



**MONOBIND, INC.**  
**Costa Mesa, CA 92627 (USA)**

## **Гормон Роста (hGH)**

**CIA™ Chemiluminescence Assays ✧**

**Хемилюминесцентные тесты CIA**

**Код товара: 1775-300**

### **Назначение:**

Количественное определение концентрации гормона роста в человеческой сыворотке при помощи хемилюминесцентного иммуноферментного теста.

### **ОБЩАЯ ИНФОРМАЦИЯ И ОПИСАНИЕ ТЕСТА**

Гормон роста (hGH, соматотропин), вырабатываемый передней долей гипофиза, – это полипептид, состоящий из двух цепей с дисульфидной связью, который циркулирует свободно или привязанным к различным белкам. Было выделено несколько форм гормона роста, при этом основная имеет молекулярный вес 22,000 дальтонов и содержит 191 аминокислотный остаток. Важным считается и вариант с массой 20000 дальтонов, который выполняет все известные биологические функции гормона роста. GH влияет на целевые органы, такие как кости и мышцы, прямо, а также косвенно через выделение соматомединов, семейство гормонов инсулиноподобных факторов роста (IGF), производимых печенью. В частности, соматотропин С (IGF-1) необходим для роста костей в детстве.

Клинически измерение гормона роста (GH) у детей требуется для подтверждения линейности роста костей вдоль эпифизарного хряща. Аномально высокий уровень GH ведет к гигантизму, в то время как полное отсутствие снижает темп роста до

одной третьей - половины нормального. У взрослых повышение GH постепенно приводит к акромегалии, то есть грубому утолщению костей черепа, рук и ног.

При проведении данного теста, сначала калибратор hGH, препарат пациента или контроль вносят в лунку, покрытую стрептавидином. Добавляют биотинилированное моноклональное антитело и антитела, меченые ферментами (направленные на различные участки эпитопа гормона роста), и реагенты смешивают. В результате реакции между различными антителами hGH и нативным hGH формируется сэндвичевый комплекс, который не отделяется от лунки.

После окончания необходимого периода инкубации, несвязанные антитела с ферментами отделяют от связанного конъюгата антител hGH при помощи декантации или аспирации. Для определения активности ферментов на поверхности лунки добавляют подходящий субстрат, и измеряют люминометром уровень люминесценции.

Используя несколько известных различных контрольных показателей концентрации гормона роста, можно построить кривую дозовой зависимости и найти с ее помощью неизвестную концентрацию гормона.

## ПРИНЦИП

### Иммуноферментный тест:

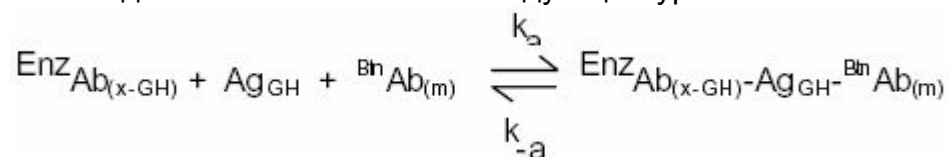
Необходимые реагенты для иммуноферментного анализа включают:

Необходимые реагенты для иммуноферментного анализа включают:

высокоаффинные и специфичные антитела (связанные ферментами и иммобилизованные), с различным и четким распознаванием эпитопа, **в избытке**, и нативный антиген.

При этой процедуре иммобилизация происходит во время теста на поверхности лунки микропланшета при взаимодействии стрептавидина сверху и добавления извне моноклонального антитела к hGH (Ab).

При смешивании моноклонального антитела, антитела, помеченного ферментами, и сыворотки, содержащей нативный антиген, происходит реакция между нативным антигеном и антителами, без конкуренции или стерического несоответствия, в результате которой формируется растворимый сэндвичевый комплекс. Взаимодействие описывается следующим уравнением:



$\text{Bn}_{\text{Ab}_{(m)}}$  - биотинилированное моноклональное антитело (в избытке)

$\text{Ag}_{\text{GH}}$  - нативный антиген

$\text{Enz}_{\text{Ab}_{(p)}}$  - антитело, помеченное ферментами (в избытке)

$Enz_{Ab_{(x-GH)}-Ag_{GH}-^{Bn}Ab_{(m)}}$  - сэндвичевый комплекс антиген-антитело

$k_a$  - постоянная скорость ассоциации

$k_{-a}$  - постоянная скорость диссоциации

Одновременно комплекс оседает в лунке благодаря реакции высокого сродства между стрептавидином и биотинилированным антителом.

Эта реакция показана ниже:



$Streptavidin_{c.w.}$  - иммобилизованный стрептавидин на поверхности лунки

$Immobilized\ complex$  - сэндвичевый комплекс на поверхности лунки

После достижения равновесия, фракция антиген-антитело отделяется от несвязанного антигена при помощи декантации или аспирации. Активность ферментов в фракции связанных антител прямо пропорциональна концентрации нативного антигена. Добавляется субстрат для определения интенсивности люминесценции при помощи люминометра. Интенсивность света прямо пропорциональна концентрации hGH в пробе. Используя несколько различных известных контрольных показателей антигена, можно построить кривую дозовой зависимости и найти с ее помощью неизвестную концентрацию антигена.

## РЕАГЕНТЫ И МАТЕРИАЛЫ:

### **A. Калибраторы гормона роста – 1.0 ml/пробирка (высушенные) [Обозначения А – F]**

Шесть (6) пробирок для сравнения с значением hGH для уровней антигена 0(A), 5(B), 10(C), 25(D), 50(E), и 150(F)  $\mu$ lU/ml. Восстановленные калибраторы можно хранить в течение 60 дней при температуре 2-8°C.

Консервирующее вещество добавлено.

**Примечание:** калибраторы на основе человеческой сыворотки были откалиброваны при использовании эталонного препарата, составленного по WHO 2rd IS (98/574).

### **B. Меченый реагент hGH—13 ml/пробирка**



Одна (1) пробирка, содержащая моноклональное антитело, меченное ферментами, биотинилированный моноклональный мышинной IgG сухой, консервированный, буфер. Хранить при температуре 2-8°C.

### **C. Лунки со Стрептавидином - 96 лунок - Значок ↓**

Белый микропланшет с 96 лунками, покрытыми стрептавидином и упакованные в алюминиевую оболочку с осушающим реагентом. Хранить при температуре 2-8°C.

**D. Концентрат промывающего раствора -- 20ml – значок**

Одна (1) пробирка, содержащая сурфактант в забуференном растворе. Добавлен консервант. Хранить при температуре 2-30°C (см. Раздел по подготовке реагентов).

**E. Сигнальный реагент А – 7мл/пробирка - Обозначение S<sup>A</sup>**

Одна (1) бутылка с люминалом в буфере. Хранить при температуре 2-8°C. (см. Раздел по подготовке реагентов).

**F. Сигнальный реагент В – 7мл/пробирка - Обозначение S<sup>B</sup>**

Одна (1) бутылка, содержащая перекись водорода (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>) в буфере. Хранить при температуре 2-8°C (см. Раздел по подготовке реагентов).

**H. Вкладыш в упаковку.**

**Примечание 1:** Не используйте реагенты, у которых истек срок годности.

**Примечание 2:** Открытые реагенты стабильны в течение 60 дней при температуре 2-8°C.

**Примечание 3:** Реагенты предназначены для использования вместе с планшетом с 96-ю лунками.

**ДОПОЛНИТЕЛЬНЫЕ МАТЕРИАЛЫ [НЕ ПОСТАВЛЯЕМЫЕ]:**

1. Пипетка для раскапывания объема 25 µl с точностью выше 1.5%.
2. Диспенсер(ы) для многократного распределения объемов в 0.100ml и 0.300ml с точностью выше 1.5%.
3. Промывающее устройство для микропланшетов или пластиковая бутылка (дополнительно).
4. Микропланшетный люминометр.
5. Абсорбирующая бумага для декантации лунок микропланшета
6. Пластиковая оболочка или крышка микропланшета для проведения инкубации.
7. Вакуумный аспиратор (дополнительно) для промывания.
8. Таймер.
9. Материалы для контроля качества.
10. Пробирки для смешивания субстратов А и В.

**МЕРЫ ПРЕДОСТОРОЖНОСТИ**

***Для диагностики In Vitro***

***Не предназначен для внутреннего или наружного употребления животными или человеком.***

Реагенты, содержащие сыворотку крови человека, тестировались на наличие антител к ВИЧ 1 и 2, вирусу гепатита С, поверхностному антигену вируса гепатита В. Были получены отрицательные результаты. Однако поскольку ни один тест не может

дать полной гарантии отсутствия инфекционных агентов, всю человеческую сыворотку следует считать потенциально опасной и инфекционной и обращаться с ней в соответствии с государственными нормами для биологически опасных веществ 2 группы. Подходящие лабораторные правила обращения с препаратами крови можно найти в "Biosafety in Microbiological and Biomedical Laboratories," 2-я редакция, 1988, NHS

## **СБОР И ПОДГОТОВКА ПРЕПАРАТОВ**

Забор крови из вены руки следует производить согласно стандартной процедуре, с соблюдением соответствующих мер предосторожности. Чтобы обеспечить возможность сравнения с контрольными значениями, нужно собирать сыворотку у пациента утром натощак. Для сбора крови используются простые пробирки с красной крышкой без геля или добавок. Дайте крови свернуться. Центрифугируйте препарат, чтобы отделить сыворотку от клеток.

Для анализа можно использовать как свежеполученные образцы сыворотки крови, так и образцы, хранившиеся при температуре от 2 до 8°C не более пяти (5) дней или при температуре минус 20°C не более 30 дней. Не допускается повторное замораживание-размораживание, приводящее к искажению результатов. При тестировании с дубликатами требуется 0.050 мл препарата.

## **ПОДГОТОВКА И ХРАНЕНИЕ РЕАГЕНТОВ:**

### **1. Промывной Буфер**

Растворите концентрат промывающего раствора в подходящем контейнере в дистиллированной или деионизированной воде, так чтобы его объем составлял 1000 мл. Храните при комнатной температуре (20-27°C) в течение 60 дней.

### **2. Рабочий раствор индикаторного реагента – готовить ежедневно**

Смешайте равные объемы раствора 'А' и раствора 'В' в чистом контейнере. Используйте в течение 60 минут после этого. Например, добавьте 1 мл А и 1 мл В в два стрипа с восьмью лунками (получится небольшой избыток раствора. Выбросьте неиспользованную долю раствора).

## **ПРОЦЕДУРА ТЕСТА**

*Перед проведением теста, доведите все реагенты, контроли и калибраторы сыворотки до комнатной температуры (20 - 27° C).*

1. Подготовьте лунки микропланшета для калибраторов, контрольных проб и препаратов пациента в дубликатах.

**Поместите неиспользованные микрострипы обратно в алюминиевую упаковку, закройте ее и храните при температуре 2-8°C.**

2. Внесите 0.025 ml (25µl) калибраторов, контрольных проб и препаратов в соответствующие лунки.
3. Добавьте 0.100 ml (100µl) раствора конъюгата GH в каждую лунку. **Необходимо вносить все реагенты как можно ближе ко дну лунки.**
4. Осторожно поворачивайте планшет в течение 20-30 секунд, чтобы реагенты перемешались. Закройте планшет пластиковой пленкой.
5. Инкубируйте в течение 45 минут при комнатной температуре.
6. Удалите содержимое лунок микропланшета при помощи декантирования или аспирации. При декантировании тщательно удалите остатки жидкости из лунок при использовании абсорбирующей бумаги.
7. Добавьте 300µl промывающего раствора (см. раздел о подготовке реагентов), декантируйте или аспирируйте. Повторите еще два (2) раза (общее число промываний – три (3)). **Можно использовать автоматическое или ручное устройство для промывания планшетов. В таком случае следуйте инструкциям производителя по эксплуатации. При использовании бутылки, наполняйте каждую лунку доверху, сжимая контейнер. Избегайте появления пузырьков. Декантируйте и повторите еще два (2) раза.**
8. Добавьте 0.100 ml (100µl) раствора субстрата во все лунки. **(см. раздел о подготовке реагентов). Всегда добавляйте реагенты в одном и том же порядке, чтобы минимизировать разницу времени реакции у различных лунок.**
9. Инкубируйте при комнатной температуре в течение пяти (5) минут в темноте.
10. Считайте RLU (относительные световые единицы) при помощи микропланшетного люминометра на 96 лунок (0.2 секунды на лунку). **Измерение должно проводиться в течение тридцати (30) минут после остановки реакции.**

## **КОНТРОЛЬ КАЧЕСТВА**

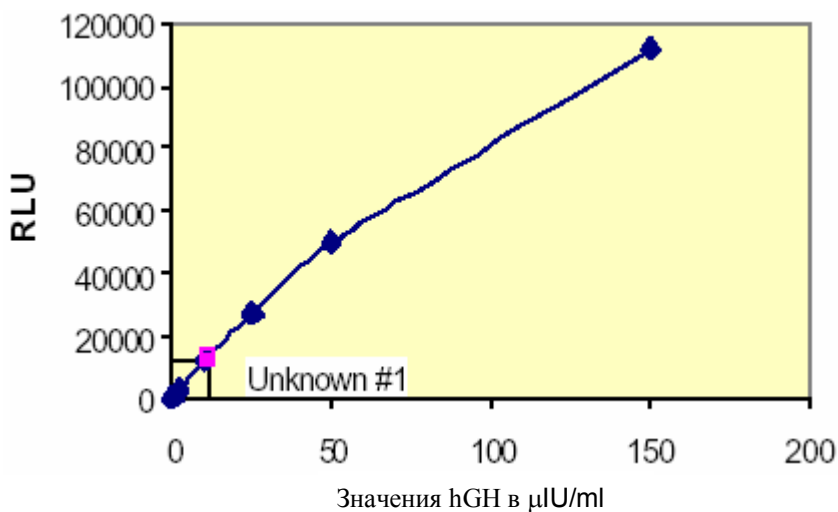
Каждая лаборатория должна проверять контроли в низком, среднем и высоком диапазоне для мониторинга проведения теста. Значение этих контролей следует определять во время каждой процедуры теста. Необходимо составлять графики контроля качества для проверки поставляемых реагентов и выявлять тренды при помощи подходящих статистических методов. Значительное отклонение от обычных показателей указывает на незамеченное изменение в условиях проведения теста или на деградацию реагентов в наборе. В этом случае используйте свежие реагенты, чтобы определить причину отклонений.

## РАСЧЕТ И РЕЗУЛЬТАТЫ

Для нахождения неизвестной концентрации гормона роста в препаратах используется кривая дозовой зависимости.

1. Запишите RLU (интенсивность сигнала люминесценции), указанную в распечатке микропланшетного анализатора (Образец 1).
2. Постройте на миллиметровой бумаге график зависимости RLU каждого дубликата калибраторов от концентрации hGH в  $\mu\text{IU/ml}$  (не усредняйте значения калибраторов перед построением графика).
3. Проведите через точки на графике наиболее подходящую кривую.
4. Чтобы определить неизвестную концентрацию hGH, отложите среднее RLU каждого препарата на вертикальной оси графика, найдите точку пересечения с кривой и по горизонтальной оси графика определите концентрацию (в  $\mu\text{IU/ml}$ ) (можно найти среднее для дубликатов препаратов с неизвестной концентрацией).

Рис.1



ОБРАЗЕЦ 1

Sample I.D.	Well Number	RLU (A)	Mean RLU (B)	Value ( $\mu$ IU/ml)
Cal A	A1	703	679	0
	B1	655		
Cal B	C1	3132	3044	2.0
	D1	2956		
Cal C	E1	12752	12574	10.0
	F1	12397		
Cal D	G1	26744	26784	25.0
	H1	26824		
Cal E	A2	53935	57636	50.0
	B2	61338		
Cal F	C2	112907	111921	150.0
	D2	110934		
Ctrl 1	E2	3794	3919	3.7
	F2	4044		
Ctrl 2	G2	12358	12685	10.6
	H2	13012		
Patient	A3	31415	32010	31.0
	B3	32605		

\* Данные на образце 1 и на рисунке 1 представлены только для демонстрации и не должны использоваться вместо кривой дозовой зависимости, составляемой при проведении каждого теста.



## ОГРАНИЧЕНИЯ ПРОЦЕДУРЫ

### А. Проведение теста

1. Время реакции во всех лунках должно быть одинаковым, чтобы обеспечить воспроизводимость результатов.
2. Пипетирование проб не должно занимать более десяти (10) минут во избежание смещения результатов теста.
3. При использовании более одного (1) планшета, рекомендуется повторять построение кривой дозового ответа.
4. Недостаточное промывание лунок планшета при аспирации или декантации может привести к получению искаженных результатов.
5. Используйте компоненты из одного набора. Не смешивайте реагенты из разных наборов.
6. Препараты с концентрациями от  $50\mu\text{IU/ml}$  до  $1000\mu\text{IU/ml}$  дают результат выше, чем стандарт  $50\text{ng/dl}$ , поэтому их нужно разбавлять и анализировать повторно.
7. Пациенты, получающие заместительную терапию GH могут вырабатывать антитела к GH, что затрудняет анализ и искажает результаты. Генетические вариации или деградация реагентов могут повлиять на связывание антител и соответственно на конечный результат. Тестирование таких препаратов дает разные результаты при использовании наборов реагентов с различными антителами.

### В. Интерпретация

1. При использовании компьютерной программы для интерпретации результатов теста, требуется, чтобы прогнозируемые значения калибраторов оказывались в пределах 10% от соответствующих концентраций.
2. Секреция гормона роста имеет суточный ритм, GH выделяется импульсами, чередующимися в течение дня с периодами, когда гормон роста не определяется. Самый высокий уровень (достигаемый двумя главными выбросами) обычно наступает через 1-2 часа после засыпания. Другими физиологическими стимулами гормона роста являются стресс, физические нагрузки, высокобелковая диета и гипогликемия.
3. Гипергликемия препятствует секреции гормона роста. Возраст сильно влияет на концентрацию гормона. После рождения концентрация GH очень высока и постепенно снижается с возрастом, за исключением фазы роста в подростковый период. У женщин концентрация обычно на 50% выше, чем у ровесников-мужчин.
4. Поскольку гормон роста вырабатывается неравномерно в течение дня (и имеет короткий период полужизни), тест одной пробы сыворотки обычно не несет полезной клинической информации. Для решения этой проблемы используются провокационные физиологические или фармацевтические стимулы для увеличения или снижения секреции гормона роста. Поэтому только результатов теста на гормон роста недостаточно для оценки клинического статуса.

## ОЖИДАЕМЫЕ ЗНАЧЕНИЯ

Поскольку секреция гормона роста неравномерна и нерегулярна, приводить диапазон нормальных значений бессмысленно. Однако в норме концентрация гормона редко превышает 150 mIU/ml.

У хорошо отдохнувших людей, концентрация GH натощак (через 12 часов после последнего приема пищи) должна составлять менее 60 mIU/ml.

С учетом этого были протестированы препараты 75 явно здоровых взрослых. Результаты приведены в таблице 1.

### ТАБЛИЦА I

#### Ожидаемые результаты теста CIA на гормон роста (в mIU/ml)

	Количество	Среднее	Диапазон
Препараты	175	9.1	0-55

Обычно используются провокационные тесты на выработку GH для оценки функции передней доли гипофиза. Стимулирующие процедуры позволяют определить способность передней доли гипофиза секретировать hGH. Таким процедурам подвергают детей, у которых подозревают задержку роста. Существует несколько динамических тестов для стимуляции выброса GH: (3) физические упражнения, назначение L-дофа (4), тест на толерантность к инсулину (5) и вливание аргинина (6). Каждая лаборатория должна выработать собственные показатели ожидаемых значений, но пиковый выброс GH, превышающий 24µIU/ml, обычно соответствует норме во всех случаях.

Тесты на оценку подавления выброса hGH из переднего отдела гипофиза проводится для определения избытка гормона роста и диагностики гигантизма или акромегалии. Тест на толерантность к глюкозе – это динамический тест на оценку избытка гормона роста. Отсутствие падения GH ниже 1µIU/ml в течение 60-120 минут указывает на избыток секреции гормона роста.

Помните, что нахождение диапазона нормальных значений для популяции зависит от множества факторов: специфичности метода, тестируемой популяции и точности метода, используемого лаборантом. Поэтому любая лаборатория должна использовать указанный производителем диапазон только до тех пор, пока выработает собственные пределы нормальных значений, основываясь на результатах анализов людей, живущих там же, где расположена лаборатория.

## ХАРАКТЕРИСТИКИ АНАЛИЗА

### А. Сходимость

Внутри- и межаналитическая точность системы оценивалась при помощи анализов на трех различных уровнях смешанной контрольной сыворотки. Номер, среднее значение, стандартное отклонение и коэффициент вариации для каждой пробы контрольной сыворотки приведены в таблицах 2 и 3.

## ТАБЛИЦА 2

Внутрианалитическая сходимость (ед.изм. -  $\mu\text{IU/ml}$ )

ПРОБА	N	X	$\sigma$	C.V.
Уровень 1	12	9.0	0.30	3.3
Уровень 2	12	23.7	1.2	5.0
Уровень 3	12	39.3	1.5	3.8%

## ТАБЛИЦА 3

Межаналитическая сходимость (ед.изм. -  $\mu\text{IU/ml}$ )

ПРОБА	N	X	$\sigma$	C.V.
Уровень 1	10	8.7	0.39	4.5%
Уровень 2	10	25.2	1.65	6.5%
Уровень 3	10	38.4	2.16	5.6%

\*данные получены в 10 экспериментах с использованием дубликатов.

## В. Точность

Было проведено сравнение *Monobind hGH Microplate CIA™* со стандартным радиоиммунологическим тестом с применением биологических препаратов (с нормальной и повышенной концентрацией). Общее количество исследованных препаратов – 80. Полученные данные представлены в таблице 4.

Метод	Среднее (x)	Регрессия методом наименьших квадратов	Коэффициент корреляции
Этот метод	15.2	$y=0.091+0.98(x)$	0.985
Метод для сравнения	15.4		

Есть лишь небольшая разница в средних значениях, полученных по данному методу (*CIA™ hGH*) и стандартному методу. Метод наименьших квадратов и коэффициент корреляции показывают отличную согласованность методов.

## С. Чувствительность

Чувствительность теста на гормон роста равна  $0.0125 \mu\text{IU}$ , что эквивалентно пробе с концентрацией  $0.5 \mu\text{IU/ml}$ .

## Д. Специфичность

Перекрестная реактивность антител гормона роста на выбранные вещества оценивалась путем добавления дополнительных веществ в матрицу сыворотки в указанных ниже концентрациях. Для определения перекрестной чувствительности рассчитывается отношение между дозой дополнительного вещества и дозой hGH с одинаковой абсорбцией.

<b>Вещество</b>	<b>Перекрестная реактивность</b>
Гормон роста (GH)	1.0000
Лютеинизирующий гормон (LH)	< 0.0001
Фоллитропин (FSH)	< 0.0001
Хорионический гонадотропин (CG)	< 0.0001
Тиротропин (TSH)	< 0.0001
Пролактин (PRL)	< 0.0001

### **СПИСОК СПРАВОЧНОЙ ЛИТЕРАТУРЫ**

1. Lewis, U.J., et al, *Acta Paediatr*, **125**, 399 (1994).
2. Henry, J.D., *Clinical Diagnosis and Management of Laboratory Methods*, W.B. Saunders Company, 324 (1996).
3. Frasier, S.D., *Pediatrics.*, **53**, 929 (1978).
4. Chevenne, D., et al, *Horm. Res.*, **40**, 168 (1993).
5. Dattani, M.T., et al, *J Endocrinol*, **133**, 447 (1992).
6. Merimee, T.J., et al, *N Eng J Med.*, **276**, 434 ((967).
7. Kraemer RR, Blair MS, McCaferty R, Castracane VD. Runninginduced alterations in growth hormone, prolactin, triiodothyronine, and thyroxine concentrations in trained and untrained men and women. *Res Q Exerc Sport* 1993;64:69-74.
8. Winer LM, Shaw MA, Baumann G. Basal plasma growth hormone levels in man: new evidence for rhythmicity of growth hormone secretion. *J Clin Endocrinol Metab* 1990;70:1678-1686.
9. Van der Berg G, Veldhuis JD, Frölich M, Roelfsema F. An amplitude-specific divergence in the pulsatile mode of growth hormone (GH) secretion underlies the gender difference in mean GH concentrations in men and premenopausal women. *J Clin Endocrinol Metab* 1996;81:2460-2467.
10. Albertsson-Wikland K, Rosberg S, Karlberg J, Groth T. Analysis of 24-hour growth hormone profiles in healthy boys and girls of normal stature: relation to puberty. *J Clin Endocrinol Metab* 1994;78:1195-1201

**Редакция: 2.**

**Date: 08.30.02**

**Cat# 1775-300.**

**Monobind Inc.  
729 West 16th Street  
Costa Mesa. CA 92627**

Tel: 949-642-4830  
Fax: 949-650-8459  
Email: [info@monobind.com](mailto:info@monobind.com)  
Вебсайт: [www.monobind.com](http://www.monobind.com)

**Пожалуйста, посетите наш вебсайт, чтобы узнать больше о предоставляемых нами товарах и услугах.**