

PROGESZTERON [I-125] RIA KÉSZLET

(Ref: RK-460CT)

A Progeszteron [I-125] RIA készlet humán szérum Progeszteron tartalmának in vitro direkt meghatározására szolgál. A készlet 100 meghatározásra elegendő reagenst tartalmaz, amellyel két párhuzamos mérés esetén 43 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 Progeszteron mennyiségi meghatározására alkalmas jelen készlet működése a kompetitív radioimmunoassay elvén alapul. ¹²⁵I-dal jelzett állandó mennyiségű Progeszteron vetelkedik a mintában jelenlevő (méréndő) jelzetlen Progeszteronnal a korlátozott számú antitest kötéshelyekért. A reakció lejátszódása alatt a reaktív kémcső az antitesthez kötött antigént megköti. A bevont cső felületén lévő jelzett antigén radioaktivitása, amely fordítottan arányos a minta Progeszteron koncentrációjával, gamma-számlálóval mérhető. A standardok relatív kötésiértékei és koncentrációi ismeretében szerkesztett mérő-(standard) görbéről, a minták relatív kötésiértékei alapján, azok Progeszteron koncentrációja meghatározható.

A készlet tartalma

- | | |
|---------|--------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|
| 1 flak. | TRACER, felhasználásra kész. ¹²⁵ I-dal jelzett Progeszteron 11 mL pufferes oldatban, 0,1% NaN ₃ tartósítóval, radioaktivitása < 260 kBq. |
| 1 flak. | ANTISZÉRUM, felhasználásra kész. Biotinilált anti-Progeszteron monoklonális antitestet tartalmaz. 11 mL pufferes oldat, 0,1 % NaN ₃ tartósítóval. |
| 6 üveg | STANDARD(1-6), felhasználásra kész, humán szérum 0,1% NaN ₃ tartósítóval. S ₁ = 1 mL, S ₂ -S ₆ = 0,5 mL, koncentrációjuk 0 (S ₁), 0,8 (S ₂), 3,6 (S ₃), 11 (S ₄), 33 (S ₅), 120 (S ₆) nmol /L. |
| 1 üveg | ELLENŐRZŐ SZÉRUM, felhasználásra kész. 0,5 mL humán szérum 0,1 % NaN ₃ tartósítóval. Koncentrációját a kísérő minőségellenőrzési bizonylat tartalmazza. |
| 2 dob. | BEVONT CSŐ, 2x50 db, 12x75 mm-es szabvány RIA kémcső, zárt műanyag dobozban. |
| 1 flak. | MOSÓPUFFER KONCENTRÁTUM. 20 mL, 0,2 % NaN ₃ tartósítóval. 700 mL desztillált vízzel hígítandó. |
| 1 db | Minőségellenőrzési bizonylat |
| 1 db | Használati utasítás |

A készlet felhasználásához szükséges anyagok és eszközök

- kémcsőtartó, rugalmas kémcső rögzítővel
- adagoló pipetták, 20, 100 µL-es eldobható műanyag hegyekkel.
- diszpenzer 2 mL-re.
- örvénykeverő (vortex)
- rázógépj vagy orbitális keverő
- kémcsőzáró műanyag folia
- papírvatta vagy itatóspapír
- gamma-számláló

Ajánlott: sorozat-adagoló (ismétlő) pipetta

A mérendő minták gyűjtése és tárolása

A vizsgálandó szérummintákat a más, ugyan-csak szérumot igénylő laboratóriumi vizsgálatoknál követett módon készítjük el. Amennyiben a Progeszteron-meghatározás a mintavételt 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 szérumot ne használjunk mérésre.

A reagensek előkészítése

A mosópuffer koncentrátumot öntsük 700 mL desztillált vízhez. A kész oldat 2-8 °C-on a készlet lejárati idejéig tárolhatjuk.

A standard, az antiszérum, a tracer, az ellenőrző szérum oldatok használatra kész állapotban vannak. Hagyjuk a reagenseket szobahőmérsékletre melegedni. Felhasználás előtt a mintákat és a reagenseket alaposan homogenizáljuk. Kerüljük el a habzást.

A meghatározás menete

(lásd folyamatábra)

1. Jelöljük meg két-két csövet az alábbi célra:
 - összes beütésszám (T) Nem bevont cső!
 - standard (S₁-S₆)
 - ellenőrző szérum (C)
 - vizsgálandó minták (M_x)
2. Mérjük **20 µL** Standardot (S₁-S₆), illetve Ellenőrző szérumot (C), és szérummintát (M_x) a megfelelő csövekbe.
3. Mérjük minden csőbe **100 µL** Tracer oldatot.
4. Mérjük minden csőbe **100 µL** Antiszérum oldatot (kivéve T).
5. A csöveket – a T jelű csövek kivételével - helyezzük olyan állványba, mely biztosan rögzíti azokat, majd fedjük le őket zárófoliával. Rögzítsük az állványt a rázógépre.
6. Indítsuk el a rázógépet, és állítsuk be a sebességet úgy, hogy a folyadék valamennyi csőben mozgásban legyen (min. 600 rpm). Ezzel a kevertetéssel inkubáljuk a csöveket 1 órán keresztül szobahőmérsékleten.
7. Adjunk minden csőhöz 2 mL mosópuffert, majd a csőtartó állványt fejjel lefelé fordítva, egyetlen határozott, gyors mozdulattal öntsük le a felüliszót, majd a tartót változatlan helyzetben (visszafordítás nélkül!) tegyük papírvattára 5 percig. Győződjünk meg arról, hogy a csövek peremén nem maradtak folyadék cseppek.
8. Mérjük meg az egyes csövek radioaktivitását gamma-számlálóval, legalább 60 másodperc számlálási idővel.

1. táblázat. A vizsgálat folyamatábrája (az adatok mikroliterben értendők) T=teljes beütésszám, S₁₋₆ standardok, C=ellenőrző szérum, M_x=minták)

Reagens	T	S ₁₋₆	C	M _x
Standard 1-6		20		
Ellenőrző szérum			20	
Minták				20
¹²⁵ I Tracer	100	100	100	100
Antiszérum		100	100	100
Kevertetés 1 órán át szobahőmérsékleten.				
Mosópuffer		2000	2000	2000
Folyadék leöntése, szárítás itatóspapíron				
Radoaktivitás mérés (min. 60 sec/cső)				
Adatfeldolgozás				

Az eredmények számítása

Számítsuk ki a párhuzamos csövek beütésszámainak középértékét (CPM).

A kapott CPM értékek alapján számítsuk ki a B₀/T-t az alábbi egyenlettel:

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

(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:

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

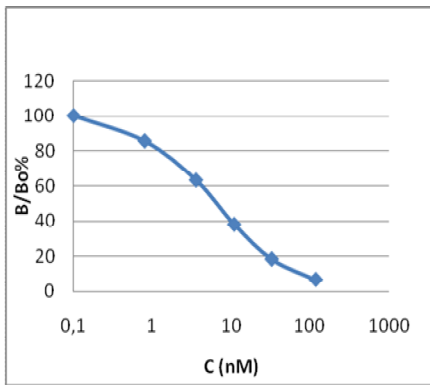
Egy jellegzetes mérési adatsort foglal össze a 2. táblázat.

Ábrázoljuk a standardokra mért beütésszámokból számított B/B₀ értékeket a standard koncentrációjának függvényében (lásd az 1. ábrát). Az így kapott standard görbéről (mérőgörbéről) olvassuk le a vizsgált minta B/B₀ értékeihez tartozó koncentrációt. A korszerű mérőkészülékek lehetővé teszik a radioaktivitás-mérést követő azonnali ("on-line") számítógépes adatfeldolgozást is.

2. táblázat. Jellemző mérési adatok

Csővek	Átlag CPM	B/T %	B/Bo %
T	68202		
S1	53434	78,3	100
S2	45958	67,4	86,0
S3	35030	51,4	65,6
S4	21448	31,4	40,1
S5	10604	15,5	19,8
S6	4051	5,9	7,6
C	11390	16,7	21,3

1. Ábra. Jellemző standard görbe (mintamérésre nem használható)



Minőségi jellemzők

Az assay jellemző paraméterei:

Bo/T 76 ± 6 %
ED-50 6,7 ± 2 nmol/L

Kimutatási határ: 0,11 nmol/L

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

Specifitás

Nulla koncentrációjú standardhoz 70 és 700 nM koncentrációban különböző szteroidokat adtunk és mértük a látszólagos Progesteron koncentrációt. 700 nM-ig a következő anyagok nem detektálhatók az adott készletben: 17β-ösztadiol, 5α-dihidrotesztozsteron, 5β-dihidro19-nortesztozsteron, androszténdiol, aldostezsteron, ösztroon. A DHEA-S keresztreakcióját 30 μM koncentrációig vizsgáltuk. 30 μM DHEA-S koncentrációnál a látszólagos Progesteron koncentráció 0,28 nM volt. Az alábbi táblázatban láthatók a mérhető keresztreakciót adó anyagok.

Hozzáadott szteroid koncentráció	70 nM	700 nM
	Mért Progesteron nM	
17 α metil tesztoszteron	0,25	0,22
Kortizol	0,18	0,25
19-nor tesztoszteron	0,25	0,28
Kortizon	0,21	0,28
Androszténdiol	0,21	0,3
Androszténdion	0,12	0,34
Deoxikortizol	0,12	0,39
Tesztoszteron	0,1	0,42
17 α OH Progesteron	0,3	0,81
Pregnenolon szulfát	0,35	3,57
Pregnenolon	0,5	4,99
Kortikoszteron	1,07	12,01
Deoxikortikoszteron	1,66	14,21

Addíciós teszt

A mérés során 5 db egyedi humán szérumból ismert mennyiségű standard antigént vittünk be három különböző koncentrációban és vizsgáltuk a kiindulási és a megemelkedett koncentráció szinteket.

A visszanyerés 90,4% ± 4,7% volt (átlag±SD).

Hígítási teszt

Egyedi szérumból S₀ standarddal végzett sorozat-hígítások a várt (x) és a mért (y) koncentrációértékek között az alábbi lineáris összefüggés adódott:

$$y = 1,0009x - 0,1259 \quad R^2 = 0,9987 \quad n = 10$$

Pontosság és reprodukálhatóság

Az intra-assay pontosságot 20 párhuzamossal egy sorozaton belül, az inter-assay pontosságot 2 párhuzamossal, 20 független mérésben értékelve az alábbi adatokat kaptuk.

Intra-assay		Inter-assay	
átlag (nmol/L)	CV %	átlag (nmol/L)	CV %
1,87	6,7	1,78	17,3
5,61	3,6	5,33	6,1
17,65	2,4	18,4	3,4
26,35	2,4	27,67	3,1
64,6	2,8	66,6	8,2
80,48	2,2	76,5	5,1

Várható referens tartomány:

	N	Minimum (nmol/L)	Maximum (nmol/L)	
Férfiak	43	0,62	3,75	
Női ciklus	Folikuláris	31	0,33	5,98
	Ovuláció	21	0,24	4,76
	Luteális	22	12,9	70,0
Posztmenopauza	49	0,12	2,27	
Gyerek (3-10 év)	64	0,37	3,59	

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

Átszámítás az SI mértékegységről

$$1 \text{ nmol/L} = 0,315 \text{ ng/mL}$$

$$1 \text{ ng/mL} = 3,18 \text{ nmol/L}$$

Egyéb tudnivalók

Felhívjuk a figyelmet arra, hogy a különböző gyártási számú készletek egyes komponensei nem helyettesíthetők sem egymással, sem más gyártó készletének komponenseivel.

Megjegyzések, tanácsok

1) Figyelem, hibaforrás! A bevont kémcsövek nem tartalmaznak külön feliratot. Közösleges kémcsövekkel való összetévesztésük komoly mérési hibákhoz vezethet! Ennek elkerülésére a műanyag dobozból soha ne vegyünk ki többet a szükséges mennyiségnél, illetve a felhasználatlan kémcsöveket azonnal tegyük vissza eredeti tartódobozukba.

2) Figyelem, hibaforrás! Kevertetésre csak olyan kémcsőtartó használható, amelyben a csövek rögzítve vannak. "Lötyögős" állványban a kémcsövek tartalma egyáltalán nem, vagy egyenetlenül keveredik, annak ellenére, hogy maga az állvány, és a kémcső mozgásban van. Egyenetlen, illetve tökéletlen keverés teljesen hamis (fals alacsony!) mérési eredményekhez vezethet!

Biztonsági óvőrendszabályok

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 levő humán szérumból tartalmazó komponensek előállításához felhasznált szérumból HIV(1/2) antitest, HBsAg antigén, Hepatitisz-C antitest és Treponema antitest vizsgálatra negatív eredményt adott. Ennek ellenére a humán szérumból 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 66 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 idő		Gyártási szám
	2-8°C-on tárolandó		Ellenőrző szérumból
	Vigyázat, lásd kapcsolódó dokumentumok		Standard
	Biológiai veszély		Bevont cső
	Lásd használati utasítás		Tracer
	In vitro diagnosztikai eszköz		Antisérumból
	Gyártó		Mosó puffer
	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