

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. A készlet 100 meghatározásra elegendő reagenst tartalmaz, amellyel két párhuzamos mérés esetén 42 minta kalcitonin koncentrációja határozható meg.

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 szérum kalcitonin-szintjének szignifikáns emelkedése pajzsmirigy C-sejtes hiperpláziában, valamint medulláris pajzsmirigy-karcinóma (MTC) esetén jellemző. Az MTC-nek familiáris és véletlenszerű előfordulásait ismerjük, amelyek a pajzsmirigy karcinóma előfordulásának 5-10 %-át teszik ki. 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, melyek meghatározására jelen készletet annak kimagasló érzékenysége különösen alkalmassá teszi.

A mérés elve

A mérőkészlet a szilárd fázisú immuno-radiometrikus assay (IRMA) működési elvét alkalmazza. Ehhez két olyan monoklonális antitest szükséges, amelyek a molekula két különböző epitopját ismerik fel. A két antitest egyike radiojódval 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-számlálással 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, felhasználásra kész. Radioaktivitása <740 kBq, 11 ml pufferes oldat, amely 0,1 % nátrium-azidot és piros festéket tartalmaz.
- 6 üveg STANDARD, liofilizált (S0-S5; 6 x 1 ml), lószérumban, 0,1% Kathon-CG tartósítósóval, rekonstituálandó 1 ml desztillált vízzel. A pontos koncentrációk az üvegek címkéin vannak feltüntetve. WHO 2nd IS 89/620-ra kalibrálva.
- 2 üveg ELLENŐRZŐ SZÉRUM, liofilizált, (CI - CII, 2 x 1 ml) 0,1% Kathon CG

tartósítósóval, rekonstituálandó 1 ml desztillált vízzel. Koncentrációját a kísérő minőségellenőrzési bizonylat tartalmazza.

4. 1 üveg HÍGÍTÓSZÉRUM, felhasználásra kész. 2 ml lószérum, 0,1% Kathon CG tartósítósóval.

5. 2 doboz BEVONT CSŐ, felhasználásra kész. 2x50 db, 12x75 mm-es szabvány RIA kémcső, zárt műanyag dobozban.

6. MOSÓPUFFER KONCENTRÁTUM, (20 ml), 0,2 % nátrium-azid tartósítósóval, 700 ml desztillált vízzel hígítandó.

1 db Minőségellenőrzési bizonylat

1 db Használati utasítás

A készlet felhasználásához szükséges anyagok és eszközök

Kémcsőtartó, rugalmas kémcsőrögzőtő kiképzésben; pipetták (0,1 és 1 ml térfogatra), eldobható műanyag hegyekkel); örvénykeverő, kémcsőzáró műanyag 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 24 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.

A reagensek előkészítése, tárolása

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

A liofilizált standardokat és ellenőrző szérumokat 1 ml desztillált vízzel rekonstituáljuk, örvénykeverővel homogenizáljuk, ügyelve a habzás elkerülésére. A rekonstituált komponenseket a teljes oldódás érdekében felhasználás előtt javasolt legalább 20 percig szobahőmérsékleten hagyni. **A rekonstituált oldatok -20 °C-on a készlet lejárati idejéig tárolhatók.**

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

A meghatározás menete

(ld. Folyamatábra, 1. Táblázat)

1. Felhasználás előtt helyezzük a készlet komponenseit szobahőmérsékletre, majd homogenizáljuk örvénykeverővel. Ügyeljünk a habzás elkerülésére.
2. Jelöljük meg két-két csövet: összes beütésszám (T), standard (S0-S5), ellenőrző szérum (CI, CII), vizsgálandó minták (M).
3. Mérjük 100 µl STANDARD-ot, ill. ELLENŐRZŐ SZÉRUMOT és szérummintát a megfelelő csővekbe.
4. Mérjük minden csőbe 100 µl TRACER oldatot.

5. Örvénykeverővel homogenizáljuk a csövek tartalmát, kivéve a T jelű csöveket.
6. Fedjük le a kémcsöveket záró-fóliával, majd inkubáljuk a csöveket 16-24 órán keresztül szobahőmérsékleten.
7. Helyezzük a kémcsöveket rögzítő kémcsőtartó állványba, a T jelű csövek kivételével.
8. Adjunk minden csőhöz 2 ml mosópuffert, majd a csőtartót fejfelé fordítva, egyetlen határozott, gyors mozdulattal öntsük le a felülészót, majd a tartót változatlan helyzetben (visszafordítás nélkül!) tegyük papírvattára 2 percre.
9. Ismételjük meg a mosási lépést kétszer, a 8. pontnak megfelelően.
10. Mérjük meg a csövek radioaktivitását gamma-számlálással 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/cső)				
Adatfeldolgozás				

Az eredmények számítása

A számítás menetét jellemző mérési adatokkal szemléltetjük. A kapott számadatoknak és a kalibrációs görbének hasonlítaniuk 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 minőségellenőrzési 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 értékeit osztjuk a totál aktivitással az alábbi egyenlet szerint:

$$B/T (\%) = \frac{S_{1-5} / C / M_x (\text{cpm}) - S_0 (\text{cpm})}{T (\text{cpm})} \times 100$$

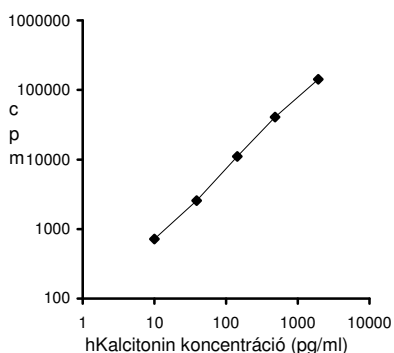
Egy jellegzetes mérési adatsort foglal össze a 2. táblázat, míg az 1. ábra egy jellemző standard görbét mutat.

A korszerű mérőkészületek lehetővé teszik a radioaktivitás-mérést követő azonnali ("online") számítógépes adatfeldolgozást is. A sokféle feldolgozó program közül jelen készítményhez 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 tekinthetők valóságnak, amelyek értéke magasabb, mint a mérés statisztikailag meghatározott kimutatási határa (ld. érzékenység).

2. Táblázat Jellemző mérési eredmények

Csövek	Átlag beütésszám [cpm]	B/T%
T	303 022	-
S0	182	0,06
S1	1 459	0,42
S2	4 759	1,51
S3	15 195	4,95
S4	46 921	15,4
S5	143 589	47,3
CI	2 804	0,87
CII	9 714	3,15



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

Minőségi jellemzők

Érzékenység

Az analitikai érzékenység az S0 20 párhuzamos mérésével meghatározva: 0,5 pg/ml. A feltüntetett kimutatási határ a 0-standard ($\pm 2 \cdot SD$ szórás által meghatározott) konfidencia-intervallumától szignifikánsan megkülönböztethető legkisebb koncentrációt jelenti.

Az LoB (Limit of Blank), LoD (Limit of Detection) és az LoQ (Limit of Quantitation) meghatározását a CLSI guideline EP17-es ajánlása alapján határoztuk meg. A mérési adatok alapján az alábbi értékeket kaptuk:

Limit of Blank (LoB): 0,65 pg/ml

Limit of Detection (LoD): 1,2 pg/ml

Limit of Quantitation (LoQ): 2,0 pg/ml

A funkcionális érzékenység megegyezik a Limit of Quantitation (LoQ) értékével.

Specifitás

A készletben alkalmazott monoklonális antitestek humán Kalcitoninra specifikusak. A készlettel való mérés során a szérumban lévő humán Prokalcitonin 80 ng/ml koncentráció alatt nem okoz detektálható interferenciát.

Ismert mennyiség visszanyerése ("recovery")

A mérés során 4 db egyedi humán szérumból ismert mennyiségű Kalcitonin adtunk három különböző koncentrációban és vizsgáltuk a kiindulási és a megemelkedett koncentráció szinteket. Az átlag visszanyerés 111% volt (101-122 %).

Pontosság és reprodukálhatóság

Az intra-assay pontosságot 7 minta 20 párhuzamosban, egy sorozaton belül való mérésével határoztuk meg, az inter-assay pontosságot 2 párhuzamosban, 20 független mérésben értékelve az alábbi adatokat kaptuk.

Minta	Intra-assay		Inter-assay	
	Átlag (pg/ml)	CV%	Átlag (pg/ml)	CV%
1	0,9	17,9	1,8	21,9
2	23,6	2,7	24,9	5,1
3	25,3	3,2	28,2	6,0
4	161,2	1,6	170,6	6,2
5	180,8	4,4	198,0	6,6
6	348,3	1,7	364,4	6,4
7	782,3	1,4	812,4	6,4

Linearitás

Öt egyedi humán szérumból hígítottunk alacsony kalcitonin koncentrációjú humán szérumból, majd a hígított mintákat a készlet protokoll szerint immunoassay-ben mértük. A várt (x) és a mért (y) koncentrációértékek között az alábbi összefüggés adódott:

$$Y = 1,1394X - 1,5616 \quad R^2 = 0,9951 \quad n = 20$$

Az átlag visszanyerés 110% volt.

Nagy-dózisú Hook effektus

Az effektus 3 000 000 pg/ml alatt nem jelentkezik. A legnagyobb standard pontnál nagyobb koncentrációjú mintákat a készletben található hígító szérumból való hígítás után célszerű újra megmérni. Javasolt hígítási arány: 1:10.

Várható referens tartomány

607 vélhetően egészséges felnőtt szérumból (304 nő és 303 férfi) mérése alapján a normál kalcitonin szint **0 – 10 pg/ml** közé esik (99,8%-os valószínűséggel).

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 humán szérumban történő Kalcitonin mérésre optimalizáltak.
- Kerüljük a minták ismételt kioldását és visszafagyasztását.
- Lipémiás, hemolizált, vagy más szempontból rendellenes szérumból ne használjunk mérésre.
- A mérések eredményét más ide vonatkozó klinikai eredményekkel együtt használjuk fel.
- Bizonyos patológiai esetekben a kalcitonin szint konkrét diagnosztikai vagy prognosztikai okok miatt is megemelkedhet, mint például hypercalcaemia, veseelégtelenség, hypergastrinemia vagy akut pancreatitis esetén.

Megjegyzések, tanácsok

A különböző gyártási számú készletek egyes komponensei nem helyettesíthetők sem egymással, sem más gyártó humán Kalcitonin készletének komponenseivel.

Figyelem, hibaforrás! A bevont kémcsövek nem tartalmaznak külön feliratot. Közös kérésű kémcsövekkel való összetévesztésük komoly

mérési hibákhoz vezethet! Ennek elkerülésére a műanyag dobozból soha ne vegyünk ki többet a szükséges mennyiségnél, illetve a felhasználatlan kémcsöveket azonnal tegyük vissza eredeti tartódobozukba. Ha az összekeverés veszélye a feldolgozás alatt is fennáll, célszerű a bevont csöveket üvegre író tollal is megjelölni.

Biztonsági óvrendszabályok

Radioaktivitás

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

Fertőzésveszély

A készletben lévő humán szérumból tartalmazó komponensek előállításához felhasznált szérumból HIV-Ab, HBsAg, Hepatitisz-C antitest, Treponema- és Hepatitisz-B antitest vizsgálatra negatív eredményt adott. Ennek ellenére a humán szérumból tartalmazó komponenseket *potenciálisan fertőzőként kell kezelni*, és az erre vonatkozó általános laboratóriumi higiénés szabályokat be kell tartani.











Minden állati terméket és származékot egészséges állatokból nyertek. Mindezek ellenére az állati eredetű komponenseket tartalmazó reagenset *potenciálisan fertőzőként kell kezelni!*

Mérgező anyagok

A készlet komponensei tartósítószerként nátrium-azidot tartalmaznak. A készlet összes nátrium-azid tartalma 51 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 juttassuk a csatornahálózatba.

Tárolás

A készlet komponensei 2-8 °C-on tárolhatók a 67 napos lejárati időn belül.

	Lejárati 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 szérumból
	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