

НАБОР ПРОГЕСТЕРОН [I-125] RIA

(Номер по каталогу: RK-460CT)

Описание

Система ПРОГЕСТЕРОН [I-125] RIA предназначена для количественного определения *in vitro* прогестерона в сыворотке крови человека. Возможно количественное определение прогестерона в диапазоне 0-120 нмоль/л (0-37.7 нг/мл) с использованием образцов сыворотки объемом 20 мкл. Каждый набор содержит количество материалов, достаточное для анализа 100 пробирок. Это позволяет построить одну стандартную кривую и проанализировать 43 неизвестных образца и 1 контрольный образец в двух экземплярах.

Введение

Прогестерон является одним из C₂₁-стероидным гормоном (Mw = 314.5), который секретируется у женщин в ходе менструального цикла в желтом теле. В гораздо больших количествах данный гормон вырабатывается в плаценте во время беременности. В небольших количествах он также секретируется у мужчин и у женщин в коре надпочечников. Большая часть циркулирующего в крови прогестерона связана с альбумином и кортикостероид-связывающим глобулином (КСГ). Биологически активный свободный гормон составляет лишь 2.5-3% от общего количества прогестерона. Определение сывороточной концентрации прогестерона позволяет выявить нарушения менструального цикла и бесплодие. Было предложено определение уровня прогестерона в первые 10 недель беременности для выявления пациенток с угрозой выкидыша и с эктопической беременностью.

Принцип метода

Данное количественное определение основано на конкуренции между немеченым прогестероном и определенным количеством ¹²⁵I-меченного прогестерона за ограниченное количество участков связывания на поверхности прогестерон-специфического моноклонального антитела. При реакции определенного количества меченых атомов и антител с различным количеством немеченных

лигандов, количество связей меченых атомов с антителами будет обратно пропорционально концентрации немеченных лигандов.

Во время 1-часового периода инкубации при непрерывном перемешивании иммуно-комплекс иммобилизуется на реактивной поверхности пробирок. После инкубации реакционная смесь удаляется, пробирки промываются и помещаются в гамма-счетчик для определения радиоактивности. Концентрация антигена обратно пропорциональна радиоактивности, измеренной в пробирках. Путем построения калибровочной кривой, в которой отражаются полученные значения в сравнении с серией калибраторов, содержащих известное количество прогестерона, может быть определена искомая концентрация прогестерона в образцах пациента.

Содержание набора

- 1 флакон ¹²⁵I-МЕТКИ, готовой к использованию (объем: 11 мл), содержащий приблизительно 260 кБк прогестерона-[¹²⁵I] в буфере с красным красителем и 0,1% NaN₃.
- 6 флаконов СТАНДАРТОВ S₁₋₆, готовых к использованию. S₁ = 1 мл, S₂₋₆ = 0.5 мл во флаконе, содержащем 0, 0.8, 3.6, 11, 33, 120 нмоль/л в сыворотке крови человека с 0.1% NaN₃.
- 1 флакон АНТИСЫВОРОТКИ, готовой к использованию (объем: 11 мл), содержащий биотинилированные моноклональные антипрогестероновые антитела в буфере с синим красителем и 0,1% NaN₃.
- 1 флакон КОНТРОЛЬНОЙ СЫВОРОТКИ, готовой к использованию (0.5 мл человеческой сыворотки с 0,1% NaN₃. Концентрация контрольных образцов сыворотки указана в прилагаемом сертификате качества.
- 1 флакон КОНЦЕНТРАТА ПРОМЫВОЧНОГО БУФЕРА (20 мл), содержащего 0,2% NaN₃. Перед использованием концентрат следует развести 700 мл дистиллированной воды.
- 2 коробки ПРОБИРОК С ПОКРЫТИЕМ, готовых к использованию. 2x50 пластиковых пробирок (12x75 мм), покрытых стрептавидином.

*Сертификат качества.
Листок-вкладыш.*

Необходимые материалы, инструменты и оборудование

Штатив для пробирок, точные пипетки со сменными наконечниками (20 и 100 мкл),

шейкер, пластиковая пленка, впитывающая ткань, гамма-счетчик.

Рекомендуемые инструменты и оборудование

Автоматические пипетки, диспенсер.

Сбор и хранение образцов

Образцы сыворотки могут быть приготовлены в соответствии с общей процедурой, которая обычно используется в клинической лабораторной практике. Сыворотка крови может храниться в течение двух дней после забора крови при температуре 2-8°C. Если анализ будет проводиться более чем через два дня, образцы сыворотки должны быть сохранены в условиях глубокого замораживания. Следует избегать повторного замораживания и размораживания реактивов. Запрещается использование липемичных, гемолизированных и мутных образцов. Образцы с концентрацией прогестерона выше, чем в наиболее концентрированном стандарте, следует развести и подвергнуть повторному исследованию. В качестве растворителя следует использовать нулевой стандарт.

Приготовление и хранение реактивов

Добавьте концентрат промывочного буфера (20 мл) к 700 мл дистиллированной воды для получения 720 мл промывочного раствора. После разведения следует хранить раствор при температуре 2-8°C до истечения срока годности набора.

Неиспользованные реагенты следует хранить при температуре 2-8°C. При такой температуре каждый реактив остается стабильным до истечения срока годности набора. Фактический срок годности набора указан на упаковке и в сертификате качества.

Процедура количественного определения

(Краткое описание процедуры см. в Таблице 1.)

- 1) Перед использованием следует уравновесить все реактивы до комнатной температуры.
- 2) Промаркируйте в двух экземплярах пробирки для определения общей радиоактивности (Т), нулевого стандарта (Стандарт 1 = B₀), стандартов (S₂₋₆), контроля (С) и образцов (S_x).
- 3) Перед использованием тщательно перемешайте все реактивы и образцы.

Избегайте чрезмерного пенообразования.

- 4) С помощью пипетки поместите по 20 мкл каждого стандарта, контроля и образца в соответствующим образом промаркированные пробирки.
- 5) С помощью пипетки поместите в каждую пробирку по 100 мкл раствора метки.
- 6) С помощью пипетки поместите по 100 мкл антисыворотки во все пробирки, за исключением пробирки Т.
- 7) Запечатывайте все пробирки пластиковой пленкой. Прочно зафиксируйте штатив на шейкере. Включите шейкер и установите необходимую скорость с тем, чтобы в каждой пробирке жидкость постоянно вращалась или перемешивалась.
- 8) Инкубируйте пробирки в течение 1 часа при комнатной температуре в условиях перемешивания.
- 9) Добавьте в каждую пробирку по 2.0 мл разведенного промывочного буфера. Удалите раствор из всех пробирок путем переворачивания штатива. В перевернутом положении поместите штатив на фильтровальную бумагу на 5 минут.
- 10) Определите радиоактивность каждой пробирки в гамма-счетчике в течение как минимум 60 секунд и рассчитайте концентрацию прогестерона в образцах так, как это описано в разделе «Расчет результатов».

Таблица 1. Протокол количественного определения (все объемы указаны в микролитрах). Т = общая радиоактивность, S₁₋₆ = стандарты, S_x = образец, С = контроль.

Пробирки	Т	S ₁₋₆	С	M _x
Стандарт 1-6		20		
Контроль			20	
Образцы				20
¹²⁵ I Метка	100	100	100	100
Антисыворотка		100	100	100
Перемешивать в течение 1 часа при комнатной температуре				
Промывочный буфер		2000	2000	2000
Слить жидкость и поместить штатив на фильтровальную бумагу				
Подсчитать радиоактивность (60 сек/пробирка)				
Рассчитать результаты				

Расчет результатов

Полученные данные количественного определения должны быть схожими с теми, которые представлены в Таблице 2.

Рассчитайте среднее значение в минуту (СРМ) для каждой из пар анализируемых пробирок. Рассчитайте процентное отношение V₀/T для нулевого стандарта (S₁) по следующей формуле:

$$V_0/T \% = 100 * S_1 / T$$

Рассчитайте нормализованное процентное связывание для каждого стандарта, контроля и образца с помощью следующей формулы:

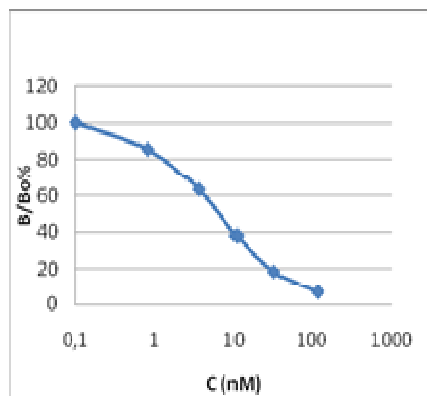
$$V/V_0 \% = 100 * (S_{2-6} ; C ; M_x) / S_1$$

Используя полулогарифмическую миллиметровую бумагу, постройте график V/V₀% для каждого стандарта относительно соответствующей концентрации прогестерона. На Рисунке 1 представлена типичная стандартная кривая. Определите концентрацию прогестерона в неизвестных образцах методом интерполяции по стандартной кривой. Не экстраполируйте значения, выходящие за пределы стандартной кривой.

Таблица 2. Типичные данные количественного определения

Пробирки	Среднее СРМ	V/T %	V/V ₀ %
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

Рисунок 1. Типичная стандартная кривая. (Не используйте для расчета значений образца)



Конверсия единиц СИ

1 нмоль/л = 0.3145 нг/мл
1 нг/мл = 3.18 нмоль/л

Характеристика количественного определения

Параметры количественного определения

V₀/T 76 ± 6%
ED-50 6.7 ± 2 нмоль/л

Специфичность

К "0" стандарту добавлялись различные гормоны в двух концентрациях (A=70 нмоль/л, B=700 нмоль/л). Ниже указаны фактические измеренные концентрации прогестерона. Не поддающиеся измерению концентрации были получены для следующих гормонов,

добавленных в концентрации 700 нмоль/л: 17β-эстрадиол, 5α дигидротестостерон, 5β дигидро-19-нортестостерон, андростендиол, альдостерон, эстрон. Перекрестная реактивность DHEA-S оценивалась при 30 мкмоль/л, при этом фактическая измеренная концентрация прогестерона составляла 0.28 нмоль/л.

Концентрация добавленного глюкокортикоидостероида	70 нМ	700 нМ
	Измеренная концентрация прогестерона, нМ	
17 α метилтестостерон	0.25	0.22
Кортизол	0.18	0.25
19-нортестостерон	0.25	0.28
Кортизон	0.21	0.28
Андростендиол	0.21	0.3
Андростендион	0.12	0.34
Деоксикортизол	0.12	0.39
Тестостерон	0.1	0.42
17 α ОН прогестерон	0.3	0.81
Прегненолон сульфат	0.35	3.57
Прегненолон	0.5	4.99
Кортикостерон	1.07	12.01
Деоксикортикостерон	1.66	14.21

Чувствительность

Аналитическая чувствительность составляла 0.11 нмоль/л. Значение аналитической чувствительности было рассчитано путем интерполяции среднего значения и двух стандартных отклонений 20 повторов нулевого стандарта.

Точность и воспроизводимость

С целью определения точности в ходе количественного определения были проанализированы шесть образцов сыворотки крови в 20 повторах. Для определения точности между количественными определениями, образцы измерялись дважды в ходе 20 независимых анализов. Полученные результаты приведены ниже в таблице.

В ходе количественного определения		Между количественными определениями	
Среднее значение (нмоль/л)	CV (%)	Среднее значение (нмоль/л)	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

Тест разведения (линейность)

Исследование пяти образцов проводилось после 2-х и 4-х кратного разведения нулевым стандартом в соответствии с протоколом набора.

Ниже приведена формула для расчета измеренной концентрации (Y) в зависимости от ожидаемой концентрации (X), которая демонстрирует хорошую линейность: $y = 1.0009x - 0.1259$ $R^2 = 0.9987$ $n = 10$

Восстановление

Под восстановлением понимается измеренное увеличение, выраженное в процентах от ожидаемого роста пиков в пяти образцах сыворотки крови с тремя различными количествами прогестерона. Среднее значение восстановления для добавленного прогестерона составляло $90.4\% \pm 4.7\%$ вольт (среднее значение \pm CO).

Ожидаемые значения

Рекомендуется, чтобы каждая лаборатория определяла собственный диапазон справочных значений.

Женщины	N	Минимум (нмоль/л)	Максимум (нмоль/л)
Фолликулярная фаза	31	0.33	5.98
Пик овуляции	21	0.24	4.76
Фаза желтого тела	22	12.9	70.0
Менопауза	49	0.12	2.27

Мужчины	43	0.62	3.75
---------	----	------	------

Дети (3-10 лет)	64	0.37	3.59
-----------------	----	------	------

Полученные результаты должны интерпретироваться с учётом всех клинических данных пациента. Никакой из наборов для диагностики *in vitro* не может использоваться как единственное доказательство наличия какого-либо заболевания или расстройства.

Дополнительная информация

Не следует смешивать или заменять компоненты из различных партий или наборов разных производителей.

Примечания к методике

1) **Источник ошибки!** Реактивные пробирки, упакованные в пластиковые коробки, индивидуально не промаркированы. Необходимо следить за тем, чтобы эти пробирки не смешались с обычными пробирками для проведения исследований. Для минимизации риска не следует брать из пластиковой коробки больше пробирок, чем необходимо для проведения исследования. Оставшиеся после работы пробирки следует складывать обратно в коробку. Пробирки для количественного определения рекомендуется помечать маркером.

2) **Источник ошибки!** Для обеспечения эффективного вращения пробирки должны быть плотно закреплены в

штативе. Никогда не используйте штативы с открытым отверстием. Неравномерное или неполное перемешивание может стать причиной низкой эффективности количественного определения.

3) **Источник ошибки!** Не используйте шейкер, в котором некоторые пробирки подвержены нагреванию. Избегайте расположения шейкера рядом с кондиционерами, нагревательными устройствами и открытыми окнами. Любая разница температуры в пробирках во время проведения инкубации может привести к серьезным ошибкам измерения.

Меры предосторожности и предостережения

Радиоактивность

Данный продукт содержит радиоактивный материал. Получение, учет и использование радиоактивных материалов является предметом регулирования и лицензирования национальных и международных регуляторных органов. Пользователь несет ответственность за соблюдение местных законов или правил по использованию радиоактивных материалов.















Биологическая опасность

Продукты человеческой крови, которые используются в наборе, были получены от здоровых доноров. Они были подвергнуты индивидуальным исследованиям с использованием утвержденных методик (ФИА, ферментативный иммуноферментный анализ), по результатам которых были получены отрицательные результаты на наличие антител к вирусу иммунодефицита человека (анти-ВИЧ-1/2), антител к вирусу гепатита С (anti-HCV), антитрепонемных антител и поверхностных антигенов вируса гепатита В (HBsAg). При работе с образцами, полученными от человека, которые подлежат исследованию с использованием диагностических наборов, необходимо всегда соблюдать осторожность. Даже если пациент прошел необходимые обследования, ни один из методов не может дать полной гарантии отсутствия инфекционных агентов. Следовательно, с образцами крови человека необходимо обращаться как с потенциально инфекционно опасным материалом.

Химическая и прочая опасность

В качестве антибактериального агента некоторые компоненты содержат азид натрия. При утилизации отходы следует смывать большим количеством воды, чтобы предотвратить накопление взрывоопасных азидов металлов в системе водопровода, который может содержать части из меди и свинца.

Содержание азидов в каждой упаковке составляет 66 мг.

	Использовать до		Номер партии
	Температурный предел		Контроль
	Внимание, обратитесь к сопроводительным документам		Стандарт
	Биологическая опасность		Пробирка с покрытием
	Обратитесь к инструкции по использованию		Метка
	Медицинское устройство для диагностики <i>in vitro</i>		Антисыворотка
	Производитель		Промывочный буфер
	Номер по каталогу		Радиоактивный материал
			

Вебсайт: <http://www.izotop.hu>

Технический e-mail: immuno@izotop.hu

Коммерческий e-mail:

commerce@izotop.hu

IZOTOP

INSTITUTE OF ISOTOPES Ltd.

1535 Budapest, Pf.: 851.

Тел.: (+36) 1-392-2577,

Факс: (+36) 1-395-9247.