

НАБОР чСТГ [I-125] IRMA (Номер по каталогу RK-5CT)

Система чСТГ [¹²⁵I] IRMA предназначена для прямого количественного определения человеческого соматотропного гормона (чСТГ) *in vitro* в сыворотке человека. чСТГ может быть определен в диапазоне 0-100 мкМЕ/мл, в образцах сыворотки объемом 50 мкл.

Введение

Гормон роста человека (соматотропин, чСТГ) представляет собой белок с молекулярной массой 22000, секретируемый гипофизом. Структура молекулы подобна пролактину (чПРЛ) и плацентарному лактогену (чПЛ). Секретция чСТГ имеет двойную регуляцию со стороны гипоталамуса: соматотропный-рилизинг гормон (СТ-РГ) и ингибирующий гормон, соматостатин.

Известны различные эффекты чСТГ. Он не только регулирует синтез белка, рост скелета, мышц и внутренних органов, но также обладает липолитическими и лактогенными свойствами и влияет на накопление гликогена в печени. В клинической практике хорошо известен диабетогенный эффект чСТГ.

Средняя концентрация чСТГ в сыворотке постепенно снижается после рождения. Его уровень снова значительно повышается в пубертатном периоде и впоследствии с возрастом снова снижается. Так как секретия чСТГ носит пульсирующий характер, единичное определение концентрации чСТГ не отражает эндогенную секрецию чСТГ. Примерно у 50% населения концентрация чСТГ очень низкая, иногда неопределяемая. Необходимы стандартизованные стимулирующие тесты для оценки секреции чСТГ гипофизом.

Измерение уровня чСТГ может широко применяться в клинической практике для диагностики гипо- и гиперсекреции, связанными с задержкой роста, гипопитуитаризмом, акромегалией и другими заболеваниями.

Принцип метода

Технология, применяемая в системе иммуно-радиометрического количественного определения (IRMA), предполагает использование двух высокоафинных моноклональных антител.

Сигнальное антитело, меченное ¹²⁵I, связывается с эпитопом молекулы

СТГ, которая пространственно отличается от молекулы, которая распознается биотин-захватывающим антителом. Два антитела одновременно реагируют с антигеном, который содержится в стандартах и в образцах, что приводит к образованию комплекса захватывающее антитело – антиген – сигнальное антитело, который также называется «сэндвич». Во время двухчасовой инкубации при непрерывном перемешивании иммунный комплекс оседает на поверхности пробирок, покрытых стрептавидином. Затем реакционная смесь удаляется, пробирки тщательно промываются с последующим определением радиоактивности в гамма-счетчике.

Концентрация антигена прямо пропорциональна уровню радиоактивности, измеренной в пробирках. Путем построения калибровочной кривой, в которой отражаются полученные значения в сравнении с серией калибраторов, содержащих известное количество чСТГ, может быть определена искомая концентрация чСТГ в образцах пациента.

Содержимое набора

1. 1 флакон МЕТКИ (21 мл), готовой к использованию. Содержит около 740 кБк ¹²⁵I-анти-чСТГ и захватывающих анти-чСТГ антител в буфере с красным красителем и 0.1% NaN₃.

2. 6 флаконов СТАНДАРТОВ, (6 x 1 мл) лиофилизированных, содержащих 0, 0.3, 1.3, 5.5, 23, 100 мкМЕ/мл чСТГ (откалиброванных в соответствии с требованиями ВОЗ 1st IS 88/624) в сыворотке крупного рогатого скота, содержит 0.1% NaN₃. Концентрация контрольной сыворотки указана в сертификате качества, прилагаемом к набору. См. Раздел «Подготовка реагентов».

3. 1 флакон КОНТРОЛЬНОЙ СЫВОРОТКИ, Лиофилизированная человеческая сыворотка с 0.1% NaN₃. Концентрация контрольной сыворотки указана в сертификате качества, прилагаемом к набору. См. Раздел «Подготовка реагентов».

4. 2 упаковки ПРОБИРОК С ПОКРЫТИЕМ, готовых к использованию. 2 x 50 пробирок для реакции, 12x75 мм, упакованные в пластиковые коробки.

5. 1 флакон КОНЦЕНТРАТА ПРОМЫВОЧНОГО БУФЕРА (20 мл), содержащий 0.2% NaN₃. См. Раздел «Подготовка реагентов».

Сертификат качества

Листок-вкладыш

Необходимые материалы, инструменты и оборудование

Штатив для пробирок, высокоточные автоматические пипетки со сменными наконечниками (50, 200 и 2000 мкл), дистиллированная вода, вихревой смеситель, шейкер, полимерная пленка, абсорбирующая ткань, гамма-счетчик.

Рекомендуемые инструменты и оборудование

Высокоточные автоматические пипетки (напр., Eppendorf и др.), диспенсер с 1л резервуаром (вместо 2мл пипетки)

Сбор и хранение образцов

Образцы сыворотки могут быть подготовлены в соответствии с общей процедурой, используемой обычно в клинической лабораторной практике. Образцы могут храниться при температуре 2-8 °С, если исследование проводится в течение 24 часов. В иных случаях аликвоты должны приготавливаться и храниться в условиях глубокого замораживания (-20°C). Перед анализом замороженные образцы следует разморозить и тщательно перемешать. Следует избегать повторного замораживания/оттаивания.

Запрещается использовать липемичные, гемолизированные и мутные образцы. Образцы с концентрацией чСТГ выше самого концентрированного стандарта должны разводиться и анализироваться повторно.

Подготовка и хранение реагентов

Добавьте концентрат промывочного буфера (20 мл) к 700 мл дистиллированной воды для получения 720 мл промывочного раствора. Полученный разбавленный раствор хранить при температуре 2-8 °С до истечения срока годности набора.

Добавьте 1000 мкл дистиллированной воды к лиофилизированному стандарту и контрольной сыворотке. Осторожно перемешайте в шейкере или вихревом смесителе (избегая образования пены).

Убедитесь, что достигнуто полное растворение и позвольте раствору уравновеситься при комнатной температуре хотя бы 20 минут. Храните раствор при -20°C до окончания срока годности набора.

После вскрытия хранить реактивы при температуре от 2-8 °С. При такой температуре каждый реактив стабилен до окончания срока годности. Фактический срок годности указан на этикетке упаковки и в сертификате качества.

ВНИМАНИЕ!

Необходимо уравновесить все реактивы и образцы сыворотки до комнатной температуры. Перед использованием тщательно перемешать все реактивы и образцы. Избегать чрезмерного пенообразования.

Процедура анализа

(Для краткого описания см. Таблицу 1.)

1. Перед использованием уравновесьте реактивы и образцы до комнатной температуры.
2. Промаркируйте пробирки с покрытием в двух экземплярах для каждого стандарта (S1-S6), контрольной сыворотки и образцов.
3. Гомогенизируйте все реагенты и образцы, аккуратно перемешивая, избегайте образования пены.
4. Внесите по 50 мкл стандарта, контроля и образцов в соответствующим образом промаркированные пробирки с покрытием. Для установки пробирок используйте штатив. Не дотрагивайтесь и не царапайте внутреннюю поверхность и дно пробирок наконечником пипетки.
5. Внесите по 200 мкл метки в каждую пробирку.
6. Закройте все пробирки пластиковой пленкой. Установите штатив с пробирками на подставку шейкера. Включите шейкер и установите адекватную скорость, такую, чтобы жидкость постоянно вращалась и перемешивалась в каждой пробирке.
7. Инкубируйте пробирки в течение 2 часов при комнатной температуре на шейкере.
8. Внесите по 2.0 мл разведенного промывочного буфера в каждую пробирку. Удалите супернатант из всех пробирок, перевернув штатив. В перевернутом положении поместите штатив на фильтровальную бумагу на 2 минуты.
9. Переверните штатив с пробирками в нормальное положение, и повторите Шаг 8 еще два раза.
10. Рассчитайте радиоактивность каждой пробирки в течение не менее 60 секунд на счетчике гамма-излучения.
11. Рассчитайте концентрации СТГ в образцах так, как это описано в разделе «Расчет результатов» или используя специальное программное обеспечение

Таблица 1. Протокол количественного определения, методика введения (все объемы указаны в мкл)

Пробирки	Всего	Стандарт	Контроль	Образец
Стандарт		50		
Контроль			50	
Образец				50
Метка	200	200	200	200
Перемешивать в течение 2 часов при комнатной температуре				
Промывочный буфер		2000	2000	2000
Удалить жидкость и высушить на фильтровальной бумаге				
Промывочный буфер		2000	2000	2000
Удалить жидкость и высушить на фильтровальной бумаге				
Измерить радиоактивность (60 сек на пробирку)				
Рассчитать результаты				

Расчет результатов

Расчет представлен с использованием репрезентативных данных. Полученные данные должны быть схожими с данными, представленными в Таблице 2.

Рассчитайте среднее значение в минуту (срм) для каждой пары исследуемых пробирок.

Рассчитайте нормализованное процентное связывание для каждого стандарта, контроля и образца, используя следующую формулу:

$$V/T(\%) = \frac{S_{2.6} / C / M_x (\text{срм}) - S_1 (\text{срм})}{T(\text{срм})} \times 100$$

Используя полулогарифмическую графическую бумагу, постройте калибровочную кривую, откладывая рассчитанные значения V/T (%) для каждого стандарта по одной оси и соответствующие им концентрации чСТГ по другой.

Определите концентрацию чСТГ в тестируемых образцах путём интерполяции с калибровочной кривой. Не экстраполируйте значения, лежащие вне диапазона концентраций калибровочной кривой.

При отсутствии программного обеспечения для аппроксимации в ходе компьютерной обработки данных, могут использоваться логит-

логарифмические и сплайновые методы аппроксимации.

Таблица 2. Типичные данные количественного определения

Пробирки	Количество срм	Среднее срм	V/T%
T	292831 290613	291722	-
S1	109 126	118	0.04
S2	643 602	622	0.21
S3	2165 2163	2164	0.73
S4	8914 8861	8887	3.00
S5	35221 33069	34145	11.56
S6	124766 117131	120949	41.00
C	11139 10670	10905	3.75

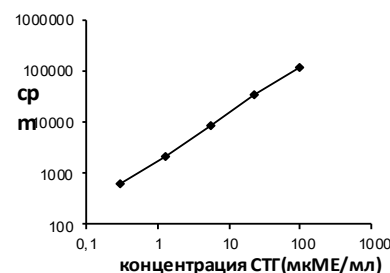


Рисунок 1: Типичная калибровочная кривая (Не использовать для расчёта результатов количественного определения!)

Характеристики количественного определения

Чувствительность

Предел определения 0.04 мкМЕ/мл был получен при тестировании 20 повторов нулевого стандарта. Чувствительность определяли как концентрацию, соответствующую сумме средних значений срм и удвоенной величины стандартного отклонения.

Эффект крючка

При концентрациях чСТГ до 5000 мкМЕ/мл высокодозный «эффект крючка» отсутствует.

Специфичность

Перекрестная реактивность с чПЛ 0.2% и с чПРЛ 1.0% не выявлена, также как и с другими гормонами в нормальных физиологических концентрациях.

Точность представленных данных

Для определения точности в ходе количественного определения были проанализированы 4 образца пациентов в 15 повторах. Полученные значения приведены ниже.

Образец	Среднее значение	CO	CV%
1	1.4	0.05	3.5
2	5.1	0.05	1.0
3	11.0	0.16	1.5
4	54.8	0.80	1.5

Воспроизводимость

Для определения воспроизводимости между сериями были протестированы 4 образца сывороток пациентов дважды в 15 независимых анализах, выполненных двумя лаборантами, с использованием наборов различных партий. Полученные результаты приведены ниже.

Образец	Среднее значение	CO	CV%
1	0.05	0.01	17.9
2	1.4	0.05	3.3
3	5.3	0.10	2.0
4	53.9	1.37	2.5

Восстановление

Под восстановлением понималось измеренное увеличение, выраженное в процентах от ожидаемого роста пиков в образцах сыворотки крови с известным количеством чСТГ. Для 10 образцов сыворотки крови с чСТГ на 3 уровнях было получено следующее значение: 92.2-104,4 %.

Ожидаемые значения

С учетом вариабельности уровня секреции чСТГ как у одного индивидуума, так и между различными людьми, считается, что определение базального уровня имеет ограниченную значимость и рекомендуется использовать оценку, основанную на ответе чСТГ на нагрузочные тесты. Значение базального уровня носит только индикативный характер. Каждой лаборатории рекомендуется самостоятельно определить метод оценки и диапазон эталонных значений.

	Женщины	Мужчины
Кол-во образцов	100	100
Среднее значение (мкМЕ/мл)	5.68	0.94
Медиана (мкМЕ/мл)	1.03	0.17
95% образцов (мкМЕ/мл)	0 – 30	0 - 6

Примечания к методике

1) Причина ошибки! Пробирки для реакции, упакованные в пластиковые коробки, не промаркированы индивидуально. Необходимо соблюдать осторожность и не перепутать их с обычными пробирками. Для снижения этого

риска никогда не доставайте из пластиковых коробок больше пробирок, чем нужно для анализа, и помещайте неиспользованные пробирки обратно в коробки. Рекомендуется сразу маркировать используемые пробирки специальным маркером.

2) Причина ошибки! Убедитесь, что перемешивание достаточно эффективно, для этого пробирки должны быть плотно установлены в штативе. Никогда не используйте штативы в открытыми отверстиями. Неравномерное или неполное перемешивание могут привести к низкой эффективности количественного определения.

3) Добавление промывочного буфера

Для добавления промывочного буфера рекомендуется использование обычного лабораторного диспенсера со стеклянной емкостью объемом 1 л и гибкого выпускника для пробирки. При отсутствии данного оборудования можно использовать шприц большого объема, соединенный с пипеткой для серийного введения.

Дополнительная информация

Нельзя заменять или смешивать компоненты наборов различных лотов или разных производителей.

Меры предосторожности

Радиоактивность

Данный продукт содержит радиоактивный материал. Пользователь несет ответственность за соблюдение местных законов или правил, касающихся порядка использования радиоактивных материалов.

Биологическая опасность

Продукты человеческой крови, использованные в наборе, были получены у здоровых доноров. Они были протестированы индивидуально с использованием утвержденных методов (иммуоферментный анализ). В результате проверки были получены отрицательные результаты на наличие антител к вирусу иммунодефицита человека (анти-ВИЧ-1), поверхностных антигенов вируса гепатита В (HBsAg) и антител к Трепонема.

Следует всегда соблюдать осторожность при работе с человеческими образцами, предназначенными для тестирования диагностическими наборами. Даже если образец был протестирован, ни один метод не может гарантировать

полного отсутствия вируса гепатита В, вируса иммунодефицита человека (ВИЧ-1) или других инфекционных агентов. Следовательно, с образцами крови человека следует обращаться как с *потенциально инфекционно опасным материалом*.

Вещества, полученные от крупного рогатого скота, были получены в странах, где не зарегистрированы случаи развития губчатой энцефалопатии крупного рогатого скота. Тем не менее вещества животного происхождения должны расцениваться как *потенциально инфекционно опасный материал*.

Химическая опасность

В качестве антибактериального агента компоненты содержат азид натрия. При утилизации отходы следует смывать большим количеством воды, чтобы предотвратить накопление взрывоопасных азидов металлов в системе водопровода, который может содержать части из меди и свинца. Содержание азидов в каждой упаковке составляет 68 мг.

Условия хранения и срок годности

Хранить при температуре 2-8°C. Срок годности: 60 дней с момента готовности.

	Использовано		Контроль
	Номер партии		Стандарт
	Внимание, обратитесь к сопроводительным документам		Пробирка с покрытием
	Биологическая опасность		Метка
	Обратитесь к инструкции по использованию		Промывочный буфер
	Устройство для проведения диагностики in vitro		Температурный предел хранения при температуре 2-8°C
	Производитель		Радиоактивный материал
	Номер по каталогу		

Сайт: <http://www.izotop.hu>
 Технический e-mail: immuno@izotop.hu
 Коммерческий e-mail: commerce@izotop.hu



INSTITUTE OF ISOTOPES LTD.
 1535 Budapest. Pf.: 851.
 Tel.: (36-1)392-2577, Fax: (36-1)395-9247
 Обновлено: март 2021 г.



Приложение к инструкции по применению, Набор РК-5СТ ЧСТГ [I-125] IRMA

Значения у детей (мeME/мл)

Мальчики

Возраст, г	Образцы	Среднее значение	Минимум	Максимум
3-4	40	1,86	0,19	16,0
5-6	40	0,87	0,16	23,6
7-8	37	0,75	0,08	38,7
9-10	35	0,64	0,04	31,5
11-12	34	0,47	0,07	19,1
13-14	31	0,78	0,12	38,7
15-16	28	0,39	0,13	28,7
17-18	31	0,37	0,08	38,7

Девочки

Возраст, г	Образцы	Среднее значение	Минимум	Максимум
3-4	27	1,98	0,33	17,5
5-6	30	1,3	0,19	28,0
7-8	33	0,66	0,05	20,7
9-10	34	0,71	0,1	17,2
11-12	36	1,03	0,18	36,7
13-14	39	0,68	0,16	21,6
15-16	41	3,65	0,15	41,2
17-18	37	3,56	0,19	41,5

Препубертатный возраст мальчики (3-14 лет)

Образцы	Среднее значение	97% диапазон
217	0,84	0,04 - 28

Препубертатный возраст девочки (3-14 лет)

Образцы	Среднее значение	97% диапазон
199	0,95	0,05 - 20

Пубертатный возраст мальчики (15-18 лет)

Образцы	Среднее значение	97% диапазон
59	0,37	0,08 - 28

Пубертатный возраст девочки (15-18 лет)

Образцы	Среднее значение	97% диапазон
78	3,61	0,15 - 40



Приложение к инструкции по применению, Набор РК-5СТ чСТГ [I-125] IRMA

Значения у детей (нг/мл)

Мальчики

Возраст, г	Образцы	Среднее значение	Минимум	Максимум
3-4	40	0,61	0,06	5,3
5-6	40	0,29	0,05	7,8
7-8	37	0,25	0,03	12,8
9-10	35	0,21	0,01	10,4
11-12	34	0,16	0,02	6,3
13-14	31	0,26	0,04	12,8
15-16	28	0,13	0,04	9,5
17-18	31	0,12	0,03	12,8

Девочки

Возраст, г	Образцы	Среднее значение	Минимум	Максимум
3-4	27	0,65	0,11	5,8
5-6	30	0,43	0,06	9,2
7-8	33	0,22	0,02	6,8
9-10	34	0,23	0,03	5,7
11-12	36	0,34	0,06	12,1
13-14	39	0,22	0,05	7,1
15-16	41	1,20	0,05	13,6
17-18	37	1,17	0,06	13,7

Препубертатный возраст мальчики (3-14 лет)

Образцы	Среднее значение	97% диапазон
217	0,28	0,01 - 10

Препубертатный возраст девочки (3-14 лет)

Образцы	Среднее значение	97% диапазон
199	0,31	0,02 - 7

Пубертатный возраст мальчики (15-18 лет)

Образцы	Среднее значение	97% диапазон
59	0,12	0,03 - 10

Пубертатный возраст девочки (15-18 лет)

Образцы	Среднее значение	97% диапазон
78	1,19	0,05 - 14