

**<sup>125</sup>I-DHEA-SO<sub>4</sub> RIA KÉSZLET**

(Ref: RK-620M)

A <sup>125</sup>I-DHEA-SO<sub>4</sub> készlet szérumszám dehidroepiandrosteron-szulfát (DHEA-SO<sub>4</sub>) tartalmának in vitro direkt meghatározására szolgál. A kötött antigén elválasztása mágneses immunoszorbens segítségével történik. A készlet 100 meghatározásra elegendő reagenst tartalmaz, amellyel két párhuzamos mérés esetén 42 minta DHEA-SO<sub>4</sub> koncentrációja meghatározható meg, a 0-30 μmol/l (0-11,05 μg/ml) mérési tartományban.

**Bevezetés**

A DHEA-SO<sub>4</sub> csaknem kizárólag a mellékvesekéregben képződik, és mennyiségileg a legfontosabb szteroidhormon a perifériás vérben. A DHEA-SO<sub>4</sub> a legfőbb forrása a 17-ketoszteroidoknak a vizeletben. Egyetlen szérumszám DHEA-SO<sub>4</sub> meghatározással kiküszöbölhető a napi vizeletgyűjtés kényelmetlensége és pontatlansága. Vérszintjének nincs napi ingadozása, nem változik naponként, és a menstruációs ciklus alatt sem. A DHEA-SO<sub>4</sub> termelés nagy és létfontosságú a magzat élettani fejlődéséhez az intrauterin életben. Születés után 8-12 éves korig a DHEA-SO<sub>4</sub> koncentráció a vérben alacsony. Ezt követően a szérumszám fokozatosan nő a pubertás kezdetéig, maximális érték 30-40 éves korig, majd fokozatosan csökken, főleg nőkben a menopauza idején.

A DHEA-SO<sub>4</sub> szérumszám informatív számos patofiziológiai állapotban.

1. A szérumszám DHEA-SO<sub>4</sub> RIA nélkülözhetetlen a mellékvesekéregben képződő androgén termelés, illetve túltermelés kimutatására.
2. A magas DHEA-SO<sub>4</sub> szérumszám a vérben kórjelzője a mellékvese eredetű virilizációs kórállapotokra nőkben. Ezek között elsősorban a mellékvese tumorokat és a kongenitális mellékvesekéreg hiperplázia korai vagy késői megjelenését kell említeni.
3. Sorozatos DHEA-SO<sub>4</sub> szérumszám mérés alkalmas a mellékvese szuppresszív terápia ellenőrzésére is (Dexamethason-kezelés).
4. Az alacsony DHEA-SO<sub>4</sub> szérumszám érték jelzője a szteroidhormonoktól függő immunológiai kórképeknek.
5. Az alacsony DHEA-SO<sub>4</sub> szérumszám kísérője egyes rákos vagy szív és érrendszeri megbetegedéseknek idős korban. Ezért az idős korban vagy ismételt DHEA-SO<sub>4</sub> meghatározások előjelzésükre nélkülözhetetlenek.

**A mérés elve**

A DHEA-SO<sub>4</sub> mennyiségi meghatározására alkalmas jelen készlet működése a kompetitív radioimmunoassay elvén alapul. A <sup>125</sup>I-dal jelzett állandó mennyiségű DHEA-SO<sub>4</sub> vetélkedik a mintában jelenlévő (méréndő) jelzetlen DHEA-SO<sub>4</sub>-tal a korlátozott számú antitest kötohelyekért. A reakció lejtátszódása után a rendszerhez adott szilárd fázisú mágneses

immunoszorbens (MIS) az antitesthez kötött antigént megköti. A kötött antigén a szabad (antitesthez nem kötött) antigéntől a szilárd fázis mágneses térben vagy centrifugálással történő ülepítésével és a felülúszó eltávolításával választható el. Az antitesthez kötött jelzett DHEA-SO<sub>4</sub> radioaktivitása, amely fordítottan arányos a minta DHEA-SO<sub>4</sub> koncentrációjával, gamma-számlálóval mérhető.

A standardok relatív kötésiértékei és koncentrációi ismeretében szerkesztett méro-(standard)-görbéről, a minták relatív kötésiértékei alapján, azok DHEA-SO<sub>4</sub> koncentrációja meghatározható.

**A készlet tartalma**

- 1 <sup>125</sup>I-TRACER, felhasználásra kész, 55 üveg ml; 0,02% nátrium- azid tartósítósóval, radioaktivitása ~150 kBq
- 1 ANTISZÉRUM, felhasználásra kész, 11 ml; 0,1% nátrium- azid tartósítósóval
- 6 STANDARD <sub>(1-6)</sub>, felhasználásra kész üveg humán savó 0,1% nátrium-azid tartósítósóval. 6\*0,5 ml, koncentrációjuk: 0 (S<sub>1</sub>), 0,3 (S<sub>2</sub>), 1 (S<sub>3</sub>), 3 (S<sub>4</sub>), 10 (S<sub>5</sub>), 30 (S<sub>6</sub>) μmol/l
- 1 ELLENORZO SZÉRUM, liofilizált, üveg rekonstituálandó 0,5 ml desztillált vízzel
- 1 MÁGNESES IMMUNSZORBENS üveg szuszpenzió, felhasználásra kész, 55 ml puffer-alapú szuszpenzió, 0,1% nátrium-azid tartósítósóval
- 1 db Minőségellenőrzési bizonylat
- 1 db Használati utasítás

**A készlet felhasználásához szükséges anyagok és eszközök**

- muanyagcsövek és csotartó
- 15, 100 és 500 μl adagolására alkalmas pipetta, eldobható muanyag hegyekkel
- örvénykevero (vortex)
- mágneses ülepítő berendezés kémcsotartóval (pl. Amerlex-M szeparátor), vagy huthető centrifuga
- papírvatta
- gamma-számláló

**Ajánlott**

- sorozat-adagoló (ismétlő) pipetta (pl. Eppendorf) orbitális kevero

**A minták gyűjtése és tárolása**

A vizsgálandó szérumszám mintákat a más, ugyan-csak szérumszám igénylő laboratóriumi vizsgálathoz követett módon készítjük el. Amennyiben a DHEA-SO<sub>4</sub>-meghatározás a mintavétel követő 1-2 napon belül megtörténik, a mintákat +2-+8°C-on, későbbi felhasználás esetén -20°C-on mélyhűtve tartjuk.

Lipémiás, hemolizált vagy más szempontból rendellenes szérumszámot ne használjunk mérésre.

**A reagensek elokészítése**

A standard, az antiszérumszám, a tracer oldatok és a mágneses immunoszorbens szuszpenzió használata kész.

A liofilizált normál ellenőrző szérumszámot oldjuk fel 500 μl desztillált vízben. Az így elkészített oldat DHEA-SO<sub>4</sub> koncentrációját a kísérő minőségügyi bizonylat tartalmazza.

**Megjegyzés:** a reagenst csak a felhasználás előtt oldjuk fel. A feloldás után legalább 20 percig ne használjuk fel. A tökéletes oldást ajánlatos enyhe rázogattással vagy vortex keverővel elősegíteni.

## A meghatározás menete

(ld. folyamatábra, 1. táblázat)

- Hagyjuk az összes reagenst szobahőmérsékletre melegezni.
- Jelöljük meg két-két muanyag csövet az alábbi célra:  
összes beütésszám (T)  
standard ( $S_1-S_6$ ) ( $B_0=S_1$ )  
ellenorzo szérum (C)  
vizsgálandó minták ( $M_x$ )
- Felhasználás előtt a mintákat és az összes reagenst alaposan homogenizáljuk, de kerüljük el a habzást.
- Mérjük 15-15  $\mu$ l STANDARDot ( $S_1-S_6$ ), ELLENORZO SZÉRUMot (C) illetve szérummintát ( $M_x$ ) a megfelelő csövekbe.
- Mérjük minden csobe 500-500  $\mu$ l  $^{125}$ I-DHEA-SO<sub>4</sub>-oldatot. (TRACER)
- Mérjük minden csobe 100-100  $\mu$ l ANTISZÉRUM oldatot, kivéve a T-jelu csöveket. *A kinetikus effektus kiküszöbölés érdekében az utolsó reagens hozzáadásának időtartamát a lehetséges minimumra kell szorítani. Általános szabályként ez a lépés öt percnél ne legyen hosszabb. Ez célszerűen sorozat-adagoló pipettával biztosítható. Örvénykeverovel homogenizáljuk a csövek tartalmát, kivéve a T-jelu csöveket. Orbitális keverőt használva, a kémcsövek egyedi keverésére nincs szükség, azokat a szeparátor tartóállványában hagyva, a keverés egyszerre elvégezhető.*
- Inkubáljuk a csöveket 2 órán keresztül szobahőmérsékleten (20-25°C)
- Alaposan rázzuk össze a mágneses immunoszorbenst, majd adjunk 500  $\mu$ l-t minden csöhöz, kivéve a T-jelu csöveket. Ezt a műveletet legcélszerűbb ismétlé pipettával végezni.
- Örvénykeverovel homogenizáljuk a csövek tartalmát. Amennyiben ismétlé pipettával dolgozott, vortexelés helyett elegendő, ha a csöveket a csotartó állvánnyal együtt enyhén összerázza. Vortexelés után inkubáljuk a csöveket 15 percig szobahőfokon.
- Mágneses szeparálással vagy centrifugálással válasszuk el az antitesthez kötött frakciót az alábbiak szerint.

**Mágneses szeparálás:** Tegyük a csöveket kivéve a T jelűeket, a mágneses szeparáló csotartójába úgy, hogy mindegyik cső érintse a mágneslapot. Hagyjuk szobahőmérsékleten 10 percig állni. Ülepítés után ne távolítsuk el a kémcsőállványt a mágneslapról. csotartót a lappal együtt fejjel lefelé fordítva öntsük le a felülúszót, majd ebben a helyzetben helyezzük a csöveket a papírvattára. A cső peremén maradt folyadék-cseppeket itassuk le. *Ügyeljünk arra, hogy leöntéskor a felülúszó kívülről visszafolyva ne szennyezze el a kémcsövek külső felületét.*

**Centrifugálás:** Centrifugáljuk a csöveket

+4°C -on, 1500xg-vel legalább 15 percig.

Szívjuk le a felülúszót, vigyázva arra, hogy a csapadék ne keveredjen fel.

11 Mérjük meg az egyes csövek radioaktivitását gamma-számlálással.

12 Számítsuk ki az eredményeket a következő fejezet szerint.

### 1. táblázat

A vizsgálat folyamatábrája (az adatok mikroliterben értendők, ellen.=ellenorzo szérum)

Reagens	Totál (T)	Standard $S_1-S_6$	Minta ( $M_x$ )	Ellen. (C)
Standard		15		
Minta			15	
Ellenorzo szér.				15
Tracer	500	500	500	500
Antiszérum		100	100	100
Keverés, 2 óra inkubálás szobahőmérsékleten .				
Mágneses immunoszorbens		500	500	500
Keverés, inkubálás szobahőmérsékleten 15 percig				
Mágneses elválasztás (10 perc), vagy centrifugálás (15 perc, 1500xg)				
Radioaktivitás-mérés (legalább 60 másodperc/cso), adatfeldolgozás.				

### Az eredmények számítása

Számítsuk ki a párhuzamos csövek beütésszámának középértékét. Számítsuk ki a  $B_0/T$ -t az alábbi egyenlettel:

$$B_0/T \% = 100 * S_1(\text{cpm}) / T(\text{cpm})$$

(Ez az érték a mérés egyik minőségi mutatója, amelynek kiszámítása a minta-koncentrációk meghatározásához nem feltétlenül szükséges.) Számítsuk ki a standardok, az ellenorzo szérum és a minták kötési százalékát az alábbi egyenlettel:

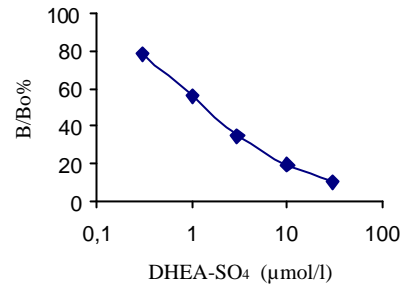
$$B/B_0 \% = 100 * S_{2-6} ; C ; M_x(\text{cpm}) / S_1(\text{cpm})$$

Egy jellegzetes mérési adatsort foglalj össze a 2. táblázat. Ábrázoljuk a standardokra mért beütésszámból számított  $B/B_0\%$  értékeket a standard koncentrációjának függvényében (lásd az 1. ábrát). Az így kapott standardgörbéről (mégörbéről) olvassuk le a vizsgált minta  $B/B_0\%$  értékeihez tartozó DHEA-SO<sub>4</sub> koncentrációit,  $\mu$ mol/l mértékegységben. Egy jellemző standardgörbét mutat az 1. ábra.

### 2. táblázat: Jellemző mérési adatok

Csővek	Beütés CPM1	Beütés CPM2	Átlag CPM	B/T %	B/Bo %
T	56421	56677	56549		
S1	34094	33608	33851	59,9	100,0
S2	26266	26732	26499	46,9	78,3
S3	18752	19180	18966	33,5	56,0
S4	11823	11811	11817	20,9	34,9
S5	6549	6636	6593	11,7	19,5
S6	3623	3607	3615	6,4	10,7
C	8153	8108	8131	14,4	24,0

1. ábra Jellemző standardgörbe (mintamérésre nem használható)



A korszerű mérőkészülékek lehetővé teszik a radioaktivitás-mérést követő azonnali ("online") számítógépes adatfeldolgozást is.

## Minőségi jellemzők

### Az assay jellemző paraméterei

Jellemző	Érték	n
NSB/T	2,5 ± 0,3%	27
B <sub>0</sub> /T	56,9 ± 5,4%	27
ED-50	1,6 ± 0,4 μmol/l	27
kimutatási határ	0,09 ± 0,04	27

A feltüntetett kimutatási határ (érzékenység) a 0-standard ± 2\*SD szórás által meghatározott) konfidencia-intervallumától szignifikánsan megkülönböztethető legkisebb koncentrációt jelenti.

### Specifitás

A specifitás megállapításához a 0 koncentrációjú standardunkhoz két koncentrációban különböző endogén hormonokat adagoltunk, majd mértük a látszólagos DHEA-SO<sub>4</sub> koncentrációt.

**Keresztreakciók:** az A és B oszlopban a DHEA-SO<sub>4</sub> látszólagos koncentrációja (μmol/l) látható. Detektálási limit az adott assayben 0,054 μmol/l. Jelölések: b=detektálási limit alatt. Bemért hormon-koncentrációk: **A=70, B=700 nmol/l.**

ANYAG	A	B	ANYAG	A	B
Aldoszteron	b	b	Ösztradiol	b	b
Androsztendion	b	0,26	Ösztrol	b	b
5α-Dihidrotesztoszteron	b	b	Ösztron	b	0,07
5β-Dihidrotesztoszteron	b	b	Progeszteron	b	b
Androsztandion	b	b	Pregnenolon	b	b
17α-hidroxi-Progeszteron	b	b	Tesztoszteron	b	b
Androsztendion	b	0,13	DHEA	0,8	7,8
Kortizol	b	b			

**megjegyzés:** mivel a DHEA fiziológiai tartománya 13-24 nmol/l (irodalmi adat), a keresztreakcióból adódó torzulás elhanyagolható.

### Várható referens tartomány (μmol/l)

	középtérték	95%-os tartomány	n
<b>Nők</b>	3,31	0,24-6,37	76
<b>Férfiak</b>	6,10	1,52-10,68	75

### Egyéb tudnivalók

#### Átszámítás az SI mértékegységről

1 μmol/l = 0,37 μg/ml

1 μg/ml = 2,71 μmol/l

#### Tárolás:

A készlet komponensei felnyitás előtt és után +2-+8°C között tárolhatók a lejárati időn belül.

#### A készlet lejárati ideje:

A reagens tartóssága a tracer előállításától számított 8 hétig garantált. A pontos lejárati

idő a kísérő bizonylaton és a dobozcímkén van feltüntetve. A tartósság optimális kihasználására javasoljuk a laboratóriumoknak, hogy rendeléseiket a jelzési naptárhoz igazítsák.

**Felhívjuk a figyelmet arra, hogy a különböző gyártási számú készletek egyes komponensei nem helyettesíthetők sem egymással, sem más gyártó DHEA-SO<sub>4</sub> készletének komponenseivel.**

### Biztonsági óvrendszabályok

#### Radioaktivitás

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

#### Fertőzésveszély

A kitben lévő humán szérumot tartalmazó komponensek előállításához 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.

#### Mérgező anyagok

A készlet komponensei tartósítószerként nátrium-azidot tartalmaznak. A készlet összes nátrium-azid tartalma 80 mg. A nátrium-azid nemcsak mérgező anyag, de belőle 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 reagenset nagy mennyiségű vízzel öblítve jutassuk a csatorna hálózatba.

	Lejárati idő		Gyártási szám
	2-8°C-on tárolandó		Kontrol
	Vigyázat, lásd kapcsolódó dokumentumok		Standard
	Biológiai veszély		Mágneses immun-szorbens
	Lásd használati utasítás		Tracer
	In vitro diagnosztikai eszköz		Antisérum
	Gyártó		
	Katalógus szám		
	Radioaktív anyag		



WEB oldal:<http://www.izotop.hu>

Technikai e-mail: [immuno@izotop.hu](mailto:immuno@izotop.hu)

Kereskedelmi e-mail:

[commerce@izotop.hu](mailto:commerce@izotop.hu)

IZOTÓP INTÉZET Kft.

1535 Budapest, Pf.: 851.

Tel.: 392-2577, Fax: 395-9247