

Spectria®

ESTRADIOL *Sensitive* RIA

Radioimunoanalytické stanovení, zkumavky s navázanou
protilátkou
Kat.č. 67031

Návod k použití soupravy

Červenec 2008

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	12
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



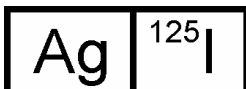
Teplotní rozmezí



Viz návod k použití



Radioindikátor



Reakční tlumivý roztok



Konzentrát promývacího roztoku



Koncentrace kalibrátoru



Obsahuje azid sodný



URČENÝ ÚČEL POUŽITÍ

Souprava SPECTRIA Estradiol Sensitive 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. 17 β -estradiol je v periferní cirkulaci přítomen hlavně ve vázané formě, nejčastěji na globulin vázající sexuální hormony (SHBG) nebo albumin. Volný hormon je biologicky aktivní.

Vysoce citlivý test na detekci 17 β -estradiolu je potřebný pro sledování hladin tohoto hormonu u dívek, mužů, perimenopauzálních a postmenopauzálních žen. U dívek je detekce 17 β -estradiolu indikována při podezření na předčasnou pubertu. U postmenopauzálních žen je koncentrace sérového 17 β -estradiolu nízká, podobně jako u mužů. Nízká koncentrace 17 β -estradiolu u postmenopauzálních žen zvyšuje riziko osteoporózy a aterosklerózy, a proto by mělo být zváženo nasazení hormonální substituční terapie (HST). U mužů lze sledovat hladiny sérového 17 β -estradiolu při syndromech jako je gynekomastie nebo u karcinomů sekretujících estrogen. Měření koncentrace 17 β -estradiolu je důležité při zjištění etiologie amenorei a/nebo infertility a karcinomů sekretujících estrogen u žen. Je také užitečnou pomůckou při monitorování ovulace.

PRINCIP TESTU

Spectria Estradiol *Sensitive* 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
<p>ESTRADIOL COATED TUBES: Zkumavky s navázanou protilátkou proti estradiolu: Geometricky optimalizované testovací zkumavky potažené polyklonální králičí protilátkou proti estradiolu.</p>	<p>100 ks v plastové krabičce</p>	<p>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 sílíka gelem.</i></p>
<p>ESTRADIOL SENS TRACER: Radioindikátor: Zásobní roztok [¹²⁵I]- značeného estradiolu. (2,5 x) Kathon, červené barvivo</p>	<p>1 lahvička 6 ml Radioaktivita < 85 kBq</p>	<p>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.</p>
<p>ESTRADIOL SENS ASSAY BUFFER: Reakční tlumivý roztok: Fosfátový tlumivý roztok je připraven k použití. Obsahuje < 0,1% Thimerosal</p>	<p>1 lahvička 45 ml</p>	<p>Při teplotě 2 – 8°C do data expirace.</p>
<p>ESTRADIOL SENS CALIBRATORS: Kalibrátory: Připraveny k použití. Koncentrace estradiolu 0; 10; 25; 100; 500 a 2000 pmol/l v lidském séru. Obsahuje Kathon , NaN₃. <i>Kalibrováno proti internímu master kalibrátoru.</i></p>	<p>6 lahviček 2 ml</p>	<p>Při teplotě 2 – 8°C do data expirace.</p>
<p>ESTRADIOL WASH CONCENTRATE: Koncentrovaný promývací roztok: Šestkrát koncentrovaný roztok Tween 20. Kathon.</p>	<p>1 lahvička 20 ml po naředění 120 ml</p>	<p>Při teplotě 2 – 8°C do data expirace. Při teplotě 2 – 8°C 8 týdnů po naředění.</p>

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 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 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 plazmy (heparin, EDTA). Nepoužívejte vzorky citrátové plazmy.

Vzorky je možno uchovávat dva dny při teplotě 2-8 °C, delší dobu při teplotě -20 °C. Zabraňte opakovanému rozmražení a zmražení vzorku.

PRACOVNÍ POSTUP

Materiály potřebné, ale nedodávané se soupravou

MIKROPIPETY pro přesné odměření 100 μ l , 200 μ l, 250 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 2,5krát ředícím roztokem pro radioindikátor (tj. 1 ml radioindikátoru + 1,5 ml reakčního tlumivého roztoku nebo 6 ml radioindikátoru + 9 ml reakčního tlumivého roztoku). Doporučujeme ředit jen potřebné množství. Lahvičku uzavřete a dobře promíchejte převrácením.

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

Promývací roztok připravte přidáním koncentrovaného roztoku do 100 ml destilované vody.

Pracovní postup

1. **Označte** zkumavky s navázanou protilátkou pro kalibrátory estradiolu, kontrolní a patientská séra. Pracujte v duplikátech. Odděleně **připravte** dvě normální zkumavky pro stanovení celkové radioaktivity.
2. **Napipetujte** 200 μ l kalibrátorů, kontrolních a patientských sér do příslušných zkumavek. Zkumavky pro stanovení celkové radioaktivity ponechte zatím prázdné.
3. Do všech zkumavek **přidejte** po 250 μ l reakčního tlumivého roztoku.
4. Všechny zkumavky pečlivě **promíchejte** na vibračním míchadle.
5. Zkumavky **přikryjte** fólií a inkubujte ve vodní lázni 1 hodinu při teplotě 37°C.
6. Do všech zkumavek přidejte po 100 μ l radioindikátoru.
7. Radioindikátor **vraťte** do lednice (2...8°C).
8. Všechny zkumavky pečlivě **promíchejte** na vibračním míchadle.
9. Zkumavky **přikryjte** fólií a inkubujte ve vodní lázni 1 hodinu při teplotě 37°C.

10. Obsah všech zkumavek, vyjma zkumavek pro stanovení celkové radioaktivity, **dekantujte** a zbytek tekutiny nechte **vstřebat** jemným poklepáním do buničité vaty.
11. Všechny zkumavky, vyjma zkumavek pro stanovení celkové radioaktivity, **promyjte** 1 ml promývacího roztoku.
12. Ručně **zatřepejte** stojánkem.
13. 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.
14. **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:

- § 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 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.

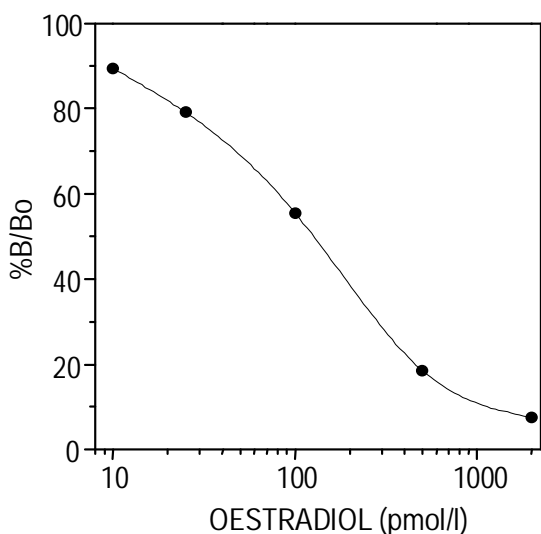
Vypočtete průměr četností všech kalibrátorů, vzorků a kontrol.

Vypočtete % (B/B₀) 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/B₀) 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/B ₀	Konc. (pmol/l)
Celková aktivita	13370		
Kal 0	4730		
Kal 10	4230	89,4	
Kal 25	3741	79,1	
Kal 100	2624	55,5	
Kal 500	875	18,5	
Kal 2000	349	7,6	
Neznámý vzorek 1	2548	53,9	107
Neznámý vzorek 2	575	12,2	844

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:

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

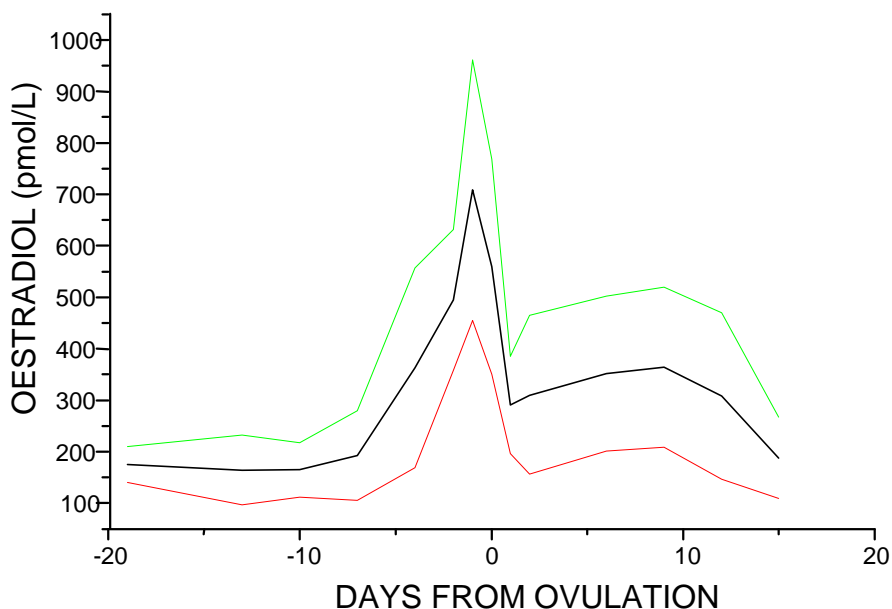
REFERENČNÍ HODNOTY

Byly měřeny hodnoty estradiolu během jednoho menstruačního cyklu u 25 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 3. Sérové koncentrace estradiolu (pmol/l) během menstruačního cyklu (dny od maxima LH)

vzorek	Den	n	Průměr	Rozmezí
Folikulární fáze	- 8	10	150	105 – 217
	- 4	15	343	207 – 1000
Střed cyklu	- 1	24	709	416 – 1399
Luteální fáze	9	17	399	165 – 788

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.



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

Měřeny byly také koncentrace sérového estradiolu u, 42 postmenopauzálních žen bez HRT, u 42 předpubertálních dívek (tabulka 3) a u 117 mužů (tabulka 4).

Tabulka 3 Koncentrace sérového estradiolu (pmol/l) u žen v nefertilním věku

	n	Průměr	Rozmezí
Post-menopauzální ženy (47-66 let)	42	26	11 – 50
Předpubertální dívky (3-5 let)	42	17	nd – 36

nd = nedekovatelné

Tabulka 4 Koncentrace sérového estradiolu (pmol/l) u zjevně zdravých mužů

Počet jedinců	117
Průměr	117 pmol/l
Referenční interval*	34 - 226 pmol/l
0,90 – interval spolehlivosti	
pro nižší referenční hranici	23 - 51 pmol/l
pro vyšší referenční hranici	191 - 266 pmol/l

* referenční interval = 0,025 & 0,975 fraktil

ANALYTICKÉ PARAMETRY MĚŘENÍ

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

Měřicí rozmezí

10 - 2000 pmol/l.

Analytická mez detekce

Mez detekce je přibližně 5 pmol/l, definováno jako nejnižší detegovatelná koncentrace odpovídající dvojnásobku směrodatné odchylky hodnot nulových kalibrátorů.

Funkční mez detekce

Je přibližně 9,5 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 (9 - 1762 pmol/l) estradiolu byla přidána k patientským sérumům s koncentrací 80 – 440 pmol/l. Přídavky byly v rozmezí od 88,2 do 117,3% s průměrnou hodnotou 102,2%.

Preciznost

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

Table 5 Intra-assay / Inter-assay preciznost

Intra-assay preciznost 10 replikátů			Inter-assay preciznost 10 duplikátů		
Vzorek	Průměr (pmol/l)	CV (%)	Vzorek	Průměr (pmol/l)	CV (%)
1	17	18,1	5	12	17,6
2	87	2,8	6	94	5,8
3	311	3,5	7	260	8,1
4	1021	5,0	8	1799	9,7

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 kapacity ukazuje tabulka 6.

Tabulka 6 Zkřížené reakce

Estradiol	100%	3,17-Beta-D-glucuroconjugate	0,007
Equilenin	8,9	17 α -Estradiol	0,005
Etinyloestradiol	1,4	Estron-glukuronid, sodná sůl	0,004
Equilin	1,1	Noretisteron acetát	0,002
Estron	0,97	Mesterolol	0,002
16-oxoestradiol	0,86	Norgestrel	0,001
Estradiol-3-glukuronid, sodná sůl	0,61	Estradiol-3, 17-disulfát, sodná sůl	$< 0,001$
Estriol	0,44	Estradiol-17-sulfáte, sodná sůl	$< 0,001$
16-hydroxyoestron	0,26	Testosteron	$< 0,001$
Estradiol-17-glukuronid, sodná sůl	0,25	Kortizol	$< 0,001$
Estradiol-17-valerát	0,16	Kortizon	$< 0,001$
Progesteron	$< 0,05$	Etisteron	$< 0,001$
Kortikosteron	0,02	Danazol	$< 0,001$
Estradiol-3-sulfát, sodná sůl	0,02	Estron-3-Beta-D-glukuronid	0,0003
2-hydroxyestradiol	0,01	Estron-3-sulfáte	$< 0,0003$
Norethisteron	0,01	Androstenediol	$<< 0,0003$

Spectria Estradiol *Sensitive* RIA

Kat.č. 67031

Obsah soupravy (100 testů)

Estradiol coated tubes: Zkumavky s navázanou protilátkou proti estradiolu

Estradiol sens tracer: Estradiol Sens radioindikátor

Estradiol sens assay buffer: Estradiol Sens tlumivý roztok

Estradiol sens calibrators: Estradiol Sens kalibrátory

Estradiol wash concentrate: Estradiol koncentrát promývacího roztoku

Souhrn pracovního postupu

(všechny objemy jsou v μ l)

	Celková aktivita	Kalibrátor	Kontrolní vzorek	Neznámý vzorek
Pipetování vzorku		200	200	200
Pipetování ředěného reakčního tlumivého roztoku		250	250	250
Promíchání		x	x	x
Inkubace 1h při 37°C		x	x	x
Pipetování ředěného radioindikátoru (červený)	100	100	100	100
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 2 min. nebo 10.000 impulsů	x	x	x	x

SPECTRIA je ochranná známka firmy Orion Corporation.

67031-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