

Artículo original

**VALIDACIÓN DE LOS KITS COMERCIALES PARA LA DETERMINACIÓN DE
HORMONA DE CRECIMIENTO HUMANA**

**Deamelys Hernández Domínguez, Taimí Fiallo, Margarita Teresa Correa Vidal,
Mario Granda Fraga.**

Laboratorio Antidoping de la Habana avlopez43@inder.cu

RESUMEN

La hormona de crecimiento (GH) es un péptido de 191 aminoácidos secretada por la hipófisis la cual está vinculada al proceso de crecimiento de los tejidos. Desde el año 2000 se encuentra en el listado de sustancias prohibidas en el deporte por la Agencia Mundial Antidopaje (AMA) por ser utilizada de forma ilegal para mejorar el rendimiento deportivo.

En el presente artículo se muestran los resultados de la validación de un inmunoensayo tipo sandwich (Kits comerciales) que se basa en la diferenciación y cuantificación de las isoformas 22kDa y 20kDa. Para esto se procesaron 12 muestras de suero y se evaluó la precisión del método con los controles positivos estudiando la repetibilidad intra e inter ensayos.

Calle 100 y Aldabó

Boyerros. CP 10 800.

La Habana, Cuba.

Dirección del Autor: 5^{ta}A # 8610 / 86 y 88.

Teléfono: 053586029

Validación de los Kits Comerciales para la Determinación de Hormona de Crecimiento Humana

Deamelys Hernández Domínguez, Taimí Fiallo, Margarita Teresa Correa Vidal, Mario Granda Fraga

Los kits mostraron valores de repetibilidad intra- ensayo para el Kit 1 fue pit GH CV% = 4.59 y rec GH CV% = 6.40, para el Kit 2 pit GH CV% = 3.58 y rec GH CV% = 2.95. La repetibilidad inter- ensayo para el Kit 1 pit GH CV% = 8.51 y rec GH CV% = 8.31, para el Kit 2 pit GH CV% = 9.02 y rec GH CV% = 4.02. La linealidad para rec GH y pit GH fue de $r^2 = 0.992$ y $r^2 = 0.999$ respectivamente en el Kit1, para el Kit 2 se obtuvieron $r^2 = 0.995$ y $r^2 = 0.996$ para la rec GH y pit GH respectivamente. La incertidumbre del método para el Kit 1 y 2 fueron de 14.71% y 12.34% y la incertidumbre expandida fue de 29.42% y 24.68%.

ABSTRACT

Growth hormone (GH) is a peptide of 191 amino acids secreted in a pulsatile pattern by the pituitary gland, which is released to the tissue's growth process. Since 2000 is established in the Prohibited List banned substance because is useful utilized by performance-enhancing.

In this paper was showed the result of the validation of an immunoassay method type sandwich (commercial Kits). These Kits are based in the differentiation and quantification of the isoforms 22 and 20 kDa. By this were analyzed 12 samples. The precision was evaluated with positive controls studying the repeatability intra and inter – assay.

The Kits showed a repeatability intra- assay for Kit 1 was pit GH CV% = 4.59 and rec GH CV% = 6.40, by Kit 2 pit GH CV% = 3.58 and rec GH CV% = 2.95. Repeatability inter-assay by Kit 1 pit GH CV% = 8.51 and rec GH CV% = 8.31, by Kit 2 pit GH CV% = 9.02 and rec GH CV% = 4.02. Linearity by rec GH and pit

Validación de los Kits Comerciales para la Determinación de Hormona de Crecimiento Humana

Deamelys Hernández Domínguez, Taimí Fiallo, Margarita Teresa Correa Vidal, Mario Granda Fraga

GH has a $r^2 = 0.992$ and $r^2 = 0.999$ respectively in Kit 1, by Kit 2 was obtained a $r^2 = 0.995$ and $r^2 = 0.996$ by rec GH and pit GH respectively. The method uncertainties by Kit 1 and 2 were 14.71% and 12.34%. The expanded uncertainties were 29.42% and 24.68%.

INTRODUCCIÓN

La hormona del crecimiento (GH), también llamada somatotropina, es un Polipéptido de 191 aminoácidos sintetizado, almacenado y secretado de forma pulsátil por el lóbulo anterior de la hipófisis⁽¹⁾. La GH pituitaria (pit GH) está compuesta por varias isoformas moleculares; 22kDa (40 – 50%); 20kDa (7 – 8%) y dímeros de estas isoformas (20 – 30%). Mientras que GH recombinante (rec GH) se compone solamente de la isoforma de 22kDa⁽²⁾.

La función de la GH en el organismo humano está íntimamente unida tanto al proceso de crecimiento de los tejidos como al metabolismo de los carbohidratos, lípidos y proteínas. Niveles fisiológicos de GH estimulan la lipólisis y la síntesis de proteínas, inhiben la utilización de la glucosa, y favorecen el crecimiento tisular vía retención de nitrógeno y aumento del transporte de aminoácidos hacia el interior de los tejidos. Estas razones han llevado al deportista al uso ilegal de preparaciones recombinantes de la hormona (recGH) obtenidas por ingeniería genética, con el propósito de mejorar su rendimiento deportivo^(2, 3). Entre los riesgos para la salud del atleta asociados a su abuso destacan el gigantismo, y la acromegalia.

Validación de los Kits Comerciales para la Determinación de Hormona de Crecimiento Humana

Deamelys Hernández Domínguez, Taimí Fiallo, Margarita Teresa Correa Vidal, Mario Granda Fraga

Es así que desde el año 2000 esta hormona se encuentra en la lista de sustancias prohibidas que anualmente emite la Agencia Mundial Antidopaje (AMA)^(1, 4).

En la búsqueda de métodos cada vez más sensibles para detectar GH debido a las bajas concentraciones en la que se encuentra esta hormona en el organismo se han desarrollado métodos de inmunoensayos inmunofuncionales(IFA)⁽⁵⁾ como son: ensayos, inmunoradiométricos (IRMA), inmunofluorométricos (IFMA) e inmunoquimioluminiméticos(ICMA) usando un anticuerpo conjugado a un compuesto marcado isotópicamente, fluorescente o quimioluminiscente respectivamente⁽⁶⁻⁸⁾.

En la actualidad las investigaciones se desarrollan es el uso de técnicas de inmunoensayos combinadas con la espectrometría de masas, ya que las técnicas de inmunoensayos pueden presentar reacciones cruzadas con otras proteínas, mientras que la espectrometría permite obtener información estructural característica para cada proteína⁽⁹⁾.

Los métodos antes mencionados permiten determinar y cuantificar la hormona pero debido al carácter pulsátil de su secreción y a que su concentración en el organismo varía de un individuo a otro dependiendo de la hora del día y de la edad, etc, no se hace posible establecer una concentración que discrimine entre un valor de concentración endógeno o un abuso de esta hormona. Además la rec GH (22kDa) tiene la misma secuencia aminoacídica que la pit

Validación de los Kits Comerciales para la Determinación de Hormona de Crecimiento Humana

Deamelys Hernández Domínguez, Taimí Fiallo, Margarita Teresa Correa Vidal, Mario Granda Fraga

GH (20kDa) lo que llevo a los científicos a desarrollar un método discriminación que se basara en la relación entre las isoformas de la GH.

Con el objetivo de armonizar los resultados en la determinación de la recGH, AMA ha sugerido a los laboratorios acreditados que implementen y validen un método automatizado, comercialmente disponible, que ofrece el resultado en 6h de trabajo para 15 muestras.

Este inmunoensayo diferencial tipo sandwich cuantifica, en suero, y en un mismo ensayo la pit GH (20kDa) y la rec GH (22kDa), utilizando unos Kits (Kit 1 y 2, productos certificados por CMZ service, CMZ- assayGmbH, Am Dianaplatz 3, D13469 Berlín). Se utilizan tubos recubiertos con anticuerpos monoclonales cuya función es capturar de forma específica ya sea la isoforma de 22 kDa o la isoforma de 20kDa. Se determina la relación entre las diferentes isoformas rec GH/ pit GH, según lo establece AMA y se considera una muestra positiva cuando la relación es mayor de 1.81 para los hombres y de 1.46 para las mujeres utilizando el Kit 1. Si se utiliza el Kit 2 los valores serian de 1.68 y 1.55 para el sexo masculino y femenino respectivamente.

El objetivo de este trabajo es validar los Kits (Kit1, Kit2) comerciales que se usan en el laboratorio antidoping de Cuba para la determinación de GH en muestras de suero humano. Para esto se evaluó la repetibilidad, la linealidad y las incertidumbres de los Kits.

Validación de los Kits Comerciales para la Determinación de Hormona de Crecimiento Humana

Deamelys Hernández Domínguez, Taimí Fiallo, Margarita Teresa Correa Vidal, Mario Granda Fraga

MATERIALES Y MÉTODOS

Reactivos y Equipamiento

- Agua desionizada
- CMZ Kit1
- CMZ Kit2
- Luminómetro (Berthold)
- Agitador (IKA KS 260 basic)

Preparación de las muestras

- Mezclar en los tubos de análisis 50µL de calibradores, controles y muestra (previamente atemperados) con 150µL de tampón S.
- Incubar por 2h a temperatura ambiente (TA)
- Lavar con el tampón de lavado
- Anadir 200µL del anticuerpo revelador e incubar por 2h a TA protegido de la luz.
- Repetir pasos de lavados.
- Lectura en luminómetro de la luminiscencia emitida
- Cálculo e interpretación de los resultados.

Validación de los Kits Comerciales para la Determinación de Hormona de Crecimiento Humana

Deamelys Hernández Domínguez, Taimí Fiallo, Margarita Teresa Correa Vidal, Mario Granda Fraga

Validación

El ensayo de repetibilidad intra-ensayo se realizó procesando en la misma corrida 16 tubos para cada control positivo con valores de concentración conocidos: rec GH (4.14 ng/mL) y pit GH (1.30ng/mL), utilizando el kit 1 y kit 2.

El ensayo de repetibilidad inter-ensayo se realizó procesando en cinco días diferentes muestras duplicadas de los controles rec GH (4.14 ng/mL) y pit GH (1.30ng/mL), para un total de 10 replicas durante los cinco días utilizando ambos kit (kit1 y kit2).El criterio de aceptación para la repetibilidad intra e inter ensayo es de un coeficiente de variación (CV) inferior al 15%.

La linealidad del método se evaluó con ambos kits utilizando una curva de 8 estándares en un rango de concentraciones entre: 0-50 ng/mL tanto para la pit GH como para la recGH. El criterio de aceptación es que un ajuste lineal de la curva presente un coeficiente de determinación mayor a 0.99 ($r^2 > 0.99$).

La incertidumbre (UM) y la UM expandida ($2 \cdot UM$) se calcularon según las especificaciones de la AMA, para una distribución t-student y un nivel de confianza de 95%.

Validación de los Kits Comerciales para la Determinación de Hormona de Crecimiento Humana

Deamelys Hernández Domínguez, Taimí Fiallo, Margarita Teresa Correa Vidal, Mario Granda Fraga

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Ambos Kits fueron validados y los parámetros analíticos analizados cumplieron con los criterios de aceptación exigidos por la AMA. La repetibilidad para ambos Kits y hormonas se muestran en la Tabla 1. Las respuestas de ambos Kits para rec GH y pit GH fueron lineales en el rango de concentraciones estudiados Figura 1 y 2 siendo para rec GH y pitGH $r^2 = 0.992$ y $r^2 = 0.999$ respectivamente en el Kit 1, para el Kit 2 se obtuvieron $r^2 = 0.995$ y $r^2 = 0.996$ para rec GH y pitGH respectivamente. La UM en la determinación de la concentración para el Kit 1 y Kit 2 fue de 14.71% y 12.34% y UM expandida fue de 29.42% y 24.68%.

Con la presente investigación quedaron validados los Kits comerciales que sugiere la AMA para la determinación de una administración de hormona de crecimiento recombinante. Los parámetros analíticos repetibilidad y linealidad estuvieron conformes con los criterios de aceptación. Los valores de UM y UM expandida estuvieron alrededor del 20% estos valores pueden variar cuando aumente el número de ensayos hechos en el laboratorio y se recalcule la UM.

Tabla 2. Ensayo de repetibilidad para ambos kits.

Repetibilidad	Kit 1	Kit 2
Intra-ensayo	pitGH CV% = 4.59	pitGH CV% = 3.58
	recGH CV% = 6.40	recGH CV% = 2.95
Inter-ensayo	pitGH CV% = 8.51	pitGH CV% = 9.02
	recGH CV% = 8.31	recGH CV% = 4.02

Validación de los Kits Comerciales para la Determinación de Hormona de Crecimiento Humana

Deamelys Hernández Domínguez, Taimí Fiallo, Margarita Teresa Correa Vidal, Mario Granda Fraga

Figura1. Curvas de calibración para las recGH (izquierda) y pitGH (derecha) utilizando el Kit 1.

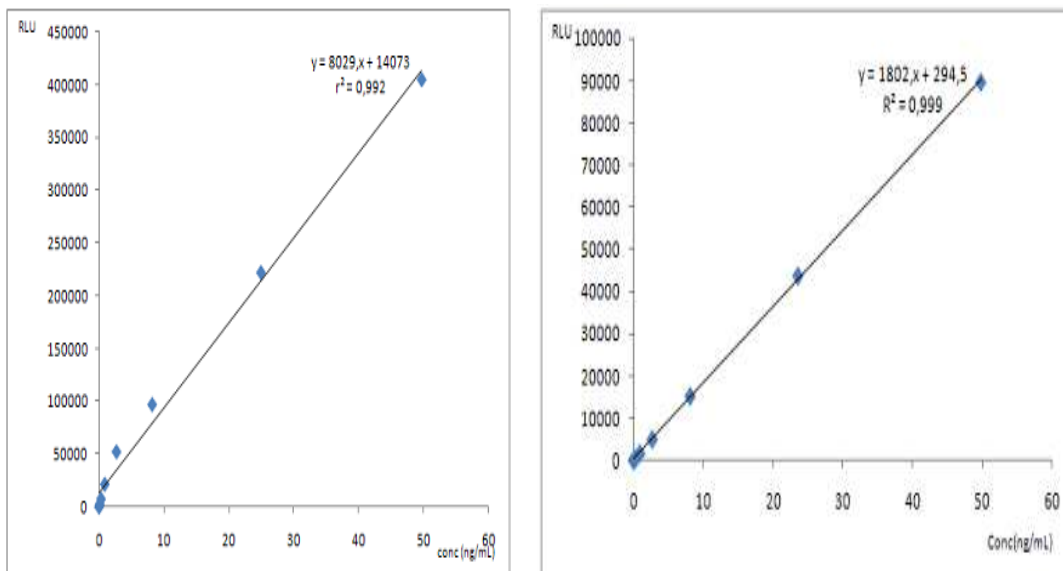
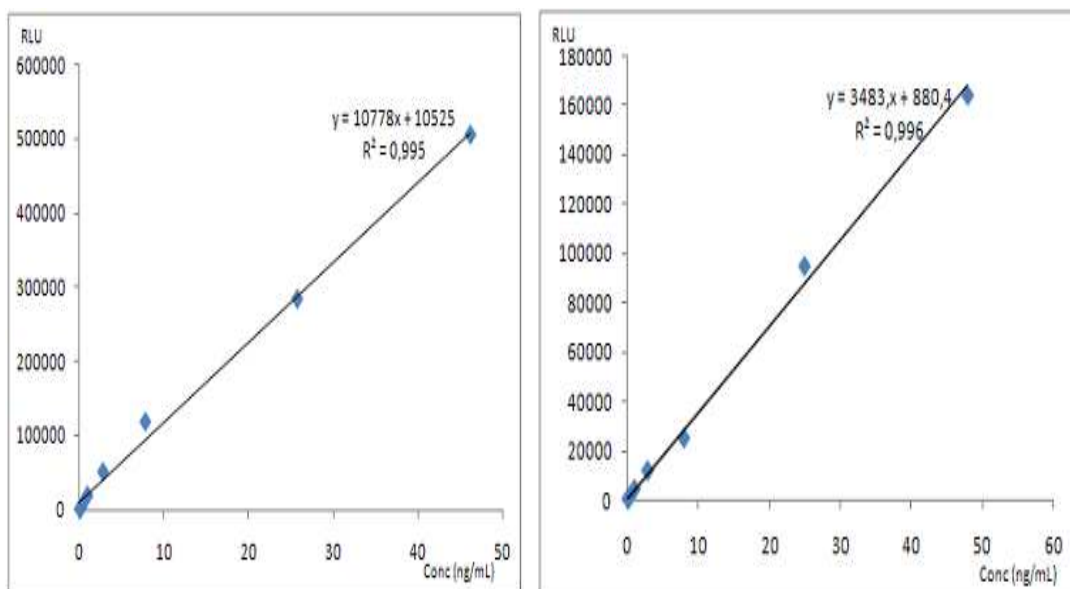


Figura 2: Curvas de calibración para las rec GH (izquierda) y pitGH (derecha) utilizando el Kit 2.



Validación de los Kits Comerciales para la Determinación de Hormona de Crecimiento Humana

Deamelys Hernández Domínguez, Taimí Fiallo, Margarita Teresa Correa Vidal, Mario Granda Fraga

BIBLIOGRAFÍA

1. Osquel Barroso, Patrick Schamasch, Olivier Rabin. Detection of GH abuse in sport: Past, present and future. *Growth Hormone & IGF Research* 2009, 19: 369–374.
2. Rosen CJ. Growth hormone and aging. *Endocrine* 2000, 12: 197- 201.
3. Kelly PA, Djiane J, Postel- Vinay M- C, Edery M. The prolactin/ growthhormone receptor family. *Endocrinol Rev* 1991, 12: 235- 251.
4. Hartman ML, Faria ACS, Vance ML, Johnson ML, Thorner MO, Veldhuis JD. Temporal structure of in vivo growth hormone secretory events in humans. *AmJPhysiol*1991. 260: E101- E110.
5. Strasburger C.J. Methods in determining growth hormone concentrations: an immunofunctional assay. *Pediatrics*. 1999;104(4):1024–1028.
6. Miles L.E, Hales C.N. Immunoradiometric assay of human growth hormone. *Lancet*. 1968;2(7566):492–493.
7. Albertsson-Wikland K, Jansson C, Rosberg S, Novamo A. Time-resolved immunofluorometric assay of human growth hormone. *Clin Chem*.1993;39 (8):1620–1625.
8. Iranmanesh A, Grisso B, Veldhuis J.D. Low basal and persistent pulsatile growth hormone secretion are revealed in normal and hyposomatotropic men studied with a new ultrasensitive chemiluminescence assay. *J ClinEndocrinolMetab*. 1994; 78 (3): 526–535.
9. Yang. S, Zhang. C, Cai. Y, Qian. X, Wu, M. The Potential Molecular Marker InDistinguishing Exogenous Recombinant Human Growth

Validación de los Kits Comerciales para la Determinación de Hormona de Crecimiento Humana

Deamelys Hernández Domínguez, Taimí Fiallo, Margarita Teresa Correa Vidal, Mario Granda Fraga

Hormone Using MALDI-TOF-MS/MS. Recent Advances in Doping Analysis 2009; 17: 447- 450.