datum\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_ jméno\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_

***Téma praktika:***

**Radioimunoanalýza (RIA) - stanovení androstendionu**

1. ***Nastavení metody na gamaměřiči LB 2111***

Nadefinování metody, typu kalibrace, zadání cílových hodnot kalibrátorů, nastavení kontrol.

Seznámení s přístrojem - princip, validace přístroje.

1. ***Vlastní provedení stanovení androstendionu v pacientských vzorcích***

***Okruhy k nastudování a dotazy:***

1. Jaká značenka se v RIA používá nejčastěji?
2. Co je to ionizující záření?
3. Jaká jsou specifika pro -záření (jakých je energií, jaké vlnové délky, propustnost)?
4. Co se děje při „fotoefektu“ a při „Comptonově rozptylu“?

**Přístroje a pomůcky:**

Gama (-) měřič LB 2111 multidetektorový gama měřič (-counter) pro radioimunoanalýzu

Souprava na stanovení androstendionu (Immunotech)

Vzorky sér

**Teorie, princip stanovení**

Stanovení aldosteronu v séru nebo plazmě (heparin, EDTA) soupravou RIA (dodává Immunotech). Principem stanovení je kompetitivní radioimunoanalýza.

Standardy, kontrolní vzorky a vzorky plazmy/séra se inkubují ve zkumavkách potažených monoklonální protilátkou společně s radioindikátorem 125 I, který je navázán na antigen - anti-androstendion. Po inkubaci se odsaje obsah zkumavek a změří se vázaná radioaktivita vyjádřená v jednotkám *cpm*. Naměřená radioaktivita je nepřímo úměrná koncentraci analytu.

**Princip scintilačního detektoru**

-counter Berthold (LB 2111) slouží ke kvantitativnímu měření radioaktivity -záření (vyjádřeno v jednotkách *cpm*). -counter Berthold je vybaven scintilačním detektorem, který je založen na vzniku luminiscence při průchodu ionizujícího záření vhodnou látkou (scintilátorem). Pro detekci -záření se jako scintilační jednotky používají krystaly NaI/Tl. Při průchodu záření gama scintilačním krystalem dochází k fotoefektu a ke Comptonově rozptylu. Elektrony uvolněné z atomových obalů excitují atomy krystalu, přitom vzniká viditelné luminiscenční záření zvané *scintilace*. Pro přeměnu scintilací na elektrické impulsy se používají fotonásobiče. Systém LB 2111 je vybaven 12 scintilačními jednotkami a fotonásobičem.

**Reagencie**OSN-E

1. **Zkumavky potažené protilátkou proti androstendionu**: 2x 48 zkumavek.
2. **Radioindikátor - značený 125I: 1 lahvička (26 ml);** připravená k použití.

Lahvička obsahuje androstendion o celkové aktivitě 111 kBq (ke dni výroby) značeného 125I roztoku s bovinnými proteiny, obsahuje azid sodný.

1. **Standardy: 6 lahviček (lyofilizáty; à 0,5 ml deioniz. H2O):** kalibrační rozmezí 0 - 11,00 g/l. Koncentrace lyofilizovaného androstendionu v lidském séru s azidem sodným (< 0,1%) jsou uvedeny na lahvičkách.
2. **Kontrolní vzorky: 2 lahvičky (lyofilizáty; à 0,5 ml deioniz. H2O):** před použitím rozpustit v deionizované vodě, její objem je uveden na lahvičce.
3. **Promývací roztok (Wash Solution =WSkonc.):** 10 ml (k naředění 70x); Tris-HCl

Všechny reagencie soupravy uschovávejte v lednici při 2-8 °C. Aktuální koncentrace standardů a kontrolních materiálů jsou zaznamenány na lahvičkách. Pracovní promývací roztok se připravuje **vždy čerstvý** z koncentrovaného promývacího roztoku (WSkonc.). Naředí se potřebné množství. Ředí se 70x deionizovanou vodou.

**Pracovní postup**

1. Nechte všechny reagencie vytemperovat na laboratorní teplotu.
2. Očíslujteduplikátní sérii potažených zkumavek. Do každé zkumavky napipetujte **25 µl kalibrátoru, kontrolních vzorků a pacientských sér**. **Nachystejte si zkumavku pro celkovou aktivitu (Total; T).**
3. Do každé zkumavky napipetujte **250 µl radioindikátoru 125I**.
4. Zkumavky promíchejte na vortexu, zakryjte parafilmem a nechte inkubovat 1 h při 18-250C za stálého třepání (≥ 280 kmitů/min).
5. Odsajte obsah všech zkumavek, s výjimkou zkumavky pro celkovou aktivitu (T) a 1x promyjte zkumavky 2 ml čerstvě naředěného promývacího roztoku, promývací roztok odsajte.
6. Zvolte vyhodnocovací program **RIA Andro** a změřte radioaktivitu zkumavek – na -counteru nastaveném na 125I po dobu 1 minuty. Tím získáte vázané ***cpm* (B)** a ***cpm*** pro celkovou aktivitu **(T)**.

**Schéma pracovního postupu**

|  |  |  |
| --- | --- | --- |
| Krok 1**Dávkování** | Krok 2**Inkubace** | Krok 3**Měření** |
| Do potažených zkumavek dávkujte:* 25 μl vzorku séra/plazmy, standardu, kontrolního vzorku
* 250 μl radioindikátoru 125I
* zakryjte parafilmem
 | Inkubujte 1 h při 18-25°C za stálého třepání (≥ 280 kmitů/min). | Pečlivě odsajte obsah zkumavek, s výjimkou zkumavky pro celkovou aktivitu, 1x promyjte 2 ml čerstvě naředěného promývacího roztoku, promývací roztok odsajte. Ponechte okapat na savý podklad a pečlivě otřete okraj zkumavek.Změřte vázané *cpm* (Bound; B) a celkové *cpm* pro celkovou aktivitu (Total; T) po dobu 1 min. |

**Vyhodnocení**

Vyhodnocení se provádí pomocí kalibrační křivky, kdy na osu x se vynáší koncentrace v g/l a na osu y poměr B/Bo.

|  |  |  |  |  |  |  |  |
| --- | --- | --- | --- | --- | --- | --- | --- |
|  | **Total** | **Bo** | **Std1** | **Std2** | **Std3** | **Std4** | **Std5** |
| **Impulzy** |  |  |  |  |  |  |  |
| **c (teoretické)** |  |  |  |  |  |  |  |
| **c (naměřené)** |  |  |  |  |  |  |  |

|  |  |  |
| --- | --- | --- |
| ***Kontroly*** | ***Impulzy*** | ***c (naměřené)*** |
| **K1** |  |  |
| **K2** |  |  |

|  |  |  |
| --- | --- | --- |
| ***Vzorky*** | ***Impulzy*** | ***c (naměřené)*** |
|  |  |  |
|  |  |  |

***3. Klinická interpretace: referenční meze; uvést příklady ↓ a ↑ klinických hodnot.***

***4. Kdy jsou koncentrace androstendionu u pacientů mnohonásobně vyšší?***

***5. Popis bezpečnosti v RIA laboratoři (příklad kontrolní test ověření znalostí), monitorování pracovního prostředí v RIA laboratořích.***

***6. Fyzikální poločas rozpadu 125I je? Jaké jsou výhody a nevýhody stanovení RIA?***