

Spectria®

SHBG IRMA

Radioimunoanalytické stanovení, zkumavky s navázanou
protilátkou
Kat.č. 68562

Září 2008

Návod k použití soupravy

Určený účel použití	3
Klinický význam SHBG	3
Princip testu	4
Reagencie	5
Přístroje	7
Manipulace se vzorkem; skladování vzorku	7
Pracovní postup	7
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

IVD

Katalogové číslo

REF

Číslo šarže

LOT

Použitelné do



Teplotní rozmezí



Viz návod k použití



Radioindikátor

Ab ¹²⁵I

Koncentrace kalibrátoru

CAL 0

Koncentrace kontrolní

CONTROL L

Obsahuje azid sodný

CONT NaN₃

Škodlivé



Xn

URČENÝ ÚČEL POUŽITÍ

Souprava SPECTRIA SHBG IRMA firmy Orion Diagnostica, využívající techniky zkumavek potažených protilátkou, je určena pro kvantitativní radioimunoanalytické *in vitro* měření koncentrace SHBG v séru.

KLINICKÝ VÝZNAM SHBG

Globulin vázající sexuální hormony je cirkulující glykoprotein s molekulovou hmotností okolo 86 000. Jeho biologickou funkcí v cirkulaci je přenos steroidních sexuálních hormonů. SHBG molekula má jedno vazebné místo pro steroidy. Předpokládá se, že SHBG je syntetizován v játrech a jeho produkce je silně ovlivněna rovnováhou mezi androgeny a estrogeny. Koncentrace SHBG se zvyšuje během těhotenství, po aplikaci syntetických estrogenů, u hyperthyroidních pacientů nebo po léčbě thyroideálními hormony. Na druhou stranu existující nižší koncentrace v plazmě u mužů než u žen je důsledkem snížené SHBG syntézy, což indukují androgeny během puberty u chlapců. SHBG váže testosteron a estradiol s vysokou afinitou. Asi 44% testosteronu u normálních dospělých mužů je vázáno na SHBG. U normálních žen je odpovídající hodnota 66%, ve vysokém stupni těhotenství až 95%. Asi 20% estradiolu u normálních mužů a 37% u normálních žen je vázáno na SHBG, zatímco v pozdním těhotenství je to až 88%. Velmi malé procento testosteronu se váže ke globulinu vázající kortizol (CBG), ale většina zbývajících testosteronu a estradiolu je volně vázána k albuminu. „Volné“ biologicky aktivní steroidy představují jen několik procent z celkového množství. Volná frakce je použitelná příslušnými tkáněmi, i když i část z celkových steroidů vázaných na albumin může být navázána na některé tkáně. Koncentrace cirkulujícího SHBG je hlavním faktorem relativního množství testosteronu a estradiolu, které nejsou vázány na protein nebo jsou vázány na albumin.

Nízké koncentrace SHBG u žen jsou obvykle spojeny s hyperandrogenizmem. U ženského hyperandrogenizmu jsou obvykle zvýšeny koncentrace volného testosteronu, i když celkové hladiny testosteronu nejsou vždy zvýšeny. Měření koncentrací cirkulujícího SHBG je indikováno v případech, kdy hladiny celkového testosteronu jsou v normálním rozmezí, ale jsou přítomny příznaky hyperandrogenizmu a současně se předpokládají nebo jsou známy zvýšené hodnoty volného testosteronu. Indikací k testu SHBG u žen je hirsutizmus, virilizmus a infertilita.

U mužů se koncentrace cirkulujícího SHBG zvyšuje s věkem. Zvýšené koncentrace cirkulujícího SHBG byly pozorovány u hypogonadizmu, ačkoliv hladiny testosteronu jsou normální.

Zvýšené hladiny SHBG byly zjištěny i u obézních osob, a to obou pohlaví. Myxedém signifikantně snižuje hladiny SHBG, což bylo pozorováno u žen, ale ne u mužů. Hyperthyroidismus zvyšuje koncentraci cirkulujícího SHBG, zatímco hypothyroidismus je snižuje u obou pohlaví.

Měření SHBG je z klinického hlediska zvláště důležité, když se současně stanoví hladina celkového sérového testosteronu pro odhad množství volného biologicky aktivního testosteronu a jeho efekt. Poměr mezi celkovým sérovým testosteronem a SHBG je běžně vyjádřen tzv. „volným androgenovým indexem (FAI)“, vypočteným jako koncentrace testosteronu (nmol/l) x 100, děleno koncentrací SHBG (nmol/l). Tento poměr je přímo úměrný koncentraci cirkulujícího volného, biologicky aktivního testosteronu.

PRINCIP TESTU

Spectria SHBG test je založen na nekompetitivní imunoradiometrické technice „sendvičového typu“, ve které je použita separační technologie zkumavek potažených protilátkou firmy Orion Diagnostica. Vzorky séra společně s přebytkem radioindikátoru, [¹²⁵I]-značené monoklonální myší protilátky proti SHBG, jsou přidány do zkumavek potažených další monoklonální myší protilátkou proti SHBG. Po vymytí nenavázaného antigenu je množství značeného SHBG ve Spectria zkumavce nepřímo úměrné množství SHBG ve vzorku. Koncentrace SHBG v neznámých vzorcích se odečtou z kalibrační křivky.

REAGENCIE

Materiály dodávané v soupravě

REAGENCIE	MNOŽSTVÍ	SKLADOVÁNÍ
SHBG COATED TUBES: Zkumavky s navázanou SHBG protilátkou: Geometricky optimalizované testovací zkumavky potažené směsí monoklonálních protilátek (myších) proti lidskému SHBG.	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 silikagelem.</i>
SHBG TRACER: SHBG radioindikátor: Připraven k použití. Radioindikátorem je [¹²⁵ I]-značená monoklonální protilátka proti SHBG v tlumivém roztoku. NaN ₃ a červené barvivo.	1 lahvička 22 ml Radioaktivita je < 222 kBq.	Při teplotě 2 – 8°C do data expirace.
SHBG CALIBRATORS: SHBG kalibrátory: Lyofilizované s koncentrací SHBG 6,25; 12,5; 25; 50; 100 a 200 nmol /l v hovězím séru. NaN ₃ . <i>Kalibrováno proti master kalibrační soupravě připravené výrobcem.</i>	6 lahviček Rekonstituuje přidavkem 500 µl destilované vody. Před použitím naředte 1:101 viz. pracovní postup.	Při 2 – 8°C do data expirace. Při 2 – 8°C 3 týdny po rekonstituci.
SHBG CONTROLS, Low & High: SHBG kontroly Low & High (nízká, vysoká): Lyofilizované; v lidském a hovězím séru. NaN ₃ . Očekávané hodnoty jsou uvedeny na zvláštní příbalové informaci.	2 lahvičky Rekonstituuje přidavkem 500 µl destilované vody. Před použitím naředte 1:101 viz. pracovní postup	Při 2 – 8°C do data expirace. Při 2 – 8°C 3 týdny po rekonstituci.
SHBG BUFFER: SHBG tlumivý roztok: Připraven k použití. PBS tlumivý roztok, pH 7,6. NaN ₃ .	1 lahvička 110 ml	Při 2 – 8°C do data expirace.

Reagencie obsahují NaN₃ jako konzervační činidla, 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.

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 **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 olovenými 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.

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, se soupravou lze použít také vzorky heparin plazmy. Vzorky séra je možno uchovávat 12 hodin při laboratorní teplotě, 3 dny při teplotě 2-8°C, delší dobu při teplotě -20°C. Zabraňte opakovanému rozmrazení a zmrazení vzorku. Naředěné vzorky, kalibrátory, nebo kontroly nemohou být mrazeny.

PRACOVNÍ POSTUPY

Materiály potřebné, ale nedodávané se soupravou

MIKROPIPETY pro přesné odměření 10 μl , 100 μl , 200 μl , 500 μl a 1ml

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

Všechny lahvičky **vytemperujte** na laboratorní teplotu. **Kalibrátory a kontrolní séra** rekonstituuje přidávkem 500 μl destilované vody do každé lahvičky. Lahvičku uzavřete a před použitím nechte 30 minut stát. Dobře promíchejte jemným kroužením nebo inverzí lahvičky, aniž by se vytvořila pěna.

Pracovní postup

1. Všechny reagensie, vzorky a kontroly **temperujte** na laboratorní teplotu (18 – 25 °C) alespoň 30 minut před použitím.

2. Kalibrátory a kontrolní a patientská séra **naředíte** 1:101 v běžné zkumavce, např. 10 µl séra a 1 ml tlumivého roztoku. Séra těhotných žen nebo jiná séra, u kterých se očekává koncentrace SHBG větší než 200 nmol/l by měla být dále ředěna alespoň čtyřikrát. Roztoky **promíchejte** na vibračním míchadle.
3. **Označte** zkumavky s navázanou protilátkou pro kalibrátory, kontrolní a patientská séra a pro nespecifickou vazebnost (NSB). Pracujte v duplikátech. Odděleně připravte dvě normální zkumavky pro stanovení celkové radioaktivity.
4. **Napipetujte** 100 µl ředěných kalibrátorů, kontrolních a patientských sér do příslušných zkumavek. Do NSB zkumavek pipetujte 100 µl tlumivého roztoku. Zkumavky pro stanovení celkové radioaktivity ponechte zatím prázdné.
5. Do všech zkumavek **přidejte** po 200 µl radioindikátoru. Všechny zkumavky pečlivě **promíchejte** jemným potřesením stojánkem. Nepoužívejte vibrační míchadlo.
6. Inkubujte 3 hodiny 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. Zkumavky 1-2 krát **promyjte** 1 ml destilované vody. Obsah všech zkumavek, vyjma zkumavek pro stanovení celkové radioaktivity, dekantujte a zbytek tekutiny nechte vstřebat jemným poklepáním do buničité vaty. Zkumavky **nechte stát** dnem vzhůru alespoň 5 minut.
9. **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 jakékoli diagnostické a terapeutické rozhodnutí musí být výsledky jednotlivých testů podloženy jinými klinicky relevantními daty.

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.

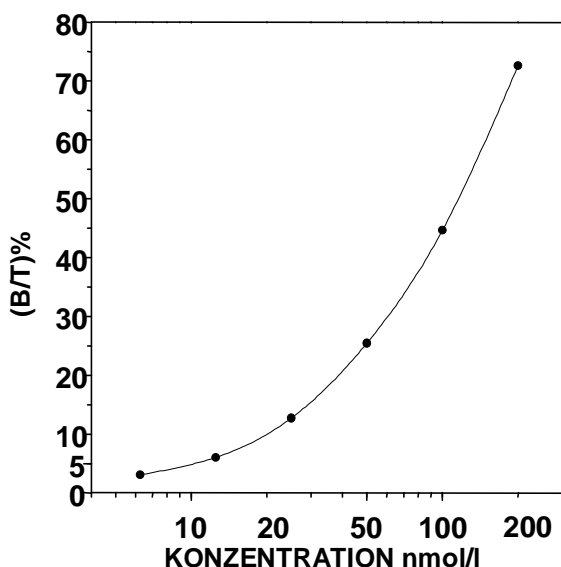
Vypočtete průměr četností všech zkumavek. **Odečtete** četnost NSB od četností všech kalibrátorů a četností neznámých vzorků.

Vypočtete % (B/T) pomocí rovnice:

$$\% \text{ B/T} = \frac{(\text{četnost kalibrátoru nebo vzorku-NSB}) \times 100}{\text{celková četnost}}$$

Vyneste kalibrační křivku v semi-logaritmických souřadnicích tak, aby % (B/T) byla na ose **y** a koncentrace kalibrátorů SHBG na ose **x**.

Odečtete koncentrace SHBG v neznámých vzorcích z kalibrační křivky.



Zkumavka	Průměr cpm	Netto cpm	(B/T)%	SHBG (nmol/l)
Celková aktivita	76209			
NSB	139			
Kal 6.25	2710	2571	3,4	
Kal 12.5	5435	5296	6,9	
Kal 25	10255	10116	13,3	
Kal 50	17667	17528	23,0	
Kal 100	29538	29399	38,6	
Kal 200	48811	48672	63,9	
Neznámý vzorek 1	4464	4325	5,7	10,1
Neznámý vzorek 2	29273	29134	38,2	98,8

Obr. 1

Typická kalibrační křivka.

Příklad.

(str. 9 originální příbalové informace)

Tabulka 1

Typická kalibrační křivka a výpočet výsledků.

Příklad.

REFERENČNÍ INTERVALY

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

Hodnoty SHBG u zřejmě zdravých dospělých osob byly naměřeny soupravou Spectria SHBG IRMA neparametrickou metodou doporučenou IFCC a byly vypočteny referenční intervaly pro nejnižší a nejvyšší hodnoty.

U normálních žen jsou hodnoty menší než 12 (9,9-12,3; 0,9-interval spolehlivosti, 165 osob, Orion Diagnostica, nepublikovaná data).

Tabulka 2 Referenční koncentrace SHBG

	Ženy	Muži
Počet osob	164	147
Průměr	57 nmol/l	33 nmol/l
Referenční interval*	21 – 139 nmol/l	16 – 61 nmol/l
0,90-interval spolehlivosti pro nejnižší hodnotu	15 – 24 nmol/l	14 – 18 nmol/l
pro nejvyšší hodnotu	98 - 159 nmol/l	57 – 73 nmol/l

* Referenční interval = 0,025 & 0,975 fraktíl

ANALYTICKÉ PARAMETRY MĚŘENÍ

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

Měřicí rozmezí

6,25 – 200 nmol/l.

Mez detekce

Mez detekce, definovaná jako nejnižší detekovatelná koncentrace odpovídající dvojnásobku směrodatné odchylky hodnot nulového kalibrátoru, je než lepší 1,3 nmol/l.

Linearita

Vzorky s vysokou koncentrací SHBG lze ředit do poměru 1:800 reakčním tlumivým roztokem ze soupravy.

Hook efekt

Nebyl zjištěn žádný Hook efekt do koncentrace 800 nmol/l. Tato koncentrace dává vyšší hodnotu než nejvyšší kalibrátor.

Preciznost (precision)

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

Tabulka 3 Intra-assay/ inter-assay preciznost

Intra-assay preciznost 10 replikátů			Inter-assay preciznost 10 duplikátů		
Vzorek	Průměr (nmol/l)	CV (%)	Vzorek	Průměr (nmol/l)	CV (%)
1	17,7	5,3	5	13,2	3,3
2	45,8	4,0	6	53,6	5,5
3	104,6	4,7	7	124,0	5,5
4	156,8	5,5	8	165,5	6,9

Str.11 originální příbalové informace

Metoda standardního přídávku (recovery)

Známa množství SHBG (30 – 140 nmol/l) byla přidána ke 4 patientským sérum. Standardní přídávky měly průměrnou hodnotu 102,1 % a směrodatnou odchylku 7,6 %.

Specificita

Při analýze soupravou Spectria SHBG IRMA nebyla zjištěna interference se žádným sérovým proteinem. Testovány byly následující látky v koncentracích vysoce překračujících fyziologické hodnoty: lidský albumin, α_1 -antitrypsin, fibrinogen, haptoglobin, IgA, IgG, orosomukoid, plazminogen a transferin.

Spectria SHGB IRMA
Radioimunoanalytické stanovení, zkumavky s navázanou protilátkou
Kat.č.: 68562

Obsah soupravy
(100 TESTŮ)

SHBG coated tubes: Zkumavky s navázanou protilátkou proti SHBG
SHBG tracer: SHBG radioindikátor
SHBG calibrators: SHBG kalibrátory
SHBG controls: SHBG kontroly
SHBG buffer: SHBG tlumivý roztok

Souhrn pracovního postupu
(všechny objemy jsou v μ l)

	Celková aktivita	NSB*	Kalibrátor	Kontrolní vzorek	Neznámý vzorek
Pipetování ředěného vzorku		100*	100	100	100
Pipetování radioindikátoru (červený)	200	200	200	200	200
Promíchání (zatřepání)		x	x	x	x
Inkubace 3h při 37°C		x	x	x	x
Dekantace		x	x	x	x
Promývání 1ml destilované vody (1-2krát)		x	x	x	x
Dekantace		x	x	x	x
Měření po dobu 1min. nebo 10.000 impulsů	x	x	x	x	x

*100 μ l Puffer für NSB*pro NSB pipetujte 100 μ l tlumivého roztoku

Spectria je ochranná známka firmy Orion Diagnostica Oy

68562-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

