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.

2. ***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 γ-záření (jakých je energií, jaké vlnové délky, propustnost)?
4. Co se děje při „fotoefektu“ a při „Comptonově rozptylu“?

Přístroje a pomůcky:

Gama (γ-) měřič LB 2111 multidetektorový gama měřič (γ-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

γ-counter Berthold (LB 2111) slouží ke kvantitativnímu měření radioaktivity γ-záření (vyjádřeno v jednotkách *cpm*). γ-counter Berthold je vybaven scintilačním detektorem, který je založen na vzniku luminiscence při průchodu ionizujícího záření vhodnou látkou (scintilátorem). Pro detekci γ-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

1. **Zkumavky potažené protilátkou proti androstendionu**: 2x 48 zkumavek.
2. **Radioindikátor - značený ^{125}I: 1 lahvička (26 ml);** připravená k použití.
   Lahvička obsahuje androstendion o celkové aktivitě 111 kBq (ke dni výroby) značeného ^{125}I roztoku s bovinnými proteiny, obsahuje azid sodný.
3. **Standardy: 6 lahviček (lyofilizáty; à 0,5 ml deioniz. H_2O):** kalibrační rozmezí 0 - 11,00 μg/l. Koncentrace lyofilizovaného androstendionu v lidském séru s azidem sodným (< 0,1%) jsou uvedeny na lahvičkách.
4. **Kontrolní vzorky: 2 lahvičky (lyofilizáty; à 0,5 ml deioniz. H_2O):** před použitím rozpustit v deionizované vodě,

její objem je uveden na lahvičce.

5. **Promývací roztok (Wash Solution =$WS_{konc.}$):** 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 ($WS_{konc.}$). Naředí se potřebné množství. Ředí se 70x deionizovanou vodou.

Pracovní postup

1. Nechte všechny reagencie vytemperovat na laboratorní teplotu.
2. Očíslujte duplikátní 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 ^{125}I**.
4. Zkumavky promíchejte na vortexu, zakryjte parafilmem a nechte inkubovat 1 h při 18-25^{0}C 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 γ-counteru nastaveném na ^{125}I 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 ^{125}I • 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 µg/l a na osu y poměr B/B_o.

	Total	**B_o**	**Std1**	**Std2**	**Std3**	**Std4**	**Std5**
Impulzy							
c (teoretické)							
c (naměřené)							

Vzorky	***Impulzy***	***c (naměřené)***

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

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 ^{125}I je? Jaké jsou výhody a nevýhody stanovení RIA?