



DCM087-4
Ed. 01/2015

SHBG

per analisi di routine

Determinazione immunoenzimatica diretta della SHBG nel siero o plasma umano.

IVD



LOT

Vedere etichetta esterna

2°C 8°C



Σ = 96 test

REF DKO087

DESTINAZIONE D'USO

Metodo immunoenzimatico diretto colorimetrico per la determinazione quantitativa della concentrazione della SHBG nel siero o plasma umano.

Il kit SHBG è destinato al solo uso di laboratorio.

1. SIGNIFICATO CLINICO

La SHBG è una glicoproteina con alta affinità di legame per il testosterone e l'estradiolo, è una proteina di trasporto che veicola gli ormoni steroidei nel circolo sanguigno fino ai tessuti bersaglio.

La SHBG è più elevata nelle donne rispetto agli uomini e aumenta in gravidanza e per l'assunzione di estrogeni. Ridotte concentrazioni di SHBG si hanno nelle donne con iperandrogenismo ed irsutismo, nella sindrome di Cushing e nella malattia ovarica policistica.

Aumenta nel maschio con ipogonadismo, nella cirrosi epatica e nella tiroto-tossicosi.

2. PRINCIPIO DEL METODO

Il test SHBG ELISA è basato sulla cattura simultanea della SHBG umana da parte di due anticorpi monoclonali, uno immobilizzato nella micropiastra, l'altro coniugato con la perossidasi di rafano (HRP).

Dopo un determinato periodo di incubazione, la separazione libero-legato si ottiene mediante semplice lavaggio della fase solida.

Successivamente l'enzima HRP presente nella frazione legata, catalizza la reazione tra il Substrato (H₂O₂) ed il TMB Substrate, sviluppando una colorazione blu che vira al giallo dopo aggiunta dello Stop Solution (H₂SO₄).

L'intensità del colore sviluppato è proporzionale alla concentrazione di SHBG presente nel campione.

La concentrazione della SHBG nel campione è calcolata in base ad una curva di calibrazione.

3. REATTIVI, MATERIALI E STRUMENTAZIONE

3.1. Reattivi e materiali forniti nel kit

1. Calibrators (5 flaconi, 1 mL ciascuno)

CAL0 **REF** DCE002/8706-0
CAL1 **REF** DCE002/8707-0
CAL2 **REF** DCE002/8708-0
CAL3 **REF** DCE002/8709-0
CAL4 **REF** DCE002/8710-0

2. Control (1 flacone, 1 mL, pronto all'uso)

La concentrazione del Controllo è indicata sul Certificato di Analisi **REF** DCE045/8703-0

3. 5X Assay buffer (1 flacone, 50 mL)

Hepes buffer; BSA 10 g/L, stabilizzanti **REF** DCE049-0

4. Conjugate (1 flacone, 12 mL)

Anticorpo monoclonale anti SHBG coniugato a Perossidasi di rafano (HRP) **REF** DCE002/8702-0

5. Coated Microplate (1 micropiastra breakable)

Anticorpo monoclonale anti SHBG adsorbito sulla micropiastra **REF** DCE002/8703-0

6. TMB Substrate (1 flacone, 15 mL)

H₂O₂-TMB (0,26 g/L) (*evitare il contatto con la pelle*) **REF** DCE004-0

7. Stop Solution (1 flacone, 15 mL)

Acido Solforico 0.15 mol/L (*evitare il contatto con la pelle*) **REF** DCE005-0

8. 50X Conc. Wash Solution (1 flacone, 20 mL)

NaCl 45g/L; Tween-20 55g/L **REF** DCE006-0

3.2. Reattivi necessari non forniti nel kit

Acqua distillata.

3.3. Materiale e strumentazione ausiliare

Dispensatori automatici.

Letto per micropiastre (450 nm, 620-630 nm).

Note

I Calibratori contengono SHBG in una matrice proteica stabilizzante.

Conservare tutti i reattivi a $2\pm 8^{\circ}\text{C}$, al riparo dalla luce. Aprire la busta del Reattivo 5 (Coated Microplate) solo dopo averla riportata a temperatura ambiente e chiuderla subito dopo il prelievo delle strips da utilizzare; una volta aperta è stabile fino alla data di scadenza del kit. Evitare di staccare la sheet adesiva dalle strips che non vengono utilizzate nella seduta analitica.

4. AVVERTENZE

- Questo test kit è per uso in vitro, da eseguire da parte di personale esperto. Non per uso interno o esterno su esseri Umani o Animali.
- Usare i previsti dispositivi di protezione individuale mentre si lavora con i reagenti forniti.
- Seguire le Buone Pratiche di Laboratorio (GLP) per la manipolazione di prodotti derivati da sangue.
- Alcuni reagenti contengono piccole quantità di Proclin 300^R come conservante. Evitare il contatto con la pelle e le mucose.
- Il TMB Substrato contiene un irritante, che può essere dannoso se inalato, ingerito o assorbito attraverso la cute. Per prevenire lesioni, evitare l'inalazione, l'ingestione o il contatto con la cute e con gli occhi.
- La Stop Solution è costituita da una soluzione di acido solforico diluito. L'acido solforico è velenoso e corrosivo e può essere tossico se ingerito. Per prevenire possibili ustioni chimiche, evitare il contatto con la cute e con gli occhi.
- Evitare l'esposizione del reagente TMB/H₂O₂ a luce solare diretta, metalli o ossidanti. Non congelare la soluzione.
- Questo metodo consente di determinare concentrazioni di SHBG da 2,78 nmol/L a 277,8 nmol/L.

5. PRECAUZIONI

- Si prega di attenersi rigorosamente alla sequenza dei passaggi indicata in questo protocollo. I risultati presentati qui sono stati ottenuti usando specifici reagenti elencati in queste Istruzioni per l'Uso.
- Tutti i reattivi devono essere conservati a temperatura controllata di $2-8^{\circ}\text{C}$ nei loro contenitori originali. Eventuali eccezioni sono chiaramente indicate. I reagenti sono stabili fino alla data di scadenza se conservati e trattati seguendo le istruzioni fornite.
- Prima dell'uso lasciare tutti i componenti dei kit e i campioni a temperatura ambiente ($22-28^{\circ}\text{C}$) e mescolare accuratamente.

- Non scambiare componenti dei kit di lotti diversi. Devono essere osservate le date di scadenza riportate sulle etichette della scatola e di tutte le fiale. Non utilizzare componenti oltre la data di scadenza.
- Qualora si utilizzi strumentazione automatica, è responsabilità dell'utilizzatore assicurarsi che il kit sia stato opportunamente validato.
- Un lavaggio incompleto o non accurato dei pozzetti può causare una scarsa precisione e/o un'elevato background. Per migliorare le prestazioni del kit su strumentazione automatica, si consiglia di aumentare il numero di lavaggi.
- Per la riproducibilità dei risultati, è importante che il tempo di reazione di ogni pozzetto sia lo stesso. Per evitare il time shifting durante la dispensazione degli reagenti, il tempo di dispensazione dei pozzetti non dovrebbe estendersi oltre i 10 minuti. Se si protrae oltre, si raccomanda di seguire lo stesso ordine di dispensazione. Se si utilizza più di una piastra, si raccomanda di ripetere la curva di calibrazione in ogni piastra.
- L'aggiunta del TMB Substrato dà inizio ad una reazione cinetica, la quale termina con l'aggiunta della Stop Solution. L'aggiunta del TMB Substrato e della Stop Solution deve avvenire nella stessa sequenza per evitare tempi di reazione differenti.
- Osservare le linee guida per l'esecuzione del controllo di qualità nei laboratori clinici testando controlli e/o pool di sieri.
- Osservare la massima precisione nella ricostituzione e dispensazione dei reagenti.
- Non usare campioni microbiologicamente contaminati, altamente lipemici o emolizzati.
- I lettori di micropiastre leggono l'assorbanza verticalmente. Non toccare il fondo dei pozzetti.

6. PROCEDIMENTO

6.1. Preparazione dei Calibratori (C₀...C₄)

I Calibratori hanno le seguenti concentrazioni:

	C ₀	C ₁	C ₂	C ₃	C ₄
nmol/L	0	2,78	27,8	111,1	277,8

I Calibratori ed il Controllo sono già stati pre-diluiti e sono pronti all'uso.

Una volta aperti, i Calibratori sono stabili 3 mesi a $2-8^{\circ}\text{C}$.

6.2. Preparazione della soluzione di lavaggio

Prima dell'uso, diluire il contenuto di ogni fiala di "50X Conc. Wash Solution" con acqua distillata fino al volume di 1000 mL. Per preparare volumi minori rispettare il rapporto di diluizione di 1:50. La

soluzione di lavaggio diluita è stabile a 2÷8°C per almeno 30 giorni.

6.3. Preparazione del campione

La determinazione della SHBG può essere effettuata su plasma o siero umano.

Il campione può essere conservato a 2-8°C per un breve periodo (massimo due giorni). Per periodi di conservazione più lunghi conservare il campione a -20°C. Evitare cicli ripetuti di congelamento e scongelamento.

Procedere come segue:

1. Diluire il 5X Assay Buffer (1:5):

Diluire 50 mL di assay buffer (reattivo 3) con 200 mL di H₂O distillata; per volumi minori rispettare il rapporto di diluizione 1:5.

Lasciare su agitatore rotante per almeno 5 minuti.

2. Diluire i campioni (1:100):

Diluire 10 µL di campione con 990 µL di Assay Buffer diluito; per volumi differenti rispettare il rapporto di diluizione 1:100.

Agitare manualmente i campioni diluiti, evitare l'uso di vortex.

6.4. Procedimento

- **Portare tutti i reagenti a temperatura ambiente (22-28°C) per almeno 30 minuti.** Al termine del dosaggio riporre immediatamente tutti i reagenti a 2-8°C: evitare lunghi periodi a temperatura ambiente.
- Le strisce di pozzetti non utilizzate devono essere rimesse immediatamente nella busta richiudibile contenente il materiale essicante e conservate a 2-8°C.
- Per evitare potenziali contaminazioni microbiche e/o chimiche non rimettere i reagenti inutilizzati nei flaconi originali.
- Al fine di aumentare l'accuratezza dei risultati del test è necessario operare in doppio, allestendo due pozzetti per ogni punto della curva di calibrazione (C₀-C₄), due per ogni Controllo, due per ogni Campione ed uno per il Bianco.

Reagente	Calibrator	Campione /Controllo	Bianco
Calibrator C ₀ -C ₄	25 µL		
Campione diluito /Controllo		25 µL	
Coniugato	100 µL	100 µL	
Incubare 1 h a temperatura ambiente (22-28°C). Allontanare la miscela di reazione. Lavare i pozzetti 3 volte con 0,3 mL di soluzione di lavaggio diluita. Nota importante: ad ogni step di lavaggio, agitare delicatamente la piastra per 5 secondi e successivamente rimuovere l'eccesso di soluzione di lavaggio sbattendo delicatamente la micropiastra capovolta su fogli di carta assorbente. Lavaggi automatici: se si utilizza strumentazione automatica effettuare almeno 5 lavaggi.			
TMB Substrate	100 µL	100 µL	100 µL
Incubare 15 minuti al buio a temperatura ambiente (22-28°C).			
Stop Solution	100 µL	100 µL	100 µL
Agitare delicatamente la micropiastra. Leggere l'assorbanza (E) a 450 nm contro una lunghezza d'onda di riferimento di 620-630 nm oppure contro il Bianco entro 5 minuti.			

7. CONTROLLO QUALITA'

Ogni laboratorio dovrebbe analizzare i campioni nella gamma dei livelli elevati, normali e bassi di SHBG per il controllo delle prestazioni dell'analisi. Questi campioni dovrebbero essere trattati come ignoti ed i valori determinati in ogni test effettuato. Le tabelle di controllo qualità dovrebbero essere effettuate per seguire le prestazioni dei reagenti forniti. Metodi statistici adeguati dovrebbero essere impiegati per accertare il trend. Il laboratorio dovrebbe fissare i limiti di accettabilità di prestazioni dell'analisi. Altri parametri che dovrebbero essere controllati includono le intercette di 80, 50 e 20% della curva di calibrazione per valutare la riproducibilità. In più, la capacità di assorbimento massima dovrebbe essere costante con l'esperienza precedente. La deviazione significativa dalle prestazioni stabilite può indicare il cambiamento inosservato negli stati o nella degradazione sperimentali dei reagenti del kit. Reagenti freschi dovrebbero essere usati per determinare il motivo delle variazioni.

8. RISULTATI

8.1. Estinzione Media

Calcolare l'estinzione media (Em) di ciascun punto della curva di calibrazione (C₀-C₄) e di ogni campione.

8.2. Curva di calibrazione

Tracciare il grafico dell'assorbanza (Em) in funzione delle concentrazioni dei Calibratori (C₀-C₄) disegnando la curva che meglio approssima il valore dei punti della curva di calibrazione (es.: Cubic Spline, Four parameter Logistic).

8.3. Calcolo dei risultati

Interpolare, sul grafico, i valori di assorbanza relativi a ciascun campione e leggerne la corrispondente concentrazione in nmol/L.

9. VALORI DI RIFERIMENTO

(nmol/L)	Uomini	Donne
N	102	44
Media	43	63
Range assoluto	15-100	15-120

È importante tenere presente che la determinazione di un range di valori attesi in un dato metodo per una popolazione "normale" è dipendente da molteplici fattori, quali la specificità e sensibilità del metodo in uso, e la popolazione in esame. Perciò ogni laboratorio dovrebbe considerare i range indicati dal Fabbricante come un'indicazione generale e produrre range di valori attesi propri basati sulla popolazione indigena dove il laboratorio risiede.

10. PARAMETRI CARATTERISTICI

10.1 Specificità

L'anticorpo riconosce specificamente la SHBG umana.

Le cross reattività sono calcolate come rapporto peso/peso percentuale.

hSHBG (Scripps Laboratories Cat.No.S1724 Lot. 545068)	100 %
hCBG (UCB, Bioproducts Cat. No. i097 Lot. 002/1)	<0.2%
hTBG (Scripps Laboratories Cat.No.T0414 Lot. 780095)	<0.04%

11. DISPOSIZIONI PER LO SMALTIMENTO

I reagenti devono essere smaltiti in accordo con le leggi locali.

BIBLIOGRAFIA

- Petra PH. *The plasma sex steroid binding protein (SBP or SHBG). A critical review of recent developments on the structure, molecular biology and function.*J Steroid Biochem Mol Biol. 1991;40(4-6):735-53. Review.
- Selby C. *Sex hormone binding globulin: origin, function and clinical significance.*Ann Clin Biochem. 1990 Nov;27 (Pt 6):532-41. Review.
- Pugeat M, Crave JC, Tourniaire J, Forest MG. *Clinical utility of sex hormone-binding globulin measurement.* Horm Res. 1996;45(3-5):148-55. Review.

Ed. 01/2015

DCM087-4

DiaMetra S.r.l. Headquarter: Via Calabria 15
20090 SEGRATE (MI) Italy

Tel. +39-02-2139184

Fax +39-02-2133354

Manufactory: Via Pozzuolo 14,
06038 SPELLO (PG) Italy

Tel. +39-0742-24851

Fax +39-0742-316197

E-mail: info@diametra.com



DCM087-4
Ed. 01/2015

SHBG

for routine analysis

Direct immunoenzymatic determination of SHBG in human serum or plasma.

IVD



LOT

See external label

2°C 8°C



Σ = 96 tests

REF DKO087

INTENDED USE

Direct immunoenzymatic colorimetric method for quantitative determination of SHBG concentration in human serum or plasma.

SHBG kit is intended for laboratory use only.

1. CLINICAL SIGNIFICANCE

Sex-Hormone-Binding Globulin is a blood transport protein for steroids hormones with an high affinity for testosterone and estradiol.

The SHBG levels are higher in women than in men and increase during pregnancy and in women taking oral contraceptives. Low levels are found in cases of hirsutism, hyperandrogenism and may be encountered in individuals with Cushing's or polycystic ovarian syndrome.

High serum level for men are associated with hypogonadism, hepatic cirrhosis and thyrotoxicosis.

2. PRINCIPLE

SHBG ELISA test is based on the simultaneous binding of human SHBG to two monoclonal antibodies, one immobilized on microwell plates and the other conjugated with horseradish peroxidase (HRP).

After incubation, the bound/free separation is performed by a simple solid-phase washing.

Then the enzyme HRP in the bound-fraction reacts with the Substrate (H₂O₂) and the TMB Substrate and develops a blu color that changes into yellow when the Stop Solution (H₂SO₄) is added.

The colour intensity is proportional to the SHBG concentration in the sample.

The SHBG concentration in the sample is calculated through a calibration curve..

3. REAGENTS, MATERIALS AND INSTRUMENTATION

3.1. Reagents and materials supplied in the kit

1. Calibrators (5 vials, 1 mL each)

CAL0	REF DCE002/8706-0
CAL1	REF DCE002/8707-0
CAL2	REF DCE002/8708-0
CAL3	REF DCE002/8709-0
CAL4	REF DCE002/8710-0

2. Control (1 vial, 1 mL, ready to use)

Concentration of Control is indicated on the certificate of Analysis

REF DCE045/8703-0

3. 5X Assay buffer (1 vial, 50 mL)

Hepes buffer; BSA 10 g/L, stabilisers

REF DCE049-0

4. Conjugate (1 vial, 12 mL)

Monoclonal antibody anti SHBG conjugated with horseradish peroxidase (HRP)

REF DCE002/8702-0

5. Coated Microplate (1 breakable microplate)

Monoclonal antibody anti SHBG adsorbed on microplate

REF DCE002/8703-0

6. TMB Substrate (1 vial, 15 mL)

H₂O₂-TMB 0.26g/L (avoid any skin contact)

REF DCE004-0

7. Stop Solution (1 vial, 15 mL)

Sulphuric acid 0.15 mol/L (avoid any skin contact)

REF DCE005-0

8. 50X Conc. Wash Solution (1 vial, 20 mL)

NaCl 45g/L; Tween-20 55g/L

REF DCE006-0

3.2. Reagents necessary not supplied

Distilled water.

3.3. Auxiliary materials and instrumentation

Automatic dispenser.

Microplates reader (450 nm, 620-630 nm).

Note

The Calibrators contain SHBG in a proteic stabilizing matrix solution.

Store all reagents between 2÷8°C in the dark. Open the bag of reagent 5 (Coated Microplate) only when it is at room temperature and close it immediately after use; once opened, it is stable until expiry date of the kit. Do not remove the adhesive sheets on the strips unutilised.

4. WARNINGS

- This kit is intended for in vitro use by professional persons only. Not for internal or external use in Humans or Animals.
- Use appropriate personal protective equipment while working with the reagents provided.
- Follow Good Laboratory Practice (GLP) for handling blood products.
- Some reagents contain small amounts of Proclin 300^R as preservatives. Avoid the contact with skin or mucosa.
- The TMB Substrate contains an irritant, which may be harmful if inhaled, ingested or absorbed through the skin. To prevent injury, avoid inhalation, ingestion or contact with skin and eyes.
- The Stop Solution consists of a diluted sulphuric acid solution. Sulphuric acid is poisonous and corrosive and can be toxic if ingested. To prevent chemical burns, avoid contact with skin and eyes.
- Avoid the exposure of reagent TMB/H₂O₂ to directed sunlight, metals or oxidants. Do not freeze the solution.
- This method allows the determination of SHBG from 2.78 to 277.8 nmol/L.

5. PRECAUTIONS

- Please adhere strictly to the sequence of pipetting steps provided in this protocol. The performance data represented here were obtained using specific reagents listed in this Instruction For Use.
- All reagents should be stored refrigerated at 2-8°C in their original container. Any exceptions are clearly indicated. The reagents are stable until the expiry date when stored and handled as indicated.
- Allow all kit components and specimens to reach room temperature (22-28°C) and mix well prior to use.
- Do not interchange kit components from different lots. The expiry dates printed on the labels of the box and of the vials must be observed. Do not use any kit component beyond their expiry date.
- If you use automated equipment is your responsibility to make sure that the kit has been appropriately tested.
- The incomplete or inaccurate liquid removal from the wells could influence the assay precision and/or increase the background. To improve the performance of the kit on automatic systems is recommended to increase the number of washes.

- It is important that the time of reaction in each well is held constant for reproducible results. Pipetting of samples should not extend beyond ten minutes to avoid assay drift. If more than 10 minutes are needed, follow the same order of dispensation. If more than one plate is used, it is recommended to repeat the dose response curve in each plate
- Addition of the TMB Substrate solution initiates a kinetic reaction, which is terminated by the addition of the Stop Solution. Therefore, the TMB Substrate and the Stop Solution should be added in the same sequence to eliminate any time deviation during the reaction.
- Observe the guidelines for performing quality control in medical laboratories by assaying controls and/or pooled sera.
- Maximum precision is required for reconstitution and dispensation of the reagents.
- Samples microbiologically contaminated should not be used in the assay. Highly lipemic or haemolysed specimens should similarly not be used
- Plate readers measure vertically. Do not touch the bottom of the wells.

6. PROCEDURE

6.1. Preparation of the Calibrators (C₀...C₄)

The Calibrators have the following concentrations:

	C ₀	C ₁	C ₂	C ₃	C ₄
nmol/L	0	2.78	27.8	111.1	277.8

The Calibrators and Control have already been pre-diluted and are ready to use.

Once opened, the Calibrators are stable 3 months at 2-8°C.

6.2. Preparation of Wash Solution

Dilute the contents of each vial of the buffered Wash Solution Concentrate (50X) with distilled water to a final volume of 1000 mL prior to use. For smaller volumes respect the 1:50 dilution ratio. The diluted wash solution is stable for 30 days at 2÷8°C.

6.3. Preparation of the Sample

Serum or plasma can be used.

Specimen can be stored at 2-8°C for at short time (max two days). For longer storage the specimen should be frozen at -20°C. Avoid repeated freezing and thawing cycles.

Proceed as follows:

1. Dilute the 5X Assay Buffer (1:5):

Dilute 50 mL of assay buffer (reagent 3) with 200 mL of distilled H₂O; for smaller volumes respect the dilution ratio 1:5. Mix gently leaving in a rotating shaker at least 5 minutes.

2. Dilute the samples (1:100):

Dilute 10 µL of sample with 990 µL of diluted assay buffer; for different volumes respect the dilution ratio 1:100.

Mix gently avoiding the use of vortex.

6.4. Procedure

- **Allow all reagents to reach room temperature (22-28°C) for at least 30 minutes.** At the end of the assay, store immediately the reagents at 2-8°C: avoid long exposure to room temperature.
- Unused coated microwell strips should be released securely in the foil pouch containing desiccant and stored at 2-8°C.
- To avoid potential microbial and/or chemical contamination, unused reagents should never be transferred into the original vials.
- As it is necessary to perform the determination in duplicate in order to improve accuracy of the test results, prepare two wells for each point of the calibration curve (C₀-C₄), two for each Control, two for each sample, one for Blank.

Reagent	Calibrator	Sample/Control	Blank
Calibrator C ₀ -C ₅	25 µL		
Diluted Samples/Control		25 µL	
Conjugate	100 µL	100 µL	
Incubate at room temperature (22±28°C) for 1 hours. Remove the content from each well. Wash the wells 3 times with 300 µL of diluted Wash Solution. Important note: during each washing step, gently shake the plate for 5 seconds and remove excess solution by tapping the inverted plate on an absorbent paper towel. Automatic washer: if you use automated equipment, wash the wells at least 5 times.			
TMB Substrate	100 µL	100 µL	100 µL
Incubate at room temperature (22±28°C) for 15 minutes in the dark.			
Stop Solution	100 µL	100 µL	100 µL
Shake the microplate gently. Read the absorbance (E) at 450 nm against a reference wavelength of 620-630 nm or against Blank within 5 minutes.			

7. QUALITY CONTROL

Each laboratory should assay controls at normal, high and low levels range of SHBG for monitoring assay performance. These controls should be treated as unknowns and values determined in every test procedure performed. Quality control charts should be maintained to follow the performance of the supplied reagents. Pertinent statistical methods should be employed to ascertain trends. The individual laboratory should set acceptable assay performance limits. Other parameters that should be monitored include the 80, 50 and 20% intercepts of the calibration curve for run-to-run reproducibility. In addition, maximum absorbance should be consistent with past experience. Significant deviation from established performance can indicate unnoticed change in experimental conditions or degradation of kit reagents. Fresh reagents should be used to determine the reason for the variations.

8. RESULTS

8.1. Mean Absorbance

Calculate the mean of the absorbancies (E_m) corresponding to the single points of the calibration curve (C₀-C₄) and of each sample.

8.2. Calibration curve

Plot the values of absorbance (E_m) of the Calibrators (C₀-C₄) against concentration. Draw the best-fit curve through the plotted points. (es: Cubic Spline or Four Parameter Logistic).

8.3. Calculation of Results

Interpolate the values of the samples on the calibration curve to obtain the corresponding values of the concentrations expressed in nmol/L.

9. REFERENCE VALUES

nmol/L	Men	Women
N	102	44
Mean	43	63
Absolute range	15-100	15-120

Please pay attention to the fact that the determination of a range of expected values for a “normal” population in a given method is dependent on many factors, such as specificity and sensitivity of the method used and type of population under investigation. Therefore each laboratory should consider the range given by the Manufacturer as a general indication and produce their own range of expected values based on the indigenous population where the laboratory works.

10. PERFORMANCE AND CHARACTERISTICS

10.1. Specificity

The antibody specifically recognizes human SHBG. Cross reactivity values have been calculated on a weight/weight basis.

hSHBG (Scripps Laboratories Cat.No.S1724 Lot. 545068)	100 %
hCBG (UCB, Bioproducts Cat. No. i097 Lot. 002/1)	<0.2%
hTBG (Scripps Laboratories Cat.No.T0414 Lot. 780095)	<0.04%

11. WASTE MANAGEMENT

Reagents must be disposed off in accordance with local regulations.

BIBLIOGRAPHY

- Petra PH. *The plasma sex steroid binding protein (SBP or SHBG). A critical review of recent developments on the structure, molecular biology and function.* J Steroid Biochem Mol Biol. 1991;40(4-6):735-53. Review.
- Selby C. *Sex hormone binding globulin: origin, function and clinical significance.* Ann Clin Biochem. 1990 Nov;27 (Pt 6):532-41. Review.
- Pugeat M, Crave JC, Tourniaire J, Forest MG. *Clinical utility of sex hormone-binding globulin measurement.* Horm Res. 1996;45(3-5):148-55. Review.

Ed. 01/2015

DCM087-4

DiaMetra S.r.l. Headquater: Via Calabria 15
20090 SEGRATE (MI) Italy
Tel. +39-02-2139184
Fax +39-02-2133354

Manufactory: Via Pozzuolo 14,
06038 SPELLO (PG) Italy
Tel. +39-0742-24851
Fax +39-0742-316197
E-mail: info@diametra.com



DCM087-4
Ed. 01/2015

SHBG

para análisis de rutina

Determinación inmunoenzimática directa de SHBG en suero o plasma humano.

IVD



LOT

ver etiqueta externa

2°C 8°C



Σ = 96 ensayos

REF DKO087

USO PREVISTO

Método inmunoenzimático directo colorimétrico para la determinación cuantitativa de la concentración de SHBG en suero o plasma humano.

El kit SHBG está destinado al uso en laboratorio exclusivamente.

1. SIGNIFICADO CLÍNICO

La SHBG es una glicoproteína con alta afinidad de unión para la testosterona y el estradiol, es una proteína de transporte que lleva las hormonas esteroideas en la circulación sanguínea hasta los tejidos de destino.

La SHBG es más alta en las mujeres que en los hombres y aumenta durante el embarazo y con la toma de estrógenos. Se encuentran concentraciones reducidas de SHBG en mujeres con hiperandrogenismo e hirsutismo, síndrome de Cushing y enfermedad ovárica poliquística.

Aumenta en los hombres con hipogonadismo, cirrosis hepática y tirotoxicosis.

2. PRINCIPIO DEL MÉTODO

El ensayo SHBG ELISA se basa en la captura simultánea de la SHBG humana por parte de dos anticuerpos monoclonales, uno inmovilizado en la microplaca y el otro conjugado con peroxidasa de rabano (HRP).

Tras un determinado período de incubación, la separación libre-unido se obtiene mediante un simple lavado de la fase sólida.

La enzima presente en la fracción unida cataliza la reacción entre el substrato (H₂O₂) y el substrato TMB (TMB), desarrollando una coloración azul que cambia a amarillo tras la adición de la solución de interrupción (H₂SO₄).

La intensidad del color desarrollado es proporcional a la concentración de SHBG presente en la muestra.

La concentración de SHBG en la muestra se calcula tomando como base una serie de Calibradores.

3. REACTIVOS, MATERIALES E INSTRUMENTACIÓN

3.1. Reactivos y materiales suministrados en el kit

1. Calibradores (5 frascos, 1 mL cada uno)

CAL0 **REF** DCE002/8706-0

CAL1 **REF** DCE002/8707-0

CAL2 **REF** DCE002/8708-0

CAL3 **REF** DCE002/8709-0

CAL4 **REF** DCE002/8710-0

2. Control (1 frasco, 1 mL, listo para usar)

La concentración del Control se indica en el certificado de calidad (Certificate of Analysis)

REF DCE045/8703-0

3. 5X Tampón de ensayo (1 frasco, 50 mL)

Tampón Hepes; BSA 10 g/L, estabilizantes

REF DCE049-0

4. Conjugado (1 frasco, 12 mL)

Anticuerpo monoclonal anti-SHBG conjugado con peroxidasa de rabano (HRP) **REF** DCE002/8702-0

5. Microplaca recubierta (1 microplaca rompible)

Anticuerpomonoclonal anti SHBG absorbido en la microplaca **REF** DCE002/8703-0

6. Substrato TMB (1 frasco, 15 mL)

H₂O₂-TMB (0,26 g/L) (*evitar el contacto con la piel*)

REF DCE004-0

7. Solución de parada (1 frasco, 15 mL)

Ácido sulfúrico 0,15 mol/L (*evitar el contacto con la piel*)

REF DCE005-0

8. Solución de lavado conc. 50X (1 frasco, 20 mL)

NaCl 45 g/L; Tween-20 55 g/L **REF** DCE006-0

3.2. Reactivos necesarios no suministrados en el kit

Agua destilada.

3.3. Material e instrumentación auxiliares

Dispensadores automáticos.

Lector de microplacas (450 nm, 620-630 nm).

Nota

Los Calibradores contienen SHBG en una matriz proteica estabilizante.

Conservar todos los reactivos a $2\div 8$ °C, protegidos de la luz. Abrir la bolsa del reactivo 5 (microplaca recubierta) solo cuando se encuentre a temperatura ambiente y cerrarla inmediatamente después de extraer las tiras que se vayan a utilizar; una vez abierta, permanece estable hasta la fecha de caducidad del kit. No retirar las hojas adhesivas de las tiras que no se vayan a usar en la sesión de análisis.

4. ADVERTENCIAS

- Este kit de ensayo está previsto para usarse in vitro y por personal experto. No es para uso interno o externo en humanos o animales.
- Usar los equipos de protección individual previstos al trabajar con los reactivos suministrados.
- Siga las Buenas Prácticas de Laboratorio (GLP) en el manejo de las muestras sanguíneas y sus derivados.
- Algunos reactivos contienen pequeñas cantidades de Proclin 300^R como conservante. Evite el contacto con la piel y las mucosas.
- El cromógeno TMB contiene un irritante que puede ser dañino si se inhala, se ingiere o se absorbe a través de la piel. Para prevenir lesiones, evitar la inhalación, la ingestión o el contacto con la piel y con los ojos.
- La solución de parada está formada por una solución de ácido sulfúrico diluido. El ácido sulfúrico es venenoso y corrosivo, y puede ser tóxico si se ingiere. Para prevenir posibles quemaduras químicas, evitar el contacto con la piel y con los ojos.
- Evite la exposición de los reactivos TMB/H₂O₂ a la luz solar directa, metales u oxidantes. No congelar la solución.
- Este método permite determinar concentraciones de SHBG de 2,78 nmol/L a 277,8 nmol/L.

5. PRECAUCIONES

- Respetar rigurosamente la secuencia de los pasos indicados en este protocolo. Los resultados aquí presentados se han obtenido utilizando los reactivos específicos que figuran en estas instrucciones de uso.
- Todos los reactivos deben conservarse a una temperatura controlada de 2-8 °C en sus recipientes originales. Todas las excepciones están claramente marcados. Los reactivos son estables hasta la fecha de caducidad cuando se almacenan y manipulan de acuerdo con las instrucciones proporcionadas.

- Antes del uso, esperar hasta que todos los componentes del kit y las muestras se encuentren a temperatura ambiente (22-28°C) y mezclar cuidadosamente.
- No mezclar componentes de kits de lotes distintos. Se debe observar la fecha de caducidad indicada en la etiqueta de la caja y de todas las ampollas. No usar componentes después de la fecha de caducidad.
- Si utiliza un equipo automático, es responsabilidad del usuario asegurar que el equipo ha sido debidamente validada.
- Un lavado incompleto o impreciso y la aspiración insuficiente del líquido de los pocillos ELISA pueden causar una precisión pobre y/o un elevado fondo. Para mejorar el rendimiento del kit en los sistemas automatizados, se recomienda aumentar el número de lavados.
- Para la reproducibilidad de los resultados, es importante que el tiempo de reacción sea igual para cada pocillo. El tiempo de dispensación de los pocillos no debe superar los 10 minutos; si se prolongara más allá de los 10 minutos, respétese el orden de dispensación. si utiliza más de una placa, se recomienda repetir la curva de calibración en cada plato.
- Al añadir el sustrato TMB inicia una reacción cinética que termina al agregar la solución de interrupción. Tanto el sustrato como la solución de interrupción deben agregarse en la misma secuencia para evitar diferentes tiempos de reacción.
- Observar las directrices para la ejecución del control de calidad en los laboratorios clínicos al comprobar controles y/o pool de sueros.
- Observar la máxima precisión en la reconstitución y dispensación de los reactivos.
- No use muestras con contaminación microbiana, altamente lipémicas o hemolizadas.
- Los lectores de microplacas leen las DO verticalmente, por tanto no debe tocarse el fondo de los pocillos.

6. PROCEDIMIENTO

6.1. Preparación de los Calibradores (C₀...C₄)

Los Calibradores calibrados tienen las siguientes concentraciones:

	C ₀	C ₁	C ₂	C ₃	C ₄
nmol/L	0	2,78	27,8	111,1	277,8

Calibradores y Control son listos para usar.

Una vez abiertos, los Calibradores permanecen estables al menos 3 meses a 2-8°C.

6.2. Preparación de la solución de lavado

Diluir el contenido del frasco en un litro de H₂O desionizada; agitar con el agitador giratorio durante al menos 5 minutos. Para volúmenes menores, respetar la proporción de la dilución 1:50 (ej: 1 mL de solución de lavado concentrada más 49 mL de H₂O destilada). La solución de lavado diluida se mantiene estable a 2÷8 °C durante al menos 30 días.

6.3. Preparación de la muestra

La determinación de SHBG puede realizarse en plasma o suero humano. Si la dosificación no se realiza en un plazo de dos días desde la extracción, conservar la muestra a -20°C. No volver a congelar las muestras una vez descongeladas.

Proceder de la siguiente:

1. Diluir el 5X Tampón de ensayo (1:5):

Diluir 50 mL de tampón de ensayo (reactivo 3) con 200 mL de H₂O destilada; Para volúmenes menores, respetar la proporción de la dilución 1:5.

Agitar durante al menos 5 minutos en el agitador giratorio.

2. Diluir las muestras (1:100):

Diluir 10 µl de muestra con 990 µL de tampón de ensayo diluido; para volúmenes distintos, respetar la proporción de la dilución 1:100.

Agitar manualmente las muestras diluidas, evitar el uso de vórtex.

6.4. Procedimiento

- **Esperar hasta que todos los reactivos se encuentren a temperatura ambiente (22-28°C) durante al menos 30 minutos.** Al final del ensayo inmediatamente poner todos los reactivos a 2-8°C para evitar largos periodos a temperatura ambiente.
- Las tiras de pocillos no utilizados se deben guardar de inmediato en la bolsa desechable que contiene desecantes y almacenarse a 2-8°C.
- Para evitar la contaminación microbiana y/o química no regrese porciones de reactivos no usados en los viales originales.
- Para aumentar la precisión de los resultados de la prueba es necesario trabajar en duplicado: preparar dos pocillos para cada punto de la curva de calibración (C₀-C₄), dos para cada control, dos para cada muestra, uno para el blanco.

Reactivo	Calibrad.	Muestra/ Control	Blanco
Calibrador C ₀ -C ₄		25 µL	
Muestra diluida/ Control	25 µL		
Conjugado	100 µL	100 µL	
Incubar 1 hora a temperatura ambiente (22-28°C). Retirar la mezcla de reacción. Lave los pozos 3 veces con 0,3 mL de solución de lavado diluida. Nota importante: agite suavemente la placa durante 5 segundos en cada paso del lavado. Después del último lavado asegúrese haber eliminado completamente la solución de lavado de los pozos, invierta la placa y golpéela repetidas veces contra una servilleta de papel absorbente. Lavados automático: si está utilizando una lavadora automática, lavar los pocillos al menos 5 veces.			
Substrato	100 µL	100 µL	100 µL
Incubar 15 minutos a temperatura ambiente (22÷28°C), protegida de la luz.			
Solución de parada	100 µL	100 µL	100 µL
Agitar suavemente la placa. Leer la absorbancia (E) a 450 nm frente una segunda lectura de referencia a 620-630 nm o frente al blanco dentro de los 5 minutos.			

7. CONTROL DE CALIDAD

Cada laboratorio debe analizar las muestras a niveles de los rangos bajo, medio y alto de SHBG para supervisar el rendimiento del análisis. Estas muestras deben tratarse como desconocidas y los valores deben determinarse en cada ensayo realizado. Se deben mantener los gráficos de control de calidad para seguir el rendimiento de los reactivos suministrados. Se deben emplear métodos estadísticos adecuados para determinar las tendencias. El laboratorio debe establecer los límites de aceptabilidad del rendimiento del análisis. Entre otros parámetros que se deben controlar, se incluyen las intersecciones de 80, 50 y 20% de la curva de calibración para evaluar la reproducibilidad. Además, la capacidad de absorción máxima debe ser constante con la experiencia anterior. Una desviación significativa del rendimiento establecido puede indicar un cambio inadvertido en las condiciones experimentales o la degradación de los reactivos del kit. Se deben usar reactivos frescos para determinar la causa de las variaciones.

8. RESULTADOS

8.1. Absorbancia media

Calcular la absorbancia media (Em) de cada punto de la curva de calibración (C₀-C₄) y de cada muestra.

8.2. Curva de calibración

Trazar el gráfico de la absorbancia en función de las concentraciones de los Calibradores (C₀-C₄) dibujando la curva que se aproxime mejor al valor de los puntos de la curva de calibración (p. ej.: modelo spline cúbico, logístico de cuatro parámetros).

8.3. Cálculo de los resultados

Interpolar en el gráfico los valores de absorbancia relativos a cada muestra y leer la concentración correspondiente en nmol/l.

9. VALORES DE REFERENCIA

Cada laboratorio debe establecer su propio rango basándose en la población de los pacientes.

nmol/L	Hombres	Mujeres
N	102	44
Media	43	63
Rango absoluto	15 - 100	15 - 120

Es importante señalar que la determinación de un rango de valores esperados en un método dado para una población "normal" depende de muchos factores, tales como la especificidad y sensibilidad del método en uso, y la población en estudio. Por lo tanto, cada laboratorio debe considerar el intervalo especificado por el fabricante como una guía general y producir su propio rango de valores calculados en base al estadístico obtenido por el laboratorio, donde reside la población local.

10. PARÁMETROS CARACTERÍSTICOS

10.1 Especificidad

El anticuerpo reconoce específicamente la SHBG humana.

Las reacciones cruzadas se han calculado como relación peso/peso porcentual.

hSHBG (Scripps Laboratories N.º cat. S1724 Lote 545068)	100 %
hCBG (UCB, Bioproducts N.º cat. i097 Lote 002/1)	<0,2%
hTBG (Scripps Laboratories N.º cat. T0414 Lote 780095)	<0,04%

11. DISPOSICIONES PARA LA ELIMINACIÓN

Los reactivos deben eliminarse de acuerdo con las leyes locales.

BIBLIOGRAFÍA

- Petra PH. *The plasma sex steroid binding protein (SBP or SHBG). A critical review of recent developments on the structure, molecular biology and function.* J Steroid Biochem Mol Biol. 1991;40(4-6):735-53. Review.
- Selby C. *Sex hormone binding globulin: origin, function and clinical significance.* Ann Clin Biochem. 1990 Nov;27 (Pt 6):532-41. Review.
- Pugeat M, Crave JC, Tourniaire J, Forest MG. *Clinical utility of sex hormone-binding globulin measurement.* Horm Res. 1996;45(3-5):148-55. Review.

Ed. 01/2015

DCM087-4

DiaMetra S.r.l. Headquarter: Via Calabria 15,
20090 SEGRATE (MI) Italy

Tel. +39-02-2139184

Fax +39-02-2133354

Manufactory: Via Pozzuolo 14,
06038 SPELLO (PG) Italy

Tel. +39-0742-24851

Fax +39-0742-316197

E-mail: info@diametra.com

	DE ES FR GB IT PT	In vitro Diagnostikum Producto sanitario para diagnóstico In vitro Dispositif medical de diagnostic in vitro In vitro Diagnostic Medical Device Dispositivo medico-diagnostico in vitro Dispositivos medicos de diagnostico in vitro		DE ES FR GB IT PT	Hergestellt von Elaborado por Fabriqué par Manufacturer Produttore Produzido por
	DE ES FR GB IT PT	Achtung, Begleitdokumente Precaución, consulte los documentos adjuntos Attention, veuillez consulter les documents d'accompagnement Caution, consult accompanying documents Attenzione, consultare la documentazione allegata Atenção, consultar os documentos de acompanhamento	 yyyy-mm	DE ES FR GB IT PT	Herstellungs datum Fecha de fabricacion Date de fabrication Date of manufacture Data di produzione Data de produção
 yyyy-mm-dd	DE ES FR GB IT PT	Verwendbar bis Establa hasta (usar antes de último día del mes) Utiliser avant (dernier jour du mois indiqué) Use by (last day of the month) Utilizzare prima del (ultimo giorno del mese) Utilizar (antes ultimo dia do mês)		DE ES FR GB IT PT	Biogefährdung Riesco biológico Risque biologique Biological risk Rischio biologico Risco biológico
	DE ES FR GB IT PT	Gebrauchsanweisung beachten Consultar las instrucciones Consulter le mode d'emploi Consult instructions for use Consultare le istruzioni per l'uso Consultar instruções para uso	LOT	DE ES FR GB IT PT	Chargenbezeichnung Codigo de lote Numero de lot Batch code Codice del lotto Codigo do lote
 $\Sigma = xx$	DE ES FR GB IT PT	Ausreichend für "n" Tests Contenido suficiente para "n" tests Contenu suffisant pour "n" tests Contains sufficient for "n" tests Contenuto sufficiente per "n" saggi Contém o suficiente para "n" testes	CONT	DE ES FR GB IT PT	Inhalt Contenido del estuche Contenu du coffret Contents of kit Contenuto del kit Conteúdo do kit
 Max Min	DE ES FR GB IT PT	Temperaturbereich Límitación de temperatura Limites de température de conservation Temperature limitation Limiti di temperatura Temperaturas limites de conservação	REF	DE ES FR GB IT PT	Bestellnummer Número de catálogo Références du catalogue Catalogue number Numero di Catalogo Número do catálogo
	DE ES FR GB IT PT	Vor direkter Sonneneinstrahlung schützen Mantener alejado de la luz solar Tenir à l'écart de la lumière du soleil Keep away from sunlight Tenere lontano dalla luce solare Mantenha longe da luz solar			

SUGGERIMENTI PER LA RISOLUZIONE DEI PROBLEMI/TROUBLESHOOTING**ERRORE CAUSE POSSIBILI/ SUGGERIMENTI****Nessuna reazione colorimetrica del saggio**

- mancata dispensazione del coniugato
- contaminazione del coniugato e/o del Substrato
- errori nell'esecuzione del saggio (es. Dispensazione accidentale dei reagenti in sequenza errata o provenienti da flaconi sbagliati, etc.)

Reazione troppo blanda (OD troppo basse)

- coniugato non idoneo (es. non proveniente dal kit originale)
- tempo di incubazione troppo breve, temperatura di incubazione troppa bassa

Reazione troppo intensa (OD troppo alte)

- coniugato non idoneo (es. non proveniente dal kit originale)
- tempo di incubazione troppo lungo, temperatura di incubazione troppa alta
- qualità scadente dell'acqua usata per la soluzione di lavaggio (basso grado di deionizzazione,)
- lavaggi insufficienti (coniugato non completamente rimosso)

Valori inspiegabilmente fuori scala

- contaminazione di pipette, puntali o contenitori- lavaggi insufficienti (coniugato non completamente rimosso)

CV% intrasaggio elevato

- reagenti e/o strip non portate a temperatura ambiente prima dell'uso
- il lavatore per micropiastre non lava correttamente (suggerimento: pulire la testa del lavatore)

CV% intersaggio elevato

- condizioni di incubazione non costanti (tempo o temperatura)
- controlli e campioni non dispensati allo stesso tempo (con gli stessi intervalli) (controllare la sequenza di dispensazione)
- variabilità intrinseca degli operatori

ERROR POSSIBLE CAUSES / SUGGESTIONS**No colorimetric reaction**

- no conjugate pipetted reaction after addition
- contamination of conjugates and/or of substrate
- errors in performing the assay procedure (e.g. accidental pipetting of reagents in a wrong sequence or from the wrong vial, etc.)

Too low reaction (too low ODs)

- incorrect conjugate (e.g. not from original kit)
- incubation time too short, incubation temperature too low

Too high reaction (too high ODs)

- incorrect conjugate (e.g. not from original kit)
- incubation time too long, incubation temperature too high
- water quality for wash buffer insufficient (low grade of deionization)
- insufficient washing (conjugates not properly removed)

Unexplainable outliers

- contamination of pipettes, tips or containers
- insufficient washing (conjugates not properly removed) too high within-run
- reagents and/or strips not pre-warmed to CV% Room Temperature prior to use
- plate washer is not washing correctly (suggestion: clean washer head)
- too high between-run - incubation conditions not constant (time, CV % temperature)
- controls and samples not dispensed at the same time (with the same intervals) (check pipetting order)
- person-related variation

ERROR / POSIBLES CAUSAS / SUGERENCIAS**No se produce ninguna reacción colorimétrica del ensayo**

- no se ha dispensado el conjugado
- contaminación del conjugado y/o del sustrato
- errores en la ejecución del ensayo (p. ej., dispensación accidental de los reactivos en orden incorrecto o procedentes de frascos equivocados, etc.)

Reacción escasa (DO demasiado bajas)

- conjugado no idóneo (p. ej., no procedente del kit original)
- tiempo de incubación demasiado corto, temperatura de incubación demasiado baja

Reacción demasiado intensa (DO demasiado altas)

- conjugado no idóneo (p. ej., no procedente del kit original)
- tiempo de incubación demasiado largo, temperatura de incubación demasiado alta
- calidad escasa del agua usada para la solución de lavado (bajo grado de desionización)
- lavados insuficientes (el conjugado no se ha retirado completamente)

Valores inexplicablemente fuera de escala

- contaminación de pipetas, puntas o contenedores- lavados insuficientes (el conjugado no se ha retirado completamente)

CV% intraensayo elevado

- los reactivos y/o tiras no se encontraban a temperatura ambiente antes del uso
- el lavador de microplacas no funciona correctamente (sugerencia: limpiar el cabezal del lavador)

CV% interensayo elevado

- condiciones de incubación no constantes (tiempo o temperatura)
- controles y muestras no dispensados al mismo tiempo (con los mismos intervalos) (controlar la secuencia de dispensación)
- variación en función de los operadores

ERREUR CAUSES POSSIBLES / SUGGESTIONS**Aucune réaction colorimétrique de l'essai**

- non distribution du conjugué
- contamination du conjugué et/ou du substrat
- erreurs dans l'exécution du dosage (par ex., distribution accidentelle des réactifs dans le mauvais ordre ou en provenance des mauvais flacons, etc.)

Réaction trop faible (DO trop basse)

- conjugué non approprié (par ex., ne provenant pas du coffret original)
- temps d'incubation trop court, température d'incubation trop basse

Réaction trop intense (DO trop élevée)

- conjugué non approprié (par ex., ne provenant pas du coffret original)
- temps d'incubation trop long, température d'incubation trop élevée
- mauvaise qualité de l'eau utilisée pour la solution de lavage (bas degré de déionisation)
- lavages insuffisants (conjugué non entièrement éliminé)

Valeurs inexplicablement hors plage

- contamination des pipettes, embouts ou récipients - lavages insuffisants (conjugué non entièrement éliminé)

CV% intra-essai élevé

- les réactifs et/ou les bandes n'ont pas atteint la température ambiante avant usage
- le laveur de microplaques ne lave pas correctement (suggestion : nettoyer la tête du laveur)

CV% inter-essai élevé

- conditions d'incubation non constantes (temps ou température)
- contrôles et échantillons non distribués en même temps (avec les mêmes intervalles) (contrôler l'ordre de distribution)
- variabilité intrinsèque des opérateurs