

Anti-hTPO [¹²⁵I] RIA készlet (REF: RK-36CT)

Az anti-TPO [¹²⁵I] RIA készlet a thyreoidea-peroxidáz (TPO) enzim elleni auto-antitestek direkt mennyiségi meghatározására szolgál humán szérumban. A készlet 100 meghatározásra elegendő reagenst tartalmaz, amellyel két párhuzamos mérés esetén, 20 µl térfogatból 42 szérumb-minta anti-TPO koncentrációja határozható meg, a 0-1900 IU/ml mérési tartományban.

Bevezetés

A TPO hem proszitetikus csoportot tartalmazó, kb. 105 kDa molekulatömegű glikoprotein enzim. A pajzsmirigy-hormonok többlépcsős bioszintézisének kulcs-enzime, amely az anorganikus jódnak szerves molekulába való beépüléséhez szükséges oxidatív reakciót katalizálja.

A pajzsmirigy-betegségek leggyakoribb kóroki tényezői különböző auto-immun mechanizmusok, ezért az ezekkel kapcsolatos antitestek (anti-thyreoglobulin, az anti-TPO, és az anti-TSH-receptor) meghatározása kiemelkedő diagnosztikai jelentőségű.

Anti-TPO auto-antitestek kimutathatók minden auto-immun eredetű pajzsmirigy-betegségben, sőt, néha még egészséges egyénekben is. Koncentrációjuk igen magas Hashimoto tireoiditiszben, idiopathiás mixodémában, és idoskori krónikus atrófiás tireoiditiszben.

TPO auto-antitestek kimutathatók a kezeletlen Graves kóros betegek jelentős hányadában is.

Az emelkedett anti-TPO szint fontos korai indikátora a későbbi tireoiditiszeknek, így az első trimeszteri terhességben a posztpartum tireoiditisznek, vagy a familiáris auto-immun tireoiditisznek, és kiegészítő módszerként számításba jöhet az egyéb auto-immun megbetegedések (diabetes mellitus, Addison-kór, anaemia perniciosa) diagnosztikájában is. Anti-TPO antitestek előfordulhatnak a pajzsmirigy daganatos megbetegedéseiben, így pajzsmirigy adenomában, és pajzsmirigy karcinómában is.

A mérés elve

A mérokészlet a szilárd fázisú radioimmunoassay (RIA) működési elvét alkalmazza. A mintában lévő anti-TPO és a mintához adott biotinált anti-TPO vetélkedik a rendszerben állandó mennyiségben jelen lévő ¹²⁵I-dal jelzett TPO kötohelyeiért. A sztreptavidinnel bevont cső az inkubálás alatt megköti a biotinált antitestet. A vetélkedés eredményeképp a cső felületén kötött radioaktivitás fordítottan arányos a minta anti-TPO koncentrációjával.

A standardok relatív kötésiértékei és koncentrációi ismeretében szerkesztett mérő-(standard)-görbéről, a minták relatív kötésiértékei alapján, azok anti-TPO koncentrációja meghatározható.

A készlet tartalma

1. 1 flakon ¹²⁵I-TRACER, liofilizált. Radioaktivitása <260kBq, 0,1 % nátrium-azidot és piros szinezéket tartalmaz. Rekonstituálandó 11 ml desztillált vízzel.

2. 1 flakon ANTISZÉRUM, felhasználásra kész.

22 ml, pufferes oldat, 0,1 % nátrium-azidot és kék szinezéket tartalmaz

3. 6 üveg STANDARD, felhasználásra kész. 1x1 ml(S0) illetve 5x0,15 ml(S1-S5), szérumb, 0,1 % nátrium-azid tartósítóval.

Konc.: 0, 15, 50, 170, 600, 1900 pmol/l.

4. 2 üveg ELLENORZO SZÉRUM, liofilizált, humán szérumb, 0,1 % nátrium-azid tartósítóval.

Rekonstituálandó 0,5 ml desztillált vízzel. Várható értékeiket a minőségellenőrzési bizonylat tartalmazza.

5. 2 doboz BEVONT CSO, 2x50 db, 12x75 mm-es szabvány RIA kémcső, zárt műanyag dobozban.

6. MOSÓPUFFER KONCENTRÁTUM.

20 ml, 0,2 % nátrium-azid tartósítóval.

200 ml desztillált vízzel hígítandó.

1 db Minőségellenőrzési bizonylat

1 db Használati utasítás

A készlet felhasználásához szükséges anyagok és eszközök

Kémcsotartó, rugalmas kémcsörögzőtő kiképzésben, 20 µl-es precíziós mikropipetta, 100, 200 µl-es és 2 ml-es ismételő pipetta, örvénykevero (vortex), orbitális kevero, papírvatta, vagy itató papír, gamma-számláló.

Ajánlott: folyadéküveges leosztó (diszpenzer), 1 literes folyadék-edénnyel, 2 ml adagolási térfogatra (ekkor a 2 ml-es ismételő pipettára nincs szükség)

A mérendő minták gyűjtése és tárolása

A vizsgálandó szérumbmintákat a más, ugyancsak szérumbot igénylő laboratóriumi vizsgálatoknál követett módon készítjük el. Amennyiben a meghatározás a mintavételt követő 1-2 napon belül megtörténik, a mintákat 2-8 °C-on, későbbi felhasználás esetén -18 °C-on mélyhűtve tartjuk. A fagyasztott mintákat hagyjuk felolvadni, és felhasználás előtt alaposan homogenizáljuk. Kerüljük az ismételt visszafagyasztást.

Lipémiás, hemolizált, vagy más szempontból rendellenes szérumbot ne használjunk mérésre. Amennyiben a minta-koncentráció várhatóan >1900 IU/ml, hígításhoz az S0 standard használható fel.

A reagensek elokészítése, tárolása

A készlet komponensei az első felnyitást követően 2-8 °C-on tárolhatóak a készlet lejárati idején belül. A pontos lejárati idő a kísérő bizonylaton és a dobozcímkén van feltüntetve.

Adjunk a liofilizált tracerhez 11 ml desztillált vizet és 10 perc állás után kíméletesen (habzás-mentesen!) homogenizáljuk az üveg tartalmát. A kész oldat 2-8 °C-on eltartható a készlet lejárati idejéig.

Adjunk a liofilizált ellenorzo szérumbhoz 0,5 ml desztillált vizet, és homogenizáljuk örvénykeverővel. Ügyeljünk a habzás elkerülésére. A rekonstituált oldatot legalább 20 percig még ne használjuk fel.

Az ellenorzo szérumb oldatot 2-8 °C-on eltartható a készlet lejárati idejéig, későbbi felhasználásra esetén -18 °C-on mélyhűtve tároljuk.

A mosópuffer koncentrátumbot öntsük 200 ml desztillált vízhez. A kész oldat 28 °C-on a készlet lejárati idejéig tárolható.

A minták hígítása. A legmagasabb standard értéknél magasabb koncentrációjú mintákat hígítás után ismételtlen mérjük meg. Hígításhoz a nulla standard (S0) használható fel. Ajánlott hígítás: 180 µl S0, 20 µl minta FIGYELEM!

A mérés megkezdése előtt a reagens oldatokat, és a mérendő mintákat is engedjük szobahőmérsékletre melegedni majd alaposan homogenizáljuk őket, de kerüljük el a habzást.

A meghatározás menete

Folyamatábra

- Jelöljük meg két-két csövet: összes beütésszám (T), standard (S0-S5), ellenorzo szérumbok (CI,CII); vizsgálandó minták (M).
- Mérjük 20 µl STANDARDot, ill. ELLENORZO SZÉRUMBot, és SZÉRUMBINTÁT a megfelelő csövekbe.
- Mérjük minden csobe 200 µl ANTISZÉRUMB oldatot, kivéve a T jelu csöveket.
- Mérjük minden csobe 100 µl TRACER oldatot.
- Helyezzük a csöveket rögzítős kémcsotartó állványba, a T jelu csövek kivételével. Állítsuk be a sebességet úgy, hogy a folyadék valamennyi kémcsoban mozgásban legyen. Kevertessük 2 órán át szobahőmérsékleten.
- A csotartót fejjel lefelé fordítva, egyetlen határozott, gyors mozdulattal öntsük le a felülúszót, majd a tartót változatlan helyzetben (visszafordítás nélkül!) tegyük papírvattára 2 percig.
- Adjunk minden csobhoz 2 ml mosópuffert, majd öntsük le a felülúszót az 6. pontnak megfelelően.
- Mérjük meg a csövek radioaktivitását gamma-számlálóval és számítsuk ki az eredményeket az alábbiak szerint.

Az eredmények számítása

Számítsuk ki a B₀/T-t az alábbi egyenlettel:

$$B_0/T\% = S_0 \text{ (cpm)} / T \text{ (cpm)} \times 100$$

Számítsuk ki a standardok, az ellenorzo szérumbok és a minták kötési százalékat

$$B/B\% = S_1-S_5, CI, CII, M \text{ (cpm)} / S_0 \text{ (cpm)} \times 100$$

A nem specifikus kötés (NSB) alacsony (NSB/T kisebb mint 1 %) , ezért meghatározása szükségtelen.

Ábrázoljuk a standardokra mért beütésszámokból számított B/B₀ % értékeket a standard koncentrációjának függvényében. Az így kapott standard görbéről olvassuk le a vizsgált minta B/B₀ % értékeihez tartozó koncentrációt.

A korszerű mérokészülékek lehetővé teszik a radioaktivitás-mérést követő azonnali ("online") számítógépes adatfeldolgozást is. A sokféle feldolgozó program közül jelen készítményhez a négyzetes logit-log illesztő program használatát javasoljuk.

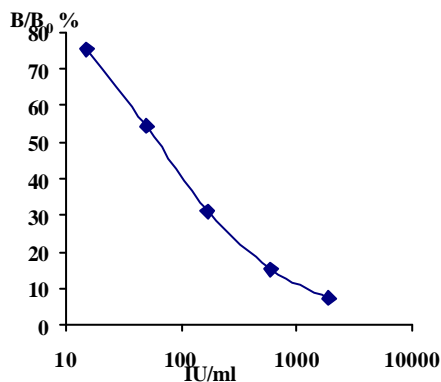
Folyamatábra, pipettázási kalauz
(térfogatok mikroliterben)

	T	S0-S5	C	M
Standard		20		
Ell. szérum			20	
Minta				20
Antiszérum		200	200	200
Tracer	100	100	100	100
Kevertetés, 2 órán át szobahőmérsékleten				
Folyadék leöntése, szárítás itatós papíron				
Mosópuffer		2000	2000	2000
Folyadék leöntése, szárítás itatós papíron				
Radoaktivitás mérés (min. 60 sec/cso)				
Adatfeldolgozás				

Jellemző mérési eredmények

Csővek	Beütés-szám cpm	Átlag cpm	B/B0 %	Anti-TPO IU/ml
T	101128 100215	100672		
S0	35588 36771	36180	100	
S1	27281 27281	27281	75,40	
S2	18467 19502	18985	52,47	
S3	10981 11496	11238	31,06	
S4	5371 5624	5497	15,19	
S5	2589 2673	2631	7,27	
CI	19775 20337	20056		43,2
CII	11714 12637	12176		146,6

Jellemző standard görbe



Minoségi jellemzők

Analitikai érzékenység

Jelen készlet analitikai érzékenysége (egy assayben 10 párhuzamos mérésből meghatározva) $1,9 \text{ IU/ml}$. Értéke egyenlo a ($B_0 - 2 \cdot SD$) kötési értékéhez tartozó koncentrációval.

Funkcionális érzékenység

9 független mérésben meghatároztuk a 20% inter-assay szóráshoz tartozó koncentrációt. A kapott érték $6,0 \text{ IU/ml}$.

Kalibráció

A készlet munka-standardjai az NIBSC 66/387 nemzetközi referencia-preparátumra kalibráltak.

Pontosság és reprodukálhatóság

Az intra-assay pontosságot 10 párhuzamosan egy sorozaton belül határoztuk meg. Az inter-

assay pontosságot 12 független mérésből számoltuk, minden mérést 2 párhuzamosan végeztünk.

Intra-assay		Inter-assay	
átlag (IU/ml)	CV %	átlag (IU/ml)	CV %
38,7	7,81	40,9	6,84
60,4	4,69	61,0	5,40
136	4,38	149	7,66
154	7,61	154	6,74
254	5,68	278	6,33
395	5,98	385	7,97
850	9,31	555	7,06
1077	8,16	1682	12,4

Várható referens tartomány

193 noi és 225 férfi véradó szérumát vizsgáltuk TSH-ra és anti-TPO-ra. A TSH eredmények alapján kórosnak tekintett minták anti-TPO koncentrációinak átlaga $488 \pm 683 \text{ IU/ml}$ volt.

A TSH eredmények alapján egészségesnek vélhető véradók anti-TPO adatait az alábbi táblázatban foglaltuk össze.

Kor (év)						
	n	Átlag	SD	Min	Max	95 % határ*
No	187	34,9	10,8	18	63	-
Férfi	207	35,0	12,0	18	64	-
Férfi+no	394	35,0	11,4	18	64	-
Anti-TPO (IU/ml)						
No	187	10,2	58,3	0	545	31
Férfi	207	30,9	135,3	0	1149	142
Férfi+no	394	21,05	106,35	0	1149	78

* a minták 95 %-ának koncentrációja az adott koncentráció alatt van.

Méréseink alapján – teljes populációra nézve – kórosnak tekinthetjük a 100 IU/ml koncentráció feletti mintákat.

Ezen érték csak tájékoztató adatnak tekintendo, és nem helyettesítheti a készlet felhasználó laboratóriumok által meghatározott saját normál/kóros értékeket.

Megjegyzések, tanácsok

- Figyelem, hibaforrás!** A bevont kémcsövek nem tartalmaznak külön feliratot. Közönséges kémcsövekkel való összetévesztésük komoly mérési hibákhoz vezethet! Ennek elkerülésére a muanyag dobozból soha ne vegyünk ki többet a szükséges mennyiségnél, illetve a felhasználatlan kémcsöveket azonnal tegyük vissza eredeti tartódobozukba.
- Figyelem, hibaforrás!** Kevertetésre csak olyan kémcsotartó használható, amelyben a csövek rögzítve vannak.
- A mosópuffer adagolása.** A mosópuffer legcélszerűbben hajlékony kivezeto csovel felszerelt diszpenzerből adagolható, amelyhez folyadék-edény csatlakozik. A hajlékony csövével az asztalon fekvő kémcsőállvány fölött végighaladva a mosópuffer hozzáadása gyors és hibamentes. Diszpenzer hiányában kelloen nagy térfogatú fecskendővel ellátott ismétlo pipetta használható.

Egyéb tudnivalók

Felhívjuk a figyelmet arra, hogy a különböző gyártási számú készletek egyes komponensei nem helyettesíthetok sem egymással, sem más gyártó készletének komponenseivel.

Biztonsági óvórendszabályok

Radioaktivitás

















A készlet radioaktív anyagot tartalmaz. A felhasználó laboratóriumok felelőssége, hogy munkájuk során ill. a védőcsomagolás esetleges sérülése esetén a radioaktív anyagok tárolására, felhasználására, és kezelésére vonatkozó törvényi szabályozás és hatósági előírások szerint járjanak el.

Fertőzésveszély

A készletben lévő humán szérumot tartalmazó komponensek eloállításához felhasznált szérum HIV-Ab és HBsAg vizsgálatra negatív eredményt adott. Ennek ellenére a humán szérumot tartalmazó komponenseket potenciálisan fertőzőként kell kezelni, és az erre vonatkozó általános laboratóriumi higiénés szabályokat be kell tartani.

Mérgezo anyagok

A készlet komponensei tartósítószerként nátrium-azidot tartalmaznak. A készlet összes nátrium-azid tartalma 80 mg. A nátrium-azid nemcsak mérgezo anyag, de belole rézzel, vagy ólommal érintkezve robbanásveszélyes azidok is keletkezhetnek. A mérgezés a laboratóriumi munkák általános biztonsági előírásainak betartásával kerülhető el. A nehézfém-azidok keletkezésének megakadályozására a nem-radioaktív hulladék reagenseket nagy mennyiségű vízzel öblítve juttassuk a csatornahálózatba.

	Lejáratido		Gyártási szám
	2-8°C-on tárolandó		Kontrol
	Vigyázat, lásd kapcsolódó dokumentumok		Standard
	Biológiai veszély		Bevont cso
	Lásd használati utasítás		Tracer
	In vitro diagnosztikai eszköz		Mosópuffer
	Gyártó		Antiszérum
	Katalógus szám		
	Radioaktív anyag		



WEB oldal: <http://www.izotop.hu>
Technikai e-mail: immuno@izotop.hu
Kereskedelmi e-mail: commerce@izotop.hu

IZOTOP
IZOTÓP INTÉZET Kft.
1535 Budapest, Pf.: 851.
Tel.: 392-2577, Fax: 395-9247