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

***Téma praktika:***

**Praktické cvičení radioimunoanalýza - stanovení 17-OH-progesteronu**

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 17- hydroxyprogesteronu 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:**

Gamaměřič LB 2111 multidetektorový gama měřič pro radioimunoanalýzu

Souprava na stanovení 17-hydroxyprogesteronu (Immunotech)

Vzorky sér

**Teorie, princip stanovení**

Stanovení 17 –hydroxyprogesteronu v séru nebo plazmě (heparin, EDTA) soupravou RIA (dodává Immunotech). Principem stanovení je kompetitivní radioimunoanalýza.

Standardy, kontrolní vzorky a vzorky se inkubují ve zkumavkách potažených monoklonální protilátkou společně s radioindikátorem 125 I značených 17-OH-progesteron. Po inkubaci se odsaje obsah zkumavek a změří se vázaná radioaktivita. Naměřená radioaktivita 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 polyklonální protilátkou proti 17-OH progesteronu**: 2x 50 zkumavek.
2. **Radioindikátor - značený 125I: 1 lahvička (45 ml);** připravená k použití.

Lahvička obsahuje aktivitu 640 kBq (ke dni výroby) 17-OH progesteronu značeného 125I roztoku s hovězím sérovým albuminem, obsahuje azid sodný.

1. **Standardy: 6 lahviček (0,5 ml);** kalibrační rozmezí 0-37 ng/ml (111,96 nmol/l). Koncentrace jsou uvedeny na lahvičkách.
2. **Kontrolní vzorky: 2 lahvičky (0,5 ml):** lyofilizovaný, před použitím rozpustit v destilované vodě, její objem je uveden na lahvičce.Aktuální koncentrace je znázorněna na lahvičce.
3. **Promývací roztok: 1 lahvička (50 ml):** rozpustit v 950 ml destilované vody. Takto je stabilní až do data expirace.

Všechny reagencie soupravy uschovávejte v lednici při 2-8 °C. Aktuální koncentrace standardů a kontrolních materiálů jsou zaznamenány na lahvičkách.

**Pracovní postup**

1. Nechte všechny reagencie vytemperovat na laboratorní teplotu.
2. Očíslujteduplikátní sérii potažených zkumavek. Do každé zkumavky napipetujte 25µl kalibrátoru, kontrolních vzorků a pacientských sér. Nachystejte i zkumavku pro celkovou aktivitu (T)
3. Do každé zkumavky napipetujte 400 µl radioindikátoru.
4. Zkumavky promíchejte na vortexu, zakryjte parafilmem a nechte inkubovat v třepačce na 2 hodiny.
5. Odsajte a promyjte pomocí 2 ml promývacího roztoku zkumavky pro celkovou aktivitu (T). **Celkem dvakrát!!!**
6. Zvolte vyhodnocovací program RIA 17- OH a změřte radioaktivitu zkumavek – v gama-čítači nastaveném na 125I, po dobu 1 minuty. Tím získáte vázané cpm (B) a celkovou aktivitu (T).

**Schéma pracovního postupu**

|  |  |  |
| --- | --- | --- |
| Krok 1  dávkování | Krok 2  Inkubace | Krok 3  měření |
| Do potažených zkumavek dávkujte:   * 25 μl vzorku, standardu, kontrolního vzorku * 400 μl radioindikátoru * Zakryjte parafilmem | Inkubujte 2 hodiny  při 18-25°C za třepání | Pečlivě odsajte a promyjte pomocí promývacího roztoku a odsajte obsah zkumavek.  Promytí 2x kromě zkumavky pro celkovou aktivitu.  Změřte vázané cpm (bound) a celkové cpm (Total) |

**Vyhodnocení**

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

**Přepočítací faktor: ng/ml x 3,026= nmol/l**

|  |  |  |  |  |  |  |  |
| --- | --- | --- | --- | --- | --- | --- | --- |
|  | Total | Bo | STD1 | STD2 | STD3 | STD4 | STD5 |
| impulzy |  |  |  |  |  |  |  |
| C teoret. |  |  |  |  |  |  |  |
| C měřená |  |  |  |  |  |  |  |

|  |  |  |
| --- | --- | --- |
| *kontroly* | *impulzy* | *c naměřená* |
| K1 |  |  |
| K2 |  |  |

|  |  |  |
| --- | --- | --- |
| *vzorky* | *impulzy* | *c naměř.* |
|  |  |  |
|  |  |  |

1. ***Klinická interpretace: uvést referenční rozmezí M, Ž + příklady ↓ a ↑ klinických hodnot.***
2. ***Proč se provádí u dětí do 6 měsíců věku extrakce?***
3. ***Popis bezpečnosti v RIA laboratoři (příklad kontrolní test ověření znalostí), monitorování pracovního prostředí v RIA laboratořích.***

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