

НАБОР ИФА ДЛЯ ОПРЕДЕЛЕНИЯ ГОРМОНА РОСТА

CAN-GH-4070, Growth Hormone

Каталог. № : CAN-GH-4070
Производитель: **Diagnostics Biochem
Canada Inc., (Канада)**

Методика от 25-10-2010
Версия 6.0



Основой при проведении анализа является оригинал инструкции на английском языке, вложенной в набор. Номер и дата версии оригинала и перевода инструкции должны совпадать.

Только для использования в in-Vitro диагностике

НАЗНАЧЕНИЕ

Набор предназначен для прямого количественного определения гормона роста в сыворотке человека методом иммуноферментного анализа. Только для диагностики in vitro.

ПРИНЦИП МЕТОДА

Данный метод основан на обычном иммуноферментном анализе сэндвичевого типа. В наборе используются два вида высоко специфичных моноклональных антител. Моноклональные антитела, специфичные к гормону роста иммобилизованы на ячейках микропланшета, а другие моноклональные антитела, специфичные к другому фрагменту гормона роста, конъюгированы с пероксидазой хрена. Гормон роста из образца или стандартов может связываться одновременно с планшетом и конъюгатом. Промывка удаляет несвязавшиеся конъюгаты. Затем, после промывки, добавляется ферментный субстрат. Ферментная реакция останавливается добавлением стоп-раствора. Абсорбция измеряется с помощью микропланшетного анализатора. Интенсивность окрашивания, сформировавшегося в ходе ферментной реакции, прямо пропорциональна концентрации гормона роста в образце. Для построения калибровочной кривой используется набор стандартов. Концентрация гормона роста в исследуемых образцах может быть рассчитана непосредственно из калибровочной кривой.

КЛИНИЧЕСКОЕ ПРИМЕНЕНИЕ

Человеческий гормон роста (hGH) – полипептид из 191 остатков АК, секретируемый в специфических клетках (соматотрофах) передней доли гипофиза. Гормон роста важнейший регулятор роста, характеризующийся главным образом анаболическим эффектом. Гормон роста способствует сохранению белковой массы через различные механизмы, включая синтез белка, транспорт глюкозы, катаболизм гликогена. Кроме того он способствует высвобождению соматомединов (инсулиноподобных факторов роста), которые в свою очередь также участвуют в каскаде реакций, обеспечивающих рост. Определение гормона роста прежде всего интересно для диагностики и лечения различных форм нарушений, ассоциированных с низким уровнем hGH. Сниженная секреция hGH у детей приводит к задержке роста, а гиперсекреция приводит к гигантизму у детей и акромегалии у взрослых. Интенсивность секреции hGH меняется в течение суток под влиянием нейрогенных, метаболических и гормональных факторов. Поэтому некорректно судить об уровне hGH лишь по одному измерению. Диагностика нарушений секреции hGH более достоверна, если основывается на уровнях hGH измеренных через определенные периоды стимуляции или подавления его секреции.

ЗАМЕЧАНИЯ ПО ПРОЦЕДУРЕ МЕТОДА И МЕРЫ ПРЕДОСТОРОЖНОСТИ

1. Для успешного проведения анализа необходимо полное понимание данной инструкции пользователями. Достоверные результаты могут быть получены только при строгом и тщательном соблюдении данной инструкции, поставляемой с набором.
2. Контрольные материалы или пулы сывороток, с высоким и низким значениями, должны быть включены в каждую постановку, для оценки достоверности результатов.
3. Используйте деионизированную или дистиллированную воду, там, где в инструкции указано использование воды для разведения или растворения.
4. Для того, чтобы избежать контакта с потенциально опасными веществами, необходимо одевать перчатки при работе с реагентами набора и образцами сывороток.

5. Все образцы и реагенты набора должны достичь комнатной температуры и быть аккуратно, тщательно перемешаны перед использованием. Избегайте повторных замораживания и оттаивания образцов и реагентов.
6. Калибровочная кривая должна строиться в каждой постановке.
7. Контроль должен быть включен в каждую постановку. Его значение, полученное при тестировании, должно соответствовать указанному диапазону допустимых значений.
8. Неточное соблюдение процедуры, техники анализа, неточное пипетирование, неполные промывки, а также несоблюдение условий хранения реагентов набора может привести к недостоверным результатам, к тому, что результат, полученные для контроля, не попадет в диапазон допустимых значений.
9. Присутствие пузырьков воздуха в лунках микропланшета влияет на результаты при считывании оптической плотности (ОП) с использованием микропланшетного анализатора. Перед считыванием результатов тщательно удалите все пузырьки с поверхности жидкости.
10. Раствор субстрата (ТМВ) чувствителен к свету и должен оставаться бесцветным при правильном хранении. Нестабильность или загрязнение реагента могут проявиться в вид окрашивания реагента в голубой цвет. В этом случае реагент использовать нельзя.
11. При внесении субстрата и стоп-раствора не используйте пипетки, в которых эти растворы могли бы контактировать с металлическими частями.
12. Для предотвращения контаминации реагентов и образцов используйте новые одноразовые сменные наконечники для каждого реагента, контроля, стандарта или образца.
13. Не смешивайте и не используйте реагенты из других наборов или лотов, не используйте набор после истечения срока годности, указанного на этикетке.
14. Реагенты набора должны считаться опасными веществами и с ними необходимо работать, соблюдая принятые в лаборатории правила безопасности.

ОГРАНИЧЕНИЯ

1. Все реагенты, входящие в состав набора, предназначены для непосредственного определения гормона роста в сыворотке человека. Данный набор не предназначен для определения гормона роста в слюне, плазме или других образцах человеческого или животного происхождения.
2. Не используйте образцы с сильным гемолизом, липемией, желтухой или неправильно хранившуюся сыворотку.
3. Любые образцы или контрольные сыворотки, содержащие азид натрия или тимерозал не совместимы с данным набором. Их анализ может привести к ложным результатам.
4. Для разведения сывороток с высокими концентрациями может быть использован только калибратор А. Использование любого другого реагента может привести к ложным результатам.
5. Результаты, полученные с помощью данного набора, никогда не должны использоваться как единственное основание для постановки диагноза. Например, присутствие гетерофильных антител у пациентов, регулярно контактирующих с животными или с материалами животного происхождения, потенциально может влиять на результаты иммунологического анализа. Следовательно, клиническая диагностика должна базироваться на полном обследовании пациента, учитывая, в том числе, интенсивность контактов с животными/продуктами, если можно подозревать ложные результаты.
6. Некоторые пациенты могут иметь антитела к мышному белку, что может влиять на результаты исследования. Поэтому результаты обследования пациентов, которые получали мышинные антитела для диагностики или терапии, должны интерпретироваться с осторожностью.

ПОТЕНЦИАЛЬНО БИООПАСНЫЕ МАТЕРИАЛЫ. ПРЕДОСТЕРЕЖЕНИЯ

Сыворотка человека, которая могла быть использована при приготовлении реагентов, стандартов и контролей, была протестирована с отрицательными результатами на содержание поверхностного антигена гепатита В, антител к ВИЧ и вирусу гепатита С. Однако не существует метода, полностью гарантирующего отсутствие таких инфекционных агентов как ВИЧ, гепатит В, С и других. Таким образом, реагенты должны рассматриваться как биологически опасные материалы и обращаться с ними необходимо в соответствии с нормами, принятыми в лаборатории для образцов крови.

ХИМИЧЕСКАЯ ОПАСНОСТЬ

Избегайте контактов с реагентами, содержащими ТМВ, перекись водорода и соляную кислоту. При контакте с такими реагентами тщательно промойте место контакта большим количеством воды. ТМВ может быть канцерогенным веществом.

СБОР И ХРАНЕНИЕ ОБРАЗЦОВ

Для проведения анализа в дублях необходимо приблизительно 0.1 мл сыворотки. Соберите 4-5 мл крови в соответствующую надписанную пробирку и дайте ей свернуться. Центрифугируйте и аккуратно соберите сыворотку. Храните при 4°C не более 24 часов. Для более длительного хранения необходимо заморозить образец при температуре -10°C или ниже. Считайте все образцы крови человека потенциально инфекционно опасными и обращайтесь с ними с соответствующими предосторожностями.

ПОДГОТОВКА ОБРАЗЦОВ

Предварительная подготовка образцов не требуется.

НЕОБХОДИМЫЕ, НО НЕ ПОСТАВЛЯЕМЫЕ МАТЕРИАЛЫ

1. Дозаторы на 25, 50, 100 и 300 мкл
2. Одноразовые сменные наконечники
3. Деионизированная или дистиллированная вода
4. Микропланшетный шейкер
5. Микропланшетный фотометр с длиной волны измерения 450 нм и верхним пределом ОП 3.0 или более*(см шаг 10 процедуры).

ПОСТАВЛЯЕМЫЕ РЕАГЕНТЫ

1. Микропланшет, покрытый мышинными антителами к гормону роста (с «ломаемыми» стрипами) - 96-ячеечный микропланшет (8x12), покрытый моноклональными антителами в закрываемом пакете с осушителем.

Хранение: охлажденным при 2 – 8°C

Стабильность: 12 месяцев или до срока годности, указанного на этикетке.

2. Концентрат конъюгата мышинных анти-hGH антител с пероксидазой хрена (100X) – требует приготовления.

Содержание: Мышиные моноклональные анти-hGH антитела, конъюгированные с пероксидазой хрена в белковом буфере с консервантом, не содержащим ртути.

Объем: 200 мкл во флаконе

Хранение: охлажденным при 2 – 8°C

Стабильность: 12 месяцев или до срока годности, указанного на этикетке.

Приготовление: Перед использованием развести в соотношении 1:100 в рабочем буфере (например, 20 мкл концентрата конъюгата в 2 мл рабочего буфера). При использовании всего микроплшета разведите 120 мкл конъюгата в 12 мл рабочего буфера. Разведенный неиспользованный конъюгат должен быть выброшен.

3. Стандарты гормона роста - готовы к использованию.

Содержание: 6 флаконов, содержащих гормон роста в белковом буфере с консервантом, не содержащим ртути.

Приготовлены добавлением 1080 известных количеств гормона роста в буфер.

Прокалиброваны по стандарту ВОЗ IS 80/505.

* В таблице приведены приблизительные концентрации, точные значения указаны на этикетках флаконов.

Стандарт	Концентрация	Объем
Стандарт А	0 нг/ мл	2.0 мл
Стандарт В	1 нг/ мл	0.5 мл
Стандарт С	5 нг/ мл	0.5 мл
Стандарт D	10 нг/ мл	0.5 мл
Стандарт E	25 нг/ мл	0.5 мл
Стандарт F	50 нг/ мл	0.5 мл

Хранение: охлажденным при 2 – 8°C

Стабильность: невскрытые флаконы хранятся 12 месяцев или до срока годности, указанного на этикетке. После вскрытия стандарты должны быть использованы в течение 14 дней или аликвотированы и заморожены для более длительного хранения. Избегайте повторных циклов замораживания-оттаивания.

4. Контроль – готов к использованию.

Содержание: 1 флакон, содержащий гормон роста в белковом буфере, с консервантом, не содержащим ртути. Приготовлен добавлением известного количества гормона роста в буфер. Ожидаемое значение и допустимый диапазон указаны на этикетке флакона.

Объем: 0.5 мл во флаконе.

Хранение: охлажденным при 2 – 8°C

Стабильность: невскрытый флакон хранится 12 месяцев или до срока годности, указанного на этикетке. После вскрытия стандарты должны быть использованы в течение 14 дней или аликвотированы

и заморожены для более длительного хранения. Избегайте повторных циклов замораживания- оттаивания.

5. Концентрат промывочного буфера – требует приготовления.

Содержание: 1 флакон, содержащий буфер с неионным детергентом и консервантом, не содержащим меди.

Объем: 50 мл во флаконе.

Хранение: охлажденным при 2 – 8°C

Стабильность: хранится 12 месяцев или до срока годности, указанного на этикетке.

Приготовление: Развести в соотношении 1:10 дистиллированной или деионизированной водой перед использованием. Если для анализа используется весь микропланшет, разведите 50 мл концентрата промывочного буфера 450 мл воды.

6. Рабочий буфер – готов к использованию.

Содержание: 1 флакон, содержащий белковый буфер с консервантом, не содержащим ртути.

Объем: 15 мл во флаконе.

Хранение: охлажденным при 2 – 8°C

Стабильность: хранится 12 месяцев или до срока годности, указанного на этикетке.

7. Субстрат ТМБ – готов к использованию.

Содержание: 1 флакон, содержащий тетраметилбензидин (ТМБ) и перекись водорода в буфере, не содержащем DMF или DMSO.

Объем: 16 мл во флаконе.

Хранение: охлажденным при 2 – 8°C

Стабильность: хранится 12 месяцев или до срока годности, указанного на этикетке.

8. Стоп - раствор – готов к использованию.

Содержание: 1 флакон, содержащий 1М серную кислоту.

Объем: 6 мл во флаконе.

Хранение: охлажденным при 2 – 8°C

Стабильность: хранится 12 месяцев или до срока годности, указанного на этикетке.

ПРОЦЕДУРА АНАЛИЗА

Подготовка образцов:

Нem.

Все реагенты должны достичь комнатной температуры перед использованием. Стандарты, контроли и образцы должны анализироваться в дублях. Вся процедура анализа должна проводиться непрерывно.

1. Приготовьте рабочие растворы конъюгата гормон роста/HRP и промывочного буфера.
2. Выберите необходимое для анализа число стрипов, неиспользованные стрипы снова верните в пакет с осушителем, запечатайте и поместите в холодильник.
3. Внесите по 25 мкл каждого стандарта, контроля и образца в дублях в соответствующим образом помеченные ячейки.
4. Внесите по 100 мкл рабочего раствора конъюгата во все ячейки (рекомендуется использовать многоканальную пипетку).
5. Инкубируйте 1 час при комнатной температуре на шейкере (приблизительно 200 об/мин).
6. Промойте ячейки 3 раза, используя по 300 мкл разведенного буфера для промывок на ячейку, а затем постучите микропланшетом по фильтровальной бумаге, убедитесь, что ячейки сухие (рекомендуется использовать автоматическое промывающее устройство).
7. Внесите с одинаковой скоростью по 100 мкл раствора ТМБ субстрата в каждую ячейку.
8. Инкубируйте на шейкере в течение 10 – 15 минут при комнатной температуре (или до тех пор, пока стандарт А не достигнет темно – голубого цвета, для получения желаемой ОП).
9. Внесите по 50 мкл стоп - раствора во все ячейки, в той же последовательности и с той же скоростью, как и в шаге 7.
10. Определимте оптическую плотность ячеек с помощью микропланшетного ридера при длине волны 450 нм в течение 20 минут после внесения стоп - раствора.

* Если ОП превышает верхний предел определения ридера или невозможно использовать фильтр 450 нм, можно проводить измерения при 405 нм или 415 нм. При этом ОП будет ниже, но это не повлияет на конечные результаты анализа.

РАСЧЕТ РЕЗУЛЬТАТОВ

1. Рассчитайте среднее значение оптической плотности дублей для каждого стандарта.
2. Рассчитайте среднее значение оптической плотности дублей для каждого образца.

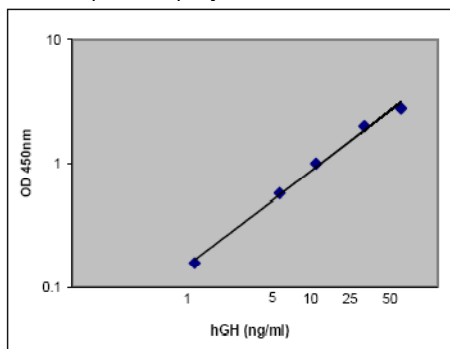
- Вычитите значения оптической плотности «нулевого» калибратора из значений ОП калибраторов, контроля и образцов.
- Постройте калибровочную кривую, используя полулогарифмическую бумагу, откладывая по оси Y среднее значение оптической плотности стандартов, а по оси X - их концентрацию. Если для построения калибровочной кривой используется программное обеспечение, то рекомендуется использовать 4-параметрическую аппроксимацию.
- Определите значения концентраций аналита в образцах непосредственно из калибровочной кривой.
- Если концентрация аналита в образце превышает 50 нг/мл, образец необходимо развести стандартом А в соотношении не более чем 1:10 и проанализировать еще раз. Полученный результат необходимо умножить на коэффициент разведения.

ТИПИЧНЫЕ РЕЗУЛЬТАТЫ:

Стандарт	ОП 1	ОП 2	Средняя ОП	Значение (нг/мл)
A	0.074	0.072	0.073	0
B	0.158	0.159	0.159	1
C	0.574	0.580	0.577	5
D	0.997	1.014	1.006	10
E	2.021	2.009	2.015	25
F	2.809	2.773	2.791	50
Образец	0.549	0.561	0.555	5.0

ПРИМЕР ТИПИЧНОЙ КАЛИБРОВОЧНОЙ КРИВОЙ

Приводится только в демонстрационных целях и не должен использоваться для расчета результатов.



ХАРАКТЕРИСТИКИ АНАЛИЗА

Чувствительность:

Минимальное детектируемое количество рассчитано исходя из калибровочной кривой вычитанием двух стандартных отклонений из среднего значения ОП нулевого стандарта (стандарт А), измеренного 10 раз. Чувствительность метода DBC Direct hGH ELISA составила **0.2 нг/мл**.

Специфичность (перекрестная реактивность):

Специфичность данного анализа была определена при измерении гормона роста в калибраторе А с добавлением различных концентраций пролактина.

Вещество	Концентрация (нг/мл)	Значения гормона роста
Пролактин	50	Не обнаружен
Калиброванный относительно ВОЗ IS 84/500	100	Не обнаружен
	500	Не обнаружен
	1000	Не обнаружен

Воспроизводимость внутри серии:

3 образца были проанализированы 10 раз каждый, по одной калибровочной кривой. Результаты (в нг/мл) приведены в таблице:

Образец	Среднее	SD	CV%
1	1.46	0.09	5.8
2	12.33	0.68	5.5
3	41.87	0.97	2.3

Воспроизводимость между сериями:

3 образца анализировали 10 раз каждый в течение 4 недель. Результаты (в нг/мл) приведены в таблице:

Образец	Среднее	SD	CV%
1	2.95	0.27	9.0
2	19.29	0.86	4.4
3	36.06	1.72	4.7

Извлечение

Насыщенные образцы были приготовлены добавлением определенных количеств гормона роста к четырем образцам сывороток пациентов. Результаты (в нг/мл) приведены в таблице:

образец	Полученный результат	Ожидаемый результат	Извлечение %
1 небогатый	ND	-	-
	+1.0	1.0	96.0
	+5.0	5.0	112.0
	+50	50	98.0
2 небогатый	0.7	-	-
	+1.0	1.7	88.2
	+5.0	5.7	115.8
	+50	50.7	104.5
3 небогатый	1.0	-	-
	+1.0	2.0	85.0
	+5.0	6.0	113.3
	+50	51	95.7

Линейность

3 образца сывороток пациентов были разведены стандартом А. Результаты (в нг/мл) приведены в таблице:

образец	Полученный результат	Ожидаемый результат	Извлечение %
1	6.44	-	-
	1:2	3.22	96.9
	1:5	1.29	89.1
	1:10	0.64	92.2
2	16.60	-	-
	1:2	8.30	96.0
	1:5	3.32	84.9
	1:10	1.66	95.8
3	33.00	-	-
	1:2	16.5	97.0
	1:5	6.6	97.0
	1:10	3.3	100.0

Эффект Хука

Эффект Хука не наблюдался при любой высокой концентрации гормона роста.

Ожидаемые нормальные значения

Как и для всех клинических анализов, каждая лаборатория должна самостоятельно установить свой собственный диапазон ожидаемых нормальных значений.

группа	N	Среднее (нг/мл)	Диапазон (нг/мл)
Мужчины	16	1.9	0-6.8
Женщины			
Пременопауза	17	2.2	0-12.5
Постменопауза	9	2.6	0-13.5



ОФИЦИАЛЬНЫЙ ДИСТРИБЬЮТОР

ООО «ДИАМЕБ»
ул. Черновола, 97
г. Ивано-Франковск, 76005
тел.: +38 (0342) 775 122
факс: +38 (0342) 775 123
e-mail: info@diameb.ua
www.diameb.com

© Перевод на русский язык ООО «ДИАМЕБ»