

hKalcitonin [¹²⁵I] IRMA készlet (REF: RK-83CT)

A hKalcitonin [¹²⁵I] IRMA készlet humán szérum kalcitonin (hKalcitonin) tartalmának *in vitro* direkt meghatározására szolgál, a 0-2000 pg/ml mérési tartományban.

Bevezetés

A kalcitonin egy 32 aminosavból álló, 3400-as molekulatömegű polipeptid, amely a pajzsmirigy parafollikuláris C-sejtjeiben keletkezik. Elsődleges biológiai szerepe a csont-metabolizmus szabályozása, ennek pontos hatás-mechanizmusa azonban mindmáig nem teljesen tisztázott.

A pajzsmirigy C-sejtes hiperpláziában, valamint medulláris pajzsmirigy-karcinómában (MTC) a szérum-kalcitonin szignifikáns emelkedése jellemző. Az MTC-nek familiáris és véletlenszerű előfordulásait ismerjük, és ezek teszik ki az összes pajzsmirigy karcinómák 5 – 10 %-át. A kalcitonin IRMA-t elsősorban az MTC-diagnosztikában, és terápia-követésben, valamint a familiáris MTC kimutatásában alkalmazzák.

A szérumban a monomer kalcitonin mellett annak dimer és polimer származékai, továbbá bomlástermékei is megtalálhatók, ezért a különböző immunoassay készletekkel mért látszólagos kalcitonin-tartalmak nagy mértékben különbözhetnek egymástól. Egészséges egyénekben a kalcitonin szérum-koncentrációk igen alacsonyak; férfiakban < 15 pg/ml, nőkben < 10 pg/ml. Az extrém alacsony koncentrációk meghatározására jelen készletet annak kimagasló érzékenysége különösen alkalmassá teszi.

A mérés elve

A mérőkészlet a szilárd fázisú immunoradiometrikus assay (IRMA) működési elvét alkalmazza. Ehhez két olyan monoklonális antitest szükséges, amelyek a molekula két különböző epitopját ismerik fel. A két antitest egyike radiojóddal jelzett (jelző antitest), a másikuk jelöletlen (ún. "capture" antitest).

Az antigénnek a két antitesttel kialakult immunkomplexe ("szendvics") a reaktív kémcső felületén mint szilárd fázison kötődik meg. A 16-24 órás reakcióidőt követően a reakcióelegyet a kémcsőből kiöntjük, és pufferes mosás után gamma-számlálóval mérjük a radioaktivitást. A kémcsővekben mért radioaktivitás egyenesen arányos a rendszerben lévő hormon koncentrációjával. Az ismert koncentrációjú standardok kötési értékei alapján szerkesztett kalibrációs görbéről az ismeretlen minták koncentrációit kötési értékeik alapján visszaolvassuk.

A készlet tartalma

- 1 flakon ¹²⁵I-TRACER (11 ml), pufferes oldat, radioaktivitása <740kBq, 0,1 % nátrium-azidot tartalmaz.
- 6 üveg STANDARD, liofilizált (6 x 1 ml), 0,1 % nátrium-azid tartósítóval, rekonstituálható 1 ml desztillált vízzel. (S0 - S5) A pontos koncentrációk az üvegek címkéin vannak feltüntetve. WHO 2nd IS 89/620 -re kalibrálva.
- 2 üveg ELLENORZO SZÉRUM, liofilizált, 0,1 % nátrium-azid tartósítóval, rekonstituálható 1 ml desztillált vízzel. Koncentrációját a kísérő minőségellenorzási bizonylat tartalmazza.
- HÍGÍTÓSZÉRUM, felhasználásra kész.

2,0 ml szérum, 0,1 % nátrium-azid tartósítóval.

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

6. MOSÓPUFFER KONCENTRÁTUM, (20 ml), 0,1 % nátrium-azid tartósítóval, 700 ml desztillált vízzel hígítandó.

1 db Minőségellenorzási bizonylat
1 db Használati utasítás

A készlet felhasználásához szükséges anyagok és eszközök

Kémcsotartó, rugalmas kémcsörögző kiképzésben; pipetták (0,1 és 1 ml térfogatra, eldobható muanyag hegyekkel); örvénykevero, kémcsőzáró muanyag fólia; papírvatta vagy itatóspapír; gamma-számláló

Ajánlott:

Sorozat-adagoló (ismétlő) pipetta; folyadéküveges leosztó (diszpenzer), 1 literes folyadékedénnyel, 2 ml adagolási térfogatra

A mérendő minták gyűjtése és tárolása

Amennyiben a kalcitonin meghatározás a mintavételt követő 1-2 napon belül megtörténik, a mintákat 2-8°C-on, későbbi felhasználás esetén -20°C-on mélyhűtve tartjuk. A fagyasztott mintákat hagyjuk felolvadni, és felhasználás előtt alaposan homogenizáljuk.

A reagensek elokészítése, tárolása

A mosóoldat koncentrátumot öntsük hozzá 700 ml desztillált vízhez. A hígított mosóoldatot 2-8°C-on tároljuk a készlet lejárataig.

A liofilizált standardokat és az ellenorzo szérumot rekonstituáljuk 1 ml desztillált vízzel, örvénykeverővel homogenizáljuk, ügyelve a habzás elkerülésére. A rekonstituált oldatot 20 percig még ne használjuk fel. A rekonstituált oldat -20°C-on a készlet lejárataig tárolható.

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

A meghatározás menete

(ld. Folyamatábra, 1. Táblázat)

1. Jelöljük meg két -két csövet: összes beütésszám (T), standard (S0-S5), ellenorzo szérum (CI, CII); vizsgálandó minták (M).
2. Mérjük 100 µl STANDARDot, ill. ELLENORZO SZÉRUMOT, és szérummintát a megfelelő csövekbe.
3. Mérjük minden csobe 100 µl TRACER oldatot.
4. Örvénykeverővel homogenizáljuk a csövek tartalmát, kivéve a T jelu csöveket.
5. Fedjük le a kémcsöveket záró-fóliával, majd inkubáljuk a csöveket 16-24 órán keresztül szobahőmérsékleten.

6. Helyezzük a kémcsöveket rögzítő kémcsotartó állványba, a T jelu csövek kivételével.
7. Adjunk minden csöhöz 2 ml mosópuffert, majd a csotartót fejjel lefelé fordítva, egyetlen határozott, gyors mozdulattal öntsük le a felülúszót, majd a tartót változatlan helyzetben (visszafordítás nélkül!) tegyük papírvattára 2 percig.
8. Ismételjük meg a mosási lépést kétszer, a 7.pontnak megfelelően.
9. Mérjük meg a csövek radioaktivitását gamma-számlálóval és számítsuk ki az eredményeket az alábbiak szerint.

1.Táblázat Folyamatábra, pipettázási kalauz (térfogatok mikroliterben)

	T	S0-S5	CI/ CII	M
Standard		100		
Ell. szérum			100	
Minta				100
Tracer	100	100	100	100
Vortex, 16-24h inkubáció szobahőmérsékleten				
Mosópuffer		2000	2000	2000
Folyadék leöntése, szárítás itatóspapíron				
Mosópuffer		2000	2000	2000
Folyadék leöntése, szárítás itatóspapíron				
Mosópuffer		2000	2000	2000
Folyadék leöntése, szárítás itatóspapíron				
Radioaktivitás mérés (min. 60 sec/cso)				
Adatfeldolgozás				

Az eredmények számítása

A számítás menetét jellemző mérési adatokkal szemléltetjük. A kapott számadatoknak, és a kalibrációs görbének hasonlítanunk kell a 2. táblázathoz, illetve az 1. ábrához.

Számítsuk ki a párhuzamos csövek beütésszámainak középértékét.

Log-log papíron ábrázoljuk a standard koncentrációkhoz tartozó átlag cpm értékeket. Olvassuk le a mérendő minták koncentrációit a standard görbéről az átlag cpm értékek alapján.

Egyes adat-kiértékelésekhez, rendszerint minőségellenorzási célból, szükség lehet a specifikus kötési értékekre. Erre a B/T értékek használhatók, amelyek számításához a standardok, illetve minták NSB-vel (azaz az S0 beütésszámával) korrigált értékeket osztjuk a totál aktivitással az alábbi egyenlet szerint:

$$B/T (\%) = \frac{S1-5/Mx/ (cpm) -S0(cpm)}{T (cpm)} \times 100$$

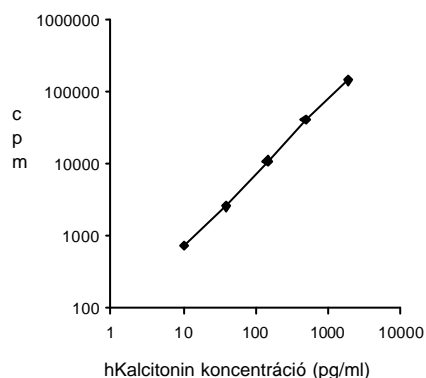
Egy jellegzetes mérési adatsort foglal össze a 2. táblázat, míg az 1. ábra egy jellemző standard görbét mutat.

A korszerű mérőkészülékek lehetővé teszik a radioaktivitás-mérést követő azonnali ("online") számítógépes adatfeldolgozást is. A sokféle feldolgozó program közül jelen kézikönyvhez speciálisan immunometrikus assayre kifejlesztett spline illesztő program használatát javasoljuk. Ügyeljünk arra, hogy vannak olyan kiértékelő programok, amelyek a 0-standard és az első standard között is interpolálnak, de a számított koncentrációk

közül csak azok tekinthetők valósak, amelyek értéke magasabb, mint a mérés statisztikailag meghatározott kimutatási határa (ld. érzékenység).

2. Táblázat Jellemző mérési eredmények

Csővek	Beütés-szám cpm	Átlag cpm	B/T%
T	301645 299398	300521	-
S0	196,5 193,6	195	0,06
S1	713,6 726,1	720	0,24
S2	2547 2594	2571	0,86
S3	11021 11047	11034	3,67
S4	40670 40713	40692	13,54
S5	141750 143492	142621	47,46
CI	1350 1352	1351	0,45
CII	8437 8640	8538	2,84



1. ábra
Tipikus standard görbe,
(Mintameghatározásra nem használható!)

Minőségi jellemzők

Áz assay jellemző paraméterei

B_{max}/B_0 >700
NSB/T <0,1%

Érzékenység

Jelen készlettel az analitikai érzékenység a 0-standarddal 20 párhuzamos mérésből meghatározva < 1,5 pg/ml. Értéke egyenlő a 0-standard B_0+2*SD kötési értékéhez tartozó koncentrációval.

A készlet funkcionális érzékenysége <3 pg/ml

Ismert mennyiség visszanyerése ("recovery")

Egyéni szérumszámokhoz ismert mennyiségű hKalcitonin-t adva (3 koncentráció), a visszanyerés (recovery) 92,4-111,3%.

Nagy-dózisú Hook effektus

Az effektus 200000 pg/ml alatt nem jelentkezik. Bármely mintának, amelynek koncentrációja a 2000-200000 pg/ml tartományba esik, ezzel a készlettel mérve, a koncentrációját több mint 2000 pg/ml-nek fogjuk találni.

Pontosság

Az intra-assay pontosságot 15 párhuzamossal egy sorozaton belül, az inter-assay pontosságot 2 párhuzamossal, 20 független mérésben értékelve, 4 mintára az alábbi adatokat kaptuk.

Intra-assay		Inter-assay	
átlag (pg/ml)	CV %	átlag (pg/ml)	CV %
6,2	8,1	4,8	15,0
31,5	2,5	27,7	5,4
65,0	3,0	61,7	4,8
107,5	3,8	104,2	4,8
347,8	2,7	327,0	4,3
1009,4	4,4	995,3	5,0
1529,7	5,9	1544,2	6,8

Várható referens tartomány

Férfiak esetén < 15 pg/ml.

Nők esetén < 10 pg/ml.

A megadott referens tartomány csak tájékoztató adatnak tekintendő, és nem helyettesítheti a készletet felhasználó laboratóriumok saját területükre jellemző normálértékének megállapítását.

Az assay korlátai

- A készletben található komponensek szérumban történő kalcitonin mérésre optimalizáltak.
- Kerüljük a minták ismételt visszafagyasztását.
- Lipémiás, hemolizált, vagy más szempontból rendellenes szérumot ne használjunk mérésre.
- Az effektus 200000 pg/ml alatt nem jelentkezik. Bármely mintának, amelynek koncentrációja a 2000-200000 pg/ml tartományba esik, ezzel a készlettel mérve, a koncentrációját több mint 2000 pg/ml-nek fogjuk találni. A legnagyobb standardnál magasabb koncentrációjú mintákat hígítsuk meg a hígító szérummal és mérjük újra
- A mérések eredményét más ide vonatkozó klinikai eredményekkel együtt használjuk fel.

Megjegyzések, tanácsok

A mosópuffer adagolása. A mosópuffer legcélszerűbben hajlékony kivezető csővel felszerelt diszpenzerből adagolható, amelyhez legalább 1 l-es folyadékedény csatlakozik. A hajlékony csővel az asztalon fekvő kémcsőállvány fölött végighaladva a mosópuffer hozzáadása gyors és hibamentes. Diszpenzer hiányában kellemesen nagy térfogatú fecskendővel ellátott ismételt pipetta használható.

Egyéb tudnivalók

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

Biztonsági óvrendszabályok

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 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 41 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 reagenseket nagy mennyiségű vízzel öblítve juttassuk a csatornahálózatba.

	Lejárat idő	CONTROL	Kontrol
	Gyártási szám	CAL	Standard
	Vigyázat, lásd kapcsolódó dokumentumok	CT	Bevont cső
	Biológiai veszély	TRAC	Tracer
	Lásd használati utasítás	WASHB	Mosópuffer
	In vitro diagnosztikai eszköz	DIL	Hígító szérum
	Gyártó		2-8°C-on tárolandó
REF	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