

Anti-GAD65 [I-125] RIA készlet

Katalógusszámok:

RK-40P50, kit 50 meghatározáshoz
RK-40P100, kit 100 meghatározáshoz

Az anti-GAD65 [I-125] RIA készlet a GAD65 elleni auto-antitestek direkt mennyiségi meghatározására szolgál humán szérumban. A készlet 50 ill. 100 meghatározásra elegendő reagenst tartalmaz, amellyel két párhuzamos mérés esetén 17 ill. 42 szérumb-minta anti-GAD65 koncentrációja határozható meg, a 0,1-120 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.

A GAD65 ellene autoantitestek jelen vannak az 1-es típusú cukorbetegséggel diagnosztizált betegek 70-80%-ában. Emellett kimutathatók a felnőttkori diabétesz látens autoimmun formájában (LADA).

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. Két órási inkubáció alatt a tracerben lévő I25-I-GAD65 kötődik a standardokban és mintákban lévő GAD65 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-GAD65 koncentráció egyenesen arányos a teszt csőben mérhető radioaktivitással.

A standardok relatív kötéseértékei és koncentrációi ismeretében szerkesztett mérő (standard) görbéről, a minták relatív kötéseértékei alapján, azok anti-GAD65 koncentrációja meghatározható.

A készlet felhasználásához szükséges anyagok és eszközök

Kémcsőtartó, teszt csövek, precíziós mikropipetta eldobható hegyekkel (20, 50 és 1000 µl-es), műanyag fólia, örvénykeverő (vortex), centrifuga, papírvatta, vagy itatós papír, gamma-számláló.

Ajánlott: ismétlő pipetta, kónikus végű teszt csövek.

A készlet tartalma

Komponens	RK-40P50	RK-40P100
TRACER, ¹²⁵ I-GAD65 <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.	6 üveg	6 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 találhatóak.

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 mintavételt követő 48 órán belül megtörténik, a mintákat 2-8 °C-on, későbbi felhasználás esetén -20 °C-on fagyaszttva 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 reagens 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 lejárati idején belül. A pontos lejárati 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-S6), 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 két órán keresztül szobahőmérsékleten.
- 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 szobahőmérsékleten.
- 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 fejfelé fordítva, egyetlen határozott, gyors mozdulattal öntsük le a felülúszót, 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 (%) értékeket minden standardra, ellenőrző szérumra és mintára az alábbi egyenlettel:

$$B/T (\%) = \frac{S1-S6 / CI-II / M_x (\text{cpm})}{T (\text{cpm})} \times 100$$

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 ("on-line") számítógépes adatfeldolgozást is. A sokféle feldolgozó program közül jelen készítményhez a spline illesztő program jól alkalmazható a szendvics-típusú (IRMA) assay-khez hasonlóan.

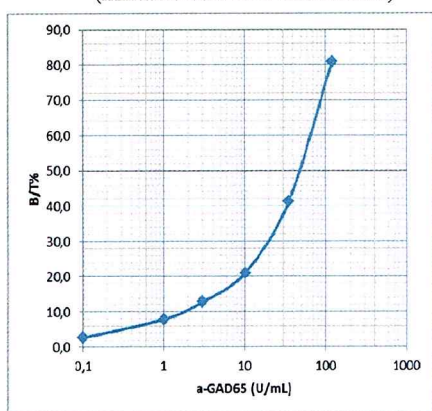
1. Táblázat: Folyamatábra, pipettázási kalauz (térfogatok mikroliterben)

	T	S1-S6	NS, CI-II	M _x
Standard		20		
Kontroll			20	
Minta				20
Tracer	50	50	50	50
Vortex, inkubálás 2 órán át szobahőmérsékleten				
Protein A		50	50	50
Vortex, inkubálás 1 órán át szobahőmérsékleten				
Precipitáló puffer (hideg)		1000	1000	1000
Centrifugálás 2000 x g-n 30 percig 4°C-on				
Leszívás vagy a folyadék óvatos leöntése, szárítás itatós papíron legalább 5 percig				
Radioaktivitás mérés (min. 60 sec/cső)				
Adatfeldolgozás				

2. Táblázat: Jellemző mérési eredmények

Cső	Átlag cpm	B/T%	U/mL
T	31556		
S1	839	2,7	0,1
S2	2468	7,8	1
S3	4029	12,8	3
S4	6602	20,9	10
S5	12994	41,2	35
S6	25488	80,8	120
CI	4058	12,9	3,1
CII	8798	27,9	17,2

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: **0,7 U/mL**.

Specifitás

A kiváló minőségű tracer (I-125 jelzett GAD65) biztosítja, hogy a direkt assay alapelv miatt csak az GAD65-hoz fog kötődni és nincs keresztreakció Inzulin, IA2, 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, 20 független mérésben értékelve, három mintára az alábbi adatokat kaptuk.

Intra-assay		Inter-assay	
Átlag (U/mL)	CV%	Átlag (U/mL)	CV%
0,8	10	0,6	20,7
1,3	9,8	1,2	12,6
8,2	6,8	8,4	5,2
45,9	1,3	45,6	1,1

Várható referens tartomány

392 vélhetően egészséges felnőtt vérérdős szérumminta és 398 gyerek kórházi maradvány szérumminta vizsgálata alapján a következő eredményeket kaptuk:

GAD65 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 GAD65 autoantitestek kimutathatóak egy ritka, "Stiff man" szindrómának nevezett neurológiai betegségben.

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

Egyetlen autoantitest jelenléte klinikai tünetek hiánya mellett alacsony prognosztikai értékű.

Nem minden autoantitest pozitív egyénben kifejlődik 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 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 (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-40P50) ill. 129 mg (RK-40P100). 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 utasítást		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

