

TESZTOSZTERON [I-125] RIA KÉSZLET

(Ref: RK-61CT)

A tesztoszteron [¹²⁵I] készlet humán szérum tesztoszteron tartalmának in vitro direkt meghatározására szolgál. A készlet 100 meghatározásra elegendő reagenst tartalmaz, amellyel két párhuzamos mérés esetén 42 minta és 2 ellenőrző szérum tesztoszteron koncentrációja határozható meg a 0-60 nmol/l (0-17,4 ng/ml) mérési tartományban.

A készlet RIA automatán való feldolgozásra alkalmas.

Bevezetés

A szérum tesztoszteron szintjének meghatározása felvilágosítást nyújt különböző patológiák esetében. A tesztoszteron szint emelkedése **férfiaknál**

- pubertás praecox,
- a 21-hidroxiáz enzim veleszületett hiánya,
- funkcionális vagy daganatos eredetű mellékvesekéreg-túlműködés (pl. Cushing-szindróma),
- testicularis daganat

nőknél

- endometriumcarcinoma,
- ovariumcarcinoma,
- Stein-Leventhal-szindróma,
- a hirsutismus egyes eseteiben,
- ACTH és glukokortikoidkezelés esetében.

A **férfiaknál** tesztoszteron szint csökkenése tapasztalható

- a primer vagy szekunder hypogonadismus,
- anorchismus, agonadismus,
- Klinefelter-szindróma,
- Kallman-szindróma,
- májcirrózis

nőknél

- 40 év feletti életkor,
- menopausa utáni állapot esetében.

A mérés elve

A tesztoszteron mennyiségi meghatározására alkalmas jelen készlet működése a kompetitív radioimmunoassay elvén alapul. ¹²⁵I-dal jelzett állandó mennyiségű tesztoszteron vetélkedik a mintában jelenlévő (méréndő) jelzetlen tesztoszteronnal a korlátozott számú antitest kötőhelyekért. 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 tesztoszteron koncentrációjával, gamma-számlálással mérhető. A standardok relatív kötési értékei és koncentrációi ismeretében szerkesztett mérő-(standard) görbéről, a minták relatív kötési értékei alapján, azok tesztoszteron koncentrációja meghatározható.

A készlet tartalma

- 1 üveg ¹²⁵I-TRACER, felhasználásra kész, 44 ml pufferes oldat, 0,1 % nátrium-azid tartósítással radioaktivitása < 260 kBq
- 6 üveg STANDARD(1-6), felhasználásra kész, 6 x 0,5 ml humán savó, 0,1% nátrium azid tartósítással, koncentrációjuk 0 (S₁), 0,6 (S₂), 2 (S₃), 6 (S₄), 20 (S₅), 60 (S₆), nmol/l

- 2 üveg ELLENŐRZŐ SZÉRUM, felhasználásra kész, 2 x 0,5 ml humán savó, 0,1% nátrium azid tartósítással.

Az ellenőrző szérumok koncentrációját a kísérő minőségellenőrzési bizonylat tartalmazza.

- 2 doboz BEVONT CSŐ, 2x50 db, 12x75 mm-es szabvány RIA kémcső, műanyag dobozban, monoklonális antitesttel bevonva.

- 1 db Minőségellenőrzési bizonylat

- 1 db Használati utasítás

A készlet felhasználásához szükséges anyagok és eszközök

Kémcsőtartó, rugalmas kémcsőrogzító kiképzésben; pipetták (25, 400 és 2000 µl-es erőfogatra, eldobható műanyag hegyekkel); desztillált víz, rázógép; kémcsőzáró műanyag fólia; papírvatta vagy itatóspapír; gamma-számláló, örvénykeverő (vortex)

Ajánlott: sorozat-adagoló pipetta (400 µl-hez), folyadékadagoló (2 ml-hez)

A mérendő minták gyűjtése és tárolása

A vizsgálandó szérummintákat a más, ugyan-csak szérumot igénylő laboratóriumi vizsgálatoknál követett módon készítjük el. Amennyiben a tesztoszteron meghatározás a mintavételt követő 1-2 napon belül megtörténik, a mintákat +2 - +8°C-on, későbbi felhasználás esetén -18°C-on mélyhűtve tartjuk.

Lipémiás, hemolizált, vagy más szempontból rendellenes szérumot ne használjunk mérésre.

A meghatározás menete

(ld. folyamatábra, 1. táblázat)

- 1) Hagyjuk az összes reagenst szobahőmérsékletre melegedni.
- 2) Jelöljük meg két-két műanyag csövet az alábbi célra:
összes beütésszám (T)
standard (S₁₋₆)(S₁=B₀)
ellenőrző szérum (CI-CII)
vizsgálandó minták (M_X)
- 3) Felhasználás előtt a mintákat és az összes reagenst alaposan homogenizáljuk, de kerüljük el a habzást.
- 4) Mérjünk 25 µl STANDARDot (S1-6), illetve ELLENŐRZŐ SZÉRUMot (CI-II), és szérummintát (M_x) a megfelelő csövekbe.
- 5) Mérjünk minden csőbe 400 µl ¹²⁵I-TRACER oldatot.
- 6) Helyezzük a kémcsöveket rögzítős kémcsőtartó állványba, a T jelű csövek kivételével. A csöveket fedjük le légmentesen műanyag fóliával. Erősítsük fel az állványt a keverőgépre úgy, hogy az biztonságosan rögzítve legyen.
- 7) Indítsuk el a keverést, és állítsuk be a sebességet úgy, hogy a folyadék valamennyi kémcsőben mozgásban legyen. Kevertessük ezzel a beállítással 2 óra keresztül szobahőmérsékleten (20-25°C).
- 8) A csőtartót fejjel lefelé fordítva, egyetlen határozott, gyors mozdulattal öntsük le a felülűszót, majd a tartót változatlan helyzetben (visszafordítás nélkül!) tegyük papírvattára 2 percig. Győződjünk meg arról, hogy a cső peremén nem maradtak folyadékcseppek.

- 9) Adjunk 2 ml desztillált vizet minden csőhöz, majd ismételjük meg 8. pontot.
- 10) Mérjük meg az egyes csövek radioaktivitását gamma- számlálóval.
- 11) Számítsuk ki az eredményeket a következő fejezet szerint.

1. táblázat. A vizsgálat folyamatábrája (az adatok mikroliterben értendők)

	T	S ₁₋₆	M _X	CI-II
Standard		25		
Minta			25	
Kontrol				25
Tracer	400	400	400	400
Rázatás 2 óra keresztül szobahőmérsékleten (20-25 °C)				
Folyadék leöntése, szárítás itatóspapíron min. 2 percig.				
Desztillált víz		2000	2000	2000
Folyadék leöntése, szárítás itatóspapíron min. 2 percig.				
Radioaktivitás-mérés (legalább 60 másodperc/cső)				
Adatfeldolgozás				

Figyelem! A magasabb inkubálási hőmérséklet fals eredményeket okozhat. Kérjük az ajánlott inkubálási hőmérséklet betartását.

Az eredmények számítása

Számítsuk ki a párhuzamos csövek beütésszámainak középértékét.

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-koncentráció meghatározásához nem feltétlenül szükséges.) Számítsuk ki a standardok, az ellenőrző szérum és a minták kötési százalékát az alábbi egyenlettel:

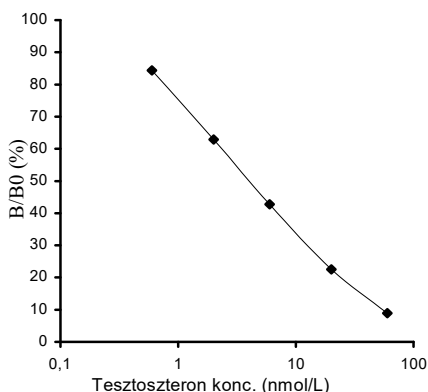
$$B/B_0 \% = 100 * (S_{2-6} ; CI-II ; M_x) / S_1$$

Egy jellegzetes mérési adatsort foglal össze a 2. táblázat. Ábrázoljuk a standardokra mért beütésszámokból számított B/B₀ értékeket a standard koncentrációjának függvényében (lásd az ábrát). Az így kapott standard görbéről (mérőgörbéről) olvassuk le a vizsgált minta B/B₀ értékeire tartozó koncentrációt. Egy jellemző standard görbét mutat az 1. ábra.

2. táblázat Jellemző mérési adatok

Csővek	Beütés CPM1	Beütés CPM2	Átlag CPM	Bo/T %	B/Bo %
T	81805	81299	81552		
S1	33103	32440	32772	40,2	
S2	28228	27079	27654		84,4
S3	21193	20005	20599		62,9
S4	13432	14645	14039		42,8
S5	7413	7334	7374		22,5
S6	2853	2940	2897		8,8
CI	23129	22780	22955		70,0
CII	9044	8967	9006		27,5

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



A korszerű mérőkészülékek lehetővé teszik a radioaktivitás-mérést követő azonnali ("online") számítógépes adatfeldolgozást is. A sokféle feldolgozó program közül jelen kézikönyvhöz a négyzetes logit-log vagy a spline illesztő program használatát javasoljuk.

Minőségi jellemzők

Szenzitivitás

Analitikai érzékenység 0,12 nmol/l.

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

Az LoB (Limit of Blank), LoD (Limit of Detection) és az LoQ (limit of Quantitation) meghatározását a CLSI guideline EP17-es ajánlása alapján határoztuk meg. A mérési adatok alapján az alábbi értékeket kaptuk:

Limit of Blank (LoB): 0,075 nmol/l

Limit of Detection (LoD): 0,14 nmol/l

Limit of Quantitation: 0,21 nmol/l

A funkcionális érzékenység megegyezik a Limit of Quantitation (LoQ) értékével.

Specifitás

0 koncentrációjú standardhoz 70 és 700 nmol/l koncentrációban különböző szteroidokat adtunk és mértük a látszólagos tesztoszteron koncentrációt.

Hozzáadott szteroid koncentráció	Mért Testoszteron nM	
	70 nM	700 nM
Ösztriol	0,1	0,31
11-Deoxikortizol	0,04	0,66
Androsztándiol	0,1	0,73
Androszténdiol	0	1,03
Kortizol	0,2	1,55
17- β -Ösztradiol	0,17	1,58
5- β -dihidro-tesztoszteron	0,39	8,52
5- α -dihidro-tesztoszteron	0,83	12,66
Androszténdion	1	15,9
Noretiszteron	1,34	16,79

Nem mérhető koncentrációkat kaptunk a következő hormonok 700 nmol/l koncentrációjánál: 17- α -OH-Progeszteron, DHEA, Progeszteron, Aldoszteron, Ösztron, Kortizon, Prednizolon, Dexametazon, Pregnenolon, Pregnenolon-szulfát, Kortikoszteron, Deoxikortikoszteron, Noretiszteron-acetát. A DHEA-S keresztreakcióját 30 μ M koncentrációig vizsgáltuk. 30 μ M DHEA-S koncentrációnál a látszólagos Testoszteron koncentráció 0,43 nM volt.

Linearitás (hígítási teszt)

Egyedi humán szérumból mintákat hígítottunk alacsony tesztoszteron koncentrációjú humán szérummal 2, 4 és 8-szorosra. A hígítási faktorokat mérlegesen pontosítottuk. A hígított mintákat a készlet protokoll szerint immunoassayben megmértük.

$$Y = 0,9496X - 0,8119 \quad R^2 = 0,9961 \quad n = 12$$

Az átlag visszanyerés 81,8 % volt.

Ismert mennyiség visszanyerése ("recovery")

5 egyéni szérumból ismert mennyiségű tesztoszteront adva az átlag visszanyerés 92,7% volt, tartomány: 81,8% - 103,3%.

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%
0,99	7,3	0,98	12,0
2,17	8,9	2,20	10,8
6,76	7,2	6,52	8,3
12,87	3,0	13,02	7,1
33,54	2,8	34,94	6,4

Várható referens tartomány:

Férfiak: 5,6 – 30,8 nmol/L (2,5 – 97,5%)

átlag \pm SD: 15,14 \pm 5,7 nmol/L

medián: 15,12 nmol/L

Nők: 0,3 – 3,8 nmol/L (2,5 – 97,5%)

átlag \pm SD: 1,47 \pm 0,66 nmol/L

medián: 1,49 nmol/L

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

Átszámítás az SI mértékegységről

$$1 \text{ nmol/l} = 0,29 \text{ ng/ml}$$

$$1 \text{ ng/ml} = 3,47 \text{ nmol/l}$$

Megjegyzések, tanácsok

1) **Figyelem, hibaforrás!** A bevont kémcsövek nem tartalmaznak külön feliratot. Közönséges kémcsövekkel való összetévesztésük komoly mérési hibához vezethet! Ennek elkerülésére a műanyag dobozból soha ne vegyünk ki többet a szükséges mennyiségnél, illetve a felhasználatlan kémcsöveket azonnal tegyük vissza eredeti tartódobozukba. Ha az összekeverés veszélye a feldolgozás alatt is fennáll, célszerű a bevont csöveket más módon is megjelölni (pl. üvegre író tollal "meggyűrűzni").

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 magas!) mérési eredményekhez vezethet!

Egyéb tudnivalók

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

gyártó tesztoszteron készletének 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 készletben lévő **humán szérumból** tartalmazó komponensek előállításához felhasznált szérumból HIV-Ab, HBsAg, 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 48 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.

Tárolás

A készlet komponensei 2-8°C között tárolhatók a 60 napos lejárati időn belül.

	Lejárati idő		Gyártási szám
	2-8°C-on tárolandó		Kontrol
	Vigyázat, lásd kapcsolódó dokumentumok		Standard
	Biológiai veszély		Bevont cső
	Lásd használati utasítás		Tracer
	In vitro diagnosztikai eszköz		Gyártó
	Katalógus szám		Radioaktív anyag

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

Technikai e-mail: immuno@izotop.hu

Kereskedelmi e-mail: commerce@izotop.hu

IZOTOP

IZOTÓP INTÉZET Kft.

1535 Budapest, Pf.: 851.

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

