

---

**HGH-CTK/ irma**  
(P2244)

---

DiaSorin

---

---

English.....	p. 1
Italiano.....	p. 8
Français.....	p. 16
Deutsch.....	p. 25
Español.....	p. 33
Português.....	p. 41
Magyar.....	p. 49
Ελληνικά.....	p. 57

## **hGH IMMUNORADIOMETRIC ASSAY KIT**

### **Procedure for quantitative determination of human growth hormone (hGH) in human serum or plasma samples**

For in vitro use only

#### **1. INTRODUCTION**

Human growth hormone (hGH) is the hormone most abundantly secreted by the pituitary. During childhood and adolescence it causes body statural growth, and throughout life it affects major metabolic processes, in such a way that growth is encouraged. It is not, however, essential to health in adult life.

hGH is synthesized by the alpha cells of the anterior pituitary. It is composed of a single chain of 191 amino acid residues with a molecular weight of 21,500 daltons and two disulphide bonds.

hGH circulates in different molecular forms, called Big-Big GH, Big GH and Little GH. Little GH is the most abundant form and probably the original monomeric form, while the other two seem to be polymeric forms.

hGH does not have a specific target organ, but receptors have been demonstrated on human liver cells and circulating lymphocytes. The metabolic effects of hGH can be generally divided into two main categories: *a)* anti-insulin direct action (lipolytic and causing hyperglycaemia); *b)* insulin-like indirect action (anti-lipolytic and mitogenic). The latter action causes body statural growth which is the classic action of hGH. This is exerted through somatomedins, relatively low-molecular weight hormones (M.W. 7,000 daltons) of chemical structure very similar to that of proinsulin.

At least two somatomedins have been identified, one with insulin-like properties, the other one more directly involved in body statural growth. Unlike all other polypeptide hormones, somatomedins mostly circulate bound to carrier proteins which prolong their half-lives, therefore making their concentrations relatively stable.

#### **2. PRINCIPLE OF THE ASSAY**

The assay is a non-competitive immunoradiometric (IRMA) method, based on the use of antibody-coated tubes, employing two mouse monoclonal antibodies directed against two different epitopes on the hGH molecule. Monoclonal IgG to hGH is coated on the tube walls and labelled monoclonal IgG to hGH is used as tracer.

The assay features a single incubation during which hGH contained in calibrators or samples allows the tracer to bind to the solid phase. After the incubation, the amount of labelled antibody bound to the solid phase is proportional to the concentration of hGH present in calibrators or samples. At the end of incubation, the unbound material is removed by aspiration and washing.

#### **3. REAGENTS PROVIDED IN THE KIT**

Coated tubes	100
<sup>125</sup> I-tracer	1 vial
hGH calibrators	7 vials
Control serum	1 vial
Wash buffer	2 bottles
Number of tubes	100

*STORAGE: Upon receipt, the kit should be stored at 2-8°C. Do not freeze. Once opened, the reagents of this kit are stable until the kit expiry date when properly stored. The kit has been designed to perform 4 assay runs when used throughout the day at room temperature and stored overnight at 2-8°C.*

*Reagents should not be used past the expiry date. The expiry date of the kit is reported on the external label and corresponds to the expiry date of the tracer. The expiry date of each component is reported on the respective vial label.*

*When reconstituting the contents of the vials, mix gently to avoid foaming.*

*Reagents from different batches must not be mixed.*

##### **3.1. Coated tubes**

The inner surface of each tube is coated with biotinylated IgG to hGH (mouse monoclonal) directed against an hGH epitope that is different from the one against which the IgG used for the tracer is raised.

*Before use, bring the coated tubes to room temperature prior to opening the box, to avoid condensation of humidity. Securely reseal the box containing unused tubes. Do not mix different batches of coated tubes.*

**3.2. <sup>125</sup>I-tracer (red):** ready-to-use reagent

The vial contains 11 mL IgG to hGH (mouse monoclonal) labelled with <sup>125</sup>I, BSA, horse serum, mouse IgG, phosphate buffer, preservatives and an inert red dye. Radioactivity is 333 kBq (9 µCi) or less on the calibration date.

**3.3. hGH calibrators:** ready-to-use reagent

The vials contain increasing amounts of hGH, human serum, phosphate buffer and preservatives. hGH concentrations are as follows: 0 - 1.5 - 4.5 - 9 - 24 - 60 - 150 µIU/mL (0 - 0.5 - 1.5 - 3 - 8 - 20 - 50 ng/mL). The zero calibrator vial contains 3 mL; the 1-6 calibrator vials contain 0.5 mL. *The kit calibrators demonstrate commutability with patient samples when used with reagents and operating procedure of this in vitro diagnostic test as the manufacturer recommends.*

The kit calibrators are referenced to the 2nd International Standard NIBSC 98/574, Recombinant DNA-derived hGH (1 ng = 3 µIU).

**3.4. Control serum:** lyophilized reagent

The vial contains hGH, human serum and preservatives. The range of concentrations of each control is reported on the certificate of analysis and indicates the limits established by DiaSorin for control values that can be obtained in reliable assay runs. Reconstitute the vial contents with 1 mL distilled water. Store the resulting solution for two weeks at 2-8°C or in deep-frozen aliquots (-20°C or below) for extended storage.

**3.5. Wash buffer:** reagent in solution (10x)

Each bottle contains 50 mL 0.5% Triton X-100 and saline solution.

Dilute the contents of each bottle to 500 mL with deionized water. The resulting solution is stable at 2-8°C until the kit expiry date. The reagent is used to rinse coated tubes.

**4. EQUIPMENT AND MATERIALS REQUIRED, BUT NOT SUPPLIED**

- Distilled or deionized water.
- Glassware.
- Micropipettes with disposable tips (50, 100, 1000 µL) (50 µL: trueness ± 3%, precision 2%; 100, 1000 µL: trueness ± 2%, precision 1%).
- Test tube rack.
- Vortex mixer.
- Horizontal shaker capable of achieving a shaking speed of 300-350 rpm (optional).
- Device for dispensing and aspiration of wash buffer capable of delivering 2-3 mL per wash cycle for two wash cycles.
- Gamma counter suitable for counting <sup>125</sup>I (counter window setting: 15-80 keV - counter efficiency: 70% - counting time: 1 min). If counter efficiency is below 60%, counting time should be prolonged to 2 min.

**5. SPECIMEN COLLECTION AND PREPARATION**

Either human serum or plasma may be used. The anticoagulants citrate, EDTA and heparin have been tested and may be used with this assay. Blood should be collected aseptically by venipuncture, allowed to clot, and the serum separated from the clot as soon as possible. Samples having particulate matter, turbidity, lipaemia, or erythrocyte debris may require clarification by filtration or centrifugation before testing. Grossly haemolyzed or lipaemic samples as well as samples containing particulate matter or exhibiting obvious microbial contamination should not be tested. If the assay is performed within 24 hours of sample collection, the samples should be kept at 2-8°C; otherwise they should be aliquoted and stored deep-frozen (-20°C or below). If samples are stored frozen, mix thawed samples well before testing. Avoid repeated freeze-thaw cycles.

*If hGH levels greater than 150 µIU/mL (50 ng/mL) are expected, the samples should be diluted with the zero calibrator.*

**6. ASSAY PROCEDURE**

Bring all reagents to room temperature (20-25°C) before assaying. Perform the assay at least in duplicate. Calibrators must be run with each series of patient specimens. Calibrators and samples should be subjected to the same process and incubation time.

Perform all assay steps in the order given and without any appreciable delays between the steps. The reagents must be dispensed as quickly as possible (max 30 min).

A clean, disposable tip should be used for dispensing each calibrator and sample.

- Dispense reagents in the bottom of coated tubes. Operate according to the following scheme:

	tubes	Calibrators 0-6	Samples
reagents			
Calibrators		50 µL	–
Samples		–	50 µL
Tracer		100 µL	100 µL

- Prepare two non-coated tubes for total activity computation containing only 100 µL tracer and set them aside until counting.
- **Mix** the contents of tubes with a Vortex and **incubate** according to the procedure selected:
  - **90 min at room temperature**, while continuously shaking (300-350 rpm) (procedure A)
  - **overnight (18-22 hours) at room temperature** (procedure B).
- Carefully **aspirate** the incubation mixture and **rinse twice** with 2 mL **wash buffer**.  
*Be sure that the aspirator tip touches the bottom of the coated tube so that all the liquid is removed. Failure to remove adhering solution adequately may result in poor reproducibility and spurious results. No trace of red dye should still be visible.*
- **Measure the radioactivity** of tubes.

## 7. CALCULATION OF RESULTS

Compute the mean net counts for each group of tubes. Compute the B/T ratio for each calibrator and unknown sample as follows:

$$B/T\% = \frac{\text{calibrator or sample mean counts}}{\text{total activity mean counts}} \times 100$$

Plot in log-log coordinates the mean percent value for each calibrator on the ordinate (y axis) as a function of hGH concentration expressed as µIU/mL or ng/mL on the abscissa (x axis). A calibration curve is thus obtained (Fig. 1). Directly from the calibration curve, read the hGH concentration of each sample expressed as µIU/mL or ng/mL. If the sample was diluted, the hGH concentration value derived from the diluted specimen must be multiplied by the dilution factor.

### Calculation example (procedure A)

*The following data must only be considered an example and should not be employed instead of the data obtained by the user.*

Description	cpm	B/T%
Total activity	112,199	100
Zero calibrator	23	0.02
1.5 µIU/mL - 0.5 ng/mL	891	0.79
4.5 µIU/mL - 1.5 ng/mL	2,861	2.55
9 µIU/mL - 3 ng/mL	5,598	4.99
24 µIU/mL - 8 ng/mL	13,308	11.86
60 µIU/mL - 20 ng/mL	29,546	26.33
150 µIU/mL - 50 ng/mL	59,715	53.22
Sample	3,636	3.24

By interpolation from the calibration curve the sample is found to contain 5.76 µIU/mL (1.92 ng/mL) hGH.

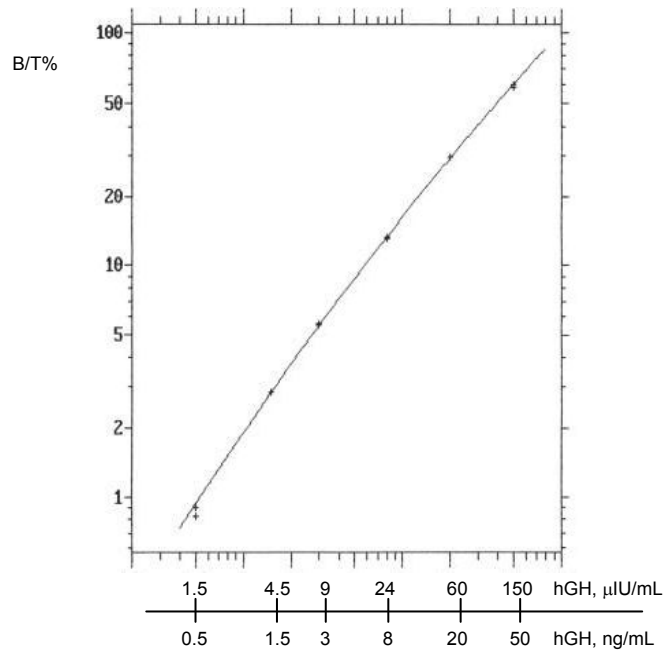


Fig. 1

## 8. EXPECTED VALUES

Given the variability of hGH secretion within a single individual and between different individuals, as reported in the literature, the basal test is considered of limited diagnostic significance and assessments based on the response of hGH to challenge tests are to be preferred.

It should be remembered, however, that the basal reference values reported below are to be considered merely indicative. Each laboratory should establish its own assessment methods and reference ranges.

Subjects	hGH, $\mu$ IU/mL	hGH, ng/mL
Prepubertal age	0.0 - 4.0	0.0 - 1.3
Pubertal age: males	0.0 - 10.0	0.0 - 3.3
females	0.0 - 30.0	0.0 - 10.0
Adult age: males	0.0 - 14.0	0.0 - 4.7
females	0.0 - 32.0	0.0 - 10.7

## 9. SPECIFIC PERFORMANCE CHARACTERISTICS

### 9.1. Analytical specificity

Analytical specificity may be defined as the ability of the assay to accurately detect specific analyte in the presence of potentially interfering factors in the sample matrix (e.g., anticoagulants, haemolysis, effects of sample treatment), or cross-reactive analytes.

**Interference.** Controlled studies of potentially interfering substances or conditions showed that the assay performance was not affected by anticoagulants (citrate, EDTA, heparin), haemolysis (up to 200 mg/dL haemoglobin), lipaemia (up to 500 mg/dL triglycerides), bilirubinaemia (up to 20 mg/dL bilirubin) or one freeze-thaw cycle of samples.

**Cross-reactions.** The kit recognizes the two monomeric variant forms of hGH (M.W. 20,000 and 22,000 daltons). Specificity was evaluated as the apparent hGH concentration obtained when testing high concentrations of potentially interfering hormones.

Hormone	Concentration	Apparent hGH level
hPRL	100 mIU/mL 3rd IS 84/500	3 $\mu$ IU/mL (1 ng/mL)
hCG	100 IU/mL 3rd IS 75/537	undetectable
hTSH	1 IU/mL 2nd IRP 80/558	undetectable
hLH	2 IU/mL 1st IRP 68/40	undetectable
hFSH	2 IU/mL 2nd IRP 78/549	undetectable
hCS	3 $\mu$ g/mL	undetectable

### 9.2. Analytical sensitivity

Analytical sensitivity may also be expressed as the limit of detection, which is the minimal amount of specific analyte detectable by the assay. The limit of detection is 0.12  $\mu$ IU/mL (0.04 ng/mL) at 95% confidence limit. This was calculated as the apparent concentration of analyte which was distinguishable from the zero calibrator, that is, two standard deviations above zero.

### 9.3. Precision

Different sample pools, containing different concentrations of specific analyte, were assayed to determine repeatability and reproducibility of the assay (i.e., within- and between-assay variability).

Repeatability	A	B	C
Number of determinations	10	10	10
Mean ( $\mu$ IU/mL)	36.80	16.40	3.42
Standard deviation	0.68	0.30	0.12
Coefficient of variation (%)	1.9	1.9	3.9

Reproducibility	A	B	C
Number of determinations	10	10	10
Mean ( $\mu$ IU/mL)	34.28	15.82	4.02
Standard deviation	0.86	0.58	0.16
Coefficient of variation (%)	2.5	3.7	4.1

### 9.4. Trueness

The assay trueness has been checked by the dilution and recovery tests.

**Dilution test.** Two sera with high hGH concentration were tested after serially diluting with the zero calibrator.

Dilution	Expected concentration, $\mu$ IU/mL	Measured concentration, $\mu$ IU/mL	% Recovery
neat	–	77.40	–
1:2	38.70	37.40	96.6
1:4	19.35	18.60	96.1
1:8	9.68	9.40	97.2
1:16	4.84	4.80	99.2
1:32	2.42	2.40	99.2
neat	–	44.40	–
1:2	22.20	23.00	103.6
1:4	11.10	10.80	97.3
1:8	5.55	5.40	97.3
1:16	2.78	2.80	100.9
1:32	1.39	1.40	100.9

**Recovery test.** Two sera containing hGH were tested as such and after mixing with increasing amounts of hGH.

Added concentration, $\mu\text{IU/mL}$	Expected concentration, $\mu\text{IU/mL}$	Measured concentration, $\mu\text{IU/mL}$	% Recovery
–	–	33.40	–
50.00	81.74	78.80	96.4
25.00	56.74	54.40	95.9
12.50	44.24	44.60	100.8
6.50	38.24	39.80	104.1
2.10	33.84	34.60	102.3
–	–	13.00	–
50.00	62.36	62.50	100.2
25.00	37.36	38.40	102.8
12.50	24.86	25.00	100.6
6.50	18.86	19.20	101.9
2.10	14.46	14.60	101.0

### 9.5. High-dose hook effect

Whenever samples containing extremely high antigen concentrations are tested in a one- step *sandwich* method, the hook effect can mimic concentrations lower than real. For correct quantification, samples containing hGH levels greater than that of the top calibrator should be diluted with the zero calibrator and retested. The results must then be multiplied by the dilution factor to obtain the levels of the neat specimens.

The kit has been designed in such a way that doses up to 7.5 mIU/mL (2.50  $\mu\text{g/mL}$ ) hGH produce an analytical signal which is above that of the top calibrator.

### 10. LIMITATIONS OF THE PROCEDURE

Diagnosis should not be established on the basis of a single test result, but should be determined in conjunction with clinical findings and other diagnostic procedures as well as in association with medical judgement.

Bacterial contamination or repeated freeze-thaw cycles of the specimens may affect the assay results. A skillful technique and strict adherence to the instructions are necessary to obtain reliable results. In particular, precise pipetting and accurate aspiration and washing are essential.

Non-reproducible results may arise from methodological factors, such as:

- cross-exchange of vial caps
- use of the same tip when withdrawing from different vials or dispensing different samples
- leaving the vials open for long
- exposure of reagents or samples to intense heat or heavy sources of bacterial contamination
- inadequate aspiration of incubation mixture and rinsing of tubes
- contamination of tube rims by tracer or samples
- casual oscillations or inadequate handling of the gamma counter
- use of reagents from different master batches.

### 11. WARNINGS AND PRECAUTIONS

Test components contain sodium azide as a preservative. Because sodium azide may form explosive lead or copper azide in plumbing, it is recommended that drains be thoroughly flushed with water after disposal of solutions containing sodium azide (Council Directive 99/45/EC).

R 22 – Harmful if swallowed.

R 31 – Contact with acids liberates toxic gas.

S 28 – After contact with skin, wash immediately with plenty of water.

S 45 – In case of accident or if you feel unwell, seek medical advice immediately (show the label where possible).

All serum and plasma units used to produce the components provided in this kit have been tested for the presence of HBsAg, anti-HCV, and anti-HIV-1/2 and found to be non-reactive. As, however, no test method can offer absolute assurance that pathogens are absent, all specimens of human origin should be considered potentially infectious and handled with care.



## 12. SAFETY PRECAUTIONS

- Do not eat, drink, smoke or apply cosmetics in the assay laboratory.
- Do not pipette solutions by mouth.
- Avoid direct contact with all potentially infectious materials by using protective clothing such as lab coats, protective glasses and disposable gloves. Wash hands thoroughly at the end of each assay.
- Avoid splashing or forming an aerosol. Any reagent spills should be washed with a 5% sodium hypochlorite solution and disposed of as though potentially infectious.
- All samples, biological reagents and materials used in the assay must be considered potentially able to transmit infectious agents. They should therefore be disposed of in accordance with the prevailing regulations and guidelines of the agencies holding jurisdiction over the laboratory, and the regulations of each Country. Disposable materials must be incinerated; liquid waste must be decontaminated with sodium hypochlorite at a final concentration of 5% for at least half an hour. Any materials to be reused must be autoclaved using an overkill approach (USP 24, 2000, p. 2143). A minimum of one hour at 121°C is usually considered adequate, though the users must check the effectiveness of their decontamination cycle by initially validating it and routinely using biological indicators.

## 13. BASIC RULES OF RADIATION SAFETY

### Reagents Containing Iodine-125

This kit contains radioactive material which does not exceed 8.85  $\mu\text{Ci}$  (328 kBq) of iodine-125. Appropriate precautions and good laboratory practices should be used in the storage, handling, and disposal of this material.

For practitioners or institutions receiving radioisotopes under a general license:

This radioactive material may be received, acquired, possessed, and used only by physicians, veterinarians in the practice of veterinary medicine, clinical laboratories, or hospitals, and only for in vitro clinical or laboratory tests not involving internal or external administration of the material, or the radiation therefrom, to human beings or animals. Its receipt, acquisition, possession, use, and transfer are subject to the regulations and the general license of the U.S. Nuclear Regulatory Commission or of the state with which the Commission has entered into an agreement for the exercise of regulatory authority.

1. Storage of radioactive material should be limited to a specifically designated area.
2. Access to radioactive materials must be limited to authorized personnel only.
3. Do not pipette radioactive material by mouth.
4. Do not eat or drink within designated radioactive work areas.
5. Areas where spills may occur should be wiped up, then washed with an alkali detergent or radiological decontamination solution. Any glassware used must be rinsed completely with water before washing with other laboratory glassware.

For practitioners or institutions receiving radioisotopes under a specific license:

The receipt, use, transfer, and disposal of radioactive materials are subject to the regulations and conditions of your specific license.

**ATTENTION:** Radioactivity printed in the package insert may be slightly different from the radioactivity printed on the box label and on the tracer vial label. The box label and the tracer vial label indicate the actual amount of radioactivity at the calibration date where the package insert indicates the theoretical radioactivity of the kit.

## SCHEME OF THE ASSAY

- 1 - RECONSTITUTE THE CONTROL SERUM.
- 2 - IDENTIFY COATED TUBES IN DUPLICATE.
- 3 - DISPENSE REAGENTS ACCORDING TO THE FOLLOWING SCHEME AND MIX THE INCUBATION MIXTURE:

	TUBES	CAL 0-6	SAMPLES
REAGENTS			
CALIBRATORS		50 $\mu\text{L}$	–
SAMPLES		–	50 $\mu\text{L}$
TRACER		100 $\mu\text{L}$	100 $\mu\text{L}$

- 4 - INCUBATE FOR:
  - . 90 MIN AT ROOM TEMPERATURE WHILE SHAKING (Procedure A)
  - . OVERNIGHT AT ROOM TEMPERATURE (Procedure B).
- 5 - ASPIRATE THE INCUBATION MIXTURE AND RINSE TWICE WITH 2 mL WASH BUFFER.
- 6 - MEASURE THE RADIOACTIVITY OF TUBES.

**KIT PER IL DOSAGGIO  
IMMUNORADIOMETRICO DELL'hGH**  
**Procedimento per l'analisi quantitativa  
dell'ormone della crescita (hGH)  
in campioni di siero o plasma umano**

Solo per uso in vitro

### 1. INTRODUZIONE

L'ormone della crescita (hGH) è l'ormone ipofisario secreto in maggior quantità. Durante l'infanzia e l'adolescenza determina la crescita corporea e durante tutta la vita influenza i processi anabolici. L'hGH non è tuttavia essenziale alla salute durante la vita adulta.

L'hGH è sintetizzato dalle cellule alfa dell'adenoipofisi. Ha peso molecolare circa 21.500 dalton ed è composto da una sola catena polipeptidica contenente 191 residui aminoacidici con due ponti disolfuro.

L'hGH circola in forme molecolari differenti denominate Big-Big GH, Big GH e Little GH. Il Little GH, che è la forma percentualmente prevalente, sarebbe la forma originale monomerica, mentre le altre due sembrerebbero forme polimeriche.

Pur non avendo uno specifico organo bersaglio, sono stati riscontrati recettori per l'hGH soprattutto sulle membrane di cellule epatiche e di linfociti circolanti. In effetti le azioni dell'hGH si possono generalmente dividere in due categorie: a) azione diretta anti-insulinica (lipolitica e iperglicemizzante); b) azione indiretta simil-insulinica (anti-lipolitica e mitogena). Quest'ultima azione, che rende conto in definitiva della crescita staturale classicamente attribuita all'hGH, viene esplicitata tramite delle somatomedine, ormoni a peso molecolare relativamente piccolo (circa 7.000 dalton) che hanno struttura molto simile a quella della proinsulina.

Sembra che vi siano almeno due somatomedine, l'una con più spiccate proprietà simil-insuliniche e l'altra più direttamente coinvolta nell'accrescimento staturale. A differenza di tutti gli altri ormoni polipeptidici le somatomedine circolano per la maggior parte veicolate da una o più proteine vettrici le quali, prolungando l'emivita della molecola nativa, avrebbero la capacità di rendere relativamente stabili nel tempo le concentrazioni somatomediniche.

### 2. PRINCIPIO DEL DOSAGGIO

Il metodo utilizzato è di tipo immunoradiometrico (IRMA) non competitivo ed utilizza due anticorpi monoclonali murini che riconoscono due epitopi diversi dell'hGH. Il primo anticorpo è fissato sulle provette mentre il secondo anticorpo è usato come tracciante.

Il dosaggio consiste in una sola incubazione durante la quale l'hGH contenuto nei calibratori o nei campioni permette il legame del tracciante alla fase solida. Dopo l'incubazione, la quantità di anticorpo marcato legata alla fase solida è proporzionale alla concentrazione di hGH presente nei calibratori o nei campioni. Al termine dell'incubazione, il materiale non legato viene rimosso mediante aspirazione e lavaggio.

### 3. REATTIVI FORNITI NEL KIT

Provette sensibilizzate	100
Tracciante <sup>125</sup> I	1 flacone
Calibratori di hGH	7 flaconi
Siero di controllo	1 flacone
Tampone di lavaggio	2 flaconi
Numero di dosaggi	100

*MODALITÀ DI CONSERVAZIONE: Al momento dell'arrivo, conservare il kit a 2-8°C. Non congelare. Dopo l'apertura, i reattivi di questo kit sono stabili fino alla data di scadenza del kit se conservati in modo adeguato. Il kit è garantito per 4 serie analitiche se utilizzato durante il giorno a temperatura ambiente e conservato durante la notte a 2-8°C.*

*Non usare i reattivi oltre la data di scadenza. La data di scadenza del kit è indicata sull'etichetta esterna e corrisponde alla data di scadenza del tracciante. La data di scadenza di ciascun componente è riportata sulle etichette dei rispettivi flaconi.*

*Nel ricostituire il contenuto dei flaconi, agitare delicatamente per evitare la formazione di schiuma.*

*Non mescolare reattivi provenienti da lotti differenti.*

#### 3.1. Provette sensibilizzate

La superficie interna di ciascuna provetta è rivestita con IgG monoclonali murine biotinate, dirette contro un epitopo dell'hGH diverso da quello contro cui sono dirette le immunoglobuline utilizzate per il tracciante. Al momento dell'uso, portare le provette sensibilizzate a temperatura ambiente prima di aprire il contenitore, per evitare condensazione di umidità.

*Le provette non utilizzate vanno conservate nel contenitore ben chiuso. Non mescolare lotti differenti di provette sensibilizzate.*

### **3.2. Traccianti <sup>125</sup>I (rosso):** reattivo pronto per l'uso

Il flacone contiene 11 mL di IgG monoclonali murine anti-hGH marcate con <sup>125</sup>I, sieroalbumina bovina, siero equino, IgG di topo, tampone fosfato, conservanti e un colorante rosso inerte. La radioattività massima è 333 kBq (9 µCi) alla data di taratura.

### **3.3. Calibratori di hGH:** reattivo pronto per l'uso

I flaconi contengono quantità crescenti di hGH, siero umano, tampone fosfato e conservanti. Le concentrazioni di hGH sono le seguenti: 0 - 1,5 - 4,5 - 9 - 24 - 60 - 150 µIU/mL (0 - 0,5 - 1,5 - 3 - 8 - 20 - 50 ng/mL). Il volume del calibratore zero è 3 mL; il volume dei calibratori 1-6 è 0,5 mL. *I calibratori del kit sono commutabili con i campioni in esame quando sono utilizzati con i reattivi e la procedura operativa di questo test diagnostico in vitro, secondo quanto raccomandato dal fabbricante.*

I calibratori del kit sono tarati contro il 2nd standard internazionale NIBSC 98/574, hGH ottenuto con la tecnica del DNA ricombinante (1 ng = 3 µIU).

### **3.4. Siero di controllo:** reattivo liofilo

Il flacone contiene hGH, siero umano e conservanti. Il range delle concentrazioni di ogni controllo è riportato sul certificato di analisi ed indica i limiti stabiliti da DiaSorin per i valori di controllo ottenibili in sessioni di analisi affidabili.

Ricostituire il contenuto del flacone con 1 mL di acqua distillata. Conservare per due settimane a 2-8°C oppure suddiviso in aliquote a -20°C o a temperature inferiori per una più lunga conservazione.

### **3.5. Tampone di lavaggio:** reattivo in soluzione (10x)

Ogni flacone contiene 50 mL di Triton X-100 allo 0,5% e soluzione fisiologica salina.

Portare a volume di 500 mL con acqua deionizzata l'intero contenuto di ogni flacone. La soluzione risultante è stabile a 2-8°C fino alla data di scadenza del kit. La soluzione viene utilizzata per il lavaggio delle provette.

## **4. ATTREZZATURE E REATTIVI AUSILIARI**

- Acqua distillata e deionizzata.
- Vetreria.
- Micropipette con puntali monouso da 50 µL (esattezza ± 3%, precisione 2%) e 100, 1000 µL (esattezza ± 2%, precisione 1%).
- Portaprovette.
- Agitatore Vortex.
- Agitatore rotante con velocità di agitazione di 300-350 rpm (facoltativo).
- Sistema per distribuire e aspirare il tampone di lavaggio in grado di distribuire 2-3 mL per ciclo di lavaggio durante due cicli di lavaggio.
- Contatore gamma per contare lo iodio <sup>125</sup>I (impostazione della finestra del contatore: 15-80 keV - efficienza del contatore: 70% - tempo di conteggio: 1 min). Se l'efficienza del contatore è inferiore al 60%, si deve prolungare il tempo di conteggio a 2 min.

## **5. PRELIEVO E PREPARAZIONE DEI CAMPIONI**

Il dosaggio può essere effettuato in campioni di siero o plasma umano. Possono essere utilizzati anticoagulanti come citrato, EDTA ed eparina. Prelevare il sangue per puntura venosa, lasciarlo coagulare e separare il siero dal coagulo al più presto. Chiarificare per filtrazione o centrifugazione prima del test i campioni che presentano materiale in sospensione, opalescenza, lipemia o residui eritrocitari. Non usare campioni fortemente emolizzati o lipemici, né campioni che presentano materiale in sospensione o evidente contaminazione microbica. Se il dosaggio è eseguito nelle 24 ore successive al prelievo, i campioni possono essere conservati a 2-8°C. In caso contrario, devono essere suddivisi in aliquote congelate a -20°C o a temperature inferiori. Se i campioni sono stati scongelati, agitare con cura prima di dosarli. Evitare cicli ripetuti di congelamento e scongelamento.

*Se si prevedono livelli di hGH maggiori di 150 µIU/mL (50 ng/mL), diluire con il calibratore zero.*

## 6. PROCEDIMENTO OPERATIVO

Portare i reattivi a temperatura ambiente (20-25°C) prima del dosaggio. Prevedere determinazioni almeno in duplicato. Eseguire la determinazione dei calibratori per ogni serie di campioni analizzati. Il procedimento operativo deve essere rigorosamente identico per calibratori e campioni in esame.

Eseguire le fasi del dosaggio nell'ordine previsto, senza interruzioni. La distribuzione dei reattivi deve essere eseguita rapidamente (al massimo 30 min). Utilizzare un puntale monouso nuovo per dispensare calibratori e campioni.

- Distribuire i reattivi sul fondo delle provette sensibilizzate. Operare secondo lo schema seguente:

reattivi \ provette	Calibratori	Campioni
Calibratori	0-6 50 µL	-
Campioni	-	50 µL
Tracciante	100 µL	100 µL

- Preparare due provette non sensibilizzate per il calcolo dell'attività totale contenenti solamente 100 µL di tracciante e lasciare da parte fino al momento del conteggio.
- **Agitare** dolcemente su Vortex il contenuto delle provette e **incubare** secondo il procedimento prescelto:
  - . **90 min a temperatura ambiente** sotto agitazione (300-350 rpm) (procedimento A)
  - . **18-22 ore a temperatura ambiente** (procedimento B).
- Aspirare accuratamente la miscela di incubazione e **lavare 2 volte** con 2 mL di **tampone di lavaggio**. *Verificare che l'eliminazione del liquido sia completa, assicurandosi che il puntale della pipetta di aspirazione tocchi il fondo delle provette sensibilizzate. La presenza di gocce aderenti alle pareti delle provette sensibilizzate può provocare scarsa riproducibilità o risultati non affidabili. Non deve restare traccia del colorante rosso.*
- **Misurare la radioattività** delle provette.

## 7. CALCOLO DEI RISULTATI

Calcolare la media dei conteggi per ogni gruppo di provette dopo aver sottratto il valore del fondo. Esprimere la media dei conteggi di calibratori e campioni come percentuale rispetto all'attività totale:

$$B/T\% = \frac{\text{conteggio medio calibratori o campioni}}{\text{conteggio medio attività totale}} \times 100$$

Riportare su grafico log-log la percentuale media calcolata per ciascun calibratore sulle ordinate (asse delle y) in funzione della concentrazione di hGH espressa in µIU/mL o ng/ mL sulle ascisse (asse delle x). Si ottiene così una curva di taratura (Fig. 1). Direttamente dalla curva di taratura leggere la concentrazione di hGH di ciascun campione espressa in µIU/mL o ng/mL. Se il campione è stato diluito, la concentrazione di hGH trovata deve essere moltiplicata per il fattore di diluizione.

**Esempio di calcolo** (procedimento A)

*I dati seguenti devono essere considerati solo un esempio e non devono essere usati in luogo dei dati ottenuti dall'utilizzatore.*

Descrizione	cpm	B/T%
Attività totale	112.199	100
Calibratore zero	23	0,02
1,5 µIU/mL - 0,5 ng/mL	891	0,79
4,5 µIU/mL - 1,5 ng/mL	2.861	2,55
9 µIU/mL - 3 ng/mL	5.598	4,99
24 µIU/mL - 8 ng/mL	13.308	11,86
60 µIU/mL - 20 ng/mL	29.546	26,33
150 µIU/mL - 50 ng/mL	59.715	53,22
Campione	3.636	3,24

Interpolando dalla curva di taratura, il campione risulta contenere 5,76 µIU/mL (1,92 ng/mL) di hGH.

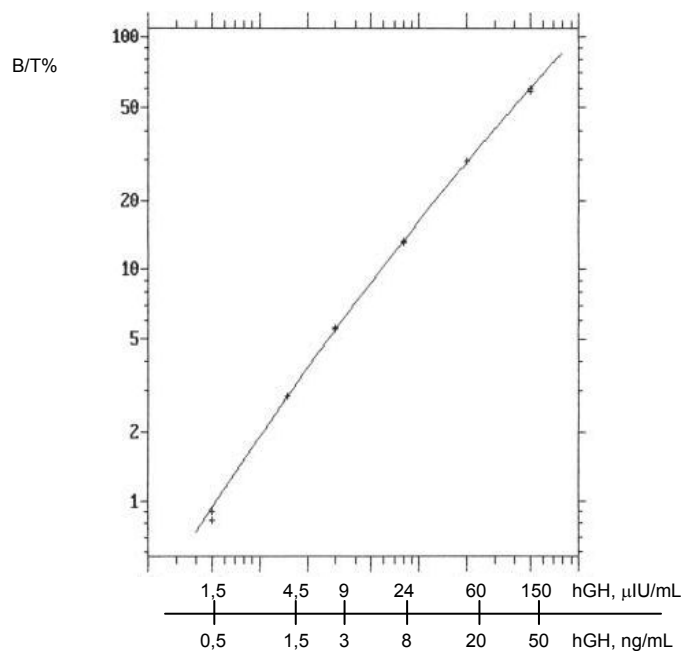


Fig. 1

## 8. DATI CLINICI

Data la variabilità intra- ed inter-individuale della secrezione di hGH, la letteratura attribuisce un limitato significato diagnostico al dosaggio basale e preferisce la valutazione della risposta dell'hGH a test di stimolo. Si ritiene quindi opportuno ricordare che i valori basali di riferimento riportati di seguito sono esclusivamente indicativi. Si raccomanda a ciascun laboratorio di stabilire i propri criteri di valutazione ed intervalli di riferimento.

Soggetti	hGH, µIU/mL	hGH, ng/mL
Età prepuberale	0,0 - 4,0	0,0 - 1,3
Età puberale: maschi	0,0 - 10,0	0,0 - 3,3
femmine	0,0 - 30,0	0,0 - 10,0
Età adulta: uomini	0,0 - 14,0	0,0 - 4,7
donne	0,0 - 32,0	0,0 - 10,7

## 9. PRESTAZIONI METODOLOGICHE DEL KIT

### 9.1. Specificità analitica

La specificità analitica è definita come la capacità del test di rilevare esattamente l'analita in presenza di fattori potenzialmente interferenti nella matrice del campione (per esempio, anticoagulanti, emolisi, effetti di trattamenti del campione) o di reazioni crociate con analiti potenzialmente interferenti.

**Interferenze.** Studi controllati su fattori potenzialmente interferenti hanno dimostrato che le prestazioni del test non sono influenzate da anticoagulanti (citrato, EDTA, eparina), emolisi (fino a 200 mg/dL di emoglobina), lipemia (fino a 500 mg/dL di trigliceridi), bilirubinemia (fino a 20 mg/dL di bilirubina) o un congelamento dei campioni.

**Reazioni crociate.** Il kit riconosce le due varianti monomeriche dell'hGH (P.M. 20.000 e 22.000 dalton).

La specificità è stata valutata come la concentrazione apparente di hGH ottenuta dosando elevate concentrazioni di ormoni potenzialmente interferenti.

Ormone	Concentrazione	Livello apparente di hGH
hPRL	100 mIU/mL 3rd IS 84/500	3 µIU/mL (1 ng/mL)
hCG	100 IU/mL 3rd IS 75/537	non rilevabile
hTSH	1 IU/mL 2nd IRP 80/558	non rilevabile
hLH	2 IU/mL 1st IRP 68/40	non rilevabile
hFSH	2 IU/mL 2nd IRP 78/549	non rilevabile
hCS	3 µg/mL	non rilevabile

### 9.2. Sensibilità analitica

La sensibilità analitica può essere espressa anche come limite di rilevazione, ossia la quantità minima di analita rilevabile dal test. Il limite di rilevazione è 0,12 µIU/mL (0,04 ng/mL) al 95% di confidenza. È stato calcolato come la concentrazione apparente di analita distinguibile dal calibratore zero, ossia due deviazioni standard sopra lo zero.

### 9.3. Precisione

La ripetibilità e la riproducibilità del saggio (ossia la variabilità intra-saggio e inter-saggio) sono state determinate utilizzando dei campioni di riferimento a diverse concentrazioni di analita.

Ripetibilità	A	B	C
Numero di determinazioni	10	10	10
Media (µIU/mL)	36,80	16,40	3,42
Deviazione standard	0,68	0,30	0,12
Coefficiente di variazione (%)	1,9	1,9	3,9

Riproducibilità	A	B	C
Numero di determinazioni	10	10	10
Media (µIU/mL)	34,28	15,82	4,02
Deviazione standard	0,86	0,58	0,16
Coefficiente di variazione (%)	2,5	3,7	4,1

### 9.4. Esattezza

L'esattezza del dosaggio è stata controllata mediante i test di diluizione e recupero.

**Test di diluizione.** Sono state dosate diluizioni scalari di due sieri a concentrazione elevata di hGH effettuate nel calibratore zero.

Diluizione	Concentrazione attesa, µIU/mL	Concentrazione misurata, µIU/mL	% Recupero
in toto	–	77,40	–
1:2	38,70	37,40	96,6
1:4	19,35	18,60	96,1
1:8	9,68	9,40	97,2
1:16	4,84	4,80	99,2
1:32	2,42	2,40	99,2
in toto	–	44,40	–
1:2	22,20	23,00	103,6
1:4	11,10	10,80	97,3
1:8	5,55	5,40	97,3
1:16	2,78	2,80	100,9
1:32	1,39	1,40	100,9

**Test di recupero.** Sono stati dosati due sieri contenenti hGH, sia in toto sia dopo averli addizionati con quantità crescenti di hGH.

Concentrazione addizionata, $\mu\text{IU/mL}$	Concentrazione attesa, $\mu\text{IU/mL}$	Concentrazione misurata, $\mu\text{IU/mL}$	% Recupero
–	–	33,40	–
50,00	81,74	78,80	96,4
25,00	56,74	54,40	95,9
12,50	44,24	44,60	100,8
6,50	38,24	39,80	104,1
2,10	33,84	34,60	102,3
–	–	13,00	–
50,00	62,36	62,50	100,2
25,00	37,36	38,40	102,8
12,50	24,86	25,00	100,6
6,50	18,86	19,20	101,9
2,10	14,46	14,60	101,0

#### 9.5. Effetto gancio ad alte dosi

Quando si dosano campioni contenenti concentrazioni di antigene estremamente elevate in un metodo *sandwich* con un'incubazione, è possibile ottenere dei livelli apparenti di antigene inferiori al reale per effetto gancio. Per una corretta quantificazione, i campioni contenenti livelli di hGH maggiori di quello del calibratore più concentrato vanno diluiti con il calibratore zero e ridosati. I risultati vanno quindi moltiplicati per il fattore di diluizione per ottenere i livelli dei campioni non diluiti.

Il kit è stato messo a punto in modo che dosi di hGH fino a 7,5 mIU/mL (2,50  $\mu\text{g/mL}$ ) forniscano un segnale analitico sempre al di sopra del calibratore più concentrato.

#### 10. LIMITI DEL DOSAGGIO

La diagnosi non deve essere formulata sulla base del risultato di un singolo dosaggio, ma questo deve essere valutato insieme ad altri riscontri clinici, procedure diagnostiche e al giudizio del medico.

Contaminazione batterica o cicli ripetuti di congelamento/scongelo dei campioni possono modificare i risultati del dosaggio.

Per ottenere risultati affidabili è necessario attenersi strettamente alle istruzioni per l'uso e possedere un'adeguata manualità tecnica. In particolare è essenziale una buona precisione nelle fasi di ricostituzione e distribuzione dei reattivi e in quelle d'aspirazione e lavaggio.

Risultati non riproducibili sono dovuti principalmente a fattori metodologici, come ad esempio:

- scambio di capsule tra i flaconi
- uso dello stesso puntale per i prelievi da flaconi diversi o da campioni diversi
- flaconi lasciati aperti per lunghi periodi di tempo
- esposizione dei reattivi o campioni a calore intenso o a forti sorgenti d'inquinamento batterico
- aspirazione della miscela di incubazione e lavaggio delle provette non adeguati
- contaminazione del bordo delle provette con il tracciante o con i campioni
- oscillazioni casuali o cattiva manutenzione del contatore gamma
- scambio di reattivi provenienti da lotti diversi.

## 11. AVVERTENZE E PRECAUZIONI

I componenti del kit contengono sodio azide come conservante. Poiché la sodio azide può formare azidi di piombo o di rame esplosivi nelle tubature, si raccomanda di far fluire acqua in abbondanza negli scarichi dopo l'eliminazione di soluzioni contenenti sodio azide (Council Directive 99/45/EC).

- R 22 – Nocivo per ingestione.
- R 31 – A contatto con acidi libera gas tossico.
- S 28 – In caso di contatto con la pelle lavarsi immediatamente ed abbondantemente con acqua.
- S 45 – In caso d'incidente o di malessere consultare immediatamente il medico (se possibile, mostrargli l'etichetta).

Tutte le unità di siero e plasma utilizzate per la fabbricazione dei componenti di questo kit sono state analizzate e trovate non reattive per HBsAg, anti-HCV e per anti-HIV-1/2. Tuttavia, poiché nessun metodo può dare assoluta certezza che siano assenti agenti patogeni, tutto il materiale di origine umana dovrebbe essere considerato potenzialmente infettivo e manipolato come tale.

## 12. REGOLE DI SICUREZZA

- Non mangiare, bere, fumare o applicare cosmetici durante l'esecuzione del dosaggio.
- Non pipettare con la bocca.
- Evitare il contatto diretto con il materiale potenzialmente infetto indossando indumenti da laboratorio, occhiali protettivi e guanti monouso. Lavare accuratamente le mani al termine del dosaggio.
- Evitare di provocare schizzi o aerosol. Ogni goccia di reattivo biologico deve essere rimossa con una soluzione di sodio ipoclorito al 5% ed il mezzo utilizzato deve essere trattato come materiale di rifiuto infetto.
- Tutti i campioni, tutti i reattivi biologici del kit e tutti i materiali usati per effettuare il saggio devono essere considerati in grado di trasmettere agenti infettivi; pertanto i rifiuti devono essere smaltiti secondo le disposizioni legislative e la regolamentazione vigente in ciascun Paese. Il materiale monouso deve essere incenerito; i rifiuti liquidi devono essere decontaminati con sodio ipoclorito ad una concentrazione finale del 5% per almeno mezz'ora. Qualsiasi materiale che deve essere riutilizzato va trattato in autoclave con un approccio di *overkill* (USP 24, 2000, p. 2143). Generalmente si considera che un'ora a 121°C sia un tempo di sterilizzazione adeguato; tuttavia si raccomanda a ciascun utilizzatore di verificare l'efficacia del ciclo di decontaminazione mediante una convalida iniziale e l'uso routinario di indicatori biologici.

## 13. REGOLE DI BASE DI RADIOPROTEZIONE

### Reagenti contenenti iodio-125

Questo kit contiene materiale radioattivo che non supera 8,85  $\mu\text{Ci}$  (328 kBq) di iodio-125. Adottare precauzioni adeguate e le buone pratiche di laboratorio per la conservazione, la manipolazione e lo smaltimento di questo materiale.

Per i professionisti o gli istituti che utilizzano radioisotopi con una licenza generale:

Questo materiale radioattivo può essere consegnato, acquisito, conservato e usato unicamente da personale medico, veterinari abilitati alla pratica di medicina veterinaria, laboratori clinici o ospedali e unicamente per test in vitro clinici o di laboratorio che non prevedano la somministrazione interna o esterna del materiale, o di radiazioni da esso derivanti, su persone o animali. L'acquisto, il possesso, la conservazione, l'uso e il trasferimento sono soggetti alle norme e alla licenza generale della Nuclear Regulatory Commission statunitense dello stato con cui la Commissione ha stipulato un accordo per l'esercizio dell'autorità normativa.

1. La conservazione del materiale radioattivo deve essere limitata ad un'area specificatamente designata.
2. L'accesso ai materiali radioattivi deve essere limitato esclusivamente al personale autorizzato.
3. Non usare la bocca per versare con la pipetta materiale radioattivo.
4. Non mangiare o bere nelle aree di lavoro designate per materiale radioattivo.

5. Le zone dove possono verificarsi perdite devono essere pulite, quindi lavate con detergente alcalino o soluzione per la decontaminazione radiologica. Tutti gli oggetti in vetro usati devono essere accuratamente risciacquati con acqua prima di lavarli con altri oggetti in vetro del laboratorio.

Per i professionisti o gli istituti che utilizzano radioisotopi con una licenza specifica:

L'acquisto, l'uso, il trasferimento e lo smaltimento di materiali radioattivi sono soggetti alle norme e alle condizioni della licenza specifica.

**ATTENZIONE:** La radioattività stampata sulle istruzioni allegate alla confezione può essere leggermente diversa dalla radioattività stampata sull'etichetta della scatola e sull'etichetta della fiala di tracciante. L'etichetta sulla scatola e sulla fiala di tracciante indicano la quantità effettiva di radioattività alla data di calibrazione, mentre il materiale informativo della confezione indica la radioattività teorica del kit.



### SCHEMA DEL DOSAGGIO

- 1 - RICOSTITUIRE IL SIERO DI CONTROLLO.
- 2 - CONTRASSEGNARE LE PROVETTE SENSIBILIZZATE IN DUPLICATO.
- 3 - DISTRIBUIRE I REATTIVI SECONDO LO SCHEMA SEGUENTE E AGITARE LA MISCELA D'INCUBAZIONE:

REATTIVI \ PROVETTE	CAL 0-6	CAMPIONI
CALIBRATORI	50 $\mu$ L	-
CAMPIONI	-	50 $\mu$ L
TRACCIANTE	100 $\mu$ L	100 $\mu$ L

- 4 - INCUBARE PER:
  - . 90 MIN A TEMPERATURA AMBIENTE SOTTO AGITAZIONE (Procedimento A)
  - . 18-22 ORE A TEMPERATURA AMBIENTE (Procedimento B).
- 5 - ASPIRARE LA MISCELA DI INCUBAZIONE E LAVARE 2 VOLTE CON 2 mL DI TAMPONE DI LAVAGGIO.
- 6 - MISURARE LA RADIOATTIVITÀ DELLE PROVETTE.

**TROUSSE POUR LE DOSAGE  
IMMUNORADIOMETRIQUE DE L'hGH**

**Technique de détermination quantitative  
de l'hormone de croissance (hGH)  
dans le sérum ou dans le plasma humain**

Usage in vitro

### 1. INTRODUCTION

L'hormone de croissance (hGH) constitue l'hormone hypophysaire sécrétée en majeure quantité. Pendant l'enfance et l'adolescence, elle détermine la croissance corporelle et, durant toute la vie, elle influe sur les processus anaboliques. L'hGH n'est pas, pourtant, essentielle à la santé durant la vie adulte.

L'hGH est synthétisée par les cellules alpha de l'adénohypophyse. D'un poids moléculaire d'environ 21.500 daltons, elle est composée d'une seule chaîne polypeptidique contenant 191 résidus d'acides aminés avec deux ponts disulfures. L'hGH circule sous des formes moléculaires différentes appelées Big-Big GH, Big GH et Little GH. Little GH, forme prédominante, serait la forme originelle monomérique tandis que les deux autres sembleraient être des formes polymériques.

Un organe cible spécifique n'existe pas mais on a trouvé des récepteurs sur les membranes des cellules du foie et des lymphocytes circulants. En fait on peut diviser les effets de l'hGH en deux catégories: a) action directe anti-insulinique (lipolytique et hyperglycémiant); b) action indirecte *insulin-like* (anti-lipolytique et mitogène). Cette dernière action qui provoque en définitive la croissance corporelle, attribuée classiquement à l'hGH, est exercée par l'intermédiaire des somatomédines. Celles-ci sont des hormones dont le poids moléculaire est relativement faible (7.000 daltons environ) et la structure fort semblable à celle de la pro-insuline.

Il semblerait y avoir au moins deux somatomédines: l'une aux propriétés *insulin-like* plus évidentes et l'autre plus directement impliquée dans la croissance corporelle. Contrairement à toutes les autres hormones polypeptidiques, les somatomédines sont véhiculées pour la plupart par une ou plusieurs protéines porteuses lesquelles, en prolongeant leur demi-vie, auraient la capacité de rendre les niveaux des somatomédines relativement stables dans le temps.

### 2. PRINCIPE DU DOSAGE

Ce dosage, de type immunoradiométrique (IRMA) non compétitif, utilise deux anticorps monoclonaux de souris reconnaissant deux épitopes différents de la molécule d'hGH. Le premier anticorps est fixé sur la paroi des tubes tandis que le second est utilisé en tant que traceur.

Le dosage prévoit une seule incubation pendant laquelle l'hGH, contenue dans les étalons ou les échantillons, permet de fixer le traceur à la phase solide. Après l'incubation, la quantité d'anticorps marqué liée à la phase solide, et par conséquent la quantité de radioactivité mesurée, est proportionnelle à la concentration d'hGH présente dans les étalons ou les échantillons. A la fin de l'incubation, le traceur non fixé est éliminé par aspiration et par lavage.

### 3. REACTIFS FOURNIS DANS LA TROUSSE

Tubes revêtus	100
Traceur <sup>125</sup> I	1 flacon
Etalons hGH	7 flacons
Sérum de contrôle	1 flacon
Tampon de lavage	2 flacons
Nombre de dosages	100

**STOCKAGE:** Conserver la trousse à 2-8°C dès réception. Ne pas congeler. Après l'ouverture, les réactifs de cette trousse restent stables jusqu'à la date de péremption de la trousse, s'ils sont conservés de manière adéquate. La trousse est garantie pour réaliser 4 séries analytiques si elle est utilisée pendant le jour à température ambiante et conservée pendant la nuit à 2-8°C.

Ne pas utiliser les réactifs ayant dépassé la date de péremption. La date de péremption de la trousse est indiquée sur l'étiquette extérieure et correspond à la date de péremption du traceur. La date de péremption de chaque composant est reportée sur les étiquettes des flacons respectifs.

Agiter doucement les flacons lors de la reconstitution de leur contenu, afin d'éviter la formation de mousse. Ne pas mélanger des réactifs provenant de lots différents.

### 3.1. Tubes revêtus

La surface interne de chaque tube est revêtue d'IgG monoclonales de souris biotinylées, dirigées contre un épitope de l'hGH différent de celui contre lequel sont dirigées les immunoglobulines utilisées pour le traceur. *Au moment de l'emploi, amener les tubes revêtus à température ambiante avant d'ouvrir leur boîte, afin d'éviter tout phénomène de condensation.*

*Conserver les tubes non utilisés dans la boîte en s'assurant que celle-ci est dûment fermée. Ne pas mélanger des tubes revêtus provenant de lots différents.*

### 3.2. Traceur <sup>125</sup>I (rouge): réactif prêt à l'emploi

Le flacon contient 11 mL d'IgG monoclonales de souris anti-hGH marquées à l'<sup>125</sup>I, de la sérumbumine bovine, du sérum de cheval, des IgG de souris, du tampon phosphaté, des conservateurs et un colorant rouge inerte. La radioactivité maximale est de 333 kBq (9 µCi) à la date d'étalonnage.

### 3.3. Etalons hGH: réactif prêt à l'emploi

Les flacons contiennent des quantités croissantes d'hGH, du sérum d'origine humaine, du tampon phosphaté et des conservateurs. Les concentrations d'hGH sont les suivantes: 0 - 1,5 - 4,5 - 9 - 24 - 60 - 150 µUI/mL (0 - 0,5 - 1,5 - 3 - 8 - 20 - 50 ng/mL). Le volume de l'étalon zéro est de 3 mL et celui des étalons 1-6 de 0,5 mL. *Les étalons de la trousse sont commutables avec les échantillons examinés s'ils sont utilisés avec les réactifs et le mode opératoire de ce test diagnostique in vitro, d'après les recommandations du fabricant.*

Les étalons de la trousse sont étalonnés par rapport au 2ème Standard International NIBSC 98/574, hGH obtenue par la technique de l'ADN recombinant (1 ng = 3 µUI).

### 3.4. Sérum de contrôle: réactif lyophilisé

Le flacon contient de l'hGH, du sérum humain et des conservateurs. La plage de concentrations pour chaque contrôle est indiquée dans le certificat d'analyse et indique les limites établies par DiaSorin pour les valeurs de contrôle qui peuvent être obtenues dans des séries analytiques fiables.

Reconstituer le contenu du flacon avec 1 mL d'eau distillée. La solution ainsi obtenue se conserve à 2-8°C pendant deux semaines; la congeler divisée en parties aliquotes à -20°C ou à des températures plus basses dans le cas d'un stockage prolongé.

### 3.5. Tampon de lavage: réactif en solution (10x)

Chaque flacon contient 50 mL de Triton X-100 à 0,5% et de la solution saline physiologique.

Compléter le contenu total de chaque flacon avec de l'eau déminéralisée jusqu'à atteindre un volume de 500 mL. La solution ainsi obtenue reste stable à 2-8°C jusqu'à la date de péremption de la trousse et est utilisée pour le lavage des tubes.

## 4. PRECAUTIONS D'UTILISATION

Certains réactifs contenus dans cette trousse renferment de l'azide de sodium. Ce sel peut réagir avec les installations sanitaires en plomb ou cuivre et former des azides métalliques extrêmement explosives. Pour évacuer ces réactifs, rincer à grande eau afin d'éviter les accumulations d'azide (Council Directive 99/45/EC).

R 22 – Nocif en cas d'ingestion.

R 31 – Au contact d'un acide, dégage un gaz toxique.

S 28 – Après contact avec la peau, se laver immédiatement et abondamment avec de l'eau.

S 45 – En cas d'accident ou de malaise, consulter immédiatement un médecin (si possible, lui montrer l'étiquette).

Toutes les unités de sérum et de plasma utilisées pour la fabrication des composants de cette trousse ont été analysées et ont été trouvées négatives en Ag HBs, en anticorps anti-VHC et en anticorps anti-HIV-1/2. Toutefois, puisqu'il n'existe aucune méthode garantissant l'absence totale d'agents pathogènes, on doit considérer tout matériau d'origine humaine comme étant potentiellement infectieux. C'est pourquoi il faudra le manipuler avec précaution.

## 5. REGLES DE SECURITE

- Ne pas manger, ni boire, ni fumer ou se maquiller pendant le dosage.
- Ne pas pipeter avec la bouche.
- Eviter le contact direct avec le matériel potentiellement infectieux en portant des vêtements de laboratoire, des lunettes de protection et des gants à usage unique. Se laver soigneusement les mains à la fin du dosage.
- Eviter de provoquer des éclaboussures ou des vaporisations. Si cela arrivait, chaque goutte de réactif doit être nettoyée avec une solution d'hypochlorite de sodium à 5% et traitée comme du matériel infectieux.
- Tous les échantillons, tous les réactifs biologiques de la trousse et tout le matériel utilisés pour effectuer l'essai doivent être considérés comme capables de transmettre des agents étiologiques. Toute élimination de déchets se fera conformément aux réglementations en vigueur. Le matériel à usage unique doit être incinéré; les déchets liquides doivent être décontaminés avec de l'hypochlorite de sodium à concentration finale de 5% pendant au moins une demi-heure. Tout matériel réutilisable doit être stérilisé en autoclave par un traitement à l'excès (*overkill*) (USP 24, 2000, p. 2143). On considère qu'un temps de stérilisation d'une heure à 121°C est convenable. Nous conseillons toutefois à chaque laboratoire de vérifier l'efficacité du cycle de décontamination en effectuant un contrôle au début et en utilisant de façon régulière les indicateurs biologiques.

## 6. REGLES DE BASE DE RADIOPROTECTION

### Réactifs contenant de l'iode 125

Cette trousse contient un produit radioactif qui ne dépasse pas 8,85  $\mu\text{Ci}$  (328 kBq) d'iode-125. Les précautions appropriées et les bonnes pratiques de laboratoire doivent être utilisées pour la conservation, la manipulation et la mise au rebut de ce produit.

Pour les praticiens ou les établissements recevant des radio-isotopes dans le cadre d'une licence générale :

Ce produit radioactif peut être reçu, réceptionné, détenu et utilisé uniquement par des médecins, des laboratoires cliniques, des hôpitaux, des vétérinaires et des centres de recherche dans le cadre de la pratique de médecine vétérinaire, de laboratoires cliniques ou des hôpitaux, et uniquement pour des analyses cliniques ou de laboratoire in vitro n'impliquant pas l'administration interne ou externe du produit, ni par rayonnement, à l'homme ou à l'animal. Sa réception, son acquisition, sa détention, son utilisation et son transfert sont sujets aux réglementations et à la licence générale de l'U.S. Nuclear Regulatory Commission de l'État avec lequel la Commission a conclu un accord pour l'exercice de l'autorité réglementaire.

1. Le produit radioactif doit être conservé à un endroit désigné.
2. L'accès aux produits radioactifs doit être limité au personnel autorisé uniquement.
3. Ne pas pipeter des solutions radioactives avec la bouche.
4. Ne pas manger, ni boire dans les zones de travail radioactives.
5. En cas de déversement de produits radioactifs dans une zone, nettoyer la zone, puis la laver à l'aide d'un produit détergent à base d'alcali ou d'une solution de décontamination radioactive. Tout article de verre utilisé doit être entièrement lavé à l'eau avant de laver les autres articles de verre du laboratoire.

Pour les praticiens ou les établissements recevant des radio-isotopes dans le cadre d'une licence spécifique :

La réception, l'utilisation, le transfert et la mise au rebut de produits radioactifs sont sujets aux réglementations et conditions de votre licence spécifique.

**ATTENTION** : La radioactivité imprimée sur la notice d'utilisation peut être légèrement différente de celle qui est imprimée sur l'étiquette de la boîte et sur l'étiquette du flacon du traceur. Les étiquettes de la boîte et du flacon du traceur indiquent la dose réelle de radioactivité à la date de calibrage, alors que la notice d'utilisation indique la radioactivité théorique de la trousse.

### Déchets radioactifs

Tout utilisateur ou détenteur de radioéléments en sources scellées ou non scellées en est responsable et comptable devant les autorités de Santé Publique et, de ce fait, n'est pas autorisé à s'en dessaisir par d'autres voies que celles définies par les procédures réglementaires. Les modalités d'élimination des déchets radioactifs provenant de sources non scellées sont définies par l'avis aux utilisateurs paru au Journal Officiel du 6 juin 1970. Conformément aux dispositions de cet avis et du décret N° 86-1103 du 2 octobre 1986 relatif à la protection des travailleurs contre les dangers des rayonnements ionisants paru au Journal Officiel du 12 octobre 1986, l'OPR<sup>(1)</sup> et les organismes désignés par lui sont seuls habilités à procéder à la prise en charge des déchets radioactifs correspondants.

Les laboratoires de notre filiale en France sont autorisés à céder les trousse conformément aux instructions de l'Arrêté du 3 avril 2002 et dans le respect de la réglementation sur le transport de matériel radioactif.

## 7. MATERIEL NECESSAIRE, MAIS NON FOURNI

- Eau distillée et déminéralisée.
- Bêchers.
- Micropipettes avec embouts à usage unique de 50  $\mu\text{L}$  (justesse  $\pm 3\%$ , fidélité 2%) et 100, 1000  $\mu\text{L}$  (justesse  $\pm 2\%$ , fidélité 1%).
- Portoir pour tubes.
- Mélangeur Vortex.
- Agitateur rotatif avec une vitesse de rotation de 300-350 tours/min (facultatif).
- Système de distribution et d'aspiration du tampon de lavage capable de distribuer 2-3 mL par cycle de lavage pendant deux cycles de lavage.
- Compteur gamma pour compter l'iode  $^{125}\text{I}$  (définition de la fenêtre du compteur: 15-80 keV - efficacité du compteur: 70% - temps de comptage: 1 min). Si l'efficacité du compteur est inférieure à 60%, le temps de comptage doit être prolongé à 2 min.

<sup>(1)</sup>O.P.R.I. BP 35 - 78110 Le Vésinet.

## 8. PRELEVEMENT ET PREPARATION DES ECHANTILLONS

Le dosage peut être effectué sur du sérum ou du plasma humain. On peut employer des anticoagulants comme le citrate, l'EDTA ou l'héparine. Pour obtenir le sérum prélever le sang par piqûre intraveineuse, le laisser coaguler et séparer le sérum du caillot dès que possible. Clarifier par filtration ou centrifugation avant le test les échantillons troubles, lipémiques et ceux contenant du matériel en suspension ou des déchets érythrocytaires. Ne pas utiliser des échantillons fortement hémolysés ou lipémiques, ni des échantillons contenant des particules en suspension ou une contamination microbienne évidente. Si le dosage est exécuté dans les 24 heures suivant le prélèvement, les échantillons peuvent être conservés à 2-8°C. Dans le cas contraire, ils doivent être aliquotés et congelés à -20°C ou à des températures plus basses. Si les échantillons ont été congelés, attendre qu'ils soient complètement décongelés et les homogénéiser avant le dosage. Il faut éviter les cycles de congélation/décongélation répétés.

*Si l'on prévoit des niveaux d'hGH supérieurs à 150 µUI/mL (50 ng/mL), diluer l'échantillon avec l'étalon zéro.*

## 9. MODE OPERATOIRE

Amener les réactifs à température ambiante (20-25°C) avant le dosage. Effectuer le dosage au moins en doublets. Les étalons doivent être dosés avec chaque série d'échantillons examinés. Le mode opératoire doit être rigoureusement identique pour les étalons et les échantillons à tester.

Exécuter toutes les phases du dosage dans l'ordre prévu, sans interruption. La distribution des réactifs doit être effectuée rapidement (30 min maximum). Utiliser un embout à usage unique neuf pour distribuer les étalons et les échantillons.

- Distribuer les réactifs au fond des tubes revêtus. Procéder d'après le schéma suivant:

réactifs \ tubes	Etalons 0-6	Echantillons
Etalons	50 µL	-
Echantillons	-	50 µL
Traceur	100 µL	100 µL

- Préparer deux tubes non revêtus ne contenant que 100 µL de traceur pour le calcul de l'activité totale (les mettre de côté en attendant la phase du calcul de la radioactivité).
- **Agiter** doucement le contenu des tubes au Vortex et **incuber** en fonction du protocole choisi pendant:
  - . **90 min à température ambiante** en agitation (300-350 tours/min) (protocole A)
  - . **18-22 heures à température ambiante** (protocole B).
- **Aspirer** le mélange d'incubation avec soin puis **laver 2 fois** avec 2 mL de **tampon de lavage**. *Vérifier que le liquide soit éliminé complètement: pour cela il faut s'assurer que l'embout de la pipette d'aspiration touche le fond des tubes revêtus. La présence de gouttes adhérant aux parois des tubes revêtus peut entraîner une mauvaise reproductibilité ou fausser les résultats. Le colorant rouge doit disparaître totalement.*
- **Mesurer la radioactivité** des tubes.

## 10. CALCUL DES RESULTATS

Calculer la moyenne des coups par minute pour chaque groupe de tubes après avoir soustrait la valeur du bruit de fond. Calculer la moyenne des coups par minute des étalons et des échantillons en pourcentage par rapport à l'activité totale:

$$B/T\% = \frac{\text{moyenne des coups par minute des étalons ou des échantillons}}{\text{moyenne des coups par minute de l'activité totale}} \times 100$$

Reporter sur du papier bilogarithmique le pourcentage moyen calculé pour chaque étalon sur l'axe des ordonnées (y) en fonction de la concentration d'hGH exprimée en µUI/mL ou ng/mL sur l'axe des abscisses (x). La Fig. 1 présente un exemple de la courbe d'étalonnage ainsi obtenue. Lire la concentration d'hGH de chaque échantillon exprimée en µUI/mL ou ng/mL directement de la courbe d'étalonnage. Si l'échantillon a été dilué, la concentration obtenue doit être multipliée par le facteur de dilution.

### Exemple de calcul (protocole A)

Les valeurs suivantes ne constituent qu'un exemple et ne doivent pas être employées à la place des données obtenues par l'utilisateur.

Description	cpm	B/T%
Activité totale	112.199	100
Etalon zéro	23	0,02
1,5 $\mu$ UI/mL - 0,5 ng/mL	891	0,79
4,5 $\mu$ UI/mL - 1,5 ng/mL	2.861	2,55
9 $\mu$ UI/mL - 3 ng/mL	5.598	4,99
24 $\mu$ UI/mL - 8 ng/mL	13.308	11,86
60 $\mu$ UI/mL - 20 ng/mL	29.546	26,33
150 $\mu$ UI/mL - 50 ng/mL	59.715	53,22
Echantillon	3.636	3,24

En effectuant l'interpolation de la courbe d'étalonnage, l'échantillon contient 5,76  $\mu$ UI/mL (1,92 ng/mL) d'hGH.

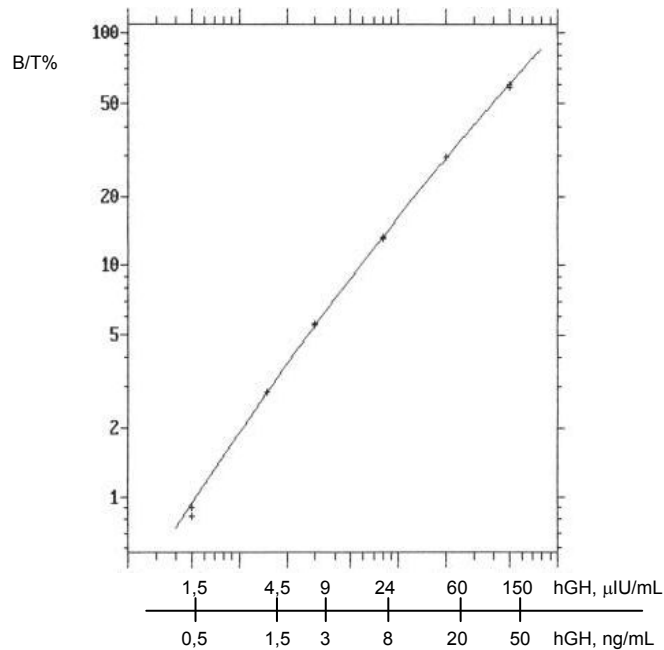


Fig. 1

## 11. VALEURS DE REFERENCE

Etant donnée la variabilité de la sécrétion d'hGH tant chez un même individu que chez des sujets différents, la littérature attribue une signification diagnostique limitée au test basal et préfère évaluer la réponse de l'hGH à des tests de stimulation.

Il est donc à rappeler que les valeurs basales de référence reportées ci-dessous ne sont données qu'à titre indicatif. Chaque laboratoire doit établir ses propres critères d'évaluation et intervalles de référence.

Sujets	hGH, $\mu$ UI/mL	hGH, ng/mL
Age prépubertaire	0,0 - 4,0	0,0 - 1,3
Age pubertaire: garçons	0,0 - 10,0	0,0 - 3,3
filles	0,0 - 30,0	0,0 - 10,0
Age adulte: hommes	0,0 - 14,0	0,0 - 4,7
femmes	0,0 - 32,0	0,0 - 10,7

## 12. CARACTERISTIQUES DU DOSAGE

### 12.1. Spécificité analytique

La spécificité analytique est définie comme la capacité du test à détecter exactement l'analyte en présence de facteurs pouvant interférer dans la matrice de l'échantillon (par exemple anticoagulants, hémolyse, effets de traitement de l'échantillon) ou d'autres analytes pouvant provoquer des réactions croisées.

**Interférences.** Des études contrôlées sur des facteurs potentiellement interférents ont démontré que les caractéristiques du test ne sont pas modifiées par des anticoagulants (citrate, EDTA, héparine), par une hémolyse (jusqu'à 200 mg/dL d'hémoglobine), une lipémie (jusqu'à 500 mg/dL de triglycérides), une bilirubinémie (jusqu'à 20 mg/dL de bilirubine) ou une congélation des échantillons.

**Réactions croisées.** La trousse reconnaît les deux formes monomériques de l'hGH (P.M. 20.000 et 22.000 daltons). La spécificité de ce test a été déterminée en évaluant le niveau apparent d'hGH lors d'un dosage avec des concentrations élevées d'hormones potentiellement interférentes.

Hormone	Concentration	Niveau apparent d'hGH
hPRL	100 mUI/mL 3rd IS 84/500	3 $\mu$ UI/mL (1 ng/mL)
hCG	100 UI/mL 3rd IS 75/537	non détectable
hTSH	1 UI/mL 2nd IRP 80/558	non détectable
hLH	2 UI/mL 1st IRP 68/40	non détectable
hFSH	2 UI/mL 2nd IRP 78/549	non détectable
hCS	3 $\mu$ g/mL	non détectable

### 12.2. Sensibilité analytique

La sensibilité analytique peut être exprimée aussi comme la limite de détection, c'est-à-dire la quantité d'analyte minimum que le test peut détecter. La limite de détection est de 0,12  $\mu$ UI/mL (0,04 ng/mL) avec des limites de confiance à 95%, calculée comme étant la concentration apparente d'analyte qui peut être différenciée de l'étalon zéro, c'est-à-dire deux écarts type au-dessus de zéro.

### 12.3. Fidélité

Plusieurs pools de référence à différentes concentrations d'analyte ont été testés pour déterminer la répétabilité et la reproductibilité du dosage (c'est-à-dire, la variabilité intra-essai et inter-essais).

Répétabilité	A	B	C
Nombre de déterminations	10	10	10
Moyenne ( $\mu\text{UI/mL}$ )	36,80	16,40	3,42
Ecart type	0,68	0,30	0,12
% de coefficient de variation	1,9	1,9	3,9

Reproductibilité	A	B	C
Nombre de déterminations	10	10	10
Moyenne ( $\mu\text{UI/mL}$ )	34,28	15,82	4,02
Ecart type	0,86	0,58	0,16
% de coefficient de variation	2,5	3,7	4,1

### 12.4. Justesse

La justesse du dosage a été vérifiée à l'aide des tests de dilution et de surcharge.

**Test de dilution.** Le test de dilution a été réalisé sur deux sérums de concentration élevée en hGH dilués en série à l'aide de l'étalon zéro.

Dilution	Concentration attendue, $\mu\text{UI/mL}$	Concentration mesurée, $\mu\text{UI/mL}$	% Récupération
pur	–	77,40	–
1/2	38,70	37,40	96,6
1/4	19,35	18,60	96,1
1/8	9,68	9,40	97,2
1/16	4,84	4,80	99,2
1/32	2,42	2,40	99,2
pur	–	44,40	–
1/2	22,20	23,00	103,6
1/4	11,10	10,80	97,3
1/8	5,55	5,40	97,3
1/16	2,78	2,80	100,9
1/32	1,39	1,40	100,9



**Test de surcharge.** Le test de surcharge a été réalisé sur deux sérums contenant de l'hGH soit purs soit par ajouts de quantités croissantes d'hGH.

Concentration ajoutée, $\mu\text{UI}/\text{mL}$	Concentration attendue, $\mu\text{UI}/\text{mL}$	Concentration mesurée, $\mu\text{UI}/\text{mL}$	% Récupération
–	–	33,40	–
50,00	81,74	78,80	96,4
25,00	56,74	54,40	95,9
12,50	44,24	44,60	100,8
6,50	38,24	39,80	104,1
2,10	33,84	34,60	102,3
–	–	13,00	–
50,00	62,36	62,50	100,2
25,00	37,36	38,40	102,8
12,50	24,86	25,00	100,6
6,50	18,86	19,20	101,9
2,10	14,46	14,60	101,0

### 12.5. Effet crochet à doses élevées

Dans une méthode *sandwich* comportant une seule incubation, lorsque la concentration en antigène est très élevée, on peut observer des concentrations apparentes d'antigène inférieures aux valeurs réelles par effet crochet. Pour une quantification correcte, les échantillons contenant des concentrations de hGH supérieures à celle du point étalon le plus concentré doivent être dilués et dosés de nouveau. Les résultats devront alors être multipliés par le facteur de dilution pour obtenir les valeurs de concentration des échantillons purs.

La trousse a été conçue de manière que des concentrations d'hGH jusqu'à 7,5 mUI/mL (2,50  $\mu\text{g}/\text{mL}$ ) génèrent un signal analytique qui est supérieur à la valeur du point étalon le plus concentré.

### 13. LIMITES DU DOSAGE

Le diagnostic ne doit pas être établi d'après le résultat d'un seul dosage, mais il faut prendre en considération les investigations cliniques, les autres procédures diagnostiques et l'avis d'un médecin.

La contamination bactérienne des échantillons ou leurs cycles répétés de congélation/ décongélation peuvent modifier les résultats du dosage.

Même si cette trousse est validée pour les échantillons de sérum et de plasma, l'Agence Française de Sécurité Sanitaire des Produits de Santé (AFSSAPS) recommande le sérum exclusivement.

Afin d'obtenir des résultats fiables, il faut suivre strictement le mode opératoire et effectuer les manipulations de façon appropriée. En particulier, la précision et le soin apportés durant les phases de reconstitution et de distribution des réactifs ainsi que d'aspiration et de lavage sont indispensables à la fiabilité du test.

Des résultats qui ne sont pas reproductibles sont dus principalement à des erreurs de manipulation comme par exemple:

- échange de bouchons entre les flacons
- utilisation du même embout pour prélever dans différents flacons ou distribuer les différents échantillons
- flacons restés trop longtemps ouverts
- exposition des réactifs ou des échantillons à une température élevée ou à de fortes sources de contamination bactérienne
- aspiration du mélange d'incubation et lavage des tubes inadéquats
- contamination du bord des tubes avec le traceur ou avec les échantillons
- oscillations accidentelles ou mauvais entretien du compteur gamma
- mélange de réactifs provenant de lots différents.

## SCHÉMA DU DOSAGE

- 1 - RECONSTITUER LE SÉRUM DE CONTRÔLE.
- 2 - IDENTIFIER AU MOYEN D'UN REPÈRE LES TUBES REVÊTUS, EN DOUBLETS.
- 3 - DISTRIBUER LES RÉACTIFS EN FONCTION DU SCHÉMA SUIVANT PUIS AGITER LE MÉLANGE D'INCUBATION:

RÉACTIFS \ TUBES	ÉTALONS 0-6	ÉCHANTILLONS
ÉTALONS	50 $\mu$ L	–
ÉCHANTILLONS	–	50 $\mu$ L
TRACEUR	100 $\mu$ L	100 $\mu$ L

- 4 - INCUBER PENDANT:
  - . 90 MIN À TEMPÉRATURE AMBIANTE EN AGITATION (Protocole A)
  - . 18-22 HEURES À TEMPÉRATURE AMBIANTE (Protocole B).
- 5 - ASPIRER LE MÉLANGE D'INCUBATION PUIS LAVER 2 FOIS AVEC 2 mL DE TAMPON DE LAVAGE.
- 6 - MESURER LA RADIOACTIVITÉ DES TUBES.

## hGH IRMA

### Methode zur quantitativen immunradiometrischen Bestimmung des humanen Wachstumshormons (hGH) in Humanserum oder -plasma

Nur für In-vitro-Diagnostik

#### 1. EINLEITUNG

Das humane Wachstumshormon (hGH) ist das am meisten produzierte Hormon der Hypophyse. Es bestimmt während der Kindheit und der Jugend das Körperwachstum und beeinflusst während des gesamten Lebens den Stoffwechsel. Das hGH ist jedoch nicht hauptsächlich für die Gesundheit der Erwachsenen.

Das hGH wird von den Alpha-Zellen der Adenohypophyse synthetisiert. Es besitzt ein Molekulargewicht von 21.500 Daltons und besteht aus nur einer Polypeptidkette, die 191 Aminosäurenreste und zwei Disulfidbrücken enthält. Das hGH zirkuliert in verschiedenen Zustandsformen des Moleküls, die mit Big-Big-GH, Big-GH und Little-GH bezeichnet werden. Das Little-GH ist die am meisten produzierte und wahrscheinlich die originale monomere Form, während die beiden anderen Formen polymer zu sein scheinen.

Auch wenn das hGH kein spezifisches Zielorgan besitzt, wurden Rezeptoren in den Leberzellen des Menschen und in den Lymphozyten festgestellt. Die Wirkungen des hGH im Stoffwechsel können generell in zwei Hauptkategorien unterschieden werden: a) direkte Anti-Insulin-Wirkung (lipolytisch und Hyperglykämie induzierend); b) indirekte Insulin-ähnliche Wirkung (anti-lipolytisch und mitogen). Diese letztere Wirkung, die das Körperwachstum verursacht, was der klassischen Wirkung des hGH entspricht, wird von den Somatomedinen ausgeführt. Das sind Hormone, die ein relativ niedriges Molekulargewicht besitzen (ca 7.000 Daltons), und eine dem Proinsulin sehr ähnliche Struktur besitzen. Es scheinen mindestens zwei verschiedene Formen des Somatomedins zu existieren, wovon eine Insulin-ähnliche Eigenschaften besitzt, und die andere direkt im Körperwachstum eingeschlossen ist. Im Unterschied zu allen anderen Polypeptidhormonen zirkulieren die Somatomedine größtenteils an ein oder mehrere Trägerproteine gebunden, die die Halbwertszeit der Somatomedine verlängern, indem sie ihre Konzentrationen relativ stabilisieren.

#### 2. TESTPRINZIP

Die Methode zur quantitativen Bestimmung von hGH ist ein nichtkompetitiver immunradiometrischer Test (IRMA), bei dem zwei monoklonale, gegen zwei verschiedene Epitope des hGH-Moleküls gerichtete Antikörper (Maus) verwendet werden. Monoklonales IgG gegen hGH ist an die Röhrchenwand gebunden bzw. radioaktiv im Tracer vorhanden. Im Ein-Schritt-Verfahren wird in den Kalibratoren oder Proben vorhandenes hGH an die feste Phase und gleichzeitig der Tracer an das festphasengebundene hGH gebunden. Nach der Inkubation ist die Menge des gebundenen Tracers proportional zur Konzentration des in den Kalibratoren oder Proben vorhandenen hGH. Ungebundenes Material wird durch Absaugen und Waschen entfernt.

#### 3. LIEFERUMFANG DES TESTS

Beschichtete Röhrchen	100
<sup>125</sup> J-Tracer	1 Fläschchen
hGH-Kalibratoren	7 Fläschchen
Kontrollserum	1 Fläschchen
Waschpuffer	2 Fläschchen
Anzahl der Bestimmungen	100

*LAGERUNG: Die Testpackung bei 2-8°C lagern! Nicht einfrieren. Nach dem Öffnen sind alle Reagenzien des Kits bei entsprechender Lagerung bis zum Verfalldatum des Kits stabil. Der Kit wurde für die Durchführung von 4 analytischen Testserien entworfen, wenn er tagsüber bei Raumtemperatur verwendet und nachtsüber bei 2-8°C aufbewahrt wird.*

*Die Reagenzien sind nicht nach dem Verfalldatum zu benutzen. Das Verfalldatum des Kits befindet sich auf der Verpackung und ist identisch mit dem Verfalldatum des Tracers. Die Verfalldaten der einzelnen Reagenzien sind jeweils auf den Flaschenetiketten angegeben.*

*Die Reagenzien unter Vermeidung von Schaum auflösen.*

*Nie unterschiedliche Reagenzienchargen miteinander mischen!*

##### 3.1. Beschichtete Röhrchen

Die Innenfläche der Röhrchen ist mit biotinyliertem IgG gegen hGH (Maus, monoklonal) beschichtet, das gegen ein anderes Epitop gerichtet ist, als das IgG des Tracers.

*Vor Gebrauch die Röhrchen in der ungeöffneten Dose auf Raumtemperatur bringen, um die Bildung von Kondenswasser auf der Oberfläche zu vermeiden.*

*Nichtgebrauchte Röhrchen in der Dose lagern. Die Dose gut verschließen. Nie verschiedene Chargen beschichteter Röhrchen miteinander mischen.*

### 3.2. <sup>125</sup>J-Tracer (rot) (gebrauchsfertige Lösung)

Das Fläschchen enthält 11 mL mit <sup>125</sup>J markiertes, gegen hGH gerichtetes IgG (Maus, monoklonal), Rinderserumalbumin, Pferdeserum, Maus-IgG, Phosphatpuffer, Konservierungsmittel und einen inerten roten Farbstoff. Die Radioaktivität beträgt max. 333 kBq (9 µCi) am Tag der Kalibration.

### 3.3. hGH-Kalibratoren (gebrauchsfertige Lösungen)

Die Fläschchen enthalten ansteigenden hGH-Konzentrationen, Humanserum, Phosphatpuffer und Konservierungsmittel. Die Kalibratoren haben folgende Konzentrationen: 0 - 1,5 - 4,5 - 9 - 24 - 60 - 150 µIE/mL (0 - 0,5 - 1,5 - 3 - 8 - 20 - 50 ng/mL). Der Inhalt des Nullkalibrators ist 3 mL; der Inhalt der Kalibratoren 1-6 ist 0,5 mL. *Die Kalibratoren des Kits sind mit den untersuchten Proben umschaltbar, wenn sie mit den Reagenzien und der Testdurchführung dieses In-vitro diagnostischen Tests verwendet werden, gemäß den Anweisungen des Herstellers.*

Die Kalibratoren des Kits sind auf den 2. internationalen Standard NIBSC 98/574, mit der rekombinierenden DNA-Technik erhaltenes hGH, kalibriert (1 ng = 3 µIE).

### 3.4. Kontrollserum (lyophilisiert)

Das Fläschchen enthält hGH, Humanserum und Konservierungsmittel. Der Konzentrationsbereich jeder Kontrolle ist auf dem Analysenzertifikat angegeben; er gibt die Grenzen an, die von DiaSorin für Kontrollwerte festgelegt wurden, die in zuverlässigen Testdurchgängen erhalten werden können.

Den Inhalt des Fläschchens mit 1 mL Aqua dest. auflösen. Die so erhaltene Lösung ist zwei Wochen bei 2-8°C zu lagern. Zur Verlängerung der Haltbarkeit portioniert tiefgefrieren (-20°C oder kälter).

### 3.5. Waschpuffer (10x Lösung)

Jedes Fläschchen enthält 50 mL 0,5%iges Triton X-100-Konzentrat und Kochsalzlösung.

Den ganzen Inhalt jedes Fläschchens bis zur 500-mL-Marke mit deionisiertem Wasser auffüllen. Die so erhaltenen Lösungen sind bei 2-8°C bis zum Verfalldatum des Kits haltbar. Diese Lösung wird zum Waschen der Röhrchen verwendet.

## 4. ERFORDERLICHE GERÄTE UND MATERIALIEN (NICHT IM KIT ENTHALTEN)

- Aqua dest. und deionisiertes Wasser.
- Glasbehälter.
- Mikropipetten mit Einmalspitzen (50, 100, 1000 µL) (50 µL: Richtigkeit ± 3%, Präzision 2%; 100, 1000 µL: Richtigkeit ± 2%, Präzision 1%).
- Röhrchen-Ständer.
- Vortex-Mischer.
- ggf. Vibrationsschüttler (Mischgeschwindigkeit: 300-350 Upm).
- Wascheinheit zum Pipettieren und Absaugen des Waschpuffers, die 2-3 mL pro Waschzyklus während zwei Waschzyklen pipettieren kann.
- Gammacounter um das <sup>125</sup>J-Jod zu zählen (Anlegen der Counter-Öffnung: 15-80 keV - Counter-Leistungsfähigkeit: 70% - Zählungszeit: 1 Min.). Wenn die Counter-Leistungsfähigkeit kleiner als 60% ist, muss die Zählungszeit verlängert werden (2 Min.).

## 5. ENTNAHME UND VORBEREITUNG DER PROBEN

Es kann Humanserum oder -plasma verwendet werden. Die Antikoagulantien Zitrat, EDTA und Heparin wurden getestet und können in diesem Test benutzt werden. Blut aus der Vene entnehmen, koagulieren lassen und das Serum so schnell wie möglich vom Koagulat trennen. Die Proben, die Teilchen in Suspension aufweisen, trüb oder lipämisch sind, oder Erythrozytenreste aufweisen, durch Filtern oder Zentrifugieren klären. Weder stark hämolytische oder lipämische Proben, noch Proben mit Teilchen in Suspension oder eindeutiger Mikrobenkontamination verwenden! Werden die Bestimmungen innerhalb von 24 Stunden nach Blutentnahme durchgeführt, können die Proben bei 2-8°C aufbewahrt werden; andernfalls portioniert tiefgefrieren (-20°C oder kälter). Sind die Proben aufgetaut worden, vor der Bestimmung vorsichtig schütteln. Wiederholtes Tiefgefrieren und Auftauen vermeiden!

*Werden hGH-Werte > 150 µIE/mL (50 ng/mL) erwartet, sind die Proben mit dem Nullkalibrator zu verdünnen.*

## 6. TESTDURCHFÜHRUNG

Alle Reagenzien vor Gebrauch auf Raumtemperatur (20-25°C) bringen. Mindestens Doppelbestimmungen durchführen. Die Bestimmung der Kalibratoren ist für jede Proben-Serie durchzuführen. Kalibratoren und Proben unter den gleichen Bedingungen testen.

Den Test in der angegebenen Reihenfolge und ohne Verzögerungen zwischen den einzelnen Versuchsschritten durchführen. Das Pipettieren der Reagenzien muss schnell ausgeführt werden (in max. 30 Min.).

Für jede Pipettierung der Kalibratoren und der Proben saubere Einmalspitzen benutzen.

- Reagenzien *auf den Boden der beschichteten Röhrchen* pipettieren. Der Testverlauf erfolgt nach folgendem Schema:

Reagenzien \ Röhrchen	Kalibratoren 0-6	Proben
Kalibratoren	50 µL	-
Proben	-	50 µL
Tracer	100 µL	100 µL

- Je 100 µL Tracer zur Bestimmung der Totalaktivität in zwei unbeschichtete Röhrchen geben und bis zur Zählung stehen lassen.
- Mit dem Vortex-Mischer vorsichtig den Inhalt der Röhrchen **schütteln** und entsprechend der ausgewählten Prozedur **inkubieren**:
  - . **90 Min. bei Raumtemperatur** fortgesetzt schütteln (300-350 Upm) (Prozedur A)
  - . **18-22 Stunden bei Raumtemperatur** (Prozedur B).
- Vorsichtig die Inkubationsmischung **absaugen** und **zweimal** mit 2 mL **Waschpuffer waschen**.  
*Es ist zu überprüfen, ob die Flüssigkeit vollständig eliminiert ist, indem man sich versichert, dass die Absaug-Pipettenspitze den Boden der beschichteten Röhrchen berührt. Das Vorhandensein von Tröpfchen, die an die Wände der beschichteten Röhrchen heften, kann schwer reproduzierbare oder unglaubliche Ergebnisse verursachen. Kein roter Farbstoff soll sichtbar sein.*
- Die Radioaktivität der Röhrchen **messen**.

## 7. BERECHNUNG DER ERGEBNISSE

Die mittlere Nettozählrate von Proben und Kalibratoren ausrechnen. Den B/T%-Quotienten nach folgender Formel ausrechnen:

$$B/T\% = \frac{\text{Mittlere Zählrate von Proben oder Kalibratoren}}{\text{Mittlere Zählrate der Totalaktivität}} \times 100$$

Auf logarithmischem Papier die mittlere Prozentwerte jedes Kalibrators auf der Ordinate (y-Achse) in Funktion zur hGH-Konzentration ausgedrückt in µIE/mL oder ng/mL auf der Abszisse (x-Achse) auftragen. Durch Verbinden der Punkte wird eine Kalibrationskurve erstellt (Abb. 1). Die Konzentrationen von hGH von jeder Probe, ausgedrückt in µIE/mL oder ng/mL, direkt von der Kalibrationskurve ablesen. Werte verdünnter Proben müssen mit dem entsprechenden Verdünnungsfaktor multipliziert werden.

### Berechnungsbeispiel (Prozedur A)

*Nachfolgende Daten gelten lediglich als Beispiel und dürfen nicht zur Ermittlung der tatsächlichen Ergebnisse benutzt werden.*

Beschreibung	cpm	B/T%
Totalaktivität	112.199	100
Nullkalibrator	23	0,02
1,5 µIE/mL - 0,5 ng/mL	891	0,79
4,5 µIE/mL - 1,5 ng/mL	2.861	2,55
9 µIE/mL - 3 ng/mL	5.598	4,99
24 µIE/mL - 8 ng/mL	13.308	11,86
60 µIE/mL - 20 ng/mL	29.546	26,33
150 µIE/mL - 50 ng/mL	59.715	53,22
Probe	3.636	3,24

Durch Ablesen von der Kalibrationskurve wird für die Probe einen hGH-Wert von 5,76 µIE/mL (1,92 ng/mL) gefunden.

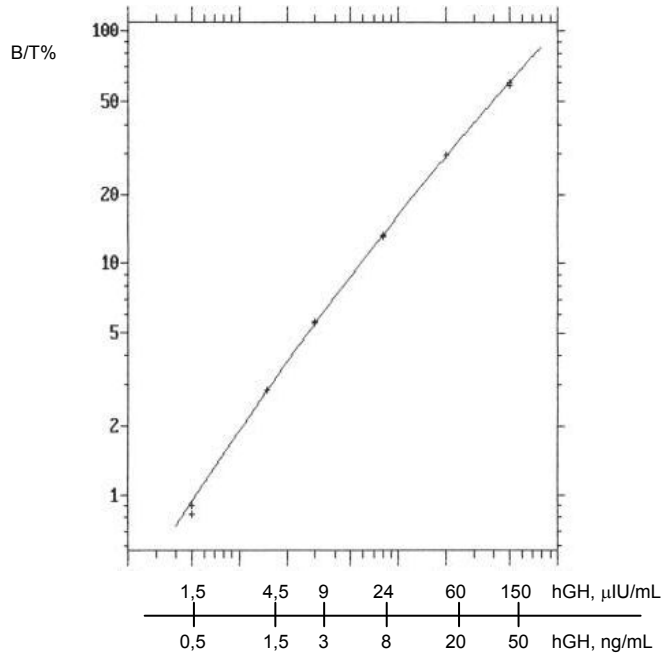


Abb. 1

## 8. ERWARTETE WERTE

Betrachtet man die intra- und interindividuelle Variabilität der Sekretion von hGH, ordnet die Literatur gegenwärtig der basalen Bestimmung nur eine begrenzte diagnostische Bedeutung zu und bewertet besonders die hGH-Antwort auf Reize.

Deshalb ist es wichtig, daran zu erinnern, dass die basalen Referenzwerte ausschließlich indikativen Charakter besitzen. Jedem Laboratorium wird empfohlen, eigene Bewertungskriterien und Referenzbereiche festzusetzen.

Gruppe	hGH, $\mu$ IE/mL	hGH, ng/mL
Präpuberale Jugendliche	0,0 - 4,0	0,0 - 1,3
Pubertät: Jungen	0,0 - 10,0	0,0 - 3,3
Mädchen	0,0 - 30,0	0,0 - 10,0
Erwachsene: Männer	0,0 - 14,0	0,0 - 4,7
Frauen	0,0 - 32,0	0,0 - 10,7

## 9. TESTMERKMALE

### 9.1. Analytische Spezifität

Die analytische Spezifität wird definiert als die Kapazität des Tests, den Analyten genau zu bestimmen bei Vorhandensein von potentiellen Interferenz-Faktoren in der Proben-Matrix (z.B. Antikoagulanten, Hämolyse, Effekte der Proben-Behandlung), oder Kreuzreaktionen mit potentiell interferierenden Analyten.

**Interferenzen.** Kontrollstudien über potentiell interferierende Faktoren haben gezeigt, dass die Leistungen des Tests nicht durch Antikoagulanten (Zitrat, EDTA, Heparin), Hämolyse (bis 200 mg/dL Hämoglobin), Lipämie (bis 500 mg/dL Triglyzeride), Bilirubinämie (bis 20 mg/dL Bilirubin) oder einmaliges Tiefgefrieren der Proben beeinflusst werden.

**Kreuzreaktionen.** Der Kit erkennt die beiden monomeren Formen des hGH (Molekulargewicht: 20.000 und 22.000 Daltons).

Die Spezifität wird erhalten, indem man die scheinbare hGH-Konzentration wertet, indem wiederum hohe Konzentrationen potentiell interferierender Hormonen bestimmt werden.

Hormon	Konzentration	Scheinbarer hGH-Wert
hPRL	100 mIE/mL 3rd IS 84/500	3 µIE/mL (1 ng/mL)
hCG	100 IE/mL 3rd IS 75/537	unbestimmbar
hTSH	1 IE/mL 2nd IRP 80/558	unbestimmbar
hLH	2 IE/mL 1st IRP 68/40	unbestimmbar
hFSH	2 IE/mL 2nd IRP 78/549	unbestimmbar
hCS	3 µg/mL	unbestimmbar

### 9.2. Analytische Sensitivität

Die analytische Sensitivität kann auch als Nachweisgrenze ausgedrückt werden, d.h. die minimale Quantität des Analyten, die durch den Test bestimmt werden kann. Die Nachweisgrenze ist 0,12 µIE/mL (0,04 ng/mL) bei einer Konfidenz-Grenze von 95%. Sie wurde als die scheinbare Analyt-Konzentration berechnet, die man vom Nullkalibrator unterscheiden kann, d.h. zwei Standardabweichungen über dem Nullkalibrator.

### 9.3. Präzision

Zur Ermittlung der Wiederholpräzision und der Vergleichpräzision des Tests (d.h. Intra- und Inter-Assay) wurden verschiedene Probenpools unterschiedlicher Analyt-Konzentrationen untersucht.

Wiederholpräzision	A	B	C
Anzahl der Bestimmungen	10	10	10
Mittelwert (µIE/mL)	36,80	16,40	3,42
Standardabweichung	0,68	0,30	0,12
Variationskoeffizient (%)	1,9	1,9	3,9

Vergleichpräzision	A	B	C
Anzahl der Bestimmungen	10	10	10
Mittelwert (µIE/mL)	34,28	15,82	4,02
Standardabweichung	0,86	0,58	0,16
Variationskoeffizient (%)	2,5	3,7	4,1

### 9.4. Richtigkeit

Die Richtigkeit der Bestimmung wurde mit Verdünnungs- und Wiederfindungstests geprüft.

**Verdünnungstest.** Es wurden zwei Proben mit hohen hGH-Konzentrationen nach serieller Verdünnung mit dem Nullkalibrator getestet.

Verdünnung	Erwartete Konzentration, µIE/mL	Erhaltene Konzentration, µIE/mL	% Wiederfindung
leer	–	77,40	–
1:2	38,70	37,40	96,6
1:4	19,35	18,60	96,1
1:8	9,68	9,40	97,2
1:16	4,84	4,80	99,2
1:32	2,42	2,40	99,2
leer	–	44,40	–
1:2	22,20	23,00	103,6
1:4	11,10	10,80	97,3
1:8	5,55	5,40	97,3
1:16	2,78	2,80	100,9
1:32	1,39	1,40	100,9

**Wiederfindungstest.** Zwei Proben, die hGH enthalten, wurden als solche und nach Zugabe bekannter Mengen an hGH getestet.

Zugegebene Konzentration, $\mu\text{IE/mL}$	Erwartete Konzentration, $\mu\text{IE/mL}$	Erhaltene Konzentration, $\mu\text{IE/mL}$	% Wiederfindung
–	–	33,40	–
50,00	81,74	78,80	96,4
25,00	56,74	54,40	95,9
12,50	44,24	44,60	100,8
6,50	38,24	39,80	104,1
2,10	33,84	34,60	102,3
–	–	13,00	–
50,00	62,36	62,50	100,2
25,00	37,36	38,40	102,8
12,50	24,86	25,00	100,6
6,50	18,86	19,20	101,9
2,10	14,46	14,60	101,0

#### 9.5. Hakeneffekt bei hoher Konzentration

Wenn Proben mit extrem hoher Antigenkonzentration mit einer *Sandwich*-Methode mit einer Inkubation dosiert werden, können scheinbare Antigen-Niveaus erhalten werden, die auf Grund des Hakeneffektes unter dem richtigen Wert liegen. Für eine korrekte Quantifizierung, müssen die Proben, die höhere hGH-Niveaus als das des konzentriertesten Kalibrators aufweisen, mit dem Nullkalibratoren verdünnt und neu dosiert werden. Die Ergebnisse werden mit dem Verdünnungsfaktor multipliziert um die Niveaus der unverdünnten Proben zu erhalten.

Der Kit wurde so angelegt, dass hGH-Konzentrationen bis zu 7,5 mIE/mL (2,50  $\mu\text{g/mL}$ ) ein analytisches Signal liefern, das immer höher als das des konzentriertesten Kalibrators liegt.

#### 10. GRENZEN DES VERFAHRENS

Die Diagnose darf nicht auf der Basis des Ergebnisses einer Bestimmung gestellt werden, sondern muss zusammen mit anderen klinischen Untersuchungen, Diagnoseverfahren und nach dem Urteil des Arztes erfolgen.

Kontamination der Proben durch Bakterien oder wiederholte Tiefgefrieren- und Auftauen-Zyklen können die Ergebnisse der Bestimmung ändern.

Die einwandfreie Beherrschung der Arbeitstechnik und die strikte Einhaltung der Arbeitsanleitung sind Voraussetzung für die Erzielung zuverlässiger Ergebnisse. Auf präzise Herstellung und Verteilung der Reagenzien und gutes Pipettieren und gründliches Absaugen und Waschen ist zu achten.

Nicht wiederholbare Proben können folgende Ursachen haben:

- Vertauschen der Fläschchenverschlüsse.
- Verwendung derselben Pipettenspitze beim Pipettieren aus verschiedenen Reagenzfläschchen oder beim Pipettieren unterschiedlicher Proben.
- Aufbewahren der Reagenzien oder Proben bei hohen Temperaturen ( $> 25^\circ\text{C}$ ) und bakterielle Kontamination.
- Bakterielle Kontamination durch zu langes Offenlassen der Fläschchen.
- Unzureichendes Absaugen und Waschen der Röhrchen.
- Kontamination der Röhrchenränder durch Tracer oder Proben.
- Schlechte Detektorstandardisierung und fehlerhafte Bedienung des Counters.
- Verwendung von Reagenzien aus verschiedenen Chargen.



## 11. WARNUNGEN

Die Testkomponenten enthalten Natriumazid als Konservierungsmittel. Weil Natriumazid explosives Blei- oder Kupferazid in Rohrleitungen bilden kann, wird empfohlen, den Abfluss, nach dem Wegschütten von Substanzen, die Natriumazid enthalten, vollständig mit Wasser durchzuspülen (Council Directive 99/45/EC).

R 22 – Gesundheitsschädlich beim Verschlucken.

R 31 – Entwickelt bei Berührung mit Säure giftige Gase.

S 28 – Bei Berührung mit der Haut sofort abwaschen mit vielem Wasser.

S 45 – Bei Unfall oder Unwohlsein sofort Arzt zuziehen (wenn möglich, dieses Etikett vorzeigen).

Alle für die Herstellung der Kit-Komponenten benutzten Serum- und Plasmaproben wurden analysiert und als nichtreaktiv für HBsAg, Anti-HCV und Anti-HIV-1/2 befunden. Da jedoch kein Prüfverfahren Keimfreiheit wirklich garantieren kann, sollten alle Präparate menschlicher Herkunft als potentiell infektiös angesehen und dementsprechend vorsichtig behandelt werden.

## 12. SICHERHEITSMASSNAHMEN

- Essen, Trinken, Rauchen und Schminken sind im Labor verboten.
- Lösungen dürfen nicht mit dem Mund pipettiert werden.
- Der direkte Kontakt mit potentiell infiziertem Material ist durch das Tragen von Laborkitteln, Schutzbrille und Einweghandschuhen zu vermeiden. Nach Beendigung des Tests sollten die Hände gründlich gewaschen werden.
- Verspritzen oder Bildung von Aerosol sind zu vermeiden. Verschüttete Reagenzien sollten mit 5%iger Natriumhypochlorit-Lösung entfernt werden. Dabei ist zu beachten, dass es sich hierbei um potentiell infektiöses Material handeln kann.
- Alle Proben, biologischen Reagenzien und für die Testdurchführung verwendeten Materialien müssen als potentiell infektiös angesehen werden. Die Beseitigung des Abfalls ist nach den Vorschriften der zuständigen Aufsichtsbehörde sowie nach den Anweisungen des verantwortlichen Amtes durchzuführen. Abfall sollte verbrannt werden. Flüssigkeiten müssen mit Natriumhypochlorit dekontaminiert werden. Dabei sollte das Natriumhypochlorit in einer Konzentration von 5% im Endgemisch vorliegen und mindestens 30 Minuten auf die zu beseitigenden Materialien einwirken. Alle Materialien, die wieder verwendet werden sollen, müssen mit einer übertriebenen (*overkill*) Methode (USP 24, 2000, S. 2143) autoklaviert werden. Im Allgemeinen wird eine Stunde bei 121°C als angebrachte Sterilisationszeit angesehen, dennoch wird jedem Benutzer empfohlen, die Wirksamkeit des Dekontaminationszyklus anfangs zu überprüfen und routinemäßig biologische Indikatoren einzusetzen.

## 13. GRUNDREGELN DES STRAHLENSCHUTZES

Reagenzien mit Jod-125

Dieses Kit enthält radioaktives Material mit höchstens 8,85 µCi (328 kBq) Jod-125. Bei der Lagerung, Handhabung und Entsorgung dieses Materials sind entsprechende Vorsichtsmaßnahmen und gute Laborpraktiken einzuhalten.

Für Ärzte bzw. Institutionen, die im Rahmen einer Generallizenz Radioisotope erhalten, gilt Folgendes:

Entgegennahme, Erwerb, Besitz und Verwendung dieses radioaktiven Materials sind nur Ärzten, veterinärmedizinisch tätigen Tierärzten, klinischen Labors oder Krankenhäusern und nur für klinische In-vitro-Tests oder In-vitro-Labortests gestattet, bei denen kein interner oder externer Kontakt des Materials oder seiner Strahlung mit Menschen oder Tieren stattfindet. Entgegennahme, Erwerb, Besitz, Verwendung und Weitergabe des Materials unterliegen den Vorschriften und der Generallizenz der US Nuclear Regulatory Commission bzw. des Staates, mit dem diese Behörde ein Abkommen zur Ausübung ihrer Überwachungsfunktion abgeschlossen hat.

1. Die Lagerung des radioaktiven Materials ist auf einen speziell dafür bestimmten Bereich zu beschränken.
2. Der Zugang zu radioaktivem Material ist nur befugten Personen zu gestatten.
3. Radioaktives Material nicht mit dem Mund pipettieren.
4. Im vorgesehenen radioaktiven Arbeitsbereich nicht essen oder trinken.
5. Verschüttetes Material aufwischen und den Bereich anschließend mit alkalischem Reinigungsmittel oder radiologischer Dekontaminationslösung wischen. Alle benutzten Glasbehälter gründlichst mit Wasser spülen, bevor sie zusammen mit anderen Laborbehältern aus Glas ausgewaschen werden.

Für Ärzte oder Einrichtungen, die im Rahmen einer Sondergenehmigung Radioisotope erhalten, gilt Folgendes:

Entgegennahme, Gebrauch, Weitergabe und Entsorgung radioaktiven Materials unterliegen den Vorschriften und Bedingungen der jeweiligen Sondergenehmigung.

**WICHTIGER HINWEIS:** Die auf der Packungsbeilage angegebene Radioaktivität kann von der auf dem Etikett des Kartons und des Tracer-Fläschchens angegebenen etwas abweichen. Sowohl das Etikett des Kartons als auch das Etikett des Tracer-Fläschchens geben den tatsächlichen Wert der Radioaktivität am Kalibrationsdatum an, während die Packungsbeilage die theoretische Radioaktivität des Kits angibt.

**HGH-CTK irma  
PIPETTIERSCHEMA**

BITTE SORGFÄLTIG DIE GEBRAUCHSANLEITUNG BEACHTEN.

KALIBRATOREN, PROBEN, KONTROLLSERUM	50 $\mu$ L
-------------------------------------	------------



TRACER	100 $\mu$ L
--------	-------------



INKUBATION:  
. 90 MIN. BEI RAUMTEMPERATUR AUF DEM SCHÜTTLER (Prozedur A)  
. 18-22 Std. BEI RAUMTEMPERATUR (Prozedur B).



ABSAUGEN UND WASCHEN.



RADIOAKTIVITÄT DER RÖHRCHEN MESSEN.

**KIT PARA LA DETERMINACIÓN  
INMUNORRADIOMÉTRICA DE LA hGH**

**Procedimiento para el análisis cuantitativo  
de la hormona del crecimiento (hGH)  
en muestras de suero o plasma humano**

Sólo para uso in vitro

**1. INTRODUCCIÓN**

La hormona del crecimiento (hGH) es la hormona hipofisaria secretada en mayor cantidad. Durante la infancia y la adolescencia determina el crecimiento corpóreo y durante toda la vida influencia los procesos anabólicos. Sin embargo, la hGH no es esencial para la salud durante la vida adulta.

La hGH es sintetizada por las células alfa de la adenohipófisis. Tiene un peso molecular de unos 21.500 daltons y está compuesta por una cadena polipeptídica que contiene 191 residuos de aminoácidos con dos puentes de bisulfuro. La hGH circula en formas moleculares diferentes denominadas Big-Big GH, Big GH y Little GH. La Little GH, que es la forma porcentualmente prevalente, sería la forma original monomérica, mientras que las otras dos parecerían ser formas poliméricas.

Si bien no existe un blanco específico, han sido detectados receptores para la hGH sobre todo en las membranas de las células hepáticas y de linfocitos circulantes. En efecto, las acciones de la hGH se pueden dividir generalmente en dos categorías: a) acción directa anti-insulínica (lipolítica y que provoca hiperglucemia); b) acción indirecta similar-insulínica (anti-lipolítica y mitógena). Esta última acción, que en definitiva da cuenta del crecimiento de estatura clásicamente atribuido a la hGH se ejerce a través de las somatomedinas, hormonas con peso molecular relativamente bajo (aproximadamente 7.000 daltons) que tienen una estructura muy similar a la de la proinsulina. Al parecer hay por lo menos dos somatomedinas, una con propiedades similar-insulínicas más marcadas y la otra, más implicada en el crecimiento de estatura. A diferencia de todas las otras hormonas polipeptídicas las somatomedinas circulan en su mayor parte transportadas por una o más proteínas fijadoras, las cuales prolongando la vida media de la molécula nativa, tendrían la capacidad de mantener relativamente estables en el tiempo las concentraciones de las somatomedinas.

**2. PRINCIPIO DEL ENSAYO**

El método utilizado es de tipo inmunorradiométrico (IRMA) no competitivo y usa dos anticuerpos monoclonales de ratón que reconocen dos diferentes epítopes de la hGH. El primer anticuerpo está fijado en los tubos, mientras que el segundo anticuerpo se utiliza como trazador.

El ensayo consiste en una sola incubación durante la cual la hGH contenida en los calibradores o en las muestras permite el enlace del trazador a la fase sólida. Después de la incubación, la cantidad de anticuerpo marcado enlazada a la fase sólida es proporcional a la concentración de hGH presente en los calibradores o en las muestras. Al final de la incubación, el material que no ha enlazado se elimina con aspiración y lavado.

**3. REACTIVOS SUMINISTRADOS EN EL KIT**

Tubos recubiertos	100
Trazador <sup>125</sup> I	1 vial
Calibradores de hGH	7 viales
Suero de control	1 vial
Tampón de lavado	2 viales
Número de ensayos	100

*MODO DE CONSERVACIÓN: A su llegada conserve el kit a 2-8°C. No congele. Después de la apertura, los reactivos de este kit son estables hasta la fecha de caducidad del kit si se conservan de manera adecuada. El kit está garantizado para 4 sesiones analíticas si se utiliza a lo largo del día a temperatura ambiente y si se conserva durante la noche a 2-8°C.*

*No use los reactivos pasada la fecha de caducidad. La fecha de caducidad del kit está escrita en la etiqueta exterior y corresponde a la fecha de caducidad del trazador. La fecha de caducidad de cada componente está indicada en las etiquetas de los respectivos viales.*

*Al reconstituir el contenido de los viales, agite delicadamente para evitar la formación de espuma.*

*No mezcle los reactivos provenientes de lotes diferentes.*

### 3.1. Tubos recubiertos

La superficie interior de cada tubo está recubierta con IgG monoclonal de ratón biotinilada, dirigida contra un epítotope de la hGH diferente de aquél contra el cual están dirigidas las inmunoglobulinas utilizadas para el trazador. *En el momento del uso, ponga los tubos recubiertos a temperatura ambiente antes de abrir el contenedor, para evitar condensaciones de humedad.*

*Los tubos no utilizados pueden ser conservados controlando que el contenedor esté bien cerrado. No mezcle lotes diferentes de tubos recubiertos.*

### 3.2. Trazador <sup>125</sup>I (rojo): reactivo listo para el uso

El vial contiene 11 mL de IgG monoclonal de ratón anti-hGH marcada con <sup>125</sup>I, albúmina sérica bovina, suero equino, IgG de ratón, tampón fosfato, conservantes y un colorante rojo inactivo. La radioactividad máxima es de 333 kBq (9 µCi) en la fecha de calibración.

### 3.3. Calibradores de hGH: reactivo listo para el uso

Los viales contienen concentraciones crecientes de hGH, suero humano, tampón fosfato y conservantes. Las concentraciones de hGH son las siguientes: 0 - 1,5 - 4,5 - 9 - 24 - 60 - 150 µUI/mL (0 - 0,5 - 1,5 - 3 - 8 - 20 - 50 ng/mL). El volumen del calibrador cero es 3 mL; el volumen de los calibradores 1-6 es 0,5 mL. *Los calibradores del kit son conmutables con las muestras en examen cuando se utilizan con los reactivos y con el procedimiento operativo de este test diagnóstico in vitro, según las recomendaciones del fabricante.*

Los calibradores del kit están calibrados contra el 2° estándar internacional NIBSC 98/574, hGH obtenida por la técnica del DNA recombinante (1 ng = 3 µUI).

### 3.4. Suero de control: reactivo liofilizado

El vial contiene hGH, suero humano y conservantes. El rango de concentraciones de cada control aparece en el certificado de análisis, e indica los límites definidos por DiaSorin para los valores de control que se pueden obtener a partir de ensayos fiables.

Reconstituya el contenido del vial con 1 mL de agua destilada. La solución que resulta es estable durante dos semanas a 2-8°C. Congele el reactivo a -20°C o a temperaturas inferiores subdividido en alícuotas en caso de conservación prolongada.

### 3.5. Tampón de lavado: reactivo en solución (10x)

Cada vial contiene 50 mL de Triton X-100 al 0,5% y solución salina.

Ponga a volumen de 500 mL con agua desionizada el contenido completo de cada vial. La solución que resulta es estable a 2-8°C hasta la fecha de caducidad del kit. La solución se utiliza para el lavado de los tubos recubiertos.

## 4. MATERIALES E INSTRUMENTOS REQUERIDOS, PERO NO SUMINISTRADOS

- Agua destilada y desionizada.
- Útiles de laboratorio de vidrio.
- Micropipetas con puntas desechables de 50 µL (veracidad ± 3%, precisión 2%) y 100, 1000 µL (veracidad ± 2%, precisión 1%).
- Gradillas para tubos.
- Agitador Vórtex.
- Agitador rotante con velocidad de agitación de 300-350 rpm (facultativo).
- Sistema para distribuir y aspirar el tampón de lavado, en condiciones de distribuir 2- 3 mL por ciclo de lavado durante dos ciclos de lavado.
- Contador gamma para contar el yodo <sup>125</sup>I (establecimiento de la ventana del contador: 15-80 keV - eficiencia del contador: 70% - tiempo de cómputo: 1 min). Si la eficiencia del contador es inferior al 60%, el tiempo de cómputo debe ser prolongado a 2 min.

## 5. RECOGIDA Y PREPARACIÓN DE LAS MUESTRAS

El ensayo se puede efectuar en muestras de suero o plasma humano. Se pueden utilizar anticoagulantes como el citrato, el EDTA y la heparina. Recoja la sangre mediante punción venosa, déjela coagular y separe el suero del coágulo lo antes posible. Clarifique por filtración o centrifugación antes del ensayo las muestras que presenten material en suspensión, opalescencia, lipemia o residuos eritrocitarios. No use muestras fuertemente hemolizadas o lipémicas, ni muestras que presenten material suspendido o evidente contaminación microbiana. Si el ensayo se lleva a cabo dentro de las 24 horas sucesivas a la recogida, las muestras se pueden conservar a 2-8°C. En caso contrario, se deben subdividir en alícuotas congeladas a -20°C o a temperaturas inferiores. Si las muestras han sido descongeladas, agítelas con cuidado antes de realizar el ensayo. Evite repetidas congelaciones y descongelaciones.

*Si se prevén niveles de hGH mayores de 150  $\mu\text{UI/mL}$  (50 ng/mL), diluya con el calibrador cero.*

## 6. PROCEDIMIENTO OPERATIVO

Ponga los reactivos a temperatura ambiente (20-25°C) antes del ensayo. Prevea determinaciones por duplicado como mínimo. Se debe realizar la determinación de los calibradores para cada serie de muestras analizadas. El procedimiento operativo debe ser exactamente idéntico para los calibradores y para las muestras en examen. Realice todas las fases del ensayo en el orden previsto, sin interrupción. La distribución de los reactivos debe realizarse rápidamente (al máximo 30 minutos).

Utilice puntas desechables nuevas para dispensar calibradores y muestras.

- Distribuya los reactivos en el fondo de los tubos recubiertos. Actúe según el siguiente esquema:

reactivos \ tubos	Calibradores 0-6	Muestras
Calibradores	50 $\mu\text{L}$	-
Muestras	-	50 $\mu\text{L}$
Trazador	100 $\mu\text{L}$	100 $\mu\text{L}$

- Prepare dos tubos no recubiertos para el cálculo de la actividad total que contengan solamente 100  $\mu\text{L}$  de trazador y déjelos separados hasta el momento de la medida de la radioactividad.
- **Agite** suavemente en el Vórtex el contenido de los tubos e **incube** según el procedimiento elegido:
  - . **90 minutos a temperatura ambiente** en agitación (300-350 rpm) (procedimiento A)
  - . **18-22 horas a temperatura ambiente** (procedimiento B).
- **Aspire** cuidadosamente la mezcla de incubación y **lave dos veces** con 2 mL de **tampón de lavado**. *Verifique que el líquido sea eliminado completamente, controlando que la punta de la pipeta de aspiración toque el fondo de los tubos recubiertos. La presencia de gotas adherentes a las paredes de los tubos recubiertos puede provocar baja reproducibilidad o resultados no fiables. No debe quedar traza del colorante rojo.*
- **Mida la radioactividad de los tubos.**

## 7. CÁLCULO DE LOS RESULTADOS

Calcule la media de los cómputos para cada grupo de tubos después de haber substraído el valor del fondo. Exprese la media de los cómputos de los calibradores y las muestras como porcentaje respecto a la actividad total:

$$B/T\% = \frac{\text{cómputo medio calibradores o muestras}}{\text{cómputo medio actividad total}} \times 100$$

Indique en un gráfico log-log el porcentaje medio calculado para cada calibrador en la ordenada (eje de las y) en función de la concentración de hGH expresada en  $\mu\text{UI/mL}$  o ng/mL en la abscisa (eje de las x). De esta manera se obtiene una curva de calibración (Fig. 1). Lea directamente de la curva de calibración la concentración de hGH de cada muestra expresada en  $\mu\text{UI/mL}$  o ng/mL. Si la muestra ha sido diluida, la concentración de hGH encontrada debe ser multiplicada por el factor de dilución.

### Ejemplo de cálculo (procedimiento A)

Los siguientes datos deben ser considerados sólo un ejemplo y no deben usarse en lugar de los datos obtenidos por el utilizador.

Descripción	cpm	B/T%
Actividad total	112.199	100
Calibrador cero	23	0,02
1,5 µUI/mL - 0,5 ng/mL	891	0,79
4,5 µUI/mL - 1,5 ng/mL	2.861	2,55
9 µUI/mL - 3 ng/mL	5.598	4,99
24 µUI/mL - 8 ng/mL	13.308	11,86
60 µUI/mL - 20 ng/mL	29.546	26,33
150 µUI/mL - 50 ng/mL	59.715	53,22
Muestra	3.636	3,24

Interpolando de la curva de calibración, la muestra contiene 5,76 µUI/mL (1,92 ng/mL) de hGH.

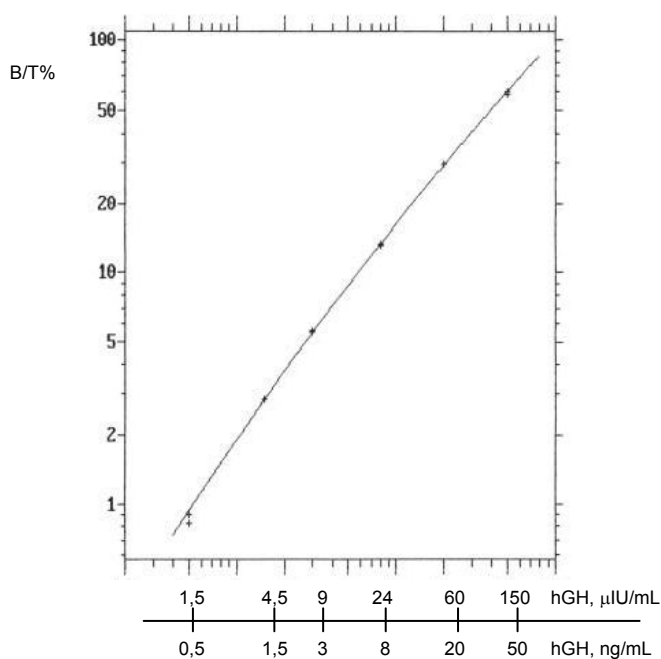


Fig. 1

## 8. DATOS CLÍNICOS

Dada la variabilidad intra- e inter-individual de la secreción de hGH, la literatura atribuye un significado diagnóstico limitado al test basal y prefiere la evaluación de la respuesta de la hGH con tests de estimulación. Por lo tanto, se considera oportuno recordar que los valores basales de referencia (en el cuadro siguiente) son exclusivamente indicativos. Se recomienda a cada laboratorio que establezca sus propios criterios de evaluación e intervalos de referencia clínicamente relevantes.

Sujetos	hGH, µUI/mL	hGH, ng/mL
Prepubescentes	0,0 - 4,0	0,0 - 1,3
Adolescentes: varones	0,0 - 10,0	0,0 - 3,3
hembras	0,0 - 30,0	0,0 - 10,0
Adultos: varones	0,0 - 14,0	0,0 - 4,7
hembras	0,0 - 32,0	0,0 - 10,7

## 9. PRESTACIONES METODOLÓGICAS DEL KIT

### 9.1. Especificidad analítica

La especificidad analítica se define como la capacidad que tiene el test para detectar exactamente el analito ante la presencia de factores potencialmente interferentes en la matriz de la muestra (por ejemplo, anticoagulantes, hemolisis, efectos de tratamientos de la muestra), o de reacciones cruzadas con analitos potencialmente interferentes.

**Interferencias.** Estudios controlados sobre los factores potencialmente interferentes han demostrado que las prestaciones del test no están influenciadas por anticoagulantes (citrato, EDTA, heparina), hemolisis (hasta 200 mg/dL de hemoglobina), lipemia (hasta 500 mg/dL de triglicéridos), bilirrubinemia (hasta 20 mg/dL de bilirrubina) o por una congelación de las muestras.

**Reacciones cruzadas.** El kit reconoce las dos formas monoméricas de la hGH (P.M. 20.000 y 22.000 daltons).

La especificidad ha sido evaluada como la concentración aparente de hGH obtenida determinando elevadas concentraciones de hormonas potencialmente interferentes.

Hormona	Concentración	Nivel aparente de hGH
hPRL	100 mUI/mL 3rd IS 84/500	3 $\mu$ UI/mL (1 ng/mL)
hCG	100 UI/mL 3rd IS 75/537	no detectable
hTSH	1 UI/mL 2nd IRP 80/558	no detectable
hLH	2 UI/mL 1st IRP 68/40	no detectable
hFSH	2 UI/mL 2nd IRP 78/549	no detectable
hCS	3 $\mu$ g/mL	no detectable

### 9.2. Sensibilidad analítica

La sensibilidad analítica se puede expresar también como el límite de detección, es decir la cantidad mínima de analito específico que el test puede detectar. El límite de detección es de 0,12  $\mu$ UI/mL (0,04 ng/mL) al 95% de confianza. Ha sido calculado como la concentración aparente de analito distinguible del calibrador cero, es decir, dos desviaciones estándar por encima de cero.

### 9.3. Precisión

La repetibilidad y la reproducibilidad del ensayo (es decir las variaciones intra-ensayo e inter-ensayo) han sido determinadas utilizando las muestras de referencia con diferentes concentraciones de analito.

Repetibilidad	A	B	C
Número de determinaciones	10	10	10
Media ( $\mu$ UI/mL)	36,80	16,40	3,42
Desviación estándar	0,68	0,30	0,12
Coefficiente de variación (%)	1,9	1,9	3,9

Reproducibilidad	A	B	C
Número de determinaciones	10	10	10
Media ( $\mu$ UI/mL)	34,28	15,82	4,02
Desviación estándar	0,86	0,58	0,16
Coefficiente de variación (%)	2,5	3,7	4,1

#### 9.4. Veracidad

La veracidad del ensayo ha sido controlada mediante los test de dilución y recuperación.

**Test de dilución.** Se han determinado diluciones en serie de dos sueros de concentración elevada de hGH realizadas en el calibrador cero.

Dilución	Concentración esperada, $\mu\text{UI}/\text{mL}$	Concentración medida, $\mu\text{UI}/\text{mL}$	% Recuperación
no diluido	–	77,40	–
1:2	38,70	37,40	96,6
1:4	19,35	18,60	96,1
1:8	9,68	9,40	97,2
1:16	4,84	4,80	99,2
1:32	2,42	2,40	99,2
no diluido	–	44,40	–
1:2	22,20	23,00	103,6
1:4	11,10	10,80	97,3
1:8	5,55	5,40	97,3
1:16	2,78	2,80	100,9
1:32	1,39	1,40	100,9

**Test de recuperación.** Se han determinado dos sueros que contengan hGH tanto no diluidos como después de la adición de cantidades crecientes de hGH.

Concentración adicionada, $\mu\text{UI}/\text{mL}$	Concentración esperada, $\mu\text{UI}/\text{mL}$	Concentración medida, $\mu\text{UI}/\text{mL}$	% Recuperación
–	–	33,40	–
50,00	81,74	78,80	96,4
25,00	56,74	54,40	95,9
12,50	44,24	44,60	100,8
6,50	38,24	39,80	104,1
2,10	33,84	34,60	102,3
–	–	13,00	–
50,00	62,36	62,50	100,2
25,00	37,36	38,40	102,8
12,50	24,86	25,00	100,6
6,50	18,86	19,20	101,9
2,10	14,46	14,60	101,0

#### 9.5. Efecto gancho con altas concentraciones

Cuando se ensayan muestras que contengan unas concentraciones de antígeno sumamente elevadas con un método *sandwich* con una incubación, se pueden obtener unos niveles aparentes de antígeno inferiores al nivel real por efecto gancho. Para cuantificar las muestras correctamente, las muestras que contienen niveles de hGH mayores que el del calibrador más concentrado deben ser diluidas con el calibrador cero y analizadas de nuevo. Los resultados deben ser multiplicados por el factor de dilución para obtener los niveles de las muestras no diluidas.

El kit ha sido desarrollado de modo que concentraciones de hGH hasta 7,5 mUI/mL (2,50  $\mu\text{g}/\text{mL}$ ) proporcionen una señal analítica siempre superior a la del calibrador más concentrado.



## 10. LIMITACIONES DEL ENSAYO

El diagnóstico no se debe formular en base al resultado de un solo ensayo, sino que éste se debe validar con otras pruebas clínicas, procedimientos diagnósticos y con la opinión del médico.

La contaminación bacteriana o las repetidas congelaciones/descongelaciones de las muestras pueden modificar los resultados del test.

Para obtener resultados fiables, es necesario respetar estrictamente las instrucciones de utilización y poseer una adecuada técnica manual. En concreto, la precisión y el cuidado en las fases de reconstitución y distribución de los reactivos y de aspiración y lavado son indispensables para la fiabilidad del ensayo.

Resultados no reproducibles se deben principalmente a factores metodológicos, como por ejemplo:

- cambio de las tapas entre los viales
- uso de la misma punta para la recogida de diferentes viales o para dispensar diferentes muestras
- viales que se han dejado abiertos durante un largo período de tiempo
- exposición de los reactivos o de las muestras a calor intenso o a fuertes fuentes de contaminación bacteriana
- aspiración de la mezcla de incubación y lavado de los tubos inadecuados
- contaminación del borde de los tubos con el trazador o bien con las muestras
- oscilaciones casuales o mal mantenimiento del contador gamma
- intercambio de reactivos procedentes de diferentes lotes.

## 11. ADVERTENCIAS Y PRECAUCIONES

Los componentes del kit contienen azida sódica como conservante. Ya que, la azida sódica puede formar azidas de plomo o de cobre explosivas en las tuberías, se recomienda dejar fluir agua en abundancia en los desagües después de la eliminación de soluciones que contengan azida sódica (Council Directive 99/45/EC).

R 22 – Nocivo por ingestión.

R 31 – En contacto con ácidos libera gases tóxicos.

S 28 – En caso de contacto con la piel, lávese inmediata y abundantemente con agua.

S 45 – En caso de accidente o malestar, acúdase inmediatamente al médico (si es posible, muéstresele la etiqueta).

Todas las unidades de suero o plasma utilizadas para la fabricación de los componentes de este kit se han analizado y se han determinado no reactivas para HBsAg, para anti-HCV y para anti-HIV-1/2. Sin embargo, visto que ningún método puede asegurar que los agentes patógenos estén ausentes, todo el material de origen humano se debería considerar potencialmente infeccioso y ser manipulado como tal.

## 12. NORMAS DE SEGURIDAD

- No coma, beba, fume o se maquille durante la ejecución del ensayo.
- No pipetee las soluciones con la boca.
- Evite el contacto directo con el material potencialmente infeccioso usando batas de laboratorio, gafas de protección y guantes desechables. Lávese cuidadosamente las manos al terminar el ensayo.
- Evite salpicaduras o formación de aerosoles. En caso de que esto sucediera, cada gota de reactivo se debe eliminar con una solución de hipoclorito sódico al 5% y el medio utilizado se deberá tratar como material residuo potencialmente infeccioso.
- Todas las muestras, los reactivos biológicos del kit y los materiales usados para efectuar el ensayo se deben considerar capaces de transmitir agentes infecciosos; por lo tanto los residuos se deberán eliminar de acuerdo con las reglamentaciones de las agencias autorizadas que tengan jurisdicción sobre el laboratorio, y con las normativas de cada país. El material desechable deberá ser incinerado; los residuos líquidos deberán ser descontaminados con una solución de hipoclorito sódico a una concentración final del 5% durante media hora como mínimo. Cualquier material que pueda ser reutilizado deberá ser tratado en autoclave con un tratamiento de exceso (*overkill*) (USP 24, 2000, p. 2143). Generalmente se considera que una hora a 121°C es un tiempo de esterilización adecuado; sin embargo se recomienda a cada usuario que verifique la eficacia del ciclo de descontaminación mediante una validación inicial y el uso rutinario de indicadores biológicos.

### 13. REGLAS BÁSICAS DE SEGURIDAD CONTRA LAS RADIACIONES

Reactivos con contenido de azida sódica

Este equipo contiene material radiactivo que no supera de 8,85  $\mu\text{Ci}$  (328 kBq) de yodo-125. Para almacenar, manejar y desechar este material, deben adoptarse las precauciones necesarias y prácticas de laboratorio correctas.

Para facultativos o instituciones que reciben radioisótopos con licencia genérica:

Este material radiactivo sólo deben recibirlo, adquirirlo, poseerlo y utilizarlo médicos, veterinarios que practiquen la medicina veterinaria, laboratorios clínicos u hospitales, y sólo para pruebas in vitro clínicas o de laboratorio que no conlleven la administración interna o externa del material ni su radiación a seres humanos ni animales. Su recepción, adquisición, posesión, uso y transferencia se rigen por la normativa y la licencia genérica de la Comisión Reguladora Nuclear del estado en el que la Comisión haya llegado a un acuerdo para el ejercicio de su autoridad reguladora.

1. El almacenamiento del material radiactivo debe limitarse a un área destinada específicamente a tal efecto.
2. El acceso a materiales radiactivos debe estar limitado a personal autorizado únicamente.
3. No recoja material radiactivo con la pipeta usando la boca.
4. No coma ni beba dentro de las áreas destinadas a trabajos radiactivos.
5. Las áreas donde puedan producirse derrames deben enjugarse y después lavarse con un detergente alcalino o una solución decontaminante radiológica. Todo recipiente de vidrio utilizado debe enjugarse completamente con agua antes de lavarse con otros recipientes de laboratorio.

Para facultativos o instituciones que reciben radioisótopos con licencia específica:

La recepción, uso, transferencia y eliminación de los materiales radiactivos se rigen por la normativa y las condiciones de la licencia en cuestión.

**ATENCIÓN:** La radiactividad impresa en el interior del paquete puede diferir ligeramente de la impresa en la etiqueta de la caja y en la del vial del trazador. La etiqueta de la caja y la del trazador indican la cantidad real de radiactividad en la fecha de la calibración, mientras que el impreso del interior del paquete indica la radiactividad teórica del equipo.

### ESQUEMA DEL ENSAYO

- 1 - RECONSTITUYA EL SUERO DE CONTROL.
- 2 - MARQUE LOS TUBOS RECUBIERTOS POR DUPLICADO.
- 3 - DISTRIBUYA LOS REACTIVOS SEGÚN EL SIGUIENTE ESQUEMA Y AGITE LA MEZCLA DE INCUBACIÓN:

REACTIVOS \ TUBOS	CAL 0-6	MUESTRAS
CALIBRADORES	50 $\mu\text{L}$	–
MUESTRAS	–	50 $\mu\text{L}$
TRAZADOR	100 $\mu\text{L}$	100 $\mu\text{L}$

- 4 - INCUBE DURANTE:
  - . 90 MIN A TEMPERATURA AMBIENTE EN AGITACIÓN (Procedimiento A)
  - . 18-22 HORAS A TEMPERATURA AMBIENTE (Procedimiento B).
- 5 - ASPIRE LA MEZCLA DE INCUBACIÓN Y LAVE 2 VECES CON 2 mL DE TAMPÓN DE LAVADO.
- 6 - MIDA LA RADIOACTIVIDAD DE LOS TUBOS.

## TESTE IMUNO-RADIOMÉTRICO DA hGH

### Procedimento para a determinação quantitativa da hormona humana do crescimento (hGH) em amostras de soro ou plasma humano

Só para uso in vitro

#### 1. INTRODUÇÃO

A hormona humana do crescimento (hGH) é a hormona hipofisária secretada em maior quantidade. Durante a infância e a adolescência determina o crescimento do corpo e durante toda a vida influencia os processos metabólicos, de maneira que seja estimulado o crescimento. Contudo, a hGH não é essencial para a saúde na idade adulta.

A hGH é sintetizada pelas células alfa da glândula hipófise. Tem peso molecular de cerca de 21.500 dáltons e é composta por uma única cadeia polipeptídica que contém 191 resíduos de aminoácidos com dois pontos dissulfetos. A hGH circula em formas moleculares diferentes denominadas Big-Big GH, Big GH e Little GH. A Little GH, que é a forma com percentagem predominante, seria a forma original monomérica, enquanto as outras duas parecem ser formas poliméricas.

Mesmo não tendo um órgão alvo específico, foram encontrados receptores para a hGH principalmente nas membranas de células hepáticas e de linfócitos circulantes. De facto, as acções metabólicas da hGH podem-se em geral dividir em duas categorias principais: a) acção directa anti-insulínica (lipolítica e causadora de hiperglicemia); b) acção indirecta semelhante à insulínica (anti-lipolítica e mitogénica). Esta última acção causa o crescimento do corpo quanto à estatura e consiste na acção clássica da hGH. Isto é exercido através das somatomedinas, hormonas de peso molecular bastante pequeno (cerca de 7.000 dáltons) que têm estrutura muito semelhante à da pró-insulina. Foram identificadas pelo menos duas somatomedinas, uma com propriedades similares à da insulina e a outra envolvida mais directamente com o crescimento em estatura. Diferentemente de todas as outras hormonas polipeptídicas, as somatomedinas circulam, na maior parte, transportadas por uma ou mais proteínas portadoras, as quais, prolongando a meia-vida da molécula nativa, teriam a capacidade de tornar bastante estáveis no decorrer do tempo as concentrações de somatomedina.

#### 2. PRINCÍPIO DO ENSAIO

O método utilizado é de tipo imuno-radiométrico (IRMA) não competitivo baseado no uso dos tubos revestidos e utiliza dois anticorpos monoclonais de rato que reconhecem dois epítomos diferentes da hGH. O primeiro anticorpo monoclonal é ligado às paredes dos tubos, enquanto o segundo anticorpo é usado como marcador. O teste consiste numa única incubação, durante a qual a hGH contida nos calibradores ou nas amostras liga o marcador à fase sólida. Após a incubação, a quantidade de anticorpo marcado ligada à fase sólida é proporcional à concentração de hGH presente nos calibradores ou nas amostras. No final da incubação, o material não ligado é removido mediante aspiração e lavagem.

#### 3. REAGENTES FORNECIDOS NO DISPOSITIVO

Tubos revestidos	100
Marcador <sup>125</sup> I	1 frasco
Calibradores de hGH	7 frascos
Soro de controlo	1 frasco
Tampão de lavagem	2 frascos
Número de testes	100

**ARMAZENAGEM:** Depois da recepção, armazene o dispositivo a 2-8°C. Não congele. Após a abertura, os reagentes deste dispositivo permanecem estáveis até ao final do prazo de validade do dispositivo, se mantidos de modo adequado. O dispositivo foi projectado para 4 execuções analíticas se utilizado durante o dia à temperatura ambiente e conservado durante a noite a 2-8°C.

Não utilize reagentes expirados. O prazo de validade do dispositivo está descrito na etiqueta externa e corresponde ao prazo de validade do marcador. O prazo de validade de cada reagente está descrito na etiqueta de cada frasco.

Quando reconstituir o conteúdo dos frascos, agite devagarinho para evitar a formação de espuma.

Não misture reagentes de lotes diferentes.

### 3.1. Tubos revestidos

A superfície interna de cada tubo é revestida com IgG monoclonal de ratinho biotinizada, dirigida contra um epítipo da hGH diferente daquele contra o qual é dirigida a IgG utilizada para o marcador.

*Antes de usar, deixe os tubos revestidos à temperatura ambiente antes de abrir a embalagem, para evitar condensação de humidade.*

*Conserve os tubos não utilizados certificando-se de que a embalagem esteja bem fechada. Não misture lotes diferentes de tubos revestidos.*

### 3.2. Marcador $^{125}\text{I}$ (vermelho): reagente pronto a usar

O frasco contém 11 mL de IgG monoclonal de ratinho anti-hGH marcada com  $^{125}\text{I}$ , albumina sérica bovina, soro equino, IgG de ratinho, tampão fosfato, conservantes e um corante vermelho inerte. A radioatividade máxima é 333 kBq (9  $\mu\text{Ci}$ ) na data de calibração.

### 3.3. Calibradores de hGH: reagente pronto a usar

Os frascos contêm quantidades crescentes de hGH, soro humano, tampão fosfato e conservantes. As concentrações de hGH são as seguintes: 0 - 1,5 - 4,5 - 9 - 24 - 60 - 150  $\mu\text{UI/mL}$  (0 - 0,5 - 1,5 - 3 - 8 - 20 - 50 ng/mL). O volume do calibrador zero é 3 mL; o volume dos calibradores 1-6 é 0,5 mL. *Os calibradores do dispositivo são comutáveis com as amostras em análise quando foram utilizados com os reagentes e com o procedimento operativo deste teste de diagnóstico in vitro, consoante as recomendações do fabricante.*

Os calibradores do dispositivo estão referenciados ao 2º Padrão Internacional NIBSC 98/574, hGH obtida com a técnica do ADN recombinante (1 ng = 3  $\mu\text{UI}$ ).

### 3.4. Soro de controlo: reagente liofilizado

O frasco contém hGH, soro humano e conservantes. O intervalo de concentrações de cada controlo é referido no certificado de análise e indica os limites estabelecidos pela DiaSorin para os valores de controlo que podem ser obtidos em ensaios fidedignos.

Reconstitua o conteúdo do frasco com 1 mL de água destilada. Conserve a solução resultante durante duas semanas a 2-8°C ou subdividida em alíquotas congeladas a -20°C ou a temperatura inferior para uma conservação prolongada.

### 3.5. Tampão de lavagem: reagente em solução (10x)

Cada frasco contém 50 mL de Triton X-100 a 0,5% e solução salina.

Dilua o inteiro conteúdo de cada frasco com água desmineralizada, obtendo uma solução de 500 mL. A solução resultante é estável a 2-8°C até ao final do prazo de validade do dispositivo. A solução é utilizada para lavar os tubos revestidos.

## 4. EQUIPAMENTOS E MATERIAIS NECESSÁRIOS, MAS NÃO FORNECIDOS

- Água destilada e desmineralizada.
- Material de vidro.
- Micropipetas com pontas descartáveis de 50  $\mu\text{L}$  (exactidão  $\pm 3\%$ , precisão 2%) e 100, 1000  $\mu\text{L}$  (exactidão  $\pm 2\%$ , precisão 1%).
- Suporte para tubos.
- Agitador Vortex.
- Agitador rotativo com velocidade de agitação de 300-350 rpm (facultativo).
- Sistema para distribuir e aspirar o tampão de lavagem em condições de distribuir 2-3 mL por ciclo de lavagem durante dois ciclos de lavagem.
- Contador gama para contar o iodo  $^{125}\text{I}$  (definição da janela do contador: 15-80 keV - eficiência do contador: 70% tempo de contagem: 1 min). Se a eficiência do contador é inferior a 60%, o tempo de contagem deve ser prolongado a 2 min.

## 5. COLHEITA E PREPARAÇÃO DAS AMOSTRAS

Pode-se utilizar tanto soro como plasma humano para o teste. Os anticoagulantes citrato, EDTA e heparina foram testados e podem ser utilizados neste teste. O sangue deve ser colhido assepticamente por punção venosa, deixado coagular e o soro deve ser separado do coágulo tão cedo quanto possível. As amostras que contêm partículas sólidas, turvas, lipémicas ou com fragmentos de eritrócitos podem necessitar de clarificação por filtragem ou centrifugação antes de serem testadas. As amostras muito hemolisadas ou lipémicas, bem como as amostras que contêm partículas sólidas ou que exibem evidente contaminação bacteriana, não devem ser utilizadas. Se o ensaio for realizado dentro de 24 horas após a colheita das amostras, estas devem ser conservadas a 2-8°C; em caso contrário, estas devem ser subdivididas em alíquotas e conservadas a -20°C ou a temperatura inferior. Se as amostras estiverem congeladas, deixe-as descongelar e misture bem antes de utilizar. Evite ciclos repetidos de congelação e descongelação.

*Se foram previstos níveis de hGH maiores que 150  $\mu\text{UI/mL}$  (50 ng/mL), dilua com o calibrador zero.*

## 6. PROCEDIMENTO DO TESTE

Deixe todos os reagentes à temperatura ambiente (20-25°C) antes do teste. Execute o teste ao menos em duplicado. Os calibradores devem ser testados em cada série de amostras de doentes. Os calibradores e as amostras devem ser submetidos ao mesmo processo e tempo de incubação.

Execute todas as etapas do teste na ordem apresentada, sem muita demora entre cada etapa. A distribuição dos reagentes deve ser efectuada tão cedo quanto possível (no máximo 30 min).

Utilize uma ponta descartável para dispensar cada calibrador e amostra.

- Distribua os reagentes no fundo dos tubos revestidos segundo o esquema abaixo:

reagentes \ tubos	Calibradores 0-6	Amostras
Calibradores	50 µL	–
Amostras	–	50 µL
Marcador	100 µL	100 µL

- Prepare dois tubos não revestidos para calcular a actividade total que contém só 100 µL de marcador e deixe-os de lado até ao momento da contagem.
- **Agite** devagarinho com um agitador Vortex o conteúdo dos tubos e **incube** segundo o procedimento escolhido:
  - . **90 min à temperatura ambiente** em agitação (300-350 rpm) (procedimento A)
  - . **18-22 horas à temperatura ambiente** (procedimento B).
- **Aspire** com cuidado a mistura de incubação e **lave duas vezes** com 2 mL de **tampão de lavagem**. *Verifique se o líquido foi eliminado completamente, controlando se a ponta da pipeta de aspiração toca o fundo dos tubos revestidos. A presença de gotas aderentes nas paredes dos tubos revestidos pode provocar baixa reprodutibilidade ou resultados não fiáveis. Não devem permanecer resíduos do corante vermelho.*
- **Meça a radioactividade** dos tubos.

## 7. CÁLCULO DOS RESULTADOS

Calcule a média das contagens para cada grupo de tubos, após ter subtraído o valor do fundo. Calcule a média das contagens de calibradores e amostras como percentagem em relação à actividade total:

$$B/T\% = \frac{\text{contagem média de calibradores ou amostras}}{\text{contagem média da actividade total}} \times 100$$

Coloque as coordenadas em papel di-logarítmico e faça a curva utilizando a ordenada (eixo dos y) para o valor médio da percentagem calculada para cada calibrador em função da concentração de hGH expressa em µUI/mL ou ng/mL na abcissa (eixo dos x). Desta forma obtém-se uma curva de calibração (Fig. 1). Directamente da curva de calibração, leia a concentração de hGH de cada amostra expressa em µUI/mL ou ng/mL. Se a amostra tiver sido diluída, a concentração de hGH encontrada deve ser multiplicada pelo factor de diluição.

### Exemplo de cálculo (procedimento A)

Os seguintes dados devem ser considerados apenas como exemplo e não devem ser usados no lugar de dados obtidos pelo utilizador.

Descrição	Contagens	B/T%
Actividade total	112.199	100
Calibrador zero	23	0,02
1,5 µUI/mL - 0,5 ng/mL	891	0,79
4,5 µUI/mL - 1,5 ng/mL	2.861	2,55
9 µUI/mL - 3 ng/mL	5.598	4,99
24 µUI/mL - 8 ng/mL	13.308	11,86
60 µUI/mL - 20 ng/mL	29.546	26,33
150 µUI/mL - 50 ng/mL	59.715	53,22
Amostra	3.636	3,24

Interpolando da curva de calibração, a amostra resulta conter 5,76 µUI/mL (1,92 ng/mL) de hGH.

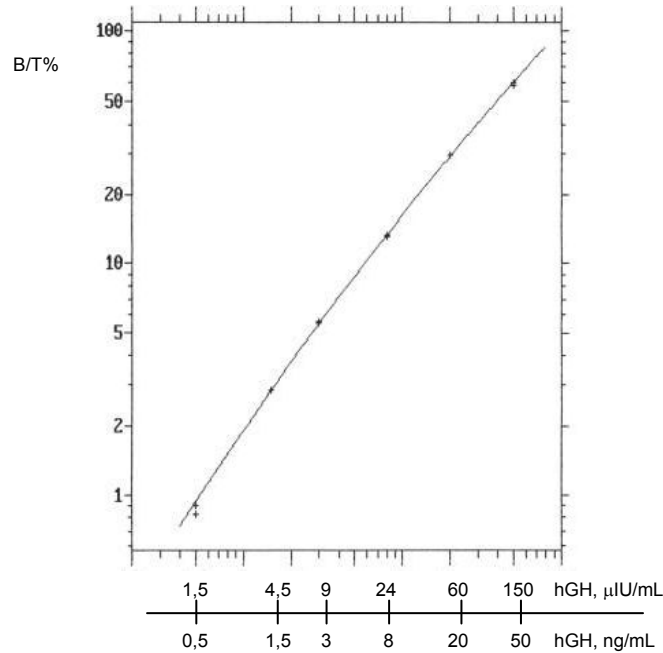


Fig. 1

## 8. VALORES ESPERADOS

Devido à variação num mesmo indivíduo e entre diferentes indivíduos da secreção de hGH, a literatura atribui um limitado significado diagnóstico ao teste basal e prefere a avaliação da resposta da hGH ao teste de estimulação. Por isso, julga-se oportuno lembrar que os valores basais de referência indicados a seguir são exclusivamente indicativos. Recomenda-se que cada laboratório estabeleça seus próprios intervalos de referência clinicamente relevantes.

Indivíduos	hGH, μUI/mL	hGH, ng/mL
Idade pré-puberal	0,0 - 4,0	0,0 - 1,3
Idade puberal:    sexo masculino	0,0 - 10,0	0,0 - 3,3
sexo feminino	0,0 - 30,0	0,0 - 10,0
Idade adulta:     sexo masculino	0,0 - 14,0	0,0 - 4,7
sexo feminino	0,0 - 32,0	0,0 - 10,7

## 9. CARACTERÍSTICAS ESPECÍFICAS DE DESEMPENHO

### 9.1. Especificidade analítica

A especificidade analítica pode ser definida como a capacidade do teste de detectar com cuidado o analito específico na presença de factores potencialmente interferentes na matriz da amostra (ex. anticoagulantes, hemólise, efeitos de tratamentos da amostra) ou de reacções cruzadas com analitos potencialmente interferentes.

**Interferências.** Estudos controlados de substâncias ou condições potencialmente interferentes demonstraram que o desempenho do ensaio não é afectado por anticoagulantes (citrato, EDTA, heparina), hemólise (até a 200 mg/dL de hemoglobina), lipemia (até a 500 mg/dL de triglicéridos), bilirrubinemia (até a 20 mg/dL de bilirrubina) ou uma congelação das amostras.

**Reacções cruzadas.** O dispositivo reconhece as duas variantes monoméricas da hGH (P.M. 20.000 e 22.000 dáltons).

A especificidade foi avaliada como a concentração aparente de hGH obtida ao testar elevadas concentrações de hormonas potencialmente interferentes.

Hormona	Concentração	Nível aparente de hGH
hPRL	100 mUI/mL 3rd IS 84/500	3 µUI/mL (1 ng/mL)
hCG	100 UI/mL 3rd IS 75/537	não detectável
hTSH	1 UI/mL 2nd IRP 80/558	não detectável
hLH	2 UI/mL 1st IRP 68/40	não detectável
hFSH	2 UI/mL 2nd IRP 78/549	não detectável
hCS	3 µg/mL	não detectável

### 9.2. Sensibilidade analítica

A sensibilidade analítica também pode ser expressa como o limite de detecção, ou seja, a quantidade mínima de analito específico detectável pelo teste. O limite de detecção é de 0,12 µUI/mL (0,04 ng/mL) com um limite de confiança de 95%. Este foi calculado como a concentração aparente de analito que pode ser distinguida do calibrador zero, isto é, dois desvios padrão acima do zero.

### 9.3. Precisão

Diferentes grupos de amostras, que contêm diferentes concentrações de analito específico, foram testados para determinar a repetibilidade e a reprodutibilidade do teste (isto é, a variabilidade intra e inter-ensaio).

Repetibilidade	A	B	C
Número de determinações	10	10	10
Média (µUI/mL)	36,80	16,40	3,42
Desvio padrão	0,68	0,30	0,12
Coefficiente de variação (%)	1,9	1,9	3,9

Reprodutibilidade	A	B	C
Número de determinações	10	10	10
Média (µUI/mL)	34,28	15,82	4,02
Desvio padrão	0,86	0,58	0,16
Coefficiente de variação (%)	2,5	3,7	4,1

### 9.4. Exactidão

A exactidão do teste foi controlada mediante os testes de diluição e recuperação.

**Teste de diluição.** Foram testadas diluições em série de dois soros que contêm uma concentração elevada de hGH efectuadas no calibrador zero.

Diluição	Concentração esperada, µUI/mL	Concentração medida, µUI/mL	% Recuperação
puro	—	77,40	—
1:2	38,70	37,40	96,6
1:4	19,35	18,60	96,1
1:8	9,68	9,40	97,2
1:16	4,84	4,80	99,2
1:32	2,42	2,40	99,2
puro	—	44,40	—
1:2	22,20	23,00	103,6
1:4	11,10	10,80	97,3
1:8	5,55	5,40	97,3
1:16	2,78	2,80	100,9
1:32	1,39	1,40	100,9

**Teste de recuperação.** Foram testados dois soros que contêm hGH, quer puros, quer após ter adicionado quantidades crescentes de hGH.

Concentração adicionada, $\mu\text{UI/mL}$	Concentração esperada, $\mu\text{UI/mL}$	Concentração medida, $\mu\text{UI/mL}$	% Recuperação
–	–	33,40	–
50,00	81,74	78,80	96,4
25,00	56,74	54,40	95,9
12,50	44,24	44,60	100,8
6,50	38,24	39,80	104,1
2,10	33,84	34,60	102,3
–	–	13,00	–
50,00	62,36	62,50	100,2
25,00	37,36	38,40	102,8
12,50	24,86	25,00	100,6
6,50	18,86	19,20	101,9
2,10	14,46	14,60	101,0

### 9.5. Efeito gancho a altas concentrações

Ao dosar amostras que contêm concentrações de antigénio extremamente elevadas com um método *sanduíche* com uma incubação, é possível obter níveis aparentes de antigénio inferiores ao real por efeito gancho. Para quantificar as amostras de maneira correcta, as amostras que contêm níveis de hGH maiores que o do calibrador mais concentrado devem ser diluídas com o calibrador zero e dosadas de novo. Os resultados devem ser multiplicados pelo factor de diluição para obter os níveis das amostras não diluídas.

O dispositivo foi desenvolvido de modo que concentrações de hGH até a 7,5 mUI/mL (2,50  $\mu\text{g/mL}$ ) forneçam um sinal analítico sempre maior que o do calibrador mais concentrado.

### 10. LIMITAÇÕES DO TESTE

O diagnóstico não deve basear-se no resultado dum único teste, mas deve ser determinado conjuntamente com outros dados clínicos e meios de diagnóstico, bem como em associação com o parecer do médico.

Contaminações bacterianas ou ciclos repetidos de congelação e descongelação das amostras podem afectar os resultados do teste.

Para obter resultados fiáveis, é necessário seguir de maneira correcta as instruções de uso e possuir uma adequada formação técnica. Em especial, é essencial uma boa precisão na preparação e distribuição dos reagentes, na aspiração e na lavagem.

Resultados não reprodutíveis podem ser devidos a erros de execução, tais como:

- troca das tampas dos frascos
- uso da mesma ponta para distribuir soluções ou amostras diferentes
- frascos deixados abertos durante um longo período de tempo
- exposição dos reagentes ou amostras ao calor intenso ou a fontes de contaminação bacteriana
- aspiração da mistura de incubação e lavagem dos tubos inadequadas
- contaminação dos rebordos dos tubos com o marcador ou com as amostras
- oscilações casuais ou manutenção inadequada do contador gama
- troca de reagentes de diferentes lotes.

### 11. ADVERTÊNCIAS E PRECAUÇÕES

Os componentes do dispositivo contêm azida sódica como conservante. Dado que a azida sódica pode formar azidas de chumbo ou de cobre explosivas nos tubos, é aconselhável deixar fluir água com abundância nas descargas após a eliminação de soluções que contêm azida sódica (Directiva 99/45/EC).

R 22 – Nocivo por ingestão.

R 31 – Em contacto com ácidos liberta gases tóxicos.

S 28 – Após contacto com a pele, lavar imediata e abundantemente com água.

S 45 – Em caso de acidente ou de indisposição, consultar imediatamente o médico (se possível mostrar-lhe o rótulo).

Todas as unidades de soro e plasma utilizadas para produzir os componentes deste dispositivo foram testadas para a presença de HBsAg, anti-HCV e anti-HIV-1/2 e os resultados encontrados foram não reactivos. Contudo, como nenhum método pode oferecer segurança absoluta de que agentes patogénicos estejam ausentes, todas as amostras de origem humana devem ser consideradas potencialmente infecciosas e manuseadas com cuidado.



## 12. REGRAS DE SEGURANÇA

- Não coma, beba, fume ou aplique cosméticos durante a execução do teste.
- Não pipete as soluções com a boca.
- Evite o contacto directo com todos os materiais potencialmente infecciosos usando equipamentos de protecção como luvas descartáveis, óculos e aventais. Lave bem as mãos no final de cada teste.
- Evite salpicos ou formação de aerossóis. Qualquer reagente derramado deve ser lavado com uma solução de hipoclorito de sódio a 5% e tratado como material residual potencialmente infeccioso.
- Todas as amostras, os reagentes biológicos e os materiais utilizados nos testes devem ser considerados potencialmente capazes de transmitir agentes infecciosos. Por isso, os resíduos devem ser eliminados conforme as regras emitidas pelos órgãos autorizados que administram o laboratório e conforme o regulamento específico de cada país. O material descartável deve ser incinerado, os resíduos líquidos devem ser descontaminados com uma solução de hipoclorito de sódio a 5% no mínimo durante meia hora. Qualquer material reutilizado deve ser autoclavado usando a abordagem de sobredestruição (*overkill*) (USP 24, 2000, p. 2143). Em geral, uma hora a 121°C é considerado um tempo de esterilização adequado, mas os utilizadores devem verificar a eficiência do seu sistema de descontaminação através de validação e utilização rotineira de indicadores biológicos.

## 13. REGRAS BÁSICAS DE SEGURANÇA CONTRA RADIAÇÃO

### Reagentes com Iodo-125

Este kit contém material radioactivo que não excede 8,85  $\mu\text{Ci}$  (328 kBq) de Iodo-125. Devem ser tomadas todas as precauções apropriadas e usadas boas práticas laboratoriais no armazenamento, manuseamento e eliminação deste material.

Para médicos ou instituições que recebam rádio-isótopos sob uma licença geral:

Este material radioactivo pode ser recebido, adquirido, possuído e usado apenas por médicos, veterinários na prática da medicina veterinária, laboratórios clínicos e hospitais, e apenas para testes laboratoriais ou testes clínico in vitro que não envolvam administração interna ou externa do material, ou a radiação deste para seres humanos ou animais. A sua recepção, aquisição, posse, uso e transferência estão sujeitos aos regulamentos e à licença geral da Comissão Reguladora Nuclear dos Estados Unidos do estado com o qual a Comissão chegou a acordo para o exercício da autoridade reguladora.

1. O armazenamento de qualquer material radioactivo deve ser limitado a uma área especificamente designada.
2. O acesso a materiais radioactivos deve ser limitado apenas a pessoal autorizado.
3. Não pipete material radioactivo por via oral.
4. Não coma nem beba nas áreas designadas para trabalho radioactivo.
5. As áreas onde possam ocorrer fugas devem ser limpas e em seguida lavadas com detergente alcali ou solução de descontaminação radiológica. Qualquer vidro usado deve ser enxaguado completamente em água antes de lavar qualquer outro material de vidro do laboratório.

Para médicos ou instituições que recebem rádio-isótopos sob uma licença específica:

A recepção, uso, transferência e eliminação de materiais radioactivos estão sujeitos aos regulamentos e condições de sua licença específica.

**ATENÇÃO:** O símbolo de radioactividade impresso na embalagem pode ser ligeiramente diferente do símbolo impresso no rótulo da caixa e no rótulo do frasco do traçador. O rótulo da caixa e do frasco do traçador indicam a quantidade real de radioactividade na data de calibragem enquanto a embalagem indica a radioactividade teórica no kit.

### ESQUEMA DO TESTE

- 1 - RECONSTITUA O SORO DE CONTROLO.
- 2 - IDENTIFIQUE OS TUBOS REVESTIDOS EM DUPLICADO.
- 3 - DISTRIBUA OS REAGENTES DE ACORDO COM O ESQUEMA ABAIXO E AGITE A MISTURA DE INCUBAÇÃO:

REAGENTES \ TUBOS	CAL 0-6	AMOSTRAS
CALIBRADORES	50 $\mu$ L	-
AMOSTRAS	-	50 $\mu$ L
MARCADOR	100 $\mu$ L	100 $\mu$ L

- 4 - INCUBE DURANTE:
  - . 90 MIN À TEMPERATURA AMBIENTE EM AGITAÇÃO (Procedimento A)
  - . 18-22 HORAS À TEMPERATURA AMBIENTE (Procedimento B).
- 5 - ASPIRE A MISTURA DE INCUBAÇÃO E LAVE DUAS VEZES COM 2 mL DE TAMPÃO DE LAVAGEM.
- 6 - MEÇA A RADIOACTIVIDADE DOS TUBOS.

## hGH IMMUNORADIOMETRIKUS ASSAY KÉSZLET

### Eljárás humán növekedési hormon (hGH)

#### kvantitatív meghatározásához

#### humán szérumból vagy plazmából

Csak in vitro alkalmazásra

### 1. BEVEZETÉS

A humán növekedési hormon (hGH) nagy mennyiségben szekretálódik a hipofízis. Gyermek és serdülő korban ez felel a test növekedésért és egész életen keresztül fontos metabolikus folyamatokra hat, oly módon, hogy a növekedést serkentsen. Bár ez a funkció nem aktív, de elengedhetetlen a felnőtt élet során is.

A hGH szintetizálását a hipofízis elülső lebenyének alfa-sejtjei végzik. Egy szálú, 191 aminosavat tartalmazó lánc, 21,500 dalton molekulatömeggel, mely két diszulfid kötést tartalmaz.

A hGH különböző molekula formákban kering: Nagy-nagy GH, nagy GH és kicsi GH. A kicsi GH található meg legnagyobb mennyiségben és talán ez az eredeti monomerikus forma, mivel a másik kettő polimerikus formát mutat.

A hGH-nak nincs specifikus cél szövete, de receptorok találhatóak a humán máj sejteken és a keringő limfocitákon. A hGH metabolikus hatásra két részre osztható: a) anti-inzulin közvetlen hatás (lipolitikus és hiperglikémiát okozó); b) 'inzulin-like' indirekt hatás (anti-lipolitikus és mitogenikus). Az utóbbi hatás következménye a test növekedése, amely a hGH klasszikusnak nevezhető hatása. Ezt a hatását szomatomedinek keresztül fejti ki, melyek relatív kis molekulatömegű hormonok (7000 dalton), melyek kémiai szerkezete nagyon egyszerű, mint például a proinzulin.

Az utolsó két utolsóként azonosított szomatomedin egyike 'inzulin-like' tulajdonságú, a másik közvetlenül segíti elő a test növekedését. Más, különböző polipeptid hormonok, szomatomedinek a keringésben hordozó fehérjékhez kötődnek, amely megnöveli felezési idejüket, ezért ezek koncentrációja relatív stabilnak mondható.

### 2. MEGHATÁROZÁS ELVE

Az assay egy nem kompetitív immunradiometrikus (IRMA) metodika, melynek alapját bevonatos csövek használata képezi és két egér monoklonális antitestet használ, mely a hGH molekula különböző epitópjaihoz képes kötődni. A monoklonális hGH IgG a cső falának bevonatában, a jelölt monoklonális hGH IgG a tracer-ben található

Az assay jellemzője az egyszeri inkubáció, mely során a kalibrátorok, illetve minták hGH tartalma a tracerhez és a szilárd fázishoz kötődik. Az inkubációt követően a szilárd fázishoz kötődött jelölt antitestek mennyisége arányos a kalibrátorokban, illetve mintákban lévő hGH koncentrációval. Az inkubációt követően a meg nem kötődött anyagok leszívással és mosással kerülnek eltávolításra.

### 3. A KÉSZLET TARTALMA

Bevonatos csövek	100
<sup>125</sup> I-tracer	1 üveg
hGH kalibrátorok	7 üveg
Kontroll szérum	1 üveg
Mosó puffer	2 flakon
Csővek száma	100

**TÁROLÁS:** Kézhez vétel után 2-8°C-on tárolandó. Tilos lefagyasztani. A felbontatlan készlet reagensei megfelelő tárolás mellett lejárati ideig eltartható. A készlet négy assay futtatására alkalmas napközben szobahőmérsékleten, éjszaka 2-8°C-on tárolva.

A reagensek lejárati idő után nem használhatóak. A készlet külső címkéjén feltüntetett lejárati idő a tracer lejárati idejével egyezik meg. Valamennyi komponens lejárati ideje a megfelelő üveg címkéjén van feltüntetve.

Az üveg tartalmának feloldásakor kerülje a habképződést.

Különböző sorozatokból származó reagensek összekeverése tilos.

#### 3.1. Bevonatos csövek

A belső felszínén valamennyi cső biotinilált hGH IgG-vel (egér monoklonális) van bevonva, mely közvetlenül képes kapcsolódni egy hGH epitóphoz, mely eltér attól, melyhez tracer-ben lévő IgG kapcsolódik.

Használat előtt a felbontatlan dobozokban hozza szobahőmérsékletre a bevonatos csöveket, hogy elkerülje a nedvességgel történő kondenzációt.

Zárja le a tökéletesen a fel nem használt csöveket a dobozban. Különböző sorozatokból származó bevonatos csövek nem keverhetőek.

### 3.2. <sup>125</sup>I-tracer (piros): felhasználásra kész

Az üveg 11 mL <sup>125</sup>I –tel jelölt hGH ellenes IgG antitestet (egér monoklonális), BSA-t, ló szérumot, egér IgG-t, foszfát puffert, tartósítót és semleges piros színezéket tartalmaz.

Radioaktivitása 333 kBq (9 µCi), vagy ennél kisebb a kalibráció idején.

### 3.3. hGH kalibrátorok: felhasználásra kész

Valamennyi üveg emelkedő mennyiségű, hGH tartalmú humán szérumot, foszfát puffert és tartósítót tartalmaz. A hGH kalibrátorok koncentrációja a következő: : 0 – 1.5 – 4.5 - 9 - 24 - 60 - 150 µIU/mL (0 – 0.5 – 1.5 - 3 - 8 - 20 - 50 ng/mL). A nulla kalibrátor üveg tartalma 3 mL; az 1-6 kalibrátoroké 0.5 mL. *A készlet kalibrátorai felcserélhetőek páciens mintákkal az in vitro diagnosztikai teszt reagenseinek és a gyártó által előírt felhasználó utasítás felhasználásával.*

A kalibrátorok hitelesítése a 2-ik Nemzetközi Standard NIBSC 98/574, Rekombináns DNA-származék hGH (1 ng = 3 µIU)-val történt.

### 3.4. Kontroll szérum: liofilizált reagens

Az üveg hGH tartalmú humán szérumot és tartósítót tartalmaz. Minden egyes kontroll koncentrációtartománya jelentésre kerül az elemzési igazoláson, és jelzi azokat a DiaSorin által a kontrollértékek számára megállapított határértékeket, amelyek megbízható assay-futtatások során szerezhetőek meg.

Oldja fel az üveg tartalmát 1 mL desztillált vízben. A kapott oldat 2-8°C-on tárolva 2 hétig, vagy kisebb részekre osztva, fagyasztva (–20°C vagy az alatt) hosszabb ideig tárolható.

### 3.5. Mosó puffer: reagens oldatban (10x)

Valamennyi flakon 50 mL 0.5% Triton X-100-at és só-oldatot tartalmaz.

Oldja fel valamennyi flakon tartalmát 500 mL deionizált vízben. A kapott oldat 2-8°C-on tárolva a készlet lejáratí idejéig stabil. A reagens a bevonatos csövek mosására szolgál.

## 4. SZÜKSÉGES ESZKÖZÖK ÉS ANYAGOK, MELYEKET A KÉSZLET NEM TARTALMAZ

- Desztillált, vagy deionizált víz.
- Üvegeszközök.
- Mikropipetta eldobható hegyekkel (50, 100, 1000 µL) (50 µL: pontosság ± 3%, precizitás 2%; 100, 1000 µL: pontosság ± 2%, precizitás 1%).
- Teszt cső tartó.
- Vortex mixer.
- Horizontális rázó, mely alkalmas 300-350 rpm-en történő működtetéshez.
- A mosó puffer adagolására és leszívására alkalmas eszköz, amely 2-3 mL kezelésére alkalmas ciklusonként a két mosási ciklusban.
- <sup>125</sup>I mérésére alkalmas gamma számláló (számláló ablak beállítása: 15-80 keV – számláló teljesítménye: 70% - mérés ideje: 1 perc). Ha a számláló teljesítménye 60% alatt van, a mérési időt 2 percre kell növelni.

## 5. MINTAVÉTEL ÉS ELŐKÉSZÍTÉS

Mind humán szérum, mind plazma használható. A citrát-, EDTA-, Heparin antikoagulánsokat tartalmazó mintákat tesztelték és mérésre alkalmasnak találták. A vérvételnek aseptikus körülmények között kell történnie, elkerülve az alvadást és a szérumot, amennyire lehet, el kell választani az alvadéktól. A partikulumokat, turbid részeket, lipémiát, vagy vörösvértest törmelékeket tartalmazó részeket szűrővel, vagy centrifugálással el kell távolítani. Nagy mértékű hemolízist, vagy lipémiát tartalmazó mintákat, valamint kívülről mikrobiológiai fertőzésnek kitett mintákat tilos feldolgozni. Amennyiben a minták 24 órán belül feldolgozásra kerülnek, azokat 2-8°C-on kell tartani, különben aliquotokra kell osztani és ezeket fagyasztóban tárolni (–20°C, vagy az alatt).

Ha a minta fagyasztva volt, a felolvasztott mintát alaposan keverje össze mérés előtt.

Kerülje az ismételt fagyasztás-olvasztást.

*Ha a várt hGH szint magasabb 150 µIU/mL (50 ng/mL) értéknél, a minták a nulla kalibrátorral kell meghígítani.*

## 6. MEGHATÁROZÁS FOLYAMATA

Hozza valamennyi reagenst szobahőmérsékletre (20-25°C) mérés előtt. Végezze a méréseket duplikátumban. A kalibrátorokat minden futtatásnál le kell mérni. A kalibrátorok és minták kezelése és inkubációja teljes mértékben megegyezik.

Minden assay-ben leírt lépés betartandó és késedelem nélkül elvégzendő. A reagensek bemérését a lehető leggyorsabban el kell végezni (max. 30 perc). Tiszta, egyszer használatos hegyet használjon mind a kalibrátorok, mind a minták beméréséhez.

- A reagenseket a bevonatos csövek aljára mérje be. Dolgozzon a következő terv alapján:

	csövek	Kalibrátorok 0-6	Minták
reagensek			
Kalibrátorok		50 µL	–
Minták		–	50 µL
Tracer		100 µL	100 µL

- Készítsen elő két nem bevonatos totál aktivitás kiszámítására alkalmas csövet, melybe csak 100 µL tracer kerül bemérésre, majd tegye félre a mérés megkezdéséig.
- **Keverje össze** a csövek tartalmát Vortex-el és **inkubálja** az eljárásnak megfelelően:
  - **90 perc szobahőmérsékleten**, folyamatos rázatás mellett (300-350 rpm) (eljárás A)
  - 1 éjszakán keresztül (18-22 óra), szobahőmérsékleten (eljárás B)
- Alaposan szívja le az inkubált elegyet, majd mossa kétszer 2 mL mosó pufferrel.  
*Győződjön meg róla, hogy a leszívó hegy érinti a cső alját és valamennyi folyadék leszívásra került. Az el nem távolított oldat rontja a reprodukálhatóságot és hamis eredményhez vezethet. Nem szabad színezéket látni a csőben.*
- **Mérje a radioaktivitást** a csövekben.

## 7. EREDMÉNYEK SZÁMÍTÁSA

Számítsa ki valamennyi csőtípusra kapott átlagot. Számolja ki a B/T hányados értékét valamennyi kalibrátorra és ismeretlen mintára vonatkozóan a következő képlet alapján:

$$B/T\% = \frac{\text{Kalibrátor, vagy minta átlag beütésszáma}}{\text{Totál csövek átlag beütésszáma}} \times 100$$

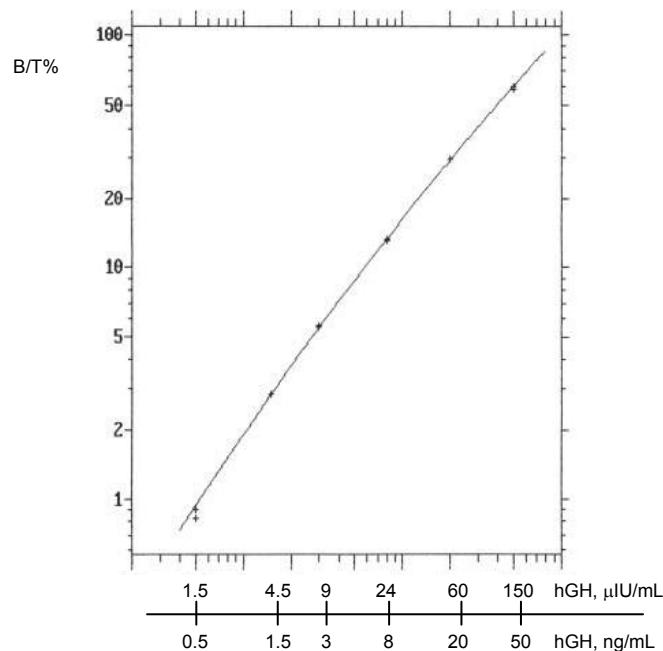
Ábrázolja log-log milliméterpapíron a kalibrátorokhoz tartozó átlagos százaléértéket az ordináta-(y) tengelyen a hozzá tartozó µIU/mL, vagy ng/mL-ben megadott hGH koncentráció függvényében (abszcissza, x- tengely). A kalibrációs görbe meghatározásra került (Ábra. 1). Valamennyi minta µIU/mL, vagy ng/mL-ben kifejezett hGH koncentrációja közvetlenül leolvasható a kalibrációs görbéről. Amennyiben a minta meg lett hígítva, akkor az eredmény számításánál a megfelelő hígítási faktortal be kell szorozni a kapott értéket.

Számítási példa (eljárás A)

*A következő adatok csak példaként szolgálnak és nem helyettesíthetők a felhasználó által mért adatokba.*

Típus	cpm	B/T%
Totál aktivitás	112,199	100
Nulla kalibrátor	23	0.02
1.5 µIU/mL - 0.5 ng/mL	891	0.79
4.5 µIU/mL - 1.5 ng/mL	2,861	2.55
9 µIU/mL - 3 ng/mL	5,598	4.99
24 µIU/mL - 8 ng/mL	13,308	11.86
60 µIU/mL - 20 ng/mL	29,546	26.33
150 µIU/mL - 50 ng/mL	59,715	53.22
Minta	3,636	3.24

A kalibrációs görbe interpolációjából a minta hGH koncentrációja 5.76 µIU/mL (1.92 ng/mL) .



Ábra 1

## 8. VÁRT ÉRTÉKEK

A hGH szekréció nagyfokú variabilitást mutathat ugyanazon egyénben és különböző személyek között; amint az irodalom is beszámol róla az alap teszt is figyelembe veszi a diagnosztikus szignifikancia határokat és a hGH eredmények kiértékelésének alapját egy terhelési teszt képezi. Ne feledje el, hogy az alább felsorolt alap referencia értékek csak tájékoztató jellegűek. Valamennyi laboratórium számára ajánlott saját referencia tartomány felállítását.

Vizsgált egyének	hGH, µIU/mL	hGH, ng/mL
Prepubertális kor	0.0 - 4.0	0.0 - 1.3
Pubertális age: férfi	0.0 - 10.0	0.0 - 3.3
nő	0.0 - 30.0	0.0 - 10.0
Felnőttek: férfi	0.0 - 14.0	0.0 - 4.7
nők	0.0 - 32.0	0.0 - 10.7

## 9. SPECIFIKUS ANALITIKAI JELLEMZŐK

### 9.1. Analitikai specificitás

Az analitikai specificitás az assay azon jellemzője, hogy hitelesen képes a specifikus analit jelenlétét kimutatni a potenciális interferáló faktortényezők (pl. antikoaguláns, hemolízis, gyógyszeres kezelés hatása), valamint keresztreakáló analitek között a minta mátrix-ból.

**Interferencia.** Az ellenőrző mérés során potenciális interferáló anyagok és interferencia tényezők kerültek vizsgálatra és az assay-re nem mutatottak hatást az antikoagulánsok (citrát, EDTA, heparin), hemolízis (200 mg/dL hemoglobin koncentrációig), lipémia (500 mg/dL triglicerid koncentrációig), bilirubinémia (20 mg/dL bilirubin koncentrációig), vagy a minták egyszeri olvasztás-fagyasztása.

**Keresztreakciók.** A készlet két különböző monomer formáját tartalmazza a GH-nak (M.W. 20,000 és 22,000 dalton).

A specificitás vizsgálata elvégzésénél meghatározott hGH koncentráció mellett vizsgálták potenciálisan nagy koncentrációjú interferáló hormonok hatását.

Hormon	Koncentráció	Meghatározott hGH szint
hPRL	100 mIU/mL 3rd IS 84/500	3 µIU/mL (1 ng/mL)
hCG	100 IU/mL 3rd IS 75/537	nem detektálható
hTSH	1 IU/mL 2nd IRP 80/558	nem detektálható
hLH	2 IU/mL 1st IRP 68/40	nem detektálható
hFSH	2 IU/mL 2nd IRP 78/549	nem detektálható
hCS	3 µg/mL	nem detektálható

## 9.2. Analitikai szenzitivitás

Az analitikai szenzitivitás a detektálás határaként fejezhető ki, mely nem más mint a specifikus analit minimális mennyisége, amely az assay-val kimutatható. A detektálás határa 0.12  $\mu\text{U/mL}$  (0.04 ng/mL) 95%-os konfidencia értéknél. Ez az analit koncentráció kiszámítható, mint a nulla kalibrátortól két standard devianciával eltérő érték.

## 9.3. Precizitás

Különböző minta pool-ok, különböző specifikus analit koncentrációval kerültek mérésre az assay ismételhetőségének és reprodukálhatóságának vizsgálatára (sorozaton belüli és sorozatok közötti variabilitás).

Ismételhetőség	A	B	C
Meghatározások száma	10	10	10
Átlag ( $\mu\text{U/mL}$ )	36.80	16.40	3.42
Standard deviancia	0.68	0.30	0.12
Variációs koefficiens (%)	1.9	1.9	3.9

Reprodukálhatóság	A	B	C
Meghatározások száma	10	10	10
Átlag ( $\mu\text{U/mL}$ )	34.28	15.82	4.02
Standard deviancia	0.86	0.58	0.16
Variációs koefficiens (%)	2.5	3.7	4.1

## 9.4. Megbízhatóság

Az assay megbízhatósága hígítási és visszanyerési teszttel ellenőrizhető.

**Hígítási teszt.** Két magas hGH koncentrációjú szérum került mérésre nulla kalibrátorral történő sorozathígítást követően.

Hígítás	Várt koncentráció, $\mu\text{U/mL}$	Mért koncentráció, $\mu\text{U/mL}$	% Visszanyerés
hígítatlan	–	77.40	–
1:2	38.70	37.40	96.6
1:4	19.35	18.60	96.1
1:8	9.68	9.40	97.2
1:16	4.84	4.80	99.2
1:32	2.42	2.40	99.2
hígítatlan	–	44.40	–
1:2	22.20	23.00	103.6
1:4	11.10	10.80	97.3
1:8	5.55	5.40	97.3
1:16	2.78	2.80	100.9
1:32	1.39	1.40	100.9

**Visszanyerési teszt.** Két hGH-t tartalmazó szérumerült mérésre miután növekvő mennyiségű hGH került hozzáadásra.

Hozzáadott koncentráció, μIU/mL	Várt koncentráció, μIU/mL	Mért koncentráció, μIU/mL	% Visszanyerés
–	–	33.40	–
50.00	81.74	78.80	96.4
25.00	56.74	54.40	95.9
12.50	44.24	44.60	100.8
6.50	38.24	39.80	104.1
2.10	33.84	34.60	102.3
–	–	13.00	–
50.00	62.36	62.50	100.2
25.00	37.36	38.40	102.8
12.50	24.86	25.00	100.6
6.50	18.86	19.20	101.9
2.10	14.46	14.60	101.0

### 9.5. High-dose hook effektus

Amennyiben az egy lépéses szendvics assay-vel extrém magas antigén koncentrációjú minta kerül mérésre, a hook effektus révén a valószínűleg alacsonyabb koncentráció kerülhet meghatározásra.

A megfelelő eredmény meghatározásához a legnagyobb kalibrátornál magasabb hGH szintű mintát a „Nulla” kalibrátorral meg kell hígítani és újramérni. A kapott eredményt be kell szorozni a hígítási faktoral, hogy megkapjuk a hígítatlan minta értékét.

A készlet oly módon lett összeállítva, hogy a 7.5 mIU/mL (2.50 μg/mL) hGH-hoz tartozó analitikai jel nagyobb, mint a legnagyobb kalibrátoré.

## 10. A MEGHATÁROZÁS KORLÁTAI

A diagnózis felállításához nem elegendő egyetlen teszt eredménye, figyelembe kell venni a klinikai leleteket és más diagnosztikai vizsgálatokat a klinikai döntéshozatal során.

A bakteriális kontamináció, vagy a minta többszöri olvasztás-fagyasztása befolyásolja az eredményeket.

Szakképzet személyzet és az utasítások teljes körű betartása szükséges a megbízható eredmények eléréséhez. Különösen fontos a pontos pipettázás és a tökéletes leszívás és mosás.

Nem reprodukálható eredmények eredhetnek a következő hibaforrásokból:

- az üvegek kupakjainak összecserélése
- ugyanazon hegy használata különböző üvegekből, vagy mintákból történő beméréskor
- hosszan nyitva tartott üvegek
- magas hőmérsékletnek, vagy bakteriális kontaminációnak kitett reagensek, vagy minták
- inkubációt követően nem megfelelő a csövek leszívása és mosása
- a cső peremének mintával, vagy tracer-rel történő beszennyezése
- a gamma számláló nem megfelelő kezelése
- nem azonos sorozatból származó reagensek keverése.

## 11. FIGYELMEZTETÉSEK ÉS ÓVINTÉZKEDÉSEK

A készlet néhány reagense sodium-azid-ot tartalmaz tartósítóként. A sodium-azid ólom és réz tartalmú vízvezetékekkel reakcióba lépve robbanásveszélyes fém-azidokat képez, ezért a hulladékot bő vízzel eressze le a felszabaduló azidok kitapadásának megakadályozására (Council Directive 99/45/EC).

R 22 – Lenyelése káros.

R 31 – Savakkal kapcsolatba lépve toxikus gázok szabadulnak fel.

S 28 – Bőrrel történő érintkezését követően azonnal bő vízzel mossa le.

S 45 – Baleset, vagy rosszullet esetén azonnal forduljon orvoshoz .

Minden szérum és plazma donor egység, amelyet a készlet tartalmaz, ki lett vizsgálva és negatív eredményt adott HBsAg-re, HCV antitestre és HIV 1/2 antitestre nézve. Bár az ellenőrzés nagy pontossággal történik nem garantálható, hogy valamennyi fertőző tényező kimutatásra kerül. A készlet tartalmaz olyan humán eredetű anyagokat is amelyek nem esnek tesztelés alá, a humán eredetű anyagokat a potenciális infekciók figyelembevételével, megfelelő elővigyázatossággal kell kezelni.



## 12. BIZTONSÁGI ELŐÍRÁSOK

- Tilos a laboratóriumban enni, inni, dohányozni és kozmetikai szereket használni.
- Tilos az oldatok szájjal történő pipettázása.
- Az anyagokat potenciális infektológiai forrásként kell kezelni, megfelelő védőruházat, például laboratóriumi köpeny, védőszemüveg, kesztyű segítségével kerülni kell velük a direkt kontaktust. Minden munkafolyamat végén alaposan mosson kezet.
- Kerülje a kicsapódást és az aeroszol képződést. Valamennyi kilöttyent reagenst 5%-os Na-hipoklorittal mossa fel és kezelje potenciális fertőzőforrásként.
- Az assay-ben használt valamennyi mintát, biológiai reagenst és anyagokat potenciális infektológiai ágensként kell kezelni. Ezért ezeket az anyagokat a mindenkorai szabályoknak és irányelveknek megfelelően kell kezelni a laboratórium illetékesek és az országos szabályok által előírtak szerint. Az egyszer használatos anyagokat el kell égetni, a folyékony hulladékot pedig dekontaminálni kell 5%-os végkoncentrációjú Na-hipoklorittal legalább fél órán keresztül. Minden újrahaználható tárgyat autoklávozni kell „mindent előlő” beállítással (USP 24, 2000, p. 2143). Minimum 1 óra 121°C rendszerint elegendő, de a felhasználónak gondoskodnia kell a dekontaminálási ciklus hatékonyság ellenőrzéséről rutinban is használt, érvényes biológiai indikátorral.

## 13. ALAPSZABÁLYOK RADIKTÍV ANYAGOK KEZELÉSÉRE

### I-125 TARTALMÚ REAGENSEK

Ez a készlet olyan I-125 tartalmú anyagokat tartalmaz, melyek radioaktivitása nem haladja meg a 8.85  $\mu\text{Ci}$  (328 kBq) értéket. Helyes előkészítés és megfelelő laboratóriumi gyakorlat szükséges az anyagok tárolásánál, kezelésénél és a hulladékkezelésnél.

Egyetemes szabályok radioizotópok kezeléséhez:

Ezeket a radioaktív anyagokat csak orvosok, vagy állatorvosok szerezhetik be, birtokolhatják és használhatják humán és állat gyógyászatban, klinikai laboratóriumokban, vagy kórházakban kizárólag in vitro klinikai, vagy laboratóriumi tesztekben, melyek nem foglalják magukban a humán, illetve állati szervezet külső, vagy belső kezelését, arra irányuló sugárzást. Ezen termékek beszerzése, birtoklása, használata, szállítása a U.S. Nuclear Regulatory Commission szabályozása alá esik.

1. A radioaktív anyagokat körülhatárolt, speciálisan jelölt területen kell tárolni.
2. A radioaktív anyagokhoz csak arra jogosult személyek férhetnek.
3. Tilos a radioaktív anyagok szájjal történő pipettázása.
4. A radioaktív munkához kijelölt területen enni és inni tilos.
5. A területet, ahová radioaktív anyag löttyen ki, fel kell törölni, majd alkali detergenssel, vagy radioaktivitást dekontamináló oldattal kell felmosni. Az üvegedényeket alaposan ki kell öblíteni vízzel mielőtt más laboratóriumi edénnyel együtt kerülne mosásra.

A radioaktív anyagok kezelésénél a következő speciális szabályok érvényesek:

A radioaktív anyagok kezelésének, használatának, szállításának és hulladékkezelésének szabályozása saját szabályozás alá esik.

**FIGYELMEZTETÉS:** A csomagoláson feltüntetett radioaktivitás némileg eltérhet a doboz és a tracer címkéjén feltüntetett értéktől. A dobozon és a tracer címkéjén feltüntetett érték a csomag kalibrációjának napján aktuálisan mért értéket mutatja, míg a csomagolás leírása a készlet teoretikus radioaktivitását tartalmazza.

## A MÉRÉS SÉMÁJA

- 1 - KONTROLL SZÉRUMOK FELOLDÁSA.
- 2 - CSÖVEK JELÖLÉSE DUPLIKÁTUMBAN.
- 3 - REAGENSEK BEMÉRÉSE A KÖVETKEZŐ SÉMA SZERINT, MAJD AZ INKUBÁLANDÓ ELEGY KEVERÉSE.:

REAGENSEK \ CSÖVEK	KAL 0-6	MINTÁK
KALIBRÁTOROK	50 µL	–
MINTÁK	–	50 µL
TRACER	100 µL	100 µL

- 4 - INKUBÁLÁS:
  - . 90 PERC SZOBAHŐMÉRSÉKLETEN, RÁZATÁSSAL (Eljárás A)
  - . EGY ÉJSZAKÁN ÁT SZOBAHŐMÉRSÉKLETEN (Eljárás B).
- 5 - AZ INKUBÁCIÓS ELEGY LESZÍVÁSA, MAJD MOSÁSA KÉTSZER 2 ML MOSÓ PUFFERREL.
- 6 - A CSÖVEK RADIOAKTIVITÁSÁNAK MÉRÉSE.

**ΣΥΣΚΕΥΑΣΙΑ ΑΝΟΣΟΡΑΔΙΟΜΕΤΡΙΚΟΥ  
ΠΡΟΣΔΙΟΡΙΣΜΟΥ ΤΗΣ ΑΝΘΡΩΠΙΝΗΣ GH**  
**Διαδικασία ποσοτικού προσδιορισμού της**  
**ανθρώπινης αυξητικής ορμόνης (ανθρώπινης GH) σε**  
**δείγματα ανθρώπινου ορού ή πλάσματος**

Μόνο για χρήση in vitro

## 1. ΕΙΣΑΓΩΓΗ

Η ανθρώπινη αυξητική ορμόνη (ανθρώπινη GH) είναι η ορμόνη που εκκρίνεται από την υπόφυση σε μεγαλύτερη ποσότητα από οποιαδήποτε άλλη ορμόνη. Κατά την διάρκεια της παιδικής ηλικίας και στην εφηβεία προάγει την αύξηση του ανθρώπινου σώματος και καθ' όλη την διάρκεια της ζωής επηρεάζει τις διαδικασίες του μεταβολισμού, συμβάλλοντας στην ανάπτυξη. Δεν θεωρείται, παρ' όλα αυτά, απαραίτητη για την υγεία κατά την ενήλικη ζωή.

Η σύνθεση της ανθρώπινης GH γίνεται από τα κύτταρα άλφα της πρόσθιας υπόφυσης. Αποτελείται από μία μονή αλυσίδα 191 αμινοξέικων υπολειμμάτων, μοριακού βάρους 21.500 daltons, και δύο δισουλφιδικούς δεσμούς.

Η ανθρώπινη GH κυκλοφορεί με διάφορους μοριακούς τύπους, που ονομάζονται Big-Big GH, Big GH και Little GH. Η little GH κυκλοφορεί σε μεγαλύτερη ποσότητα από όλες τις άλλες μορφές και, κατά πάσα πιθανότητα, αποτελεί την κατ' εξοχήν μονομερή μορφή, ενώ οι άλλες δύο φαίνεται πως είναι πολυμερείς μορφές.

Η ανθρώπινη GH δεν διαθέτει ένα συγκεκριμένο όργανο στόχο, όμως έχουν ανακαλυφθεί υποδοχείς της στα κύτταρα του ανθρώπινου ήπατος και σε κυκλοφορούμενα λεμφοκύτταρα. Οι μεταβολικές επιδράσεις της ανθρώπινης GH χωρίζονται, γενικά, σε δύο βασικές κατηγορίες: α) άμεση αντι-ινσουλική δράση (λιπολυτική που προκαλεί υπεργλυκαιμία), β) έμμεση δράση, παρόμοια με αυτή της ινσουλίνης (αντιλιπολυτική και μιτογόνος). Η τελευταία δράση βοηθά στην σωματική αύξηση, η οποία αποτελεί την κλασσική δράση της ανθρώπινης GH και ασκείται μέσω των σωματομεδινών, ορμονών σχετικά χαμηλού μοριακού βάρους (M.B. 7.000 daltons) και χημικής δομής παρόμοιας με αυτή της προΐνσουλίνης.

Τουλάχιστον δύο σωματομεδίνες έχουν ταυτοποιηθεί, η μία με ιδιότητες παρόμοιες με αυτές της ινσουλίνης, η άλλη με πιο άμεση εμπλοκή στην σωματική αύξηση. Αντίθετα με όλες τις άλλες πολυπεπτιδικές ορμόνες, οι σωματομεδίνες κυκλοφορούν κυρίως προσδεσμένες σε μεταφέρουσες πρωτεΐνες, οι οποίες παρατείνουν τον χρόνο ημιζωής τους και, κατά συνέπεια, σταθεροποιούν και την συγκέντρωσή τους.

## 2. ΑΡΧΕΣ ΤΗΣ ΔΙΑΔΙΚΑΣΙΑΣ

Ο συγκεκριμένος προσδιορισμός είναι μία μη ανταγωνιστική ανοσοραδιομετρική μέθοδος (IRMA), η οποία βασίζεται στην χρήση σωληναρίων επικαλυμμένων με αντισώματα και χρησιμοποιεί δύο μονοκλωνικά αντισώματα ποντικού, που απευθύνονται σε δύο διαφορετικούς επιτόπους στο μόριο της ανθρώπινης GH. Γίνεται επικάλυψη των τοιχωμάτων του σωληναρίου με μονοκλωνικό IgG έναντι της ανθρώπινης GH και χρησιμοποιείται επισημασμένο IgG έναντι της ανθρώπινης GH ως ιχνηθέτης.

Κατά την διάρκεια του προσδιορισμού γίνεται μόνο μία επώαση, κατά την οποία η ανθρώπινη GH που υπάρχει στους βαθμονομητές και τα δείγματα επιτρέπει στον ιχνηθέτη να προσδεθεί στην στερεή φάση. Μετά την επώαση, η ποσότητα του επισημασμένου αντισώματος που έχει δεσμευτεί από την στερεή φάση είναι ανάλογη της συγκέντρωσης της ανθρώπινης GH που βρίσκεται στους βαθμονομητές ή τα δείγματα. Στο τέλος της επώασης, το μη δεσμευμένο υλικό αφαιρείται με αναρρόφηση και πλύση.

## 3. ΑΝΤΙΔΡΑΣΤΗΡΙΑ ΠΟΥ ΠΕΡΙΕΧΟΝΤΑΙ ΣΤΗΝ ΣΥΣΚΕΥΑΣΙΑ

Επικαλυμμένα σωληνάκια	100
Ιχνηθέτης $I^{125}$	1 φιαλίδιο
Βαθμονομητές ανθρώπινης GH	7 φιαλίδια
Ορός ελέγχου	1 φιαλίδιο
Ρυθμιστικό διάλυμα πλύσης	2 μπουκάλια
Αριθμός σωληναρίων	100

*Αποθήκευση:* Κατά την παραλαβή, η συσκευασία πρέπει να φυλάσσεται στους 2- 8°C. Μην καταψύχετε. Μόλις ανοιχτεί η συσκευασία, τα αντιδραστήρια παραμένουν σταθερά μέχρι την ημερομηνία λήξης, εάν η συσκευασία φυλάσσεται σωστά. Η συσκευασία έχει σχεδιαστεί για την διεξαγωγή 4 σειρών μέτρησης, όταν χρησιμοποιείται κατά την διάρκεια της ημέρας σε θερμοκρασία δωματίου και φυλάσσεται κατά την διάρκεια της νύχτας στους 2- 8°C.

Τα αντιδραστήρια δεν πρέπει να χρησιμοποιούνται μετά την ημερομηνία λήξης. Η ημερομηνία λήξης της συσκευασίας αναγράφεται στην εξωτερική ετικέτα και αντιστοιχεί με την ημερομηνία λήξης του ιχνηθέτη. Η ημερομηνία λήξης κάθε συστατικού αναγράφεται στην αντίστοιχη ετικέτα του φιαλιδίου.

Όταν πραγματοποιείτε ανασύσταση του περιεχομένου των φιαλιδίων, αναμείξτε απαλά για να αποφύγετε την δημιουργία αφρού.

Δεν πρέπει να ανακατεύετε αντιδραστήρια από διαφορετικές παρτίδες.

### 3.1 Επικαλυμμένα σωληνάρια

Η εσωτερική επιφάνεια κάθε σωληναρίου είναι επικαλυμμένη με βιοτινυλωμένο IgG έναντι της ανθρώπινης GH (μονοκλωνικό αντίσωμα ποντικού), που κατευθύνεται έναντι ενός επιτόπου της ανθρώπινης GH, ο οποίος είναι διαφορετικός από αυτόν, κατά του οποίου εγείρεται το IgG που χρησιμοποιείται για τον ιχνηθέτη.

*Πριν την χρήση και προτού ανοίξετε την συσκευασία, φέρτε τα επικαλυμμένα σωληνάρια σε θερμοκρασία δωματίου, για να αποφύγετε την συμπύκνωση της υγρασίας.*

*Σφραγίστε και πάλι την συσκευασία που περιέχει μη χρησιμοποιημένα σωληνάρια. Μην ανακατεύετε διαφορετικές παρτίδες επικαλυμμένων σωληναρίων.*

### 3.2 Ιχνηθέτης I<sup>125</sup> (κόκκινος): αντιδραστήριο έτοιμο για χρήση

Το φιαλίδιο περιέχει 11mL IgG έναντι της ανθρώπινης GH (μονοκλωνικό ποντικού), επισημασμένο με I<sup>125</sup>, BSA, ορό ίππου, IgG ποντικού, ρυθμιστικό διάλυμα φωσφορικών, συντηρητικά και μία αδρανή κόκκινη χρωστική. Η ραδιενέργεια την ημέρα της βαθμονόμησης είναι 333 kBq (9 μCi) ή λιγότερο.

### 3.3 Βαθμονομητές ανθρώπινης GH: αντιδραστήριο έτοιμο για χρήση

Τα φιαλίδια περιέχουν αυξανόμενες ποσότητες ανθρώπινης GH, ανθρώπινο ορό, ρυθμιστικό διάλυμα και συντηρητικά.

Οι συγκεντρώσεις της ανθρώπινης GH έχουν ως εξής: 0 - 1.5 - 4.5 - 9 - 24 - 60 - 150 μIU/mL (0 - 0,5 - 1,5 - 3 - 8 - 20 - 50 ng/mL). Το περιεχόμενο του φιαλιδίου του μηδενικού βαθμονομητή είναι 3 mL. Το περιεχόμενο των φιαλιδίων των βαθμονομητών 1-6 είναι 0,5 mL. *Οι βαθμονομητές της συσκευασίας επιδεικνύουν την ίδια συμπεριφορά με τα δείγματα των ασθενών, όταν χρησιμοποιούνται με τα αντιδραστήρια και με την διαδικασία χρήσης αυτής της in vitro διαγνωστικής δοκιμασίας, όπως συστήνει ο κατασκευαστής.*

Οι συγκεντρώσεις του βαθμονομητή έχουν οριστεί με βάση το 2ο Διεθνές Πρότυπο NIBSC 98/574, παράγωγο ανθρώπινης GH προερχόμενο από ανασυνδυασμένο DNA (1 ng = 3 μIU).

### 3.4 Ορός ελέγχου: λυοφιλιωμένο αντιδραστήριο

Το φιαλίδιο περιέχει ανθρώπινη GH, ανθρώπινο ορό και συντηρητικά. Το εύρος των συγκεντρώσεων κάθε ελέγχου αναφέρεται στο πιστοποιητικό ανάλυσης και δείχνει τα όρια που έχουν καθοριστεί από την DiaSorin για τιμές ελέγχων που μπορούν να επιτευχθούν σε αξιόπιστους κύκλους εξετάσεων.

Ανασυστήσατε το περιεχόμενο του φιαλιδίου με 1 mL αποσταγμένου νερού. Αποθηκεύσατε το διάλυμα που προκύπτει στους 2-8°C για δύο εβδομάδες ή σε κατεψυγμένα κλάσματα (-20°C ή ακόμη χαμηλότερη θερμοκρασία) για παρατεταμένη φύλαξη.

### 3.5 Ρυθμιστικό διάλυμα πλύσης: αντιδραστήριο σε διάλυμα (10x)

Κάθε μπουκάλι περιέχει 50 mL 0,5% Triton X-100 και διάλυμα φυσιολογικού ορού.

Αραιώστε το περιεχόμενο κάθε μπουκαλιού στα 500 mL με αφιονισμένο νερό. Το διάλυμα που προκύπτει παραμένει σταθερό στους 2-8°C μέχρι την ημερομηνία λήξης της συσκευασίας. Το αντιδραστήριο χρησιμοποιείται για την πλύση των επικαλυμμένων σωληναρίων.

## 4. ΑΠΑΙΤΟΥΜΕΝΟΣ ΑΛΛΑ ΜΗ ΣΥΜΠΑΡΑΔΙΔΟΜΕΝΟΣ ΕΞΟΠΛΙΣΜΟΣ ΚΑΙ ΥΛΙΚΑ

- Αποσταγμένο και αφιονισμένο νερό.
- Γυάλινα σκεύη.
- Μικροπιπέτες με ρύγχος μίας χρήσης (50, 100, 1000 μL) (50 μL: πιστότητα ± 3%, ακρίβεια 2%. 100, 1000 μL: πιστότητα ± 2%, ακρίβεια 1%).
- Έδρανο δοκιμαστικών σωληναρίων.
- Αναμείκτης vortex.
- Οριζόντιος αναδευτήρας (shaker) με ικανότητα να επιτύχει ταχύτητα ανάμειξης 300-350 rpm (προαιρετικός).
- Συσκευή για διανομή και αναρρόφηση του ρυθμιστικού διαλύματος πλύσης, με ικανότητα απόδοσης 2-3 mL ανά κύκλο πλύσης, για δύο κύκλους πλύσης.
- Μετρητής γάμα, κατάλληλος για την μέτρηση I<sup>125</sup> (ρύθμιση παραθύρου μετρητή: 15-80 keV - αποδοτικότητα μετρητή: 70% - χρόνος μέτρησης: 1 λεπτό). Εάν η αποδοτικότητα του μετρητή είναι κάτω από 60%, ο χρόνος μέτρησης πρέπει να παρατείνεται στα 2 λεπτά.

## 5. ΣΥΛΛΟΓΗ ΚΑΙ ΠΡΟΕΤΟΙΜΑΣΙΑ ΤΩΝ ΔΕΙΓΜΑΤΩΝ

Μπορεί να χρησιμοποιηθεί είτε ανθρώπινος ορός είτε πλάσμα. Τα αντιπηκτικά κιτρικό, EDTA και ηπαρίνη, έχουν ελεγχθεί και μπορούν να χρησιμοποιηθούν στον συγκεκριμένο προσδιορισμό. Η αιμοληψία πρέπει να γίνεται άσηπτα, με παρακέντηση της φλέβας, το αίμα πρέπει να αφήνεται να πήξει και ο ορός να διαχωρίζεται από το πήγμα το συντομότερο δυνατόν. Τα δείγματα που περιέχουν σωματιδιακή ύλη, που παρουσιάζουν θολερότητα, λιπαιμία ή νεκρωμένα ερυθροκύτταρα, μπορεί να χρειάζονται καθαρισμό με φιλτράρισμα ή φυγοκέντρηση πριν την διεξαγωγή της δοκιμασίας. Δεν πρέπει να γίνονται δοκιμασίες σε εμφανώς αιμολυμένα ή λιπαιμικά δείγματα, καθώς και σε δείγματα που περιέχουν σωματιδιακή ύλη ή παρουσιάζουν εμφανή μικροβιακή μόλυνση. Εάν ο προσδιορισμός λάβει χώρα εντός 24 ωρών από την συλλογή των δειγμάτων, η φύλαξή τους μπορεί να γίνεται στους 2-8°C. Σε αντίθετη περίπτωση, πρέπει να γίνεται επιμερισμός σε κλάσματα και αποθήκευση των δειγμάτων στην κατάψυξη (-20°C ή χαμηλότερη θερμοκρασία). Εάν η αποθήκευση των δειγμάτων γίνεται στην κατάψυξη, τα δείγματα θα πρέπει να αποψυχθούν και να αναμειχθούν πολύ πριν την διεξαγωγή της δοκιμασίας. Αποφύγετε τους επανειλημμένους κύκλους ψύξης - απόψυξης.

*Εάν τα αναμενόμενα επίπεδα της ανθρώπινης GH είναι μεγαλύτερα από 150 μIU/mL (50 ng/mL), θα πρέπει να γίνεται αραιώση των δειγμάτων με τον μηδενικό βαθμονομητή.*

## 6. ΔΙΑΔΙΚΑΣΙΑ ΤΟΥ ΠΡΟΣΔΙΟΡΙΣΜΟΥ

Πριν την διεξαγωγή του προσδιορισμού, πρέπει να φέρετε όλα τα αντιδραστήρια σε θερμοκρασία δωματίου (20-25°C). Ο προσδιορισμός πρέπει να γίνει τουλάχιστον εις διπλούν. Πρέπει να χρησιμοποιούνται οι βαθμονομητές με κάθε σειρά δειγμάτων ασθενών. Οι βαθμονομητές και τα δείγματα πρέπει να έχουν τον ίδιο χρόνο επεξεργασίας και επώασης. Τα στάδια του προσδιορισμού πρέπει να διεξάγονται όλα με την σειρά που ορίζεται και να μην υπάρχουν σημαντικές καθυστερήσεις μεταξύ τους. Τα αντιδραστήρια πρέπει να διανέμονται όσο το δυνατόν γρηγορότερα (30 λεπτά το μέγιστο). Για την διανομή κάθε βαθμονομητή ή δείγματος, πρέπει να χρησιμοποιείται κάθε φορά καινούριο ρύγχος μίας χρήσης.

- Εισάγετε τα αντιδραστήρια στον πάτο των επικαλυμμένων σωληναρίων. Ενεργήστε σύμφωνα με το ακόλουθο σχήμα:

Αντιδραστήρια	Σωληνάρια	Βαθμονομητές 0-6	Δείγματα
Βαθμονομητές		50 μL	-
Δείγματα		-	50 μL
Ιχνηθέτης		100 μL	100 μL

- Ετοιμάστε δύο μη επικαλυμμένα σωληνάρια που θα περιέχουν μόνο 100 μL ιχνηθέτη, για τον υπολογισμό της συνολικής δραστηριότητας, και αφήστε τα στην άκρη, μέχρι να γίνει η μέτρηση.
- **Αναμείξτε** το περιεχόμενο των σωληναρίων με μείκτη Vortex και κάντε **επώαση** σύμφωνα με την επιλεγμένη διαδικασία:
  - **90 λεπτά σε θερμοκρασία δωματίου**, ενώ ανακινείτε συνεχώς (300-350 rpm) (διαδικασία A)
  - **όλη την νύχτα** (18-22 ώρες) **σε θερμοκρασία δωματίου** (διαδικασία B).
- **Αναρροφήστε** προσεκτικά το μείγμα της επώασης και **ξεπλύνετε δύο φορές** με 2 mL **ρυθμιστικό διάλυμα πλύσης**. *Βεβαιωθείτε ότι το ρύγχος της συσκευής αναρρόφησης αγγίζει τον πάτο του επικαλυμμένου σωληναρίου, έτσι ώστε να αφαιρεθεί όλο το υγρό. Τυχόν αδυναμία επαρκούς αφαίρεσης του διαλύματος που προσκολλάται στα τοιχώματα μπορεί να οδηγήσει σε χαμηλή αναπαραγωγιμότητα και αναληθή αποτελέσματα. Δεν πρέπει να παραμείνει κανένα ίχνος κόκκινης χρωστικής.*
- **Μετρήστε την ραδιενέργεια** των σωληναρίων.

## 7. ΥΠΟΛΟΓΙΣΜΟΣ ΤΩΝ ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΩΝ

Υπολογίστε τις μέσες καθαρές μετρήσεις για κάθε ομάδα σωληναρίων. Υπολογίστε τον λόγο B/T για κάθε βαθμονομητή και άγνωστο δείγμα ως εξής:

$$B/T\% = \frac{\text{Μέση μέτρηση βαθμονομητή ή δείγματος}}{\text{Μέση μέτρηση συνολικής δραστηριότητας}} \times 100$$

Σχεδιάστε την γραφική παράσταση των log-log συντεταγμένων του εκατοστιαίου μέσου όρου που υπολογίστηκε για κάθε βαθμονομητή στον άξονα των τεταγμένων (άξονας Y), σε συνάρτηση με την συγκέντρωση της ανθρώπινης GH, που εκφράζεται σε μIU/mL ή ng/mL, στον άξονα των τεταγμένων (άξονας X). Επιτυγχάνεται έτσι η καμπύλη βαθμονόμησης (Εικ.1). Διαβάστε την συγκέντρωση της ανθρώπινης GH κάθε δείγματος, που εκφράζεται σε μIU/mL ή ng/mL, κατευθείαν από την καμπύλη βαθμονόμησης. Εάν πρόκειται για αραιωμένο δείγμα, πρέπει να πολλαπλασιάσετε την τιμή της συγκέντρωσης της ανθρώπινης GH που προέρχεται από το αραιωμένο δείγμα με τον παράγοντα αραιώσης.

### Παράδειγμα υπολογισμού (διαδικασία A)

Τα παρακάτω στοιχεία πρέπει να λαμβάνονται υπόψη ως απλό παράδειγμα και να μην χρησιμοποιούνται αντί των στοιχείων που διαθέτει ο χρήστης.

Περιγραφή	cpm	B/T%
Συνολική δραστηριότητα	112.199	100
Μηδενικός βαθμονομητής	23	0,02
1,5 μIU/mL - 0,5 ng/mL	891	0,79
4,5 μIU/mL - 1,5 ng/mL	2.861	2,55
9 μIU/mL - 3 ng/mL	5.598	4,99
24 μIU/mL - 8 ng/mL	13.308	11,86
60 μIU/mL - 20 ng/mL	29.546	26,33
150 μIU/mL - 50 ng/mL	59.715	53,22
Δείγμα	3.636	3,24

Με γραμμική παρεμβολή από την καμπύλη βαθμονόμησης, βρίσκουμε ότι το δείγμα περιέχει 5,76  $\mu\text{IU/mL}$  (1,92  $\text{ng/mL}$ ) ανθρώπινης GH.

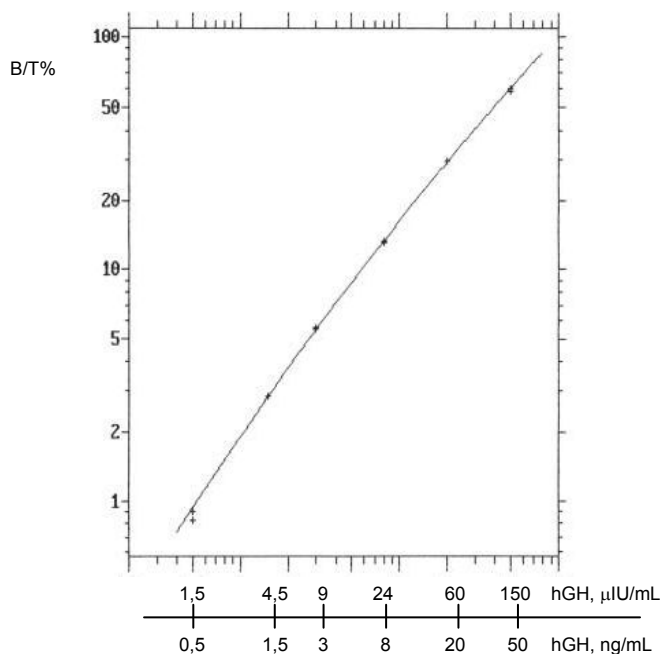


Fig. 1

## 8. ANAMENOMENES TIMES

Δεδομένου ότι η έκκριση της ανθρώπινης GH δεν είναι πάντοτε η ίδια, ούτε στο ίδιο άτομο ούτε μεταξύ διαφορετικών ατόμων, όπως αναφέρεται στην βιβλιογραφία, η βασική δοκιμασία θεωρείται μειωμένης διαγνωστικής αξίας και προτιμούνται οι εκτιμήσεις που βασίζονται στην απάντηση της ανθρώπινης GH σε δοκιμασίες πρόκλησης.

Παρ' όλα αυτά, πρέπει να λαμβάνεται υπόψη ότι οι τιμές αναφοράς της βασικής δοκιμασίας, που αναφέρονται παρακάτω, είναι καθαρά ενδεικτικές. Κάθε εργαστήριο πρέπει να καθορίσει τις δικές του μεθόδους εκτίμησης και το εύρος αναφοράς.

Ατομα	ανθρώπινη GH, $\mu\text{IU/mL}$	ανθρώπινη GH, $\text{ng/mL}$
Προεφηβική ηλικία	0,0 - 4,0	0,0 - 1,3
Εφηβική ηλικία: Άντρες	0,0 - 10,0	0,0 - 3,3
Γυναίκες	0,0 - 30,0	0,0 - 10,0
Ενήλικες: Άντρες	0,0 - 14,0	0,0 - 4,7
Γυναίκες	0,0 - 32,0	0,0 - 10,7

## 9. ΕΙΔΙΚΑ ΧΑΡΑΚΤΗΡΙΣΤΙΚΑ ΑΠΟΔΟΣΗΣ

**9.1** Ως αναλυτική εξειδίκευση ορίζεται η ικανότητα του προσδιορισμού να εντοπίζει με ακρίβεια μία συγκεκριμένη αναλυόμενη ουσία, υπό την παρουσία παραγόντων που ενδεχομένως παρεμβάλλονται στο στρώμα του δείγματος (π.χ. αντιπηκτικά, αιμόλυση, αποτελέσματα επεξεργασίας δείγματος) ή αναλυόμενες ουσίες που προκαλούν διασταυρούμενη αντίδραση.

**Παρεμβολή.** Ελεγχόμενες μελέτες ουσιών ή συνθηκών που ενδεχομένως να παρεμβάλλονται στα αποτελέσματα έδειξαν ότι η απόδοση του προσδιορισμού δεν επηρεάζεται από την παρουσία αντιπηκτικών (κιτρικό, EDTA, ηπαρίνη), αιμόλυσης (μέχρι 200  $\text{mg/dL}$  αιμοσφαιρίνη), λιπαιμίας (μέχρι 500  $\text{mg/dL}$  τριγλυκερίδια), χολερυθριναιμίας (μέχρι 20  $\text{mg/dL}$  χολερυθρίνη).

**Διασταυρούμενες αντιδράσεις.** Η συγκεκριμένη σειρά αντιδραστηρίων αναγνωρίζει τις δύο διαφορετικές μονομερείς μορφές της ανθρώπινης GH (M.B. 20.000 και 22.000 daltons). Η εξειδίκευση υπολογίστηκε ως η εμφανής συγκέντρωση της ανθρώπινης GH που παίρνουμε από τις δοκιμασίες μεγάλων συγκεντρώσεων δυναμικά παρεμβαλλόμενων ορμονών.

Ορμόνη	Συγκέντρωση	Εμφανή επίπεδα ανθρώπινης GH
hPRL	100 mIU/mL 3 <sup>ο</sup> IS 84/500	3,4 μIU/mL (1 ng/mL)
hCG	100 IU/mL 3 <sup>ο</sup> IS 75/537	μη ανιχνεύσιμη
hTSH	1 IU/mL 2 <sup>ο</sup> IRP 80/558	μη ανιχνεύσιμη
hLH	2 IU/mL 1 <sup>ο</sup> IRP 68/40	μη ανιχνεύσιμη
hFSH	2 IU/mL 2 <sup>ο</sup> IRP 78/549	μη ανιχνεύσιμη
hCS	3 μg/mL	μη ανιχνεύσιμη

### 9.2 Αναλυτική ευαισθησία

Η αναλυτική ευαισθησία μπορεί να οριστεί και αυτή ως το όριο ανίχνευσης, δηλαδή το ελάχιστο ποσό μιας συγκεκριμένης αναλυόμενης ουσίας που μπορεί να ανιχνεύσει ο προσδιορισμός. Το όριο ανίχνευσης είναι 0,12 μIU/mL (0,04 ng/mL) σε όριο εμπιστοσύνης 95%. Το όριο αυτό υπολογίστηκε ως η εμφανής συγκέντρωση αναλυόμενης ουσίας που διακρίνεται από μηδενικό βαθμονομητή, δηλαδή δύο τυπικές αποκλίσεις άνω του μηδενός.

### 9.3 Ακρίβεια

Διαφορετικά μείγματα δειγμάτων, που περιέχουν μία συγκεκριμένη αναλυόμενη ουσία σε διαφορετικές συγκεντρώσεις, υποβλήθηκαν σε προσδιορισμό, για τον ορισμό της επαναληψιμότητας και της αναπαραγωγιμότητας του προσδιορισμού (π.χ. διακύμανση εντός και μεταξύ των προσδιορισμών).

Επαναληψιμότητα	A	B	Γ
Αριθμός προσδιορισμών	10	10	10
Μέση τιμή (μIU/mL)	36,80	16,40	3,42
Τυπική απόκλιση	0,68	0,30	0,12
Συντελεστής διακύμανσης (%)	1,9	1,9	3,9

Αναπαραγωγιμότητα	A	B	Γ
Αριθμός προσδιορισμών	10	10	10
Μέση τιμή (μIU/mL)	34,28	15,82	4,02
Τυπική απόκλιση	0,86	0,58	0,16
Συντελεστής διακύμανσης (%)	2,5	3,7	4,1

### 9.4 Πιστότητα

Η πιστότητα του προσδιορισμού ελέγχθηκε με δοκιμή αραιώσης και δοκιμή ανάκτησης.

**Δοκιμή αραιώσης.** Έγινε έλεγχος δύο ορών με υψηλή συγκέντρωση σε ανθρώπινη GH κατόπιν αραιώσης κατά σειρά με μηδενικό βαθμονομητή.

Αραίωση	Αναμενόμενη συγκέντρωση, μIU/mL	Μετρούμενη συγκέντρωση, μIU/mL	% Ανάκτηση
Καθαρή	–	77,40	–
1:2	38,70	37,40	96,6
1:4	19,35	18,60	96,1
1:8	9,68	9,40	97,2
1:16	4,84	4,80	99,2
1:32	2,42	2,40	99,2
Καθαρή	–	44,40	–
1:2	22,20	23,00	103,6
1:4	11,10	10,80	97,3
1:8	5,55	5,40	97,3
1:16	2,78	2,80	100,9
1:32	1,39	1,40	100,9

**Δοκιμή ανάκτησης:** Έγινε έλεγχος δύο ορών που περιείχαν ανθρώπινη GH, ως είχαν και κατόπιν ανάμειξης με αυξανόμενες ποσότητες ανθρώπινης GH.

Προστιθέμενη συγκέντρωση, $\mu\text{IU}/\text{mL}$	Αναμενόμενη συγκέντρωση, $\mu\text{IU}/\text{mL}$	Μετρούμενη συγκέντρωση, $\mu\text{IU}/\text{mL}$	% Ανάκτηση
–	–	33,40	–
50,00	81,74	78,80	96,4
25,00	56,74	54,40	95,9
12,50	44,24	44,60	100,8
6,50	38,24	39,80	104,1
2,10	33,84	34,60	102,3
–	–	13,00	–
50,00	62,36	62,50	100,2
25,00	37,36	38,40	102,8
12,50	24,86	25,00	100,6
6,50	18,86	19,20	101,9
2,10	14,46	14,60	101,0

### 9.5 High-dose hook effect

Όταν δείγματα με ιδιαίτερα υψηλές συγκεντρώσεις αντιγόνων υποβάλλονται σε δοκιμασία με μέθοδο *σάντουιτς* ενός σταδίου, το φαινόμενο που είναι γνωστό ως "high-dose hook effect" μπορεί να μιμηθεί συγκεντρώσεις, που είναι χαμηλότερες από τις πραγματικές. Για να γίνει σωστή ποσοτικοποίηση, τα δείγματα στα οποία τα επίπεδα της ανθρώπινης GH είναι μεγαλύτερα από τον ανώτατο βαθμονομητή πρέπει να αραιώνονται με μηδενικό βαθμονομητή και να επαναλαμβάνεται η δοκιμασία. Κατόπιν τα αποτελέσματα πρέπει να πολλαπλασιάζονται με το ποσοστό αραιώσεως, για να πάρουμε τα επίπεδα των καθαρών δειγμάτων.

Η συσκευασία έχει σχεδιαστεί έτσι ώστε οι δόσεις μέχρι τα 7,5  $\mu\text{IU}/\text{mL}$  (2,50  $\mu\text{g}/\text{mL}$ ) ανθρώπινης GH να παράγουν αναλυτικό σήμα πάνω από τον ανώτατο βαθμονομητή.

### 10. ΠΕΡΙΟΡΙΣΜΟΙ ΤΗΣ ΔΙΑΔΙΚΑΣΙΑΣ

Η διάγνωση δεν πρέπει να γίνεται με βάση τα αποτελέσματα μίας και μοναδικής δοκιμασίας, αλλά θα πρέπει να τεκμηριώνεται από τα κλινικά ευρήματα και άλλες διαγνωστικές διαδικασίες και να συνδυάζεται με την κρίση του γιατρού.

Τα αποτελέσματα του προσδιορισμού μπορεί να επηρεάζονται από τυχόν μικροβιακή μόλυνση ή από τους επαναλαμβανόμενους κύκλους ψύξης-απόψυξης των δειγμάτων.

Η επιδεξιότητα στην χρήση της τεχνικής, καθώς και η πιστή συμμόρφωση με τις οδηγίες χρήσης είναι απαραίτητες για την απόκτηση αξιόπιστων αποτελεσμάτων. Ιδιαίτερα, η ακριβής αναρρόφηση, με ή χωρίς πιπέτα, και η πλήση θεωρούνται βασικής σημασίας.

Μπορεί να προκύψουν αποτελέσματα που δεν αναπαράγονται εξαιτίας μεθοδολογικών παραγόντων, όπως:

- ανταλλαγή στις κάψουλες των φιαλιδίων μεταξύ τους
- χρήση του ίδιου ρύγχους για τις αναλήψεις από διαφορετικά φιαλίδια ή την διανομή διαφορετικών δειγμάτων
- φιαλίδια που έχουν παραμείνει ανοιχτά για μεγάλο χρονικό διάστημα
- έκθεση των αντιδραστηρίων ή των δειγμάτων σε εξαιρετικά υψηλή θερμότητα ή σε ισχυρές πηγές μικροβιακή μόλυνσης
- ανεπαρκής αναρρόφηση του μείγματος επώασης και πλήση των σωληναρίων
- μόλυνση του χείλους των σωληναρίων από τον ιχνηθέτη ή τα δείγματα
- τυχαίες διακυμάνσεις ή ανεπαρκής συντήρηση του μετρητή  $\gamma$ -ακτινοβολίας
- χρήση αντιδραστηρίων από διαφορετικές παρτίδες.

### 11. ΠΡΟΕΙΔΟΠΟΙΗΣΕΙΣ ΚΑΙ ΜΕΤΡΑ ΠΡΟΦΥΛΑΞΗΣ

Τα συστατικά που χρησιμοποιούνται στις δοκιμασίες περιέχουν αζίδιο του νατρίου ως συντηρητικό. Επειδή το αζίδιο του νατρίου μπορεί να δημιουργήσει εκρηκτικό αζίδιο μολύβδου ή χαλκού στα υδραυλικά, συνίσταται οι σωλήνες της αποχέτευσης να ξεπλένονται με μεγάλη ποσότητα νερού μετά την απόρριψη διαλυμάτων που περιέχουν αζίδιο του νατρίου (Οδηγία του Συμβουλίου 99/45/EC).

R 22 - Επιβλαβές κατά την κατάποση.

R 31 - Η επαφή με οξέα απελευθερώνει τοξικά αέρια.

S28 - Μετά την επαφή με το δέρμα, ξεπλύνετε αμέσως με άφθονο νερό.

S45 - Σε περίπτωση ατυχήματος ή εάν αισθανθείτε αδιαθεσία, ζητήστε αμέσως ιατρική συμβουλή (εάν είναι δυνατόν, δείξτε την ετικέτα).

Όλες οι μονάδες ορού ή πλάσματος που χρησιμοποιήθηκαν για την παραγωγή των συστατικών της συσκευασίας έχουν υποβληθεί σε έλεγχο για την παρουσία HBsAg, αντι-HCV, αντι-HIV-1/2 και βρέθηκε ότι δεν αντιδρούν. Επειδή, όμως, καμία μέθοδος δεν διασφαλίζει πλήρως την απουσία παθογόνων παραγόντων, όλα τα δείγματα ανθρώπινης προέλευσης πρέπει να θεωρούνται εν δυνάμει μολυσματικά και, ως εκ τούτου, ο χειρισμός τους να γίνεται με την ανάλογη προσοχή.



## 12. ΠΡΟΦΥΛΑΞΕΙΣ ΑΣΦΑΛΕΙΑΣ

- Μην καπνίζετε, μην πίνετε, μην τρώτε και μην χρησιμοποιείτε καλλυντικά στο εργαστήριο όπου διεξάγονται οι προσδιορισμοί.
- Μην αναρροφάτε με το στόμα.
- Αποφύγετε την άμεση επαφή με όλα τα εν δυνάμει μολυσματικά υλικά και χρησιμοποιείτε προστατευτική ένδυση, όπως εργαστηριακές ποδιές, προστατευτικά γυαλιά και γάντια μίας χρήσης. Πλύνετε με μεγάλη προσοχή τα χέρια σας μετά το πέρας κάθε προσδιορισμού.
- Αποφύγετε την διάχυση σταγόνων ή την δημιουργία αερολύματος στο χώρο. Τυχόν διαρροές από τα αντιδραστήρια πρέπει να ξεπλένονται με διάλυμα υποχλωριώδους νατρίου 5% και να απορρίπτονται ως εν δυνάμει μολυσματικές.
- Όλα τα δείγματα, τα βιολογικά αντιδραστήρια και τα υλικά που χρησιμοποιούνται στον προσδιορισμό πρέπει να θεωρούνται εν δυνάμει μολυσματικά. Θα πρέπει συνεπώς η διάθεσή κι απόρριψή τους να γίνεται σύμφωνα με τους ισχύοντες κανόνες και τις προδιαγραφές των φορέων που είναι αρμόδιοι για το εργαστήριο, καθώς και με την νομοθεσία της κάθε Χώρας. Τα υλικά μίας χρήσης πρέπει να αποτεφρώνονται. Τα υγρά απόβλητα πρέπει να απολυμαίνονται με διάλυμα υποχλωριώδους νατρίου τελικής συγκέντρωσης 5% για μισή ώρα τουλάχιστον. Όσα υλικά πρόκειται να επαναχρησιμοποιηθούν πρέπει να αποστειρώνονται σε αυτόκαυστο (μέθοδος *overkill*) (USP 24, 2000, p. 2143). Επαρκής θεωρείται η αποστείρωση που γίνεται στους 121°C για μία ώρα τουλάχιστον. Ωστόσο, οι χρήστες πρέπει να ελέγχουν την αποτελεσματικότητα του απολυμαντικού κύκλου, αξιολογώντας αρχικά την επάρκεια του και κάνοντας τακτική χρήση βιολογικών δεικτών.

## 13. ΒΑΣΙΚΟΙ ΚΑΝΟΝΕΣ ΡΑΔΙΟΛΟΓΙΚΗΣ ΑΣΦΑΛΕΙΑΣ

### Αντιδραστήρια που περιέχουν ιώδιο 125

Το κιτ αυτό περιέχει ραδιενεργό υλικό το οποίο δεν υπερβαίνει τα 8,85 μCi (328 kBq) σε ιώδιο 125. Κατά τη φύλαξη, το χειρισμό και τη διάθεση του υλικού αυτού, θα πρέπει να χρησιμοποιούνται κατάλληλες προφυλάξεις και καλές εργαστηριακές πρακτικές.

Προς ιατρούς ή ιδρύματα που παραλαμβάνουν ραδιοϊσότοπα κάτω από γενική άδεια:

Το παρόν ραδιενεργό υλικό μπορεί να ληφθεί, να αποκτηθεί, να κατέχεται και να χρησιμοποιείται μόνο από ιατρούς, κτηνίατρος που εξασκούν κτηνιατρική ιατρική, κλινικά εργαστήρια ή νοσοκομεία και μόνο για κλινικές ή εργαστηριακές δοκιμές *in vitro* που δεν περιλαμβάνουν την εσωτερική ή εξωτερική χορήγηση του υλικού, ή της ακτινοβολίας αυτού, σε ανθρώπους και ζώα. Η παραλαβή, η απόκτηση, η κατοχή, η χρήση και η μεταφορά υπόκεινται στους κανονισμούς και τη γενική άδεια της Ρυθμιστικής Επιτροπής Πυρηνικών των Η.Π.Α. (NRC) της πολιτείας στην οποία η επιτροπή έχει συνάψει συμφωνία για την άσκηση καθηκόντων αρμόδιας αρχής.

1. Η φύλαξη του ραδιενεργού υλικού θα πρέπει να περιοριστεί σε ειδικά επισημασμένο χώρο.
2. Η πρόσβαση σε ραδιενεργά υλικά πρέπει να περιοριστεί μόνο σε εξουσιοδοτημένο προσωπικό.
3. Μη χρησιμοποιείτε πιπέτα με το στόμα σε ραδιενεργά διαλύματα.
4. Μην τρώτε ή πίνετε εντός των χώρων εργασίας που έχουν επισημανθεί ως ραδιενεργοί.
5. Οι περιοχές, όπου ενδεχομένως έχουν προκληθεί εκχύσεις, θα πρέπει να σκουπιστούν και κατόπιν να πλυθούν με αλκαλικό απορρυπαντικό ή ραδιολογικό απολυμαντικό διάλυμα. Τυχόν υάλινα σκεύη που χρησιμοποιήθηκαν πρέπει να εκπλυθούν καλά με νερό πριν από την πλύση άλλων εργαστηριακών υάλινων σκευών.

Προς ιατρούς ή ιδρύματα που παραλαμβάνουν ραδιοϊσότοπα κάτω από ειδική άδεια:

Η παραλαβή, η χρήση, η μεταφορά και η διάθεση των ραδιενεργών υλικών υπόκεινται στους κανονισμούς και τις συνθήκες της ειδικής άδειάς σας.

**ΠΡΟΣΟΧΗ:** Η ραδιενέργεια που αναγράφεται στο ένθετο συσκευασίας μπορεί να διαφέρει ελαφρώς από τη ραδιενέργεια που αναγράφεται στην ετικέτα συσκευασίας ή στην ετικέτα φιαλιδίου ιχνηθέτη. Η ετικέτα συσκευασίας και η ετικέτα φιαλιδίου ιχνηθέτη υποδεικνύουν την πραγματική ποσότητα ραδιενέργειας κατά την ημερομηνία βαθμονόμησης, ενώ το ένθετο συσκευασίας υποδεικνύει τη θεωρητική ραδιενέργεια του κιτ.

### ΣΧΗΜΑ ΠΡΟΣΔΙΟΡΙΣΜΟΥ

- 1 - ΑΝΑΣΥΣΤΗΣΑΤΕ ΤΟΝ ΟΡΟ ΕΛΕΓΧΟΥ.
- 2 - ΣΗΜΕΙΩΣΤΕ ΤΑ ΕΠΙΚΑΛΥΜΜΕΝΑ ΣΩΛΗΝΑΡΙΑ ΕΙΣ ΔΙΠΛΟΥΝ.
- 3 - ΔΙΑΝΕΙΜΕΤΕ ΤΑ ΑΝΤΙΔΡΑΣΤΗΡΙΑ ΣΥΜΦΩΝΑ ΜΕ ΤΟ ΠΑΡΑΚΑΤΩ ΣΧΗΜΑ ΚΑΙ ΑΝΑΜΕΙΞΑΤΕ ΤΟ ΜΕΙΓΜΑ ΕΠΩΑΣΗΣ:

ΑΝΤΙΔΡΑΣΤΗΡΙΑ \ ΣΩΛΗΝΑΡΙΑ	ΒΑΘ 0-6	ΔΕΙΓΜΑΤΑ
ΒΑΘΜΟΝΟΜΗΤΕΣ	50 $\mu$ L	–
ΔΕΙΓΜΑΤΑ	–	50 $\mu$ L
ΙΧΝΗΘΕΤΗΣ	100 $\mu$ L	100 $\mu$ L

- 4 - ΠΡΑΓΜΑΤΟΠΟΙΗΣΤΕ ΕΠΩΑΣΗ ΓΙΑ :
  - 90 ΛΕΠΤΑ ΣΕ ΘΕΡΜΟΚΡΑΣΙΑ ΔΩΜΑΤΙΟΥ ΕΝΩ ΑΝΑΚΙΝΕΙΤΕ (Διαδικασία Α)
  - ΟΛΟΚΛΗΡΗ ΤΗΝ ΝΥΧΤΑ ΣΕ ΘΕΡΜΟΚΡΑΣΙΑ ΔΩΜΑΤΙΟΥ (Διαδικασία Β).
- 5 - ΑΝΑΡΡΟΦΗΣΤΕ ΤΟ ΜΕΙΓΜΑ ΕΠΩΑΣΗΣ ΚΑΙ ΞΕΠΛΥΝΕΤΕ ΔΥΟ ΦΟΡΕΣ ΜΕ 2  $\mu$ L ΡΥΘΜΙΣΤΙΚΟ ΔΙΑΛΥΜΑ ΠΛΥΣΗΣ.
- 6 - ΜΕΤΡΗΣΤΕ ΤΗΝ ΡΑΔΙΕΝΕΡΓΕΙΑ ΤΩΝ ΣΩΛΗΝΑΡΙΩΝ.

## REFERENCES/BIBLIOGRAFIA/BIBLOGRAPHIE/LITERATUR/BIBLIOGRAFÍA/REFERÊNCIAS/IRODALOM/ ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ

- R.L. ABRAMS et al.  
Hypothalamic regulation of growth hormone secretion.  
J. Clin. Invest., **43** : 1242 (1964).
- G. BANFI, M. MARINELLI, M. PONTILLO, P. BONINI  
Standardisation with synthetic 22-kDa monomer human growth hormone reduces discrepancies between two monoclonal immunoradiometric assay kits.  
Clin. Chem., **38** (10) : 2107-2110 (1992).
- R. BOUILLON, P. DE MOOR  
Heterogeneity of human growth hormone in serum.  
Ann. Endocr., **35** : 606 (1974).
- A.C. CELNIKER, A.B. CHEN, R.M. WERT Jr., B.M. SHERMAN  
Variability in the quantitation of circulating growth hormone using commercial immunoassays.  
J. Clin. Endocrinol. Metab., **68** : 469-475 (1989).
- W.H. DAUGHADAY  
The adenohipophys. In: «Textbook of endocrinology», R.H. Williams ed., W.B. Saunders, Philadelphia, p. 73 (1981).
- E. GHIGO et al.  
Growth hormone-releasing activity of hexarelin, a new synthetic hexapeptide, after intravenous, subcutaneous, intranasal, and oral administration in man.  
J. Clin. Endocrinol. Metab., **78** : 693-698 (1994).
- W.M. HUNTER  
Growth hormone. In: «Hormone assays and their clinical application», J.A. Loraine, E.T. Bell eds., Churchill Livingstone, Edinburgh, p. 221 (1976).
- U.J. LEWIS et al.  
Human growth hormone: a complex of proteins.  
Rec. Progr. Horm. Res., **36** : 477 (1980).
- C.H. LI  
Human growth hormone: perspectives on its chemistry and physiology.  
In: «Advances in human growth hormone research», S. Raiti ed., U.S. Department of Health, Education and Welfare Publ., DHEW publ. no. (NIH) 74-612, p. 321 (1974).
- G.M. MOLINATTI et al.  
Radioimmunoassay of human growth hormone.  
J. Nucl. Biol. Med., **13** : 26 (1968).
- G.T. PEAKE, J. MORRIS, M.T. BUCKMAN  
Growth hormone. In: «Methods of hormone radioimmunoassay», B.M. Jaffe, H.R. Behrman eds., Academic Press, New York, p. 223 (1979).
- E. SCHAFF-BASS et al.  
Advances in diagnosis and treatment of short stature with special reference to the role of growth hormone.  
J. Pediatr., **104** : 801 (1984).
- B.T. TRUDD  
Growth, growth hormone and the somatomedins: a historical perspective and current concepts.  
Ann. Clin. Biochem., **28** : 542-555 (1991).



DiaSorin Inc.  
1951 Northwestern Avenue  
P.O. Box 285  
Stillwater, MN 55082-0285 U.S.A.  
Phone: 651-439-9710  
FAX: 651-351-5669

APM0133



DiaSorin S.p.A.,  
13040 Saluggia (VC) Italy

34663 7/10