

Anti-IA2 [I-125] RIA készlet

Katalógusszámok:

RK-20P50, kit 50 meghatározáshoz
RK-20P100, kit 100 meghatározáshoz

Az anti-IA2 [I-125] RIA készlet az IA2 elleni auto-antitestek direkt mennyiségi meghatározására szolgál humán szérumban. A készlet 50 ill. 100 meghatározásra elegendő reagenst tartalmaz, amellyel két párhuzamos mérés esetén 18 ill. 43 szérum-minta anti-IA2 koncentrációja határozható meg, a 0,1-60 U/ml mérési tartományban.

Bevezetés

Az 1-es típusú cukorbetegség a hasnyálmirigy inzulint termelő béta sejteinek krónikus, autoimmun eredetű pusztulásának eredménye. A preklinikai fázisban a béta-sejt antigének elleni autoantitestek már megjelennek, ami a klinikai tünetek jelentkezése előtt már évekkel korábban mérhető. Ezek az antigének az Inzulin, a glutaminsav-dekarboxiláz enzim (GAD65) és a protein tirozin-foszfátáz (IA2). A vérkeringési rendszerben lévő béta-sejt elleni autoantitestek fontos markerei az 1-es típusú cukorbetegségnek.

Az IA2 a protein tirozin-foszfátáz enzimek családjához tartozik. Az IA2 elleni autoantitestek kimutathatók a pre-diabetikus fázisban lévő páciensek többségében, és indikátorai lehetnek a betegség gyors lefolyásának.

Az anti-GAD65, anti-IA2 és IAA autoantitestek együttes meghatározása az 1-es típusú cukorbetegség jövőbeni megjelenésének prognosztizálására alkalmas. A betegség kifejlődésének rizikója a detektált autoantitestek számával nő.

A mérés elve

A mérőkészlet egy direkt assay, amely a radioligand assay működési elvét alkalmazza. Egy éjszakás inkubáció alatt a tracerben lévő ¹²⁵I-IA2 kötődik a standardokban és mintákban lévő IA2 elleni auto-antitestekhez. Protein A hozzáadásával (amely az auto-antitestek Fc régiójához kötődik) a I-125 jelzett antigén-antitest komplex kicsapódik. Centrifugálás után a csapadékban mérhető a radioaktivitás.

A mintában lévő anti-IA2 koncentráció egyenesen arányos a teszt csőben mérhető radioaktivitással.

A standardok relatív kötésiértékei és koncentrációi ismeretében szerkesztett mérő (standard) görbéről, a minták relatív kötésiértékei alapján, azok anti-IA2 koncentrációja meghatározható.

A készlet felhasználásához szükséges anyagok és eszközök

Kémcsőtartó, teszt csövek, precíziós mikropipetta eldobható hegyekkel (20, 50 és 1000 µl-es), kémcsőzáró műanyag fólia, örvénykeverő (vortex), centrifuga, papírvatta, vagy itató papír, gamma-számláló.
Ajánlott: ismétlő pipetta, kónikus végű teszt csövek.

A készlet tartalma

Komponens	RK-20P50	RK-20P100
TRACER, ¹²⁵ I-IA2 <100 kBq/üveg, liofilizált, piros.	1 üveg	2 üveg
PROTEIN-A, liofilizált, kék.	1 üveg	2 üveg
STANDARD, felhasználásra kész, 0,25 mL/üveg human szérumban.	5 üveg	5 üveg
ELLENŐRZŐ SZÉRUM, felhasználásra kész, 0,25 mL/üveg human szérumban.	2 üveg	2 üveg
REKONSTITUCIÓS PUFFER, felhasználásra kész	1 üveg 6 mL	1 üveg 12 mL
PRECIPITÁLÓ PUFFER, felhasználásra kész	1 üveg 55 mL	1 üveg 105 mL

A standardok koncentrációja az üveg címkén és a minőségi bizonylaton található.

Az ellenőrző szérumok várható értékei a minőségi bizonylaton találhatók.

Minden komponens tartalmaz 0,1% nátrium azid tartósítószert.

A mérendő minták gyűjtése és tárolása

A vizsgálandó szérummintákat a más, ugyancsak szérumot igénylő laboratóriumi vizsgálatoknál követett módon készítjük el. Amennyiben a meghatározás a mintavétel követő 48 órán 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. Kerüljük az ismételt visszafagyasztást.

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

A reagensek előkészítése, tárolása

Tracer és Protein A: 2.6 ml rekonstitúciós pufferrel oldjuk vissza az egyes üvegek tartalmát, amit közvetlenül felhasználás előtt alaposan homogenizálunk. A feloldott Tracer és Protein-A két hétig tárolható 2-8°C-on.

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

FIGYELEM!

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

A meghatározás menete

Folyamatábra

- Jelöljük meg két-két csövet: összes beütésszám (T), standardok (S1-S5), ellenőrző szérumok (CI, CII); vizsgálandó minták (Mx).
- Mérjük meg 20 µl STANDARDot, ill. ELLENŐRZŐ SZÉRUMot, és SZÉRUMMINTÁT a megfelelő csövekbe.

- Mérjük minden csőbe 50 µl TRACER oldatot, fedjük le és tegyük félre a totál csöveket (T).
- Vortexelés után fedjük le a csöveket műanyag fóliával és inkubáljuk egy éjszakán keresztül (18-24 óra) 2-8 °C.
- Mérjük minden csőbe 50 µl Protein A-t. (A Protein A-t alaposan vortexelni közvetlenül a felhasználás előtt.)
- Vortexelés után inkubáljuk a csöveket 1 órán keresztül 2-8°C-on.
- Adjunk minden csőhöz 1 ml hideg (2-8°C) precipitáló puffert.
- Centrifugáljuk a csöveket 2000 x g-n 30 percig 4°C-on
- Majd szívjuk le a folyadékot vagy a csőtartót fejjel lefelé fordítva, egyetlen határozott, gyors mozdulattal öntsük le a felülülőzt, azután a tartót változatlan helyzetben (visszafordítás nélkül!) tegyük papírvattára 5 percig.
- Mérjük meg a csövek radioaktivitását gamma-számlálóval és számítsuk ki az eredményeket az alábbiak szerint.

Az eredmények számítása

Számítsuk ki az átlag cpm értéket minden teszt cső párra.

Számítsuk ki a B/T (%) értéket minden standardra, ellenőrző szérumra és mintára az alábbi egyenlettel:

$$B/T (\%) = \frac{S1-S5 / CI-II / M_x (\text{cpm})}{T (\text{cpm})} \times 100$$

Ábrázoljuk a standardokra mért beütésszámokból számított B/T % értékeket a standard koncentrációjának függvényében. Az így kapott standard görbéről olvassuk le a vizsgált minta B/T % értékeihez tartozó koncentrációt. A görbén kívül eső értékeket ne próbáljuk extrapolációval meghatározni.

A korszerű mérőkészülékek lehetővé teszik a radioaktivitás-mérést követő azonnali ("online") számítógépes adatfeldolgozást is. A sokféle feldolgozó program közül jelen készítményhez a spline illesztő program jól alkalmazható a szendvics-típusú (IRMA) assay-khez hasonlóan.

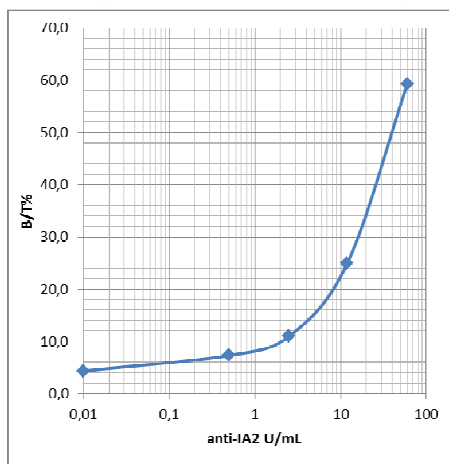
1. Táblázat: Folyamatábra, pipettázási kalauz (térfogatok mikroliterben)

	T	S1-S5	NS, CI-II	M _x
Standard		20		
Kontroll			20	
Minta				20
Tracer	50	50	50	50
Vortex, inkubálás 18-24 órán át 2-8 °C-on				
Protein A		50	50	50
Vortex, inkubálás 1 órán át 2-8 °C-on				
Precipitáló puffer (hideg)		1000	1000	1000
Centrifugálás 2000 x g-n 30 percig 4°C-on				
Leszívás vagy a folyadék óvatos leöntése, szárítás itató papíron legalább 5 percig				
Radioaktivitás mérés (min. 60 sec/cső)				
Adatfeldolgozás				

2. Táblázat: Jellemző mérési eredmények

Cső	Átlag cpm	B/T%	U/mL
T	59819		
S1	2590	4,3	0,01
S2	4378	7,3	0,5
S3	6559	11,0	2,5
S4	14928	25,0	12
S5	35441	59,2	60
CI	7136	11,9	3,0
CII	17791	16,6	16,6

1. Ábra: Tipikus standard görbe (mintamérésre nem használható)



Minőségi jellemzők

Kalibráció

A készlet munka-standardjainak koncentrációi önkényes egységek.

Analitikai érzékenység

Jelen készlet analitikai érzékenysége: **0,1 U/mL**, a negatív szérum egy assayben 20 párhuzamos mérésből meghatározva. Értéke egyenlő a kötés átlagos cpm értéke + kétszeres szórás kötési értékéhez tartozó koncentrációval.

Funkcionális érzékenység alatt azt a legkisebb koncentrációt értjük, amely már szignifikánsan különbözik a zéró koncentrációtól az inter-assay precíziós profil statisztikája alapján (20 % CV). A készlet funkcionális érzékenysége: **0,8 U/mL**.

Specifitás

A kiváló minőségű tracer (I-125 jelzett IA2) biztosítja, hogy a direkt assay alapelv miatt csak az IA2-hoz fog kötődni és nincs keresztreakció Inzulin, GAD65, TG, TPO és TSH receptor elleni auto-antitestekkel.

Pontosság és reprodukálhatóság

Az intra-assay pontosságot 20 párhuzamossal egy sorozaton belül, az inter-assay pontosságot 2 párhuzamossal, 10 független mérésben értékelve, három mintára az alábbi adatokat kaptuk.

Intra-assay		Inter-assay	
Átlag (U/mL)	CV%	Átlag (U/mL)	CV%
0,76	10,4	0,92	17,01
5,80	4,2	6,13	2,97
24,68	2,6	24,76	1,96

Várható referens tartomány

230 vélhetően egészséges felnőtt vérérdős szérumminta és 386 gyerek kórházi maradvány szérumminta vizsgálata alapján a következő eredményeket kaptuk:

IA2 autoantitest	U/mL
negatív	< 1
szürke zóna	1 - 2
pozitív	> 2

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

Az assay korlátai

A negatív eredmény nem zárja ki az 1-es típusú diabéteszt. Az autoimmun válasz különbözik az egyénekben.

Egyetlen autoantitest jelenléte klinikai tünetek hiánya mellett alacsony prognosztikai értékű. Nem minden autoantitest pozitív egyénben fejlődik ki az 1-es típusú cukorbetegség.

Egyéb tudnivalók

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

Biztonsági óvőrendszabályok

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 (anti-HIV 1/2), HBsAg, Hepatitis C Ab és Treponema Ab 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 68 mg (RK-20P50) ill. 129 mg (RK-20P100). 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.

Tarolás és lejárati

A készlet tarolási hőmérséklete 2-8°C, lejárata 67 nap.

	Lejárati idő		Gyártási szám
	2-8°C-on tárolandó		Kontrol
	Vigyázat, lásd kapcsolódó dokumentumok		Standard
	Biológiai veszély		Tracer
	Lásd használati utasítás		Rekonstitúciós puffer
	In vitro diagnosztikai eszköz		Protein A
	Gyártó		Precipitáló puffer
	Radioaktív anyag		Katalógus szám
			

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