

Spectria®
DHEAS RIA
Radioimunoanalytické stanovení, zkumavky s navázanou
protilátkou
Kat.č.67793

NÁVOD K POUŽITÍ SOUPRAVY

Říjen 2004

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



Orion Diagnostica

ISO9001
CERTIFIED

Výrobce: Orion Diagnostica Oy
P.O.BOX 83
FIN-02101 Espoo, Finsko
Tel. +358-10-42995
Fax.+358-10-4297546
www.oriondiagnostica.fi

CE

Vysvětlení symbolů použitých na štítcích

Diagnostický zdravotnický prostředek in vitro



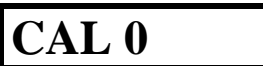
Katalogové číslo



Číslo šarže



Koncentrace kalibrátoru



Použitelné do



Teplotní rozmezí



Viz návod k použití



Obsahuje NaN_3 .



Škodlivé



Xn

URČENÝ ÚČEL POUŽITÍ

Souprava SPECTRIA DHEAS RIA firmy Orion Diagnostica (dehydroepiandrosteronsulfát), využívající techniky zkumavek potažených protilátkou, je určena pro kvantitativní radioimunoanalytické *in vitro* měření koncentrace DHEAS v séru.

KLINICKÝ VÝZNAM DHEAS

Nekonjugovaný dehydroepiandrosteron (DHEA) a jeho sulfát (DHEAS) jsou hlavními steroidními hormony kůry nadledvinek. Koncentrace DHEAS v séru je 200-500x vyšší než DHEA a 20x vyšší než ostatních steroidních hormonů. DHEAS se silně váže k albuminu a vytváří tak cirkulující zásobu, zatímco DHEA je pravděpodobně více aktivní na úrovni tkání. Sekrece DHEAS je stimulována kortikotropinem (ACTH), ale odpověď na simulace klesá s věkem. Nejvyšší hodnota DHEAS v séru je dosahována kolem 25 let a potom stále klesá.

Navzdory přítomnosti velkého množství DHEA a DHEAS, jejich fyziologická role zůstává zatím neznámá. Je možné, že závisí na hormonálním prostředí, zda mají vliv jako estrogen nebo androgen.

Určení hladin testosteronu, SHBG a DHEAS se používá při sledování hyperandrogenicity u žen a dětí. DHEAS je dobrý marker androgenové sekrece nadledvinek. Zvyšující se hladiny DHEAS indikují buď různé stupně adrenokortikální hypertenze nebo androgen sekretující karcinom nadledvinek.

U dospělých žen ve fertilním věku je hyperandrogenita způsobena ve většině případů polycystickým vaječníkem. Adrenokortikální hypertenze způsobená buď nadbytečnou ACTH stimulací nebo defekty enzymů nadledvinek, je spojena s různými stupni zvýšení hladin DHEAS. Tyto podmínky mohou být různé intenzity, včetně různé stupně maskulinizace. Při hyperplazii nadledvinek způsobené ACTH stimulací a u androgen sekretujících karcinomů může být naměřený DHEAS vysoký. Koncentrace DHEAS se zvyšují také u předčasné adrenarche, kde mohou dosahovat hladin u dospělých osob.

Nedávno se zájem o DHEAS zvýšil, protože DHEAS je sloučenina potenciálně působící proti stárnutí, protože hraje roli při Alzheimerově chorobě a při kardiovaskulárních chorobách.

PRINCIPY TESTU

Spectria DHEAS RIA test je založen na technice kompetitivní radioimunoanalýzy využívající techniky firmy Orion Diagnostica, zkumavek potažených protilátkou. Známé množství značeného DHEAS a neznámé množství neznáčeného antigenu soutěží o omezený počet vysoce afinitních vazebných míst protilátky na Spectria zkumavce. Po vymytí nenavázaného antigenu je množství značeného DHEAS ve Spectria zkumavce nepřímo úměrné množství DHEAS ve vzorku. Koncentrace DHEAS v neznámých vzorcích se odečtou z kalibrační křivky.

REAGENCIE

Materiály dodávané v soupravě

REAGENCIE	MNOŽSTVÍ	SKLADOVÁNÍ
Spectria zkumavky s navázanou protilátkou: Geometricky optimalizované testovací zkumavky potažené polyklonální králičí protilátkou proti DHEAS barva: lila	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>
Radioindikátor DHEAS Připraven k použití. Radioindikátorem je [¹²⁵ I]- značený DHEAS ve fosfátovém tlumivém roztoku s proteinem. NaN ₃ < 0,01% Thimerosal a červené barvivo	1 lahvička 55 ml Radioaktivita <200 kBq	Při teplotě 2 – 8°C do data expirace.
Kalibrátory DHEAS Lyofilizovány. Koncentrace DHEAS 0; 0,1; 0,5; 2; 10 a 30 μmol/l v lidském séru. NaN ₃ , Kathon. <i>Kalibrováno proti interní master kalibrační soupravě.</i>	6 lahviček Rekonstituovat 0,5ml destilované vody	Při teplotě 2 – 8°C do data expirace. Při teplotě 2 – 8°C 8 týdnů po rekonstituci.

Reagencie obsahují NaN₃ a Kathon 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. Nemíchejte substance ze souprav různých šarží. Používejte pouze substance jedné šarže soupravy. Nepoužívejte reagentie po datu expirace, které je vytištěno na každém štítku balení.

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: 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

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 reagentii 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: Reagentie obsahují **azid sodný (NaN₃)** jako konzervační činidlo. Lyofilizované reagentie obsahují < 1% azid sodný, který je v této koncentraci škodlivý při vdechnutí, polknutí a při kontaktu s kůží. Proloužením 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 NaN₃ toxické výpary.

VAROVÁNÍ 5: Lyofilizované kalibrátory obsahují 1,5% Kathon jako konzervační činidlo. Zabraňte kontaktu s kůží. Rekonstituovaný kalibrátor obsahuje 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 1 týden při teplotě 2-8°C, delší dobu při teplotě -20°C. Zabraňte opakovanému rozmrazení a zmrazení vzorku.

PRACOVNÍ POSTUPY

Materiály potřebné, ale nedodávané se soupravou

MIKROPIPETY pro přesné odměření 25 µl a 500 µl

DÁVKOVAČ REAGENCIÍ pro dávkování 1 ml

TESTOVACÍ ZKUMAVKY (pro stanovení celkové radioaktivity)

VIBRAČNÍ MÍCHADLO

DEKANTOVACÍ STOJÁNEK

VODNÍ LÁZEŇ s teplotou 37°C

BUNIČITÁ VATA
 GAMMA-ČÍTAČ, manuální nebo automatický
 KRYCÍ FÓLIE PARAFILM
 DESTILOVANÁ VODA

Rekonstituce reagensů

Kalibrátory **vytemperujte** na laboratorní teplotu (18...25°C). Lyofilizované kalibrátory **rekonstituuje** tak, že do každé lahvičky přidáte 500µl destilované vody. Lahvičku uzavřete a dobře promíchejte jemným kroužením, aniž by se vytvořila pěna. Před použitím nechte 1 hodinu stát.

Pracovní postup

1. Všechny reagensie, kontroly a vzorky **vytemperujte** na laboratorní teplotu (18...25°C).
1. **Označte** zkumavky s navázanou protilátkou pro kalibrátory, kontrolní a pacientská séra. Pracujte v duplikátech. Odděleně připravte dvě normální zkumavky pro stanovení celkové radioaktivity.
2. **Napipetujte** 25 µl kalibrátorů, kontrolních a pacientských sér do příslušných zkumavek. Zkumavky pro stanovení celkové radioaktivity ponechte zatím prázdné.
3. Do všech zkumavek **přidejte** po 500µl DHEAS radioindikátoru (červený roztok).
4. Všechny zkumavky pečlivě **promíchejte** na vibračním míchadle.
5. Zkumavky **přikryjte** fólií a **inkubujte** ve vodní lázni 1 hodinu 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** 1ml promývacího roztoku a ručně **zatřepejte** stojánkem.
8. Zkumavky **dekantujte** a zbytek tekutiny z každé **nechte vstřebat** jemným poklepáním do buničité vaty. Zkumavky **nechte stát** vzhůru dnem alespoň 5 minut. Potom s nimi **znovu poklepte** na buničitou vatu.
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:

- § Reagensie pipetujte přímo na dno zkumavek.
- § Předcházejte poškrábání dna zkumavek špičkami pipet.
- § Po 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 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 DHEAS (µmol/l) na ose x.

Odečtěte koncentrace DHEAS v neznámých vzorcích z kalibrační křivky.

Obr.1 Typická kalibrační křivka
str.7 originální příbalové informace

Tabulka 1 Typická kalibrační křivka a výpočet výsledků

Zkumavka	cpm	%(B/Bo)	koncentrace (mmol/l)
str.7 originální příbalové informace			

Hodnoty DHEAS jsou získány v SI jednotkách, $\mu\text{mol/l}$. Převod na $\mu\text{g/ml}$ je možný s použitím následující rovnice:

$$\text{DHEAS } (\mu\text{g/ml}) = \text{DHEAS } (\mu\text{mol/l}) \times 0,3685$$

REFERENČNÍ INTERVALY

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.

Byly měřeny hodnoty DHEAS v séru u zdravých jedinců. K výpočtu referenčního intervalu a intervalu spolehlivosti pro vyšší a nižší hraniční hodnotu normálu byla použita neparametrická metoda, doporučená IFCC. Výsledky jsou uvedeny v tabulce 2. Výsledky byly rozděleny do skupin podle věku a pohlaví. V tabulce 3 jsou uvedena data pro věkovou skupinu 21 – 50 let.

Tabulka 2. Referenční hodnoty pro DHEAS závislé na věku a pohlaví

		Ženy		Muži		
Věk (roky)	n	Průměr (mmol/l)	Rozmezí (mmol/l)	n	Průměr (mmol/l)	Rozmezí (mmol/l)
*) referenční interval = 0,025&0,975 fraktíl						

**)Rozmezí = nejnižší a nejvyšší hodnota skupiny

Tabulka 3. Referenční hodnoty pro DHEAS ($\mu\text{mol/l}$) pro ženy a muže, věk 21 – 50 let

Pohlaví	n	Věk (roky)	Průměr (mmol/l)	Referenční rozmezí (0,025&0,975 fraktíl)	0,90 interval spolehlivosti
Ženy					
Muži					

str.8 originální příbalové informace

ANALYTICKÉ PARAMETRY MĚŘENÍ

Měřicí rozmezí

0,1 – 30 $\mu\text{mol/l}$.

Mez detekce

Mez detekce, definovaná jako nejnižší detekovatelná koncentrace odpovídající dvojnásobku směrodatné odchylky hodnot nulového kalibrátoru, je 0,03 $\mu\text{mol/l}$.

Linearita

Vzorky lze ředit do poměru 1:20 nulovým kalibrátorem ze soupravy.

Metoda standardního přípravku (recovery)

Známa množství DHEAS (1,65 –18,0 $\mu\text{mol/l}$) byla přidána ke vzorkům patientských sér obsahujících 0,04–4,53 $\mu\text{mol/l}$ DHEAS. Standardní přídatky se pohybovaly v rozmezí 88 –114 % s průměrnou hodnotou 103 %.

Preciznost (precision)

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

Tabulka 4. Intra-assay/ inter-assay preciznost

Intra-assay preciznost 14 replikátů			Inter-assay preciznost 11 duplikátů		
Vzorek	Průměr ($\mu\text{mol/l}$)	CV (%)	Vzorek	Průměr ($\mu\text{mol/l}$)	CV (%)

Str.9 originální příbalové informace

Interferující látky

Sérový bilirubin do koncentrace < 350 $\mu\text{mol/l}$ a hemoglobin do koncentrace 5 g/l nemá vliv na měření koncentrace DHEAS. Nedoporučujeme používat vysoce lipemické vzorky.

Specifická

Procento zkřížených reakcí při 50% vazebné kapacitě ukazuje tabulka 5. Efekt maximálních koncentrací některých látek na hodnoty DHEAS je uveden v tabulce 6.

Tabulka 5 Zkřížené reakce

Látka	Zkřížená reakce (%)	Látka	Zkřížená reakce (%)
DHEAS	100	DHEA glukuronid	nd
Aldosteron	nd	5 α -dihydrotestosteron	nd
Androstendiol	nd	Estradiol	nd
Androstendion	0,01	Estron	nd
Androsteron	nd	Estron-3-sulfát	1,6
Androsteron glukuronid	nd	17 α -hydroxyprogesteron	nd
Androsteron sulfát	0,3	19-hydroxy-4-androsten-3,17-dion	nd
Kortikosteron	nd	Metyrapon	nd
Kortizol	nd	Pregnenolon	nd
Kyproteron acetát	nd	Progesteron	nd
Dexametazon	nd	Testosteron	nd
DHEA	nd		

nd = nedekovatelné

Tabulka 6. Vliv některých steroidů na hodnoty DHEAS. Uvedené sloučeniny byly přidány buď ke vzorkům séra, nebo k nulovému séru. Hodnoty koncentrace DHEAS byly měřeny před a po přidavku.

Sloučenina	Přidaná patologická/ fyziologická koncentrace nmol/l	Vliv na hodnoty DHEAS ($\mu\text{mol/l}$)	
		vzorky séra bazální hodnota	nulová séra po přidavku

str.10 originální příbalové informace

LITERATURA

str.11 originální příbalové informace

Spectria® DHEAS RIA

Kat.č. 67793

Obsah soupravy (100 testů)

ZKUMAVKY S NAVÁZANOU PROTILÁTKOU
PROTI DHEAS
DHEAS RADIOINDIKÁTOR
DHEAS KALIBRÁTORY

Souhrn pracovního postupu

(všechny objemy jsou v μ l)

	Celková aktivita	Kalibrátor	Kontrolní vzorek	Neznámý vzorek
Pipetování vzorku		25	25	25
Pipetování radioindikátoru (červený roztok)	500	500	500	500
Promíchání		x	x	x
Inkubace 1h při 37°C		x	x	x
Dekantace		x	x	x
Promývání 1ml destilované vody		x	x	x
Dekantace		x	x	x
Měření po dobu 1min. nebo 10.000 impulsů	x	x	x	x

Spectria je ochranná známka firmy Orion Corporation.

Zastoupení výrobce v ČR: Orion Diagnostica-organizační složka
Bělohorská 57, 169 00 Praha 6
tel. 233 350 533, fax: 233 350 532
E-mail: orion@oriondiagnostica.cz

Datum poslední revize textu: 14.7.2005

Originální příbalová informace: 67793-E05