

KORTIZOL [¹²⁵I] RIA KÉSZLET

(Ref: RK-240CT)

A Kortizol [¹²⁵I] RIA készlet humán szérumban kortizol tartalmának *in vitro* direkt meghatározására szolgál. A készlet 100 meghatározásra elegendő reagenst tartalmaz, amellyel két párhuzamos mérés esetén 42 minta kortizol koncentrációja határozható meg, a 0-1600 nmol/l (0-580 ng/ml) mérési tartományban.

Bevezetés

A ¹²⁵I-kortizol RIA készlet a humán szérumban vagy plazmában kortizol tartalmának meghatározására szolgál. A kortizol fő glukokortikoid, amelyet a mellékvese termel. A kortizol szintjének meghatározása a hipotalamus-hipofízis-mellékvesekéreg (HPA) szabályzás rendszerének működésének kimutatására alkalmas. A megnövekedett kortizolszint lehet a Cushing szindróma következménye, míg csökkent szint mérhető az elsődleges vagy másodlagos mellékvesekéreg-elégtelenség esetében. Egészséges egyéneknél a kortizolelválasztásnak jellegzetes ritmusa van: legmagasabb a kortizolszint reggel, s estére mintegy felére csökken. Ezért célszerű a kortizolszint meghatározását reggel és este is elvégezni.

A mérés elve

A kortizol mennyiségi meghatározására alkalmas jelen készlet működése a kompetitív radioimmunoassay elvén alapul. ¹²⁵I-dal jelzett állandó mennyiségű kortizol vetélkedik a mintában jelenlévő (méréndő) jelzetlen kortizollal a korlátozott számú antitest kötőhelyekért. A reakció lejátszódása alatt a reaktív kémcső az antitesthez kötött antigént megköti. A bevont cső felületén lévő jelzett antigén radioaktivitása, amely fordítottan arányos a minta kortizol koncentrációjával, gamma-számlálással mérhető. A standardok relatív kötésiértékei és koncentrációi ismeretében szerkesztett mérő (standard) görbéről, a minták relatív kötésiértékei alapján, azok kortizol koncentrációja meghatározható.

A készlet tartalma

1 üveg	TRACER, felhasználásra kész, 55 ml pufferes oldat, 0,1 % nátrium-azid tartósítással radioaktivitása < 260 kBq
1 üveg	ANTISZÉRUM, felhasználásra kész, 55 ml pufferes oldat, 0,1 % nátrium-azid tartósítással
6 üveg	STANDARD (1-6), felhasználásra kész humán savó, 0,1 % nátrium-azid tartósítással 6 * 0,5 ml, koncentrációjuk 0 (S ₁), 40 (S ₂), 100 (S ₃), 250 (S ₄), 650 (S ₅), 1600 (S ₆) nmol/l
1 üveg	ELLENŐRZŐ SZÉRUM, liofilizált, humán savó, 0,1 % nátrium-azid tartósítással, rekonstituálható 0,5 ml desztillált vízzel
2 doboz	BEVONT CSŐ, 2x50 db, 12x75 mm-es szabvány RIA kémcső, zárt műanyag dobozban.
1 db	Minőségellenőrzési bizonylat

A készlet felhasználásához szükséges anyagok és eszközök

kémcsőtartó, rugalmas kémcsőrogzító kiképzésben
 automata pipetták, 10 és 500 µl-es térfogatra, eldobható műanyag hegyekkel
 örvénykeverő (vortex)
 rázógép vagy orbitális keverő
 kémcsőzáró műanyag fólia
 papírvatta vagy itatóspapír
 gamma-számláló

Ajánlott: sorozat-adagoló pipetta

A mérendő minták gyűjtése és tárolása

Amennyiben a kortizol-meghatározás a mintavételt követő 1-2 napon belül megtörténik, a mintákat 2-8 °C-on, későbbi felhasználás esetén -12 °C alatt, mélyhűtve tartjuk

A reagens előkészítése

A standard, az antiszérumban és a tracer oldat felhasználásra kész. A liofilizált normál ellenőrző szérumban oldjuk fel 500 µl desztillált vízben. Az így elkészített oldat kortizol koncentrációját a kísérő minőségi bizonylat tartalmazza.

A meghatározás menete

(ld. folyamatábra, 1. táblázat)

- Hagyjuk az összes reagenst szobahőmérsékletre melegedni (kb. 1 óra).
- Jelöljük meg két-két műanyag csövet az alábbi célra:
 összes beütésszám (T)
 standard (S₁₋₆)(S₁ = B₀)
 ellenőrző szérumban (C)
 vizsgálandó minták (M_x)
- Felhasználás előtt a mintákat és az összes reagenst alaposan homogénizáljuk, de kerüljük el a habzást.
- Mérjük 10 µl STANDARDot (S₁₋₆), illetve ELLENŐRZŐ SZÉRUMot (C), és szérumban (M_x) a megfelelő csövekbe.
- Mérjük minden csőbe 500 µl ¹²⁵I-TRACER oldatot.
- Mérjük minden csőbe 500 µl ANTISZÉRUM oldatot, kivéve a T jelű csöveket. A kinetikus effektus kiküszöbölése 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.
- A csöveket fedjük le légmentesen műanyag fóliával. Ha T jelű cső is készült, helyezük külön a többi csőtól.
- Helyezzük a kémcsöveket rögzítő kémcsőtartó állványba, a T jelű csövek kivételével. Erősítsük fel az állványt a keverőgépre, vagy az orbitális keverőre, úgy, hogy az biztonságosan rögzítve legyen.
- Indítsuk el a keverést, és állítsuk be a sebességet úgy, hogy a folyadék valamennyi kémcsőben mozgásban legyen. Keveressük ezzel a beál-

lással 2 órán keresztül szobahőmérsékleten.

- A csőtartót fejfelé fordítva, egyetlen határozott, gyors mozdulattal öntsük le a felülűszót, majd a tartót változatlan helyzetben (visszafordítás nélkül!) tegyük papírvattára 5 percig. Győződjünk meg arról, hogy a cső peremén nem maradtak folyadékcseppek.
- Mérjük meg az egyes csövek radioaktivitását gamma-számlálással.
- Számítsuk ki az eredményeket a következő fejezet szerint.

1. táblázat. A vizsgálat folyamatábrája (az adatok mikroliterben értendők)

Reagens	T	S ₁₋₆	C	M _x
Standard 1-6		10		
Ellenőrző szérumban			10	
Minták				10
Tracer	500	500	500	500
Antiszérumban		500	500	500
Gépi kevertetés 2 órán át szobahőmérsékleten.				
Folyadék leöntése, szárítás itatóspapíron min. 5 percig.				
Radioaktivitás-mérés (legalább 60 másodperc/cső)				
Adatfeldolgozás				

Az eredmények számítása

Számítsuk ki a párhuzamos csövek beütésszámainak középértékét.

Számítsuk ki a B₀/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-koncentráció meghatározásához nem feltétlenül szükséges.) Számítsuk ki a standardok, az ellenőrző szérumban és a minták kötési százalékát az alábbi egyenlettel:

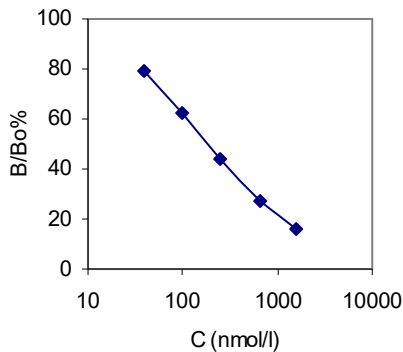
$$B/B_0 \% = 100 * S_{2-6} ; C ; M_x(\text{cpm}) / S_1(\text{cpm})$$

Nem specifikus kötést (NSB)-mivel kevesebb, mint 3%-os adottságban nem mérünk. Egy jellegzetes mérési adatsort foglal össze a 2. táblázat. Ábrázoljuk a standardokra mért beütésszámokból számított B/B₀ értékeket a standard koncentrációjának függvényében (lásd az ábrát). Az így kapott standard görbéről (mérőgörbéről) olvassuk le a vizsgált minta B/B₀ értékeihez tartozó koncentrációt. Egy jellemző standard görbét mutat az 1. ábra.

2.táblázat. Jellemző mérési adatok

Csővek	Beütés CPM1	Beütés CPM2	Átlag CPM	B/T %	B/B ₀ %
T	90172	89562	89867		
S ₁	51816	51699	51758	57,6	100
S ₂	41325	40790	41058	45,7	79,3
S ₃	32114	32332	32223	35,9	62,3
S ₄	23112	22076	22594	25,1	43,7
S ₅	14264	13917	14091	15,7	27,2
S ₆	8272	8347	8309,5	9,2	16,1
C	19600	18893	19247	21,4	37,2

1. ábra. Jellemző standard görbe (mintamérésre nem használható)



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

Minőségi jellemzők

Az assay jellemző paraméterei

B₀/T 56±10 %
ED-50 180±36 nmol/l

Analitikai érzékenység 2,9 nmol/l

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

Specifitás

0 koncentrációjú standardhoz 70 és 700 nmol/l koncentrációban különböző szteroidokat adtunk és mértük a látszólagos kortizol koncentrációt. 700 nM-ig a következő anyagok nem detektálhatók az adott készletben: β-ösztadiol, progeszteron, 5-alfa dihidro tesztoszteron, 5-β-dihidro-19-nortesztoszteron, tesztoszteron, dehidro-epiandroszteron, androsztendion, tesztoszteron, androsztendiol, 17-α-metiltesztoszteron, androsztandiól, aldoszteron, pregnenolon, ösztion, ösztriol, 19-nortesztoszteron. Az alábbi táblázatban láthatók a mérhető keresztreakciót adó anyagok.

Hozzáadott szteroid koncentráció	Mért kortizol nM	
	70 nM	700 nM
Kortikoszteron	6	30
17-α-hidroxi progeszteron	<DL	13
Kortizon	<DL	6
11-deoxikortizol	10	56
Deoxikortikoszteron	<DL	12
Prednizolon	64	428
Dexametazon	<DL	15

Ismert mennyiség visszanyerése ("recovery")

16 egyéni szérummintához ismert mennyiségű kortizolt adva, a visszanyerés (recovery) 92 ± 7,0 % volt.

Pontosság és reprodukálhatóság

Az intra-assay pontosságot 10 párhuzamossal egy sorozaton belül, az inter-assay pontosságot 2 párhuzamossal, 7 független mérésben értékelve az alábbi adatokat kaptuk.

Inter-assay		Intra-assay	
Átlag	CV%	Átlag	CV%
45,7	1,65	46,5	6,25
86,0	3,15	84,6	3,70
223,9	3,33	237,7	6,81
339,6	1,77	398,3	3,16
427,1	2,87	439,6	2,47
792,6	4,56	766,5	4,51
1113,9	4,70	1142,8	5,62

Várható referens tartomány:

Déletőtti minták (8 és 11 óra között): 90 véradó férfi és 90 nő szérumának kortizol koncentrációját mérve a statisztikai adatok: 353±139 nmol/l (átlag±SD), tartomány 127 – 859 nmol/l. A mért adatok logaritmikus transzformálás után normál elosztást mutatnak. A **95%-os konfidencia intervallum alapján becsülhető referens tartomány 147-726 nmol/l.**

Átszámítás az SI mértékegységről:

1 nmol/l = 0,362 ng/ml

Egyéb tudnivalók

Az assay korlátai

Lipémiás, hemolizált, vagy más szempontból rendellenes szérumot ne használjunk mérésre. Kerüljük a minták ismételt visszafagyasztását. Felhívjuk a figyelmet arra, hogy a különböző gyártási számú készletek egyes komponensei nem helyettesíthetők sem egymással, sem más gyártó kortizol készletének komponenseivel.

Tárolás

A rekonstituált ellenőrző szérum 2-8°C-on 2 hónapig tárolható. A készlet többi komponense az első felnyitást követően 2-8°C-on tárolható a készlet lejárati idején belül.

A készlet lejárati ideje

A pontos lejárati idő a kísérő bizonylaton és a dobozcímkén van feltüntetve.

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 114 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 hulladék reagenseket nagy mennyiségű vízzel öblítve juttassuk a csatorna hálózatba.

	Lejárati idő	<input type="checkbox"/> LOT	Gyártási szám
	2-8°C-on tárolandó	<input type="checkbox"/> CONTROL	Kontrol
	Vigyázat, lásd kapcsolódó dokumentumok	<input type="checkbox"/> CAL	Standard
	Biológiai veszély	<input type="checkbox"/> CT	Bevont cső
	Lásd használati utasítás	<input type="checkbox"/> TRAC	Tracer
<input type="checkbox"/> IVD	In vitro diagnosztikai eszköz	<input type="checkbox"/> AS	Antiszérum
	Gyártó		
<input type="checkbox"/> 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

01472