

Spectria®

TESTOSTERONE RIA

Radioimunoanalytické stanovení, zkumavky
s navázanou protilátkou
Kat.č.68628

Leden 2008

Návod k použití soupravy

Určený účel použití	3
Klinický význam testosteronu	3
Princip testu	4
Reagencie	4
Přístroje	6
Manipulace se vzorkem; skladování vzorku	6
Pracovní postup	6
Omezení metody	8
Zajištění jakosti	8
Výpočet výsledků	9
Referenční intervaly	10
Analytické parametry měření	10
Literatura (viz originální příbalová informace)	



Orion Diagnostica



Výrobce:
Orion Diagnostica Oy
P.O. Box 83, FI-02101 Espoo, Finland
Tel. +358 10 4261
Fax +358 10 426 7546
www.oriondiagnostica.fi



Vysvětlení symbolů použitých na štítcích

Diagnostický zdravotnický
prostředek in vitro



Katalogové číslo



Číslo šarže



Použitelné do



Teplotní rozmezí



Viz návod k použití



Obsahuje NaN₃.

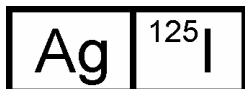


Škodlivé



Xn

Radioindikátor



Koncentrace kalibrátoru



URČENÝ ÚČEL POUŽITÍ

Souprava SPECTRIA Testosteron RIA firmy Orion Diagnostica, využívající techniky zkumavek potažených protilátkou, je určena pro kvantitativní radioimunoanalytické *in vitro* měření koncentrace celkového testosteronu v lidském séru.

KLINICKÝ VÝZNAM TESTOSTERONU

Testosteron (17β -hydroxy-4-androsten-3on) je predominantní androgen sekretovaný varlaty mužů. U žen je koncentrace testosteronu asi 10% koncentrace u mužů a je vylučován vaječником a kůrou nadledvinek. Vzniká také konverzí z jiných steroidů v periferních tkáních. Produkce testikulárního testosteronu je řízena luteinizačním hormonem (LH) hypofýzy a hodnoty periferního sérového testosteronu dobře korelují s produkcí androgenů varletem. To se ukazuje zejména při zvýšené produkci testosteronu v pubertě u chlapců. U žen dobře korelují hladiny cirkulačního testosteronu s klinickými příznaky androgenicity.

U mužů je měření testosteronu používáno jako test funkce Leydigových buněk. Pacienti s primárním nebo sekundárním hypogonadizmem různého původu (Klinefelterův syndrom a další chromozomální alterace, hypopituitarismus, enzymové defekty androgenní syntézy) vykazují subnormální hladiny testosteronu. Stejný efekt je pozorován při opožděné pubertě z důvodů androgenní insuficience. Stanovení testosteronu a gonadotropinu může být důležité při určení impotence, která je často prvním symptomem onemocnění systému hypothalamus-hypofýza. Vysoké hladiny testosteronu je možno sledovat u některých maligních karcinomů varlat a stanovení testosteronu může být součástí stanovení diagnózy a následného sledování léčby pacienta. Při sekundárním hypogonadizmu, u kojenců s kryptorchidizmem a při zvýšení hladin testosteronu po léčbě hCG lze sledování tohoto parametru použít jako známky funkčnosti tkáně varlat.

U žen je velmi důležité stanovit testosteron při syndromech hirsutizmu a/nebo virilizmu. Zvýšené jsou hladiny testosteronu adrenálního i ovariálního původu. Nejčastěji vysoké hladiny cirkulujícího testosteronu způsobují karcinomy nadledvinek a vaječniku produkující androgeny. U polycystických chorob vaječniku a u „idiopatického“ hirsutizmu jsou hladiny testosteronu také zvýšeny.

Samotné měření hladiny testosteronu nestačí k určení funkce pohlavních žláz. Jako základ pro terapeutická a diagnostická rozhodnutí, musí být měření testosteronu podepřeno dalšími relevantními daty. U mužů např. klinickým vyšetřením lékařem, hodnocením ejakulátu a určením koncentrace gonadotropinů. U žen se syndromem hirsutizmu a virilizmu je třeba dalších vyšetření, aby se odlišil ovariální nebo adrenální původ testosteronu. Tyto testy zahrnují např. sérový kortizol, ACTH a gonadotropin.

PRINCIPY TESTU

Spectria Testosteron test je založen na technice kompetitivní radioimunoanalýzy. Známé množství značeného testosteronu a neznámé množství neznačeného antigenu soutěží o omezený počet vysoce afinitních vazebných míst protilátky. Po separaci volného antigenu je množství značeného testosteronu ve zkumavce nepřímo úměrné množství testosteronu ve vzorku. Koncentrace v neznámých vzorcích se odečtou z kalibrační křivky.

REAGENCIE

Materiály dodávané v soupravě

REAGENCIE	MNOŽSTVÍ	SKLADOVÁNÍ
TESTOSTERONE COATED TUBES: Zkumavky s navázanou protilátkou proti testosteronu: Geometricky optimalizované testovací zkumavky potažené monoklonální protilátkou (králičí) proti testosteronu.	100 ks v plastové krabičce	Při 2 - 8°C v původním obalu do data expirace. <i>K analýze vezměte pouze nezbytně nutné množství zkumavek. Krabičku skladujte v uzavíracím plastovém sáčku společně se silika gelem.</i>
TESTOSTERONE TRACER Radioindikátor: Připraven k použití. Radioindikátorem je [¹²⁵ I]-značený testosteron ve fosfátovém tlumivém roztoku. Kathon a žluté barvivo.	1 lahvička 55 ml Radioaktivita: < 200 kBq	Při teplotě 2 – 8°C do data expirace.
TESTOSTERONE CALIBRATORS Kalibrátory: Lyofilizované s koncentrací testosteronu 0; 0,5; 1,5; 5; 15 a 50 nmol /l v lidském séru. NaN ₃ a Kathon.	6 lahviček Rekonstituujte přídavkem 0,5 ml destilované vody.	Při 2 – 8°C do data expirace. Při 2 – 8°C 12 týdnů po rekonstituci.

Reagents contain as preservative NaN₃ and Kathon, see Warnings and precautions.

Upozornění a varování

VAROVÁNÍ 1: Pro diagnostické použití *in vitro* Není určeno pro interní nebo externí použití u lidí nebo u zvířat. Používejte pouze součásti jedné soupravy. Nemíchejte zkumavky s navázanou protilátkou z různých souprav (krabic). Reagencie nepoužívejte po expirační době soupravy. Nepipetujte ústy. Při práci s radioaktivním materiálem je zakázáno jíst, pít nebo kouřit. Používejte jednorázové rukavice a vhodný ochranný oděv. Zabraňte kontaktu s kůží a očima. Po skočení práce s těmito látkami si důkladně umyjte ruce. Ukápnutý materiál je nutno okamžitě omýt velkým množstvím vody. Materiály použité k čištění by měly být likvidovány dle předpisů.

VAROVÁNÍ 2: Souprava obsahuje ^{125}I (poločas rozpadu $T_{1/2}$ 60 dní) emitující 35,5 keV gama záření a 27 - 32 keV rentgenového záření. **Radioaktivní materiál** mohou přijímat, skladovat a používat pouze pracoviště, která splňují ustanovení zákona 18/1997 Sb. v platném znění a příslušných vyhlášek Ministerstva zdravotnictví.

Při práci s radioaktivním materiálem dodržujte následující pravidla:

- všechny radioaktivní materiály skladujte v původním balení a jen na místech k tomu určených, s radioaktivním materiálem pracujte pouze ve schválených prostorách
- příjem a spotřebu radioaktivních látek evidujte
- povrch pracovních stolů, který by mohl být kontaminován, pravidelně kontrolujte
- ukápnutý radioaktivní materiál je nutno okamžitě utřít a kontaminované čisticí materiály umístit do sběrné nádoby pro radioaktivní odpad, potřísněné povrchy vyčistěte příslušným dekontaminantem (čištění je možno usnadnit překrytím pracovní plochy jednorázovým absorpčním materiálem)
- obalový materiál, který není kontaminován, je možno odložit do běžného odpadu pouze po odstranění varovných nápisů a značek
- všechno laboratorní sklo, které bylo použito pro práci s radioaktivními látkami, musí být před dalším použitím řádně dekontaminováno a proměřeno
- Radioaktivní materiál, určený do odpadu, musí být likvidován v souladu s platnými právními předpisy v daném státě.

VAROVÁNÍ 3: Se všemi vzorky pacientů je nutno pracovat jako s **potenciálně infekčním** materiálem. Výchozím materiálem pro kalibrátory je lidská krev, která byla testována licencovanými reagencemi a shledána negativní na HbsAg, HIV 1, HIV 2 a HCV protilátky. Vzhledem k tomu, že žádný známý test nemůže dát jistotu, že materiál není infekční, pracujte s ním jako s materiálem potenciálně infekčním.

VAROVÁNÍ 4: Reagencie obsahují **azid sodný (NaN_3)** jako konzervační činidlo. Lyofilizované reagencie obsahují < 1% azid sodný, který je v této koncentraci škodlivý při vdechnutí, polknutí a při kontaktu s kůží.

Prodloužením expozice se zvyšuje nebezpečí vážného poškození zdraví. Po rekonstituci obsahují kalibrátory < 0,1% azidu sodného, což se za škodlivou koncentraci nepovažuje.

Azid sodný může reagovat s olověnými nebo měděnými uzávěry za tvorby vysoce explozivních azidů příslušných kovů. Jako prevenci tvorby azidů opláchněte uzávěry před likvidací velkým množstvím vody. Výjimečně mohou být kovové uzávěry opláchnuty také 10% hydroxidem sodným. Při kontaktu s kyselinami tvoří NaN_3 toxické výpary.

VAROVÁNÍ 5: Lyofilizované reagentie obsahují 1,5% Kathon jako konzervační činidlo. Zabraňte styku s kůží. Rekonstituované reagentie obsahují 0,1% Kathon, což se za škodlivou koncentraci nepovažuje.

PŘÍSTROJE

K měření lze použít jakýkoliv gama čítač schopný měření ^{125}I . Účinnost měření by měla být pravidelně kontrolována, stejně tak i proměřováno pozadí. Doporučuje se systematická kalibrace přístroje. Podrobnosti týkající se zapojení, použití, údržby a kalibrace najdete v návodu k obsluze dodávaném výrobcem přístroje.

MANIPULACE SE VZORKEM; SKLADOVÁNÍ VZORKU

Ačkoliv se doporučuje použít jako vzorek sérum, lze použít také vzorky plazmy (heparin, EDTA). Vzorky je možno uchovávat 12 hodin při laboratorní teplotě, tři dny při teplotě 2-8°C a delší dobu při teplotě -20°C. Zabraňte opakovanému rozmražení a zmražení vzorku.

PRACOVNÍ POSTUP

Materiály potřebné, ale nedodávané se soupravou

MIKROPIPETY pro přesné odměření 25 μl , 500 μl a 1 ml

TESTOVACÍ ZKUMAVKY (pro stanovení celkové radioaktivity)

VIBRAČNÍ MÍCHADLO

DEKANTOVACÍ STOJÁNEK

VODNÍ LÁZEŇ s teplotou 37°C

BUNIČITÁ VATA

GAMMA-ČÍTAČ

KRYCÍ FÓLIE PARAFILM

DESTILOVANÁ VODA

Rekonstituce kalibrátorů

Kalibrátory **vytemperujte** na laboratorní teplotu. Kalibrátory se rekonstituuji přidavkem 500 µl destilované vody do každé lahvičky. Lahvičku uzavřete a dobře promíchejte jemným kroužením, aniž by se vytvořila pěna. Před použitím nechte 30 minut stát.

Pracovní postup

1. Všechny reagensie, vzorky a kontroly **vytemperujte** na laboratorní teplotu.
2. **Označte** zkumavky s navázanou protilátkou pro kalibrátory, kontrolní a patientská séra. Pracujte v duplikátech. Odděleně připravte dvě normální zkumavky pro stanovení celkové radioaktivity.
3. **Napipetujte** 25 µl kalibrátorů, kontrolních a patientských sér do příslušných zkumavek. Zkumavky pro stanovení celkové radioaktivity ponechte zatím prázdné.
4. Do všech zkumavek **přidejte** po 500 µl testosteron radioindikátoru (žlutý roztok).
5. Všechny zkumavky pečlivě **promíchejte** na vibračním míchadle.
6. Zkumavky **přikryjte** fólií a inkubujte ve vodní lázni 1 hodinu při teplotě 37°C.
7. Obsah všech zkumavek, vyjma zkumavek pro stanovení celkové radioaktivity, **dekantujte** a zbytek tekutiny nechte vstřebat jemným **poklepáním** do buničité vaty.
8. Všechny zkumavky, vyjma zkumavek pro stanovení celkové radioaktivity, **promyjte** 1ml promývacího roztoku a ručně **zatřepete** stojánkem.
9. Zkumavky **dekantujte** a zbytek tekutiny z každé nechte vstřebat jemným **poklepáním** do buničité vaty . Zkumavky **nechte stát** vzhůru dnem alespoň 5 minut. Znovu **poklepte**, dokud zkumavky nejsou prázdné.
10. **Změřte** radioaktivitu všech zkumavek pomocí gamma-čítače po dobu alespoň 1 minuty nebo po akumulaci 10 000 impulsů/ zkumavku.

Poznámky

Abyste dosáhli vysoké přesnosti, dodržujte následující pravidla:

- § Reagensie pipetujte přímo na dno zkumavek.
- § Předcházejte poškrábání dna zkumavek špičkami pipet.
- § Po odsátí nebo dekantaci nechte zbytek tekutiny ze zkumavek vstřebat jemným poklepáním do buničité vaty.

OMEZENÍ METODY

Spectria Testosteron RIA měří celkový nekonjugovaný testosteron tj. protein vázající i protein nevázající. Normálně je asi 98% mužského a 99% ženského cirkulujícího testosteronu vázáno na plazmové proteiny, z nichž nejdůležitější je SHBG (vysoká afinita) a albumin (nízká afinita). Jen nenavázaná frakce testosteronu (asi 1-2%) je biologicky aktivní. Testosteron RIA souprava měří celkový nekonjugovaný testosteron, tj. vázané a nevázané na protein. Jestliže výše jmenované plasmové proteiny jsou buď abnormálně nízké (např. u onemocnění jater), nebo abnormálně vysoké (např. při estrogenové terapii, těhotenství, před pubertou, ve stáří u mužů), je nutno případné změny ve frakci volného testosteronu hodnotit spolu s těmito fakty. Hladinu celkového testosteronu nelze přesně interpretovat u žen léčených Danazolem.

Jako základ pro jakékoli diagnostické a terapeutické rozhodnutí musí být výsledky jednotlivých testů podloženy jinými klinicky relevantními daty.

ZAJIŠTĚNÍ KVALITY

Doporučujeme všem laboratořím používat interní program kontroly kvality tak, že se současně analyzují séra s nízkou i vysokou hraniční koncentrací normálního rozmezí.

Doporučujeme, aby si každá laboratoř vytvořila vlastní přijatelné rozmezí pro kontrolní vzorky. Průměr kontrolního rozmezí by měl být uvnitř přijatelného rozmezí daného výrobcem. K měření kontrolních hodnot použijte alespoň dvou různých šarží.

VÝPOČET VÝSLEDKŮ

Při automatickém výpočtu výsledků doporučujeme použít spline funkci. Výsledky lze odečíst manuálně z kalibrační křivky vynesené v semilogaritmických souřadnicích.

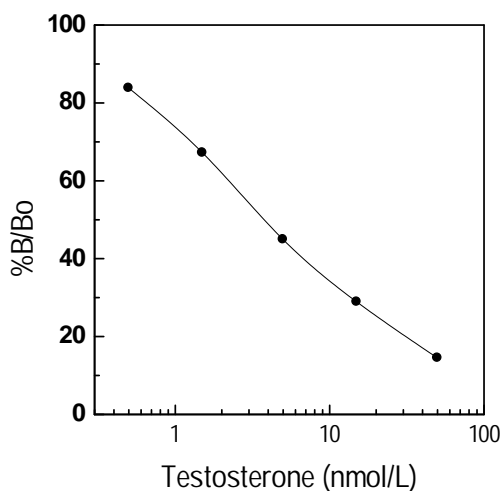
Vypočtete průměr četností všech kalibrátorů, vzorků a kontrol.

Vypočtete % (B/Bo) pomocí rovnice:

$$\% B/B_0 = \frac{(\text{četnost kalibrátoru nebo vzorku}) \times 100}{\text{četnost nulového kalibrátoru}}$$

Vyneste kalibrační křivku v semi-logaritmických souřadnicích tak, aby % (B/Bo) byla na ose y a koncentrace kalibrátorů testosteronu (nmol/l) na ose x.

Odečtete koncentrace testosteronu v neznámých vzorcích z kalibrační křivky a zprůměrujte hodnoty duplikátů.



Obr. 1

Typická kalibrační křivka.

Příklad.

(str. originální příbalové informace)

Tabulka 1

Typická kalibrační křivka a výpočet výsledků. Příklad.

Hodnoty testosteronu jsou získány v SI jednotkách, nmol/l. Převod na ng/ml je možný s použitím následující rovnice:

$$\text{testosteron (ng/ml)} = \text{testosteron (nmol/l)} \times 0,288$$

REFERENČNÍ HODNOTY

Z důvodů etnické, dietární a věkové variability nemusí tyto referenční hodnoty odpovídat celé populaci. Každá laboratoř by si proto měla udělat vlastní rozmezí referenčních hodnot.

Tabulka 2. Referenční koncentrace testosteronu (nmol/l)

Vzorek	n	Rozmezí
Muži	87	8,2 – 34,6
Ženy	175	0,3 – 3,0

ANALYTICKÉ PARAMETRY MĚŘENÍ

Níže uvedené výsledky byly získány v Orion Diagnostica a představují typická analytická data.

Měřicí rozmezí

0,5 - 50 nmol/l.

Analytická mez detekce

Mez detekce, definovaná jako nejnižší detekovatelná koncentrace odpovídající dvojnásobku směrodatné odchylky hodnot nulového kalibrátoru, je 0,1 nmol/l.

Funkční mez detekce

Je přibližně 0,11 nmol/l.

Linearita

Vzorky s vysokou koncentrací testosteronu lze ředit do poměru 1:10 nulovým kalibrátorem ze soupravy.

Metoda standardního přídatku (recovery)

Známa množství testosteronu byla přidána k patientským sérum (n = 6) také o známé koncentraci. Standardní přídatky byly v rozmezí od 84,2 do 121,7% s průměrnou hodnotou 98,9±8,4% (SD).

Preciznost

Vzorky s různou koncentrací testosteronu byly analyzovány k určení intra-assay a inter-assay variability.

Tabulka 3 Intra-assay / Inter-assay preciznost

Intra-assay preciznost 12 replikátu			Inter-assay preciznost 10 duplikátu		
Vzorek	Průměr (nmol/l)	CV (%)	Vzorek	Průměr (nmol/l)	CV (%)
1	1,6	7,5	5	1,2	7,0
2	4,8	4,5	6	3,5	5,1
3	11,4	3,8	7	9,1	4,8
4	26,5	5,5	8	23,3	4,8

Interferující látky

Sérový bilirubin do koncentrace $\leq 340 \mu\text{mol/l}$ a hemoglobin do koncentrace $\leq 2 \text{ g/l}$ nemají vliv na měření koncentrace testosteronu. Nedoporučujeme používat vysoce lipemické vzorky.

Specifická

Bylo stanoveno procento zkřížených reakcí antiséra testosteronu při 50% vazebné kapacitě. Navíc byl sledován vliv koncentrací každé z látek jak klinicky relevantních, tak signifikantně vyšších na koncentrace testosteronu.

Tabulka 4. Zkřížené reakce testosteron antiséra při 50% vazebné kapacitě a zdánlivé zvýšení koncentrace testosteronu v přítomnosti různých steroidních hormonů (nmol/l)

Látka	Zkřížená reakce	Koncentrace	Zdánlivé zvýšení
Testosteron	100%	35	35
5 α -dihydrotestosteron	4,5	0,6 10	< 0,1 0,45
Methyltestosteron	0,45	3 50	< 0,1 0,22
Androstandion	0,03	2 30	nd nd
5-androstendiol	0,02	4 50	nd nd
Danazol	0,02	10 1000	nd 0,2
17 β -estradiol	0,012	0,7 70	nd nd
5 α -androstandiol-3 β , 17 β	0,01	0,5 5	nd nd
5 α -androstandiol-3 α , 17 β	0,01	1 30	nd nd
Progesteron	0,01	30 1000	nd 0,1
Androstendion	0,007	5 100	nd nd
Kortizol	0,006	500 8000	< 0,1 0,48
Androsteron	0,005	2 30	nd nd
Dehydroepiandrosteron	0,003	20 400	nd nd
17OH-Progesteron	< 0,001	5 1000	nd nd
Dehydroepiandrosteron-sulfát	0	5000 50000	nd nd

nd= nedetekovatelné

Reference: Kallner A, Magid E, Ritchie R, eds. Improvement of Comparability and Compatibility of Laboratory Assay results in Life Sciences. 4. Bergmeyer Conference. Proposals for two immunomethod reference systems: cortisol and human chorionic gonadotropin. Lenggries, DE, 1992

Spectria Testosterone RIA

Kat.č. 68628

Obsah soupravy (100 testů)

Testosterone coated tubes: Zkumavky s navázanou protilátkou proti testosteronu

Testosterone tracer: Testosteron radioindikátor

Testosterone calibrators: Testosteron kalibrátory

Souhrn pracovního postupu pro přímé stanovení testosteronu (všechny objemy jsou v μ l)

	Celková aktivita	Kalibrátor	Kontroln í vzorek	Neznámý vzorek
Pipetování vzorku		25	25	25
Pipetování radioindikátoru (žlutý)	500	500	500	500
Promíchání		x	x	x
Inkubace 1h při 37°C		x	x	x
Dekantace		x	x	x
Promývání 1ml promývacího roztoku		x	x	x
Dekantace		x	x	x
Měření po dobu 1min. nebo 10.000 impulsů	x	x	x	x