

TSEKKI

Spectria®

ESTRADIOL RIA

**Radioimunoanalytické stanovení, zkumavky s navázanou
protilátkou
Kat.č. 68633**

Červenec 2008

Návod k použití soupravy

Určený účel použití	3
Klinický význam estradiolu	3
Princip testu	3
Reagencie	4
Přístroje	6
Manipulace se vzorkem; skladování vzorku	6
Pracovní postup	7
Omezení metody	8
Zajištění jakosti	8
Výpočet výsledků	9
Referenční intervaly	10
Analytické parametry měření	11
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

IVD

Katalogové číslo

REF

Číslo šarže

LOT

Použitelné do



Teplotní rozmezí



Viz návod k použití



Radioindikátor

Ag ¹²⁵I

Koncentrát promývacího roztoku

BUF WASH 6X

Koncentrace kalibrátoru

CAL 0

Obsahuje azid sodný

CONT NaN₃

URČENÝ ÚČEL POUŽITÍ

Souprava SPECTRIA Estradiol RIA firmy Orion Diagnostica, využívající techniky zkumavek potažených protilátkou, je určena pro kvantitativní radioimunoanalytické in vitro měření koncentrace celkového nekonjugovaného 17 β -estradiolu v lidském séru.

KLINICKÝ VÝZNAM ESTRADIOLU

17 β -Estradiol je steroidní hormon a nejúčinnější estrogen v periferním oběhu. Je produkován převážně vaječníkem ženy. Malé množství estradiolu –17 β je také syntetizováno kůrou nadledvinek, varlaty u mužů a různými tkáněmi periferní konverzí z estrogenu a testosteronu obou pohlaví. U netěhotných žen se koncentrace estradiolu pravidelně mění, nejvyšší hodnoty jsou obvykle naměřeny jeden den před ovulací. Tato nejvyšší hodnota estradiolu má zásadní vliv na hodnotu luteinizačního hormonu (LH), který má nejvyšší hodnotu při ovulaci. Během těhotenství je koncentrace 17 β -estradiolu značně zvýšena.

Měření koncentrace 17 β -estradiolu je důležité při zjištění etiologie amenorei nebo infertility, monitorování léčení pomocí klomiphen citrátem, LH-RH nebo exogenními gonadotropiny. Během hyperstimulace vaječníku pro oplodnění in vitro (IVF) je koncentrace sérového 17 β -estradiolu měřena denně k optimalizaci aplikace hCG a odběru oocytů. U mužů lze 17 β -estradiol sledovat při ženských syndromech. U postmenopauzálních žen je koncentrace sérového 17 β -estradiolu nízká, podobně jako u mužů.

PRINCIPY TESTU

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

REAGENCIE

Materiály dodávané v soupravě

REAGENCIE	MNOŽSTVÍ	SKLADOVÁNÍ
ESTRADIOL COATED TUBES: Zkumavky s navázanou protilátkou proti estradiolu: Geometricky optimalizované testovací zkumavky potažené polyklonální králičí protilátkou proti estradiolu.	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>
ESTRADIOL TRACER Radioindikátor: Zásobní roztok [¹²⁵ I]- značeného estradiolu ve fosfátovém pufru. (5 x) Kathon, červené barvivo	1 lahvička 12 ml Radioaktivita < 170 kBq	Při teplotě 2 – 8°C do data expirace. Při teplotě 2 – 8°C 8 týdnů po naředění. Radioindikátor po použití okamžitě vraťte zpět do teploty 2 – 8°C.
ESTRADIOL TRACER DILUENT: Ředící roztok pro radioindikátor: Fosfátový tlumivý roztok je připraven k použití. Obsahuje < 0,1% Thimerosal	1 lahvička 45 ml	Při teplotě 2 – 8°C do data expirace.
ESTRADIOL CALIBRATORS: Kalibrátory estradiolu: Připraveny k použití. Koncentrace estradiolu 0; 50; 150; 500; 1500; 5000 a 15000 pmol/l v lidském séru. Kathon, NaN ₃ . <i>Kalibrováno proti internímu master kalibrátoru.</i>	7 lahviček 1 ml	Při teplotě 2 – 8°C do data expirace.
ESTRADIOL WASH CONCENTRATE: Koncentrovaný promývací roztok Šestkrát koncentrovaný roztok Tween 20. Kathon.	1 lahvička 20 ml po naředění 120 ml	Při teplotě 2 – 8°C do data expirace. Při teplotě 2 – 8°C 8 týdnů po naředění.

Reagencie obsahují azid sodný a Kathon, čtěte „Upozornění a varování“.

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.

Nezkontaminujte složky kitu nebo špičky k pipetě estradiolem z externího zdroje (např. hormonálním gelem).

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 absorbčním 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 reagenciemi 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 < 0,1% **azid sodný (NaN₃)** jako konzervační činidlo, 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 NaN₃ toxické výpary.

VAROVÁNÍ 5: Reagencie obsahují 0,1% Kathon, což se za škodlivou koncentraci nepovažuje.

PŘÍSTROJE

K měření lze použít jakýkoliv gama čítač schopný měření ¹²⁵I. 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 plasmy (heparin, EDTA). Vzorky je možno uchovávat dva dny při teplotě 2-8 °C, delší dobu při teplotě -20 °C. Zabraňte opakovanému rozmrazení a zmrazení vzorku.

PRACOVNÍ POSTUP

Materiály potřebné, ale nedodávané se soupravou

MIKROPIPETY pro přesné odměření 100 μ l , 500 μ l 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 reagensů

Zásobní roztok estradiolového radioindikátoru naředte pětkrát ředícím roztokem pro radioindikátor (tj. 1 ml radioindikátoru + 4 ml ředícího roztoku). Jestliže potřebujete celý objem, jednoduše přidejte obsah lahvičky estradiolového radioindikátoru (12 ml) do lahvičky s ředícím tlumivým roztokem. Doporučujeme ředit jen potřebné množství. Lahvičku uzavřete a dobře promíchejte jemným kroužením nebo inverzí, abyste zabránili tvorbě pěny.

Naředěný **radioindikátor** ponechte při laboratorní teplotě pouze po dobu nezbytně nutnou k pipetování.

Promývací roztok připravte přidáním 20 ml koncentrovaného roztoku ke 100 ml destilované vody.

Pracovní postup

1. **Označte** zkumavky s navázanou protilátkou pro kalibrátory estradiolu, kontrolní a pacientská séra. Pracujte v duplikátech. Odděleně **připravte** dvě normální zkumavky pro stanovení celkové radioaktivity.
2. **Napipetujte** 100 μ l kalibrátorů, kontrolních a pacientských sér do příslušných zkumavek. Zkumavky pro stanovení celkové radioaktivity ponechte zatím prázdné.
3. Do všech zkumavek **přidejte** po 500 μ l radioindikátoru. Radioindikátor **vraťte** do lednice (2...8°C).
4. Všechny zkumavky pečlivě **promíchejte** na vibračním míchadle.
5. Zkumavky **přikryjte** fólií a inkubujte ve vodní lázni 2 hodiny při teplotě 37°C.
6. Obsah všech zkumavek, vyjma zkumavek pro stanovení celkové radioaktivity, **dekantujte** a zbytek tekutiny nechte **vstřebat** jemným poklepáním do buničité vaty.
7. Všechny zkumavky, vyjma zkumavek pro stanovení celkové radioaktivity, **promyjte** 1 ml promývacího roztoku a ručně **zatřepete** stojánkem.

8. 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.
9. **Změřte** radioaktivitu všech zkumavek pomocí gamma-čítače po dobu alespoň 1 minuty nebo po akumulaci 10 000 impulsů/zkumavku.

Poznámky

V krátkých IVF sériích vzorků, kde dosažení rovnovážného stavu není podstatné, inkubační dobu lze zkrátit na 30 minut při 37°C.

Abyste dosáhli vysoké přesnosti, dodržujte následující pravidla:

- § Reagencie 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

Jako základ pro terapeutická a diagnostická rozhodnutí, musí být měření estradiolu podepřeno dalšími relevantními daty, jako např. klinickým vyšetřením lékařem, koncentrací gonadotropinů, progesteronu, testosteronu a kortizolu v krvi.

Měření koncentrace estradiolu ve vzorcích odebraných v různých dnech cyklu dávají mnohem více informací než jednorázové stanovení.

ZAJIŠTĚNÍ JAKOSTI

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.

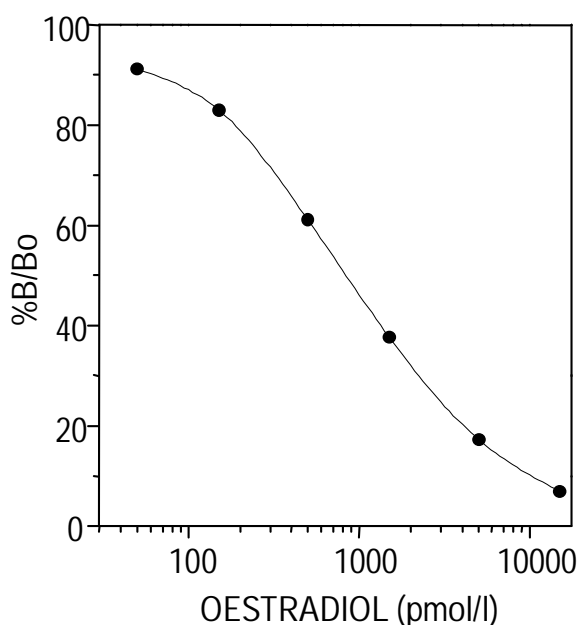
Vypočtete průměr četností všech kalibrátorů, vzorků a kontrol.

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 estradiolu (pmol/l) na ose x.

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



Zkumavka	Průměr cpm	%B/Bo	Konc. (pmol/l)
Celková aktivita	42601		
Kal 0	17814		
Kal 50	16250	91,2	
Kal 150	14788	83,0	
Kal 500	10898	61,2	
Kal 1500	6721	37,7	
Kal 5000	3081	17,3	
Kal 15000	1232	6,9	
Neznámý vzorek 1	10872	61,1	503
Neznámý vzorek 2	3199	18,0	4750

Obr. 1

Typická kalibrační křivka.

Příklad.

(str.8 originální příbalové informace)

Tabulka 1

Typická kalibrační křivka a výpočet výsledků.

Příklad.

Hodnoty estradiolu jsou získány v SI jednotkách, pmol/l. Převod na pg/ml je možný s použitím následující rovnice:

$$\text{estradiol (pg/ml)} = \text{estradiol (pmol/l)} \times 0,2724$$

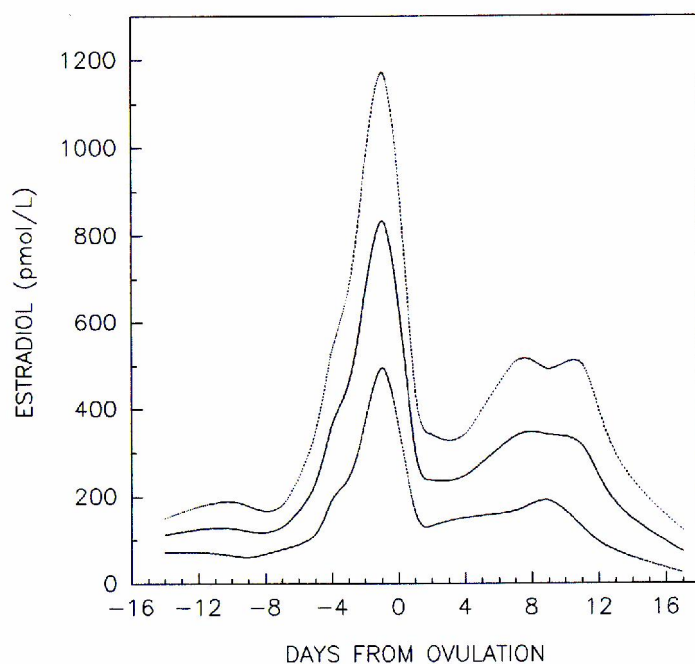
REFERENČNÍ INTERVALY

Byly měřeny hodnoty estradiolu během jednoho menstruačního cyklu u 22 zdravých, normálně menstruuících žen. Ovulační dny byly stanoveny měřením koncentrace LH u každého vzorku. Průměr koncentrací estradiolu se směrodatnou odchylkou jsou uvedeny na obr. 2. Den 0 je den nejvyšší koncentrace LH.

Tabulka 2. Sérové koncentrace estradiolu (pmol/l) během menstruačního cyklu

vzorek	n	průměr	rozmezí
Folikulární fáze	54	126	37 – 285
Střed cyklu	59	713	290 – 1621
Luteální fáze	89	317	51 – 872

Měřeny byly také koncentrace sérového estradiolu u 98 mužů a 80 postmenopauzálních žen.



Obr. 2 Koncentrace sérového estradiolu během menstruačního cyklu (průměr \pm SD). Den 0 je den nejvyšší koncentrace LH.

Tabulka 3 Koncentrace sérového estradiolu (pmol/l) u různých typů vzorku

	n	rozmezí
Muži	98	nd – 228
Post-menopauzální ženy	80	nd – 291

nd = nedekovatelné

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.

ANALYTICKÉ PARAMETRY MĚŘENÍ

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

Měřicí rozmezí

Je přibližně 37 - 15000 pmol/l.

Analytická mez detekce

Mez detekce metody, definovaná jako nejnižší detekovatelná koncentrace odpovídající dvojnásobku směrodatné odchylky hodnot nulového kalibrátoru, je 30 pmol/l.

Funkční mez detekce

Je přibližně 37 pmol/l.

Linearita

Vzorky sér s vysokou koncentrací estradiolu mohou být ředěny nulovým kalibrátorem z kitu do poměru 1:100.

Metoda standardního přípravku (recovery)

Známa množství (100 - 10.000 pmol/l) estradiolu byly přidány k patientským sérum s koncentrací 17 – 292 pmol/l. Standardní přídavky byly v rozmezí od 85,6 do 108,9% s průměrnou hodnotou 99,5%.

Preciznost

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

Tabulka 4 Intra-assay/inter-assay preciznost

Intra-assay preciznost 10 replikátů			Inter-assay preciznost měření duplikátů		
Vzorek	Průměr (pmol/l)	CV (%)	Vzorek	Průměr (pmol/l)	CV (%)
1	103	9,7	5	65 (n=10)	10,2
2	547	7,3	6	394 (n=6)	5,1
3	1569	3,2	7	3254 (n=6)	2,3
4	5274	2,9	8	9520 (n=6)	8,3

Interferující látky

Sérový bilirubin do koncentrace $\leq 170 \mu\text{mol/l}$ a hemoglobin do koncentrace $< 10 \text{ g/l}$ nemají vliv na měření koncentrace estradiolu. Nedoporučujeme používat vysoce lipemické vzorky.

Specifická

Procento zkřížených reakcí antiséra estradiolu při 50% vazebné kapacitě.

Tabulka 5 Zkřížené reakce

Estradiol	100%	Mesterolone	0,002
Ethinylestradiol	1.4	Noretisterone acetát	$< 0,002$
Estron	0.97	Estradiol-17-sulfát, sodná sůl	$< 0,002$
16-oxoestradiol	0.86	Estradiol-diglukuronid	0,0014
Estradiol-3-glukuronid, sodná sůl	0.61	3,17-Beta-D-glucuroconjugate	0,0014
Estriol	0.44	Norgestrel	0,001
16-hydroxyestrone	0,26	Androstenediol	$< 0,001$
Estradiol-17- glukuronid, sodná sůl	0,08	Kortizol	$< 0,001$
Estradiol-17-valerát	0,08	Kortizon	$< 0,001$
Progesteron	$< 0,05$	Danazol	$< 0,001$
Kortikosteron	0,02	Etisteron	$< 0,001$
2-hydroxyestradiol	0,01	Estrone-3-Beta-D-glukuronid	$< 0,001$
17 α -Estradiol	0,008	Estron-3-sulfát	$< 0,001$
Estradiol-3-sulfát, sodná sůl	0,005	Testosteron	$< 0,001$
Noretisteron	0,004		
Estron-glukuronid, sodná sůl	$< 0,003$		
Estradiol-3,17-disulfát, sodná sůl	$< 0,003$		

Spectria Estradiol RIA

Kat.č. 68633

Obsah soupravy (100 testů)

Estradiol coated tubes: Zkumavky s navázanou protilátkou proti estradiolu

Estradiol tracer: Estradiol radioindikátor

Estradiol tracer diluent: Estradiol ředící roztok pro radioindikátor

Estradiol calibrators: Estradiol kalibrátory

Estradiol wash concentrate: Estradiol koncentrát promývacího roztoku

Souhrn pracovního postupu

(všechny objemy jsou v μl)

	Celková aktivita	Kalibrátor	Kontrolní vzorek	Neznámý vzorek
Pipetování vzorku		100	100	100
Pipetování ředěného radioindikátoru (červený)	500	500	500	500
Promíchání		x	x	x
Inkubace 2h při 37°C		x	x	x
Dekantace		x	x	x
Promývání 1 ml promývacího roztoku		x	x	x
Dekantace		x	x	x
Měření po dobu 1 min. nebo 10.000 impulsů	X	x	x	x

SPECTRIA je ochranná známka firmy Orion Diagnostica Oy

68633-CZ05

Sídlo v ČR (zastoupení pro ČR a SR): Orion Diagnostica-organizační složka
Bělohorská 57, 169 00 Praha 6
Tel. +420 233 350 533, fax:+420 233 350 532
E-mail: orion@oriondiagnostica.cz
www.oriondiagnostica.cz