



IVD

CE

hGH-IRMA

KIP1081

Version : 230123

Date of issue : 23/01/2023

Revision date: 23/01/2023

History

Summary of change:

Current Version: 230123
New logo

Read entire protocol before use.

hGH-IRMA

I. INTENDED USE

Immunoradiometric assay kit for the *in vitro* quantitative measurement of human growth hormone (hGH) in serum.

II. GENERAL INFORMATION

- A. **Proprietary name :** DIAsource hGH-IRMA
- B. **Catalogue number :** KIP1081 : 96 tests
- C. **Manufactured by :** DIAsource ImmunoAssays S.A.
Rue du Bosquet, 2, B-1348 Louvain-la-Neuve, Belgium.

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

III. CLINICAL BACKGROUND

A. Biological activities of hGH

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

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

B. Clinical application of hGH-IRMA

· **Growth retardation**

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

· **Hypopituitarism**

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


· **Gigantism and acromegaly**

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

IV. PRINCIPLES OF THE METHOD

The DIASource hGH-IRMA is an immunoradiometric assay based on coated-tube separation. Mab 1 - the capture antibody is attached to the lower and inner surface of the plastic tube. Calibrators or samples added to the tubes will at first show low affinity for Mab 1. Addition of Mab 2, the signal antibody labeled with ¹²⁵I, will complete the system and trigger the immunological reaction. After washing, the remaining radioactivity bound to the tube reflects the antigen concentration.

V. REAGENTS PROVIDED

Reagents	96 Test Kit	Colour Code	Reconstitution			
 Tubes coated with anti hGH (monoclonal antibodies)	2 x 48	white	Ready for use			
<table border="1" data-bbox="119 638 255 683"> <tr> <td>Ab</td> <td>¹²⁵I</td> </tr> </table> TRACER: ¹²⁵ Iodine labeled anti - hGH (monoclonal antibodies) in phosphate buffer with bovine serum albumin, azide (< 0.1%) and an inert red dye.	Ab	¹²⁵ I	1 vial 5.5 ml 350 kBq	red	Ready for use	
Ab	¹²⁵ I					
<table border="1" data-bbox="127 840 247 884"> <tr> <td>CAL</td> <td>0</td> </tr> </table> Zero calibrator (0 µIU/ml) in human plasma with thymol	CAL	0	1 vial lyophilized	yellow	Add 2 ml distilled water	
CAL	0					
<table border="1" data-bbox="127 940 247 985"> <tr> <td>CAL</td> <td>N</td> </tr> </table> Calibrators hGH N = 1 to 6 (see exact values on vial labels) in human plasma with thymol	CAL	N	6 vials lyophilized	yellow	Add 0.5 ml distilled water	
CAL	N					
<table border="1" data-bbox="71 1086 319 1131"> <tr> <td>WASH</td> <td>SOLN</td> <td>CONC</td> </tr> </table> Wash solution (NaCl, Tween 20)	WASH	SOLN	CONC	1 vial 40 ml	brown	Dilute 20 x with distilled water (use a magnetic stirrer).
WASH	SOLN	CONC				
<table border="1" data-bbox="79 1198 279 1243"> <tr> <td>CONTROL</td> <td>N</td> </tr> </table> Controls - N = 1 or 2 in human plasma with thymol	CONTROL	N	2 vials lyophilized	silver	Add 0.5 ml distilled water	
CONTROL	N					

Note : Use the zero calibrator for sample dilutions.

1 µIU of the calibrator preparation is equivalent to 1 µIU NIBSC 2nd IS 98/574.

VI. SUPPLIES NOT PROVIDED

The following material is required but not provided in the kit:

- Distilled water
- Pipettes for delivery of: 50 µl, 500 µl and 2 ml (the use of accurate pipettes with disposable plastic tips is recommended)
- Vortex mixer
- Magnetic stirrer
- 5 ml automatic syringe (Cornwall type) for washing
- Aspiration system (optional)
- Any gamma counter capable of measuring ¹²⁵I may be used (minimal yield 70%).

VII. REAGENT PREPARATION

- Calibrators :** Reconstitute the zero calibrator with 2.0 ml distilled water and other calibrators with 0.5 ml distilled water.
- Controls :** Reconstitute the controls with 0.5 ml distilled water.
- Working Wash solution :** Prepare an adequate volume of Working Wash solution by adding 19 volumes of distilled water to 1 volume of Wash Solution (20x). Use a magnetic stirrer to homogenize. Discard unused Working Wash solution at the end of the day.

VIII. STORAGE AND EXPIRATION DATING OF REAGENTS

- Before opening or reconstitution, all kits components are stable until the expiry date, indicated on the label, if kept at 2 to 8°C.
- After reconstitution, calibrators and controls are stable for one week at 2 to 8°C. For longer storage periods, aliquots should be made and kept at -20°C for 3 months. Avoid successive freezing and thawing.
- Freshly prepared Working Wash solution should be used on the same day.
- After its first use, tracer is stable until expiry date, if kept in the original well closed vial at 2 to 8°C.
- Alterations in physical appearance of kit reagents may indicate instability or deterioration.

IX. SPECIMEN COLLECTION AND PREPARATION

- Serum samples must be kept at 2-8°C.
- If the test is not run within 24 hrs., storage at -20°C is recommended.
- Avoid successive freezing and thawing.

X. PROCEDURE

A. Handling notes

Do not use the kit or components beyond expiry date. Do not mix materials from different kit lots. Bring all the reagents to room temperature prior to use.

Thoroughly mix all reagents and samples by gentle agitation or swirling. In order to avoid cross-contamination, use a clean disposable pipette tip for the addition of each reagent and sample.

High precision pipettes or automated pipetting equipment will improve the precision. Respect the incubation times.

Prepare a calibration curve for each run, do not use data from previous runs.

B. Procedure

- Label coated tubes in duplicate for each calibrator, sample, and control. For the determination of total counts, label 2 normal tubes
- Briefly vortex calibrators, controls and samples and dispense 50µl of each into respective tubes.
- Dispense 50 µl of ¹²⁵Iodine labeled anti-hGH into each tube, including the uncoated tubes for total counts.
- Shake the tube rack gently by hand.
- Incubate for 2 hours at room temperature.
- Aspirate (or decant) the content of each tube (except total counts). Be sure that the plastic tip of the aspirator reaches the bottom of the coated tube in order to remove all the liquid.
- Wash tubes with 3 ml Working Wash solution (except total counts). Avoid foaming during the addition of the Working Wash solution.
- Aspirate (or decant) the content of each tube (except total counts).
- Wash tubes again with 3 ml Wash solution (except total counts) and aspirate (or decant).
- After the last washing, let the tubes stand upright for two minutes and aspirate the remaining drop of liquid.
- Count tubes in a gamma counter for 60 seconds.

XI. CALCULATION OF RESULTS

- Calculate the mean of duplicate determinations.
- On semilogarithmic or linear graph paper plot the c.p.m. (ordinate) for each calibrator against the corresponding concentration of hGH (abscissa) and draw a calibration curve through the calibrator points, reject the obvious outliers.
- Read the concentration for each control and sample by interpolation on the calibration curve.
- Computer assisted data reduction will simplify these calculations. If automatic result processing is used, a 4 parameter logistic function curve fitting is recommended.

XII. TYPICAL DATA

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

hGH-IRMA	cpm	B/T (%)
Total count	126065	
Calibrator		
0 µIU/ml	241	0.19
1.0 µIU/ml	1254	0.99
2.4 µIU/ml	2743	2.18
8.0 µIU/ml	7817	6.20
25.5 µIU/ml	19515	15.48
59.1 µIU/ml	34310	27.22
119.9 µIU/ml	49965	39.63

XIII. PERFORMANCE AND LIMITATIONS

A. Detection limit

Twenty zero calibrators were assayed along with a set of other calibrators. The detection limit, defined as the apparent concentration two standard deviations above the average counts at zero binding, was 0.04 µIU/ml.

B. Specificity

Cross-reactive hormones were added to a low and to a high hGH value calibrator. The apparent hGH response was measured.

added Hormone	hGH CAL 1 µIU/ml	hGH CAL 5 µIU/ml
-	0.60	65
hCG 300000 mIU/ml	0.63	63
hPL 50000 ng/ml	0.69	68
PRL 2000 ng/ml	1.35	63

Note : this table shows the cross-reactivity for the hGH-IRMA.

C. Precision

INTRA-ASSAY				INTER-ASSAY			
Serum	N	<X> ± SD (µIU/ml)	CV (%)	Serum	N	<X> ± SD (µIU/ml)	CV (%)
A	6	6.7 ± 0.3	4.4%	A	20	3.8 ± 0.3	8.1%
B	6	19.0 ± 0.2	1.0%	B	20	17.9 ± 1.2	6.7%

SD : Standard Deviation; CV: Coefficient of variation

D. Accuracy

DILUTION TEST			
Sample	Dilution	Theoretical Concent. (µIU/ml)	Measured Concent. (µIU/ml)
Serum 1	1/1	-	35.6
	1/2	17.8	17.4
	1/4	8.9	8.8
	1/8	4.5	5.0
	1/16	2.2	2.4
	1/32	1.1	1.2

Sample was diluted with the zero calibrator.

Conversion factor:

1µIU hGH-IRMA Calibrator = 0.33 ng

RECOVERY TEST

Sample	added hGH (µIU/ml)	Recovered hGH (µIU/ml)	Recovered (%)
Serum 1	5	5.1	102%
	10	9.5	95%
	25	24.7	99%
	50	53.7	107%
Serum 2	60	63	105%
	40	46.8	117%
	20	22.1	111%
	10	10.2	102%
	5	4.8	96%

E. Time delay between last calibrator and sample dispensing

As shown hereafter, assay results remain accurate even when a sample is dispensed 30 minutes after the calibrator has been added to coated tubes.

TIME DELAY

Serum (µIU/ml)	0'	15'	30'
Serum 1	4.4	4.5	4.8
Serum 2	18.8	18.1	19.3
Serum 3	27.6	26.2	27.0
Serum 4	36.5	36.8	36.6

F. Hook effect

A sample spiked with hGH up to 4000 µIU/ml gives a signal above the highest calibrator concentration.

XIV. LIMITATIONS

- Specimens from patients who have received preparations of mouse monoclonal antibodies for diagnosis or therapy may contain human anti-mouse antibodies (HAMA). Such specimens may show either falsely elevated or depressed values when tested with assay kits which employ mouse monoclonal antibodies.
- Heterophilic antibodies in human serum can react with reagent immunoglobulins, interfering with in vitro immunoassays. Patients routinely exposed to animals or animal serum products can be prone to this interference and anomalous values may be observed in case of the presence of heterophilic antibodies. Carefully evaluate the results of patients suspected of having these antibodies. If results are not consistent with other clinical observations, additional information should be required before diagnosis.

XV. INTERNAL QUALITY CONTROL

- If the results obtained for Control 1 and/or Control 2 are not within the range specified on the vial label, the results cannot be used unless a satisfactory explanation for the discrepancy has been given.
- If desirable, each laboratory can make its own pools of control samples, which should be kept frozen in aliquots.
- Acceptance criteria for the difference between the duplicate results of the samples should rely on Good Laboratory Practices.

XVI. REFERENCE INTERVALS

These values are given only for guidance; each laboratory should establish its own normal range of values.

In normal subjects, growth hormone (hGH) secretion is pulsatile. During day-time, hGH concentrations range from <0.2-10 µIU/ml. During sleep, hGH concentrations increase consistently (± 30 µIU/ml).

hGH secretion is greatly stimulated by exercise and stress (venous puncture, hypoglycemia, ...), but is decreased by hyperglycemia.

In normal subjects (n=34), two hours after oral glucose load (75 g in adults), hGH levels were lower than 10 µIU/ml and the hGH response to stimulation tests (insulin, arginine, glucagon administration) exceeded 20 µIU/ml.

hGH levels were elevated (even after glucose load) in acromegaly (> 10 µIU/ml). In hGH deficiency, the response to stimulation test is absent or blunted (short stature by hGH deficiency; hypopituitarism from various origins).

XVII. PRECAUTIONS AND WARNINGS

Safety

For in vitro diagnostic use only.

This kit contains ¹²⁵I (half-life: 60 days) ,emitting ionizing X (28 keV) and γ (35.5 keV) radiations.

This radioactive product can be transferred to and used only by authorized persons; purchase, storage, use and exchange of radioactive products are subject to the legislation of the end user's country. In no case the product must be administered to humans or animals.

The human blood components included in this kit have been tested by European approved and/or FDA approved methods and found negative for HBsAg, anti-HCV, anti-HIV-1 and 2. No known method can offer complete assurance that human blood derivatives will not transmit hepatitis, AIDS or other infections. Therefore, handling of reagents or serum specimens should be in accordance with local safety procedures.

All animal products and derivatives have been collected from healthy animals. Bovine components originate from countries where BSE has not been reported. Nevertheless, components containing animal substances should be treated as potentially infectious.

Avoid any skin contact with reagents (sodium azide as preservative). Azide in this kit may react with lead and copper in the plumbing and in this way form highly explosive metal azides. During the washing step, flush the drain with a large amount of water to prevent azide build-up.

Do not smoke, drink, eat or apply cosmetics in the working area. Do not pipette by mouth. Use protective clothing and disposable gloves. All radioactive handling should be executed in a designated area, away from regular passage. A log book for receipt and storage of radioactive materials must be kept in the lab. Laboratory equipment and glassware, which could be contaminated with radioactive substances should be segregated to prevent cross contamination of different radioisotopes.

Any radioactive spills must be cleaned immediately in accordance with the radiosafety procedures. The radioactive waste must be disposed of following the local regulations and guidelines of the authorities holding jurisdiction over the laboratory. Adherence to the basic rules of radiation safety provides adequate protection.

XVIII. BIBLIOGRAPHY

1. CAMANNI F., MASSARA F., BELFORTE L., ROSATELLO A., MOLENATTI G.M. (1977)
Effect of dopamine on plasma growth hormone and prolactin levels in normal and acromegalic subjects.
J. Clin. Endo. and Metab., 44:465.
2. DAUGHADAY W.H. (1981)
The adenohypophysis
In : "Textbook of Endocrinology", R.H. Williams ed., W.B. Saunders, Philadelphia, p;73.
3. DROBNY E.C., AMBURN K., BAUMANN G. (1983)
Circadian variation of basal plasma growth hormone in man.
J. Clin. Endo. and Metab., 57:524-528.
4. HASHIDA S., NAKAWAGA K., ISHIKAWA E., OHTAKI S. (1985)
Basal level of human growth hormone (hGH) in normal serum.
Clin. Chim. Acta, 151:185-186.
5. LEWIS V.J. et al. (1980)
Human growth hormone : A complex of proteins.
Rec. Progr. Horm. Res., 36:488.

6. LI C.H. (1974)
Human growth hormone : perspective on its chemistry and physiology.
In : "Advances in human growth hormone research", S. Raiti ed. U.S. Department of Health, Education and Welfare Publ. DMEW publ. no. (NJH) 74-612, p. 321.
7. REUTENS AT. (1995)
Evaluation and application of a highly sensitive assay for serum growth hormone (GH) in the study of adult GH deficiency.
J. Clin. Endocrinol. Metab., 80(2): 480-485
8. CROWLEY S. et al. (1995)
Growth and the growth hormone axis in prepubertal children with asthma.
J. Pediatr. 126(2): 297-303.
9. KELLY JT. et al. (1993)
Effect of different oral oestrogen formulations on insulin-like growth factor I, growth hormone and growth hormone binding protein in post-menopausal women.
Clin. Endocrinol. 39(5) : 561-567

XIX. SUMMARY OF THE PROTOCOL

	TOTAL COUNTS ml	CALIBRATORS ml	SAMPLE(S) CONTROLS ml
Calibrators (0 to 6)	-	0.05	-
Samples, controls	-	-	0.05
Tracer	0.05	0.05	0.05
Incubation	2 hours at room temperature		
Separation	-	aspirate (or decant)	
Working Wash solution	-	3.0	
Separation	-	aspirate (or decant)	
Working Wash solution	-	3.0	
Separation	-	aspirate (or decant)	
Counting	Count tubes for 60 seconds		

Other translations of this Instruction for Use can be downloaded from our website: <https://www.diasource-diagnostics.com/>

Lire entièrement le protocole avant utilisation.

hGH-IRMA

I. BUT DU DOSAGE

Trousse de dosage radio-immunométrique pour la mesure quantitative *in vitro* de l'hormone de croissance (hGH) dans le sérum humain.

II. INFORMATIONS GENERALES

- A. Nom du produit :** DIAsource hGH-IRMA kit
- B. Numéro de catalogue :** KIP1081 : 96 tests
- C. Fabriqué par :** DIAsource ImmunoAssays S.A.
Rue du Bosquet, 2, B-1348 Louvain-la-Neuve, Belgium.

Pour une assistance technique ou une information sur une commande :

Tel : +32 (0)10 84.99.11

Fax : +32 (0)10 84.99.91

III. CONTEXTE CLINIQUE

A. Activités biologiques de la hGH

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

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

B. Application clinique de la hGH-IRMA

Retard de croissance

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

Hypopituitarisme

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


Gigantisme et acromégalie

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

IV. PRINCIPE DU DOSAGE

La trousse DIASource hGH-Irma est une trousse de dosage radio-immunométrique basée sur la séparation en tube recouvert d'anticorps. Mabs1, les anticorps de capture, sont attachés sur la surface basse et interne du tube plastic. Les calibrateurs ou les échantillons ajoutés dans les tubes présenteront dans un premier temps une faible affinité pour Mabs1. L'addition de Mab2, l'anticorps signal marqué avec l'¹²⁵I, complètera le système et déclenchera la réaction immunologique. Suite au lavage, la radioactivité restante liée au tube reflètera la concentration de l'antigène.

V. REACTIFS FOURNIS

Reactifs	96 tests Kit	Code Couleur	Reconstitution			
 Tubes recouverts avec l'anti hGH (anticorps monoclonal)	2 x 48	Blanc	Prêt à l'emploi			
<table border="1" data-bbox="108 678 242 712"><tr><td>Ab</td><td>¹²⁵I</td></tr></table> TRACEUR: anti - hGH marquée à l' ¹²⁵ Iodine (anticorps monoclonaux) dans un tampon phosphate avec de l'albumine bovine, de l'azide de sodium (<0,1%) et un colorant rouge inactif	Ab	¹²⁵ I	1 flacon 5,5 ml 350 kBq	Rouge	Prêt à l'emploi	
Ab	¹²⁵ I					
<table border="1" data-bbox="98 887 231 920"><tr><td>CAL</td><td>0</td></tr></table> Calibrateur zéro dans du plasma humain avec du thymol	CAL	0	1 flacon lyophilisé	Jaune	Ajouter 2 ml d'eau distillée	
CAL	0					
<table border="1" data-bbox="98 992 231 1025"><tr><td>CAL</td><td>N</td></tr></table> Calibrateur N = 1 à 6 (cfr. Valeurs exactes sur chaque flacon) dans du plasma humain avec du thymol	CAL	N	6 flacons lyophilisés	Jaune	Ajouter 0,5 ml d'eau distillée	
CAL	N					
<table border="1" data-bbox="76 1137 258 1171"><tr><td>WASH</td><td>SOLN</td><td>CONC</td></tr></table> Solution de Lavage (NaCl, Tween 20)	WASH	SOLN	CONC	1 flacon 40 ml	Brun	Diluer 20 x avec de l'eau distillée (utiliser un agitateur magnétique).
WASH	SOLN	CONC				
<table border="1" data-bbox="82 1243 242 1276"><tr><td>CONTROL</td><td>N</td></tr></table> Contrôles - N = 1 ou 2 dans du plasma humain avec du thymol	CONTROL	N	2 flacons lyophilisés	Gris	Ajouter 0,5 ml d'eau distillée	
CONTROL	N					

Note : 1. Utiliser le calibrateur zéro pour la dilution des échantillons.
2. 1 µIU de la préparation du calibrateur est équivalent à 1 µIU NIBSC 2nd IS 98/574.

VI. MATERIEL NON FOURNI

Le matériel mentionné ci-dessous est requis mais non fourni avec la trousse:

- Eau distillée
- Pipettes pour distribuer: 50 µl, 500 µl et 2 ml (l'utilisation de pipettes précises et de pointes en plastique est recommandée)
- Agitateur vortex
- Agitateur magnétique
- Seringue automatique de 5 ml (type Cornwall) pour les lavages
- Système d'aspiration (optionnel)
- Tout compteur gamma capable de mesurer l'¹²⁵I peut être utilisé (rendement minimum 70%).

VII. PREPARATION DES REACTIFS

- Calibrateurs** : Reconstituer le calibrateur zéro avec 2,0 ml d'eau distillée et les autres calibrateurs avec 0,5 ml d'eau distillée.
- Contrôles** : Reconstituer les contrôles avec 0,5 ml d'eau distillée.
- Solution de Lavage** : Préparer un volume adéquat de Solution de Lavage en ajoutant 19 volumes d'eau distillée à 1 volume de Solution de Lavage (20x). Utiliser un agitateur magnétique pour homogénéiser. Eliminer la Solution de Lavage non utilisée à la fin de la journée.

VIII. STOCKAGE ET DATE D'EXPIRATION DES REACTIFS

- Avant l'ouverture ou la reconstitution, tous les composants de la trousse sont stables jusqu'à la date d'expiration, indiquée sur l'étiquette, si la trousse est conservée entre 2 et 8°C.
- Après reconstitution, les calibrateurs et les contrôles sont stables pendant 7 jours entre 2 et 8°C. Pour de plus longues périodes de stockage, des aliquots devront être réalisés et ceux-ci seront gardés à -20°C pendant 3 mois au maximum. Eviter des cycles de congélation et décongélation successifs.
- La Solution de Lavage préparée doit être utilisée le jour même.
- Après la première utilisation, le traceur est stable jusqu'à la date d'expiration, si celui-ci est conservé entre 2 et 8°C dans le flacon d'origine correctement fermé.
- Des altérations dans l'apparence physique des réactifs de la trousse peuvent indiquer une instabilité ou une détérioration.

IX. PREPARATION ET STABILITE DE L'ECHANTILLON

- Les échantillons de sérum doivent être gardés entre 2 et 8°C.
- Si le test n'est pas réalisé dans les 24 heures, un stockage à -20°C est recommandé.
- Eviter des cycles de congélation et décongélation successifs.

X. MODE OPERATOIRE

A. Notes de manipulation

Ne pas utiliser la trousse ou ses composants après avoir dépassé la date d'expiration. Ne pas mélanger du matériel provenant de trousses de lots différents. Mettre tous les réactifs à température ambiante avant utilisation. Mélanger tous les réactifs et les échantillons sous agitation douce. Pour éviter toute contamination croisée, utiliser une nouvelle pointe de pipette pour l'addition de chaque réactif et échantillon. Des pipettes de haute précision ou un équipement de pipetage automatique permettent d'augmenter la précision. Respecter les temps d'incubation. Préparer une courbe de calibration pour chaque nouvelle série d'expériences, ne pas utiliser les données d'expériences précédentes.

B. Mode opératoire

- Identifier les tubes recouverts fournis dans la trousse, en double pour chaque calibrateur, contrôle, échantillon. Pour la détermination de l'activité totale, identifier 2 tubes non recouverts d'anticorps.
- Agiter au vortex brièvement les calibrateurs, les contrôles et les échantillons. Puis distribuer 50 µl de chacun d'eux dans leurs tubes respectifs.
- Distribuer 50 µl de traceur dans chaque tube.
- Agiter légèrement le portoir de tube manuellement pour libérer toute bulle d'air emprisonnée.
- Incuber pendant 2 heures à température ambiante.
- Aspirer (ou décanter) le contenu de chaque tube (à l'exception des tubes utilisés pour la détermination de l'activité totale). Assurez-vous que la pointe utilisée pour aspirer le liquide des tubes atteint le fond de chacun d'eux pour éliminer toute trace de liquide.
- Laver les tubes avec 3 ml de Solution de Lavage (à l'exception des tubes utilisés pour la détermination de l'activité totale) et aspirer. Eviter la formation de mousse pendant l'addition de la Solution de Lavage.
- Aspirer (ou décanter) le contenu de chaque tube (à l'exception des tubes utilisés pour la détermination de l'activité totale).
- Laver les tubes à nouveau avec 3 ml de Solution de Lavage (à l'exception des tubes utilisés pour la détermination de l'activité totale) et aspirer (ou décanter).
- Après le dernier lavage, laisser les tubes droits pendant 2 minutes et aspirer (ou décanter) le reste de liquide.
- Placer les tubes dans un compteur gamma pendant 60 secondes pour quantifier la radioactivité.

XI. CALCUL DES RESULTATS

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

XII. DONNEES TYPES

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

hGH-IRMA		cpm	B/T (%)
Activité totale		126065	100
Calibrateur	0 µIU/ml	241	0,19
	1,0 µIU/ml	1254	0,99
	2,4 µIU/ml	2743	2,18
	8,0 µIU/ml	7817	6,20
	25,5 µIU/ml	19515	15,48
	59,1 µIU/ml	34310	27,22
	119,9 µIU/ml	49965	39,63

XIII. PERFORMANCE ET LIMITES DU DOSAGE

A. Sensibilité

Vingt calibrateurs zéro ont été testés en parallèle avec un assortiment d'autres calibrateurs. La limite de détection, définie comme la concentration apparente située 2 déviations standards au-dessus de la moyenne déterminée à la fixation zéro, était de 0,04 µIU/ml.

B. Spécificité

Des hormones cross-réactives ont été ajoutées à un calibrateur de valeur haute en hGH et à un calibrateur de valeur basse. La réponse hGH apparente a été mesurée.

Hormone ajoutée	hGH CAL 1 µIU/ml	hGH CAL 5 µIU/ml
-	0,60	65
hCG 300000 mIU/ml	0,63	63
hPL 50000 ng/ml	0,69	68
PRL 2000 ng/ml	1,35	63

Note : Cette table indique la réactivité croisée pour la hGH-IRMA.

C. Précision

INTRA-ESSAI				INTER-ESSAI			
Sérum	N	<X> ± SD (µIU/ml)	CV (%)	Sérum	N	<X> ± SD (µIU/ml)	CV (%)
A	6	6,7 ± 0,3	4,4%	A	20	3,8 ± 0,3	8,1%
B	6	19,0 ± 0,2	1,0%	B	20	17,9 ± 1,2	6,7%

SD : Déviation Standard; CV: Coefficient de variation

D. Exactitude

TEST DE RECUPERATION

Echantillon	hGH ajoutée (µIU/ml)	hGH récupérée (µIU/ml)	Récupération (%)
Serum 1	5	5,1	102%
	10	9,5	95%
	25	24,7	99%
	50	53,7	107%
Serum 2	60	63	105%
	40	46,8	117%
	20	22,1	111%
	10	10,2	102%
	5	4,8	96%

Facteur de conversion:

1µIU de la préparation du calibrateur hGH-IRMA = 0,33 ng

TEST DE DILUTION

Echantillon	Dilution	Concent. théorique (µIU/ml)	Concent. Mesurée (µIU/ml)
Serum 1	1/1	-	35,6
	1/2	17,8	17,4
	1/4	8,9	8,8
	1/8	4,5	5,0
	1/16	2,2	2,4
	1/32	1,1	1,2

L' échantillon a été dilué avec le calibrateur zéro.

E. Délai entre la distribution du dernier calibrateur et celle de l'échantillon

Comme montré ci-dessous, les résultats d'un essai restent précis même quand un échantillon est distribué 30 minutes après que le calibrateur a été ajouté aux tubes avec l' anticorps.

DELAI			
Echantillon	0'	15'	30'
Serum 1	4,4	4,5	4,8
Serum 2	18,8	18,1	19,3
Serum 3	27,6	26,2	27,0
Serum 4	36,5	36,8	36,6

F. Effet crochet

Un échantillon dopé avec du hGH jusqu'à 4000 µIU/ml donne des cpm supérieurs au dernier point de calibration.

XIV. LIMITATIONS

- Les échantillons de patients ayant reçu des préparations d'anticorps monoclonaux de souris pour un diagnostic ou comme traitement peuvent contenir des anticorps humains anti-souris (HAMA). De tels échantillons peuvent montrer des valeurs soit faussement élevées soit faussement basses lorsqu'ils sont analysés avec des trousse d'analyses utilisant des anticorps monoclonaux de souris.
- Des anticorps hétérophiles dans le sérum humain peuvent réagir avec le réactif immunoglobulines, interférant ainsi avec les méthodes d'analyse immunologiques in vitro.

Les patients couramment en contact avec des animaux ou des produits de sérum animal peuvent être sujets à ces interférences. Des valeurs anormales peuvent être observées en cas de présence d'anticorps hétérophiles. Évaluer soigneusement les résultats des patients suspectés d'avoir ces anticorps.

Si les résultats ne sont pas cohérents avec les autres observations cliniques, des informations supplémentaires doivent être demandées avant de poser le diagnostic.

XV. CÔNTROLE QUALITE INTERNE

- Si les résultats obtenus pour le(s) contrôle(s) 1 et/ou 2 ne sont pas dans l'intervalle spécifié sur l'étiquette du flacon, les résultats ne peuvent pas être utilisés à moins que l'on ait donné une explication satisfaisante de la non-conformité.
- Chaque laboratoire est libre de faire ses propres stocks d'échantillons contrôles, lesquels doivent être congelés aliquotés.
- Les critères d'acceptation pour les écarts des valeurs in duplo des échantillons doivent être basés sur les pratiques de laboratoire courantes.

XVI. VALEURS ATTENDUES

Les valeurs sont donnés à titre d' information; chaque laboratoire doit établir ses propres écarts de valeurs.

Chez les sujets normaux, la sécrétion de l'hormone de croissance (hGH) est pulsatile. Durant la journée, le domaine des concentrations en hGH est <0,2-10 µIU/ml. Pendant le sommeil, les concentrations en hGH augmentent constamment (± 30 µIU/ml).

La sécrétion en hGH est fortement stimulée par le sport et le stress (ponction veineuse, hypoglycémie, ...), mais décroît en hyperglycémie.

Chez les sujets normaux (n=34), deux heures après une prise orale de glucose (75 g pour les adultes), les taux en hGH étaient inférieurs à 10 µIU/ml et la réponse hGH aux tests de stimulation (administration d'insuline, arginine, glucagon) excédait 20 µIU/ml.

Les taux en hGH étaient élevés (même après prise de glucose) en acromégalie

(> 10 µIU/ml).

En déficience de hGH, la réponse aux tests de stimulation est absente ou faible (petite taille par déficience en hGH; hypopituitarisme de différentes origines).

XVII. PRECAUTIONS ET AVERTISSEMENTS

Sécurité

Pour utilisation en diagnostic *in vitro* uniquement.

Cette trousse contient de ^{125}I (demi-vie: 60 jours), une matière radioactive émettant des rayonnements ionisants X (28 keV) et γ (35.5 keV).

Ce produit radioactif peut uniquement être reçu, acheté, possédé ou utilisé par des personnes autorisées; l'achat, le stockage, l'utilisation et l'échange de produits radioactifs sont soumis à la législation du pays de l'utilisateur final. Ce produit ne peut en aucun cas être administré à l'homme ou aux animaux.

Toutes les manipulations radioactives doivent être exécutées dans un secteur désigné, éloigné de tout passage. Un journal de réception et de stockage des matières radioactives doit être tenu à jour dans le laboratoire. L'équipement de laboratoire et la verrerie, qui pourrait être contaminée avec des substances radioactives, doivent être isolés afin d'éviter la contamination croisée de plusieurs isotopes.

Toute contamination ou perte de substance radioactive doit être réglée conformément aux procédures de radio sécurité. Les déchets radioactifs doivent être placés de manière à respecter les réglementations en vigueur. L'adhésion aux règles de base de sécurité concernant les radiations procure une protection adéquate.

Les composants de sang humain inclus dans ce kit ont été évalués par des méthodes approuvées par l'Europe et/ou la FDA et trouvés négatifs pour HBsAg, l'anti-HCV, l'anti-HIV-1 et 2. Aucune méthode connue ne peut offrir l'assurance complète que des dérivés de sang humain ne transmettront pas d'hépatite, le sida ou toute autre infection. Donc, le traitement des réactifs ou des échantillons de sérum devront être conformes aux procédures locales de sécurité.

Tous les produits animaux et leurs dérivés ont été collectés d'animaux sains. Les composants bovins proviennent de pays où l'ESB n'a pas été détectée. Néanmoins, les composants contenant des substances animales devront être traités comme potentiellement infectieux.

L'azide de sodium est nocif s'il est inhalé, avalé ou en contact avec la peau (l'azide de sodium est utilisé comme agent conservateur). L'azide dans cette trousse pouvant réagir avec le plomb et le cuivre dans les canalisations et donner des composés explosifs, il est nécessaire de nettoyer abondamment à l'eau le matériel utilisé.

Ne pas fumer, ni boire, ni manger ni appliquer de produits cosmétiques dans les laboratoires où des produits radioactifs sont utilisés. Ne pas pipeter avec la bouche. Utiliser des vêtements protecteurs et des gants à usage unique.

XVIII. BIBLIOGRAPHIE

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

- CROWLEY S. et al. (1995)
Growth and the growth hormone axis in prepubertal children with asthma.
J. Pediatr. 126(2): 297-303.
- KELLY JT. et al. (1993)
Effect of different oral oestrogen formulations on insulin-like growth factor I, growth hormone and growth hormone binding protein in post-menopausal women.
Clin. Endocrinol. 39(5) : 561-567

XIX. RESUME DU PROTOCOLE

	ACTIVITE TOTALE (ml)	CALIBRATEURS (ml)	ECHANTILLON(S) CONTROLES (ml)
Calibrateurs (0-6)	-	0,05	-
Echantillons, Contrôles	-	-	0,05
Traceur	0,05	0,05	0,05
Incubation	2 heures à température ambiante		
Séparation	-	Aspiration	
Solution de Lavage	-	3,0	
Séparation	-	Aspiration	
Solution de Lavage	-	3,0	
Séparation	-	Aspiration	
Comptage	Temps de comptage des tubes: 60 secondes		

Lees het hele protocol vóór gebruik.

hGH-IRMA

I. BEOOGD GEBRUIK

Immunoradiometrische testkit voor de in vitro kwantitatieve bepaling van humaan groeihormoon (hGH) in serum.

II. ALGEMENE INFORMATIE

- A. Gedeponoerd handelsmerk:** DIASource hGH-IRMA kit
- B. Catalogusnummer:** KIP1081: 96 testen
- C. Geproduceerd door:** DIASource ImmunoAssays S.A.
Rue du Bosquet, 2, B-1348 Louvain-la-Neuve, België.

Voor technische assistentie of voor bestelinformatie kunt u contact opnemen met:

Tel.: +32 (0)10 84 99 11 - Fax: +32 (0)10 84 99 91

III. KLINISCHE ACHTERGROND

A. Biologische activiteiten van hGH

hGH is een polipeptide hormoon (moleculair gewicht 21,500 Da) geproduceerd door de acidofiele cellen van het anterieure deel van de hypofyse onder controle van twee hoofdstoffen van de middenkwab: Groeihormoon Vrijstellingsfactor (GRF) en een inhiberende agent, somatostatine. Dopaminergische, adrenergische en serotonergische neuro-endocriene pathways spelen ook een belangrijke rol in de controle van de secretie van hGH. Excitatorische stimuli van de secretie van hGH omvatten hypoglycemie, beweging, vasten, maaltijden met een hoog proteïnegehalte, diepe slaap, stress, L Dopa, aminozuren, etc. Inhibitorische stimuli omvatten glucose, cortisol, hGH en vrije vetzuren. Door zijn korte plasma halfleven (± 25 minuten) en door de frequente excitatorische of inhibitorische stimuli, vertoont hGH frequente en grote concentratievariëaties in serum.

Eén van de belangrijkste fysiologische functies van hGH is zijn werking op de lever en andere weefsel voor de productie van Somatomedines, die op hun beurt de groei induceren door directe werking op doelweefsels. In tegenstelling tot hGH, wordt de concentratie van somatomedine in serum stabiel gehouden daar het grotendeels gebonden is aan circulerende plasmaproteïnen.

B. Klinische toepassing van hGH-IRMA

· ***Groeivertraging***

Hyposecretie van hGH is een van de verscheidene oorzaken van een kleine gestalte bij kinderen. De meting van serum hGH met een zeer gevoelige test, zeker als die een provocatieve stimulus volgt (afwezigheid van respons), is een belangrijke manier om deze diagnose tot stand te brengen omdat deze groep patiënten behandeld kan worden door de toediening van hGH.

· ***Hypopituitarisme***

Serum hGH bepalingen zijn ook een aanwijzing van het functioneren van de hypofyse als hypopituitarisme (hetzij idiopathisch, hetzij te wijten aan een tumor of chirurgie) wordt vermoed.

· ***Gigantisme and acromegalie***

Serum hGH bepalingen zijn een belangrijke manier om de diagnose te stellen van hypersecretie van hGH ten gevolge van een acidofiele hypofysetumor, zeker als ze volgen op een provocatieve inhibitorische test (afwezigheid van respons). Dit resulteert in gigantisme bij kinderen en acromegalie bij volwassenen. Beide ziekten kunnen behandeld worden met chirurgie of bestraling.

IV. BESCHRIJVING VAN DE METHODE

hGH-Irma van DIASource is een immunoradiometrische bepaling die gebaseerd is op een scheiding aan de hand van een gecoate buis. Mabs1, de invangantilichamen, zijn onderaan aan het binnenoppervlak van de plastic buis gehecht. Kalibrators of monsters die toegevoegd worden aan de buizen zullen aanvankelijk een lage affiniteit vertonen voor Mabs1. Toevoeging van Mab2, het signaalgenererend antilichaam dat gelabeld werd met ¹²⁵I, zal het systeem vervolledigen en de immunologische reactie teweegbrengen. Na de wasfase geeft de overblijvende radioactiviteit, gebonden aan de buis, de antigeenconcentratie weer.

V. GELEVERDE REAGENTIA

Reagentia	Kit met 96 testen	Kleur-code	Reconstitutie
U buizen gecoat met anti-hGH (monoklonale antilichamen)	2 x 48	wit	Klaar voor gebruik
Ab ¹²⁵ I TRACER: Anti-hGH (monoklonale antilichamen) gelabeld met ¹²⁵ jood in fosfaat buffer met bovien serumalbumine, azide (< 0,1%) en een inerte rode kleurstof	1 flacon 5,5 ml 350 kBq	rood	Klaar voor gebruik
CAL 0 Nulkalibrator in humaan plasma met thymol	1 vial gevries- droogd	geel	2 ml gedestilleerd water toevoegen
CAL N Kalibrator - N = 1 tot 6 (raadpleeg de flaconetiketten voor de exacte waarden) in humaan plasma met thymol	6 flacons, gevries- droogd	geel	0,5 ml gedestilleerd water toevoegen
WASH SOLN CONC Wasoplossing (NaCl, Tween 20)	1 flacon 40 ml	bruin	20 x met gedestilleerd water verdunnen (gebruik een magnetische roerder).
CONTROL N Controles - N = 1 of 2 in humaan plasma met thymol	2 flacons, gevries- droogd	zilver	0,5 ml gedestilleerd water toevoegen

Opmerking: Gebruik Nulkalibrator voor monsterverdunningen .
1 µIU van de kalibratorbereiding is gelijk aan 1 µIU NIBSC 2nd IS 98/574.

VI. NIET MEEGELEVERDE MATERIALEN

De volgende materialen zijn noodzakelijk maar worden niet meegeleverd met de kit:

- Gedestilleerd water.
- Pipetten voor een volume van 50 µl, 500 µl en 2 ml (het gebruik van nauwkeurige pipetten met plastic wegwerptips wordt aanbevolen).
- Automatische spuit van 5 ml (type Cornwall) voor de wasfase.
- Afzuigstelsysteem (facultatief).
- Vortexmenger.
- Magnetische roerder.
- Een gammateller die geschikt is voor de bepaling van ¹²⁵I (rendement van ten minste 70%).

VII. BEREIDING VAN HET REAGENS

- Kalibrators:** Reconstitueer de nulkalibrator met 2,0 ml gedestilleerd water en de andere kalibrators met 0,5 ml gedestilleerd water.
- Controles:** Reconstitueer de controles met 0,5 ml gedestilleerd water.
- Werk-wasoplossing:** Bereid een voldoende hoeveelheid werk-wasoplossing door 19 eenheden gedestilleerd water toe te voegen aan 1 eenheid wasoplossing (20 x).
Gebruik een magnetische roerder voor de homogenisering. Op het eind van de dag moet de ongebruikte werk-wasoplossing afgevoerd worden.

VIII. OPSLAG EN VERVALDATUM VAN REAGENTIA

- Vóór opening of reconstitutie zijn alle kitcomponenten houdbaar tot de vervaldatum, zoals vermeld op het etiket, indien zij bewaard werden bij 2 tot 8°C.
- Na reconstitutie zijn de kalibrators en de controles gedurende 7 dagen houdbaar bij 2 tot 8°C. Voor een langere bewaartermijn moeten aliquots gemaakt worden, die bij -20°C bewaard moeten worden voor maximaal 3 maanden. Vermijd opeenvolgende cycli van bevriezen en ontdooien
- Een vers bereide werk-wasoplossing moet op dezelfde dag nog gebruikt worden.
- Na het eerste gebruik is de tracer houdbaar tot de vervaldatum, indien bewaard bij 2 tot 8°C in de oorspronkelijke, goed afgesloten flacon.
- Wijzigingen in het fysieke aspect van kitreagentia kunnen wijzen op instabiliteit of op een kwaliteitsvermindering.

IX. MONSTERAFFNAME EN MONSTERBEREIDING

- Serum moet bij 2 tot 8°C bewaard worden.
- Indien de bepaling niet binnen 24 uur uitgevoerd wordt, dan wordt aanbevolen om ze bij -20°C te bewaren.
- Vermijd opeenvolgende cycli van bevriezen en ontdooien

X. PROCEDURE

A. Opmerkingen bij de procedure

Gebruik de kit of de componenten niet langer dan de aangegeven vervaldatum. Materialen van kits van verschillende loten mogen niet gemengd worden. Laat alle reagentia op kamertemperatuur komen vóór gebruik.
Meng alle reagentia en monsters goed door ze voorzichtig te bewegen of door er voorzichtig mee te draaien. Om kruisbesmetting te vermijden, moet een propere wegwerpbaar pipettip gebruikt worden voor toevoeging van elk reagens en monster.
Pipetten met een grote precisie of geautomatiseerde pipetteerapparatuur zullen de precisie verhogen. Respecteer de incubatietijden.
Bereid een kalibratiecurve voor elke run; men mag geen gegevens gebruiken van voorafgaande runs.

B. Procedure

- Etiket de gecoate buisjes in duplo voor elke kalibrator, voor elk monster, voor elke controle. Etiket 2 normale buizen voor de bepaling van de totaal tellingen.
- Vortex de kalibrators, monsters en controles gedurende korte tijd en pipetteer 50 µl van elk in de desbetreffende buis.
- Pipetteer 50 µl van de tracer in elke buis.
- Schud het rek met de buizen voorzichtig met de hand zodat eventueel ingesloten luchtballen vrijkomen.
- Incubeer gedurende 2 uur bij kamertemperatuur.
- Zuig de inhoud van elke buis (met uitzondering van de totaal tellingen) op (of giet het over). Zorg ervoor dat de plastic tip van de aspirator tot aan de bodem van de gecoate buis komt zodat alle vloeistof verwijderd wordt.
- Was de buizen met 3 ml werk-wasoplossing (met uitzondering van de totaal tellingen). Vermijd schuimvorming tijdens toevoeging van de werk-wasoplossing.
- Zuig de inhoud van elke buis (met uitzondering van de totaal tellingen) op (of decanteer).
- Was de buizen nogmaals met 3 ml werk-wasoplossing (met uitzondering van de totaal tellingen) en zuig op (of decanteer).
- Na de laatste wasfase moeten de buizen gedurende twee minuten rechtop blijven staan en zuig daarna de overblijvende vloeistof op.
- Tel de buizen in een gammateller gedurende 60 seconden.

XI. BEREKENING VAN DE RESULTATEN

- Bereken het gemiddelde voor de bepalingen in duplo.
- Zet de cpm (ordinaat) uit voor elke kalibrator tegen de overeenkomstige hGH -concentratie (abscis) op semi-logaritmisch of lineair millimeterpapier en teken een kalibratiecurve door de kalibratiepunten, waarbij de duidelijke uitschieters verworpen worden.
- Lees door interpolatie de concentratie voor elke controle en voor elk monster op de kalibratiecurve.
- Door computergestuurde gegevensreductie worden deze berekeningen vereenvoudigd.
Indien de resultaten automatisch verwerkt worden, wordt de 4 parameter logistische functie aanbevolen voor de gepaste curve.

XII. KENMERKENDE GEGEVENS

De volgende gegevens dienen enkel ter illustratie en mogen in geen geval gebruikt worden ter vervanging van de real time kalibratiecurve.

hGH-IRMA		cpm	B/T (%)
Totaaltelling		126065	100
Kalibrator	0 µIE/ml	241	0,19
	1,0 µIE/ml	1254	0,99
	2,4 µIE/ml	2743	2,18
	8,0 µIE/ml	7817	6,20
	25,5 µIE/ml	19515	15,48
	59,1 µIE/ml	34310	27,22
	119,9 µIE/ml	49965	39,63

XIII. EIGENSCHAPPEN EN GRENZEN

A. Detectielimiet

Twintig nulkalibrators werden bepaald, samen met een reeks andere kalibrators. De detectielimiet, omschreven als de schijnbare concentratie van twee standaarddeviaties boven de gemiddelde tellingen bij nulbinding, bedroeg 0,04 µIE/ml.

B. Specificiteit

Kruisreagerende hormones werden toegevoegd aan kalibrators met lage en hoge waarden. De schijnbare respons van hGH werd gemeten.

Toegevoegd hormoon	hGH CAL 1 µIE/ml	hGH CAL 5 µIE/ml
-	0,60	65
hCG 300000 mIU/ml	0,63	63
hPL 50000 ng/ml	0,69	68
PRL 2000 ng/ml	1,35	63

Nota : deze tabel toont de kruisreactiviteit voor de hGH-IRMA.

C. Precisie

BINNEN EEN TEST				TUSSEN TESTEN			
Serum	N	<X> ± SD (µIE/ml)	VC(%)	Serum	N	<X> ± SD (µIE/ml)	VC (%)
A	6	6,7 ± 0,3	4,4%	A	20	3,8 ± 0,3	8,1%
B	6	19,0 ± 0,2	1,0%	B	20	17,9 ± 1,2	6,7%

SD: standaarddeviatie; VC: variatiecoëfficiënt

D. Nauwkeurigheid

RECOVERY –TEST

Monster	Toegevoegd hGH (µIE/ml)	Recovery van hGH (µIE/ml)	Recovery (%)
Serum 1	5	5,1	102%
	10	9,5	95%
	25	24,7	99%
	50	53,7	107%
Serum 2	60	63	105%
	40	46,8	117%
	20	22,1	111%
	10	10,2	102%
	5	4,8	96%

Conversiefactor :

1µIU hGH-IRMA Kalibrator = 0,33 ng

VERDUNNINGSTEST

Monster	Verdunning	Theoretische concentratie (µIE/ml)	Concentratie die bepaald werd (µIE/ml)
Serum 1	1/1	-	35,6
	1/2	17,8	17,4
	1/4	8,9	8,8
	1/8	4,5	5,0
	1/16	2,2	2,4
	1/32	1,1	1,2

Het staal is verdund met Nulkalibrator.

F. Tijdsprent tussen de laatste kalibrator en distributie van het monster
Zoals hieronder weergegeven wordt, blijven de resultaten van de bepaling nauwkeurig, zelfs wanneer een monster 30 minuten na toevoeging van de kalibrator in de gecoate buizen gepipetteerd wordt.

TIJDSPANNE			
Monster	0'	15'	30'
Serum 1	4,4	4,5	4,8
Serum 2	18,8	18,1	19,3
Serum 3	27,6	26,2	27,0
Serum 4	36,5	36,8	36,6

G. "Hook"-effect

Een monster, dat met hGH gespiked werd tot 4000 µIE/ml, levert hogere tellingen op dan het laatste kalibratiepunt.

XIV. BEPERKINGEN

- Specimens van patiënten die voor de diagnose of behandeling preparaten hebben gekregen van monoklonale antilichamen van muizen kunnen humane anti-muis-antilichamen (HAMA) bevatten. Dergelijke specimens kunnen ofwel vals-verhoogde of vals-verlaagde waarden vertonen wanneer ze met testkits worden getest waarbij gebruik wordt gemaakt van monoklonale antilichamen van muizen.
- Heterofiele antilichamen in humaan serum kunnen reageren met reagensimmunoglobulinen, wat een effect kan hebben op in vitro immunoassays. Patiënten die regelmatig aan dieren of dierlijke serumproducten worden blootgesteld, kunnen vatbaar zijn voor een dergelijk effect, terwijl afwijkende waarden kunnen worden waargenomen wanneer heterofiele antilichamen aanwezig zijn. Beoordeel de resultaten zorgvuldig van patiënten van wie vermoed wordt dat ze deze antilichamen hebben. Als de resultaten niet overeenstemmen met andere klinische waarnemingen moet bijkomende informatie worden verkregen voordat de diagnose wordt gesteld.

XV. INTERNE KWALITEITSCONTROLE

- Indien de resultaten, die verkregen werden voor controle 1 en/of controle 2, niet binnen het bereik vallen zoals vermeld op het flaconetiket, dan mogen de resultaten niet gebruikt worden tenzij een bevredigende uitleg gegeven wordt voor de discrepantie.
- Indien gewenst, kan elk laboratorium zijn eigen pools voor controlemonsters maken, die dan in aliquots bewaard moeten worden in de diepvriezer.
- Aanvaardingscriteria voor het verschil tussen de resultaten in duplo van monsters moeten steunen op gangbare laboratoriumpraktijken.

XVI. REFERENTIE-INTERVALS

Deze waarden worden slechts als leidraad gegeven; elk laboratorium moet zijn eigen normaal bereik van waarden uitmaken. Bij normale subjecten is de secretie van groeihormoon (hGH) pulsatieel. Overdag gaan hGH concentraties van <0,2-10 µIE/ml. Tijdens de slaap stijgen de hGH concentraties consequent (± 30 µIE/ml).

hGH secretie wordt sterk gestimuleerd door beweging en stress (aderpunctie, hypoglycemie, ...), maar vermindert onder invloed van hyperglycemie.

Bij normale subjecten (n=34), waren de hGH niveaus twee uur na orale opname van glucose (75 g in adults), lager dan 10 µIE/ml en de hGH respons op stimulatietests (toediening van insuline, arginine, glucagon) oversteeg 20 µIE/ml. De hGH niveaus waren verhoogd (zelfs na toediening van glucose) bij acromegalie (> 10 µIU/ml).

Bij hGH deficiëntie is de respons op stimulatietests afwezig of beknot (korte gestalte door hGH deficiëntie; hypopituitarisme van verscheidene oorsprong).

XVII. VOORZORGSMAATREGELEN EN WAARSCHUWINGEN

Veiligheid

Uitsluitend voor in vitro diagnosegebruik.

Deze kit bevat ¹²⁵I (halfwaardetijd: 60 dagen), dat ioniserende X- (28 keV) en γ-stralen (35.5 keV) uitzendt.

Dit radioactieve product mag enkel overhandigd worden aan en gebruikt worden door bevoegd personeel; ontvangst, opslag, gebruik en overdracht van radioactieve producten zijn onderworpen aan de wetgeving van het land van de eindgebruiker. In geen geval mag het product toegediend worden aan mensen of dieren.

Alle handelingen met radioactief materiaal moeten plaatsvinden in een daartoe bestemde ruimte, waar uitsluitend bevoegd personeel toegelaten wordt. Een logboek met ontvangst en opslag van radioactieve materialen moet worden bijgehouden in het laboratorium. Laboratoriumapparatuur en glaswerk, dat eventueel gecontamineerd werd met radioactieve bestanddelen, moeten worden gesegregeerd om kruisbesmetting van verschillende radioisotopen te vermijden.

Als radioactief materiaal gemorst werd, dan moet dat onmiddellijk gereinigd worden in overeenstemming met de procedure voor stralingsveiligheid. Het radioactieve afval moet worden weggegooid in overeenstemming met de plaatselijke voorschriften en richtlijnen van de autoriteiten waaronder het laboratorium valt. Naleving van de basisregels van stralingsveiligheid zorgt voor een juiste bescherming.

De componenten, afkomstig van menselijk bloed, in deze kit werden getest door in Europa goedgekeurde en/of door de Amerikaanse FDA goedgekeurde methoden op aanwezigheid van HBsAg, anti-HCV, anti-HIV-1 en 2 en gaven een negatief resultaat. Geen enkele bekende methode kan echter volledige garantie bieden dat derivaten van menselijk bloed geen hepatitis, aids of andere infecties overdragen. Daarom moet men reagentia of serum plasmamonsters behandelen in overeenstemming met de plaatselijke veiligheidsprocedures.

Alle producten en derivaten van dierlijke oorsprong zijn afkomstig van gezonde dieren. Boviene componenten komen uit landen waar BSE niet gerapporteerd werd. Toch moeten componenten die bestanddelen van dierlijke oorsprong bevatten, behandeld worden als potentieel infectieus materiaal.

Vermijd dat de reagentia (natriumazide als conserveermiddel) in contact komen met de huid. Azide in deze kit kan reageren met lood en koper in de afvoerleidingen en op die manier zeer explosieve metaalaziden vormen. Tijdens de wasfase moeten de afvoerleidingen ruimschoots met water nagespoeld worden om ophoping van azide te vermijden.

Niet roken, drinken, eten of cosmetica aanbrengen in de werkruimte. Niet met de mond pipetteren. Draag beschermende kleding en gebruik wegwerphandschoenen.

XVIII. BIBLIOGRAFIE

- CAMANNI F., MASSARA F., BELFORTE L., ROSATELLO A., MOLENATTI G.M. (1977)
Effect of dopamine on plasma growth hormone and prolactin levels in normal and acromegalic subjects.
J. Clin. Endo. and Metab., 44:465.
- DAUGHADAY W.H. (1981)
The adenohypophysis
In : "Textbook of Endocrinology", R.H. Williams ed., W.B. Saunders, Philadelphia, p;73.
- DROBNY E.C., AMBURN K., BAUMANN G. (1983)
Circadian variation of basal plasma growth hormone in man.
J. Clin. Endo. and Metab., 57:524-528.
- HASHIDA S., NAKAWAGA K., ISHIKAWA E., OHTAKI S. (1985)
Basal level of human growth hormone (hGH) in normal serum.
Clin. Chim. Acta, 151:185-186.

- LEWIS V.J. et al. (1980)
Human growth hormone : A complex of proteins.
Rec. Progr. Horm. Res., 36:488.
- LI C.H. (1974)
Human growth hormone : perspective on its chemistry and physiology.
In : "Advances in human growth hormone research", S. Raiti ed. U.S. Department of Health, Education and Welfare Publ. DMEW publ. no. (NJH) 74-612, p. 321.
- REUTENS AT. (1995)
Evaluation and application of a highly sensitive assay for serum growth hormone (GH) in the study of adult GH deficiency.
J. Clin. Endocrinol. Metab., 80(2): 480-485
- CROWLEY S. et al. (1995)
Growth and the growth hormone axis in prepubertal children with asthma.
J. Pediatr. 126(2): 297-303.
- KELLY JT. et al. (1993)
Effect of different oral oestrogen formulations on insulin-like growth factor I, growth hormone and growth hormone binding protein in post-menopausal women.
Clin. Endocrinol. 39(5) : 561-567

XIX. SAMENVATTING VAN HET PROTOCOL

	TOTAAL-TELLINGEN (ml)	KALIBRATORS (ml)	MONSTER(S) CONTROLES (ml)
Kalibrators (0 -6) Monsters, Controles Tracer	- - 0,05	0,05 - 0,05	- 0,05 0,05
Incubatie	2 uur bij kamertemperatuur		
Scheiding Werk-wasoplossing Scheiding Werk-wasoplossing Scheiding	- - - - -	opzuigen (of overgieten) 3,0 opzuigen (of overgieten) 3,0 opzuigen (of overgieten)	
Telling	Tel de buisjes gedurende 60 seconden		

Vor Gebrauch des Kits lesen Sie bitte diese Packungsbeilage.

hGH-IRMA

I. VERWENDUNGSZWECK

Ein Radio-Immunoassay für die quantitative *in vitro* Bestimmung von humanem Wachstumshormon (hGH) in Serum.

II. ALLGEMEINE INFORMATION

- A. **Handelsbezeichnung :** DIAsource hGH-IRMA Kit
- B. **Katalognummer :** KIP1081 : 96 Tests
- C. **Hergestellt von:** DIAsource ImmunoAssays S.A.
Rue du Bosquet, 2, B-1348 Louvain-la-Neuve, Belgien.

Für technische Unterstützung oder Bestellungen wenden Sie sich bitte an:

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

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

E-mail Ordering : ordering@diasource.be

III. KLINISCHER HINTERGRUND

A. Biologische Aktivität von hGH

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

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

B. Klinische Anwendung der hGH-Bestimmung

· **Minderwuchs**

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

· **Hypopituitarismus**

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


· **Gigantismus und Akromegalie**

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

IV. GRUNDSÄTZLICHES ZUR DURCHFÜHRUNG

Der DIASource hGH-IRMA ist ein Radioimmuno-Assay in beschichteten Röhrchen. Mabs1, die Fänger-Antikörper, haften an der unteren inneren Oberfläche des Plastikröhrchens. In die Röhrchen zugegebene Kalibratoren oder Proben zeigen zuerst eine niedrige Affinität zu Mabs1. Zugabe von Mab2, das mit ¹²⁵I markierten Signalantikörpers, vervollständigt das System und triggert die immunologische Reaktion. Nach dem Waschen gibt die verbleibende, an den Röhrchen haftende Radioaktivität die Antigenkonzentration wieder.

V. MITGELIEFERTE REAGENZIEN

Reagenzien	96 Test Kit	Farb Code	Rekonstitution			
 Mit anti hGH- beschichtete Röhrchen (monoklonale Antikörper)	2 x 48	Weiß	gebrauchsfertig			
<table border="1" data-bbox="108 678 244 712"><tr><td>Ab</td><td>¹²⁵I</td></tr></table> TRACER: ¹²⁵ Iodmarkierter Anti-hGH (monoklonale Antikörper) in Phosphatpuffer mit Rinderserumalbumin, Azid (<0,1%) und inertem roten Farbstoff	Ab	¹²⁵ I	1 Gefäß 5,5 ml 350 kBq	Rot	gebrauchsfertig	
Ab	¹²⁵ I					
<table border="1" data-bbox="108 846 231 880"><tr><td>CAL</td><td>0</td></tr></table> Null Kalibrator in Humanplasma mit Thymol	CAL	0	1 Gefäß lyophil.	gelb	2 ml dest. Wasser zugeben	
CAL	0					
<table border="1" data-bbox="108 958 231 992"><tr><td>CAL</td><td>N</td></tr></table> Kalibrator - N = 1 to 6 (genaue Werte auf Gefäß-Etiketten) in Humanplasma mit Thymol	CAL	N	6 Gefäße lyophil.	gelb	0,5 ml dest. Wasser zugeben	
CAL	N					
<table border="1" data-bbox="76 1093 263 1126"><tr><td>WASH</td><td>SOLN</td><td>CONC</td></tr></table> Waschlösung (NaCl, Tween 20)	WASH	SOLN	CONC	1 Gefäß 40 ml	braun	20 x mit dest. Wasser verdünnen (Magnetrührer benutzen).
WASH	SOLN	CONC				
<table border="1" data-bbox="92 1205 244 1238"><tr><td>CONTROL</td><td>N</td></tr></table> Kontrollen - N = 1 or 2 Humanplasma mit Thymol	CONTROL	N	2 Gefäße lyophil.	silber	0,5 ml dest. Wasser zugeben	
CONTROL	N					

Bemerkung: Benutzen Sie Null Kalibrator zur Probenverdünnung. 1 µIU der Standardzubereitung ist äquivalent zu 1 µIU NIBSC 2nd IS 98/574.

VI. ZUSÄTZLICH BENÖTIGTES MATERIAL

Folgendes Material wird benötigt, wird aber nicht mit dem Kit mitgeliefert:

1. Dest. Wasser
2. Pipetten: 50 µl, 500 µl und 2 ml (Verwendung von Präzisionspipetten mit Wegwerf-Plastikspitzen wird empfohlen)
3. 5 ml automatische Spritze (Cornwall Typ) zum Waschen
4. Absaugsystem (optional)
5. Vortex Mixer
6. Magnetrührer
7. Jegl. Gamma-Counter, der ¹²⁵I messen kann, kann verwendet werden. (minimal Yield 70%)

VII. VORBEREITUNG DER REAGENZIEN

- A. Kalibratoren :** Rekonstituieren Sie den Null Kalibrator mit 2,0 ml dest. Wasser, die anderen Kalibratoren mit 0,5 ml dest. Wasser.
- B. Kontrollen :** Rekonstituieren Sie die Kontrollen mit 0,5 ml dest. Wasser.
- C. Waschlösung:** Bereiten Sie ein angemessenes Volumen Waschlösung aus einem Anteil Waschlösung (20x) mit 19 Anteilen dest. Wasser zu. Verwenden Sie einen Magnetrührer zum gleichmäßigen Durchmischen. Verwerfen Sie die nicht benutzte Waschlösung am Ende des Tages.

VIII. AUFBEWAHRUNG UND LAGERUNG DER REAGENZIEN

- Vor dem Öffnen oder Rekonstitution sind die Reagenzien des Kits bis zum Ablaufdatum (Angaben auf Etikett) bei Lagerung bei 2°C bis 8°C stabil.
- Nach der Rekonstitution sind die Kalibratoren und Kontrollen bei 2°C bis 8°C, 7 Tage stabil. Aliquots müssen bei längerer Aufbewahrung bei -20°C eingefroren werden während max. 3 Monaten. Vermeiden Sie wiederholtes Einfrieren und Auftauen.
- Frisch zubereitete Waschlösung sollte am selben Tag benutzt werden.
- Nach der ersten Benutzung ist der Tracer bei Aufbewahrung im Originalgefäß und bei 2° bis 8° C bis zum Ablaufdatum stabil.
- Veränderungen im Aussehen der Kitkomponenten können ein Anzeichen für Instabilität oder Zerfall sein.

IX. PROBENSAMMLUNG UND -VORBEREITUNG

- Serumproben müssen bei 2-8°C aufbewahrt werden.
- Falls der Test nicht innerhalb von 24 Std. durchgeführt wird, ist die Aufbewahrung bei -20°C erforderlich.
- Vermeiden Sie wiederholtes Einfrieren und Auftauen.

X. DURCHFÜHRUNG

A. Bemerkungen zur Durchführung

Verwenden Sie den Kit oder dessen Komponenten nicht nach Ablaufdatum. Vermischen Sie Materialien von unterschiedlichen Kit Chargen nicht. Bringen Sie alle Reagenzien vor der Verwendung auf Raumtemperatur.

Mischen Sie alle Reagenzien und Proben gründlich durch sanftes Schütteln oder Rühren. Verwenden Sie saubere Wegwerf-Pipettenspitzen, um Kreuzkontamination zu vermeiden.

Präzisionspipetten oder ein automatisches Pipettiersystem erhöhen die Präzision. Achten Sie auf die Einhaltung der Inkubationszeiten.

Erstellen Sie für jeden Durchlauf eine Standardkurve, verwenden Sie nicht die Daten von früheren Durchläufen.

B. Durchführung

1. Beschriften Sie je 2 beschichtete Röhrchen für jeden Kalibrator, jede Probe und Kontrolle. Zur Bestimmung der Gesamtaktivität, beschriften Sie 2 normale Röhrchen.
2. Vortexen Sie Kalibratoren, Proben und Kontrollen kurz und geben Sie jeweils 50 µl in ihre Röhrchen.
3. Geben Sie 50 µl des Tracers in jedes Röhrchen.
4. Schütteln Sie vorsichtig die Halterung mit den Röhrchen um Blasen zu entfernen.
5. Inkubieren Sie 2 Stunden bei Raumtemperatur
6. Saugen Sie den Inhalt jedes Röhrchens ab (oder dekantieren Sie) (außer Gesamtaktivität). Vergewissern Sie sich, dass die Plastikspitze des Absaugers den Boden des beschichteten Röhrchens erreicht, um die gesamte Flüssigkeit zu entfernen.
7. Waschen Sie die Röhrchen mit 3 ml Waschlösung (außer Gesamtaktivität) und saugen Sie ab (oder dekantieren Sie). Vermeiden Sie Schaumbildung bei Zugabe der Waschlösung.
8. Saugen Sie den Inhalt jeden Röhrchens (außer Gesamtaktivität) ab.
9. Waschen Sie die Röhrchen mit 3 ml Waschlösung (außer Gesamtaktivität) und saugen Sie ab (oder dekantieren Sie).
10. Lassen Sie nach dem letzten Waschen die Röhrchen 2 Minuten aufrecht stehen und saugen Sie den verbleibenden Flüssigkeitstropfen ab.
11. Werten Sie die Röhrchen in einem Gamma-Counter 60 Sekunden aus.

XI. BERECHNUNG DER ERGEBNISSE

1. Berechnen Sie den Durchschnitt aus den Doppelbestimmungen.
2. Tragen Sie auf semilogarithmischem oder linearem Millimeterpapier den c.p.m. (Ordinate) für jeden Standard gegen die entsprechende Konzentration hGH (Abszisse) und zeichnen Sie eine Standardkurve durch die Standardpunkte, schließen Sie offensichtliche „Ausreißer“ aus.
3. Berechnen Sie die Konzentration für jede Kontrolle und Probe durch Interpolation aus der Standardkurve.
4. Computergestützte Methoden können ebenfalls zur Erstellung der Kalibrationskurve verwendet werden. Falls die Ergebnisberechnung mit dem Computer durchgeführt wird, empfehlen wir die Berechnung mit einer „4 Parameter“-Kurvenfunktion.

XII TYPISCHE WERTE

Die folgenden Daten dienen nur zu Demonstrationszwecken und können nicht als Ersatz für die Echtzeitstandardkurve verwendet werden.

hGH-IRMA		cpm	B/T (%)
Gesamtaktivität		126065	100
Kalibrator	0 µIU/ml	241	0,19
	1,0 µIU/ml	1254	0,99
	2,4 µIU/ml	2743	2,18
	8,0 µIU/ml	7817	6,20
	25,5 µIU/ml	19515	15,48
	59,1 µIU/ml	34310	27,22
	119,9 µIU/ml	49965	39,63

XIII. LEISTUNGSMERKMALE UND GRENZEN DER METHODIK

A. Nachweisgrenze

Zwanzig Null-Kalibratoren wurden zusammen mit einem Satz anderer Kalibratoren gemessen.

Die Nachweisgrenze, definiert als die scheinbare Konzentration bei zwei Standardabweichungen über dem gemessenen Durchschnittswert bei Nullbindung, entsprach 0,04 µIU/ml.

B. Spezifität

Kreuzreaktive Hormone wurden zu einem minderwertigen und zu einem hochwertigen Kalibrator zugegeben. Das Scheinbare hGH Ergebnis wurde gemessen.

Zugeg. Hormon	hGH CAL 1 µIU/ml	hGH CAL 5 µIU/ml
-	0,60	65
hCG 300000 mIU/ml	0,63	63
hPL 50000 ng/ml	0,69	68
PRL 2000 ng/ml	1,35	63

Bemerkung: Diese Tabelle zeigt die Kreuz-Reaktivität für hGH-IRMA.

C. Präzision

INTRA ASSAY				INTER ASSAY			
Serum	N	<X> ± SD (µIU/ml)	CV (%)	Serum	N	<X> ± SD (µIU/ml)	CV (%)
A	6	6,7 ± 0,3	4,4%	A	20	3,8 ± 0,3	8,1%
B	6	19,0 ± 0,2	1,0%	B	20	17,9 ± 1,2	6,7%

SD : Standardabweichung; CV: Variationskoeffizient

D. Genauigkeit

WIEDERFINDUNGSTEST			
Probe	Zugeg. hGH (µIU/ml)	Wiedergef. hGH (µIU/ml)	Wiedergefunden (%)
Serum 1	5	5,1	102%
	10	9,5	95%
	25	24,7	99%
	50	53,7	107%
Serum 2	60	63	105%
	40	46,8	117%
	20	22,1	111%
	10	10,2	102%
	5	4,8	96%

Umrechnungsfaktor:

1µIU der Standardzubereitung hGH-IRMA = 0,33 ng

VERDÜNNUNGSTEST

Probe	Verdünn.	Theoret. Konz. (µIU/ml)	Gemess. Konz. (µIU/ml)
Serum 1	1/1	-	35,6
	1/2	17,8	17,4
	1/4	8,9	8,8
	1/8	4,5	5,0
	1/16	2,2	2,4
	1/32	1,1	1,2

Die Proben wurden mit Null Kalibrator verdünnt.

E. Zeitverzögerung zwischen letzter Kalibrator- und Probenzugabe

Es wird im folgenden gezeigt, dass die Genauigkeit der Tests selbst dann erhalten bleibt, wenn die Probe 30 Minuten nach Zugabe des Kalibrators in die beschichteten Röhrchen zugefügt wird.

ZEITABSTAND			
Probe	0'	15'	30'
Serum 1	4,4	4,5	4,8
Serum 2	18,8	18,1	19,3
Serum 3	27,6	26,2	27,0
Serum 4	36,5	36,8	36,6

F. Hookeffekt

Eine Probe mit hGH bis zu 4000 µIU/ml liefert höhere Messwerte als der letzte Kalibratorwert.

XIV. ANWENDUNGSGRENZEN

- Proben von Patienten, die Zubereitungen von monoklonalen Maus-Antikörpern zur Diagnose oder Therapie erhalten haben, können humane Anti-Maus Antikörper (HAMA) enthalten. Solche Proben können entweder falsch erhöhte oder zu niedrige Werte ergeben, wenn sie mit Testsystemen getestet werden, die monoklonale Maus Antikörper enthalten.
- Heterophile Antikörper im humanen Serum können mit Immunglobulinen der Reagenzien reagieren und so mit in vitro Immunoassays interferieren. Patienten, die routinemäßigen Umgang mit Tieren oder Tierseren haben, können zu dieser Interferenz neigen und so können anormale Werte in Gegenwart von heterophilen Antikörpern beobachtet werden. Ergebnisse von Patienten, bei denen diese Antikörper vermutet werden, müssen sorgfältig evaluiert werden. Wenn die Ergebnisse nicht mit anderen klinischen Beobachtungen übereinstimmen, sollten weitere Informationen vor der Diagnosestellung ermittelt werden.

XV. INTERNE QUALITÄTSKONTROLLE

- Entsprechen die Ist-Werte nicht den auf den Fläschchen angegebenen Soll-Werten, können die Werte, ohne treffende Erklärung der Abweichungen, nicht weiterverarbeitet werden.
- Falls Extra-Kontrollen erwünscht sind, kann jedes Labor seinen eigenen Pool herstellen, der in Aliquots eingefroren werden sollte.
- Akzeptanzkriterien für die Differenz zwischen den Resultaten der Wiederholungstests anhand der Proben müssen auf Guter Laborpraxis beruhen.

XVI. REFERENZINTERVALLE

Diese Werte sind nur Richtwerte; jedes Labor muss seinen eigenen Normalwertbereich ermitteln.

Bei gesunden Personen erfolgt die hGH-Ausschüttung pulsatil. Tagsüber variiert die hGH-Konzentration von < 0,2 bis 10 µIE/ml. Im Schlaf steigt die hGH-Konzentration kontinuierlich an (± 30 µIE/ml).

Nach sportlichen Aktivitäten oder Stress (Blutentnahme, Hypoglykämie) werden hohe Werte, bei Hyperglykämie niedrige hGH-Spiegel gefunden.

Zwei Stunden nach Glucose-Belastung (75 g bei Erwachsenen) wurden bei gesunden Personen (n = 34) hGH-Spiegel < 10 µIE/ml, nach einem Stimulationstest (Insulin, Arginin, Glucagon) hGH-Spiegel > 20 µIE/ml gefunden.

Patienten mit Akromegalie zeigten selbst nach Glucose-Gabe erhöhte hGH-Werte (> 10 µIU/ml).

Bei hGH-Mangel kann keine oder nur verminderte Erhöhung der hGH-Spiegel nach Stimulation detektiert werden (Minderwuchs durch hGH-Mangel; Hypopituitarismus verschiedener Ursachen).

XVII. VORSICHTMASSNAHMEN UND WARNUNGEN

Sicherheit

Nur für diagnostische Zwecke.

Dieser Kit enthält ¹²⁵I (Halbwertszeit: 60 Tagen), das ionisierende X (28 keV) und γ (35,5 keV) Strahlungen emittiert.

Dieses radioaktive Produkt kann nur an autorisierte Personen abgegeben und darf nur von diesen angewendet werden; Erwerb, Lagerung, Verwendung und Austausch radioaktiver Produkte sind Gegenstand der Gesetzgebung des Landes des jeweiligen Endverbrauchers. In keinem Fall darf das Produkt an Menschen oder Tieren angewendet werden.

Der Umgang mit radioaktiven Substanzen sollte fern von Durchgangsverkehr in einem speziell ausgewiesenen Bereich stattfinden. Ein Logbuch für Protokolle und Aufbewahrung muss im Labor sein. Die Laborausstattung und die Glasbehälter, die mit radioaktiven Substanzen kontaminiert werden können, müssen ausgesondert werden, um Kreuzkontaminationen mit unterschiedlichen Radioisotopen zu verhindern. Verschüttete radioaktive Substanzen müssen sofort den Sicherheitsbestimmungen entsprechend entfernt werden. Radioaktive Abfälle müssen entsprechend den lokalen Bestimmungen und Richtlinien der für das Labor zuständigen Behörden gelagert werden. Das Einhalten der Sicherheitsbestimmungen für den Umgang mit radioaktiven Substanzen gewährleistet ausreichenden Schutz.

Die menschlichen Blutkomponenten in diesem Kit wurden mit europäischen und in USA erprobten FDA Methoden getestet, sie waren negativ für HBsAG, anti-HCV und anti-HIV 1 und 2. Keine bekannte Methode kann jedoch vollkommene Sicherheit liefern, dass menschliche Blutbestandteile nicht Hepatitis, AIDS oder andere Infektionen übertragen. Deshalb sollte der Umgang mit Reagenzien oder Serumproben in Übereinstimmung mit den Sicherheitsbestimmungen erfolgen.

Alle tierischen Produkte und deren Derivate wurden von gesunden Tieren gesammelt. Komponenten von Rindern stammen aus Ländern in denen BSE nicht nachgewiesen wurde.

Trotzdem sollten Komponenten, die tierische Substanzen enthalten, als potenziell infektiös betrachtet werden.

Vermeiden Sie Hautkontakt mit den Reagenzien (Natriumazid als Konservierungsmittel). Das Azid in diesem Kit kann mit Blei oder Kupfer in den Abflussrohren reagieren und so hochexplosive Metallazide bilden. Spülen Sie während der Waschstufen den Abfluss gründlich mit viel Wasser, um die Metallazidbildung zu verhindern.

Bitte rauchen, trinken, essen oder wenden Sie Kosmetika nicht in Ihrem Arbeitsbereich an. Pipettieren Sie nicht mit dem Mund. Verwenden Sie Schutzkleidung und Wegwerfhandschuhe.

XVIII. LITERATUR

1. CAMANNI F., MASSARA F., BELFORTE L., ROSATELLO A., MOLENATTI G.M. (1977)
Effect of dopamine on plasma growth hormone and prolactin levels in normal and acromegalic subjects.
J. Clin. Endo. and Metab., 44:465.
2. DAUGHADAY W.H. (1981)
The adenohypophysis
In : "Textbook of Endocrinology", R.H. Williams ed., W.B. Saunders, Philadelphia, p;73.
3. DROBNY E.C., AMBURN K., BAUMANN G. (1983)
Circadian variation of basal plasma growth hormone in man.
J. Clin. Endo. and Metab., 57:524-528.
4. HASHIDA S., NAKAWAGA K., ISHIKAWA E., OHTAKI S. (1985)
Basal level of human growth hormone (hGH) in normal serum.
Clin. Chim. Acta, 151:185-186.
5. LEWIS V.J. et al. (1980)
Human growth hormone : A complex of proteins.
Rec. Progr. Horm. Res., 36:488.

6. LI C.H. (1974)
Human growth hormone : perspective on its chemistry and physiology.
In : "Advances in human growth hormone research", S. Raiti ed. U.S. Department of Health, Education and Welfare Publ. DMEW publ. no. (NJH) 74-612, p. 321.
7. REUTENS AT. (1995)
Evaluation and application of a highly sensitive assay for serum growth hormone (GH) in the study of adult GH deficiency.
J. Clin. Endocrinol. Metab., 80(2): 480-485
8. CROWLEY S. et al. (1995)
Growth and the growth hormone axis in prepubertal children with asthma.
J. Pediatr. 126(2): 297-303.
9. KELLY JT. et al. (1993)
Effect of different oral oestrogen formulations on insulin-like growth factor I, growth hormone and growth hormone binding protein in post-menopausal women.
Clin. Endocrinol. 39(5) : 561-567

XIX. ZUSAMMENFASSUNG DES PROTOKOLLS

	GESAMT- AKTIVITÄT (ml)	KALIBRA- TOREN (ml)	PROBE(N) KONTROLLEN (ml)
Kalibratoren (0-6) Proben, Kontrollen Tracer	- - 0,05	0,05 - 0,05	- 0,05 0,05
Inkubation	2 Std. bei Raumtemperatur		
Trennung Waschlösung Trennung Waschlösung Trennung	- - - - -	absaugen (oder dekant.) 3,0 absaugen (oder dekant.) 3,0 absaugen (oder dekant.)	
Gamma Counter	60 Sekunden messen		

Prima di utilizzare il kit leggere attentamente le istruzioni per l'uso

hGH-IRMA

I. USO DEL KIT

Kit radioimmunologico per la determinazione quantitativa in vitro dell'ormone della crescita (hGH) umano in siero.

II. INFORMAZIONI DI CARATTERE GENERALE

- A. Nome commerciale:** DIAsource hGH-IRMA Kit
- B. Numero di catalogo:** KIP1081: 96 tests
- C. Prodotto da:** DIAsource ImmunoAssays S.A.
Rue du Bosquet, 2, B-1348 Louvain-la-Neuve, Belgio.

Per informazioni tecniche o su come ordinare il prodotto contattare:

Tel: +32 (0)10 84.99.11

Fax: +32 (0)10 84.99.91

III. INFORMAZIONI CLINICHE

A. Attività biologiche dell'hGH

L'hGH è un ormone polipeptidico (peso molecolare 21.500 Da) prodotto dalle cellule acidofile dell'ipofisi anteriore sotto il controllo delle due sostanze principali provenienti dall'eminenza mediana: il Fattore stimolante l'ormone della crescita (GRF, Growth-hormone Releasing Factor) e l'agente inibitorio Somatostatina. Nel controllo della secrezione di hGH, un ruolo importante viene inoltre attribuito ai circuiti neuroendocrini dopaminergici, adrenergici e serotoninergici. Gli stimoli eccitatori sulla secrezione di hGH includono ipoglicemia, esercizio, digiuno, pasti ad elevato contenuto proteico, sonno profondo, stress, glucagone, L Dopa, aminoacidi, ecc. Viceversa, gli stimoli inibitori includono glucosio, cortisolo, hGH e acidi grassi liberi. A causa della breve emivita plasmatica (± 25 minuti) e degli stimoli frequenti eccitatori o inibitori, le concentrazioni sieriche di hGH variano ampiamente e frequentemente.

Una delle principali funzioni fisiologiche dell'hGH è quella di agire sul fegato e sugli altri tessuti per produrre Somatomedine, che inducono successivamente la crescita per azione diretta sui tessuti bersaglio. A differenza dell'hGH, la concentrazione di somatomedina nel siero viene mantenuta stabile in quanto questa è ampiamente legata alle proteine plasmatiche circolanti.

B. Applicazioni cliniche di hGH-IRMA

Ritardo della crescita

L'iposecrezione dell'hGH è una delle varie cause della bassa statura nei bambini. La misurazione dell'hGH sierico con un test estremamente sensibile, soprattutto dopo uno stimolo provocativo (assenza di risposta), è un importante metodo per stabilire questa diagnosi affinché questo gruppo di pazienti possa essere trattato con la somministrazione di hGH.

Ipipituitarismo

La misurazione dell'hGH rappresenta anche un indice della funzione ipofisaria quando si sospetta una condizione di ipipituitarismo (idiomatico o secondario a neoplasia o chirurgia).


Gigantismo e acromegalia

La misurazione sierica dell'hGH, in particolar modo dopo un test inibitorio provocativo (assenza di risposta), è un metodo importante per stabilire la diagnosi dell'ipersecrezione di hGH da tumore pituitario acidofilo. Questa condizione porta a gigantismo nei bambini e acromegalia negli adulti. Ambedue le condizioni possono essere trattate con la chirurgia o con le radiazioni.

IV. PRINCIPIO DEL METODO

Il kit DIASource hGH-IRMA è un dosaggio immunoradiometrico con separazione coated tube. Gli anticorpi di cattura, Mabs 1, sono adsorbiti sulla superficie interna della parte inferiore di provette di polistirene. Standard e campioni hanno dapprima una bassa affinità per i Mabs 1; l'aggiunta di anticorpi di segnale Mabs 2, marcati con ¹²⁵I, provocano un aumento di affinità per i Mabs 1 e l'inizio della reazione immunologica. Al termine dell'incubazione la radioattività non legata alla fase solida viene allontanata mediante lavaggio. La radioattività residua è direttamente proporzionale alla concentrazione di hGH in standard e campioni.

V. REATTIVI FORNITI

Reattivi	Kit da 96 test	Codice colore	Volume di ricostituzione			
 Provette sensibilizzate con anticorpo anti hGH (anticorpi monoclonali)	2 x 48	Bianco	Pronte per l'uso			
<table border="1" data-bbox="119 741 252 790"> <tr> <td>Ab</td> <td>¹²⁵I</td> </tr> </table> Marcato: anti-hGH (Anticorpi monoclonali) marcati con ¹²⁵ I in tampone fosfato con BSA, sodio azide (<0,1%) e un colorante inerte rosso	Ab	¹²⁵ I	1 flacone 5,5 ml 350 kBq	Rosso	Pronto per l'uso	
Ab	¹²⁵ I					
<table border="1" data-bbox="119 913 252 963"> <tr> <td>CAL</td> <td>0</td> </tr> </table> Calibratore zero in plasma umano contenente timolo	CAL	0	1 vial liofiliz.	Giallo	Aggiungere 2 ml di acqua distillata	
CAL	0					
<table border="1" data-bbox="119 1025 252 1075"> <tr> <td>CAL</td> <td>N</td> </tr> </table> Calibratore 1-6 (le concentrazioni esatte degli calibratore sono riportate sulle etichette dei flaconi), in plasma umano contenente timolo	CAL	N	6 flaconi liofiliz.	Giallo	Aggiungere 0,5 ml di acqua distillata	
CAL	N					
<table border="1" data-bbox="76 1198 320 1247"> <tr> <td>WASH</td> <td>SOLN</td> <td>CONC</td> </tr> </table> Tampone di lavaggio (NaCl, Tween 20)	WASH	SOLN	CONC	1 flacone 40 ml	Marrone	Diluire 20 x con acqua distillata usando un agitatore magnetico
WASH	SOLN	CONC				
<table border="1" data-bbox="97 1368 325 1417"> <tr> <td>CONTROL</td> <td>N</td> </tr> </table> Controlli: N = 1 o 2, in plasma umano contenente timolo	CONTROL	N	2 flaconi liofiliz.	Argento	Aggiungere 0,5 ml di acqua distillata	
CONTROL	N					

Note: Usare zero Calibratore per diluire i campioni.
1 µIU della calibratore preparazione è equivalente a 1 µIU NIBSC 2nd IS 98/574.

VI. REATTIVI NON FORNITI

Il seguente materiale è richiesto per il dosaggio ma non è fornito nel kit.

1. Acqua distillata.
2. Pipette per dispensare 50 µl, 500 µl e 2 ml (Si raccomanda di utilizzare pipette accurate con puntale in plastica monouso).
3. Agitatore tipo vortex.
4. Agitatore magnetico.
5. Pipetta a ripetizione automatica 5 ml per i lavaggi.
6. Sistema di aspirazione dei campioni (facoltativo).
7. Contatore gamma con finestra per ¹²⁵I (efficienza minima 70%)

VII. PREPARAZIONE DEI REATTIVI

- A. **Calibratore:** Ricostituire lo calibratore zero con 2,0 ml di acqua distillata e gli altri calibratore con 0,5 ml di acqua distillata.
- B. **Controlli:** Ricostituire i controlli con 0,5 ml di acqua distillata.
- C. **Soluzione di lavoro del tampone di lavaggio:** Preparare la quantità necessaria di soluzione di lavoro del tampone di lavaggio aggiungendo 19

parti di acqua distillata ad una parte di tampone di lavaggio concentrato (20 x). Usare un agitatore magnetico per rendere la soluzione omogenea. La soluzione di lavoro va scartata al termine della giornata.

VIII. CONSERVAZIONE E SCADENZA DEI REATTIVI

- I reattivi non utilizzati sono stabili a 2-8°C fino alla data riportata su ciascuna etichetta.
- Dopo ricostituzione, calibratore e controlli sono stabili 7 giorni a 2-8°C e, suddivisi in aliquote a -20°C per periodi più lunghi per 3 mesi al massimo.
- Evitare ripetuti cicli di congelamento-scongelo dei campioni.
- La soluzione di lavoro del tampone di lavaggio deve essere preparata fresca ogni volta e usata nello stesso giorno della preparazione.
- Dopo apertura del flacone, il marcato è stabile fino alla data di scadenza riportata sull'etichetta, se conservato a 2-8°C nel flacone originale ben tappato.
- Alterazioni dell'aspetto fisico dei reattivi possono indicare una loro instabilità o deterioramento.

IX. RACCOLTA E PREPARAZIONE DEI CAMPIONI

- Conservare i campioni di siero a 2-8°C.
- Se non si desidera eseguire il dosaggio entro 24 ore dal prelievo, si raccomanda di conservare i campioni a -20°C.
- Evitare ripetuti cicli di congelamento-scongelo dei campioni.

X. METODO DEL DOSAGGIO

A. Avvertenze generali

Non usare il kit o suoi componenti oltre la data di scadenza. Non mescolare reattivi di lotti diversi. Prima dell'uso portare tutti i reattivi a temperatura ambiente.

Mescolare delicatamente i campioni per inversione o rotazione. Per evitare cross-contaminazioni, cambiare il puntale della pipetta ogni volta che si usi un nuovo reattivo o campione.

L'uso di pipette ben tarate e ripetibili o di sistemi di pipettamento automatici migliora la precisione del dosaggio. Rispettare i tempi di incubazione.

Allestire una curva di taratura per ogni seduta analitica, in quanto non è possibile utilizzare per un dosaggio curve di taratura di sedute analitiche precedenti.

B. Metodo del dosaggio

1. Numerare le provette sensibilizzate necessarie per dosare in duplicato ogni standard, campione o controllo. Numerare 2 provette non sensibilizzate per la determinazione dell'attività totale.
2. Agitare brevemente su vortex standard, campioni e controlli. Dispensare 50 µl di standard, campioni e controlli nelle rispettive provette.
3. Dispensare 50 µl di marcato in tutte le provette.
4. Scuotere delicatamente il portaprovette per liberare eventuali bolle d'aria intrappolate nel liquido contenuto nelle provette.
5. Incubare 2 ore a temperatura ambiente.
6. Aspirare (o decantare) il liquido contenuto in tutte le provette, tranne in quelle per l'attività totale, facendo attenzione che il puntale dell'aspiratore raggiunga il fondo delle provette e che aspiri tutto il liquido.
7. Lavare tutte le provette, tranne quelle per l'attività totale, con 3 ml di soluzione di lavoro di tampone di lavaggio, evitando di provocare la formazione di schiuma.
8. Aspirare (o decantare) il liquido contenuto in tutte le provette, tranne in quelle per l'attività totale.
9. Lavare nuovamente tutte le provette, tranne quelle per l'attività totale, con 3 ml di soluzione di lavoro di tampone di lavaggio e aspirare (o decantare).
10. Dopo il secondo lavaggio lasciare decantare le provette in posizione verticale per due minuti circa e aspirare eventuali gocce di liquido residue.
11. Contare tutte le provette per 1 minuto con il contatore gamma.

XI. CALCOLO DEI RISULTATI

1. Calcolare la media delle determinazioni in duplicato.
2. Costruire la curva di calibrazione su carta millimetrata semilogaritmica o lineare ponendo in ordinata le medie dei colpi per minuto (cpm) dei replicati degli standard e in ascissa le rispettive concentrazioni di hGH. Scartare i duplicati palesemente discordanti.
3. Determinare le concentrazioni e controlli per interpolazione sulla curva di

taratura.

4. È possibile utilizzare un sistema di interpolazione dati automatizzato. Con un sistema automatico di interpolazione dati, utilizzare la curva a 4 parametri.

XII. CARATTERISTICHE TIPICHE

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

hGH-IRMA		cpm	B/T (%)
Attività totale		126065	100
Calibratore	0 µIU/ml	241	0,19
	1,0 µIU/ml	1254	0,99
	2,4 µIU/ml	2743	2,18
	8,0 µIU/ml	7817	6,20
	25,5 µIU/ml	19515	15,48
	59,1 µIU/ml	34310	27,22
	119,9 µIU/ml	49965	39,63

XIII. CARATTERISTICHE E LIMITI DEL METODO

A. Sensibilità

Venti replicati dello standard zero sono stati dosati insieme agli altri standard. La sensibilità, calcolata come concentrazione apparente di un campione con cpm pari alla media più 2 deviazioni standard di 20 replicati dello standard zero, è risultata essere 0,04 µIU/ml.

B. Specificità

Ormoni cross-reattivi sono stati aggiunti a un calibratore a bassa e ad elevata concentrazione di hGH. È stata misurata la risposta apparente nel kit hGH.

Ormone aggiunto	hGH CAL 1 µIU/ml	hGH CAL 5 µIU/ml
-	0,60	65
hCG 300000 mIU/ml	0,63	63
hPL 50000 ng/ml	0,69	68
PRL 2000 ng/ml	1,35	63

Nota: questa tabella mostra la cross-reattività per hGH-IRMA.

C. Precisione

INTRA SAGGIO

INTER SAGGIO

Siero	N	<X> ± SD (µIU/ml)	CV (%)	Siero	N	<X> ± SD (µIU/ml)	CV (%)
A	6	6,7 ± 0,3	4,4%	A	20	3,8 ± 0,3	8,1%
B	6	19,0 ± 0,2	1,0%	B	20	17,9 ± 1,2	6,7%

SD: Deviazione Standard; CV: Coefficiente di Variazione

D. Accuratezza

TEST DI DILUZIONE

Campione	Diluizione	Concentrazione teorica (µIU/ml)	Concentrazione misurata (µIU/ml)
Serum 1	1/1	-	35,6
	1/2	17,8	17,4
	1/4	8,9	8,8
	1/8	4,5	5,0
	1/16	2,2	2,4
	1/32	1,1	1,2

I campioni sono stati diluiti con calibratore zero.

Fattore di conversione:

1µIU hGH-IRMA Calibratore = 0,33 ng

TEST DI RECUPERO

Campione	hGH aggiunta (µIU/ml)	hGH recuperata (µIU/ml)	Recupero (%)
Serum 1	5	5,1	102%
	10	9,5	95%
	25	24,7	99%
	50	53,7	107%
Serum 2	60	63	105%
	40	46,8	117%
	20	22,1	111%
	10	10,2	102%
	5	4,8	96%

E. Tempo trascorso tra l'aggiunta dell'ultimo calibratore e il campione

Come mostrato nella seguente tabella, il dosaggio si mantiene accurato anche quando un campione viene aggiunto nelle provette sensibilizzate 30 minuti dopo l'aggiunta del calibratore.

TEMPO TRASCORSO			
Campione	0'	15'	30'
Serum 1	4,4	4,5	4,8
Serum 2	18,8	18,1	19,3
Serum 3	27,6	26,2	27,0
Serum 4	36,5	36,8	36,6

F. Effetto hook

Un campione ha cui è stata aggiunta hGH fino a 4000 µIU/ml ha cpm superiori a quello dello standard più concentrato.

XIV. LIMITAZIONI

- Campioni di pazienti che abbiano assunto preparazioni a base di anticorpi monoclonali murini a scopo diagnostico o terapeutico potrebbero contenere anticorpi umani antimurini (HAMA). Tali campioni, quando testati con metodiche basate sull'impiego di anticorpi monoclonali murini, potrebbero produrre valori falsamente elevati o ridotti.
- Nell'esecuzione di tecniche di immunodosaggio in vitro, la presenza in campioni di siero umano di anticorpi eterofili che possono reagire con immunoglobuline reattive può dar luogo ad interferenze. Pazienti sistematicamente esposti al contatto con animali o con prodotti derivanti da siero animale possono essere oggetto di tale tipo di interferenza, con conseguente riscontro di risultati anomali in caso di presenza di anticorpi eterofili. Si raccomanda pertanto di valutare attentamente i risultati relativi ai pazienti con sospetta presenza di tale tipo di anticorpo. Qualora i risultati non fossero in linea con le altre osservazioni cliniche si renderà necessaria la raccolta di ulteriori informazioni prima della formulazione di una diagnosi.

XV. CONTROLLO DI QUALITÀ INTERNO

- Se i risultati ottenuti dosando il Controllo 1 e il Controllo 2 non sono all'interno dei limiti riportati sull'etichetta dei flaconi, non è opportuno utilizzare i risultati ottenuti per i campioni, a meno che non si trovi una giustificazione soddisfacente.
- Ogni laboratorio può preparare un proprio pool di sieri da utilizzare come controllo, da conservare congelato in aliquote.
- I criteri di accettazione per la differenza tra i risultati doppi dei campioni devono riflettere la Buona prassi di laboratorio

XVI. INTERVALLI DI RIFERIMENTO

Questi valori vengono dati solo come guida; ogni laboratorio deve stabilire i propri intervalli normali di valori.

Nei soggetti normali, la secrezione dell'ormone della crescita (hGH) è pulsatile. Durante il giorno, le concentrazioni di hGH variano tra <0,2-10 µIU/ml. Durante la notte, le concentrazioni di hGH aumentano notevolmente (± 30 µIU/ml).

La secrezione di hGH è fortemente stimolata dall'esercizio e dallo stress (venopuntura, ipoglicemia, ...), ma viene diminuita dall'iperglicemia.

Nei soggetti normali (n=34), due ore dopo un carico di glucosio orale (75 g negli adulti), i livelli di hGH erano più bassi di 10 µU/ml e la risposta dell'hGH ai test di stimolazione (somministrazione di insulina, arginina, glucagone) superava i 20 µU/ml.

I livelli di hGH erano elevati (persino dopo il carico di glucosio) nell'acromegalia (> 10 µU/ml).

Nella carenza di hGH, la risposta al test di stimolazione è assente o attenuata (bassa statura per carenza di hGH, ipopituitarismo di varie origini).

XVII. PRECAUZIONI PER L'USO

Sicurezza

Il kit è solo per uso diagnostico in vitro.

Il kit contiene ¹²⁵I (emivita: 60 giorni) emettente raggi X (28 keV) e γ (35.5 keV) ionizzanti.

L'acquisto, a detenzione, l'utilizzo e il trasporto di materiale radioattivo sono soggetti a regolamentazione locale. In nessun caso il prodotto può essere somministrato ad esseri umani o animali.

Usare sempre guanti e camici da laboratorio quando si manipola materiale radioattivo. Le sostanze radioattive devono essere conservate in propri contenitori in appositi locali che devono essere interdetti alle persone non autorizzate. Deve essere tenuto un registro di carico e scarico del materiale radioattivo. Il materiale di laboratorio e la vetreria deve essere dedicato all'uso di isotopi specifici per evitare cross-contaminazioni.

In caso di contaminazione o dispersione di materiale radioattivo, fare riferimento alle norme locali di radioprotezione. I rifiuti radioattivi devono essere smaltiti secondo le norme locali di radioprotezione. Lo scrupoloso rispetto delle norme per l'uso di sostanze radioattive fornisce una protezione adeguata agli utilizzatori.

I reattivi di origine umana presenti nel kit sono stati dosati con metodi approvati da organismi di controllo europei o da FDA e si sono rivelati negativi per HBs Ag, anti HCV, anti HIV1 e anti HIV2. Non sono disponibili metodi in grado di offrire la certezza assoluta che derivati da sangue umano non possano provocare epatiti, AIDS o trasmettere altre infezioni. Manipolare questi reattivi o i campioni o siero secondo le procedure di sicurezza vigenti.

Tutti i prodotti di origine animale o loro derivati provengono da animali sani. I componenti di origine bovina provengono da paesi dove non sono stati segnalati casi di BSE. E' comunque necessario considerare i prodotti di origine animale come potenziali fonti di infezioni.

Evitare ogni contatto dell'epidermide con i reattivi contenenti sodio azide come conservante. La sodio azide può reagire con piombo rame o ottone presenti nelle tubature di scarico per formare metallo-azidi esplosive. Smaltire questi reattivi facendo scorrere abbondante acqua negli scarichi.

Nei luoghi dove si usano sostanze radioattive non è consentito consumare cibi o bevande, fumare o usare cosmetici. Non pipettare i reattivi con pipette a bocca.

XVIII. RIFERIMENTI BIBLIOGRAFICI

- CAMANNI F., MASSARA F., BELFORTE L., ROSATELLO A., MOLENATTI G.M. (1977)
Effect of dopamine on plasma growth hormone and prolactin levels in normal and acromegalic subjects.
J. Clin. Endo. and Metab., 44:465.
- DAUGHADAY W.H. (1981)
The adenohypophysis
In : "Textbook of Endocrinology", R.H. Williams ed., W.B. Saunders, Philadelphia, p:73.
- DROBNY E.C., AMBURN K., BAUMANN G. (1983)
Circadian variation of basal plasma growth hormone in man.
J. Clin. Endo. and Metab., 57:524-528.
- HASHIDA S., NAKAWAGA K., ISHIKAWA E., OHTAKI S. (1985)
Basal level of human growth hormone (hGH) in normal serum.
Clin. Chim. Acta, 151:185-186.
- LEWIS V.J. et al. (1980)
Human growth hormone : A complex of proteins.
Rec. Progr. Horm. Res., 36:488.
- LI C.H. (1974)
Human growth hormone : perspective on its chemistry and physiology.
In : "Advances in human growth hormone research", S. Raiti ed. U.S. Department of Health, Education and Welfare Publ. DMEW publ. no. (NJH) 74-612, p. 321.

- REUTENS AT. (1995)
Evaluation and application of a highly sensitive assay for serum growth hormone (GH) in the study of adult GH deficiency.
J. Clin. Endocrinol. Metab., 80(2): 480-485
- CROWLEY S. et al. (1995)
Growth and the growth hormone axis in prepubertal children with asthma.
J. Pediatr. 126(2): 297-303.
- KELLY JT. et al. (1993)
Effect of different oral oestrogen formulations on insulin-like growth factor I, growth hormone and growth hormone binding protein in post-menopausal women.
Clin. Endocrinol. 39(5) : 561-567

XIX. SCHEMA DEL DOSAGGIO

	Attività totale µl	Calibratore µl	Campioni Controlli µl
Calibratore (0 to 6) Campioni, controlli Marcato	- - 50	50 - 50	- 50 50
Incubazione	2 ore a temperatura ambiente		
Separazione Soluzione di lavoro Separazione Soluzione di lavoro Separazione	- - - - -		Aspirare 3,0 Aspirare 3,0 Aspirare
Conteggio	Contare le provette per 1 minuto		

Leer el protocolo completo antes de usar.

hGH-IRMA

I. INSTRUCCIONES DE USO

Kit para ensayo inmunoradiométrico para la determinación cuantitativa in vitro de hormona de crecimiento humano (hGH) en suero.

II. INFORMACIÓN GENERAL

- A. **Nombre:** DIAsource hGH-IRMA
- B. **Número de Catálogo:** KIP1081: 96 tests
- C. **Fabricado por:** DIAsource ImmunoAssays S.A.
Rue du Bosquet, 2, B-1348 Louvain-la-Neuve, Bélgica

Para cuestiones técnicas e información sobre pedidos contactar:

Tel : +32 (0)10 84.99.11

Fax : +32 (0)10 84.99.91

III. INFORMACIÓN CLÍNICA

A. Actividades biológicas de hGH

hGH es una hormona polipeptídica (peso molecular 21,500 Da) producida por las células acidófilas de la hipófisis anterior bajo el control de dos importantes sustancias de la eminencia media : factor liberador de hormona del crecimiento (GRF) y un agente inhibidor, somatostatina. Las vías neuroendocrinas dopaminérgica, adrenérgica y serotoninérgica también juegan un papel importante en el control de la secreción de hGH. Los estímulos excitatorios de la secreción de hGH incluyen hipoglicemia, ejercicio, ayuno, alimentos con alto contenido proteico, sueño profundo, estrés, glucagón, L Dopa, amino ácidos, etc. Los estímulos inhibitorios incluyen glucosa, cortisol, hGH y ácidos grasos libres. Debido a que su vida media en el plasma es corta (± 25 minutos) y a los frecuentes estímulos excitatorios o inhibidores, la hGH generalmente presenta una gran variación en la concentración sérica.

Una de las funciones fisiológicas más importantes de la hGH es actuar en el hígado y otros tejidos para producir somatomedinas, que a su vez inducen crecimiento actuando directamente sobre tejidos objetivo. Al contrario de hGH, la concentración de somatomedina en el suero se mantiene estable por encontrarse en su mayoría unida a proteínas plasmáticas.

B. Aplicación clínica de hGH-IRMA

· **Retardo del Crecimiento**

La hiposecreción de hGH es una de las diversas causas de la estatura baja en niños. Las mediciones de hGH en suero con un ensayo de alta sensibilidad, especialmente después de un estímulo provocador (ausencia de respuesta), es un modo importante de establecer un diagnóstico porque este grupo de pacientes puede ser tratado con la administración de hGH.

· **Hipopituitarismo**

La medición de hGH en suero también es un índice de la función hipofisaria cuando se sospecha de hipopituitarismo (ya sea idiopático o debido a un tumor y cirugía).











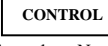

· **Gigantismo y acromegalia**

La medición de hGH en suero, especialmente después de una prueba inhibidora provocadora (ausencia de respuesta), es un modo importante de establecer un diagnóstico de hipersecreción de hGH debida a un tumor hipofisario acidófilico. Esto resulta en gigantismo en los niños y en acromegalia en los adultos. Ambos trastornos pueden tratarse con cirugía o radiación.

IV. PRINCIPIOS DEL MÉTODO

DIASource hGH-IRMA es un ensayo inmunoradiométrico basado en un tubo recubierto. Mab 1, el anticuerpo de captura, recubre la parte interna inferior del tubo de plástico. Los calibradores o muestras agregadas a los tubos manifestarán al principio una baja afinidad por Mab 1. La adición de Mab 2, el anticuerpo de señal marcado con ¹²⁵I, completa el sistema y desencadena la reacción inmunológica. Después de lavar, la radioactividad remanente en el tubo refleja la concentración del antígeno.

V. REACTIVOS SUMINISTRADOS

Reactivos	96 test Kit	Código de Color	Reconstitución
 Tubos recubiertos con anti-hGH (anticuerpo monoclonal)	2 x 48	blanco	Listo para uso
  TRAZADOR: Anticuerpos monoclonales anti- hGH marcados con yodo ¹²⁵ en tampón fosfato con albúmina de suero bovino, azida (<0,1 %) y colorante rojo inerte	1 vial 5,5 ml 350 kBq	rojo	Listo para uso
  Calibrador Cero (0 µUI / ml) en plasma humano y timol	1 vial liofilizado	amarillo	Añadir 2 ml de agua destilada
  Calibradores hGH N = 1 a 6 en plasma humano y timol (mirar los valores exactos en las etiquetas)	6 viales lío filizados	amarillo	Añadir 0,5 ml de agua destilada
   Solución de lavado (NaCl, Tween 20)	1 vial 40 ml	marrón	Diluir 20 x con agua destilada (utilizar agitador magnético)
  Controles - N = 1 o 2 en plasma humano y timol	2 viales lío filizados	plateado	Añadir 0,5 ml de agua destilada

Nota: Use el calibrador cero para diluir muestras.
1 µUI de la preparación del calibrador es equivalente a 1 µUI de NIBSC 2° IS 98/574.

VI. MATERIAL NO SUMINISTRADO

- El material mencionado a continuación es necesario y no está incluido en el kit
1. Agua destilada
 2. Pipetas de 50 µl, 500 µl y 2 ml (Se recomienda el uso de pipetas precisas con puntas desechables de plástico)
 3. Vortex
 4. Agitador magnético
 5. Jeringa automática 5 ml (tipo Cornwall) para el lavado
 6. Sistema de aspiración (opcional)
 7. Contador de radiaciones gamma para medir I¹²⁵ (mínima eficiencia 70%)

VII. PREPARACIÓN DE REACTIVOS

- A. Calibradores:** Reconstituya el calibrador cero con 2,0 ml de agua destilada y los otros calibradores con 0,5 ml de agua destilada.
- B. Controles:** Reconstituya los controles con 0,5 ml de agua destilada.
- C. Solución de lavado de trabajo:** Preparar el volumen necesario de Solución de lavado de trabajo mezclando 19 partes de agua destilada por 1 parte de Solución de lavado (20x). Utilizar un agitador magnético para homogeneizar. Desechar la solución de lavado de trabajo no utilizada al final del día.

VIII. ALMACENAJE Y CADUCIDADES DE LOS REACTIVOS

- Antes de abrir o reconstituir todos los componentes de los kits son estables hasta la fecha de caducidad indicada en la etiqueta, si se guardan a 2-8°C.
- Después de reconstituidos los calibradores y controles son estables por una semana a 2-8°C.
Para periodos de almacenaje más largos, se deben preparar alícuotas y deben ser almacenadas a -20°C por 3 meses. Evitar congelar y descongelar sucesivamente.
- La solución de lavado de trabajo recién preparada solo debe utilizarse en el mismo día.
- Después del primer uso, el trazador es estable hasta la fecha de caducidad, si se guarda en el vial original cerrado a 2-8°C.
- Las alteraciones de los reactivos en el aspecto físico pueden indicar inestabilidad o deterioro.

IX. RECOGIDA Y PREPARACIÓN DE MUESTRAS

- Las muestras de suero deben ser guardadas a 2-8°C.
- Si el ensayo no se realiza en 24 hrs., almacenar las muestras a -20°.
- Evitar congelar y descongelar sucesivamente.

X. PROTOCOLO

A. Notas de manejo

No utilizar el kit o componentes después de la fecha de caducidad. No mezclar reactivos de diferente número de lote. Llevar todos los reactivos a temperatura ambiente antes de su uso.
Agitar minuciosamente todos los reactivos y muestras, agitándolos o girándolos suavemente.
Con el fin de evitar ninguna contaminación utilizar puntas de pipetas desechables y limpias para la adición de cada reactivo y muestra.
El uso de pipetas de precisión o equipamiento de dispensación automática mejorara la precisión. Respetar los tiempos de incubación.
Preparar la curva de calibración en cada ensayo, no utilizar los datos de un ensayo previo.

B. Protocolo

1. Marcar los tubos recubiertos por duplicado para cada uno de los calibradores, muestras y controles. Para la determinación de las Cuentas Totales, marcar 2 tubos normales.
2. Agitar brevemente los calibradores, muestras y controles y dispensar 50 µl de cada uno en sus respectivos tubos.
3. Dispensar 50 µl de Anti-hGH marcado con yodo¹²⁵ en cada tubo, incluyendo los tubos correspondientes a las Cuentas Totales.
4. Agitar suavemente con la mano la gradilla con tubos.
5. Incubar durante 2 horas a temperatura ambiente.
6. Aspirar (o decantar) el contenido de cada tubo (excepto los de Cuentas Totales). Asegurarse que la punta de la pipeta de aspiración toca el fondo del tubo con el fin de aspirar todo el líquido.
7. Lavar los tubos con 3 ml de Solución de lavado de trabajo (excepto los de Cuentas Totales). Evitar la formación de espuma durante la adición de la Solución de lavado.
8. Aspirar (o decantar) el contenido de cada tubo (excepto los de Cuentas Totales).
9. Lavar los tubos nuevamente con 3 ml de Solución de lavado de trabajo (excepto los de Cuentas Totales) y aspirar (o decantar).
10. Después del último lavado, dejar los tubos en posición inversa durante 2 minutos y aspirar el líquido restante.
11. Medir la actividad de cada tubo durante 60 segundos en un Contador Gamma.

XI. CÁLCULO DE RESULTADOS

1. Calcular la media de los duplicados.
2. Representar en un gráfico semilogarítmico o lineal las c.p.m. (ordenada) para cada calibrador frente a las concentraciones de hGH (abscisa) y dibujar una curva de calibración por los puntos de calibración, rechazando los extremos claros.
3. Leer la concentración para cada control y muestra por interpolación en la curva de calibración.
4. Métodos computarizados de computación de resultados pueden ser utilizados para la construcción de la curva de calibración. Si se utiliza un sistema automático de cálculo de resultados, se recomienda usar la representación gráfica "4 parámetros".

XII. EJEMPLO DE RESULTADOS

Los datos mostrados a continuación sirven como ejemplo y nunca deberán ser usados como una calibración real.

hGH-IRMA		cpm	B/T (%)
Cuentas Totales		126065	
Calibrador	0 μ UI/ml	241	0,19
	1,0 μ UI/ml	1254	099
	2,4 μ UI/ml	2743	2,18
	8,0 μ UI/ml	7817	6,20
	25,5 μ UI/ml	19515	15,48
	59,1 μ UI/ml	34310	27,22
	119,9 μ UI/ml	49965	39,63

XIII. REALIZACIÓN Y LIMITACIONES

A. Límite de detección

Veinte calibradores cero fueron medidos en una curva con otros calibradores. El límite de detección, definido como la concentración aparente resultante de dos desviaciones estándares sobre la media de enlace del calibrador cero, fue de 0,04 μ UI/ml.

B. Especificidad

Se agregaron hormonas de reacción cruzada a calibradores con valores de hGH altos y bajos. Se midió la respuesta aparente de hGH.

Hormona agregada	hGH CAL 1 μ UI/ml	hGH CAL 5 μ UI/ml
-	0,60	65
hCG 300000 mUI/ml	0,63	63
hPL 50000 ng/ml	0,69	68
PRL 2000 ng/ml	1,35	63

Nota: esta tabla muestra la reactividad cruzada para hGH-IRMA.

C. Precisión

INTRA-ENSAYO				INTER-ENSAYO			
Suero	N	<X> \pm S.D. (μ UI/ml)	CV (%)	Suero	N	<X> \pm S.D. (μ UI/ml)	CV (%)
A	6	6,7 \pm 0,3	4,4%	A	20	3,8 \pm 0,3	8,1%
B	6	19,0 \pm 0,2	1,0%	B	20	17,9 \pm 1,2	6,7%

SD: Desviación Estándar; CV: Coeficiente de Variación

D. Exactitud

TEST DILUCIÓN			
Muestra	Dilución	Concent. Teórica (μ UI/ml)	Concent. Medida (μ UI/ml)
Suero 1	1/1	-	35,6
	1/2	17,8	17,4
	1/4	8,9	8,8
	1/8	4,5	5,0
	1/16	2,2	2,4
	1/32	1,1	1,2

Las muestras fueron diluidas con calibrador cero

Factor de conversión:

1 μ UI hGH-IRMA Calibrador = 0,33 ng

TEST DE RECUPERACIÓN

Muestra	añadido hGH (μ UI/ml)	Recuperado hGH (μ UI/ml)	Recuperado (%)
Suero 1	5	5,1	102%
	10	9,5	95%
	25	24,7	99%
	50	53,7	107%
Suero 2	60	63	105%
	40	46,8	117%
	20	22,1	111%
	10	10,2	102%
	5	4,8	96%

E. Retardo de tiempo entre dispensar el último calibrador y la muestra

Como se muestra a continuación, los resultados del ensayo no varían a pesar de que una muestra es dispensada 30 min. después que el calibrador ha sido agregado a los tubos plásticos.

RETARDO DE TIEMPO

Suero (μ UI/ml)	0'	15'	30'
Suero 1	4,4	4,5	4,8
Suero 2	18,8	18,1	19,3
Suero 3	27,6	26,2	27,0
Suero 4	36,5	36,8	36,6

F. Efecto de gancho

Una muestra a la que se le agregó hGH hasta 4000 μ UI/ml da una señal por sobre la concentración del calibrador más alto.

XIV. LIMITACIONES

- Las muestras de pacientes que han recibido preparaciones de anticuerpos monoclonales de ratón para diagnóstico o tratamiento pueden contener anticuerpos humanos anti-ratón (HAMA). Estas muestras pueden resultar en valores elevados o reducidos falsos al ser analizadas con kits de ensayos que utilizan anticuerpos monoclonales de ratón.
- Anticuerpos heterofílicos en el suero humano pueden reaccionar con las inmunoglobulinas de los reactivos, interfiriendo con los inmunoensayos in vitro. Pacientes que han sido expuestos en forma rutinaria a productos animales o del suero de animales, pueden estar predispuestos a esta interferencia y se pueden observar valores erróneos en el caso que existan anticuerpos heterofílicos. Evalúe cuidadosamente los resultados de los pacientes sospechosos de tener estos anticuerpos. Si los resultados no son consistentes con otras observaciones clínicas, se deberá solicitar información clínica adicional antes de hacer un diagnóstico.

XV. CONTROL DE CALIDAD INTERNO

- Si los resultados obtenidos para el Control 1 y/o Control 2 no están dentro del rango especificado en la etiqueta del vial, los resultados obtenidos no podrán ser utilizados a no ser que se pueda dar una explicación convincente de dicha discrepancia
- Si es conveniente, - cada laboratorio puede utilizar sus propios pools de controles, los cuales se guardan en alícuotas congeladas. No congelar y descongelar más de dos veces.
- Los criterios de aceptación de la diferencia entre los resultados de los duplicados de las muestras se apoyan en las prácticas de laboratorio corrientes.

XVI. INTERVALOS DE REFERENCIA

Estos valores solamente sirven de pauta; cada laboratorio tiene que establecer sus propios valores normales.

En sujetos normales la secreción de hormona del crecimiento (hGH) es pulsátil. Durante el día, las concentraciones de hGH fluctúan entre <0.2-10 μ UI/ml.

Durante el sueño, la concentración de hGH aumenta consistentemente (\pm 30 μ UI/ml).

La secreción de hGH se estimula marcadamente por el ejercicio y el estrés (punción venosa, hipoglicemia, ...), pero disminuye con la hiperglicemia.

En sujetos normales (n=34), dos horas después de una sobrecarga oral de glucosa (75 g en adultos), los niveles de hGH eran inferiores a 10 μ UI/ml y la respuesta de hGH a pruebas de estimulación (insulina, arginina, administración de glucagón) sobrepasó 20 μ UI/ml.

Los niveles de hGH estaban elevados (incluso después de sobrecarga de glucosa) en acromegalia (> 10 μ UI/ml).

En deficiencia de hGH, la respuesta a la prueba de estimulación esta ausente o limitada (estatura baja por deficiencia de hGH; hipopituitarismo de varios orígenes).

XVII. PRECAUCIONES Y ADVERTENCIAS

Seguridad

Para uso solo en diagnóstico in vitro.

Este kit contiene I^{125} (vida media: 60 días) emisor de rayos X (28 keV) y de rayos γ (35,5 keV) ionizantes.

Este producto radiactivo solo puede ser manejado y utilizado por personas autorizadas; la compra, almacenaje, uso y cambio de productos radiactivos están sujetos a la legislación del país del usuario. En ningún caso el producto deberá ser suministrado a humanos y animales.

Los componentes de sangre humana utilizados en este kit han sido testados por métodos aprobados por la CEE y/o la FDA dando negativo a HBsAg, anti-HCV, anti-HIV-1 y 2. No se conoce ningún método que asegure que los derivados de la sangre humana no transmitan hepatitis, SIDA u otras infecciones. Por lo tanto el manejo de los reactivos y muestras se hará de acuerdo con los procedimientos de seguridad locales.

Todos los productos animales y derivados han sido obtenidos a partir de animales sanos. Componentes bovinos originales de países donde BSE no ha sido informado. Sin embargo, los componentes conteniendo sustancias animales deberán ser considerados como potencialmente infecciosos.

Evitar cualquier contacto de los reactivos con la piel (azida sódica como conservante). La azida en este kit puede reaccionar con el plomo y cobre de las cañerías y producir azidas metálicas altamente explosivas. Durante el proceso de lavado, hacer circular mucha cantidad de agua por el sumidero para evitar el almacenamiento de la azida.

No fumar, beber, comer o utilizar cosméticos en el área de trabajo. No pipetear con la boca. Utilizar ropa de protección y guantes. Todo el manejo de producto radiactivo se hará en un área señalizada, diferente de la de paso regular. Deberá de utilizarse un libro de registros de productos radiactivos utilizados. El material de laboratorio, vidrio que podría estar contaminado radiactivamente deberá de descontaminarse para evitar la contaminación con otros isótopos.

Cualquier derramamiento radiactivo deberá ser limpiado de inmediato de acuerdo con los procedimientos de seguridad. Los desperdicios radiactivos deberán ser almacenados de acuerdo con las regulaciones y normativas vigentes de la legislación a la cual pertenezca el laboratorio. El ajustarse a las normas básicas de seguridad radiológica facilita una protección adecuada.

XVIII. BIBLIOGRAFIA

- CAMANNI F., MASSARA F., BELFORTE L., ROSATELLO A., MOLENATTI G.M. (1977)
Effect of dopamine on plasma growth hormone and prolactin levels in normal and acromegalic subjects.
J. Clin. Endo. and Metab., 44:465.
- DAUGHADAY W.H. (1981)
The adenohypophysis
In : "Textbook of Endocrinology", R.H. Williams ed., W.B. Saunders, Philadelphia, p;73.
- DROBNY E.C., AMBURN K., BAUMANN G. (1983)
Circadian variation of basal plasma growth hormone in man.
J. Clin. Endo. and Metab., 57:524-528.
- HASHIDA S., NAKAWAGA K., ISHIKAWA E., OHTAKI S. (1985)
Basal level of human growth hormone (hGH) in normal serum.
Clin. Chim. Acta, 151:185-186.
- LEWIS V.J. et al. (1980)
Human growth hormone: A complex of proteins.
Rec. Progr. Horm. Res., 36:488.

- LI C.H. (1974)
Human growth hormone: perspective on its chemistry and physiology.
In : "Advances in human growth hormone research", S. Raiti ed. U.S. Department of Health, Education and Welfare Publ. DMEW publ. no. (NJH) 74-612, p. 321.
- REUTENS AT. (1995)
Evaluation and application of a highly sensitive assay for serum growth hormone (GH) in the study of adult GH deficiency.
J. Clin. Endocrinol. Metab., 80(2): 480-485
- CROWLEY S. et al. (1995)
Growth and the growth hormone axis in prepubertal children with asthma.
J. Pediatr. 126(2): 297-303.
- KELLY JT. et al. (1993)
Effect of different oral oestrogen formulations on insulin-like growth factor I, growth hormone and growth hormone binding protein in post-menopausal women.
Clin. Endocrinol. 39(5) : 561-567

XIX. RESUMEN DEL PROTOCOLO

	CUENTAS TOTALES ml	CALIBRADORES ml	MUESTRA(S) CONTROLES ml
Calibradores (0 a 6)	-	0,05	-
Muestras, controles	-	-	0,05
Trazador	0,05	0,05	0,05
Incubación	2 horas a temperatura ambiente		
Separación	-	Aspirar (o decantar)	
Solución de Lavado	-	3,0	
Separación	-	Aspirar (o decantar)	
Solución de Lavado	-	3,0	
Separación	-	Aspirar (o decantar)	
Contaje	Contar los tubos durante 60 segundos		

Διαβάστε ολόκληρο το πρωτόκολλο πριν από τη χρήση.

hGH-IRMA

I. ΧΡΗΣΗ ΓΙΑ ΤΗΝ ΟΠΟΙΑ ΠΡΟΟΡΙΖΕΤΑΙ

Κιτ ανοσοραδιομετρικού προσδιορισμού για την *in vitro* ποσοτική μέτρηση της ανθρώπινης αυξητικής ορμόνης (hGH) στον ορό.

II. ΓΕΝΙΚΕΣ ΠΛΗΡΟΦΟΡΙΕΣ

- A. **Εμπορική ονομασία:** hGH-IRMA της DIASource
- B. **Αριθμός καταλόγου:** KIP1081 : 96 προσδιορισμοί
- Γ. **Κατασκευάζεται από την:** DIASource ImmunoAssays S.A.
Rue du Bosquet, 2, B-1348 Louvain-la-Neuve, Belgium.

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

III. ΚΛΙΝΙΚΟ ΥΠΟΒΑΘΡΟ

A. Βιολογική δράση της hGH

Η hGH είναι μια πολυπεπτιδική ορμόνη (μοριακό βάρος 21.500 Da) που παράγεται από τα οξεόφιλα κύτταρα της πρόσθιας υπόφυσης υπό τον έλεγχο των δύο κυρίων ουσιών από το μέσο έπαρμα: του παράγοντα απελευθέρωσης της αυξητικής ορμόνης (GRF) και ενός ανασταλτικού παράγοντα, της σωματοστατίνης. Οι ντοπαμινεργικοί, αδρενεργικοί και σεροτονινεργικοί νευροενδοκρινικοί οδοί παίζουν επίσης σημαντικό ρόλο στον έλεγχο της έκκρισης της hGH. Στα ερεθίσματα που διεγείρουν την έκκριση της hGH περιλαμβάνονται η υπογλυκαιμία, η άσκηση, η νηστεία, τα γεύματα με υψηλή περιεκτικότητα πρωτεΐνης, ο βαθύς ύπνος, το στρες, η γλυκαγόνη, η L Dopa, τα αμινοξέα κ.λπ. Στα ανασταλτικά ερεθίσματα περιλαμβάνονται η γλυκόζη, η κορτιζόλη, η hGH και τα ελεύθερα λιπαρά οξέα. Λόγω της σύντομης ημιζωής της στο πλάσμα (± 25 λεπτά) και των συχνών διεγερτικών ή ανασταλτικών ερεθισμάτων, η hGH εμφανίζει συχνές και μεγάλες διακυμάνσεις ως προς τη συγκέντρωση στο πλάσμα.

Μια από τις κύριες φυσιολογικές λειτουργίες της hGH είναι να δρα στο ήπαρ και άλλους ιστούς για την παραγωγή σωματομεδινών, οι οποίες με τη σειρά τους επιφέρουν αύξηση με άμεση δράση επί των ιστών-στόχων. Σε αντίθεση με την hGH, η συγκέντρωση της σωματομεδίνης στον ορό διατηρείται σταθερή συνεπεία του μεγάλου βαθμού δέσμευσής της στις κυκλοφορούσες πρωτεΐνες του πλάσματος.

B. Κλινική εφαρμογή του προσδιορισμού hGH-IRMA

· Καθυστέρηση της ανάπτυξης

Η μειωμένη έκκριση hGH είναι μιας από τις διάφορες αιτίες για το μικρό ανάστημα στα παιδιά. Μέτρηση της hGH στον ορό με έναν προσδιορισμό υψηλής ευαισθησίας, ειδικά μετά από ένα προκλητό ερέθισμα (έλλειψη απόκρισης), αποτελεί σημαντικό τρόπο για να τεκμηριωθεί η διάγνωση αυτή διότι η συγκεκριμένη ομάδα ασθενών μπορεί να αντιμετωπισθεί θεραπευτικά με τη χορήγηση hGH.

· Υποϋποφισισμός

Η μέτρηση της hGH στον ορό αποτελεί επίσης ένα δείκτη της λειτουργίας της υπόφυσης όταν υπάρχει υποψία υποϋποφισισμού (είτε ιδιοπαθούς είτε λόγω όγκου ή χειρουργικής επέμβασης).













· Γιγαντισμός και μεγαλακρία

Η μέτρηση της hGH στον ορό, ειδικά μετά από μια προκλητή εξέταση αναστολής (απουσία απόκρισης), αποτελεί σημαντικό τρόπο για την τεκμηρίωση της διάγνωσης υπερβολικής έκκρισης hGH λόγω οξεόφιλου όγκου της υπόφυσης. Αυτό έχει ως αποτέλεσμα γιγαντισμό στα παιδιά και μεγαλακρία στους ενήλικους. Και οι δύο αυτές διαταραχές μπορούν να αντιμετωπισθούν με χειρουργική επέμβαση ή ακτινοβολία.

IV. ΒΑΣΙΚΕΣ ΑΡΧΕΣ ΤΗΣ ΜΕΘΟΔΟΥ

Η εξέταση hGH-IRMA της DIASource είναι ένας ανοσοραδιομετρικός προσδιορισμός που βασίζεται σε διαχωρισμό επιστρωμένων σωληναρίων. Το Mab 1, το αντίσωμα σύλληψης, προσκολλάται στην κάτω και εσωτερική επιφάνεια του πλαστικού σωληναρίου. Οι βαθμονομητές ή τα δείγματα που προστίθενται στα σωληνάρια θα επιδείξουν αρχικά χαμηλό βαθμό συγγένειας για το Mab 1. Προσθήκη Mab 2, του αντισώματος σήματος, το οποίο είναι σημασμένο με ¹²⁵I, θα ολοκληρώσει το σύστημα και θα ενεργοποιήσει την ανοσολογική αντίδραση. Μετά την πλύση, η υπολειπόμενη ραδιενέργεια, που είναι δεσμευμένη στο σωληνάριο, αντανακλά τη συγκέντρωση του αντιγόνου.

V. ΠΑΡΕΧΟΜΕΝΑ ΑΝΤΙΔΡΑΣΤΗΡΙΑ

Αντιδραστήρια	Κιτ 96 προσδιορισμών	Χρωματικός κωδικός	Ανασύσταση
 Tubes coated with anti hGH (monoclonal antibodies)	2 x 48	λευκό	Έτοιμο για χρήση
 Ab  ¹²⁵ I ΙΧΝΗΘΕΤΗΣ: Αντι-hGH μονοκλωνικά αντισώματα σημασμένα με ¹²⁵ Iοδίνη σε φωσφορικό ρυθμιστικό διάλυμα με βόεια ορολευκωματίνη, αζίδιο (<0,1%), EDTA και μια αδρανής κόκκινη χρωστική.	1 φιαλίδιο 5,5 ml 350 kBq	κόκκινο	Έτοιμο για χρήση
 CAL  0 Μηδενικός βαθμονομητής (0 μIU/ml) σε ανθρώπινο πλάσμα με θυμόλη	1 φιαλίδιο λυοφιλοπονημένο	κίτρινο	Προσθέστε 2 ml απεσταγμένου νερού
 CAL  N Βαθμονομητές hGH N = 1 έως 6 (δείτε τις ακριβείς τιμές πάνω στις ετικέτες των φιαλιδίων) σε ανθρώπινο πλάσμα με θυμόλη	6 φιαλίδια λυοφιλοπονημένα	κίτρινο	Προσθέστε 0,5 ml απεσταγμένου νερού
 WASH  SOLN  CONC Διάλυμα πλύσης (NaCl, Tween 20)	1 φιαλίδιο 40 ml	καφέ	Αραιώστε 20 x με απεσταγμένο νερό (χρησιμοποιήστε μαγνητικό αναδευτήρα).
 CONTROL  N Οροί ελέγχου - N = 1 ή 2 σε ανθρώπινο πλάσμα με θυμόλη	2 φιαλίδια λυοφιλοπονημένα	ασημί	Προσθέστε 0,5 ml απεσταγμένου νερού

Σημείωση: Χρησιμοποιείτε το μηδενικό βαθμονομητή για αραιώσεις δειγμάτων. 1 μIU του βαθμονομητή ισοδυναμεί με 1 μIU NIBSC 2nd IS 98/574.

VI. ΑΝΑΛΩΣΙΜΑ ΠΟΥ ΔΕΝ ΠΑΡΕΧΟΝΤΑΙ

Τα ακόλουθα υλικά απαιτούνται αλλά δεν παρέχονται στο κιτ:

1. Απεσταγμένο νερό
2. Πιπέτες για διανομή: 50 μl, 500 μl και 2 ml (συνιστάται η χρήση πιπετών ακριβείας με αναλώσιμα πλαστικά ρύγχη)
3. Αναμεικτής στροβίλισμού (τύπου vortex)
4. Μαγνητικός αναδευτήρας
5. Αυτόματη σύριγγα των 5 ml (τύπου Cornwall) για πλύση
6. Σύστημα αναρρόφησης (προαιρετικό)
7. Μπορεί να χρησιμοποιηθεί οποιοσδήποτε απεριθμητής μετρητής γ ακτινοβολίας με δυνατότητα μέτρησης της ¹²⁵I (ελάχιστη απόδοση 70%).

VII. ΠΑΡΑΣΚΕΥΗ ΑΝΤΙΔΡΑΣΤΗΡΙΟΥ

- A. Βαθμονομητές:** Ανασυστήστε το μηδενικό βαθμονομητή με 2,0 ml απεσταγμένου νερού και άλλους βαθμονομητές με 0,5 ml απεσταγμένου νερού.
- B. Οροί ελέγχου:** Ανασυστήστε τους ορούς ελέγχου με 0,5 ml απεσταγμένου νερού.
- Γ. Διάλυμα πλύσης εργασίας:** Προετοιμάστε επαρκή όγκο διαλύματος πλύσης εργασίας με προσθήκη 19 όγκων απεσταγμένου νερού σε 1 όγκο διαλύματος πλύσης (20x). Χρησιμοποιήστε μαγνητικό αναδευτήρα για την

ομογενοποίηση. Απορρίψτε το μη χρησιμοποιημένο διάλυμα πλύσης εργασίας στο τέλος της ημέρας.

VIII. ΦΥΛΑΞΗ ΚΑΙ ΗΜΕΡΟΜΗΝΙΑ ΛΗΞΗΣ ΤΩΝ ΑΝΤΙΔΡΑΣΤΗΡΙΩΝ

- Πριν από το άνοιγμα ή την ανασύσταση, όλα τα συστατικά του κιτ παραμένουν σταθερά έως την ημερομηνία λήξης, η οποία αναγράφεται στην ετικέτα, εφόσον διατηρούνται σε θερμοκρασία 2 έως 8° C.
- Μετά την ανασύσταση, οι βαθμονομητές και οι οροί ελέγχου παραμένουν σταθεροί για μία εβδομάδα σε θερμοκρασία 2 έως 8° C. Για μεγαλύτερες περιόδους φύλαξης, πρέπει να σχηματίζονται κλάσματα/δόσεις μιας χρήσης και να διατηρούνται στους -20° C για 3 μήνες. Αποφεύγετε τη διαδοχική κατάψυξη και απόψυξη.
- Φρέσκο, παρασκευασμένο διάλυμα πλύσης εργασίας θα πρέπει να χρησιμοποιείται την ίδια ημέρα.
- Μετά την πρώτη χρήση του, ο ιχνηθέτης παραμένει σταθερός έως την ημερομηνία λήξης, εφόσον διατηρείται στο αρχικό, ερμητικά κλειστό φιαλίδιο σε θερμοκρασία 2 έως 8° C.
- Τυχόν μεταβολές της φυσικής εμφάνισης των αντιδραστηρίων του κιτ ενδέχεται να υποδηλώνουν αστάθεια ή αλλοίωση.

IX. ΣΥΛΛΟΓΗ ΚΑΙ ΠΡΟΕΤΟΙΜΑΣΙΑ ΔΕΙΓΜΑΤΩΝ

- Τα δείγματα ορού πρέπει να φυλάσσονται σε θερμοκρασία 2-8° C.
- Εάν η εξέταση δεν πραγματοποιηθεί εντός 24 ωρών, συνιστάται η φύλαξη στους -20° C.
- Αποφεύγετε τη διαδοχική κατάψυξη και απόψυξη.

X. ΔΙΑΔΙΚΑΣΙΑ

A. Σημειώσεις σχετικά με το χειρισμό

Μη χρησιμοποιείτε το κιτ ή τα συστατικά μετά την ημερομηνία λήξης. Μη αναμειγνύετε υλικά από διαφορετικές παρτίδες κιτ. Φέρετε όλα τα αντιδραστήρια σε θερμοκρασία δωματίου πριν από τη χρήση. Αναμείξτε καλά όλα τα αντιδραστήρια και τα δείγματα με απαλή ανακίνηση ή ανάδευση. Χρησιμοποιείτε ένα καθαρό αναλώσιμο ρύγχος πιπέτας για την προσθήκη κάθε διαφορετικού αντιδραστηρίου και δείγματος προκειμένου να αποψύξετε την επιμόλυνση. Η ακρίβεια βελτιώνεται με χρήση πιπετών υψηλής ακρίβειας ή αυτοματοποιημένου εξοπλισμού διανομής με πιπέτες. Τηρείτε τους χρόνους επώασης. Προετοιμάστε μια καμπύλη βαθμονόμησης για κάθε ανάλυση και μη χρησιμοποιείτε δεδομένα από προηγούμενες αναλύσεις.

B. Διαδικασία

1. Σημάνετε επιστρωμένα σωληνάρια εις διπλούν για κάθε βαθμονομητή, δείγμα και ορό ελέγχου. Για τον προσδιορισμό των μετρήσεων του ιχνηθέτη ¹²⁵I ("total"), σημάνετε 2 κοινά (μη επιστρωμένα) σωληνάρια.
2. Αναμείξτε για λίγο (με αναμεικτή στροβίλισμού τύπου vortex) βαθμονομητές, ορούς ελέγχου και δείγματα και διανείμετε 50 μl από έκαστο σε αντίστοιχα σωληνάρια.
3. Διανείμετε 50 μl αντι-hGH σημασμένης με ¹²⁵I σε κάθε σωληνάριο, συμπεριλαμβανοντας τα μη επιστρωμένα σωληνάρια που αφορούν τις μετρήσεις του ιχνηθέτη ¹²⁵I ("total").
4. Ανακινήστε απαλά με το χέρι τη βάση στήριξης των σωληναρίων.
5. Επώαστε επί 2 ώρες σε θερμοκρασία δωματίου.
6. Αναρροφήστε (ή μεταγγίστε) το περιεχόμενο κάθε σωληναρίου (με εξαίρεση εκείνα που αφορούν τις μετρήσεις του ιχνηθέτη ¹²⁵I ["total"]). Βεβαιωθείτε ότι το πλαστικό ρύγχος του αναρροφητή φθάνει στον πυθμένα του επιστρωμένου σωληναρίου προκειμένου να αφαιρεθεί όλη η ποσότητα του υγρού.
7. Πλύνετε τα σωληνάρια με 3 ml διαλύματος πλύσης εργασίας (με εξαίρεση εκείνα που αφορούν τις συνολικές μετρήσεις). Αποψύγετε το σχηματισμό αφρού κατά τη διάρκεια της προσθήκης του διαλύματος πλύσης εργασίας.
8. Αναρροφήστε (ή μεταγγίστε) το περιεχόμενο κάθε σωληναρίου (με εξαίρεση εκείνα που αφορούν τις συνολικές μετρήσεις).
9. Πλύνετε τα σωληνάρια και πάλι με 3 ml διαλύματος πλύσης εργασίας (με εξαίρεση εκείνα που αφορούν τις συνολικές μετρήσεις) και αναρροφήστε (ή μεταγγίστε).
10. Μετά την τελευταία πλύση, αφήστε τα σωληνάρια να σταθούν σε όρθια θέση για δύο λεπτά και αναρροφήστε τη σταγόνα υγρού που απομένει.
11. Υποβάλλετε σε μέτρηση τα σωληνάρια σε απεριθμητή ακτίνων γ για 60 δευτερόλεπτα.

XI. ΥΠΟΛΟΓΙΣΜΟΣ ΤΩΝ ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΩΝ

- Υπολογίστε τη μέση τιμή των διπλών προσδιορισμών.
- Σε ημιλογαριθμικό ή γραμμικό χαρτί γραφημάτων, παραστήστε γραφικά τις c.p.m. (κρούσεις ανά λεπτό) (τεταγμένη) για κάθε βαθμονομητή έναντι της αντίστοιχης συγκέντρωσης της hGH (τετημημένη) και σχεδιάστε μια καμπύλη βαθμονόμησης μέσω των σημείων του βαθμονομητή, απορρίψτε τις εμφανείς μη αποδεκτές τιμές.
- Διαβάστε τη συγκέντρωση για κάθε ορό έλεγχου και δείγμα με αναγωγή στην καμπύλη βαθμονόμησης.
- Αναγωγή δεδομένων με τη βοήθεια ηλεκτρονικού υπολογιστή θα απλοποιήσει αυτούς τους υπολογισμούς. Εάν χρησιμοποιείται αυτόματη επεξεργασία αποτελεσμάτων, συνιστάται προσαρμογή καμπύλης λογιστικής συνάρτησης 4 παραμέτρων.

XII. ΤΥΠΙΚΑ ΔΕΔΟΜΕΝΑ

Τα ακόλουθα δεδομένα προορίζονται μόνο ως παράδειγμα και δεν πρέπει να χρησιμοποιούνται ποτέ αντί της καμπύλης βαθμονόμησης πραγματικού χρόνου.

hGH-IRMA	cpm	B/T (%)
Κρούσεις του ιχνηθέτη ¹²⁵ I ("total")	126065	
Βαθμονομητής		
0 μIU/ml	241	0,19
1,0 μIU/ml	1254	0,99
2,4 μIU/ml	2743	2,18
8,0 μIU/ml	7817	6,20
25,5 μIU/ml	19515	15,48
59,1 μIU/ml	34310	27,22
119,9 μIU/ml	49965	39,63

XIII. ΑΠΟΔΟΣΗ ΚΑΙ ΠΕΡΙΟΡΙΣΜΟΙ

A. Όριο ανίχνευσης

Μετρήθηκαν είκοσι μηδενικοί βαθμονομητές μαζί με ένα σύνολο άλλων βαθμονομητών.

Το όριο ανίχνευσης, οριζόμενο ως η φαινομενική συγκέντρωση δύο τυπικών αποκλίσεων πάνω από τις μέσες μετρήσεις σε μηδενική δέσμευση, ήταν 0,04 μIU/ml.

B. Ειδικότητα

Ορμόνες διασταυρούμενης αντιδραστικότητας προστέθηκαν σε ένα βαθμονομητή χαμηλής και υψηλής τιμής hGH. Μετρήθηκε η φαινομενική απόκριση της hGH.

Προσθεθείσα ορμόνη	hGH CAL 1 μIU/ml	hGH CAL 5 μIU/ml
-	0,60	65
hCG 300000 mIU/ml	0,63	63
hPL 50000 ng/ml	0,69	68
PRL 2000 ng/ml	1,35	63

Σημείωση: Στον πίνακα αυτό παρουσιάζεται η διασταυρούμενη αντιδραστικότητα για τον προσδιορισμό hGH-IRMA.

Γ. Ακρίβεια

ΓΙΑ ΤΟΝ ΙΔΙΟ ΠΡΟΣΔΙΟΡΙΣΜΟ

ΜΕΤΑΞΥ ΔΙΑΦΟΡΕΤΙΚΩΝ
ΠΡΟΣΔΙΟΡΙΣΜΩΝ

Ορός	N	<X> ± T.A. (μIU/ml)	Σ.Δ. (%)	Ορός	N	<X> ± T.A. (μIU/ml)	Σ.Δ. (%)
A	6	6,7 ± 0,3	4,4%	A	20	3,8 ± 0,3	8,1%
B	6	19,0 ± 0,2	1,0%	B	20	17,9 ± 1,2	6,7%

T.A.: Τυπική απόκλιση, Σ.Δ.: Συντελεστής διακύμανσης

Δ. Ορθότητα

ΔΟΚΙΜΑΣΙΑ ΑΡΑΙΩΣΗΣ

Δείγμα	Αραίωση	Θεωρητική συγκέντρωση (μIU/ml)	Μετρηθείσα συγκέντρωση (μIU/ml)
Ορός 1	1/1	-	35,6
	1/2	17,8	17,4
	1/4	8,9	8,8
	1/8	4,5	5,0
	1/16	2,2	2,4
	1/32	1,1	1,2

Το δείγμα αραιώθηκε με το μηδενικό βαθμονομητή.

ΔΟΚΙΜΑΣΙΑ ΑΝΑΚΤΗΣΗΣ

Δείγμα	Προσθεθείσα hGH (μIU/ml)	Ανακτηθείσα hGH (μIU/ml)	Ανακτηθείσα (%)
Ορός 1	5	5,1	102%
	10	9,5	95%
	25	24,7	99%
	50	53,7	107%
Ορός 2	60	63	105%
	40	46,8	117%
	20	22,1	111%
	10	10,2	102%
	5	4,8	96%

Συντελεστής μετατροπής:

1 μIU του βαθμονομητή ισοδυναμεί με 0,33 ng

E. Μεσοδιάστημα μεταξύ της διανομής τελευταίου βαθμονομητή και δείγματος

Όπως φαίνεται στη συνέχεια, τα αποτελέσματα του προσδιορισμού παραμένουν αξιόπιστα ακόμα και όταν διανέμεται ένα δείγμα 30 λεπτά μετά την προσθήκη του βαθμονομητή στα επιστρωμένα σωληνάρια.

ΜΕΣΟΔΙΑΣΤΗΜΑ

Ορός (μIU/ml)	0'	15'	30'
Ορός 1	4,4	4,5	4,8
Ορός 2	18,8	18,1	19,3
Ορός 3	27,6	26,2	27,0
Ορός 4	36,5	36,8	36,6

ΣΤ. Φαινόμενο αγκίστρου (hook)

Δείγμα που εμβολιάστηκε με hGH έως 4000 μIU/ml δίνει σήμα πάνω από την υψηλότερη συγκέντρωση του βαθμονομητή.

XIV. ΠΕΡΙΟΡΙΣΜΟΙ

- Δείγματα από ασθενείς που έχουν λάβει παρασκευάσματα μονοκλωνικών αντισωμάτων ποντικού για σκοπούς διάγνωσης ή θεραπείας, ενδεχομένως να περιέχουν ανθρώπινα αντισώματα αντι-ποντικού (HAMA). Σε αυτά τα δείγματα μπορούν να παρατηρηθούν ψευδώς αυξημένες ή ψευδώς μειωμένες τιμές, όταν ελέγχονται με kit προσδιορισμού που χρησιμοποιούν μονοκλωνικά αντισώματα ποντικού.
- Τα ετεροφιλικά αντισώματα στον ανθρώπινο ορό μπορούν να αντιδράσουν με ανοσοσφαιρίνες των αντιδραστηρίων, προκαλώντας παρεμβολή σε in vitro ανοσοπροσδιορισμούς. Ασθενείς που εκτίθενται τακτικά σε ζώα ή προϊόντα ζωικού ορού ενδεχομένως να είναι επιρρεπείς σε αυτήν την παρεμβολή. Παθολογικές τιμές μπορούν να παρατηρηθούν σε παρουσία ετεροφιλικών αντισωμάτων. Αξιολογείτε με προσοχή τα αποτελέσματα ασθενών, στους οποίους υπάρχει υποψία αυτών των αντισωμάτων. Εάν τα αποτελέσματα δεν είναι σύμφωνα με άλλες κλινικές παρατηρήσεις, θα χρειαστεί η λήψη περαιτέρω πληροφοριών πριν από τη θέση της διάγνωσης.

XV. ΕΣΩΤΕΡΙΚΟΣ ΠΟΙΟΤΙΚΟΣ ΕΛΕΓΧΟΣ

- Εάν τα αποτελέσματα που λαμβάνονται για τον ορό ελέγχου 1 ή/και τον ορό ελέγχου 2 δε βρίσκονται εντός του πεδίου τιμών που καθορίζεται στην ετικέτα του φιαλιδίου, τα αποτελέσματα δεν είναι δυνατό να χρησιμοποιηθούν, εκτός εάν έχει δοθεί ικανοποιητική εξήγηση για την ασυμφωνία.
- Εάν είναι επιθυμητό, κάθε εργαστήριο μπορεί να δημιουργήσει τα δικά του μείγματα δειγμάτων ελέγχου (pools), τα οποία πρέπει να διατηρούνται κατεψυγμένα σε κλάσματα/δόσεις μιας χρήσης.
- Τα κριτήρια αποδοχής για τη διαφορά μεταξύ των διπλών αποτελεσμάτων των δειγμάτων θα πρέπει να βασίζονται σε ορθές εργαστηριακές πρακτικές.

XVI. ΤΙΜΕΣ ΑΝΑΦΟΡΑΣ

Οι τιμές αυτές παρέχονται μόνον ως οδηγός. Κάθε εργαστήριο θα πρέπει να καθιερώσει το δικό του πεδίο φυσιολογικών τιμών.

Σε φυσιολογικά υποκείμενα, η έκκριση της αυξητικής ορμόνης (hGH) είναι παλμικού τύπου. Κατά τη διάρκεια της ημέρας, οι συγκεντρώσεις της hGH κυμαίνονται από <0,2-10 μIU/ml. Κατά τη διάρκεια του ύπνου, οι συγκεντρώσεις της hGH αυξάνονται σταθερά (± 30 μIU/ml).

Η έκκριση της hGH διεγείρεται κατά πολύ από την άσκηση και το στρες (φλεβική παρακέντηση, υπογλυκαιμία, ...), αλλά μειώνεται από την υπεργλυκαιμία.

Σε φυσιολογικά υποκείμενα (n=34), δύο ώρες μετά από του στόματος λήψη γλυκόζης (75 g σε ενηλίκους), τα επίπεδα της hGH ήταν χαμηλότερα από 10 μIU/ml και η απόκριση της hGH σε δοκιμασίες διέγερσης (χορήγηση ινσουλίνης, αργινίνης, γλυκαγόνης) υπερέβαινε τα 20 μIU/ml.

Τα επίπεδα της hGH ήταν αυξημένα (ακόμη και μετά τη χορήγηση γλυκόζης) στη μεγαλακρία (> 10 μIU/ml).

Σε ανεπάρκεια hGH, η απόκριση στη δοκιμασία διέγερσης είτε δεν υπάρχει είτε έχει αμβλυνθεί (μικρό ανάστημα λόγω ανεπάρκειας hGH, υποϋποφυσισμός προερχόμενος από διάφορα αίτια).

XVII. ΠΡΟΦΥΛΑΞΕΙΣ ΚΑΙ ΠΡΟΕΙΔΟΠΟΙΗΣΕΙΣ

Ασφάλεια

Μόνο για διαγνωστική χρήση in vitro.

Το kit αυτό περιέχει το ¹²⁵I (Χρόνος ημιζωής: 60 ημέρες), μια ραδιενεργή ουσία η οποία εκπέμπει ιονίζουσα ακτινοβολία X (28 keV) και γ (35.5 keV).

Αυτό το ραδιενεργό προϊόν είναι δυνατό να μεταφερθεί και να χρησιμοποιηθεί μόνο από εξουσιοδοτημένα άτομα. Η αγορά, φύλαξη, χρήση και ανταλλαγή ραδιενεργών προϊόντων υπόκεινται στη νομοθεσία της χώρας του τελικού χρήστη. Σε καμία περίπτωση δεν πρέπει να χορηγείται το προϊόν σε ανθρώπους ή ζώα.

Τα συστατικά ανθρώπινου αίματος που περιλαμβάνονται στο kit αυτό έχουν ελεγχθεί με μεθόδους εγκεκριμένες στην Ευρώπη ή/και από τον FDA και έχει διαπιστωθεί ότι είναι αρνητικά ως προς την παρουσία HBSAg, αντι-HCV, αντι-HIV-1 και 2. Καμία γνωστή μέθοδος δεν είναι δυνατό να παρέχει πλήρη διασφάλιση ότι παράγωγα του ανθρώπινου αίματος δε θα μεταδώσουν ηπατίτιδα, AIDS ή άλλες λοιμώξεις. Επομένως, ο χειρισμός αντιδραστηρίων ή δειγμάτων ορού θα πρέπει να γίνεται σύμφωνα με τις τοπικές διαδικασίες περί ασφάλειας. Όλα τα ζωικά προϊόντα και παράγωγα έχουν συλλεχθεί από υγιή ζώα. Τα βόεια συστατικά προέρχονται από χώρες όπου δεν έχει αναφερθεί BSE. Παρ' όλ' αυτά, συστατικά που περιέχουν ζωικές ουσίες θα πρέπει να αντιμετωπίζονται ως δυναμικά μολυσματικά.

Αποφεύγετε οποιαδήποτε επαφή του δέρματος με αντιδραστήρια (χρησιμοποιείται αζίδιο του νατρίου ως συντηρητικό). Το αζίδιο στο kit αυτό ενδέχεται να αντιδράσει με μόλυβδο και χαλκό των υδραυλικών σωληνώσεων και να σχηματίσει με τον τρόπο αυτό ιδιαίτερα εκρηκτικά αζίδια μετάλλων. Κατά τη διάρκεια του βήματος πλύσης, εκπλύνετε την αποχέτευση με μεγάλη ποσότητα νερού, για την πρόληψη τυχόν συσσώρευσης αζιδίου.

Μην καπνίζετε, μην πίνετε, μην τρώτε και μη χρησιμοποιείτε καλλυντικά στο χώρο εργασίας. Μην διανέμετε με πιπέτα χρησιμοποιώντας το στόμα σας. Χρησιμοποιείτε προστατευτικό ρουχισμό και γάντια μιας χρήσης. Όλος ο χειρισμός του ραδιενεργού υλικού θα πρέπει να εκτελείται σε καθορισμένο χώρο, μακριά από χώρους τακτικής διέλευσης. Στο εργαστήριο πρέπει να διατηρείται ημερολόγιο για την παραλαβή και τη φύλαξη ραδιενεργών υλικών. Εξοπλισμός και γυάλινα σκεύη του εργαστηρίου, τα οποία θα μπορούσαν να μολυνθούν με ραδιενεργές ουσίες, θα πρέπει να φυλάσσονται σε ξεχωριστό χώρο για την πρόληψη επιμόλυνσης των διαφόρων ραδιοϊσοτόπων.

Τυχόν διαρροές ραδιενεργών υγρών πρέπει να καθαρίζονται αμέσως σύμφωνα με τις διαδικασίες ασφάλειας από ραδιενέργεια. Τα ραδιενεργά απόβλητα πρέπει να απορρίπτονται σύμφωνα με τους τοπικούς κανονισμούς και τις κατευθυντήριες οδηγίες των αρχών που έχουν δικαιοδοσία στο εργαστήριο. Η τήρηση των βασικών κανόνων ασφάλειας από ραδιενέργεια παρέχει επαρκή προστασία.

XVIII. ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ

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

XIX. ΠΕΡΙΛΗΨΗ ΤΟΥ ΠΡΩΤΟΚΟΛΛΟΥ

	ΚΡΟΥΣΕΙ Σ "TOTAL" μl	ΒΑΘΜΟΝΟΜΗ ΤΕΣ μl	ΔΕΙΓΜΑ(ΤΑ) ΟΡΟΙ ΕΛΕΓΧΟΥ μl
Βαθμονομητές (0 έως 6) Δείγματα, οροί ελέγχου Ιχνηθέτης	- - 0,05	0,05 - 0,05	- 0,05 0,05
Επώαση	2 ώρες σε θερμοκρασία δοματίου		
Διαχωρισμός Διάλυμα πλύσης εργασίας Διαχωρισμός Διάλυμα πλύσης εργασίας Διαχωρισμός	- - - -	- - - -	Αναρρόφηση (ή μετάγγιση) 3,0 Αναρρόφηση (ή μετάγγιση) 3,0 Αναρρόφηση (ή μετάγγιση)
Μέτρηση	Μέτρηση σωληναρίων επί 60 δευτερόλεπτα		

Przed użyciem zapoznaj się z treścią instrukcji.

hGH-IRMA

I. PRZEZNACZENIE

Zestaw immunoradiometrycznego do ilościowego oznaczania ludzkiego hormonu wzrostu (hGH) w ludzkiej surowicy.

II. INFORMACJE OGÓLNE

- A. Nazwa zestawu: DIAsource hGH-IRMA Kit
- B. Numer katalogowy: KIP1081: 96 oznaczeń
- C. Producent: DIAsource ImmunoAssays S.A.
Rue du Bosquet, 2, B-1348 Louvain-la-Neuve, Belgium.

W celu uzyskania pomocy technicznej lub informacji odnośnie zamówień prosimy o kontakt:

Tel: +32 (0)10 84.99.11

Fax: +32 (0)10 84.99.91

III. ZASTOSOWANIE KLINICZNE

A. Aktywność biologiczna

Ludzki hormon wzrostu (hGH) jest polipeptydem, o ciężarze cząsteczkowym 21 500 Da, produkowanym przez acidofilowe komórki przedniego płata przysadki mózgowej. Jego produkcja jest kontrolowana głównie przez dwie substancje: GRF (Growth-hormone Releasing Factor) czynnik uwalniający hormon wzrostu oraz inhibitor, somatostatynę. Ważną rolę w regulacji sekrecji hGH odgrywają następujące szlaki: dopaminergiczny, adrenergiczny, serotoninergetyczny. Czynniki pobudzające wydzielanie hGH to hipoglikemia, ćwiczenia fizyczne, wygłodzenie (bycie na czczo), dieta bogata w białko, głęboki sen, stres, glukagon, L-DOPA, aminokwasy itd. W skład czynników będących inhibitorami wwydzielania hGH wchodzą glukoza, kortyzol, hGH oraz wolne kwasy tłuszczowe.

hGH wykazuje dużą zmienność stężenia w surowicy krwi spowodowaną jego krótkim połowicznym okresem rozpadu biologicznego (± 25 minut) oraz częstym wpływem zarówno czynników pobudzających jak i inhibitorów. Jedną z głównych funkcji hGH jest stymulowanie innych tkanek do produkcji somatomedyn, które z kolei bezpośrednio stymulują wzrost poszczególnych tkanek. W przeciwieństwie do hGH, stężenie somatomedyn w surowicy utrzymuje się na stałym poziomie z powodu silnego wiązania z białkami osocza.

B. Zastosowanie kliniczne

• *Opóźnienie wzrostu*

Jedną z wielu przyczyn niskiego wzrostu u dzieci jest hyposekrecja hGH. Pomiar hGH w surowicy powinien charakteryzować się wysoką czułością, szczególnie w przypadku pobudzania jego wydzielania. Diagnozowanie w ten sposób tej grupy chorych jest istotne, ponieważ mogą oni być leczeni przez podawanie hGH.

• *Niedoczynność przysadki mózgowej*

Pomiar stężenia hGH w surowicy jest również ważnym wyznacznikiem funkcjonowania przysadki mózgowej, w przypadku podejrzenia jej niedoczynności (idiopatycznej bądź wywołanej nowotworem i operacją).

• *Gigantyzm oraz akromegalia*


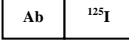
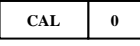
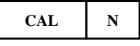
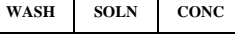
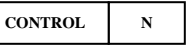
Pomiar stężenia hGH w surowicy, zwłaszcza po wykonaniu testu hamowania (brak odpowiedzi) jest ważnym sposobem poparcia diagnozy, że hipersekrecja hGH spowodowana jest rakiem komórek kwasochłonnych przysadki mózgowej. Rezultatem tego może być gigantyzm u dzieci i akromegalia u dorosłych. Oba te schorzenia mogą być leczone chirurgicznie lub przez naświetlanie promieniowaniem jonizującym.

IV. ZASADA DZIAŁANIA TESTU

DIASource hGH-IRMA jest testem immunoradiometrycznym opartym na separacji próbek opłaszczonych przeciwciałami. Mabs1. Przeciwciała te są przytwierdzone do dolnej, wewnętrznej powierzchni plastikowej próbki. Do próbek dodaje się kalibratory lub badane próbki, wykazujące niskie powinowactwo do Mab 1. Dodanie drugiego przeciwciała Mab 2 anty hGH znakowanego ¹²⁵I powoduje rozpoczęcie reakcji immunologicznej i utworzenie kompleksu typu sandwich: Mab1/cząsteczka hGH/Mab2.

Po inkubacji usuwa się nadmiar antygeny, próbki się przepłukuje i mierzy się związaną z próbkami aktywność, będącą miarą stężenia dodanego antygeny.

V. SKŁAD ZESTAWU

Odczynniki	ilość 96 oznaczeń	kolor odczynnika	odtworzenie
 Probówki opłaszczone przeciwciałem monoklonalnym anty-hGH	2 x 48	biały	gotowe do użycia
 ZNACZNIK: znakowane jodem- ¹²⁵ anty-hGH (przeciwciała monoklonalne) w buforze fosforanowym z albuminą surowicy wołowej, azydkiem (< 0.1%) oraz obojętnym czerwonym barwnikiem.	1 fiołka 5,5 ml 350 kBq	czerwony	gotowe do użycia
 Kalibrator zerowy w plazma ludzkiej z tymolem	1 fiołka liofilizat	żółty	Dodać 2,0 ml wody destylowanej
 Kalibratory 1-6 w plazma ludzkiej z tymolem (patrz: dokładne wartości na etykietach fiolek)	6 fiołki liofilizat	żółty	Dodać 0,5 ml wody destylowanej
 Roztwór płuczący (NaCl, Tween 20)	1 fiołka 40 ml	brązowy	Rozcieńczyć 20 x w wodzie destylowanej (użyć mieszadła magnetycznego)
 Kontrole 1 i 2 w plazma ludzkiej z tymolem	2 fiołki liofilizat	srebrny	Dodać 0,5 ml wody destylowanej

Uwaga: Do rozcieńczania surowic używać kalibratora 0.
1 µIU kalibratora odpowiada 1 µIU NIBSC 2nd IS 98/574.

VI. DODATKOWE MATERIAŁY I WYPOSAŻENIE

Do wykonania testu są konieczne, a nie dostarczone wraz z zestawem:

- woda destylowana
- mikropipety z końcówkami do dozowania 50 µl , 500 µl i 2ml (zaleca się używanie wykalibrowanych pipet z końcówkami wymiennymi)
- wytrząsarka
- mieszadło magnetyczne
- automatyczna strzykawka 5ml (typ Cornwall) do płukania
- system do odciągania płynu (opcjonalny),
- licznik promieniowania gamma (minimalna czułość 70%)

VII. PRZYGOTOWANIE ODCZYNNIKÓW

- Kalibratory:** Do kalibratora zero dodać 2 ml wody destylowanej, do pozostałych dodać po 0,5 ml wody destylowanej.
- Kontrole:** Dodać do każdej po 0,5 ml wody destylowanej.
- Roztwór płuczący:** Rozcieńczyć roztwór płuczący: zmieszać 1 część roztworu płuczącego z 19 częściami wody destylowanej (rozcieńczenie 20-krotne). W celu wymieszania użyć mieszadła magnetycznego lub homogenizatora. Pod koniec dnia roboczego nieużyty płyn wylać.

VIII. PRZECHOWYWANIE ORAZ OKRES WAŻNOŚCI ODCZYNNIKÓW I PRÓBEK

- Wszystkie odczynniki zestawu przed ich otwarciem i rekonstruowaniem są ważne do końca daty ważności podanej na etykietach. Przechowywać w temperaturze 2-8°C.
- Rozcieńczone odczynniki - kalibratory oraz kontrole - są stabilne przez okres 7 dni w temperaturze 2-8°C.
- Warunki dłuższego przechowywania odczynników to temperatura -20°C max. przez okres 3 miesiące. Unikać wielokrotnego rozmrażania i zamrażania.
- Świeżo przygotowany roztwór płuczący należy zużyć tego samego dnia.
- Znacznik przechowywany w oryginalnym opakowaniu w temperaturze 2 do 8°C, szczelnie zamknięty zachowuje swoje właściwości do końca terminu ważności.
- Zmiany wyglądu odczynników zestawu mogą wskazywać na ich rozkład lub niestabilność.

IX. PRZYGOTOWANIE I PRZECHOWYWANIE PRÓBEK

- Próbkę surowicy muszą być przechowywane w temperaturze 2-8°C.
- Jeżeli test nie będzie wykonywany w ciągu 24 godzin, zaleca się zamrożenie próbek w temp. -20°C.
- Unikać wielokrotnego rozmrażania i zamrażania próbek.

X. PROCEDURA

A. Przestrzeganie następujących zasad zagwarantuje powtarzalność oznaczeń

Nie należy wykonywać testu po upływie daty ważności odczynników. Nie należy łączyć odczynników z różnych zestawów, posiadających inny numer serii. Przed wykonaniem testu składniki zestawu należy doprowadzić do temperatury pokojowej. Dokładnie wymieszać wszystkie odczynniki oraz próbki poprzez delikatne wytrząsanie. Zapobiegać zanieczyszczeniu odczynników i wody przez drobnoustroje. Stosować wymienne, jednorazowe końcówki do pipet osobne dla każdego odczynnika i dla każdej próbki. Używać wody destylowanej i czystych pojemników. Używać wykalibrowanych pipet w celu zapewnienia precyzji oznaczeń. Do każdego cyklu oznaczeń należy wykonać nową krzywą standardową.

B. Procedura

- Oznaczyć w dubletach próbki opłaszczone dla każdego kalibratora, próby badanej i kontroli. Do oznaczania zliczeń całkowitych oznaczyć dwie zwykłe próbki.
- Wymieszać kalibratory, kontrole i próbki badane na wytrząsarce typu vortex, po czym dodawać po 50µl każdego z nich do odpowiednich próbek.
- Dodawać po 50 µl znacznika anty-hGH-¹²⁵I do każdej próbki, łącznie z próbkami dla zliczeń całkowitych.
- Wstrząsnąć delikatnie statywem.
- Inkubować przez 2 godziny w temperaturze pokojowej.
- Odciągnąć płyn z każdej próbki (lub zdekantować) z wyjątkiem próbek do zliczeń całkowitych. Należy upewnić się, że plastikowa końcówka odciągacza znajduje się na dnie próbki, w celu odciążenia całego płynu.
- Przepłukać próbki za pomocą 3 ml roztworu płuczącego (z wyjątkiem próbek do zliczeń całkowitych). Unikać spieniania przy pipetowaniu.
- Odciągnąć (lub zdekantować) zawartość każdej próbki (z wyjątkiem próbek do zliczeń całkowitych).
- Ponownie przemyć próbki za pomocą 3 ml roztworu płuczącego (z wyjątkiem próbek do zliczeń całkowitych), po czym odciągnąć (lub zdekantować).
- Po ostatnim przepłukaniu pozostawić próbki w pozycji pionowej na dwie minuty, po czym zassać pozostałe krople płynu
- Zliczyć aktywność związaną z próbkami na liczniku promieniowania gamma przez 60 sekund.

XI. OBLICZANIE WYNIKÓW

- Policzyć wartości średnie z dubletów.
- Na papierze o skali półlogarytmicznej lub liniowej wykreślić krzywą dla każdego kalibratora: aktywność c.p.m. (oś rzędnych) względem

odpowiednich stężeń hGH (oś odciętych), po czym poprowadzić krzywą wzorcową przez punkty kalibracji, odrzucić wyniki krańcowe.

- Odczytać stężenie każdej kontroli i próbki poprzez interpolację na krzywej wzorcowej.
- Powyższe obliczenia można uprościć, stosując komputerową redukcję danych. W przypadku użycia automatycznego obliczania wyników, zaleca się wykorzystanie 4-parameterowej funkcji krzywej logistycznej.

XII. PRZYKŁAD TYPOWEJ KRZYWEJ WZORCOWEJ

Poniższe dane są jedynie przykładem i nie powinny być używane w miejsce rzeczywistej krzywej wzorcowej.

hGH-IRMA	cpm	B/T (%)
Zliczenia całkowite	126065	
Kalibratory		
0 µIU/ml	241	0,19
1,0 µIU/ml	1254	0,99
2,4 µIU/ml	2743	2,18
8,0 µIU/ml	7817	6,20
25,5 µIU/ml	19515	15,48
59,1 µIU/ml	34310	27,22
119,9 µIU/ml	49965	39,63

XIII. CHARAKTERYSTYKA OZNACZENIA I OGRANICZENIA

A. Czulość zestawu

Czulość zestawu zdefiniowana jako wartość stężenia hGH odpowiadająca wartości dwóch odchyłeń standardowych dla kalibratora zero (określonych na podstawie 20 różnych oznaczeń) wynosi 0,04 µIU/ml.

B. Specyficzność

Reakcje krzyżowe antygenów były mierzone przy niskiej i wysokiej wartości hGH.

Dodany hormon	hGH CAL 1 µIU/ml	hGH CAL 5 µIU/ml
-	0,60	65
hCG 300000 mIU/ml	0,63	63
hPL 50000 ng/ml	0,69	68
PRL 2000 ng/ml	1,35	63

Uwaga: powyższa tabela przedstawia reaktywność krzyżową dla hGH-IRMA.

C. Precyzja

zmienność międzyseryjna				zmienność międzyseryjna			
Surowica	N	<X> ± SD (µIU/ml)	CV (%)	Surowica	N	<X> ± SD (µIU/ml)	CV (%)
A	6	6,7 ± 0,3	4,4%	C	20	3,8 ± 0,3	8,1%
B	6	19,0 ± 0,2	1,0%	D	20	17,9 ± 1,2	6,7%

SD: odchylenie standardowe; CV: współczynnik zmienności

D. Dokładność

TEST ROZCIĘCZANIA

Próbka	Proporcja	Stężenie teoretyczne (µIU/ml)	Stężenie zmierzone (µIU/ml)
Próbka 1	1/1	-	35,6
	1/2	17,8	17,4
	1/4	8,9	8,8
	1/8	4,5	5,0
	1/16	2,2	2,4
	1/32	1,1	1,2

Próbki rozcieńczono za pomocą kalibratora zerowego.

Współczynnik zamiany:

1µIU kalibratora hGH-IRMA = 0,33 ng

ODZYSK

Próbka	dodane hGH (µIU/ml)	Odzyskane hGH (µIU/ml)	Odzysk (%)
Próbka 1	5	5,1	102%
	10	9,5	95%
	25	24,7	99%
	50	53,7	107%
Próbka 2	60	63	105%
	40	46,8	117%
	20	22,1	111%
	10	10,2	102%
	5	4,8	96%

E. Przesunięcie czasowe w trakcie dozowania

Upływ czasu między dodaniem ostatniego kalibratora a dozowaniem próbki nie przekraczający 30 minut nie ma wpływu na wartość wyniku.

CZAS PRZESUNIĘCIA

Próbka (µIU/ml)	0'	15'	30'
Próbka 1	4,4	4,5	4,8
Próbka 2	18,8	18,1	19,3
Próbka 3	27,6	26,2	27,0
Próbka 4	36,5	36,8	36,6

F. Efekt wysokich dawek (Hook effect)

Próbki o stężeniu hGH do 4000 µIU/ml dają odczyt powyżej wartości ostatniego kalibratora.

XIV. OGRANICZENIA

- Próbki od pacjentów, którzy w celach diagnostycznych lub terapeutycznych otrzymywali preparaty z mysich przeciwciał monoklonalnych, mogą zawierać ludzkie przeciwciała anti-mysie (HAMA). Próbki takie, oznaczane z użyciem zestawów testowych wykorzystujących mysie przeciwciała monoklonalne, mogą wykazywać wartości fałszywie zawyżone lub zaniżone.
- Przeciwciała heterofilne w ludzkiej surowicy mogą reagować z immunoglobulinami odczynnika, interferując z oznaczeniami immunologicznymi przeprowadzanymi in vitro. Pacjenci rutynowo ekspozowani na zwierzęta lub produkty z surowic zwierzęcych mogą wykazywać skłonność do takich interferencji i w razie obecności przeciwciał heterofilnych występować mogą u nich nieprawidłowe wyniki testów. Wyniki oznaczeń próbek od pacjentów z takimi przeciwciałami należy interpretować z ostrożnością. Jeżeli wyniki nie są zgodne z obserwacjami klinicznymi, przed postawieniem rozpoznania powinny być uzyskane dodatkowe informacje.

XV. WEWNĘTRZNA KONTROLA JAKOŚCI

- Jeżeli wyniki otrzymane dla Kontroli 1 i Kontroli 2 nie mieszczą się w przedziale wartości przedstawionym na fiolce, nie wolno ich wykorzystywać do momentu wyjaśnienia zaistniałej sytuacji.
- Jeżeli znajdzie potrzeba, laboratorium może przygotować własne kontrole powstałe po połączeniu wielu surowic. Surowice kontrolne powinny być przechowywane zamrożone w porcjach do jednorazowego użycia.
- Akceptowalna wielkość rozrzutów przy oznaczaniu próbek w dubletach odnosi się do kryteriów Dobrej Praktyki Laboratoryjnej

XVI. ZAKRES NORMY

Każde laboratorium powinno ustalić własne zakresy normy. Normy podane poniżej należy traktować jako wskazówkę

U zdrowych ludzi wydzielanie hormonu wzrostu (hGH) jest pulsacyjne. W ciągu dnia stężenia hGH wahają się od <0,2-10 µIU/ml. Podczas snu stężenia hGH konsekwentnie wzrastają (± 30 µIU/ml).

Wydzielanie hGH wyraźnie stymulują ćwiczenia fizyczne, stres (punkcja żylna, hipoglikemia, ...), natomiast hamuje hiperglikemia.

U zdrowych osobników (n=34), w dwie godziny po doustnym podaniu glukozy (75 g u dorosłych), poziom hGH musi być mniejszy niż 10 µIU/ml, a odpowiedź hGH w testy stymulacyjnych (podanie insuliny, argininy, glukagonu) nie przewyższa 20 µIU/ml.

Poziomy hGH są podwyższone (nawet po podaniu glukozy) w przypadkach akromegalii (> 10 µIU/ml).

W przypadku niedoboru hGH nie ma odpowiedzi na test stymulacyjny lub jest ona bardzo słaba (niski wzrost spowodowany deficytem hGH; niedoczynność przysadki różnego pochodzenia).

XVII. OSTRZEŻENIA I ŚRODKI OSTROŻNOŚCI

Bezpieczeństwo

Zestaw jest przeznaczony jedynie do diagnostyki in vitro. Zestaw zawiera ¹²⁵I (Okres połowicznego rozpadu: 60 dni), emitujący promieniowanie jonizujące X (28 keV) i γ (35.5 keV). Przestrzeganie podstawowych zasad ochrony radiologicznej gwarantuje bezpieczeństwo.

Produkty radioaktywne mogą być nabywane, otrzymywane, przechowywane i używane jedynie przez osoby do tego upoważnione oraz w laboratoriach posiadających odpowiednią autoryzację. Roztwory w żadnym przypadku nie mogą być podawane ludziom ani zwierzętom.

Zasady stosowania produktów radioaktywnych regulują przepisy danego kraju.

Materiały promieniotwórcze można wykorzystywać w obszarach specjalnie do tego przeznaczonych. Laboratorium powinno prowadzić dziennik przechowywanych materiałów promieniotwórczych. Aparatura laboratoryjna oraz wyroby szklane, które mogą ulec skażeniu przez materiały promieniotwórcze, powinny zostać oddzielone, w celu uniknięcia ich skażenia. Każdy wyciek radioaktywny należy natychmiast zmyć zgodnie z lokalną procedurą bezpieczeństwa promieniotwórczego. Odpady radioaktywne należy usuwać zgodnie z przepisami prawnymi obowiązującymi w danym państwie.

Postępowanie wg podstawowych zasad bezpieczeństwa radioaktywnego zapewnia wystarczającą ochronę. Odczynniki zestawu zawierające składniki pochodzenia ludzkiego zostały przetestowane licencjonowanymi zestawami (sprawdzone metodami Europejskimi zatwierdzone przez FDA) i wykluczono obecność przeciwciał anty-HIV 1, anty-HIV 2, anty- HCV i antygeny HBs. Mimo to nie ma jednak pełnej gwarancji, że takie składniki nie mogą przenosić żółtaczki, wirusów HIV czy innych infekcji wirusowych – dlatego też zarówno te odczynniki, jak i próbki pacjentów należy traktować jako potencjalne źródło zakażenia.

Składniki pochodzenia zwierzęcego w odczynnikach zestawu, zostały pobrane od zwierząt zdrowych. Składniki pochodzenia wołowego pochodzą z państw, gdzie nie stwierdzono przypadków zarażenia BSE. Mimo to, wszystkie próbki pochodzenia zwierzęcego należy traktować jako potencjalnie zakaźne. Unikaj kontaktu ze skórą jakiegokolwiek z odczynników (azydek sodu jako konserwant). Azydek sodu może reagować z ołowianymi lub miedzianymi rurami, w wyniku czego mogą odkładać się na nich wybuchowe azydki metali. Aby temu zapobiec należy po wylaniu odpadów dobrze przepłukać rury kanalizacyjne.

Nie palić, nie jeść, nie pić ani nie używać kosmetyków w obszarze pracy. Nie pipetować ustami. Zakładać odzież ochronną i gumowe rękawiczki.

XVIII. BIBLIOGRAFIA

- CAMANNI F., MASSARA F., BELFORTE L., ROSATELLO A., MOLENATTI G.M. (1977)
Effect of dopamine on plasma growth hormone and prolactin levels in normal and acromegalic subjects.
J. Clin. Endo. and Metab., 44:465.
- DAUGHADAY W.H. (1981)
The adenohipophysis
In : "Textbook of Endocrinology", R.H. Williams ed., W.B. Saunders, Philadelphia, p;73.
- DROBNY E.C., AMBURN K., BAUMANN G. (1983)
Circadian variation of basal plasma growth hormone in man.
J. Clin. Endo. and Metab., 57:524-528.
- HASHIDA S., NAKAWAGA K., ISHIKAWA E., OHTAKI S. (1985)
Basal level of human growth hormone (hGH) in normal serum.
Clin. Chim. Acta, 151:185-186.
- LEWIS V.J. et al. (1980)
Human growth hormone : A complex of proteins.
Rec. Progr. Horm. Res., 36:488.

- LICH. (1974)
Human growth hormone : perspective on its chemistry and physiology.
In : "Advances in human growth hormone research", S. Raiti ed. U.S. Department of Health, Education and Welfare Publ. DMEW publ. no. (NJH) 74-612, p. 321.
- REUTENS AT. (1995)
Evaluation and application of a highly sensitive assay for serum growth hormone (GH) in the study of adult GH deficiency.
J. Clin. Endocrinol. Metab., 80(2): 480-485
- CROWLEY S. et al. (1995)
Growth and the growth hormone axis in prepubertal children with asthma.
J. Pediatr. 126(2): 297-303.
- KELLY JT. et al. (1993)
Effect of different oral oestrogen formulations on insulin-like growth factor I, growth hormone and growth hormone binding protein in post-menopausal women.
Clin. Endocrinol. 39(5) : 561-567

XIX. SCHEMAT PROCEDURY

	LICZBA ZLICZEŃ CAŁKOWITYCH ml	KALIBRATORY ml	PRÓBKA(I) PRÓBKA(I) KONTROLNA(E) ml
Kalibratory (0-6)	-	0,05	-
Próbki, kontrole Znacznik	- 0,05	- 0,05	0,05 0,05
inkubacja	2 godziny w temperaturze pokojowej		
Separacja Roztwór płuczący Separacja Roztwór płuczący Separacja	- - - - -	zassać (lub zdekantować) 3,0 zassać (lub zdekantować) 3,0 zassać (lub zdekantować)	
liczenie aktywności	pomiar próbek przez 60 sekund		



Прочетете целия протокол преди употреба

hGH-IRMA

I. УПОТРЕБА

Имунорадиометричен набор за количествено измерване *in vitro* на човешкия хормон на растежа (hGH) в серум.

II. ОБЩА ИНФОРМАЦИЯ

- A. Патентовано име: DIAsource hGH-IRMA Kit
- B. Каталоген номер: KIP1081: 96 теста
- C. Произведено от: DIAsource ImmunoAssays S.A.
Rue du Bosquet, 2, B-1348 Louvain-la-Neuve, Belgium.

За техническа помощ или поръчка:
Тел.: +32 (0)10 84.99.11 Факс: +32 (0)10 84.99.91

III. КЛИНИЧЕН ПРЕГЛЕД

A. Биологична активност на hGH

hGH е полипептиден хормон (с молекулно тегло 21,500 Da), произвеждан от ацидофилните клетки в предната част на хипофизата при контрол на две основни вещества с умерена значимост: фактор, стимулиращ отделянето на хормона на растежа (GRF), и инхибиторно вещество, соматостатин. Допаминаргичните, адренергичните и серотонинергичните невроендокринни пътища също играят съществена роля при контрола на секрецията на hGH. Възбуждащите стимули за секрецията на hGH включват хипогликемия, спортуване, диети, хранене с високо съдържание на протеини, дълбок сън, стрес, глюкагон, L-допа, аминокиселини и т.н. Инхибиторните стимули включват глюкоза, кортизол, hGH и свободни мастни киселини. Поради краткия си полуживот в плазмата (± 25 минути) и честото наличие на възбуждащи или инхибиращи стимули, hGH демонстрира чести и големи вариации на концентрациите си в серума.

Една от основните физиологични функции на hGH е да въздейства върху черния дроб и други тъкани за производството на соматомедини, които на свой ред индуцират растежа чрез директно въздействие върху целевите тъкани. За разлика от hGH, концентрацията на соматомедин в серума се поддържа стабилна чрез свързване до голяма степен с циркулиращите плазмени протеини.

B. Клинично приложение на hGH-IRMA

- **Забавяне на растежа**
Свръхсекрецията на hGH е една от многобройните причини за ниския ръст при децата. Измерването на съдържанието на hGH в серума със силно сензитивно изследване, особено след провокативни стимули (липса на реакция), е важен начин за установяване на тази диагноза, тъй като тази група пациенти могат да бъдат подложени на лечение с прием на hGH.
- **Хипопитуитаризъм**
Измерването на съдържанието на hGH в серума е също така индекс за функцията на хипофизата при съмнения за хипопитуитаризъм (идиопатичен или дължащ се на тумор и операция).
- **Гигантизъм и акромегалия**
Измерването на съдържанието на hGH в серума, особено след провокативен инхибиторен тест (липса на реакция), е важен начин за установяването на диагноза свръхсекреция на hGH, поради ацидофилен тумор на хипофизата. Това води до гигантизъм при децата и акромегалия при възрастните. И двете нарушения са лечими чрез операция или лъчева терапия.

IV. ПРИНЦИПИ НА МЕТОДА

DIAsource hGH-IRMA е имунорадиометрично изследване на база на сепарация на покрити епруветки. Mabs1 (моноклонални антитела 1), които са прихващащи антитела, са разположени по долната и вътрешната повърхност на пластмасовата епруветка. Калибраторите или пробите, които се добавят към епруветките отначало показват слаб афинитет към Mabs1. Добавянето на Mabs2, които са сигнални антитела, маркирани с ¹²⁵I, завършват системата и пускат в ход имунологичната реакция. След измиване остатъчната радиоактивност, свързана с епруветката, отразява антигенната концентрация. Използването на няколко различни Mabs предотвратява развитието на хиперспецифичност.

V. ИЗПОЛЗВАНИ РЕАГЕНТИ

Реагенти	Количество %б теста	Цветен код	Приготвяне
Епруветки, покрити с анти-hGH (моноклонални антитела)	2 x 48	бял	Готов за употреба
Ab ¹²⁵ I ТРЕЙСЪР: Натоварени с ¹²⁵ I анти - hGH (моноклонални антитела) във фосфатен буфер с волски серумен албумин, азид (< 0.1%) и инертна червена боя.	1 флакон 5,5 ml 350 kBq	червен	Готов за употреба
CAL 0 Нулев Калибратор в човешки плазма с тимол	1 флакон лиофилизира н	жълт	Добавете 2 ml дестилирана вода
CAL N Калибратори 1-6 в човешки плазма с тимол (виж точните стойности на етикетите на флаконите)	6 флакона лиофилизира ни	жълт	Добавете 0,5 ml дестилирана вода
WASH SOLN CONC Измиващ разтвор (NaCl, Tween 20)	1 флакон 40 ml	кафяв	Разредете 20x с дестилирана вода (използвайте магнитен сепаратор)
CONTROL N Контроли 1 и 2 в човешки плазма с тимол	2 флакона лиофилизира ни	сребърен	Добавете 0,5 ml дестилирана вода

Забележка: 1. Използвайте нулевия калибратор за серумните разреждания.
2. 1 µIU от калибрирания препарат е еквивалентен на 1 µIU от NIBSC 2nd IS 98/574.

VI. СРЕДСТВА, КОИТО НЕ СЕ ОСИГУРЯВАТ

Следните материали са необходими, но не се осигуряват в набора:

1. Дестилирана вода
2. Пипети от: 50 µl, 500 µl и 2 ml (препоръчва се използването на прецизни пипети с накрайници за еднократна употреба).
3. Завихрящ смесител
4. Магнитен сепаратор
5. 5 ml автоматична спринцовка (тип Cogwall) за измиване
6. Аспирационна система (по избор).
7. Всякакъв гама брояч, който може да измери употребеното количество ¹²⁵I (минимален капацитет от 70%)

VII. ПРИГОТВЯНЕ НА РЕАГЕНТА

- Калибратори:** Реконституирайте нулевия калибратор с 2 ml дестилирана вода, а другия калибратор – с 0,5 ml дестилирана вода.
- Контроли:** Реконституирайте контролите с 0,5 ml дестилирана вода.
- Работен измиващ разтвор:** Подгответе адекватен обем от работния измиващ разтвор чрез добавянето на 19 обема дестилирана вода към 1 обем от измиващия разтвор (20x). Използвайте магнитен сепаратор, за да хомогенизирате. Изхвърлете неупотребеното количество от работния измиващ разтвор в края на деня.

VIII. СЪХРАНЕНИЕ И СРОК НА ГОДНОСТ НА РЕАГЕНТИТЕ

- Всички компоненти на кита са стабилни до датата на срока на годност, посочен на опаковката, при температура на съхранение от 2 °C до 8 °C преди отваряне или реконституиране.
- След реконституиране, калибраторите и контролите са стабилни за срок от 7 дни при температури 2-8°C. За по-дълги срокове на съхранение, се определя кратно и се съхранява при температура -20 °C за максимум 3 месеца. Избягвайте последващи цикли на замразяване-размразяване.
- Прясно приготвения Работен измиващ разтвор трябва да бъде използван същия ден.
- След първата употреба, трейсера е стабилен до изтичане срока на годност, ако се съхранява в оригиналния добре затворен флакон при температури 2-8°C.
- Промени във физическия вид на реагентите на кита индицират нестабилност или негодност.

IX. СЪБИРАНЕ НА ПРОБИТЕ И ОБРАБОТКА

- Серумът трябва да се съхраняват при температури 2 – 8°C.
- Ако тестът не се направи в рамките на 24 часа, се препоръчва съхранение при температура -20°C.
- Избягвайте последващи цикли на замразяване-размразяване.

X. ПРОЦЕДУРА

A. Общи бележки

Не използвайте кита или компонентите му след датата на изтичане срока на годност. Не смесвайте материали от различни партии китове. Преди употреба оставете всички реагенти на стайна температура. Внимателно смесвайте всички реагенти с пробите чрез нежно раклащане или въртеливо размесване. За да избегнете кръстосана контаминация, използвайте чист пипетен накрайник за еднократна употреба за добавянето на всеки реагент към съответната проба. Високо прецизираните пипети или автоматичните пипети биха подобрили точността. Съобразявайте се с времето за инкубация. Подгответе калибрационна крива за всяко измерване и не използвайте данни от предишни измервания.

B. Процедура

1. Означете две по две покритите епруветки за всеки калибратор, контрола и проба. За определяне на общия брой импулси, обозначете 2 нормални епруветки.
2. Разклатете за кратко време калибраторите, контролите и пробите и разпределете по 50 µl от всяко в съответните епруветки.
3. Разпределете 50 µl от анти-hGH-¹²⁵I трейсер във всяка епруветка, включително и в епруветките без покритие за общия брой импулси.
4. Разтърсете нежно с ръка стойката с епруветките, за да освободите някое остатъчно въздушно мехурче.
5. Инкубирайте за 2 часа при стайна температура.
6. Аспирирайте (или прелейте) съдържанието на всяка епруветка (освен епруветките за определяне на общия брой импулси). Уверете се, че пластмасовият край на аспиратора достига дъното на покритата епруветка, за да може да отстрани цялата течност.
7. Изплакнете епруветките с 3 ml от Измиващия разтвор (освен епруветките за определяне на общия брой импулси). Избягвайте получаването на пяна по време на добавянето на Работния измиващ разтвор.
8. Аспирирайте (или прелейте) съдържанието на всяка епруветка (освен епруветките за определяне на общия брой импулси).
9. Изплакнете отново епруветките с 3 ml от Измиващия разтвор (освен епруветките за определяне на общия брой импулси) и аспирирайте (или прелейте).
10. След последното изплакване, оставете епруветките да стоят обърнати нагоре за две минути и аспирирайте останалите капчици от течността.
11. Отчетете епруветките в гама брояч за 60 секунди.

XI. ИЗЧИСЛЯВАНЕ НА РЕЗУЛТАТИТЕ

1. Изчислете средното аритметично на резултатите, получени от две по две епруветките.
2. На полулогаритмична или линейна диаграма върху графична хартия нанесете (на ординатата) броят на минута за всеки калибратор (общ брой импулси в минута) спрямо (на абсцисата) съответната

концентрация на hGH и начертайте калибрационна крива през калибрационните точки като не включвате точките, които очевидно не принадлежат към тази крива.

3. Прочетете концентрациите за всяка контрола и проба чрез интерполиране върху калибрационната крива.
4. Тези изчисления могат да се улеснят чрез асистирано редуциране на данните посредством компютър. Ако се използва автоматична обработка на резултатите, се препоръчва прилагането на 4-параметрова логистична функционална крива.

XII. ХАРАКТЕРНИ ДАННИ

Данните, изложени по-долу са само за илюстрация и никога не бива да се използват вместо истинската калибрационна крива.

hGH-IRMA	срп	В/Т (%)
Общ брой	126065	
Калибратор	0,0 $\mu\text{IU/ml}$	241
	1,0 $\mu\text{IU/ml}$	1254
	2,4 $\mu\text{IU/ml}$	2743
	8,0 $\mu\text{IU/ml}$	7817
	25,5 $\mu\text{IU/ml}$	19515
	59,1 $\mu\text{IU/ml}$	34310
	119,9 $\mu\text{IU/ml}$	49965

XIII. ИЗПЪЛНЕНИЕ И ОГРАНИЧЕНИЯ

A. Определен лимит

Двадесет нулеви калибратора са били изпитани заедно с комплект от други калибратори. Определения лимит, дефиниран като явната концентрация на две стандартни отклонения над средния брой при нулево свързване, е бил 0,04 $\mu\text{IU/ml}$.

B. Специфичност

Хормони с кръстосана реактивност са добавени към калибратор за ниски и високи стойности на hGH. Явният hGH отговор е измерен.

добавен хормон	hGH CAL 1 $\mu\text{IU/ml}$	hGH CAL 5 $\mu\text{IU/ml}$
-	0.60	65
hCG 300000 mIU/ml	0.63	63
hPL 50000 ng/ml	0.69	68
PRL 2000 ng/ml	1.35	63

Забележка: Тази таблица показва кръстосаната реактивност на hGH-IRMA.

C. Прецизност

ПО ВРЕМЕ НА ИЗПИТВАНЕТО МЕЖДУ ИЗПИТВАНЕТО

Серум	N	$\langle X \rangle \pm S.D.$ $\mu\text{IU/ml}$	CV (%)	Серум	N	$\langle X \rangle \pm S.D.$ $\mu\text{IU/ml}$	CV (%)
A	6	$6,7 \pm 0,3$	4,4%	A	20	$3,8 \pm 0,3$	8,1%
B	6	$19,0 \pm 0,2$	1,0%	B	20	$17,9 \pm 1,2$	6,7%

SD : Стандартно отклонение; CV: Коефициент на вариация

D. Точност

ВЪЗСТАНОВИТЕЛЕН ТЕСТ

Проба	Добавен hGH ($\mu\text{IU/ml}$)	Възстановен hGH ($\mu\text{IU/ml}$)	Възстановяване (%)
Серум 1	5	5,1	102%
	10	9,5	95%
	25	24,7	99%
	50	53,7	107%
Серум 2	60	63	105%
	40	46,8	117%
	20	22,1	111%
	10	10,2	102%
	5	4,8	96%

ТЕСТ С РАЗРЕЖДАНЕ

Проба	Разреждане	Теоретична концентрация ($\mu\text{IU/ml}$)	Измерена концентрация ($\mu\text{IU/ml}$)
Серум 1	1/1	-	35,6
	1/2	17,8	17,4
	1/4	8,9	8,8
	1/8	4,5	5,0
	1/16	2,2	2,4
	1/32	1,1	1,2

Пробите са били разредени с нулев калибратор.

Коефициент на преобразуване

1 μIU hGH-IRMA калибратор = 0,33 ng

E. Закъснение

Както е показано по-долу, резултатите от изпитването остават точни дори когато пробата е разпределена 30 минути след като калибраторът е бил добавен към покритата епруветка.

Серум ($\mu\text{IU/ml}$)	Закъснение		
	0'	15'	30'
Серум 1	4,4	4,5	4,8
Серум 2	18,8	18,1	19,3
Серум 3	27,6	26,2	27,0
Серум 4	36,5	36,8	36,6

F. Ефект на кукичката

Пробите, съдържащи до 4000 $\mu\text{IU/ml}$ hGH, дават по-високи резултати спрямо последната точка на калибриране.

XIV. ОГРАНИЧЕНИЯ

- Пробите от пациенти, които са приели препарати от миши моноклонални антитела за диагностика или лечение, могат да съдържат човешки анти-миши антитела (НАМА). Тези проби могат да покажат или фалшиво повишени, или намалени стойности, когато се тестват с китове, които използват миши моноклонални антитела.
 - Хетерофилните антитела в човешкия серум могат да реагират с реагентните имуноглобулини, смущавайки ин витро имунотестовите. Пациенти, рутинно изложени на животни или на продукти от животински серум, могат да бъдат предразположени към тези смущения и могат да се наблюдават аномални стойности в случай на наличие на хетерофилни антитела. Внимателно преценявайте резултатите на пациенти, за които има подозрения, че имат от тези антитела.
- Ако резултатите не са съвместими с други клинични наблюдения, ще се изисква допълнителна информация преди поставяне на диагноза.

XV. ВЪТРЕШЕН КАЧЕСТВЕН КОНТРОЛ

- Ако резултатите, получени за Контрола 1 и/или Контрола 2 не са в рамките на нивото, указано на етикета на флакона, то резултатите не могат да бъдат използвани, освен ако не се предостави задоволително обяснение на това несъответствие.
- По желание, всяка лаборатория може да си направи собствен комплект от контролни проби, които трябва да се съхраняват замразени в кратни съотношения.
- Критериите за приемане на разликата от двойните резултати на пробите трябва да се опират на Добрата Лабораторна Практика.

XVI. РЕФЕРЕНТНИ ИНТЕРВАЛИ

Стойностите, показани по-долу, са предоставени само за напътствие; всяка лаборатория трябва да установи свои собствен нормален обхват на стойности.

При нормални субекти секретията на хормона на растежа (hGH) е импулсна. През деня интервалът на концентрациите на hGH варира от <0.2

до 10 $\mu\text{U/ml}$. По време на сън концентрациите на hGH се увеличават значително ($\pm 30 \mu\text{U/ml}$).

Секретицията на hGH се стимулира до голяма степен от физически упражнения и стрес (спукване на вена, хипогликемия и т.н.), но се намалява при хипергликемия.

При нормални субекти ($n=34$), два часа след орално обременяване с глюкоза (75 g при възрастни), нивата на hGH стават по-ниски от $10 \mu\text{U/ml}$ а реакцията на hGH на стимулиращите тестове (с прием на инсулин, аргинин, глюкогон) е увеличаване над $20 \mu\text{U/ml}$.

Нивата на hGH се повишават (дори след обременяване с глюкоза) при акромегалия ($> 10 \mu\text{U/ml}$).

При недостиг на hGH реакцията на стимулиращите тестове липсва или е притъпена (нисък ръст, поради недостиг на hGH; хипопитуитаризъм с различен произход).

XVII. ПРЕДПАЗНИ МЕРКИ И ПРЕДУПРЕЖДЕНИЯ

Безопасност

Само за *in vitro* диагностика.

Този набор съдържа ^{125}I (полуживот: 60 дни), емитиращ йонизиращи X (28 keV) и γ (35.5 keV) лъчения.

Този радиоактивен продукт може да се пренася и да се използва само от оторизирани лица; покупката, съхранението, употребата и размяната на радиоактивни продукти са предмет на законодателството на държавата, на крайния потребител. Този продукт не бива в никакъв случай да се прилага на хора или животни.

Боравенето с радиоактивния продукт трябва да се извършва в определена за целта територия, далеч от регулярни зони на преминаване. В лабораторията трябва да се поддържа дневник за получаването и съхранението на радиоактивни материали. Лабораторната екипировка и стъклария, които могат да бъдат контаминирани с радиоактивни субстанции, трябва да бъдат отделени с цел да се избегне кръстосана контаминация с различни радионуклиди.

Всякакви радиоактивни пръски трябва да се почистват незабавно в съответствие с процедурите за радиационна безопасност. Радиоактивните отпадъци трябва да се изхвърлят, следвайки местните наредби и ръководства на властите, упражняващи юрисдикцията, над лабораториите. Придържането към основните правила за радиационна безопасност осигуряват адекватна защита.

Човешките кръвни компоненти, включени в кита, са били тествани чрез одобрени от Европейски и/или FDA (Американска агенция по храните и лекарствата) методи и са дали отрицателен резултат за HbsAg, анти-HCV, анти-HIV-1 и 2. Няма известен метод, който да дава пълна гаранция за това, че човешките кръвни деривати не пренасят хепатит, СПИН или други инфекции. Ето защо, боравенето със реагентите или серумните проби трябва да бъде в съответствие с местните процедури по безопасност.

Всички животински продукти и деривати са били събирани от здрави животни. Волските компоненти са с произход от страни, където BSE (волска серумна енцефалопатия) не е била установявана. Независимо от това, компонентите, съдържащи животински субстанции трябва да се третират като потенциално инфекциозни.

Избягвайте какъвто и да било кожен контакт с реагентите (съдържат натриев азид като консервант). Азидът в този кит може да реагира с оловото и медта във водопроводните инсталации като по този начин се получават силно експлозивни метални азиди. По време на измивния етап, промийте със силна и обилна струя вода канализацията, за да избегнете формирането на азиди.

Не пушете, не пийте, не яжте и не си слагайте козметика в работната територия. Не пипетирайте с уста. Използвайте защитно облекло и ръкавици за еднократна употреба.

XVIII. БИБЛИОГРАФИЯ

- CAMANNI F., MASSARA F., BELFORTE L., ROSATELLO A., MOLENATTI G.M. (1977)
Effect of dopamine on plasma growth hormone and prolactin levels in normal and acromegalic subjects.
J. Clin. Endo. and Metab., 44:465.
- DAUGHADAY W.H. (1981)
The adenohipophys
In : "Textbook of Endocrinology", R.H. Williams ed., W.B. Saunders, Philadelphia, p;73.
- DROBNY E.C., AMBURN K., BAUMANN G. (1983)
Circadian variation of basal plasma growth hormone in man.
J. Clin. Endo. and Metab., 57:524-528.
- HASHIDA S., NAKAWAGA K., ISHIKAWA E., OHTAKI S. (1985)
Basal level of human growth hormone (hGH) in normal serum.

Clin. Chim. Acta, 151:185-186.

- LEWIS V.J. et al. (1980)
Human growth hormone : A complex of proteins.
Rec. Progr. Horm. Res., 36:488.
- LI C.H. (1974)
Human growth hormone : perspective on its chemistry and physiology.
In : "Advances in human growth hormone research", S. Raiti ed. U.S. Department of Health, Education and Welfare Publ. DMEW publ. no. (NJH) 74-612, p. 321.
- REUTENS AT. (1995)
Evaluation and application of a highly sensitive assay for serum growth hormone (GH) in the study of adult GH deficiency.
J. Clin. Endocrinol. Metab., 80(2): 480-485
- CROWLEY S. et al. (1995)
Growth and the growth hormone axis in prepubertal children with asthma.
J. Pediatr. 126(2): 297-303.
- KELLY JT. et al. (1993)
Effect of different oral oestrogen formulations on insulin-like growth factor I, growth hormone and growth hormone binding protein in post-menopausal women.
Clin. Endocrinol. 39(5) : 561-567

XIX. ОБОБЩЕНИЕ НА ПРОТОКОЛА

	ОБЩА АКТИВНОСТ ml	КАЛИБРАТОРИ ml	ПРОБА (И) КОНТРОЛИ ml
Калибратори (0-6) Проби, контроли Трейсър	- - 0,05	0,05 - 0,05	- 0,05 0,05
Инкубация	2 часа при стайна температура		
Сепарация Измиващ разтвор	- -	аспирирайте (или прелейте) 3,0	
Сепарация Измиващ разтвор	- -	аспирирайте (или прелейте) 3,0	
Сепарация	-	аспирирайте (или прелейте)	
Броење	Отчетете епруветките за 60 секунди		