4-Para-

meter-Logistik akzeptabel sind. Siehe: Dudley RA, et al. Guidelines for immunoassay data reduction. Clin Chem 1985;31:1264-71.

**Auswertebeispiel:** Dieses Beispiel dient nur zur Veranschaulichung und ist nicht dazu geeignet Werte aus einem anderen Testansatz damit zu ermitteln. Aufgrund der *Chargenabhängigkeit* der Standard-Konzentrationen müssen die in der rechten Spalte der Tabelle gelisteten Konzentrationen nicht mit den Konzentrationen in Ihrer Lieferung übereinstimmen. (siehe Tabelle "Example Run").

### Qualitätskontrolle

Es wird empfohlen Kontrollen oder Serumpools mit mindestens 2 hGH Konzentrationen (niedrig und hoch) routinemäßig als unbekannte Proben einzusetzen.

Patientenergebnisse dürfen nur dann freigegeben werden, wenn die laborspezifischen Akzeptanzkriterien erfüllt sind. Hierzu sind die jeweils gültigen Richtlinien zu berücksichtigen.

Es ist gute Laborpraxis die Chargennummern, sowie das Datum der ersten Öffnung bzw. Rekonstitution der verwendeten Komponenten zu protokollieren. Die wiederholte Messung von Proben kann bei der Beurteilung der Interassay Präzision hilfreich sein. Der Einsatz von Kontrollprobenpaaren an unterschiedlichen Positionen des Testansatzes ist hilfreich, um einen eventuellen Drift zu erkennen.

**Zentrifugation:** Die Durchführung erfordert eine Zentrifugation bei 3000xg für 15 Minuten. Niedrigere Beschleunigungen sind ebenfalls akzeptabel, wenn die Zentrifugationszeit verlängert wird, z. B. auf 30 Minuten bei 1500xg. Eine gekühlte Hochgeschwindigkeitszentrifuge ist empfehlenswert, aber nicht zwingend notwendig. Mit den unten genannten Formeln kann die Beschleunigung der eingesetzten Zentrifuge bei einer bestimmten Umdrehungszahl oder die benötigte Umdrehungszahl (Umdrehungen pro Minute) für die erforderliche Zentrifugalbeschleunigung berechnet werden.

$g = 28,38 \times (U/\text{min} / 1\,000)^2 \times \text{Radius [ Zoll ]}$

$$U/\text{min} = 187,7 \times \sqrt{(g / \text{Radius [ Zoll ]})}$$

oder

$$g = 11,18 \times (U/\text{min} / 1\,000)^2 \times \text{Radius [ cm ]}$$

$$U/\text{min} = 299,07 \times \sqrt{(g / \text{Radius [ cm ]})}$$

## Referenzwerte

In einer Referenzbereichsstudie wurden Serumproben von 72 nüchternen, erwachsenen Freiwilligen im Doppelantikörper hGH RIA gemessen. Die Ergebnisse der Studie empfehlen einen Referenzbereich für Erwachsenen von:

Nicht nachweisbar bis 7 ng/ml.

Die genannten Bereiche sind *als Richtlinie* zu interpretieren. Jedes Labor sollte seine eigenen Referenzbereiche etablieren.

## Leistungsdaten

Im folgenden Abschnitt sind Daten gezeigt, die für die Leistung des hGH Doppelantikörper RIA repräsentativ sind. Die Ergebnisse sind als ng/ml ausgedrückt.

### Umrechnungsfaktor:

$$\text{ng/ml} \times 2,0 \rightarrow \text{mIU/l [WHO IRP 66/217]}$$

$$\text{ng/ml} \times 2,6 \rightarrow \text{mIU/l [WHO 1st IRP 80/505]}$$

### Messbereich:

ca. 1 – 30 ng/ml.

Die Standardwerte sind chargen-spezifisch.

**Analytische Sensitivität:** 0,9 ng/ml

**Intraassay-Präzision:** Statistische Berechnung der Ergebnisse von 6 Proben, die in 20 Röhrchenpaaren in einem Ansatz gemessen wurden. (Siehe Tabelle „Intraassay-Precision“.)

**Interassay-Präzision:** Statistische Berechnung der Ergebnisse von 6 Proben, die in 20 Röhrchenpaaren in verschiedenen Ansätzen gemessen wurden. (Siehe Tabelle „Interassay-Precision“.)

**"End of Run" Effekt:** Tritt bis ca. 150 Röhrchen nicht auf. (siehe Tabelle "End-of-Run Effect").

**Spezifität:** Hochspezifischer Antikörper gegen humanes Wachstumshormon. (siehe Tabelle „Spezifität“.)

**Linearität:** Proben wurden in verschiedenen Verdünnungen getestet.

(Repräsentative Daten entnehmen Sie bitte der Tabelle „Linearität“.)

**Wiederfindung:** Proben wurden 1:19 mit 4 hGH Lösungen (50, 100, 200 und 400 ng/ml) versetzt und gemessen. (Repräsentative Daten entnehmen Sie bitte der Tabelle „Recovery“.)

**Bilirubin:** Bilirubin hat in Konzentrationen bis zu 100 mg/l keinen Einfluss auf die Ergebnisse, der größer als die Impräzision des Assays selbst ist.

**Hämolyse:** Ergebnisse aus hämolysierten Proben sollten mit Vorsicht interpretiert werden, wegen der Tendenz – wenn auch nicht einheitlich – zu erniedrigten Werten als eine Funktion ansteigender Hämoglobin Konzentrationen. (Siehe Tabelle "Hemolysis".)

**Freie Fettsäuren:** Die Anwesenheit von Ölsäure in Konzentrationen bis zu 10 nmol/l hat keinen klinisch signifikanten *in vitro* Einfluss auf die Ergebnisse.

**Alternativer Probentyp:** Um den Einfluss von Antikoagulantien zu überprüfen, wurde Blut von 20 Gesunden in Röhrchen ohne Zusatz, Heparin- und EDTA-Röhrchen entnommen. Alle Proben wurden im hGH Doppelantikörper RIA gemessen. Berechnung der linearen Regression:

$$(\text{Heparin}) = 1,02 (\text{Serum}) + 0,04 \text{ ng/ml}$$

$$r = 0,998$$

$$(\text{EDTA}) = 0,97 (\text{Serum}) + 0,09 \text{ ng/ml}$$

$$r = 0,995$$

Mittelwerte:

3,8 ng/ml (Heparin)

3,7 ng/ml (Serum)

3,7 ng/ml (EDTA)

**Methodenvergleich:** Der Assay wurde mit einem kommerziell erhältlichen Radioimmunoassays (Kit A) anhand von 145 Patientenserumproben verglichen. (Konzentrationsbereich: nicht nachweisbar bis ca. 7,4 ng/ml im Doppelantikörper Verfahren.) Berechnung der linearen Regression:

$$(\text{Kit A}) = 1,13 (\text{DAK}) + 0,13 \text{ ng/ml}$$

$$r = 0,985$$

Mittelwerte:

1,72 ng/ml (Doppelantikörper)

2,07 ng/ml (Kit A)

Die leicht erniedrigten Werte des Doppelantikörper Verfahren erklären sich wahrscheinlich aus dem Einsatz der Standards. Diese basieren auf einer

humanen Serum-Matrix, um eine maximale Vergleichbarkeit zu typischen Patientenproben zu erreichen, während im Kit A eine Rinder-Puffer-Matrix verwendet wird.

## Anwendungsberatung

Bei Rückfragen wenden Sie sich bitte an Ihre DPC Niederlassung.

Das Qualitätssystem der Diagnostic Products Corporation ist nach ISO 13485:2003 registriert.

---

## Español

---

### Doble Anticuerpo hGH

**Utilidad del análisis:** El procedimiento Doble Anticuerpo hGH en un  $^{125}\text{I}$  radioinmunoensayo diseñado para la determinación cuantitativa de la hormona de crecimiento humana en suero o plasma. Su uso es estrictamente para diagnóstico *in vitro*.

Referencia: **KGHD1** (70 tubos), **KGHD2** (140 tubos).



El kit de 70 tubos contiene menos de 3 microcurios (111 kilobecquerelios) de hormona de crecimiento marcada con  $^{125}\text{I}$  radiactivo; el kit de 140 tubos contiene menos de 6 microcurios (222 kilobecquerelios).

### Resumen y Explicación del Test

La hormona de crecimiento humana (hGH, somatotropina) es un polipéptido que se origina en la pituitaria anterior. Tiene 191 aminoácidos de longitud y un peso molecular de aproximadamente 22 000 daltons. Sus efectos metabólicos son principalmente anabólicos. Activa la conservación de las proteínas y participa en una amplia variedad de mecanismos de síntesis de proteínas. También mejora el transporte de glucosa y facilita la acumulación de depósitos de glucógeno. Otra familia de hormonas peptídicas, las somatomedinas, media su cascada de acciones en la activación del crecimiento.

La determinación de hGH es de primordial interés en el diagnóstico y tratamiento de diversas formas de secreción inadecuada

de la hormona de crecimiento. Entre los trastornos clínicos de hiposecreción se incluyen el enanismo y el potencial de crecimiento no alcanzado. La hipersecreción se asocia con gigantismo y acromegalia.

La interpretación clínica de los niveles de la hormona de crecimiento debe hacerse con precaución. Estos niveles varían a lo largo del día, lo que hace difícil definir un intervalo de referencia o juzgar el estado de un individuo sobre la base de una sola determinación. Se sabe que hay muchos factores que influyen en la tasa de secreción de la hormona de crecimiento, entre los que se incluyen períodos de sueño y vigilia, ejercicio, estrés, hipoglucemia, estrógenos, corticosteroides, L-dopa y otros. Debido a su similitud con la prolactina y el lactógeno placentario, inmunoensayos anteriores de la hormona de crecimiento a menudo arrojaban valores erróneamente altos en mujeres gestantes y en período de lactancia.

Puesto que no todos los individuos acromegálicos tienen niveles de base elevados, los análisis de supresión basados en la carga de glucosa resultan valiosos en este contexto. A pesar de la hiperglucemia inducida, en la acromegalia raramente se produce un descenso de los niveles de base.

Los individuos con déficit de hormona de crecimiento tienen niveles, en ayunas y descanso, similares a los de los individuos sanos. Se han ideado varios análisis de carga para diferenciar estos grupos. Así, al iniciarse el sueño profundo o bien después de 15 a 20 minutos de ejercicio vigoroso, los niveles de la hormona de crecimiento suelen mostrar un aumento. Otros análisis de sensibilidad a la hormona de crecimiento se basan en la administración de L-dopa, arginina e insulina. Para acentuar la respuesta a veces se administra propanolol o estrógeno junto con el estímulo primario.

Se han documentado algunos casos de enanismo en los que tanto el nivel basal como la respuesta al análisis de carga eran normales. En tales casos suele darse una insensibilidad tisular a la hormona de crecimiento o a las somatomedinas, o bien la presencia de anticuerpos o de



hormona de crecimiento inmunorreactiva pero biológicamente inactiva.

## Principio del análisis

En el procedimiento Doble Anticuerpo hGH, la hormona de crecimiento marcada con <sup>125</sup>I compete con la hormona de crecimiento de la muestra del paciente por los sitios de unión del anticuerpo específico para la hormona de crecimiento. Después de incubar por un tiempo determinado, la separación de la forma unida de la libre se logra mediante un método de doble anticuerpo acelerado por PEG. Luego el tubo se lee en un contador gama. La cantidad de cuentas está inversamente relacionada con la cantidad de hormona de crecimiento presente en la muestra del paciente.

**Reactivos a pipetear:** 3

**Tiempo total de incubación:** 2 horas

**Separación:** La Solución Precipitante lista para usar contiene el segundo anticuerpo y PEG diluido.

**Cuentas totales en la iodización:**  
aproximadamente 60 000 cpm

## Advertencias y precauciones

Para uso diagnóstico *in vitro*.

**Reactivos:** Almacenar a 2–8°C en una cámara preparada para almacenar material radiactivo. Desechar de acuerdo a la legislación en vigor.

No usar los reactivos después de su fecha de caducidad.

Algunos componentes suministrados en el kit pueden contener material de origen humano y/o otros componentes potencialmente peligrosos que necesitan ciertas precauciones.

Siga las precauciones universales y manipule todos los componentes como si fueran capaces de transmitir agentes infecciosos. Los materiales derivados de sangre humana han sido analizados y son negativos para sífilis; para anticuerpos frente al VIH 1 y 2; para el antígeno de superficie de hepatitis B y para los anticuerpos de hepatitis C.

Se ha usado Azida sódica, en concentraciones menores de 0,1 g/dl, como conservante. Para su eliminación, lavar con grandes cantidades de agua

para evitar la constitución de residuos de azidas metálicas, potencialmente explosivos, en las cañerías de cobre y plomo.

**Agua:** Usar agua destilada o desionizada.

## Radiactividad

Una copia de cualquier certificado de licencia de radioisótopos (específico o general) emitido a la aduana de los EE.UU. se registrará en los ficheros de Diagnostic Products Corporation antes de que se puedan enviar kits o componentes conteniendo material radiactivo. Estos materiales radiactivos pueden adquirirse por cualquier cliente con la licencia específica apropiada. Con una licencia general, estos materiales radiactivos pueden adquirirse solo por médicos, veterinarios en la práctica de la medicina veterinaria, laboratorios clínicos y hospitales — y estrictamente para la clínica *in vitro* o tests de laboratorio que no conlleven la administración interna o externa de material radiactivo o su radiación a humanos u otros animales. Su adquisición, recepción, almacenaje, uso, transferencia y desecho están regulados, y se expenderá una licencia (general o específica) de la Comisión Nuclear de EE.UU. o de un Estado con el NRC para su consiguiente control.

Manejar los materiales radiactivos de acuerdo a los requerimientos de su licencia general o específica. Para minimizar la exposición a la radiación, el usuario debe adherirse al cuarto conjunto de guías publicadas por el National Bureau of Standards con el nombre *Safe Handling of Radioactive Materials* (Handbook No. 92, issued March 9, 1964) y en las consiguientes publicaciones de las autoridades Federales o Estatales.

Limpiar y descontaminar rápidamente las superficies afectadas. Evitar la generación de aerosoles. Eliminar los residuos sólidos radiactivos de acuerdo con los requerimientos de su licencia. Licencias generales (NRC Form 483) pueden eliminar sus residuos sólidos radiactivos como residuos no radiactivos, después de retirar las etiquetas. Licencias específicas (NRC Form 313) se deben referir al Título 10, Código de Regulaciones Federales, Parte 20. Las licencias en Estados Asociados deben referirse a las normativas de su correspondiente Estado.

Licencias generales pueden eliminar sus residuos líquidos radiactivos contenidos en este tipo de productos como cualquier otro material líquido, quitando las etiquetas de los contenedores y procesándolos como residuos sólidos. Licencias específicas pueden eliminar pequeñas cantidades de residuos líquidos radiactivos contenidos en este tipo de productos como cualquier otro material líquido. Refiérase a la normativa aplicable a su laboratorio.

### **Materiales Suministrados: Preparación Inicial**

Preparar todos los componentes por los menos 10 minutos antes de usarlos.

#### **Antisuero hGH (GHD1)**

Antisuero liofilizado para la hormona de crecimiento, con conservante. Reconstituir cada vial con **7,7 ml** de agua destilada o desionizada. Mezclar por inversión suave. Estable a 2–8°C durante 30 días tras su reconstitución. Color: azul.

**KGHD1:** 1 vial. **KGHD2:** 2 viales.

#### **<sup>125</sup>I hGH (GHD2)**

Hormona de crecimiento yodada, con conservante. Reconstituir cada vial con **7,7 ml** de agua destilada o desionizada. Mezclar por inversión suave. Estable a 2–8°C durante 30 días después de la reconstitución, o hasta la fecha de caducidad impresa en el vial. Color: amarillo.

**KGHD1:** 1 vial. **KGHD2:** 2 viales.

#### **Calibradores de hGH (GHD3–9)**

Siete viales de calibradores liofilizados, marcados A a G. Por lo menos 30 minutos antes de usar, reconstituir el calibrador cero **A con 5,0 ml** de agua destilada o desionizada, y cada uno de los calibradores restantes, **B a G, con 2,0 ml** de agua destilada o desionizada. Usar pipetas volumétricas y mezclar por inversión *suave*. Estable a 2–8°C durante 30 días tras su reconstitución. Para almacenar por períodos más prolongados, alicuotar y congelar: estable a –20°C durante 6 meses.

**KGHD1:** 1 juego. **KGHD2:** 1 juego.

Los calibradores tienen valores *lote-específicos de aproximadamente* 0, 1, 2, 5, 10, 20 y 30 ng/ml en una matriz de suero humano. El ensayo está

normalizado en términos de las Preparaciones Internacionales de Referencia de la Organización Mundial de la Salud para la Hormona de Crecimiento humana para inmunoensayo, números 66/217 y 80/505, y la preparación de referencia del Instituto Nacional de Salud para hGH NIAMDD-hGH-RP-1. *Para las concentraciones exactas en ng/ml, consultar las etiquetas del vial.* Los puntos de calibración intermedios se pueden obtener mezclando los calibradores en proporciones adecuadas.

#### **Solución de Precipitación (ACGG)**

Gama globulina de cabra anti-conejo (GARGG) y polietilén glicol diluido (PEG) en solución salina. La Solución de Precipitación se suministra en forma líquida, lista para usar. Estable a 2–8°C durante 30 días después de su apertura. La Solución de Precipitación deberá mezclarse bien antes de usar, ya que se puede formar un precipitado fino después de guardarla a 2–8°C. Color: azul.

**KGHD1:** 1 vial. **KGHD2:** 2 viales.

### **Materiales Requeridos pero no suministrados**

Contador Gamma

Centrífuga – preferiblemente refrigerada y capaz de producir por lo menos 3000 xg.

Vortex

#### **Preparación de los reactivos**

Agua destilada o desionizada.

Pipeta volumétrica: 2,0, 5,0 y 7,7 ml

#### **Radioinmunoanálisis**

Tubos de ensayo de polipropileno de 12 x 75 mm, disponibles en DPC

Micropipetas: 100 µl y 1,0 ml.

Rack de decantación – disponible en DPC

Papel gráfico Logit-log – disponible en DPC (Referencia: ZP797)

Un control de inmunoanálisis, de tres niveles, basado en suero humano, que contiene hGH como uno de sus 25 constituyentes, disponible en DPC (Referencia: CON6).

## Recogida de la muestra

El paciente deberá estar en ayunas y en reposo absoluto 30 minutos antes de recoger la sangre.<sup>6,7</sup>

Recoger la sangre por venipunción<sup>5</sup> en tubos sin anticoagulante, heparinizados o con EDTA, y separar el suero o plasma de las células. Registrar el tiempo de la recolección.

Se recomienda el uso de una ultracentrífuga para aclarar las muestras lipémicas.

Las muestras lipémicas, hemolizadas o ampliamente contaminadas pueden dar resultados erróneos.

Los tubos para recoger sangre de distintos fabricantes pueden producir valores diferentes, dependiendo del material del tubo y de los aditivos, incluyendo barreras de gel o barreras físicas, activadores de la coagulación y/o anticoagulantes. El hGH Double Antibody no ha sido analizado con todos los distintos tipos de tubos. Para obtener detalles sobre los tipos de tubos que se han analizado, consulte la sección de Tipos de Muestras Alternativas.

**Volumen requerido:** 100 µl suero o plasma por tubo.

**Conservación:** Refrigerar inmediatamente. Estable a 2–8°C durante 8 horas,<sup>6,7</sup> o 2 meses (alicuotado) a –20°C. (Evitar la congelación y descongelación repetidas).

Antes del ensayo, llevar todas las muestras a temperatura ambiente (15–28°C) y mezclar por inversión. No intentar la descongelación de muestras congeladas calentándolas en un baño de agua.

## Procedimiento del Radioinmunoanálisis

Todos los componentes, excepto por la Solución de Precipitación, deben llevarse a temperatura ambiente (15–28°C) antes de su uso.

- 1 Marcar dieciocho tubos por duplicado: T (cuentas totales), NSB (unión inespecífica), A (unión máxima) y B a G. Marcar tubos adicionales, también por duplicado, para los controles y las muestras de los pacientes.

| Calibrador | Aproximado ng/ml |
|------------|------------------|
| A (MB)     | 0                |
| B          | 1                |
| C          | 2                |
| D          | 5                |
| E          | 10               |
| F          | 20               |
| G          | 30               |

**Nota:** Los calibradores son lote-específicos. Ver las etiquetas de cada vial de calibrador para conocer el valor en ng/ml.

- 2 Pipetear **100 µl** del calibrador cero A en los tubos NSB y A, y **100 µl** de cada uno de los calibradores B-G en los tubos correspondientemente marcados. Pipetear **100 µl** de cada muestra del paciente (suero o plasma) y **100 µl** de cada control en los tubos preparados.

Las muestras de los pacientes que se espera que contengan concentraciones de hGH mayores que la del calibrador más alto (30 ng/ml) se deberán diluir con el calibrador cero antes del ensayo.

Es una buena práctica el uso de micropipetas con punta desechables, cambiando las puntas entre las muestras, para evitar la contaminación por arrastre.

- 3 Añadir **100 µl** de antisuero para hGH (Azul) a todos los tubos, excepto a los tubos NSB y T. Mezclar en el Vortex.

Todos los tubos, excepto los tubos NSB y T, deberán estar de color azul-verde. Para las adiciones de 100 µl de antisuero y trazador se recomienda usar un dispensador de repetición.

- 4 Incubar durante **1 hora** a temperatura ambiente (15–28°C).

La incubación se puede prolongar hasta 90 minutos a temperatura ambiente, siempre que la segunda incubación (paso 6) se modifique en forma similar.

- 5 Añadir **100 µl** de <sup>125</sup>I hGH (Amarillo) a todos los tubos. Mezclar en el Vortex.

Todos los tubos, excepto los tubos NSB y T, deberán estar de color verde. Dejar los tubos T a un lado para su conteo (paso 10); no

requieren más procesamiento posterior.

- 6 Incubar durante **1 hora** a temperatura ambiente (15–28°C).  
Este paso de incubación deberá llevarse a cabo de la misma forma que el paso 4 anterior.
- 7 Añadir **1,0 ml** de la Solución de Precipitación (Azul) *fría* a todos los tubos. Mezclar en el Vortex.  
Todos los tubos deberán estar de color azul, excepto por los tubos T que deberán estar amarillos. Antes de dispensar, se deberá mezclar bien la Solución de Precipitación (sin crear espuma), hasta que todo el precipitado visible haya desaparecido.
- 8 Centrifugar **15 minutos** a 3000 g.
- 9 Decantar (o aspirar) el sobrenadante, reteniendo el precipitado para su conteo.  
Usando un rack de decantación de espuma, golpear los tubos suavemente sobre papel absorbente y secar los bordes, para remover todas las gotas residuales.
- 10 Contar cada tubo durante **1 minuto**.

### Cálculo de resultados

Para calcular las concentraciones de hormona de crecimiento a partir de una representación logit-log de la curva de calibración, primero hay que calcular para cada pareja de tubos las cuentas medias por minuto corregidas con el NSB:

Cuentas netas = (Media CPM) menos (Media **NSB** CPM)

Entonces, determinar la unión de cada pareja de tubos como un porcentaje de la unión máxima (MB), tomando las cuentas corregidas con el NSB de los tubos A como 100%:

Porcentaje de Unión = (Cuentas netas / Cuentas **MB** netas) × 100

Usando papel gráfico logit-log, representar el porcentaje de unión en el eje vertical frente a la concentración en el eje horizontal (logarítmico) para cada calibrador no cero y dibujar la línea que pase por esos puntos aproximadamente. Los resultados de las muestras pueden ser leídos en la curva por interpolación.

Es una buena práctica inspeccionar los resultados para comprobar la concordancia entre los replicados, y realizar una gráfica de la curva de calibración (aunque los cálculos se realicen por ordenador) para ver la transformación más apropiada a usar y las posibles desviaciones en los puntos de calibración. También, recomendamos mantener un registro de los siguientes parámetros de la reducción de datos:

T = Cuentas totales (como cuentas por minuto)

%NSB =  $100 \times (\text{Media cuentas NSB} / \text{cuentas totales})$

%MB =  $100 \times (\text{Cuentas netas} / \text{Cuentas totales})$

Y los cortes 20, 50 y 80 por ciento, donde

20% = Concentración al 20 por ciento de unión, etc.

Otras aproximaciones, por ejemplo, logística 4-parámetros, también son aceptables. Ver Dudley RA, et al. "Guidelines for immunoassay data reduction". Clin Chem 1985;31:1264-71.

**Ejemplo:** Sólo como ilustración, no se puede utilizar para calcular resultados. Al ser los valores de los calibradores *lote-específicos*, las concentraciones expresadas en la columna derecha no pueden coincidir con los valores de los calibradores suministrados en su envío. (Ver la tabla "Example Run").

### Control de Calidad

Se deben procesar de manera rutinaria al menos dos niveles de controles (o pool de sueros) con diferente concentración de hGH — baja y alta.

Informar los resultados de los pacientes sólo si los resultados de los controles para este ensayo están dentro de los criterios de aceptabilidad establecidos por su laboratorio.

Es una buena práctica de laboratorio registrar para cada ensayo los números de lote de los componentes usados, así como las fechas en las que fueron abiertos por primera vez y reconstituidos. También recomendamos el uso de gráficos diarios de los controles —como se describe, por ejemplo, en Westgard JO, et al. A multi-rule chart for quality control. Clin Chem 1981;27:493-501. Las muestras repetidas pueden servir como una herramienta de valor adicional para

monitorizar la precisión interensayo, y las parejas de los tubos del control pueden espaciarse a lo largo de la tanda de ensayo para verificar la ausencia de deriva significativa.

**Centrifugación:** El procedimiento establece centrifugar a 3000 xg durante 15 minutos. Aceleraciones menores han probado ser satisfactorias sólo cuando el tiempo de centrifugación se aumenta adecuadamente, por ejemplo, 30 minutos a 1500 xg. El uso de una centrífuga de alta velocidad refrigerada es deseable pero no esencial. Usar las fórmulas que se dan a continuación para calcular la aceleración de su centrífuga a una velocidad dada, o la velocidad (en revoluciones por minuto) requerida para lograr la fuerza g deseada.

Fuerza g =  $28,38 \times (\text{rpm} / 1\,000)^2 \times \text{radio}$  [pulgadas]

$\text{rpm} = 187,7 \times \sqrt{(\text{fuerza g} / \text{radio [pulgadas]})}$

o

Fuerza g =  $11,18 \times (\text{rpm} / 1\,000)^2 \times \text{radio [cm]}$

$\text{rpm} = 299,07 \times \sqrt{(\text{fuerza g} / \text{radio [cm]})}$

## Valores esperados

En el laboratorio de un hospital de gran capacidad, se realizó un estudio del intervalo de referencia en el cual se analizaron muestras de 72 voluntarios del laboratorio mediante el procedimiento Doble Anticuerpo hGH. Los resultados del estudio sugieren un intervalo de referencia para adultos de:

no detectable a 7 ng/ml

Los laboratorios deben considerar estos resultados *sólo como una guía*. Cada laboratorio deberá establecer sus propios intervalos de referencia.

## Características analíticas

Para obtener datos *representativos* del rendimiento del kit Doble Anticuerpo hGH, ver la sección Tablas y Gráficos. Los resultados se expresan en ng/ml.

### Factor de Conversión:

$\text{ng/ml} \times 2 \rightarrow \text{mIU/l [WHO IRP 66/217]}$

$\text{ng/ml} \times 2,6 \rightarrow \text{mIU/l [WHO 1}^{\text{st}} \text{IRP 80/505]}$

### Intervalo de calibración:

Aproximadamente 1–30 ng/ml.

Los valores de los calibradores son *lote específicos*.

**Sensibilidad analítica:** 0,9 ng/ml

**Precisión intraensayo (dentro de una tanda):** Las estadísticas se calcularon para las muestras a partir de los resultados de 20 pares de tubos en una sola tanda de análisis. (Ver la tabla "Intraassay Precision".)

**Precisión entre ensayos (de una tanda a otra):** Las estadísticas se calcularon para las muestras a partir de los resultados de pares de tubos en 20 análisis distintos. (Ver la tabla "Interassay Precision".)

**Efecto deriva:** Ninguno hasta aproximadamente 150 tubos. (Ver la tabla "End-of-Run Effect").

**Especificidad:** El anticuerpo es altamente específico para hormona de crecimiento humanos. (Ver la tabla "Specificity".)

**Linealidad:** Las muestras fueron analizadas con varias diluciones. (Véase la tabla "Linearity" para resultados representativos.)

**Recuperación:** Se han analizado las muestras cargadas 1 a 19 con cuatro soluciones (50, 100, 200 y 400 ng/ml) de hGH. (Ver la tabla "Recovery" para resultados representativos).

**Bilirrubina:** La presencia de bilirrubina, en concentraciones de hasta 100 mg/l, no tiene ningún efecto sobre los resultados en términos de precisión.

**Hemólisis:** Los resultados obtenidos con muestras hemolizadas se deberán interpretar con precaución, ya que existe una tendencia, si bien no es uniforme, hacia valores menores en función de una concentración creciente de hemoglobina. (Ver la tabla "Hemolysis").

**Ácido graso libre:** La presencia de ácido oleico en concentraciones de hasta 10 mmol/l no tiene ningún efecto significativo *in vitro* sobre los resultados.

**Tipo de Muestra Alternativa:** Para determinar si los anticoagulantes interfieren con el análisis, se recogió sangre de 20 voluntarios sanos en tubos vacutainer sin anticoagulante, heparinizados y con EDTA. Luego se analizaron todas las muestras mediante el

procedimiento Doble Anticuerpo hGH. Por regresión lineal:

(Heparina) = 1,02 (Suero) + 0,04 ng/ml  
 $r = 0,998$

(EDTA) = 0,97 (Suero) + 0,09 ng/ml  
 $r = 0,995$

Medias:

3,8 ng/ml (Heparina)

3,7 ng/ml (Suero)

3,7 ng/ml (EDTA)

**Comparación de los métodos:** El análisis se comparó con un radioinmunoensayo comercialmente disponible (Kit A) en 145 muestras de suero de pacientes. (Intervalo de concentración: de no detectable a 7,4 ng/ml aproximadamente, mediante el procedimiento Doble Anticuerpo). Por regresión lineal:

(Kit A) = 1,13 (DAb) + 0,13 ng/ml  
 $r = 0,985$

Medias:

1,72 ng/ml (Double Antibody)

2,07 ng/ml (Kit A)

Los resultados levemente menores que se obtuvieron con el kit Doble Anticuerpo probablemente se deban a que este kit utiliza calibradores en una matriz de suero humano para producir la máxima compatibilidad con las muestras típicas de pacientes, mientras que el Kit A utiliza una matriz de solución amortiguadora bovina.

## Asistencia técnica

Póngase en contacto con el distribuidor nacional.

El Sistema de Calidad de Diagnostic Products Corporation está registrado para la ISO 13485:2003.

---

## Français

---

### Double Antibody hGH

**Domaine d'utilisation:** "Double Antibody Human Growth Hormone (hGH)" est un dosage radioimmunologique à l'iode 125 destiné à la mesure quantitative de l'hormone de croissance (hGH) dans le sérum ou plasma. Ce test est réservé à un usage diagnostique *in vitro*.

Référence catalogue : **KGHD1** (70 tubes), **KGHD2** (140 tubes).



Le coffret de 70 tubes contient moins de 3 microcuries (111 kilobecquerels) d'hormone de croissance marquée à l'iode 125. Le coffret de 140 tubes contient moins de 6 microcuries (222 kilobecquerels).

## Introduction

L'hormone de croissance humaine (hGH) est un polypeptide produit par l'antéhypophyse. Elle compte 191 acides aminés pour une masse moléculaire de 22 000 daltons environ. Ses effets métaboliques sont essentiellement anabolisants. Elle favorise la conservation des protéines et stimule un vaste ensemble de mécanismes de la biosynthèse des protéines. Elle stimule également le transport du glucose et facilite l'accumulation de réserves de glycogène. Une autre famille d'hormones peptidiques, les somatomédines, médie la cascade des actions stimulant la croissance.

Le dosage de l'hGH présente surtout un intérêt pour le diagnostic et le traitement de différentes formes de sécrétion pathologiques de l'hormone de croissance. Les manifestations cliniques d'hyposécrétion comprennent le nanisme et un développement incomplet. L'hypersécrétion est associée au gigantisme et à l'acromégalie.

L'interprétation clinique des taux d'hormone de croissance est délicate. En effet, ils présentent une variation diurne qui rend difficile la définition d'un intervalle de référence ou l'appréciation du statut d'un individu à partir de dosages uniques. De nombreux facteurs sont connus pour influencer le rythme de sécrétion de l'hormone de croissance, parmi lesquels les périodes de sommeil et d'éveil, l'activité physique, le stress, l'hypoglycémie, les œstrogènes, les corticostéroïdes, la L-dopa et d'autres encore. En raison de sa similitude avec la prolactine et l'hormone lactogène placentaire, les premiers immunodosages de l'hGH étaient souvent entachés de valeurs faussement élevées pour les femmes enceintes ou les femmes qui allaitaient.

Etant donné que les individus acromégales n'ont pas tous des taux de base élevés, une épreuve de freinage

basée sur une charge de glucose est utile dans ce contexte. En dépit de cette hyperglycémie provoquée, on note rarement une diminution à partir des niveaux de base dans l'acromégalie.

Les individus qui présentent une insuffisance en hormone de croissance ont des taux à jeun/ au repos similaires à ceux d'individus normaux. Des épreuves de confrontation variées ont été mises au point pour différencier ces groupes. Ainsi, avec la venue du sommeil profond ou après 15 à 20 minutes d'exercice physique vigoureux, les taux d'hormone de croissance enregistrent normalement une élévation. D'autres tests de la réactivité à l'hormone de croissance sont basés sur l'administration de L-dopa, d'arginine ou d'insuline. Le propanolol ou l'oestrogène sont parfois administrés en association avec le stimulus principal pour accentuer la réponse.

On a recensé un petit nombre de cas de nanisme pour lesquels les niveaux de base, comme la réponse aux épreuves de confrontation, étaient normaux. De tels cas peuvent venir d'une insensibilité tissulaire à l'hormone de croissance ou aux somatomédines, ou à la présence d'anticorps ou d'hormone de croissance immunoréactive mais biologiquement inactive.

### Principe du test

Le dosage Double Anticorps hGH est une technique radioimmunologique par compétition, dans laquelle l'hormone de croissance marquée à l'iode 125 rentre en compétition avec l'hGH de l'échantillon du patient vis-à-vis des sites d'anticorps. Après une incubation d'une durée fixée, la séparation entre la partie libre et liée est réalisée par un deuxième anticorps entraîné par le PEG. Enfin, la fraction d'anticorps liée est précipitée et comptée. La concentration de l'échantillon lue sur la courbe d'étalonnage est inversement proportionnelle au nombre de coups obtenu sur le compteur gamma.

**Réactifs à distribuer:** 3

**Temps d'incubation totale :** 2 heures

**Séparation:** la solution précipitante prête à l'emploi combine un second anticorps et du PEG dilué.

**Activité totale en début de marquage :**  
environ 60 000 cpm

### Précautions d'emploi

Réservé à un usage diagnostique *in vitro*.

**Réactifs :** Conserver à +2/+8°C dans un réfrigérateur autorisé à recevoir du matériel radioactif. Éliminer les déchets conformément aux lois en vigueur.

Ne pas utiliser les réactifs au delà de leur date d'expiration.

Certains composants fournis avec ce coffret peuvent contenir des agents humains et/ou d'autres éléments potentiellement infectieux qui nécessitent certaines précautions.

Respecter les précautions d'emploi et manipuler tous les composants du coffret comme des produits potentiellement infectieux. Les réactifs dérivés de produits humains et utilisés dans ce coffret ont subi un test sérologique pour la Syphilis et des tests de dépistage pour les anticorps anti-VIH1 et 2, anti-VHC et pour l'antigène de surface de l'hépatite B, qui se sont tous avérés négatifs.

De l'azide de sodium à des concentrations inférieures à 0,1 g/dl a été ajouté comme conservateur ; lors de l'élimination, l'évacuer avec de grandes quantités d'eau pour éviter une accumulation d'azides métalliques explosifs dans les canalisations.

**Eau :** utiliser de l'eau distillée ou désionisée.

### Radioactivité

Ce coffret de réactif est réservé à l'usage *in vitro* (Autorisation DGSNR).

**Règles de base de protection contre les rayonnements ionisants et précautions d'emploi.**

**Ce produit radioactif** ne peut être reçu, acheté, détenu ou utilisé que par des personnes autorisées à cette fin et dans des laboratoires dotés de cette autorisation. Cette solution ne peut en aucun cas être administrée à l'homme ou aux animaux. Respecter impérativement les dates de péremption indiquées sur l'emballage extérieur et sur les étiquettes des différents réactifs du coffret. Tous les réactifs, dont les tubes revêtus d'anticorps, doivent être conservés à

+ 4/+ 8° C dans leur conditionnement d'origine avant d'être utilisés. L'achat, la possession, l'utilisation et l'échange de matières radioactives sont soumis aux réglementations en vigueur dans le pays de l'utilisateur. Les règles de base de protection contre les rayonnements ionisants doivent être respectées selon des procédures en vigueur. Ne pas pipeter des solutions radioactives avec la bouche. Eviter le contact direct avec la peau ou les muqueuses de tout produit radioactif en utilisant des blouses et gants de protection. Toute manipulation de matières radioactives se fera dans un local ad hoc éloigné de tout passage. Les produits radioactifs seront stockés dans leur conditionnement d'origine dans un local approprié. Un cahier de réception et de stockage de produits radioactifs sera tenu à jour. Le matériel de laboratoire et la verrerie qui ont été contaminés doivent être éliminés au fur et à mesure afin d'éviter une contamination croisée de plusieurs isotopes. Chaque contamination ou perte de substance radioactive devra être réglée selon les procédures établies. Toute mise aux déchets de matière radioactive se fera en accord avec les réglementations en vigueur. Ne pas manger, ni boire, ni fumer, ni appliquer des cosmétiques dans les laboratoires où des produits radioactifs sont utilisés. Les réactifs radioactifs ne peuvent être vendus qu'à des personnes habilitées à manipuler des substances radioactives.

### **Matériel Fourni : Préparation Initiale**

Préparer tous les réactifs au moins 10 minutes avant emploi

#### **Anticorps anti-hGH (GHD1)**

Antisérum anti hGH lyophilisé avec conservateur. Reconstituer avec 7.7 ml d'eau distillée ou désionisée. Agiter doucement par inversion du flacon. Conserver réfrigéré: stable à +2°/+8°C pendant 30 jours après reconstitution. Code couleur : bleue.

**KGHD1:** 1 flacon. **KGHD2:** 2 flacons.

#### **Traceur hGH marquée à l'iode 125 (GHD2)**

hGH marquée à l'iode 125 sous forme lyophilisée avec conservateur. Reconstituer chaque flacon avec **7,7 ml**

d'eau distillée ou désionisée, mélanger par inversion Stable à +2°/+8°C pendant 30 jours après reconstitution ou jusqu'à la date de péremption indiquée sur le flacon. Couleur: jaune.

**KGHD1:** 1 flacon. **KGHD2:** 2 flacons.

#### **Standards hGH (GHD3-9)**

Sept flacons de standards A à G, lyophilisés avec conservateur. Au moins 30 minutes avant emploi, reconstituer le standard zéro **A avec 5 ml**, et les autres standards **B à G avec 2 ml** chacun, d'eau distillée. Utiliser des pipettes volumétriques et mélanger par inversion. Stable à +2°/+8°C pendant 30 jours après reconstitution. Pour une conservation plus longue, aliquoter et congeler, stables 6 mois à -20°C. Eviter des congélations et décongélations successives.

**KGHD1:** 1 jeu. **KGHD2:** 1 jeu.

Les standards ont des concentrations spécifiques à chaque lot, et contiennent environ 0, 1, 2, 5, 10, 20 et 30 nanogrammes par millilitre (ng/ml) d'hGH dans une matrice sérique humaine; ce dosage est standardisé par rapport au standard international WHO IRP numéro 66/217 et 80/505 et du NIH réf. NIAMDD-hGH-RP-1. Se reporter à l'étiquetage des flacons pour les concentrations exactes. Des points intermédiaires peuvent être obtenus en mélangeant des standards dans des proportions compatibles.

#### **Solution Précipitante (ACGG)**

Solution précipitante constituée de gammaglobulines de chèvre anti lapin et diluée dans une solution saline de polyéthylène glycol (PEG). La solution précipitante est fournie sous forme liquide, prête à l'emploi. Stable à +2°/+8°C pendant 30 jours après ouverture. Bien mélanger sans former de mousse avant emploi pour dissoudre un éventuel précipité pouvant se former durant la réfrigération. Couleur: bleue.

**KGHD1:** 1 flacon. **KGHD2:** 2 flacons.

### **Matériel requis mais non fourni**

Compteur gamma compatible avec des tubes 12x75 mm.

Centrifugeuse – de préférence réfrigérée et d'une capacité d'au moins 3000xg

Agitateur de type Vortex



### Préparation du réactif

Eau distillée ou désionisée

Pipettes volumétriques: pour distribuer 2, 5 et 7,7 ml

### Radioimmunodosage

Tubes secs en polypropylène 12x75 mm – disponibles chez DPC

Micropipettes – 100 µl et 1,0 ml

Un portoir de décantation – disponible chez DPC

Papier graphe Logit-log– disponibles chez DPC (Référence catalogue : ZP797)

Un contrôle, à base de sérum humain, à trois niveaux, contenant différentes concentrations d'hGH, est disponible chez DPC (Référence catalogue : CON6)

### Recueil des échantillons

Le patient doit être à jeun et au repos depuis au moins 30 minutes avant prélèvement.<sup>6,7</sup>

Prélever le sang par ponction veineuse<sup>12</sup> sur tube sec, hépariné ou avec E.D.T.A. en notant l'heure de prélèvement, et séparer le sérum ou plasma des cellules.

Il est recommandé de clarifier les échantillons hyperlipémiques par ultracentrifugation.

Des échantillons lipémiques, hémolysés ou fortement contaminés pourront donner des résultats erronés.

Des tubes pour prélèvements sanguins provenant de fabricants différents peuvent donner des résultats différents, selon les matériaux et additifs utilisés, y compris gels ou barrières physiques, activateurs de la coagulation et/ou anticoagulants. Le coffret hGH Double Antibody n'a pas été testé sur tous les types de tubes possibles. Veuillez consulter le chapitre intitulé Autres Types d'Échantillons pour plus de renseignements sur les tubes qui ont été évalués.

**Volume nécessaire :** 100 µl de sérum ou de plasma par tube.

**Conservation:** refroidir immédiatement, stable 8 heures à +2/+8°C<sup>6,7</sup> ou 2 mois à -20°C.

Avant le dosage, laisser les échantillons revenir à température ambiante (15–28°C), mélanger doucement par rotations ou retournement. Aliquoter, si nécessaire,

afin d'éviter de répéter les cycles congélation / décongélation. *Ne pas* tenter de décongeler les spécimens congelés à l'aide d'un bain marie.

### Protocole de dosage

Tous les composants, excepté la solution précipitante, doivent être à température ambiante (15–28°C) avant leur utilisation.

- 1 Etiqueter 18 tubes en duplicate: T (activité totale), LNS (liaison non spécifique), A (liaison maximale B0) et de B à G. Etiqueter des tubes supplémentaires, également en duplicate, pour les échantillons de patients et les contrôles.

| Standards | Approx. ng/ml |
|-----------|---------------|
| A (B0)    | 0             |
| B         | 1             |
| C         | 2             |
| D         | 5             |
| E         | 10            |
| F         | 20            |
| G         | 30            |

**Note:** Les standards sont *lot-dépendants*. Se référer aux flacons pour les valeurs exactes en ng/ml.

- 2 Pipeter **100 µl** du standard zéro A dans les tubes LNS et A, et **100 µl** des autres standards B à G, sérums de contrôle et échantillons de patients dans les tubes respectifs.

Les échantillons de patients suspectés de contenir des concentrations d'hGH supérieures au standard le plus élevé (30 ng/ml) doivent être dilués avec le standard zéro avant le dosage.

Il est bon d'utiliser des embouts de micropipettes jetables, de changer d'embout entre les échantillons de manière à éviter toute contamination.

- 3 Ajouter **100 µl** d'anticorps anti hGH (bleu) dans chaque tube. (sauf tube LNS et T) Agiter au vortex.

Tous les tubes (sauf T et LNS) doivent être bleu-verts. Une multipipette est recommandée pour cette étape et pour l'addition de traceur et antisérum.

- 4 Incuber **1 heures** à température ambiante (15–28°C).

Cette incubation peut être prolongée à 90 minutes sous condition d'incuber la même durée lors de l'étape 6.

- 5** Ajouter **100 µl** du traceur  $^{125}\text{I}$  hGH (jaune) à chaque tube. Agiter au vortex.

Tous les tubes (sauf T et LNS) doivent être verts. Les tubes T peuvent être mis de côté jusqu'au comptage (étape 10); ils n'ont pas d'autre traitement.

- 6** Incuber **1 heures** à température ambiante (15–28°C).

Cette incubation doit avoir la même durée que lors de l'étape 4.

- 7** Ajouter **1,0 ml** de solution précipitante froide (Bleue) à tous les tubes. Agiter au vortex.

Avant utilisation, bien mélanger la solution à précipité (sans mousser) jusqu'à ce que tout le précipité visible ait disparu.

- 8** Centrifuger **15 minutes** à 3000xg.

- 9** Utiliser un portoir pour la décantation, laisser décanter (ou aspirer), séparer le surnageant en retenant le précipité pour le comptage.

Laisser les tubes retournés durant 10 minutes sur du papier absorbant. Tapoter doucement les tubes, essuyer les bords afin d'éliminer les gouttelettes résiduelles.

- 10** Compter chaque tube pendant **1 minute**.

## Calcul des Résultats

Afin d'obtenir des résultats en concentrations de hGH à partir d'une représentation logit-log de la courbe de calibration, calculer pour chaque doublet de tubes les coups corrigés: moyenne cpm-moyenne des cpm du LNS:

CPM corrigés = (Moyenne cpm) moins (Moyenne cpm **LNS**)

Puis déterminer pour chaque doublet la capacité de liaison en pourcentage de liaison maximale (B0), corrigée des cpm dus au LNS des tubes A tubes considérés à 100%:

% liaison =  $(\text{cpm corrigés} / \text{cpm corrigés LM}) \times 100$

En utilisant un papier logit-log, on porte en ordonnée les pourcentages de liaison en fonction des concentrations des standards qui ne sont pas à zéro, en abscisse. On trace une ligne droite passant approximativement par ces points. Les concentrations des échantillons inconnus sont déterminées par interpolation sur la courbe standard.

Il est bon de vérifier les doublets et de construire une représentation graphique de la courbe de calibration (même si celle-ci est faite par ordinateur) avec les différentes valeurs de façon à visualiser le meilleur tracé et c'est une façon de détecter les points deviants. Nous recommandons aussi de suivre les paramètres suivants :

T = Activité totale (cpm)

%LNS =  $100 \times (\text{Moyenne des cpm du LNS} / \text{cpm Totaux})$

%LM =  $100 \times (\text{cpm corrigés} / \text{cpm totaux})$

Et les intercepts à 20, 50 et 80 % avec

20% = Concentration à 20% de liaison, etc.

Note: d'autres approches sont possibles comme l'intégration de paramètres 4-p logistique. Se rapporter à Dudley RA, et al. Guidelines for immunoassay data reduction. Clin Chem 1985;31:1264-71.

**Exemple de série** : A titre d'exemple uniquement, et non pour calculer des résultats provenant d'une autre série. Comme les valeurs des calibrateurs sont *lot-dépendantes*, les concentrations indiquées peuvent être différentes de celles de vos livraisons. (Voir le tableau « Example Run ».)

## Contrôle de Qualité

Les contrôles (ou pools de sérums) avec au moins deux taux de concentration de hGH – haut et bas - doivent être dosés en routine comme des échantillons inconnus.

Les résultats de patient ne doivent être validés que si les résultats des contrôles correspondent aux critères d'acceptation établis par votre laboratoire.

Il est bon d'enregistrer pour chaque dosage les numéros de lots des composants utilisés ainsi que la date à laquelle ils ont été reconstitués ou ouverts. Nous recommandons également de noter jour après jour les résultats des contrôles

– comme décrit par exemple dans Westgard JO, et al. A multi-rule chart for quality control. Clin Chem 1981;27:493-501. Noter qu'un redosage d'échantillon peut être précieux pour suivre la précision inter essai, et que les doublets de tubes contrôle peuvent être espacés de façon à vérifier l'absence de dérive significative.

**Centrifugation:** La procédure nécessite une centrifugation à 3000xg pendant 15 minutes. Des accélérations plus basses sont satisfaisantes uniquement si le temps de centrifugation est augmenté de manière appropriée – par exemple, 30 minutes à 1500xg. Une ultra-centrifugeuse réfrigérée est souhaitable mais non essentielle. Utiliser les formules ci-dessous pour calculer l'accélération de votre centrifugeuse à une vitesse donnée ou la vitesse (en tours par minute) requise pour atteindre la force g désirée.

force g =  $28,38 \times (\text{tpm} / 1\,000)^2 \times \text{rayon [pouces]}$

tpm =  $187,7 \times \sqrt{(\text{force g} / \text{rayon [pouces]})}$

ou

force g =  $11,18 \times (\text{tpm} / 1\,000)^2 \times \text{rayon [cm]}$

tpm =  $299,07 \times \sqrt{(\text{force g} / \text{rayon [cm]})}$

## Valeurs de référence

Une étude du domaine de normalité dans un laboratoire hospitalier avec 72 adultes volontaires à jeun dosés avec le coffret Double Antibody hGH a donné l'intervalle de normalité de :

Non-déTECTable à 7 ng/ml.

Ces valeurs sont données à *titre indicatif uniquement*. Chaque laboratoire devra établir ses propres valeurs de référence.

## Performances du test

Voir les tableaux et graphiques pour les données représentatives obtenues avec le coffret Double Antibody hGH. Les résultats sont donnés en ng/ml.

### Facteur de conversion :

ng/ml  $\times 2 \rightarrow$  mUI/l [WHO IRP 66/217]

ng/ml  $\times 2,6 \rightarrow$  mUI/l

[WHO 1<sup>st</sup> IRP 80/505]

### Intervalle de linéarité :

Approximativement 1–30 ng/ml.

Les valeurs des standards sont *lot-spécifiques*.

**Sensibilité analytique :** 0,9 ng/ml

**Précision intra-dosage (au sein d'une même série) :** Les calculs ont été effectués à partir des résultats de 20 dosages en double pour chacun des 6 échantillons dans une seule série. (Voir le tableau « Intraassay Precision ».)

**Précision inter-dosage (entre plusieurs séries) :** Calculée sur 6 échantillons analysés en double dans 20 séries. (Voir le tableau « Interassay Precision ».)

**Effet de la position des tubes :** Aucun jusqu'à 150 tubes. (Voir le tableau « End-of-Run Effect ».)

**Spécificité :** L'anticorps utilisé est hautement spécifique de l'hormone de croissance humaine. (Voir le tableau « Specificity ».)

**Test de dilution :** Des échantillons ont été dosés à différentes concentrations. (Voir le tableau « Linearity » pour des données représentatives.)

**Test de récupération :** Des échantillons sont mélangés dans les proportions 1 à 19 avec quatre solutions de hGh (50, 100, 200 et 400 ng/ml) puis dosés. (Voir le tableau « Recovery » pour des données représentatives.)

**Bilirubine :** La présence de bilirubine ne présente aucun effet sur les résultats ni sur la précision du dosage si la concentration ne dépasse pas 100 mg/l.

**Hémolyse :** les résultats obtenus sur des échantillons hémolysés doivent être interprétés avec précaution car il existe une tendance (non systématique) à obtenir des valeurs abaissées lorsque le taux d'hémoglobine augmente. (Voir le tableau "Hemolysis".)

**Effet des acides gras libres:** la présence d'acide oléique jusqu'à 10 mmol/L n'a pas d'effet significatif *in vitro* sur les résultats.

**Autres types d'échantillons:** Afin de déterminer le rôle éventuel des anticoagulants sur la technique, le sang de 20 volontaires a été recueilli sur tubes secs, héparinés ou avec E.D.T.A. Tous ces tubes sont dosés avec le coffret Double Antibody hGH. Par régression linéaire :

(Héparine) =  $1,02 (\text{Sérum}) + 0,04 \text{ ng/ml}$   
 $r = 0,998$

(EDTA) =  $0,97 (\text{Sérum}) + 0,09 \text{ ng/ml}$   
 $r = 0,995$

Moyennes :  
3,8 ng/ml (Héparine)  
3,7 ng/ml (Sérum)  
3,7 ng/ml (EDTA)

**Comparaison de méthodes:** Ce dosage a été comparé à un autre coffret commercial hGH (Kit A) sur 145 patients avec un intervalle de concentration en hGH de non détectable à 7,4 ng/ml. Par régression linéaire :

(Kit A) = 1,13 (DAb) + 0,13 ng/ml  
r = 0,985

Moyennes :  
1,72 ng/ml (Double Antibody)  
2,07 ng/ml (Kit A)

Les résultats légèrement inférieurs du coffret Double Antibody hGH sont probablement dus à l'emploi d'une matrice sérique humaine pour les standards, pour une compatibilité maximale avec les échantillons, tandis que le kit A utilise une matrice tamponnée bovine.

### Assistance technique

Contactez votre distributeur national. En France distribué par DPC France 90 bd National 92257 La Garenne-Colombes.

Le système d'assurance qualité de DPC est certifié ISO 13485 (2003).

---

## Italiano

---

### Doppio Anticorpo hGH

**Uso:** Il dosaggio Doppio Anticorpo Ormone della Crescita Umana (hGH) è un radioimmunosaggio marcato con  $^{125}$ I per la determinazione quantitativa dell'ormone della crescita umana nel siero o nel plasma. A solo uso diagnostico *in vitro*.

Codice: **KGHD1** (70 provette), **KGHD2** (140 provette).



Il kit da 70 determinazioni contiene meno di 3 microcurie (111 kilobecquerel) di ormone della crescita marcato con  $^{125}$ I ed il kit da 140 determinazioni contiene meno di 6 microcurie (222 kilobecquerel).

### Riassunto e Spiegazione del Test

L'ormone della crescita umana (hGH, somatotropina) è un polipeptide che ha

origine nell'ipofisi anteriore. E' costituito da una catena di 191 aminoacidi ed una massa molecolare di circa 22 000 dalton. Gli effetti metabolici sono principalmente anabolici. Favorisce la conservazione delle proteine ed utilizza un vasto range di meccanismi per la sintesi delle proteine. Migliora anche il trasporto del glucosio e facilita l'accumulo del glicogeno. Un'altra famiglia di ormoni peptidici, le somatomedine, media le azioni che favoriscono la crescita.

La misurazione dell'hGH è interessante principalmente nella diagnosi e nella terapia delle varie forme di secrezione anomala dell'ormone della crescita. I disturbi clinici legati all'iposecrezione includono il nanismo ed il potenziale di accrescimento non raggiunto. L'ipersecrezione viene associata al gigantismo ed all'acromegalia.

Si consiglia di essere prudenti nell'interpretazione dei livelli dell'ormone della crescita. I livelli variano durante il giorno, rendendo difficile la definizione di un range di riferimento o lo stato del paziente sulla base di singole determinazioni. E' stato riscontrato che molti fattori influenzano il tasso di secrezione dell'ormone della crescita, inclusi periodi di sonno e veglia, esercizio fisico, stress, iperglicemia, estrogeni, corticosteroidi, L-dopa, ed altri. A causa della sua somiglianza con la prolattina ed il lattogeno placentare, i primi immunodosaggi sull'ormone della crescita hanno prodotto valori erroneamente elevati in gravidanza ed in donne in allattamento.

Poiché non tutti gli individui acromegalici hanno livelli di base elevati, i test di soppressione basati sul carico di glucosio sono importanti in questo contesto. Nonostante l'iperglicemia indotta, è raro nell'acromegalia che si riscontri una diminuzione dai livelli di base.

Individui con deficienze nell'ormone della crescita hanno livelli a digiuno/riposo simili ai livelli riscontrati in individui sani. Per questo motivo, sono stati sviluppati vari test per differenziare questi gruppi. Con l'inizio del sonno profondo o dopo 15–20 minuti di esercizio fisico vigoroso, i livelli dell'ormone della crescita presentano un aumento. Altri test per valutare la risposta dell'ormone della crescita sono basati

sulla somministrazione di L-dopa, di arginina e di insulina. Propanololo o estrogeni vengono somministrati in combinazione allo stimolo principale per accentuare la risposta.

Sono stati documentati alcuni casi di nanismo in cui sia il livello di base che la risposta al test sono stati normali. Questi casi possono includere insensibilità all'ormone della crescita o alle somatomedine, o la presenza di anticorpi o dell'ormone della crescita immunoreattivo ma biologicamente inattivo.

### Principio del Dosaggio

Nel dosaggio Doppio Anticorpo hGH l'ormone della crescita marcato con  $I^{125}$  compete con l'ormone della crescita presente nel campione del paziente per i siti sull'anticorpo specifico per l'ormone della crescita. Dopo incubazione per un tempo fisso, si ottiene la separazione del legato dal libero attraverso il metodo del doppio anticorpo accelerato con PEG. La provetta viene quindi contata in un gamma counter, le conte sono inversamente proporzionali al quantitativo di ormone della crescita presente nel campione.

**Reagenti da Dispensare:** 3

**Tempo Totale di Incubazione:** 2 ore

**Separazione:** La Soluzione Precipitante pronta all'uso combina il secondo anticorpo ed il PEG diluito.

**Conte Totali alla iodinazione:**  
Circa 60 000 cpm

### Avvertenze e Precauzioni

Ad uso diagnostico *in vitro*.

**Reagenti:** Conservare a 2–8°C in un frigorifero appositamente destinato al materiale radioattivo. Eliminare secondo le normative di legge vigenti.

Non utilizzare reagenti oltre la data di scadenza.

Alcuni componenti forniti in questo kit possono contenere materiale di origine umana e/o altri ingredienti potenzialmente pericolosi che necessitano di precauzioni di utilizzo.

Seguire le precauzioni universali, e manipolare tutti i componenti come se potessero trasmettere agenti infettivi.

Sono stati dosati i materiali di origine umana e sono stati trovati non reattivi per la Sifilide; per gli Anticorpi Anti-HIV 1 e 2; per l'Antigene di Superficie dell'Epatite B; e per gli Anticorpi Anti-Epatite C.

E' stata aggiunta Sodio Azide a concentrazioni inferiori a 0.1 g/dL come conservante. Al momento dell'eliminazione, irrorare con molta acqua per evitare la formazione di azidi metalliche potenzialmente esplosive nelle tubature di piombo e di rame.

**Acqua:** Utilizzare solo acqua distillata o deionizzata.

### Radioattività

Una copia di tutti i certificati di Autorizzazione per radioisotopi (Specifico o Generico) rilasciata ad un cliente americano deve essere conservata in file presso la Diagnostic Products Corporation prima che i kit o i componenti contenenti materiale radioattivo possano essere spediti. Questi materiali radioattivi possono essere acquisiti da qualsivoglia cliente in possesso dell'Autorizzazione Specifica. Con l'Autorizzazione Generica questi materiali radioattivi possono essere acquistati solo da medici, veterinari che esercitino la professione, laboratori clinici ed ospedalieri – e solo per l'esecuzione di test clinici o di laboratorio in vitro che non implicino somministrazione interna o esterna del materiale radioattivo o delle sue radiazioni alle persone o animali. La sua acquisizione, ricevimento, conservazione, utilizzo, trasferimento ed eliminazione sono soggette a regolamentazioni e ad Autorizzazione (Generica o Specifica) della Commissione Statunitense per il Nucleare o dello Stato con il quale l'NRC abbia stipulato un accordo per l'esercizio del controllo regolatorio.

Manipolare i materiali radioattivi secondo quanto previsto dall'Autorizzazione Generica o Specifica. Per minimizzare l'esposizione alle radiazioni, l'utilizzatore deve attenersi alle linee guida stabilite dal National Bureau of Standards publication su "*Safe Handling of Radioactive Materials*" "*Norme per una corretta manipolazione dei Materiali Radioattivi*". (Guida N° 92, pubblicata il 9 Marzo 1964) e successive edizioni pubblicate dallo Stato e dalle Autorità Federali.

Assorbire immediatamente le fuoriuscite e decontaminare le superfici contaminate. Evitare la formazione di aerosol. Eliminare i rifiuti solidi radioattivi secondo quanto previsto dall'Autorizzazione. Le licenze generiche (possessori di NRC Form 483) possono eliminare i rifiuti radioattivi solidi come non radioattivi, dopo aver rimosso l'etichetta. I detentori di autorizzazioni specifiche (NRC Form 313) devono fare riferimento al Titolo 10, Codice delle Regolamentazioni Federali Parte 20. I detentori di Autorizzazioni negli Stati che hanno stipulato un accordo con l'NRC dovrebbero far riferimento alle regolamentazioni idonee dei loro stati. I detentori di Autorizzazioni Generali possono eliminare i rifiuti radioattivi liquidi del tipo contenuto in questo prodotto attraverso il lavello del laboratorio. I detentori di autorizzazione devono eliminare o rendere illeggibili le etichette dei contenitori vuoti di materiali radioattivi prima di eliminare i rifiuti solidi. I detentori di autorizzazioni specifiche possono eliminare piccoli quantitativi di rifiuti radioattivi liquidi del tipo utilizzato in questo prodotto attraverso il lavello del laboratorio. Fare riferimento alle regolamentazioni appropriate applicabili al Vostro laboratorio.

### **Materiali Forniti: Preparazione Iniziale**

Preparare tutti i componenti almeno 10 minuti prima dell'utilizzo.

#### **Antisiero hGH (GHD1)**

Antisiero ormone della crescita liofilo con conservanti. Ricostituire ciascun flacone aggiungendo **7,7 mL** di acqua distillata o deionizzata. Mescolare capovolgendo. Stabile a 2–8°C per 30 giorni dopo la ricostituzione. Colore: Blu.

**KGHD1:** 1 flacone. **KGHD2:** 2 flaconi

#### **hGH marcato con $I^{125}$ (GHD2)**

Ormone della crescita iodinato e liofilo, con conservanti. Ricostituire ciascun flacone aggiungendo **7,7 mL** di acqua distillata o deionizzata. Mescolare capovolgendo. Stabile a 2–8°C per 30 giorni dopo la ricostituzione, o fino alla data di scadenza indicata sulla provetta. Colore: Giallo.

**KGHD1:** 1 flacone. **KGHD2:** 2 flaconi

#### **Calibratori hGH (GHD3–9)**

Sette flaconi, etichettati dalla A alla G di calibratori liofilati. Almeno 30 minuti prima dell'utilizzo, ricostituire il calibratore zero **A con 5,0 mL** con acqua distillata o deionizzata, e ciascuno dei rimanenti calibratori dalla **B alla G con 2,0 mL** di acqua distillata o deionizzata. Utilizzare pipette volumetriche e mescolare capovolgendo *dolcemente*. Stabile a 2–8°C per 30 giorni dopo la ricostituzione. Per una conservazione prolungata, aliquotare e congelare: stabile a –20°C per 6 mesi.

**KGHD1:** 1 set. **KGHD2:** 1 set.

I calibratori hanno valori *lot-specifici* di circa 0, 1, 2, 5, 10, 20 e 30 ng/mL in *una matrice di siero umano*. Il dosaggio è standardizzato in termini di WHO Preparazioni Internazionali di Riferimento per l'Ormone della Crescita Umano negli immunodosaggi, numeri 66/217 e 80/505 e la preparazione di riferimento dell'Istituto Nazionale di Sanità per l'hGH NIAMDD-hGH-RP-1. Fare riferimento alle etichette dei flaconi per le concentrazioni esatte in ng/mL. I punti intermedi della calibrazione possono essere ottenuti mescolando i calibratori in proporzioni idonee.

#### **Soluzione Precipitante (ACGG)**

Gamma globulina di capra anti-coniglio (GARGG) e polietilene glicole diluito (PEG) in soluzione salina. La Soluzione Precipitante viene fornita in forma liquida, pronta all'uso. Stabile a 2–8°C per 30 giorni dopo l'apertura. La Soluzione Precipitante dovrebbe essere completamente mescolata prima dell'utilizzo, poiché potrebbe formarsi un sottile precipitato dopo la conservazione a 2–8°C. Colore: Blu.

**KGHD1:** 1 flacone. **KGHD2:** 2 flaconi.

### **Materiali Richiesti Ma Non Forniti**

Gamma counter.

Centrifuga – preferibilmente refrigerata in grado di effettuare almeno 3000xg.

Vortex mixer.

#### **Preparazione dei Reagenti**

Acqua distillata o deionizzata.

Pipette volumetriche: 2,0, 5,0 e 7,7 mL.

### Radioimmunosaggio

Provette di polipropilene da 12x75 mm – disponibili presso DPC.

Micropipette: 100 µL e 1,0 mL.

Foam per la decantazione – disponibile presso DPC.

Carta per grafici logit-log – disponibile presso DPC (Codice: ZP797).

E' disponibile presso DPC un controllo a tre livelli basato su siero umano, contenente hGH tra gli oltre 25 costituenti dosati. (Codice: CON6).

### Prelievo dei Campioni

Il paziente dovrebbe essere a digiuno e a completo riposo 30 minuti prima del prelievo.<sup>6,7</sup>

Prelevare il sangue<sup>5</sup> in provette semplici, eparinizzate o EDTA, evitando l'emolisi e separare il siero o il plasma dalle cellule. Occorre annotare l'ora del prelievo.

Si consiglia l'utilizzo di un'ultracentrifuga per schiarire i campioni lipemici.

I campioni lipemici, emolizzati o grossamente contaminati possono rendere risultati erranei.

Provette per il prelievo di sangue di produttori diversi possono dare valori differenti, a seconda dei materiali e degli additivi usati, incluso gel o barriere fisiche, attivatori di coaguli e/o anticoagulanti. L'Double Antibody hGH non è stato verificato con tutte le possibili variazioni di tipi di provette. Consultare la sezione riguardante Campioni Alternativi per dettagli sulle provette testate.

**Volume Richiesto:** 100 µL di siero o plasma per provetta.

**Conservazione:** Refrigerare immediatamente. Stabile a 2–8°C per 8 ore,<sup>6,7</sup> o per 2 mesi (aliquotato) a –20°C. (Evitare cicli ripetuti di congelamento e scongelamento.)

Prima del dosaggio consentire ai campioni di raggiungere temperatura ambiente e mescolare scuotendo leggermente o capovolgendo la provetta. *Non* tentare di scongelare i campioni congelati riscaldandoli in un bagnetto termostato.

### Dosaggio Radioimmunologico

Tutti i componenti eccetto la Soluzione Precipitante devono essere a temperatura ambiente (15–28°C) prima dell'uso.

- 1 Etichettare diciotto provette in duplicato: T (conte totali), NSB (legame non specifico), A (legame massimo) e dalla B alla G. Etichettare altre provette anch'esse in duplicato per i campioni dei pazienti ed i controlli.

| Calibratori | Circa ng/mL |
|-------------|-------------|
| A (MB)      | 0           |
| B           | 1           |
| C           | 2           |
| D           | 5           |
| E           | 10          |
| F           | 20          |
| G           | 30          |

**Nota:** Questi calibratori sono *lotto-specifici*. Fare riferimento alle etichette dei flaconi per i valori in ng/mL.

- 2 Dispensare **100 µL** del calibratore zero A nelle provette NSB ed A, e **100 µL** di ciascuno dei calibratori rimanenti dalla B alla G nelle provette etichettate in maniera corrispondente. Dispensare **100 µL** di ciascun campione (siero o plasma) e **100 µL** di ciascun controllo nelle provette preparate.

I campioni con concentrazioni attese di hGH superiori al calibratore più elevato (30 ng/mL) dovrebbero essere diluiti con il calibratore zero prima del dosaggio.

Si consiglia di utilizzare un puntale monouso, cambiando il puntale tra un campione e l'altro, per evitare la contaminazione da carryover.

- 3 Aggiungere **100 µL** dell'Antisiero hGH (Blu) a tutte le provette eccetto le provette NSB e T. Vortexare.

Tutte le provette ad eccezione delle provette NSB e T dovrebbero essere blu-verdi. Si consiglia l'utilizzo di un dispensatore a ripetizione per l'aggiunta di 100 µL di antisiero e tracciante.

- 4 Incubare per **1 ora** a temperatura ambiente (15–28°C).

L'incubazione può essere estesa fino a 90 minuti a temperatura ambiente a patto che la seconda incubazione (punto 6) venga modificata in maniera simile.

- 5 Aggiungere **100 µL** di hGH marcato con <sup>125</sup>I (Giallo) a tutte le provette. Vortexare.  
Tutte le provette eccetto le provette NSB e T dovrebbero essere verdi. Mettere da parte le provette T per la conta al punto 10; non sono necessari ulteriori passaggi.
- 6 Incubare per **1 ora** a temperatura ambiente (15–28°C).  
Questo punto dell'incubazione deve essere eseguito in maniera analoga rispetto al punto 4 sopra descritto.
- 7 Aggiungere **1,0 mL** di Soluzione Precipitante *fredda* (Blu) a tutte le provette. Vortexare.  
Tutte le provette devono essere blu, eccetto le provette T che devono essere gialle. Prima della dispensazione, la Soluzione Precipitante deve essere mescolata completamente (senza formazione di schiuma) fino a che il precipitato visibile non sia scomparso.
- 8 Centrifugare per **15 minuti** a 3000xg.
- 9 Decantare (o aspirare) il supernatante, ritenendo il precipitato per le conte.  
Utilizzando un foam per la decantazione, scuotere le provette su carta assorbente e blottare i bordi, per eliminare l'umidità residua.
- 10 Contare ciascuna provetta per **1 minuto**.

### Calcolo dei Risultati

Per calcolare le concentrazioni dell'ormone della crescita da una rappresentazione logit-log della curva di calibrazione, calcolare inizialmente per ciascuna coppia di provette le conte medie al minuto corrette con NSB:

Conte Nette = (Media dei CPM) Meno (Media CPM **NSB**)

Quindi determinare il legame di ogni coppia di provette come percentuale del legame massimo (MB), con le conte

corrette-NSB delle provette A prese al 100%:

Percentuale di Legato = (Conte Nette / Conte Nette **MB**) × 100

Utilizzando la carta logit-log, tracciare la Percentuale di Legato sull'asse verticale (probabilità) verso la Concentrazione sull'asse orizzontale (logaritmica) per ciascuno dei calibratori non zero e tracciare una linea retta approssimativamente lungo il tracciato di questi punti. I risultati per i campioni non noti possono essere letti dalla retta attraverso interpolazione.

Si consiglia di visionare i risultati per stabilire la correlazione entro i replicati e tracciare un grafico della curva di calibrazione (anche se i calcoli vengono effettuati dal computer) per visualizzare l'appropriatezza della trasformazione utilizzata e per individuare i punti devianti all'interno della calibrazione. Consigliamo anche di mantenere una rintracciabilità dei parametri utilizzati per la riduzione dei dati:

T = Conte Totali (conte al minuto)

%NSB = 100 × (Conte NSB Medie / Conte Totali)

%MB = 100 × (Conte Nette / Conte Totali)

E le "intercette" al 20, 50 ed 80%, dove

20% = Concentrazione al 20% di Legato ecc.

Nota: sono accettabili anche altri tipi di approccio, quali: l'implementazione della logistica a 4 parametri. Vedi Dudley Ra et al. Guidelines for immunoassay data Reduction. Clin Chem 1985;31:1264-71.

**Seduta Esemplificativa:** a solo scopo illustrativo e non per calcolare i risultati di un'altra seduta. I valori dei calibratori sono *lotto-specifici*, le concentrazioni elencate nella colonna più a destra possono non essere in linea con i valori dei calibratori forniti nel kit. (vedi tabella "Example Run").

### Controllo di Qualità

Controlli o pool di sieri con almeno due livelli di concentrazione di hGH — basso ed alto — devono essere dosati di routine come campioni non noti.

Riportare i risultati dei pazienti solo se i risultati dei controlli sono conformi ai criteri di accettabilità del Vostro laboratorio.



Si consiglia per ogni dosaggio di annotare i numeri di lotto dei componenti utilizzati, quali le date di ricostituzione o di apertura. Si consiglia anche di tracciare i grafici dei risultati dei controlli giorno dopo giorno – come descritto, ad esempio, in Westgard JO, et al. A multi-rule chart for quality control. Clin Chem 1981;27:493-501. Campioni ripetuti possono servire come ulteriore strumento per monitorare la precisione inter-dosaggio; coppie di campioni intervallate lungo tutto il dosaggio possono essere d'aiuto nel verificare l'assenza di deviazioni significative.

**Centrifuga:** La procedura richiede una centrifugazione a 3000xg per 15 minuti. Accelerazioni inferiori sono soddisfacenti se si aumenta in maniera adeguata il tempo di centrifugazione – ad esempio, 30 minuti a 1500xg. Si consiglia, anche se non è indispensabile una centrifuga refrigerata a velocità elevata. Utilizzare le formule di cui di seguito per calcolare l'accelerazione della vostra centrifuga ad una data velocità o la velocità (in rivoluzioni al minuto) richiesta per raggiungere la forza g desiderata.

$$\text{forza g} = 28,38 \times (\text{rpm} / 1\,000)^2 \times \text{raggio [pollici]}$$

$$\text{rpm} = 187,7 \times \sqrt{(\text{forza g} / \text{raggio [pollici]})}$$

o

$$\text{forza g} = 11,18 \times (\text{rpm} / 1\,000)^2 \times \text{raggio [cm]}$$

$$\text{rpm} = 299,07 \times \sqrt{(\text{forza g} / \text{raggio [cm]})}$$

## Valori Attesi

E' stato effettuato uno studio sul range di riferimento presso un grosso ospedale nel quale campioni di 72 adulti a digiuno sono stati dosati con il dosaggio Doppio Anticorpo hGH. I risultati dello studio suggeriscono un range di riferimento per gli adulti da:

Non rilevabile a 7 ng/mL.

I laboratori devono considerare questi risultati *soltanto come linee guida*. Ogni laboratorio dovrebbe stabilire i propri range di riferimento.

## Prestazioni del Dosaggio

Vedi Tabelle e Grafici per dati *rappresentativi* delle prestazioni del Dosaggio Doppio Anticorpo hGH. I risultati sono espressi in ng/mL.

### Fattore di Conversione:

$$\text{ng/mL} \times 2 \rightarrow \text{mIU/L [WHO IRP 66/217]}$$

$$\text{ng/mL} \times 2,6 \rightarrow \text{mIU/L}$$

$$[\text{WHO 1}^{\text{st}} \text{ IRP 80/505}]$$

### Range di Calibrazione:

Circa da 1–30 ng/mL.

I valori dei calibratori sono *lotto-specifici*.

**Sensibilità Analitica:** 0,9 ng/mL

**Precisione Intra-Dosaggio (All'interno della stessa seduta):** Sono state calcolate statistiche per ciascuno dei sei campioni dai risultati di 20 coppie di provette in un unico dosaggio. (Vedi tabella "Intraassay Precision".)

**Precisione Inter-Dosaggio (Da una seduta all'altra):** Sono state calcolate statistiche per ciascuno dei sei campioni dai risultati di coppie di provette in 20 dosaggi differenti. (Vedi tabella "Interassay Precision".)

**Effetto Fine-Seduta:** Nessuno fino a circa 150 provette. (vedi tabella "End-of-Run Effect").

**Specificità:** L'anticorpo è molto specifico per l'ormone umano della crescita. (Vedi tabella "Specificity".)

**Linearità:** I campioni sono stati dosati a varie diluizioni. (Vedi tabella "Linearity" per dati rappresentativi.)

**Recupero:** Sono stati dosati campioni cui sono state aggiunte quattro soluzioni 1:19 di hGH (50, 100, 200 e 400 ng/mL). (Vedi tabella "Recovery" per dati rappresentativi).

**Bilirubina:** La presenza di bilirubina in concentrazioni fino a 100 mg/L non ha nessun effetto sui risultati entro il range di precisione del dosaggio.

**Emolisi:** I risultati ottenuti da campioni emolizzati devono essere interpretati con attenzione, poiché vi è una tendenza – anche se non uniforme – verso valori più bassi in funzione dell'aumento delle concentrazioni di emoglobina. (vedi tabella "Emolisi").

**Acidi Grassi Liberi:** La presenza di acido oleico in concentrazioni fino a 10 mmol/L non ha nessun effetto clinico *in vitro* sui risultati.

**Tipo di Campione Alternativo:** Per determinare se gli anticoagulanti interferiscano nel dosaggio, è stato prelevato del sangue da 20 volontari in

buono stato di salute in provette semplici, eparinizzate e vacutained EDTA. Tutti i campioni sono stati dosati con il Dosaggio Doppio Anticorpo hGH. Mediante regressione lineare:

(Eparina) = 1,02 (Siero) + 0,04 ng/mL  
r = 0,998

(EDTA) = 0,97 (Siero) + 0,09 ng/mL  
r = 0,995

Valore Medio:  
3,8 ng/mL (Eparina)  
3,7 ng/mL (Siero)  
3,7 ng/mL (EDTA)

**Comparazione di Metodi:** Il dosaggio è stato comparato ad un radioimmunosaggio disponibile in commercio (Kit A) su 145 campioni di siero dei pazienti. (Range di concentrazione: da non rilevabile a circa 7,4 ng/mL con il Dosaggio Doppio Anticorpo.) Mediante regressione lineare:

(Kit A) = 1,13 (DAb) + 0,13 ng/mL  
r = 0,985

Valore Medio:  
1,72 ng/mL (Doppio Anticorpo)  
2,07 ng/mL (Kit A)

I risultati leggermente più bassi ottenuti con il kit Doppio Anticorpo sono probabilmente dovuti al fatto che lo stesso utilizza calibratori in una matrice di siero umano per una compatibilità massima con i campioni tipici dei pazienti, mentre il kit A usa una matrice/tampone bovino.

### Assistenza Tecnica

All'Estero: Contattare il Proprio Distributore Nazionale.

Il Sistema Qualità della Diagnostic Products Corporation è certificato secondo le norme ISO 13485:2003.

---

## Português

---

### Double Antibody hGH

**Utilização:** O Double Antibody Human Growth Hormone (hGH) é um radioimunoensaio <sup>125</sup>I concebido para a medição quantitativa da hormona de crescimento humano no soro ou no plasma. Destina-se unicamente a uso de diagnóstico *in vitro*.

Números de catálogo: **KGHD1** (70 tubos), **KGHD2** (140 tubos).



O kit de 70 tubos contém menos de 3 microcuries (111 quilobecquerels) de hormona de crescimento <sup>125</sup>I radioactiva, e o kit de 140 tubos contém menos de 6 microcuries (222 quilobecquerels).

### Sumário e explicação do teste

A hormona de crescimento humano (hGH, somatotrofina) é um polipeptídeo que tem origem na pituitária anterior. É composta por uma sequência de 191 aminoácidos e tem um peso molecular de aproximadamente 22 000 daltons. Os seus efeitos metabólicos são principalmente anabólicos. Promovem a conservação da proteína e participam numa vasta gama de mecanismos para síntese de proteína. Também aumenta o transporte de glucose e facilita a acumulação de glicogénio. Uma outra família de hormonas peptídicas, as somatomedinas, são responsáveis pela mediação da sequência de acções que promovem o crescimento.

A medição de hGH é principalmente de interesse no diagnóstico do tratamento de várias formas de secreção desajustada de hormonas do crescimento. As disfunções clínicas ligadas à hiposecreção incluem nanismo e crescimento potencial não atingido. A hipersecreção está associada ao gigantismo e à acromegalia.

A interpretação clínica de níveis de hormonas do crescimento deve ser feita de forma cuidadosa. Estes variam ao longo do dia, tornando difícil a definição de uma gama de referência ou a avaliação do estado de um indivíduo com base numa única determinação. São muitos os factores conhecidos como tendo influência na taxa de secreção da hormona do crescimento, incluindo períodos de sono e estado de alerta, exercício, stress, hipoglicémia, estrogénios, corticosteróides, L-dopa e outros. Devido à sua semelhança com a prolactina e lactogénio placentar, os primeiros imunoensaios da hormona do crescimento apresentavam em geral valores falsamente altos nas mulheres em fase de aleitação e nas grávidas.

Uma vez que nem todos os indivíduos acromegálicos apresentam níveis de

referência elevados, os testes de supressão baseados na carga de glucose são importantes neste contexto. Apesar da hiperglicémia induzida, raramente ocorre uma redução dos níveis basais na acromegalia.

Indivíduos com deficiência de hormona de crescimento possuem níveis em jejum/repouso semelhantes aos encontrados em indivíduos saudáveis. Foram concebidos diversos testes de provocação para diferenciar estes grupos. Assim, os níveis de hormona do crescimento apresentam normalmente um aumento com o início de sono profundo ou após 15 a 20 minutos de exercício intenso. Outros testes de resposta da hormona do crescimento são baseados na administração de L-dopa, arginina e insulina. O Propanolol ou o estrogénio são muitas vezes administrados juntamente com o estímulo primário, com o objectivo de acentuar a resposta.

Foi documentado um pequeno número de casos de nanismo em que o nível basal e a resposta ao teste de provocação foram normais. Estes casos podem envolver insensibilidade do tecido ou à hormona de crescimento ou às somatomedinas, ou a presença de anticorpos ou hormona do crescimento imunoreactiva, embora biologicamente inactiva.

### Princípio do Procedimento

No procedimento Double Antibody hGH, a hormona de crescimento marcada com <sup>125</sup>I concorre com a hormona de crescimento na amostra de paciente por locais de fixação de anticorpos específicos de hormona de crescimento. Após incubação durante um período pré-determinado, a separação entre as fracções ligada e livre é conseguida através do método de anticorpo duplo acelerado com PEG. O tubo é então colocado no contador gama e as contagens estão inversamente relacionadas com a quantidade de hormona do crescimento presente na amostra de paciente.

**Reagentes para Pipetar:** 3

**Tempo de Incubação:** 2 horas.

**Separação:** A Solução de Precipitação pronta a usar combina um segundo anticorpo e PEG diluído.

**Contagens Totais na Marcação com o Iodo:** aproximadamente 60 000 cpm

### Avisos e Precauções

Para uso de diagnóstico *in vitro*.

**Reagentes:** Conservar a 2–8°C num frigorífico destinado a materiais radioactivos. Eliminar de acordo com a legislação aplicável.

Não utilizar reagentes depois do respectivo prazo de validade.

Alguns componentes fornecidos com este kit podem conter matéria de origem humana e/ou outros ingredientes potencialmente perigosos que necessitem de algumas precauções.

Manipular todos os materiais que possam transmitir agentes infecciosos, tomando as devidas precauções. As matérias primas, obtidas a partir de soro humano, foram testadas, revelando resultados negativos para a sífilis, para os anticorpos do vírus da imunodeficiência humana (HIV) 1 e 2; para o antígeno de superfície da hepatite B e para os anticorpos da hepatite C.

Foi adicionada azida de sódio como conservante, em concentrações inferiores a 0,1 g/dL; a fim de evitar acumulações de azidas metálicas explosivas em canalizações de cobre e chumbo, os reagentes devem ser drenados através do esgoto apenas depois de diluídos com grandes volumes de água.

**Água:** Utilizar água destilada ou desionizada.

### Radioactividade

Uma cópia da licença de utilização de radioisótopos (Específica ou Geral) emitida para um determinado cliente, deve estar em poder da Diagnostic Product Corporation antes do envio de kits ou componentes que contenham material radioactivo. Estes materiais radioactivos podem ser adquiridos por qualquer cliente que possua a necessária licença Específica. Com uma licença Geral, estes produtos radioactivos só podem ser adquiridos por médicos, veterinários na prática de medicina veterinária, laboratórios clínicos e hospitalares. E estritamente para uso clínico *in vitro* ou testes laboratoriais que não envolvam a administração externa ou interna do

material radioactivo ou a sua radiação para seres humanos ou outros animais. A sua aquisição, prescrição, armazenamento, utilização, transporte e eliminação estão sujeitos aos regulamentos legais e a licença (Geral ou Específica) emitida pela Comissão Reguladora Nuclear ou por um Estado com o qual a NRC (Comissão Reguladora Nuclear) tenha estabelecido um protocolo para o exercício de actividades de regulação.

Tratar os materiais radioactivos de acordo com os requisitos da respectiva licença, Específica ou Geral. Para minimizar a exposição à radiação, o utilizador deve seguir as instruções da publicação do Departamento Nacional de Normas *Utilização Segura de Materiais Radioactivos* (Livro No. 92, publicado em Março de 1964) e publicações seguintes do Estado e Autoridades Federais.

Limpar imediatamente os derrames e descontaminar as superfícies afectadas. Evitar os aerossóis. Eliminar os resíduos sólidos radioactivos de acordo com os requisitos da licença. Os detentores de licenças gerais (titulares da licença NRC 483) podem eliminar os resíduos sólidos radioactivos como resíduos não radioactivos depois de remover os rótulos. Os detentores de licenças Específicas (Licença NRC 313) devem ter em conta o Capítulo 10 do Artigo 20 do Código de Regulamentações Federais. Os detentores de licenças nos Estados com os quais exista um protocolo devem cumprir a legislação em vigor aprovada para o seu território. Os detentores de licenças gerais podem eliminar os resíduos líquidos radioactivos do tipo usado neste produto através de um esgoto de laboratório. As entidades licenciadas devem remover ou tornar irreconhecíveis os rótulos das embalagens vazias de materiais radioactivos antes de os eliminar como resíduos sólidos. Os detentores de licenças específicas podem eliminar pequenas quantidades de resíduos líquidos radioactivos do tipo usado neste produto através de um esgoto normal de laboratório. Devem ser cumpridas as normas em vigor aplicáveis ao seu laboratório.

## Materiais fornecidos:

### Preparação inicial

Preparar todos os componentes pelo menos 10 minutos antes da utilização.

#### Anti-soro hGH (GHD1)

Anti-soro de hormona do crescimento liofilizado, com conservante. Reconstituir cada frasco adicionando **7,7 mL** de água destilada ou desionizada. Misturar por inversão *suave*. Estável a uma temperatura de 2–8°C durante 30 dias depois de reconstituído. Cor: azul.

**KGHD1:** 1 frasco. **KGHD2:** 2 frascos.

#### hGH <sup>125</sup>I (GHD2)

Hormona do crescimento iodada liofilizada, com conservante. Reconstituir cada frasco adicionando **7,7 mL** de água destilada ou desionizada. Misturar por inversão *suave*. Estável, após a reconstituição, durante 30 dias a 2–8°C, ou até à data de validade inscrita no frasco. Cor: amarelo.

**KGHD1:** 1 frasco. **KGHD2:** 2 frascos.

#### Calibradores hGH (GHD3–9)

Sete frascos, rotulados de A a G, de calibradores liofilizados. Pelo menos 30 minutos antes da utilização, reconstituir o calibrador zero **A com 5,0 mL** de água destilada ou desionizada, e cada um dos restantes calibradores de **B a G com 2,0 mL** de água destilada ou desionizada. Usar pipetas volumétricas e misturar por inversão *suave*. Estável a uma temperatura de 2–8°C durante 30 dias depois de reconstituído. Para períodos de armazenamento mais prolongados, aliquotar e congelar: estável a –20°C durante 6 meses.

**KGHD1:** 1 conjunto. **KGHD2:** 1 conjunto.

Os calibradores têm valores *específicos de lote* de *aproximadamente* 0, 1, 2, 5, 10, 20 e 30 ng/mL *numa matriz de soro humano*. O ensaio é padronizado nos termos das Preparações de Referência Internacional de Hormona de Crescimento humano para imunoensaio da Organização Mundial de Saúde, com os números 66/217 e 80/505, e da preparação de referência para hGH NIAMDD-hGH-RP-1 do Instituto Nacional de Saúde. *Consultar os rótulos dos frascos para concentrações exactas em ng/mL*. Os pontos de calibração intermédios podem ser obtidos misturando

os calibradores nas proporções adequadas.

#### **Solução de Precipitação (ACGG)**

Globulina gama anti-coelho de cabra (GARGG) e glicol de polietileno diluído (PEG) em soro fisiológico. A Solução de Precipitação é fornecida na forma líquida, pronta a usar. Estável a uma temperatura de 2–8°C durante 30 dias depois de aberto. A Solução de Precipitação deve ser bem misturada antes da sua utilização, uma vez que há possibilidade de formação de precipitado fino após armazenamento a 2–8°C. Cor: azul.

**KGHD1:** 1 frasco. **KGHD2:** 2 frascos.

#### **Materiais necessários mas não fornecidos**

Contador Gama:

Centrífuga – de preferência refrigerada e com uma capacidade mínima de 3000xg.

Misturador giratório

#### **Preparação dos Reagentes**

Água destilada ou desionizada

Pipetas volumétricas: 2,0, 5,0 e 7,7 mL

#### **Radioimunoensaio**

Tubos lisos de polipropileno 12x75 mm – disponíveis na DPC

Micropipetas: 100 µL e 1,0 mL.

Dispositivo de decantação de espuma – disponível na DPC

Papel milimétrico logit-log — disponível na DPC (Números de catálogo: ZP797)

Um controlo de três níveis de imunoensaio baseado em soro humano, contendo hGH como um dos mais de 25 constituintes submetidos a ensaio, está disponível na DPC (Números de catálogo: CON6).

#### **Colheita**

O paciente deve estar em jejum e repouso absoluto 30 minutos antes da colheita de sangue.<sup>6,7</sup>

Colher sangue por punção venosa<sup>5</sup> para tubos lisos, heparinizados ou EDTA, evitando a hemólise, e separar o soro ou plasma das células. Anotar a hora da colheita.

Recomenda-se o uso de uma ultra centrífuga para clarear amostras lipémicas.

Amostras lipémicas, hemolisadas ou totalmente contaminadas podem causar resultados erróneos.

Os tubos para colheita sanguínea de diferentes fabricantes, podem originar diferentes valores, dependendo dos materiais e aditivos, incluindo gel ou barreiras físicas, activadores do coágulo e/ou anti coagulantes. Double Antibody hGH não foram ainda testados com todas as possíveis variações originadas pelos tipos de tubos. Consultar a secção Tipos de Amostras Alternativas para obter detalhes sobre os tubos que foram testados.

**Volume de Amostra:** 100 µL de soro ou plasma por tubo.

**Armazenamento:** Refrigerar imediatamente. Estável a uma temperatura de 2–8°C durante 8 horas,<sup>6,7</sup> ou durante 2 meses (aliquotado) a –20°C. (Evitar o descongelamento e congelamento repetidos).

Antes de proceder ao ensaio, deixar que as amostras atinjam a temperatura ambiente e misturar por agitação ou inversão suave. Não descongelar as amostras aquecendo-as em banho-maria.

#### **Procedimento de Radioimunoensaio**

Todos os componentes, à excepção da Solução de Precipitação, devem estar à temperatura ambiente (15–28°C) antes da sua utilização.

- 1 Rotular dezoito tubos em duplicado: T (contagens totais), NSB (ligação não específica), A (ligação máxima), e de B a G. Rotular tubos adicionais, também em duplicado, para amostras de paciente e controlos.

| Calibrador | Aproximado ng/mL |
|------------|------------------|
| A (MB)     | 0                |
| B          | 1                |
| C          | 2                |
| D          | 5                |
| E          | 10               |
| F          | 20               |
| G          | 30               |

**Nota:** Os calibradores são *específicos de cada lote*. Consulte os rótulos dos frascos para valores em ng/mL.

- 2** Pipetar **100 µL** do calibrador zero A para os tubos NSB e A, e **100 µL** de cada um dos restantes calibradores de B a G para os tubos com os rótulos correspondentes. Pipetar **100 µL** de cada amostra de paciente (soro ou plasma) e **100 µL** de cada controlo para os tubos preparados.

As amostras de paciente que se preveja que contenham concentrações de hGH superiores ao calibrador mais elevado (30 ng/mL) deverão ser diluídas com o calibrador zero antes do ensaio.

Recomenda-se a utilização de uma micro-pipeta de pontas descartáveis, mudando a ponta entre as amostras de modo a evitar contaminação.

- 3** Adicionar **100 µL** de Anti-soro hGH (Azul) a todos os tubos, à excepção dos tubos NSB e T. Turbilhonar.

Todos os tubos excepto os tubos NSB e T deverão ficar com uma cor entre o azul e o verde. Recomenda-se um dispensador de repetição para as adições de 100 µL de anti-soro e marcador.

- 4** Incubar durante **1 hora** à temperatura ambiente (15–28°C).

A incubação pode ser prolongada até 90 minutos à temperatura ambiente desde que a segunda incubação (fase 6) seja modificada da mesma forma.

- 5** Adicionar **100 µL** de hGH <sup>125</sup>I (Amarelo) a todos os tubos. Turbilhonar.

Todos os tubos à excepção dos tubos NSB e T deverão ficar verdes. Reservar os tubos T para contagem

na fase 10; não necessitam de mais processamento.

- 6** Incubar durante **1 hora** à temperatura ambiente (15–28°C).

Esta fase de incubação pode ser tratada da mesma forma que a fase 4 acima.

- 7** Adicionar **1,0 mL** de Solução de Precipitação *fria* (Azul) a todos os tubos. Turbilhonar.

Todos os tubos deverão ficar azuis, à excepção dos tubos T que deverão ficar amarelos. Antes de ser dispensada, a Solução de Precipitação deve ser bem misturada (sem espuma) até desaparecer todo o precipitado visível.

- 8** Centrifugar durante **15 minutos** a 3000xg.

- 9** Decantar (ou aspirar) o sobrenadante, retendo o precipitado para contagem.

Usando um dispositivo de decantação de espuma, bater suavemente os tubos contra papel absorvente e enxugar os rebordos a fim de remover as gotas residuais.

- 10** Contar cada tubo durante **1 minuto**.

## Cálculo dos Resultados

Para calcular as concentrações de hormona do crescimento a partir de uma representação logit-log da curva de calibração, começar por calcular a média das contagens por minuto corrigidas com NSB de cada par de tubos:

Contagens reais = (Média CPM) minutos (Média **NSB** CPM)

Determinar a ligação de cada par de tubos como percentagem de ligação máxima (MB), considerando as contagens por minuto corrigidas com NSB do tubo A como 100%:

Percentagem de Ligação = (Contagens reais / Contagens **MB** reais) × 100

Usando papel milimétrico logit-log, representar a Percentagem de Ligação no eixo vertical (probabilidade) relativamente à Concentração no eixo horizontal (logarítmico) para cada um dos calibradores diferentes de zero, e representar uma linha recta, em função da trajectória destes pontos. Os resultados

de amostras desconhecidas podem então ser lidos a partir da linha por interpolação.

Constitui boa prática verificar os resultados através da concordância entre as réplicas, e construir um gráfico da curva de calibração (mesmo que os cálculos sejam efectuados por computador) para verificação visual da aplicabilidade da transformação usada e como forma de detectar pontos de calibração divergentes. Recomenda-se também que sejam mantidos registos destes parâmetros de redução de dados:

$T = \text{Contagens Totais (como contagens por minuto)}$

$\%NSB = 100 \times (\text{Média Contagens NSB} / \text{Contagens Totais})$

$\%MB = 100 \times (\text{Contagens MB reais} / \text{Contagens Totais})$

E os 20%, 50% e 80% de intercepção, onde

20% = Concentração a 20 por cento de Ligação, etc.

De notar que outras abordagens, tais como a aplicação de uma logística de 4 parâmetros, são igualmente aceitáveis. Ver Dudley RA, et al. Guidelines for immunoassay data reduction. Clin Chem 1985; 31:1264-71.

**Exemplo de Ensaio:** Apenas para ilustração, não serve para calcular resultados de outro ensaio. Uma vez que os valores dos calibradores são valores *específicos de lote*, as concentrações listadas na coluna mais à direita podem não corresponder aos valores dos calibradores fornecidos na sua remessa. (Ver tabela "Exemplo de Ensaio".)

### Controlo de Qualidade

Os controlos ou os pools de soro com pelo menos dois níveis de concentração de hGH — baixo e elevado — devem ser submetidos por rotina a ensaio como amostras desconhecidas.

Os resultados dos pacientes devem apenas ser referenciados se os resultados dos controlos para este ensaio estiverem dentro dos critérios de aceitação estabelecidos pelo laboratório.

Constitui boa prática laboratorial registar para cada ensaio o número do lote dos componentes usados, bem como as datas de quando foram reconstituídos ou

abertos pela primeira vez. Recomenda-se registar os resultados do controlo em gráfico de dia para dia — como descrito, por exemplo, in Westgard JO, et al. A multi-rule chart for quality control. Clin Chem 1981; 27:493-501. Clin Chem 1981;27:493-501. De notar que a repetição das amostras pode constituir uma ferramenta adicional para monitorizar a precisão inter-ensaio, e que pares de controlos podem ser colocados ao longo do ensaio para ajudar a verificar a ausência de variação significativa.

**Centrifugação:** O procedimento requer centrifugação a 3000xg durante 15 minutos. Acelerações inferiores são consideradas satisfatórias apenas quando o tempo de centrifugação é aumentado na proporção adequada — por exemplo, 30 minutos a 1500xg. Uma centrífuga refrigerada de alta velocidade é recomendável mas não essencial. Usar as fórmulas abaixo para calcular a aceleração da sua centrífuga a uma dada velocidade, ou a velocidade (em rotações por minuto) necessária para atingir a força g necessária.

$\text{força g} = 28,38 \times (\text{rpm} / 1\,000)^2 \times \text{raio [em polegadas]}$

$\text{rpm} = 187,7 \times \sqrt{(\text{força g} / \text{raio [polegadas]})}$

ou

$\text{força g} = 11,18 \times (\text{rpm} / 1\,000)^2 \times \text{raio [em cm]}$

$\text{rpm} = 299,07 \times \sqrt{(\text{força g} / \text{raio [cm]})}$

### Valores Esperados

Foi realizado um estudo de gama de referência num laboratório hospitalar de grandes dimensões no qual foram submetidas a ensaio com o procedimento Double Antibody hGH amostras de 72 voluntários adultos em jejum. Os resultados do estudo sugerem uma gama de referência para adultos de:

Não detectável até 7 ng/mL

Os laboratórios devem considerar estes resultados *apenas como directrizes*. Cada laboratório deve estabelecer as suas próprias gamas de referência.

### Dados de Desempenho

Ver Tabelas e Gráficos para dados *representativos* do desempenho do kit

Double Antibody hGH. Os resultados são apresentados em ng/mL.

**Factor de conversão:**

ng/mL  $\times$  2  $\rightarrow$  mIU/L [WHO IRP 66/217]

ng/mL  $\times$  2,6  $\rightarrow$  mIU/L

[WHO 1<sup>st</sup> IRP 80/505]

**Gama de Calibração:**

Aproximadamente 1–30 ng/mL.

Os valores dos calibradores são valores *específicos de lote*.

**Sensibilidade Analítica:** 0,9 ng/mL

**Precisão Intra-ensaio (Dentro do**

**Ensaio):** Foram calculadas estatísticas para cada uma das seis amostras a partir dos resultados de 20 pares de tubos num único ensaio. (Ver a tabela "Precisão Intra-ensaio".)

**Precisão Inter-ensaio (Ensaio a**

**ensaio):** Foram calculadas estatísticas para cada uma de seis amostras a partir dos resultados de pares de tubos em 20 ensaios diferentes. (Ver tabela "Precisão Inter-ensaio".)

**Efeito fim-de-série:** Nenhum até aproximadamente 150 tubos. (Ver tabela "Efeito fim-de-série".)

**Especificidade:** O anticorpo é altamente específico para hormona de crescimento humano. (Ver tabela "Especificidade".)

**Linearidade:** As amostras foram submetidas a ensaio sob várias diluições. (Ver tabela "Linearidade" para dados representativos.)

**Recuperação:** Foram submetidas a ensaio amostras a que foram adicionadas quatro soluções de hGH na proporção de 1 para 19 (50, 100, 200 e 400 ng/mL) (Ver tabela "Recuperação" para dados representativos.)

**Bilirrubina:** A presença de bilirrubina em concentrações até 100 mg/L não tem efeito nos resultados, dentro da precisão do ensaio.

**Hemólise:** Os resultados obtidos a partir de amostras hemolisadas devem ser interpretados de forma cuidadosa, já que existe a tendência — embora não seja uma tendência uniforme — para valores mais baixos associados a uma concentração crescente de hemoglobina. (Ver Tabela "Hemólise".)

**Ácidos Gordos Livres:** A presença de ácido oleico em concentrações até

10 mmol/L não tem qualquer efeito clínico significativo *in vitro* sobre os resultados.

**Tipo de amostra alternativa:** A fim de determinar se os anticoagulantes interferem no ensaio, foi colhido sangue de 20 voluntários saudáveis para tubos de vácuo lisos, heparinizados e EDTA. Todas as amostras foram submetidas a ensaio com o procedimento Double Antibody hGH. Regressão linear:

(Heparina) = 1,02 (Soro) + 0,04 ng/mL  
 $r = 0,998$

(EDTA) = 0,97 (Soro) + 0,09 ng/mL  
 $r = 0,995$

Médias:

3,8 ng/mL (Heparina)

3,7 ng/mL (Soro)

3,7 ng/mL (EDTA)

**Comparação de Métodos:** O ensaio foi comparado com um radioimunoensaio disponível no mercado (Kit A) em 145 amostras de soro de paciente. (Gama de concentração: não detectável até aproximadamente 7,4 ng/mL com o procedimento Double Antibody.) Regressão linear:

(Kit A) = 1,13 (DAB) + 0,13 ng/mL  
 $r = 0,985$

Médias:

1,72 ng/mL (Double Antibody)

2,07 ng/mL (Kit A)

Os resultados ligeiramente inferiores obtidos com o kit Double Antibody devem-se provavelmente ao facto de este utilizar calibradores numa matriz de soro humano para uma compatibilidade máxima com amostras de paciente típicas, enquanto o kit A utiliza uma matriz de tampão bovino.

## Assistência Técnica

Por favor contacte o seu Distribuidor Nacional.

O Sistema de Qualidade da Diagnostic Products Corporation está registado sob ISO 13485:2003.

**DPC**®

Diagnostic Products Corporation  
Corporate Offices  
5210 Pacific Concourse Drive  
Los Angeles, CA 90045-6900  
USA

2005-03-18

PIKGHD – 6





EC REP DPC Biermann GmbH  
61231 Bad Nauheim  
Germany  
+49 -6032-994-00