

## C-PEPTID [<sup>125</sup>I] IRMA készlet (REF: RK-84CT)

A C-PEPTID IRMA [<sup>125</sup>I] készlet humán szérum vagy vizelet C-peptid tartalmának direkt meghatározására szolgál. A készlet 100 meghatározásra elegendő reagenst tartalmaz, amellyel két párhuzamos mérés esetén 42 minta C-peptid koncentrációja határozható meg a 0-30 ng/ml (szérumban), illetve a 0-300 ng/ml (vizeletben) mérési tartományban.

### Bevezetés

A C-peptid 31 aminosavból álló, 3600-as molekulatömegű polipeptid. A hasnyálmirigy béta-sejtjeiben szintetizált proinzulinból 1:1 molarányban inzulin és C-peptid keletkezik, amelyek a portális keringésbe kerülnek. A máj az inzulin jelentős részét visszatartja, míg a C-peptid lényegében változatlan mennyiségben bejut a szisztémás keringésbe. Fentiekből következően a C-peptid pontosabb mutatója az inzulin-szekréciónak, mint maga az inzulin. További előnye, hogy koncentrációját nem befolyásolják az inzulin-terápián lévő betegekben gyakran létrejövő anti-inzulin antitestek, amelyek az inzulin-mérést teljesen megzavarhatják. A cukorbetegség diagnózisában és terápiájában tehát a C-peptid nélkülözhetetlen mutatója a szigetsejtek maradék aktivitásának.

### A mérés elve

A készlet működése a szilárd fázisú immunoradiometrikus assay (IRMA) elvén alapul. Ehhez két olyan monoklonális antitest szükséges, amelyek a molekula két különböző epitópját ismerik fel. A két antitest egyike radiojódval jelzett (jelző antitest), a másikuk jelöletlen (ún. "capture" antitest).

A bevont csöves rendszerek jelen változatában az antigénnek a két antitesttel kialakult immunkomplexe („szendvics”) a reaktív kémcső felületén, mint szilárd fázison kötődik meg. 3 óras reakcióidőt követően a reakcióelegyet a kémcsőből kiöntjük, és pufferes mosás után gamma-számlálóval mérjük a radioaktivitást.

A szilárd fázison mért radioaktivitás egyenesen arányos a rendszerben lévő C-peptid koncentrációjával. Az ismert koncentrációjú standardok kötési értékei alapján szerkesztett kalibrációs görbéről az ismeretlen minták koncentrációit kötési értékeik alapján visszaolvassuk.

### A készlet tartalma

1. 1 flakon <sup>125</sup>I-TRACER, felhasználásra kész. 21 ml pufferes oldat, piros színezéssel, 0,1 % nátrium-azid tartósítóval. Radioaktivitása < 740 kBq,

2. 6 üveg STANDARD(S0-S5),

1 x 2,5 ml (S0), felhasználásra kész, marha szérum 0,1 % nátrium-azid tartósítóval.

5 x 0,5 ml (S1-S5), liofilizált.

Humán szérum, 0,1 % nátrium-azid tartósítóval.

Rekonstituálандó 0,5 ml desztillált vízzel

Konc.: 0, 0,25, 0,9, 3, 9, 30 ng/ml. Kalibrálva a 84/510 WHO standardra.

3. 1 üveg ELLENŐRZŐ SZÉRUM, liofilizált.

Humán szérum 0,1 % nátrium-azid tartósítóval.

Rekonstituálандó 0,5 ml desztillált vízzel. Várható értékét a minőségellenőrzési bizonylat tartalmazza.

4. 2 doboz BEVONT CSŐ, 2x50 db, 12x75 mm-es szabvány RIA kémcső.

5. 1 flakon

MOSÓPUFFER KONCENTRÁTUM.

20 ml, 0,2 % nátrium-azid tartósítóval.

700 ml desztillált vízzel hígítandó.

1 db Minőségellenőrzési bizonylat

1 db Használati utasítás

### A készlet felhasználásához szükséges anyagok és eszközök

Kémcsőtartó, rugalmas kémcsőörögítő kiképzésben, 50 µl-es precíziós mikropipetta, 200 µl-es és 1,5 ml-es ismétlő pipetta, örvénykeverő (vortex), orbitális keverő, papírvatta, gamma-számláló.

*Ajánlott:* folyadéküveges leosztó (diszpenzer), 1 literes folyadék-edénnyel, 1,5 ml adagolási térfogatra (ekkor az 1,5 ml ismétlő pipettára nincs szükség).

### A mérendő minták gyűjtése és tárolása

A vizsgálandó szérummintákat a más, ugyancsak szérumot igénylő laboratóriumi vizsgálatoknál követett módon készítjük el. Amennyiben a C-peptid-meghatározás a mintavételt követő 1 napon belül megtörténik, a mintákat +2 - +8 °C-on, későbbi felhasználás esetén -18 °C-on mélyhűtve tartjuk. A fagyasztott minta legfeljebb 60 napig tárolható. Kerüljük az ismételt visszafagyasztást.

Lipémiás, hemolizált, vagy más szempontból rendellenes szérumot ne használjunk mérésre. A legmagasabb standard értéknél magasabb koncentrációjú mintákat hígítás után ismételtlen mérjük meg. Hígításhoz a nulla standard (S0) használható fel.

Napi gyűjtött vizelethez a mintákat azonnal fagyasszuk le. A gyűjtés végeztével, a mérés előtt olvasszuk fel a mintákat, és egyesítés, homogenizálás után határozzuk meg a koncentrációt. A fagyasztott minta legfeljebb 60 napig tárolható -18 °C-on.

### A reagensek előkészítése, tárolás

A készlet komponensei 2-8 °C között tárolhatók a lejáratú időn belül. A rekonstituált standardok valamint az ellenőrző szérum az adott assayben való használat után a legrövidebb időn belül lefagyasztandók. A lefagyasztott komponensek - 20 °C-on 2 hónapig tárolhatók. A feloldott komponensek kétszeri fagyasztása a mérési eredményekben 10 %-nál nagyobb hibát nem okoz.

Adjunk a *lioofilizált standardhoz*(S1-S5) és *ellenőrző szérumhoz* 0,5 ml desztillált vizet, homogenizáljuk örvénykeverővel. Ügyeljünk a habzás elkerülésére. A rekonstituált oldatot legalább 20 percig még ne használjuk fel.

A *mosópuffer koncentrátumot* öntsük 700 ml desztillált vízhez. A kész oldat 2-8 °C-on a készlet lejáratú idejéig tárolható.

A *vizeletmintákat* hígítsuk S0-al. 20 µl vizelethez adjunk 180 µl S0 oldatot, majd vortexeljünk.

**FIGYELEM!**

A mérés megkezdése előtt a reagens oldatokat és a mérendő mintákat is engedjük

szobahőmérsékletre melegedni majd alaposan homogenizáljuk őket, de kerüljük el a habzást.

### A meghatározás menete (Folyamatábra)

- Jelöljük meg két-két csövet az alábbi célra:
  - összes beütésszám (T)
  - standard (S0-5) (S0=NSB)
  - ellenőrző szérum (C)
  - vizsgálandó minták (M<sub>x</sub>)
- Mérjük **50 µl** Standardot (S0-S5), illetve Ellenőrző szérumot (C), és szérummintát (M<sub>x</sub>) a megfelelő csövekbe.
- Mérjük minden csőbe **200 µl** Tracer oldatot.
- Örvénykeverővel homogenizáljuk a csövek tartalmát, kivéve a T jelű csöveket. Ha inkubáláshoz orbitális keverőt használunk, a kémcsövek egyedi keverésére nincs szükség. A csöveket – a T jelű csövek kivételével - helyezzük olyan állványba, mely biztosan rögzíti azokat, majd fedjük le őket zárófóliával. Rögzítsük az állványt a rázógépre.
- Indítsuk el a rázógépet, és állítsuk be a sebességet úgy, hogy a folyadék valamennyi csőben mozgásban legyen. Ezzel a kevertetéssel inkubáljuk a csöveket 3 órán keresztül szobahőmérsékleten.
- Adjunk minden csőhöz 1,5 ml mosópuffert, majd a csöveket az állvánnyal együtt fejfelé fordítva, egyetlen határozott, gyors mozdulattal öntsük le a felülűszót. A tartót változatlan helyzetben (visszafordítás nélkül!) tegyük papírvattára 2 percig. Győződjünk meg arról, hogy a csövek peremén nem maradtak folyadék-cseppek, majd fordítsuk vissza a szeparáló állványt.
- Ismételjük meg a 6. lépést.
- Ismételjük meg a 6. lépést.
- Mérjük meg az egyes csövek radioaktivitását gamma-számlálóval, legalább 60 másodperc számlálási idővel.

### Az eredmények számítása

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 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:

$$B/T\% = S1-5, C, M(\text{cpm}) - S0(\text{cpm}) / T(\text{cpm}) \times 100$$

A korszerű mérőkészülékek lehetővé teszik a radioaktivitás-mérést követő azonnali ("online") számítógépes adatfeldolgozást is. A sokféle feldolgozó program közül jelen készítményhez a simított spline eljárást ajánljuk. 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.

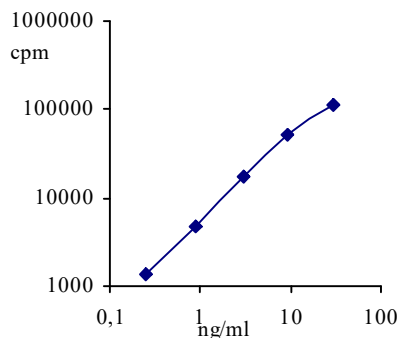
### Folyamatábra, pipettázási kalauz (térfogatok mikroliterben)

	T	S0-S5	C	M
Standard		50		
Ell. szérum			50	
Minta				50
Tracer	200	200	200	200
Kevertetés, 3 órán át szobahőmérsékleten				
Mosópuffer		1500	1500	1500
Folyadék leöntése, szárítás itatóspapíron				
Mosópuffer		1500	1500	1500
Folyadék leöntése, szárítás itatóspapíron				
Mosópuffer		1500	1500	1500
Folyadék leöntése, szárítás itatóspapíron				
Radoaktivitás mérés (min. 60 sec/cső)				

### Jellemző mérési eredmények

Cső	Beütés cpm	Átlag cpm	Bo/T %	ng/ml
T	273835 274213	274024		
S0	74 68	71	0,00	
S1	1363 1378	1370	0,47	
S2	4744 4815	4780	1,72	
S3	17158 18023	17591	6,39	
S4	50937 53632	52285	19,05	
S5	115771 118580	117176	42,74	
C	27956 26006	26981		4.5

### Jellemző standard görbe



### Minőségi jellemzők

A minőségi jellemzőket optimális körülmények között, 0-5 napos tracerrel, 3 mosással nyertük. Az adatok a hígítás nélküli assayre vonatkoznak (szérum mérése). Ha a mosáshoz nem rendelkezünk automata mosóval, úgy a munkaigény csökkentésére az utolsó mosás elhagyható. E lépés elhagyása érzékelhető változást csak az assay érzékenységében okoz.

### Az assay jellemző paraméterei

NSB/T <0,05% (2 mosás esetében <0,08 %)  
Bmax/T>35%

### Aalitkai érzékenység

Jelen készlettel az analitikai érzékenység a 0-standarddal 20 párhuzamos mérésből meghatározva 0,0056 ng/ml (2 mosás esetében 0,0186 ng/ml). Értéke egyenlő a 0-

standard Bo+2\*SD kötési értékéhez tartozó koncentrációval, mely értéket S0 és S1 közt lineáris interpolációval számoltuk.

### Funkcionális érzékenység

A funkcionális érzékenységet alacsony koncentrációjú minták inter-assay CV profil méréséből határoztuk meg. 10 assayból, spline görbeillesztési eljárást alkalmazva, a 0,072 és 0,126 ng/ml koncentrációjú minta közt lineáris interpolációt végezve, a 20 % CV-hez tartozó koncentrációra 0,105 ng/ml-t kaptunk.

### Nagy-dózisú Hook effektus

Hígítás nélküli mintákra 90 ng/ml-ig Hook effektust nem tapasztaltunk.

### Specifitás

A keresztreakciót az assayben azonos jelet adó C-peptid és keresztreakáló anyag tömegeinek arányából számoltuk.

Keresztreakáló anyag	Keresztreakció %
Humán inzulin	<0,04
Proinzulin	27,1

Nem diabéteszes személyek éhgyomri mintáiban a proinzulin moláris koncentrációja mintegy 5%-a a C-peptidének, ezért a keresztreakcióból származó C-peptid meghatározási pontatlanság mintegy 2-4 %-ra becsülhető.

### Ismert mennyiség visszanyerése

9 egyéni szérummintához ismert mennyiségű C-peptid-et adva, a koncentrációkat 3 fokozatban emelve, a visszanyerés átlaga 97,2±8,5% volt.

### Hígítási teszt

4 egyéni szérumminta nulla standarddal végzett sorozat-hígításakor (hígítás 2, 4, 8, 16) a várt (x) és a mért (y) koncentráció érték között az alábbi lineáris összefüggés adódott:  
 $y = 1,014x - 0,011$   $R = 0,9973$ ,  $n = 16$

### Pontosság és reprodukálhatóság

Az intra-assay pontosságot 20 párhuzamosan egy sorozaton belül, az inter-assay pontosságot 2 párhuzamosan, 12 független mérésben értékelve, 7 mintára az alábbi adatokat kaptuk.

Intra-assay		Inter-assay	
átlag (ng/ml)	CV %	átlag (ng/ml)	CV %
0,52	4,87	0,52	3,31
1,55	2,12	1,41	4,65
2,33	5,03	3,03	4,07
3,81	3,56	3,10	5,88
5,64	2,09	4,36	2,28
7,57	5,09	6,57	3,25
23,46	4,04	11,96	3,96

### Várható referens tartomány

Éhgyomri szérum egészséges önkéntesekben (n=27)

1,77 ±0,62 ng/ml, min 1,07 max 3,51

Nappali szérum egészséges önkéntesekben (n=71)

4,88 ±2,60 ng/ml, min 1,37, max 11,8

Éhgyomri vizelet egészséges önkéntesekben (n=29)

35,8 ±19,2 ng/ml, min 2,72, max 78,3.

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

### Átszámítás az SI mértékegységről

1 nmol/l = 3,617 ng/ml

1 ng/ml = 0,276 nmol/l

a standardizáláshoz használt preparátum molekula tömege alapján számolva

### Egyéb tudnivalók

A reagensek a gyártástól számítva általában legalább 8 hétig felhasználhatók. A pontos lejárat idő a kísérő bizonylaton és a dobozcímkén van feltüntetve.

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

### Biztonsági óvrendszabályok

#### Radioaktivitás

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 kitben levő humán szérumot tartalmazó komponensek előállításához használt szérum HIV(1/2) antitest, HBsAg antigén, Hepatitisz-C antitest és Treponema antitest 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.

Minden állati terméket és származékot egészséges állatokból nyerték. Mindezek ellenére az állati eredetű komponenseket tartalmazó reagenseket potenciálisan fertőzőként kell kezelni!

#### Mérgező anyagok

A készlet komponensei tartósítószerként nátrium-azidot tartalmaznak. A készlet összes nátrium-azid tartalma 66 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	<b>LOT</b>	Gyártási szám
	2-8°C-on tárolandó	<b>CONTROL</b>	Kontrol
	Lásd használati utasítás	<b>CAL</b>	Standard
	In vitro diagnosztikai eszköz	<b>CT</b>	Bevont cső
	Gyártó	<b>TRAC</b>	Tracer
<b>REF</b>	Katalógus szám	<b>WASHB</b>	Mosópuffer
	Radioaktív anyag		Vigyázat, lásd kapcsolódó dokumentumok
	Biológiai veszély		

**IZOTOP**

WEB oldal: <http://www.izotop.hu>

Technikai e-mail: [immuno@izotop.hu](mailto:immuno@izotop.hu)

Kereskedelmi e-mail: [commerce@izotop.hu](mailto:commerce@izotop.hu)

IZOTÓP INTÉZET Kft.  
1535 Budapest, Pf.: 851.  
Tel.: 392-2577, Fax: 395-9247