

PROGESZTERON [¹²⁵I] RIA KÉSZLET (Ref: RK-460M)

A progeszteron [¹²⁵I] RIA készlet humán szérumban progeszteron tartalmának in vitro direkt meghatározására szolgál. A kötött antigén elválasztása mágneses immunoszorbens segítségével történik. A készlet 100 meghatározásra elegendő reagenst tartalmaz, amellyel két párhuzamos mérés esetén 41 minta progeszteron koncentrációja határozható meg, az 0 -120 nmol/l (0 - 37,7 ng/ml) mérési tartományban.

Bevezetés

A progeszteron a sárgatestben keletkezik a normál menstruációs ciklus második fázisában. Kis koncentrációban a mellékvese kéreg is termeli, mind férfiaknál, mind nőknél. A terhesség hetedik hete után, a progeszteron fő forrása a méhlepény. A progeszteron plazmaszintek változása indikátora a menstruációs ciklus egyes fázisainak, a menstruációs rendellenességeknek, és a meddőségnek egyaránt.

A mérés elve

A készlet működése a kompetitív radioimmunoassay elvén alapul. A ¹²⁵I-dal jelzett állandó mennyiségű progeszteron vetelkedik a mintában jelenlévő (mérő) jelzetlen progeszteronnal a korlátozott számú antitest kötohelyekért. A reakció lejátszódása után a rendszerhez adott szilárd fázisú mágneses immunoszorbens az antitesthez kötött jelzett antigént megkötöti. Az antitesthez kötött jelzett progeszteron radioaktivitása, amely fordítottan arányos a minta progeszteron koncentrációjával, gamma-számlálóval mérhető. A standardok relatív kötésiértékei és koncentrációi ismeretében szerkesztett méro-(standard)-görbéről, a minták relatív kötésiértékei alapján, azok progeszteron-koncentrációja meghatározható.

A készlet tartalma

- 1 TRACER, felhasználásra kész.
flak. 11 ml pufferes oldat, 0,1% nátrium-azid tartósítóval radioaktivitása < 115 kBq
- 1 ANTISZÉRUM, felhasználásra kész.
flak. 11 ml pufferes oldat, 0,1% nátrium-azid tartósítóval
- 6 STANDARD₍₁₋₆₎, felhasználásra kész humán szérumban 0,1% nátrium-azid tartósítóval. S₁= 1 ml, S₂₋₆ = 0,5 ml koncentrációjuk 0 (S₁), 1,5 (S₂), 4 (S₃), 12 (S₄), 40 (S₅), 120 (S₆) nmol/l

1 ELLENORZO SZÉRUM, felhasználásra kész. 0,5 ml humán szérumban 0,1% nátrium-azid tartósítóval.

1 MÁGNESES IMMUNOSZORBENS üveg szuszpenzió, felhasználásra kész, 55 ml puffer-alapú szuszpenzió, 0,1% nátrium-azid tartósítóval

1 db Minőségellenőrzési bizonylat

1 db Használati utasítás

A készlet felhasználásához szükséges anyagok és eszközök

muanyag csövek és csotartó adagoló pipetták, 50, 100, és 500 µl-es eldobható muanyag hegyekkel örvénykevero (vortex) mágneses ülepítő berendezés kémcsotartóval (pl. Amerlex-M szeparátor), vagy huthető centrifuga papírvatta gamma-számláló

Ajánlott:

sorozat-adagoló (ismétlő) pipetta és orbitális kevero

A mérő minták gyűjtése és tárolása

A vizsgálandó szérumbintákat a más, ugyancsak szérumban igényelt laboratóriumi vizsgálatoknál követett módon készítjük el. Amennyiben a progeszteron-meghatározás a mintavétel követő 1-2 napon belül megtörténik, a mintákat +2 - +8 °C-on, későbbi felhasználás esetén -18 °C-on mélyhűtve tartjuk. A magas progeszteron koncentrációjú mintát a nulla standarddal (S₁) hígíthatjuk. Lipémiás, hemolizált, vagy más szempontból rendellenes szérumban nem használunk mérésre.

A reagensek elokészítése

A standard, az antiszérumban, a tracer, az ellenorzo szérumban oldatok és a mágneses immunoszorbens szuszpenzió használatra kész.

A meghatározás menete

(ld. folyamatábrára, 1. táblázat)

- 1) Hagyjuk az összes reagenst szobahőmérsékletre melegedni.
- 2) Jelöljük meg két-két muanyag csövet az alábbi célra: összes beütésszám (T), nem specifikus kötés (NSB), standard (S₁₋₆) (S₁=B₀), ellenorzo szérumban (C), vizsgálandó minták (M_x)
- 3) Felhasználás előtt a mintákat és az összes reagenst alaposan homogenizáljuk, de kerüljük el a habzást.
- 4) Mérjük meg 50 µl STANDARDot (S₁₋₆), illetve ELLENORZO SZÉRUMot (C), és szérumbintát (M_x) a megfelelő csövekbe.
- 5) Mérjük meg minden csöve 100 µl ¹²⁵I-TRACER oldatot.
- 6) Mérjük meg minden csöve 100 µl ANTISZÉRUM oldatot, kivéve a T és NSB

jelu csöveket. A kinetikus effektus kiküszöbölése érdekében az utolsó reagens hozzáadásának időtartamát a lehetséges minimumra kell szorítani. Általános szabályként ez a lépés öt percnél ne legyen hosszabb. Ez célszerűen sorozat-adagoló pipettával biztosítható.

7) Örvénykeveroval homogenizáljuk a csövek tartalmát, kivéve a T jelű csöveket.

Orbitális keveroval használva a kémcsövek egyedi keverésére, nincs szükség, azokat a szeparátor tartóállványában hagyva, a keverés egyszerre elvégezhető.

8) Inkubáljuk a csöveket 2 órán keresztül szobahőmérsékleten (20-25°C).

9) Alaposan rázzuk össze a mágneses immunoszorbens, majd adjunk 500 µl-t minden csövhöz, kivéve a T jelű csöveket. Ezt a műveletet legcélszerűbb ismétlő pipettával végezni.

10) Örvénykeveroval homogenizáljuk a csövek tartalmát. Amennyiben ismétlő pipettával dolgozott, vortexelés helyett elegendő, ha a csöveket a csotartó állvánnyal együtt enyhén összerázza. Vortexelés után inkubáljuk a csöveket 15 percig szobahőfokon.

11) Mágneses szeparálással vagy centrifugálással válasszuk el az antitesthez kötött frakciót az alábbiak szerint.

Mágneses szeparálás: Tegyük a csöveket, kivéve a T jelűeket, a mágneses szeparáló csotartójába úgy, hogy mindegyik cső érintse a mágneslapot. Hagyjuk szobahőmérsékleten 5 percig állni. Ülepítés után ne távolítsuk el a kémcsotállványt a mágneslapról. A csotartót a lappal együtt fejjel lefelé fordítva öntsük le a felülülzöt, majd ebben a helyzetben helyezzük a csöveket papírvattára. A cső peremén maradt folyadék-cseppeket itassuk le.

Ügyeljünk arra, hogy leöntéskor a felülülzöt kívülről visszafolyva ne szennyezze el a kémcsövek külső felületét.

Centrifugálás: Centrifugáljuk a csöveket +4°C-on, 1500-2000 g-vel, legalább 15 percig. Szívjuk le (ne dekantáljuk) a felülülzöt, vigyázzunk arra, hogy a csapadék ne keveredjen fel.

12) Mérjük meg az egyes csövek akitvitását gamma-számlálóval, legalább 60 másodperc számlálási idővel.

13) Számítsuk ki az eredményeket a következő fejezet szerint.

1. táblázat. A vizsgálat folyamatábrája (az adatok mikroliterben értendők) T=teljes beütésszám, NSB=nem specifikus kötés, S₁₋₆ standardok, C=ellenorzo szérumban, M_x=minták)

Reagens	T	NSB	S ₁₋₆	C	M _x
Standard 1-6			50		
Ellenorzo szérumban				50	
Minták					50
¹²⁵ I Tracer	100	100	100	100	100
Antiszérumban			100	100	100

Keverés, inkubálás szobahomérosékleten 2 órán át.					
Mágneses immunosz.		500	500	500	500
Keverés, inkubálás szobahomérosékleten 15 percig					
Mágneses elválasztás (5 perc), vagy centrifugálás (15 perc, 1500xg)					
Feltűsző eltávolítása, radioaktivitás mérése, eredmények kiértékelése					

Az eredmények számítása

Számítsuk ki a párhuzamos csövek beütésszámainak középértékét (CPM).

A kapott CPM értékek alapján számítsuk ki a B_0/T -t az alábbi egyenlettel:

$$B_0/T \% = 100 * (S_1 - NSB) / (T - NSB)$$

(Ez az érték a mérés egyik minőségi mutatója, amelynek kiszámítása a minta-koncentrációk meghatározásához nem feltétlenül szükséges.)

Számítsuk ki a standardok, az ellenőrző szérum és a minták kötési százalékát az alábbi egyenlettel:

$$B/B_0 \% = 100 * (S_{2-6} ; C ; M_k - NSB) / (S_1 - NSB)$$

Egy jellegzetes mérési adatsort foglalj össze a 2. táblázat.

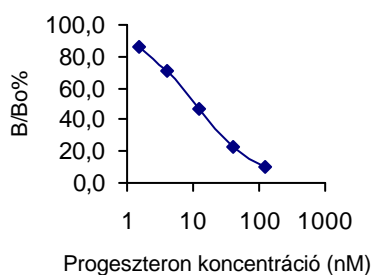
Ábrázoljuk a standardokra mért beütésszámokból számított B/B_0 értékeket a standard koncentrációjának függvényében (lásd az 1. ábrát). Az így kapott standard görbéről (mérőgörbéről) olvassuk le a vizsgált minta B/B_0 értékeihez tartozó koncentrációt. A korszerű mérőkészülékek lehetővé teszik a radioaktivitás-mérést követő azonnali ("on-line") számítógépes adatfeldolgozást is.

2. táblázat. Jellemző mérési adatok

Csővek	Beütés CPM1	Beütés CPM2	Átlag CPM	B/T %	B/Bo %
T	45230	46214	45722		
S1	18517	18728	18623	38,7	100,0
S2	16281	16068	16175	33,4	86,2
S3	13515	13284	13400	27,3	70,5
S4	9294	8980	9137	18,0	46,4
S5	5003	4844	4924	8,8	22,6
S6	2694	2880	2787	4,1	10,6
C	5858	5790	5824	10,7	27,7
NSB	869	962	915,5	2,0	

1. ábra.

Jellemző standard görbe (mintamérésre nem használható)



Minőségi jellemzők

Az assay jellemző paraméterei (n=20).

B_0/T	$47 \pm 9 \%$
NSB/T	$< 3 \%$
ED-50	$14 \pm 6 \text{ nmol/l}$
kimutatási határ	$0,44 \pm 0,12 \text{ nmol/l}$

A feltüntetett kimutatási határ (érzékenység) a 0-standard ($\pm 2 * SD$ szórás által meghatározott) konfidencia-intervallumától szignifikánsan megkülönböztethető legkisebb koncentrációt jelenti.

Specifitás

A specifitást a keresztreakcióval jellemezzük, úgy, hogy az 50 %-os gátlást okozó progeszteron koncentráció százszorosát osztjuk a keresztreakáló anyag ugyancsak 50 %-os gátlást eredményező koncentrációjával.

Anyag	Keresztreakció %
Progeszteron	100
17- α -hidroxiprogeszteron	13
pregnenolon	0,03
kortizol	0,07
kortikoszteron	0,6
11-dezoxi-17-hidroxikortikoszteron	0,08
tesztoszteron	0,01
5- α -dihidrotesztoszteron	$< 0,001$
ösztriol	0,003
17- α -ösztadiol	$< 0,001$
dehidroepiandrosteron	$< 0,001$

Ismert mennyiség visszanyerése

Egyéni szérummintákhoz ismert mennyiségű progeszteront adva, a visszanyerés (recovery) $97,3 \pm 5,7 \%$ (középérték $\pm SD$, n= 21).

Hígítási teszt (linearity)

Egyéni szérumminták nulla standarddal végzett sorozat-hígításakor a várt (x) és a mért (y) koncentráció érték között az alábbi lineáris összefüggés adódott:

$$y = 1,02 x - 0,27, R = 0,9988$$

Pontosság és reprodukálhatóság

Az intraassay pontosságot 9 párhuzamossal egy sorozaton belül, az interassay pontosságot 2 párhuzamossal, 9 független mérésben értékelve az alábbi adatokat kaptuk.

Intra-assay		Inter-assay	
átlag (nmol/l)	CV %	átlag (nmol/l)	CV %
2,51	10,2	2,7	11,8
22,9	3,2	23,6	6,4
54,9	3,5	55,8	5,8

Várható referens tartomány:

follikuláris fázis 0,6-3,8 nmol/l (0,2-1,2 ng/ml)

luteális fázis 10,5-58 nmol/l (3,3-18,2 ng/ml)

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

Átszámítás az SI mértékegységre

$$\text{Inmol/l} = 0,3145 \text{ ng/ml}$$

$$1 \text{ ng/ml} = 3,18 \text{ nmol/l}$$

Egyéb tudnivalók

Tárolás

A készlet komponensei felnyitás előtt és után 2-8 °C között tárolhatók a lejáratú időn belül.

A készlet lejáratú ideje

A reagensek a gyártástól számítva általában legalább 8 hétig felhasználhatók. A pontos lejáratú idő a kísérő bizonylaton és a doboz-címkén van feltüntetve. A tartósság optimális

kihasználására javasoljuk a laboratóriumoknak, hogy rendeléseiket a készlet-gyártási naptárhoz igazítsák. Felhívjuk a figyelmet arra, hogy a különböző gyártási számú készletek egyes komponensei nem helyettesíthetők sem egymással, sem más gyártó progeszteron készleteknek komponenseivel.

Biztonsági óvórendszabályok

Radioaktivitás













A készlet radioaktív anyagot tartalmaz. A felhasználó laboratóriumok felelőssége, hogy munkájuk során a radioaktív anyagok tárolására, felhasználására, és kezelésére vonatkozó törvényi szabályozás és hatósági előírások szerint járjanak el.

Fertőzésveszély

A kitben lévő humán szérumot tartalmazó komponensek előállításához felhasznált szérum HIV-Ab és HBsAg 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.

Mérgező anyagok

A készlet komponensei tartósítószerként nátrium-azidot tartalmaznak. A készlet összes nátrium-azid tartalma 81 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 csatorna hálózatba.

	Lejárat		Gyártási szám
	2-8°C-on tárolandó		Kontrol
	Vigyázat, lásd kapcsolódó dokumentumok		Standard
	Biológiai veszély		Mágneses immun-szorbens
	Lásd használati utasítás		Tracer
	In vitro diagnosztikai eszköz		Antiszérum
	Gyártó		
	Katalógus szám		
	Radioaktív anyag		



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

Technikai e-mail: immuno@izotop.hu

Kereskedelmi e-mail: commerce@izotop.hu



IZOTÓP INTÉZET Kft.

1535 Budapest, Pf.: 851.

Tel.: 392-2577, Fax: 395-9247