

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.

2. Vlastní provedení stanovení 17- hydroxyprogesteronu v patientských vzorcích

Okruhy k nastudování a dotazy:

1. Jaká značka 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:

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 nepřímou úměrnou 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 polyklonální protilátkou proti 17-OH progesteronu:** 2x 50 zkumavek.
2. **Radioindikátor - značený ^{125}I :** 1 lahvička (45 ml); připravená k použití.
Lahvička obsahuje aktivitu 640 kBq (ke dni výroby) 17-OH progesteronu značeného ^{125}I roztoku s hovězím sérovým albuminem, obsahuje azid sodný.
3. **Standardy: 6 lahviček (0,5 ml);** kalibrační rozmezí 0-37 ng/ml (111,96 nmol/l). Koncentrace jsou uvedeny na lahvičkách.

4. **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.
5. **Promývací roztok: 1 lahvička (50 ml):** rozpustit v 950 ml destilované vody. Takto je stabilní až do data expirace.

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

Pracovní postup

1. Nechte všechny reagensie vytemperovat na laboratorní teplotu.
2. Očíslete duplikátní sérii potažených zkumavek. Do každé zkumavky napipetujte 25 μ l kalibrátoru, kontrolních vzorků a patientských sér. Nachystejte i zkumavku pro celkovou aktivitu (T)
3. Do každé zkumavky napipetujte 400 μ l 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: <ul style="list-style-type: none"> • 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							

vzorky	impulzy	c naměř.

kontroly	impulzy	c naměřená
K1		
K2		

3. **Klinická interpretace: uvést referenční rozmezí M, Ž + příklady ↓ a ↑ klinických hodnot.**
4. **Proč se provádí u dětí do 6 měsíců věku extrakce?**
5. **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?**