

ZenTech







IRMAZENco SHBG


DEUTSCH	(de)
ENGLISH	(en)
ESPAÑOL	(es)
ΕΛΛΗΝΙΚΑ	(el)
FRANÇAIS	(fr)
NEDERLANDS	(nl)
POLSKI	(pl)
PORTUGES	(pt)

ZenTech s.a.

Liège Science Park,
Avenue du Pré-Ailly 10,
4031 ANGLEUR, Belgium
Tel. : + 32-(0)4-361.42.32
Fax : + 32-(0)4-367.00.63

info@zentech.be
www.zentech.be

ISO15223	SYMBOLS FÜR MEDIZINPRODUKTE	MEDICAL DEVICES SYMBOL	SÍMBOLOS PARA APARATOS DE USO EN MEDICINA	ΣΥΜΒΟΛΟ ΙΑΤΡΙΚΩΝ ΣΥΣΚΕΥΩΝ ΚΑΤΑ	SYMBOLS APPLIQUES AUX DISPOSITIFS MEDICAUX	SYMBOL CONFORM MEDISCHE HULPMIDDELEN	SYMBOL URZĄDZENIA MEDYCZNEGO	SÍMBOLOS DE DISPOSITIVO MÉDICO
	LIMITIERUNG DER LAGERTEMPERATUR	STORAGE TEMPERATURE LIMITATION	LIMITES DE TEMPERATURA DE ALMACENAMIENTO	ΠΕΡΙΟΡΙΣΜΟΣ ΘΕΡΜΟΚΡΑΣΙΑΣ ΦΥΛΑΞΗΣ	LIMITES DE TEMPERATURES	TEMPERATUURLIMIET	OGRANICZENIA TEMPERATURY PRZECHOWYWANIA	LIMITE DA TEMPERATURA DE ARMAZENAGEM
LOT	CHARGENCODE	BATCH CODE	CÓDIGO DE LOTE	ΚΩΔΙΚΟΣ ΠΑΡΤΙΔΑΣ	NUMERO DE LOT	LOT NUMMER	KOD SERII	LOTE
	VERWENDBAR BIS	USE BY	CONSUMIR ANTES DE	ΗΜΕΡΟΜ. ΛΗΞΗΣ	DATE D'EXPIRATION	HOUDBAAR TOT	ZUZYC PRZED	UTILIZADO POR
	DAS HANDBUCH ZU RATE ZIEHEN	CONSULT OPERATING INSTRUCTIONS	CONSULTAR LAS INSTRUCCIONES DE MANEJO O FUNCIONAMIENTO	ΑΝΑΤΡΕΞΕΤΕ ΣΤΙΣ ΟΔΗΓΙΕΣ ΛΕΙΤΟΥΡΓΙΑΣ	LIRE LES INSTRUCTIONS	RAADPLEEG DE GEBRUIKSAANWIJZING	ZAPOZNAC SIE Z INSTRUKCJA	CONSULTE O MANUAL DE OPERAÇÕES
IVD	FÜR IN-VITRO-DIAGNOSTISCHE ANWENDUNG	IN VITRO DIAGNOSTIC DEVICE	DISPOSITIVO DE DIAGNÓSTICO IN VITRO	ΔΙΑΓΝΩΣΤΙΚΗ ΣΥΣΚΕΥΗ IN VITRO	IN VITRO DIAGNOSTIC	IN VITRO DIAGNOSTISCH PRODUCT	URZĄDZENIE DO DIAGNOSTYKI IN VITRO	DISPOSITIVO DE DIAGNOSTICO IN VITRO
	HERGESTELLT VON	MANUFACTURED BY	FABRICADO POR	ΚΑΤΑΣΚΕΥΑΖΕΤΑΙ ΑΠΟ ΤΗΝ	FABRIQUE PAR	FABRIKANT	PRODUCENT	FABRICADO POR
REF	KATALOG NR.	CATALOGUE NUMBER	NÚMERO DE CATÁLOGO	ΑΡΙΘΜΟΣ ΚΑΤΑΛΟΓΟΥ	REFERENCE	CATALOGUS NUMMER	NUMER KATALOGOWY	NÚMERO DO CATALOGO

	SYMBOLS (EMPFOHLEN VON DER EDMA)	SYMBOLS (EDMA RECOMMENDATIONS)	SÍMBOLOS (RECOMENDACIONES DE LA EDMA)	ΣΥΜΒΟΛΑ (Συστάσεις EDMA)	SYMBOLS (recommandations EDMA)	SYMBOLS (EDMA-AANBEVELINGEN)	SYMBOLS (ZALECANE PRZEZ EDMA)	SÍMBOLOS (RECOMENDAÇÕES EDMA)
	Anzahl der Bestimmungen	Number of determinations	Número de determinaciones	Αριθμός προσδιορισμών	Nombre de déterminations (Σ)	Inhoud voldoende voor "n" tests	Liczba oznaczeń	Número de determinações
CAL	Kalibratoren	Calibrators	Calibradores	Βαθμονομητές	Calibrateurs	Kalibratoren	Kalibrator	Calibrador
CONTROL	Kontrolle	Control	Control	Όρος ελέγχου	Contrôle	Controle	Kontrola	Controle
SORB CT	Beschichtete Röhrchen	Coated tubes	Tubos recubiertos	Επιστρωμένα σωληνάκια	Tubes coatés	Gecoate buisjes	Probówki z warstwą przeciwciat	Tubos adsorvidos
Anti-SHBG^{125I}	Radioaktiver Tracer	Radioactive tracer	Trazador radiactivo	Ραδιενεργός ιχνηθέτης	Traceur radioactif	Radioactieve tracer	znacznik radioaktywny	Marcador radioativo
DIL	Verdünnungspuffer	Diluent	Diluyente	Αραιωτικό	DILUANT	Verduunningsvloeistof	Rozcieńczalnik	Diluyente
BUF WASH n X	Waschlösung zum x-maligen Verdünnen	Washing solution to be diluted n-fold	Solución de lavado que debe diluirse n veces	Διάλυμα πλύσης που πρέπει να αραιωθεί n φορές	Solution de lavage à diluer n fois	In n-voud te verdunnen wasoplossing	Roztwór odmywający do n-krotnego rozcieńczenia	Solução de lavagem a ser diluída n X

DEUTSCH

IMMUNORADIOMETRISCHER TEST ZUR QUANTITATIVEN BESTIMMUNG DES HUMANEN SEXUAL-HORMON BINDENDEN GLOBULINS IN HUMANEM SERUM

R-CC-100 - 100 Bestimmungen

DIESER KIT IST NUR FÜR DIE IN - VITRO – DIAGNOSTIK BESTIMMT

1. KLINISCHE ANWENDUNGEN

Humanes Sexual-Hormon bindendes Globulin (**hSHBG**) ist ein zirkulierendes Glykoprotein mit einem Molekulargewicht von 90000 (die wichtigste Rolle des SHBG ist die des Transportproteins für Östrogene und Androgene im peripheren Kreislauf).

Der Level des Sexual-Hormon bindenden Globulins wird durch Östrogene während der Schwangerschaft oder durch Schilddrüsenhormone gesteigert. Der Level des SHBG wird durch Androgene (externer oder interner Produktion) und durch einige Drogen gesenkt.

SHBG Messungen im Serum sind daher ein sehr wichtiger Verlaufsprozess- Index für Krankheiten, die nicht direkt mit Steroiden in Zusammenhang gebracht werden können.

Der Level des SHBG Werte korreliert gut mit der Funktion der Schilddrüse und hohen Werten wie Sie in Fällen von eingeschränkter Leberfunktion (Zirrhose) auftreten.

2. TESTPRINZIP

Dieser Test Kit ist ein immunoradiometrischer Test (IRMA). Er basiert auf mit monoklonalen Antikörpern beschichteten Röhren, die gezielt gegen die eindeutigen Epitope der SHBG- Moleküle gerichtet sind. Zwei Fang-Antikörper sind an der Innenseite des Röhrens gebunden. Das SHBG des Kalibrators oder das der Proben werden an diese Antikörper gebunden.

Die Addition des dritten Antikörpers, der mit ¹²⁵I markiert ist, komplettiert das System. Es ermöglicht die Herstellung einer Verbindung zwischen den beschichteten und den markierten Antikörpern.

Nach dem Waschen steht die verbleibende, an den Röhren gebundene Radioaktivität, in direktem Bezug zur Konzentration des SHBG in den Kalibratoren oder der Proben.

Die sorgfältige Auswahl der drei monoklonalen Antikörper erlaubt eine hohe Spezifität und vermeidet ein Übermaß an Spezifität, was manchmal den immunometrischen Versuchen mit nur zwei monoklonalen Antikörpern angelastet wird.

3. MITGELIEFERTES MATERIAL

- Die Reagenzien sind für 100 Bestimmungen ausreichend.
- Lagern Sie den Kit und die Reagenzien bei 2 – 8° C.
- Das Verfallsdatum jedes Reagenz ist auf dem Etikett angegeben.

1. **Radioaktiver Tracer:** 1 Fläschchen mit 22 ml anti – hSHBG markiert mit ¹²⁵I im Phosphatpuffer, der BSA enthält. Radioaktivität: ± 275 kBq. Konservierungsmittel: NaN₃ < 0,1%.
2. **Kalibratoren:** 7 Fläschchen mit 0,7 ml hSHBG in verdünntem Pferdeserum. Gebrauchsfertig. Konzentrationen: 0 10 25 40 75 125 250 nmol/l. Konservierungsmittel: NaN₃ < 0,1%.
3. **Kontrolle:** Ein Fläschchen mit 0,7 ml humanen, vorverdünntem Serum. Gebrauchsfertig. **Die Sollwerte entnehmen Sie bitte dem Qualitätskontroll-Datenblatt.** Konservierungsmittel: NaN₃ < 0,1%.

4. **Beschichtete Röhren:** 100 Röhren beschichtet mit zwei mononuklearen Antikörpern von Mäusen, die gegen hSHBG gerichtet sind. Unbenutzte Röhren müssen bei 2–8° C, geschützt vor Feuchtigkeit, gelagert werden.
5. **Waschlösung (50 x konzentriert):** 1 Fläschchen mit 20 ml TRIS HCl Puffer mit Detergenten. Konservierungsmittel: NaN₃ < 0,1 % . Füllen Sie mit destilliertem Wasser auf 1000 ml auf. Die verdünnte Lösung ist bei 2 – 8° C zwei Monate lang stabil.
6. **Verdünnungspuffer:** 1 Fläschchen mit 100 ml Phosphatpufferlösung mit BSA. Konservierungsmittel: NaN₃ < 0,1%. Gebrauchsfertig.

4. ERFORDERLICHES, JEDOCH NICHT MITGELIEFERTES, MATERIAL

- Teströhren aus Plastik
- Racks für die Teströhren
- einstellbare, automatische Mikropipetten mit Einmalspitzen
- Vortexmischer
- Graduierter Zylinder
- Absaugpumpe oder automatische Waschanlage
- Szintillations-Gamma-Counter
- destilliertes Wasser
- Orbitalschüttler, einstellbar auf 150 rpm

5. WARNHINWEISE UND VORSICHTS-MAßNAHMEN

Um reproduzierbare Ergebnisse zu erhalten, müssen folgende Regeln eingehalten werden:

- Verwenden oder mischen Sie keine Testkomponenten unterschiedlicher Chargen.
- Verwenden Sie keine Reagenzien nach Ablauf des Verfallsdatums.
- Verwenden Sie nur völlig saubere Glasutensilien.
- Benutzen Sie destilliertes Wasser, dass in geeigneten, sauberen Behältern aufbewahrt werden muss.
- Vermeiden Sie jede Kontamination der einzelnen Reagenzien; so müssen für jede Probe und jedes Reagenz Einmalpipettenspitzen verwendet werden.

Um die Kontamination von Personen und Umgebung zu vermeiden, müssen die folgenden Vorsichtsmaßnahmen beachtet werden.

- Tragen Sie während der Durchführung des Assays sowie beim Umgang mit potentiell infektiösem Material Einweghandschuhe.
- Nicht mit dem Mund pipettieren.
- Rauchen, Essen und Trinken Sie nicht bei der Durchführung des Assays; benutzen Sie währenddessen keine Kosmetika.
- Alle Materialien humaner Herkunft zur Herstellung dieses Kits sind negativ auf HBs-Ag, Anti-HIV und Anti-HCV getestet. Da jedoch keine der zur Zeit verfügbaren Testmethoden absolute Gewähr für das Fehlen dieser Viren garantieren kann, müssen alle Proben und Reagenzien als potentiell infektiös betrachtet werden ; deshalb muss der Assayabfall dekontaminiert und beseitigt werden in Übereinstimmung mit den etablierten Sicherheitsstandards.
- Vorhandene entzündbare Materialien müssen verbrannt werden; nicht entzündbare Materialien müssen im Autoklaven mindestens 1 Stunde bei 121 °C sterilisiert werden.

- Flüssigem Abfall muss Natriumhypochlorit zugefügt werden, um eine Endkonzentration von 3% zu erhalten. Diese muss mindestens 30 Min. einwirken. Flüssiger säurehaltiger Abfall muss zunächst mit einer geeigneten Menge an Base neutralisiert werden, bevor er mit Natriumhypochlorit versetzt werden kann.
- Vermeiden Sie Spritzen und Aerosolbildung. Für den Fall einer Kontamination durch Spritzer reinigen Sie sorgfältig mit 3% iger Natriumhypochloritlösung und entsorgen diese Reinigungsflüssigkeit als potentiell infektiösen Abfall.
- Einige Reagenzien enthalten Natriumazid als Konservierungsmittel; um den Aufbau von explosiven Metallaziden in Rohr- und Kupferleitungen zu verhindern, müssen die Reagenzien unter großen Mengen fließenden Wassers entsorgt werden.
- Beschaffung, Lagerung, Nutzung und Beseitigung radioaktiver Materialien (flüssig und fest) sind Gegenstand von Gesetzen und Vorschriften der zuständigen, lokalen Behörden.

6. SAMMLUNG VON EINZELPROBEN

Verwenden Sie nur Serumproben. Hoch lipämische oder hämolytische Proben müssen verworfen werden. Die Proben können bei 2– 8°C 7 Tage aufbewahrt werden; bei längeren Zeiträumen ist es empfehlenswert, die Proben aliquotiert bei – 20°C einzufrieren. Ein wiederholtes Einfrieren oder Auftauen sollte vermieden werden.

Vor der Analyse müssen die Proben 1/51 im SHBG Verdünnungspuffer verdünnt werden und zwar wie folgt:

Probe **20µl** + SHBG Verdünnungspuffer **1 ml**

Verdünnen Sie weder die Kalibratoren, noch das Kontrollserum. Beide sind schon vorverdünnt und gebrauchsfertig.

7. TESTVERLAUF

- Vor Gebrauch müssen alle Reagenzien und Proben auf Raumtemperatur gebracht werden.
 - Vor Gebrauch müssen die Proben durch Schwenken gemischt werden.
 - Für alle Kalibratoren wird eine doppelte Messung empfohlen.
1. Bereiten Sie die leeren Röhrchen für die Total Counts und die beschichteten Röhrchen für Kalibratoren, Proben und Kontrolle vor.
 2. Pipettieren Sie **50µl** der Kalibratoren, des Kontrollserums und der vorverdünnten Proben in die zugehörigen beschichteten Röhrchen. Pipettieren Sie direkt auf den Boden der Röhrchen.
 3. Geben Sie **200µl** des radioaktiven Tracers (¹²⁵I markiertes anti-hSHGB) in jedes Röhrchen. Mischen Sie die Röhrchen vorsichtig mit dem Vortexmischer und inkubieren Sie Sie 90 Minuten auf einem Orbitalschüttler bei 150 rpm.
 4. Saugen Sie den Inhalt jedes Röhrchens ab, außer den Röhrchen für die Total Counts.
 5. Geben Sie **2 ml** verdünnter Waschlösung in jedes Röhrchen, außer in denen für die Total Counts, und saugen Sie gründlich ab oder gießen Sie die Inhalte aller Röhrchen auf absorbierendes Papier.
 6. Zählen Sie die an die Röhrchen gebundene Radioaktivität 1 Minute lang in einem Gamma-Counter. Wir schlagen vor, den Hintergrund des Instruments vor dem Zählen zu messen. Um Abweichungen in der Sensitivität des Systems zu vermeiden, muß der Hintergrund auf ein Minimum reduziert oder angepasst werden.

VERSUCHSSCHEMA

Röhrchen Reagenzien	Totalaktivität	Kalibratoren	Kontrolle	Proben
Kalibratoren	----	50 µl	----	----
Kontrolle	----	----	50 µl	----
Proben	----	----	----	50 µl
Tracer	200 µl	200 µl	200 µl	200 µl

- Inkubieren: 90 min R.T., Schütteln (150 rpm)
 - Absaugen und Waschen: 1x 2ml
 - Zählen

8. KALKULATION DER RESULTATE

Ermitteln Sie die Eichkurve durch logarithmische Auftragung (log/lin) von B/T (%) von jedem Kalibrator (y-Achse), gegen die relative Konzentration (x-Achse). Kalkulieren Sie den B/T (%) von jeder Probe und ermitteln Sie die Konzentration durch Interpolation auf der Eichkurve

KALKULATIONSBEISPIEL

Die unten aufgeführten Werte müssen als Beispiel gesehen werden und sollten nicht an Stelle experimentell gewonnener Daten verwendet werden.

Beschreibung	Durchschnittlicher cpm	B/T (%)	SHBG (nmol/l)
Totalaktivität (T)	109800	-	-
CAL 0	140	0,1	0
CAL 1	3572	3,3	10
CAL 2	10255	9,3	25
CAL 3	15037	13,7	40
CAL 4	28925	26,3	75
CAL 5	44924	40,9	125
CAL 6	64577	58,8	250
Control	28855	26,3	74,8
P1	22839	20,8	59,2
P2	45754	41,7	133,0

9. REFERENZWERTE

Es wird empfohlen, dass jedes Labor seine eigenen Referenzintervalle bestimmt. Die unten aufgeführten Werte sind lediglich indikativ.

	SHBG (nmol/l) Bereich	N
Frauen	20 - 85	49
Männer	9 – 55	50

Kinder: Eine hohe Konzentration des SHBG kann während der Vorpubertät, der Pubertät und der Wachstumsphasen bis zum Erwachsenen-Level fallen.

Ältere Erwachsene: Es wird beschrieben, dass der SHBG Level mit zunehmendem Alter bei Erwachsenen ansteigt.

Schwangerschaft: Während der Schwangerschaft steigt der SHBG Level beträchtlich bis zu 200 – 400 nmol/l während des letzten Schwangerschaftsdrittels.

Leberzirrhose: ansteigend

Der SHBG Level variiert bei verschiedenen krankheitsbedingten Zuständen

- Das SHBG wird durch synthetische Östrogene, abhängig von Dosis und Art des Östrogens, erhöht.³
- SHBG wird als erniedrigt beschrieben durch Levernorgestrel⁶.

Die Konzentration des SHBG kann benutzt werden zum Errechnen des „ Free Androgen Index „ (FAI):

$$FAI = \frac{\text{Total Testosteron (nmol/l)}}{\text{SHBG (nmol/l)}} \times 100$$

Der „ Free Androgen Index „ ist ein sehr nützlicher Parameter um Hyperandrogenismus bei Frauen zu beurteilen^{5,11}.

SHBG kann ebenso genutzt werden, um Freie Testosteron- und Freie Estradiol – Konzentrationen in Zusammenhang mit dem Massenwirkungsgesetz zu bestimmen.

10. VERSUCHSDURCHFÜHRUNG

SENSITIVITÄT

Analytische Sensitivität

Die Sensitivität war basierend auf der Eichkurve kalkuliert definiert als die kleinste Konzentration, die einen signifikanten Unterschied zum Nullkalibrator ergibt (Mittelwert + 2fache Standardabweichung).

Diese Konzentration ist 0,26 nmol/l.

Funktionale Sensivität

Die funktionale Testsensivität ist der niedrigste Wert, der mit einer Präzision von maximal 20% Inter-Assay Varianz gemessen wird. Bei SHBG ist dieser Wert kleiner als 0,3 nmol/l.

PRÄZISION

Die Präzision wurde evaluiert nach Intra-Assay und Inter-Assay Variabilität, bei verschiedenen Konzentrationen der Analyten.

Intra-assay

Serum	durchschnittliche (nmol/l)	±	S.D.	V.K. (%)	N
1	15,1	±	0,5	3,3	20
2	44,7	±	1,3	2,9	20
3	151,5	±	7,9	5,2	20

Inter-assay

Serum	durchschnittliche (nmol/l)	±	S.D.	V.K. (%)	N
1	15,5	±	0,5	2,9	9
2	45,1	±	2,1	4,6	9
3	163,3	±	9,4	5,8	9

GENAUIGKEIT

Die Genauigkeit der Methode wurde durch Wiederfindungs- und Paralleltests evaluiert.

Wiederfindungs - Test

Proben, vermischt mit den gleichen Volumina jedes Kalibrators, werden getestet.

	erwartete Werte (nmol/l)	gemessene Werte (nmol/l)	Wiederfindung (%)
S1	-	29,1	-
S1 + CAL 1	19,5	16,9	86,3
S1 + CAL 2	27,0	25,4	93,8
S1 + CAL 3	34,5	32,6	94,3
S1 + CAL 4	52,0	50,4	96,9
S1 + CAL 5	77,0	75,7	98,2
S1 + CAL 6	139,5	126,4	90,6
S2	-	43,7	-
S2 + CAL 1	26,9	23,8	88,6
S2 + CAL 2	34,4	32,4	94,3
S2 + CAL 3	41,9	39,8	95,0
S2 + CAL 4	59,4	55,7	93,9
S2 + CAL 5	84,4	80,2	95,1
S2 + CAL 6	146,9	131,7	89,7

Parallel - Test

Seren mit hohen, analytischen Konzentrationen werden mit unterschiedlichen Verdünnungen mit dem Nullkalibrator getestet.

Verdünnung	erwartete Werte nmol/l	gemessene Werte nmol/l	Wiederfindung
S1 unverdünnt	-	58,1	-
1/1.5	38,7	38,6	99,7
1/2	29,0	26,2	90,2
1/4	15,5	12,3	85,0
1/8	7,3	6,9	94,6
S2 unverdünnt	-	88,0	-
1/1.5	58,7	54,4	92,7
1/2	44,0	43,8	99,6
1/4	22,0	17,7	80,5
1/8	11,0	9,2	83,6

HOOK-EFFEKT

Gespikete Proben mit gereinigtem SHBG bis zu 1000 nmol/l ergeben höhere Werte als der letzte Kalibrator.

Diese Produktinformation ist unter www.zentech.be verfügbar.

ENGLISH

IMMUNORADIOMETRIC ASSAY FOR THE QUANTITATIVE DETERMINATION OF HUMAN SEX HORMONE BINDING GLOBULIN IN HUMAN SERUM

R-CC-100 - 100 Determinations

FOR IN VITRO DIAGNOSTIC USE ONLY

1. CLINICAL APPLICATIONS

Human Sex Hormone-Binding Globulin (hSHBG) is a circulating glycoprotein with a molecular weight of about 90000 (the most important role of SHBG is as a transport protein for estrogens and androgens in the peripheral circulation).

Level of Sex Hormone Binding Globulin is increased by estrogens, during pregnancy and by thyroid hormones. Level of SHBG is decreased by androgens (external or internal production) and some drugs.

SHBG measurement in serum is also a very important evolutivity index for non strictly steroid related diseases. SHBG levels correlate well with thyroid function and high values are found in cases of reduced liver function as in cirrhosis.

2. PRINCIPLE OF THE ASSAY

This test kit is an immunoradiometric assay (IRMA) based on coated-tubes with monoclonal antibodies directed against distinct epitopes of the molecule of SHBG.

Two capture antibodies are coated on the inner wall of tubes. SHBG of the calibrators or of the samples is captured by these antibodies. Addition of the third antibody labeled with ¹²⁵Iodine completes the system, allowing the formation of a bridge between the coated antibodies and the labeled antibody.

After washing, the remaining radioactivity bound to the tubes is directly related to the concentration of SHBG in the calibrators or samples.

The careful choice of the three monoclonal antibodies allows high specificity and high sensitivity and avoids excess of specificity which is sometimes reproached to immunometric assays with only two monoclonals.

3. MATERIAL PROVIDED

-The reagents are sufficient for 100 determinations.

- Store the kit and reagents at 2-8°C.

- The expiration date of each reagent is shown on the label.

- Radioactive Tracer:** 1 vial of 22 ml anti-hSHBG labeled with ¹²⁵I, in phosphate buffer containing BSA. Radioactivity : ± 275 kBq. Preservatives : NaN₃ < 0.1%.
- Calibrators:** 7 vials containing 0.7 ml of hSHBG in horse serum, pre-diluted. Ready for use. Concentrations : 0 - 10 - 25 - 40 - 75 - 125 - 250 nmol/l. Preservative : NaN₃ < 0.1%.
- Control:** 1 vial containing 0.7 ml human serum prediluted. Ready for use. **For the exact values, refer to the values indicated on the quality control data sheet.** Preservative : NaN₃ < 0.1%.
- Coated Tubes:** 100 tubes coated with two mouse monoclonal antibodies directed against hSHBG. Unused tubes must be stored at 2-8°C, protected from moist ure.
- Washing Solution (50 x concentrated):** 1 vial of 20 ml TRIS-HCl buffer with detergent Preservative : NaN₃ < 0.1%. Bring to 1000 ml with distilled water. The diluted washing solution is stable for 2 months at 2-8°C.
- Diluent:** 1 vial containing 100 ml phosphate buffer solution with BSA Preservative : NaN₃ < 0.1%. Ready for use.

4. MATERIAL REQUIRED BUT NOT SUPPLIED

- Plastic test tubes
- Test tube racks.
- Adjustable, automatic micropipettes with disposable tips.
- Vortex mixer.
- Graduated cylinder.
- Aspiration pump or automated washing device.
- Scintillation gamma counter.
- Distilled water.
- Orbital shaker adjustable at 150 rpm.

5. WARNINGS AND PRECAUTIONS

In order to obtain reproducible results, the following rules must be observed :

- Do not mix reagents of different lots.
- Do not use reagents beyond their expiry date.
- Use thoroughly clean glassware.
- Use distilled water, stored in clean containers.
- Avoid any contamination among samples; to this purpose disposable tips should be used for each sample and reagent.

In order to avoid personal and environmental contamination, the following precautions must be observed :

- Use disposable gloves while handling potentially infectious material and performing the assay.
- Do not pipette reagents by mouth.
- Do not smoke, eat, drink or apply cosmetics during the assay.
- All material of human origin used for the preparation of this kit has been tested and found negative for HBsAg, anti-HIV and anti-HCV. Since no test at present can guarantee complete absence of these viruses, all samples and reagents used for the assay must be considered potentially infectious; therefore, the assay waste must be decontaminated and disposed of, in accordance with established safety procedures. Disposable ignitable material must be incinerated; disposable non-ignitable material must be sterilized in autoclave for at least 1 hour at 121°C. Liquid wastes must be added with sodium hypochlorite at a final concentration of 3%. Let the hypochlorite act for at least 30 minutes. Liquid wastes containing acid must be neutralized with appropriate amounts of base, before treating with sodium hypochlorite.
- Avoid splashing and aerosol formation; in case of spilling, wash carefully with a 3% sodium hypochlorite solution and dispose of this cleaning liquid as potentially infectious waste.
- Some reagents contain sodium azide as preservative; to prevent build-up of explosive metal azides in lead and copper plumbing, reagents should be discarded by flushing the drain with large amounts of water.
- Acquisition, storage, use and disposal of radioactive material (liquid and solid) are subject to regulation and ordination of local authorities.

6. SPECIMEN COLLECTION

Only serum sample may be used. Highly lipemic or hemolyzed samples must be discarded. Keep samples at 2-8°C for 7 days; for longer periods it is advisable to freeze samples in aliquots at -20°C. Repeated freezing and thawing of samples should be avoided. Before analysis, samples must be diluted 1/51 in the SHBG diluent as follow :

Sample **20 µl** + SHBG Diluent **1 ml**

Do not attempt to dilute the calibrators and control serum. They are already pre-diluted and ready for use.

7. ASSAY PROCEDURE

- Bring all reagents and samples to room temperature prior to use.
- Before use, mix the samples by inversion.
- For all calibrators, a duplicated measure is recommended.

1. Prepare plain tubes for Total Counts, and coated tubes for Calibrators, Samples and Control.
2. Pipette **50 µl** of Calibrators, Control Serum and pre-diluted Samples into the appropriate coated tubes. Pipette directly to the bottom of the tubes.
3. Add **200 µl** radioactive tracer (¹²⁵I labeled anti-hSHBG) to all tubes. Mix gently the tubes on vortex and incubate for 90 minutes on an orbital shaker set at 150 rpm.
4. Aspirate the contents of each tube, except the tubes for Total Counts.
5. Add **2 ml** of diluted washing solution to every tube, except tubes for Total Counts and aspirate thoroughly or decant the contents of all tubes on absorbent paper.
6. Count the radioactivity bound to the tubes for 1 minute in a gamma counter. We suggest to control the background of the instrument before counting the assay. In order to avoid variations in the sensitivity of the system, the background must be reduced to a minimum or adjusted properly.

SCHEME OF THE ASSAY

Tubes	Total Activity	Calibrators	Control	Samples
Reagent				
Calibrators	----	50 µl	----	----
Control	----	----	50 µl	----
Samples	----	----	----	50 µl
Tracer	200 µl	200 µl	200 µl	200 µl

- Incubate: 90 min R.T. shaking (150 rpm)
 - Aspirate and wash: 1 x 2 ml
 - Count

8. CALCULATION OF THE RESULTS

Draw the calibration curve on log/lin graph by plotting the B/T (%) obtained for each calibrator (y-axis) against the relative concentration (x-axis). Calculate the B/T (%) of each sample and read the concentration by interpolating on the calibration curve.

EXAMPLE OF CALCULATION

The values reported below must be considered as an example and may not be used in place of experimental data

Description	Average cpm.	B/T (%)	SHBG (nmol/l)
Total Activity (T)	109800	-	-
CAL 0	140	0.1	0
CAL 1	3572	3.3	10
CAL 2	10255	9.3	25
CAL 3	15037	13.7	40
CAL 4	28925	26.3	75
CAL 5	44924	40.9	125
CAL 6	64577	58.8	250
CONTROL	28855	26.3	74.8
P1	22839	20.8	59.2
P2	45754	41.7	133.0

9. REFERENCE VALUES

It is recommended that each laboratory determines its own reference interval. Values reported below are only indicative.

	SHBG (nmol/l) range	N
Women	20 - 85	49
Men	9 - 55	50

Children : high concentration of SHBG dropping over the pre-pubertal, pubertal and adolescent periods to adult levels.

Aging adults : the SHBG level has been reported to increase with age in adults.

Pregnancy : during pregnancy, SHBG level increases considerably, up to 200 – 400 nmol/l during the 3rd trimester⁴.

Cirrhosis of the liver : increased

SHBG level varies in various physiopathological states :

- SHBG is increased by synthetic estrogens depending on the dose and type of estrogen³.
- SHBG has been reported to be lowered by levenorgestrel⁶.

The concentration of SHBG can be used to calculate the "Free Androgen Index" (FAI) :

$$FAI = \frac{\text{Total Testosterone (nmol/l)}}{\text{SHBG (nmol/l)}} \times 100$$

The "Free Androgen Index" is a very useful parameter to evaluate hyperandrogenism in women^{5,11}.

SHBG can also be used to calculate Free Testosterone and Free Estradiol concentrations according to the low of mass action¹².

10. PERFORMANCE OF THE ASSAY

SENSITIVITY

Analytical sensitivity

The sensitivity was calculated based upon the calibration curve and expressed as the minimal dose showing a significant difference from the Zero Calibrator (mean value + 2 S.D.). This dose is 0.26 nmol/l.

Functional sensitivity

The functional assay sensitivity is the lowest value which is measured with a precision of maximum 20% inter-assay variance. For the SHBG, this value is lower than 0.3 nmol/l.

PRECISION

Precision was evaluated upon intra- and inter-assay variability, at different analyte concentrations.

Intra-assay

Serum	Mean	±	S.D.	C.V. (%)	N
1	15.1	±	0.5	3.3	20
2	44.7	±	1.3	2.9	20
3	151.5	±	7.9	5.2	20

Inter-assay

Serum	Mean	±	S.D.	C.V. (%)	N
1	15.5	±	0.5	2.9	9
2	45.1	±	2.1	4.6	9
3	163.3	±	9.4	5.8	9

ACCURACY

The accuracy of the method has been evaluated by recovery and parallelism tests.

Recovery Test

Samples, mixed with equal volumes of each calibrator, were tested.

	Expected (nmol/l)	Measured (nmol/l)	Recovery (%)
S1	-	29.1	-
S1 + CAL 1	19.5	16.9	86.3
S1 + CAL 2	27.0	25.4	93.8
S1 + CAL 3	34.5	32.6	94.3
S1 + CAL 4	52.0	50.4	96.9
S1 + CAL 5	77.0	75.7	98.2
S1 + CAL 6	139.5	126.4	90.6
S2	-	43.7	-
S2 + CAL 1	26.9	23.8	88.6
S2 + CAL 2	34.4	32.4	94.3
S2 + CAL 3	41.9	39.8	95.0
S2 + CAL 4	59.4	55.7	93.9
S2 + CAL 5	84.4	80.2	95.1
S2 + CAL 6	146.9	131.7	89.7

Parallelism Test

Serums with high analyte concentration were tested at different dilutions with the Zero Calibrator.

Dilution	Expected (nmol/l)	Measured (nmol/l)	Recovery (%)
S1 undiluted	-	58.1	-
1/1.5	38.7	38.6	99.7
1/2	29.0	26.2	90.2
1/4	15.5	12.3	85.0
1/8	7.3	6.9	94.6
S2 undiluted	-	88.0	-
1/1.5	58.7	54.4	92.7
1/2	44.0	43.8	99.6
1/4	22.0	17.7	80.5
1/8	11.0	9.2	83.6

HOOK-EFFECT

Samples spiked with purified hSHBG up to 1,000 nmol/l gave values higher than the last calibrator.

This package insert is downloadable at www.zentech.be

ESPAÑOL

RADIONMUNOANÁLISIS PARA LA DETERMINACIÓN CUANTITATIVA DE GLOBULINA FIJADORA DE HORMONAS SEXUALES EN SUERO HUMANO

R-CC-100 - 100 determinaciones

SÓLO PARA USO EN DIAGNÓSTICOS IN VITRO

1. APLICACIONES CLÍNICAS

La globulina fijadora de las hormonas sexuales humanas (**hSHBG**) es una glucoproteína circulante con un peso molecular en torno a 90 kda (la función más importante de la SHBG es actuar como proteína de transporte de estrógenos y andrógenos en la circulación periférica).

El nivel de globulina fijadora de las hormonas sexuales se ve incrementado por los estrógenos, durante el embarazo y por las hormonas tiroideas. El nivel de SHBG se ve reducido por los andrógenos (producción externa o interna) y por algunos fármacos. La medición de SHBG en suero constituye también un índice de evolución importante para enfermedades no estrictamente relacionadas con esteroides. Los niveles de SHBG presentan una buena correlación con la función tiroidea y en casos en los que la función hepática está disminuida (como en la cirrosis) se detectan valores elevados.

2. PRINCIPIO DEL ANÁLISIS

Este kit de análisis es un ensayo inmunoradiométrico (IRMA) basado en tubos recubiertos con anticuerpos monoclonales dirigidos contra distintos epítopes de la molécula de SHBG.

La pared interna de los tubos está recubierta con dos anticuerpos de captura. Estos anticuerpos capturan la SHBG de los calibradores o de las muestras. La adición del tercer anticuerpo, marcado con yodo¹²⁵ completa el sistema, lo que permite la formación de un puente entre los anticuerpos de recubrimiento y el anticuerpo marcado.

Después del lavado, la radiactividad remanente de los tubos está directamente relacionada con la concentración de SHBG en los calibradores o en las muestras.

La cuidadosa selección de los tres anticuerpos monoclonales permite una gran sensibilidad y especificidad, evitando que ésta sea excesiva, como sucede a menudo en los análisis inmunométricos con sólo dos monoclonales.

3. MATERIAL SUMINISTRADO

- Reactivos suficientes para 100 determinaciones.
- Almacene el kit y los reactivos a 2-8°C.
- La fecha de caducidad de cada reactivo se muestra en la etiqueta.

1. **Trazador radiactivo:** 1 vial de 22 ml anti-hSHBG marcado con ¹²⁵I, en tampón fosfato con BSA. Radiactividad: ± 275 kBq. Conservantes: NaN₃ < 0,1%.
2. **Calibradores:** 7 viales con 0,7 ml de hSHBG en suero de caballo prediluido. Listo para el uso Concentraciones: 0 - 10 - 25 - 40 - 75 - 125 - 250 nmol/l. Conservante: NaN₃ < 0,1%.
3. **Control:** 1 vial con 0,7 ml de suero humano prediluido. Listo para el uso **Para conocer los valores exactos, consulte la hoja de datos de control de calidad.** Conservante: NaN₃ < 0,1%.
4. **Tubos recubiertos:** 100 tubos recubiertos con dos anticuerpos monoclonales de ratones dirigidos contra la hSHBG. Los tubos que no se usen deberán almacenarse a 2-8°C y protegidos de la humedad.

5. **Solución de lavado (concentración x 50):** 1 vial de 20 ml de tampón TRIS-HCl con detergente Conservante: NaN₃ < 0,1%. Disolver en agua destilada hasta obtener un volumen de 1000 ml. La solución de lavado diluida se mantiene estable durante 2 meses a 2-8°C.
6. **Diluyente:** 1 vial con 100 ml de solución de tampón fosfato con BSA Conservante: NaN₃ < 0,1%. Listo para el uso

4. MATERIAL NECESARIO NO SUMINISTRADO

- Tubos de ensayo de plástico
- Gradillas de tubos de ensayo.
- Micropipetas automáticas ajustables con puntas desechables.
- Mezclador vórtex.
- Cilindro graduado.
- Bomba de aspiración o aparato de lavado automático.
- Contador de centelleo gamma.
- Agua destilada.
- Agitador orbital ajustable a 150 rpm.

5. ADVERTENCIAS Y PRECAUCIONES

Para conseguir resultados reproducibles, deberán observarse las siguientes normas:

- No mezcle reactivos de lotes distintos.
- No utilice reactivos después de que se haya cumplido su fecha de caducidad.
- Utilice material de vidrio totalmente limpio.
- Utilice agua destilada, almacenada en recipientes limpios.
- Evite que se produzca cualquier contaminación entre muestras; para ello, deberán utilizarse puntas desechables para cada muestra y reactivo.

Para evitar contaminación personal y ambiental, deberán observarse las siguientes precauciones:

- Utilice guantes desechables para manipular material potencialmente infeccioso y realizar el análisis.
- No pipetee los reactivos con la boca.
- Durante el análisis no fume, coma, ni beba. Tampoco debe aplicarse ningún cosmético.
- Todos los materiales de origen humano utilizados para la preparación de este kit deben haber sido sometidos a análisis de HBsAg, anti-VIH y anti-HCV, con resultados negativos. Dado que actualmente ninguna prueba puede garantizar la total ausencia de estos virus, todos los reactivos y las muestras utilizados para el análisis deben ser considerados como potencialmente infecciosos; por lo tanto, los desechos de los análisis deben ser descontaminados y eliminados con arreglo a los procedimientos de seguridad establecidos. El material desechable que sea inflamable debe ser incinerado; el material desechable no inflamable debe ser esterilizado en autoclave, al menos durante 1 hora a 121°C.
- A los desechos líquidos debe añadirse hipoclorito sódico en una concentración final al 3%. Deje que el hipoclorito actúe durante 30 minutos, como mínimo. Los desechos líquidos que contengan ácido deben ser neutralizados con cantidades de base apropiadas antes del tratamiento con hipoclorito sódico.
- Evite salpicaduras y la formación de aerosol; en caso de salpicaduras, lave cuidadosamente con una solución de hipoclorito sódico al 3% de sodio y deseche este líquido resultante de la limpieza como residuo potencialmente infeccioso.
- Algunos reactivos contienen azida de sodio como conservante; para evitar la acumulación de azidas metálicas explosivas en cañerías de plomo y cobre, los reactivos deben desecharse por los desagües correspondientes con grandes cantidades de agua.
- La adquisición, el almacenamiento, el uso y el desecho de material radioactivo (líquido y sólido) están sometidos a la normativa y las ordenanzas locales.

6. RECOGIDA DE MUESTRAS

Sólo se pueden utilizar muestras de suero. Deberán descartarse las muestras de alto contenido lipídico o hemolizadas. Mantenga las muestras a 2-8°C durante 7 días; para períodos más largos se recomienda congelar las muestras alícuotas a -20°C. Debe evitarse la congelación y descongelación repetida de las muestras. Antes del análisis, las muestras deben diluirse un 1/51 en el diluyente de SHBG del modo siguiente:

Muestra 20 µl + Diluyente SHBG 1 ml

No intente diluir los calibradores ni el suero de control. Ya están prediluidos y listos para ser utilizados.

7. PROCEDIMIENTO DE ANÁLISIS

- Asegúrese de que todas las muestras y los reactivos se encuentran a temperatura ambiente antes de utilizarlos.
- Antes de su uso, mezcle las muestras por inversión.
- Se recomienda medir todos los calibradores por duplicado.

1. Prepare tubos normales para los recuentos totales y tubos con recubrimiento para los calibradores, las muestras y el control.
2. Pipetee 50 µl de calibradores, suero de control y muestras prediluidas en los tubos con recubrimiento correspondientes. Pipetee directamente del fondo de los tubos.
3. Añada 200 µl de trazador radioactivo (anti-hSHBG marcado con ¹²⁵I) en todos los tubos. Mezcle suavemente el contenido de los tubos con el vórtex e incúbelos durante 90 minutos en un agitador orbital a 150 rpm.
4. Aspire el contenido de los tubos, excepto el de los de recuentos totales.
5. Añada 2 ml de solución de lavado diluida en todos los tubos, excepto los de recuentos totales, y aspire totalmente o decante el contenido de los tubos con ayuda de papel absorbente.
6. Mida la radiactividad de los tubos durante 1 minuto con un contador gamma. Es recomendable controlar el ruido de fondo del instrumento antes de realizar la medición en el análisis. Para evitar variaciones en la sensibilidad del sistema, el ruido de fondo debe reducirse al mínimo o ajustarse debidamente.

ESQUEMA DEL ANÁLISIS

Tubos	Actividad total	Calibradores	Control	Muestras
Reactivo				
Calibradores	----	50 µl	----	----
Control	----	----	50 µl	----
Muestras	----	----	----	50 µl
Trazador	200 µl	200 µl	200 µl	200 µl

- Llevar a cabo la incubación: 90 min a T° ambiente con agitación (150 rpm)
 - Aspirar y lavar: 1 x 2 ml
 - Recuento

8. CÁLCULO DE RESULTADOS

Trace la curva de calibración sobre una gráfica log/lin a partir de los valores de B/T (%) obtenidos para cada calibrador (eje y) con respecto a la concentración relativa (eje x). Calcule el valor B/T (%) de cada muestra y lea la concentración interpolando la curva de calibración.

EJEMPLO DE CÁLCULO

Los valores que se indican a continuación son simplemente ilustrativos y no deben emplearse en lugar de los datos experimentales.

Descripción	Promedio cpm.	B/T (%)	SHBG (nmol/l)
Actividad total (T)	109800	-	-
CAL 0	140	0,1	0
CAL 1	3572	3,3	10
CAL 2	10255	9,3	25
CAL 3	15037	13,7	40
CAL 4	28925	26,3	75
CAL 5	44924	40,9	125
CAL 6	64577	58,8	250
CONTROL	28855	26,3	74,8
P1	22839	20,8	59,2
P2	45754	41,7	133,0

9. VALORES DE REFERENCIA

Es recomendable que cada laboratorio determine su propio intervalo de referencia. Los valores que se indican a continuación son meramente indicativos.

	SHBG (nmol/l) rango	N
Mujeres	20 - 85	49
Hombres	9 - 55	50

Niños: concentración alta de SHBG que va disminuyendo hasta los niveles de adultos en el transcurso de los períodos prepuberal, puberal y de la adolescencia.

Ancianos: según los estudios realizados, el nivel de SHBG aumenta con la edad en los adultos.

Embarazo: durante la gestación, el nivel de SHBG aumenta considerablemente, hasta 200 - 400 nmol/l durante el tercer trimestre⁴.

Cirrosis hepática: incrementa de la concentración de SHBG.

El nivel de SHBG varía en distintos estados fisiopatológicos:

- El nivel de SHBG se ve incrementado por estrógenos sintéticos, en función de la dosis y del tipo de estrógeno³.
- Se ha descrito que el nivel de SHBG disminuye al administrar levonorgestrel⁶.

La concentración de SHBG se puede utilizar para calcular el "índice de andrógenos libres" (FAI):

$$FAI = \frac{\text{Total de testosterona (nmol/l)}}{\text{SHBG (nmol/l)}} \times 100$$

El "índice de andrógenos libres" (FAI) constituye un parámetro de gran utilidad para evaluar el hiperandrogenismo en mujeres^{5,11}.

El nivel de SHBG también puede servir para calcular las concentraciones de testosterona libre y estradiol libre a según la ley de acción de masas¹².

10. RENDIMIENTO DEL ANÁLISIS

SENSIBILIDAD

Sensibilidad analítica

La sensibilidad se calculó a partir de la curva de calibración y se expresó como dosis mínima con una diferencia significativa con respecto al calibrador cero (valor promedio + 2 D. E.). Esta dosis es de 0,26 nmol/l.

Sensibilidad funcional

La sensibilidad funcional del análisis es el valor inferior medido con una precisión de un máximo de un 20% de varianza entre análisis. Para el nivel de SHBG, este valor es inferior a 0,3 nmol/l.

PRECISIÓN

La precisión se evaluó sobre la variabilidad intraensayo y entre análisis, con concentraciones de analito distintas.

Intraensayo

Suero	Media	±	D.E.	C.V. (%)	N
1	15,1	±	0,5	3,3	20
2	44,7	±	1,3	2,9	20
3	151,5	±	7,9	5,2	20

Entre análisis

Suero	Media	± (nmol/l)	D.E.	C.V. (%)	N
1	15,5	±	0,5	2,9	9
2	45,1	±	2,1	4,6	9
3	163,3	±	9,4	5,8	9

EXACTITUD

La exactitud del método ha sido evaluada mediante pruebas de recuperación y paralelismo.

Prueba de recuperación

Se analizaron muestras preparadas con volúmenes iguales de cada calibrador.

	Previsto (nmol/l)	Medido (nmol/l)	Recuperación (%)
S1	-	29,1	-
S1 + CAL 1	19,5	16,9	86,3
S1 + CAL 2	27,0	25,4	93,8
S1 + CAL 3	34,5	32,6	94,3
S1 + CAL 4	52,0	50,4	96,9
S1 + CAL 5	77,0	75,7	98,2
S1 + CAL 6	139,5	126,4	90,6
S2	-	43,7	-
S2 + CAL 1	26,9	23,8	88,6
S2 + CAL 2	34,4	32,4	94,3
S2 + CAL 3	41,9	39,8	95,0
S2 + CAL 4	59,4	55,7	93,9
S2 + CAL 5	84,4	80,2	95,1
S2 + CAL 6	146,9	131,7	89,7

Prueba de paralelismo

Los sueros con una elevada concentración de analito fueron analizados a distintas diluciones con el calibrador cero.

Dilution	Previsto (nmol/l)	Medido (nmol/l)	Recuperación (%)
S1 sin diluir	-	58,1	-
1/1.5	38,7	38,6	99,7
1/2	29,0	26,2	90,2
1/4	15,5	12,3	85,0
1/8	7,3	6,9	94,6
S2 sin diluir	-	88,0	-
1/1.5	58,7	54,4	92,7
1/2	44,0	43,8	99,6
1/4	22,0	17,7	80,5
1/8	11,0	9,2	83,6

EFFECTO HOOK

Las muestras a las que se añadió hSHBG purificada hasta 1.000 nmol/l presentaron valores superiores a los del último calibrador.

Información disponible en la página web: www.zentech.be.

ΕΛΛΗΝΙΚΑ

ΑΝΟΣΟΡΑΔΙΟΜΕΤΡΙΚΗ ΜΕΘΟΔΟΣ ΓΙΑ ΤΟΝ ΠΟΣΟΤΙΚΟ ΠΡΟΣΔΙΟΡΙΣΜΟ ΤΗΣ ΑΝΘΡΩΠΙΝΗΣ ΦΥΛΟΔΕΣΜΕΥΤΙΚΗΣ ΣΦΑΙΡΙΝΗΣ ΣΕ ΑΝΘΡΩΠΙΝΟ ΟΡΟ

R-CC-100 100 προσδιορισμοί

ΜΟΝΟ ΓΙΑ ΔΙΑΓΝΩΣΤΙΚΗ ΧΡΗΣΗ IN VITRO

1. ΚΛΙΝΙΚΕΣ ΕΦΑΡΜΟΓΕΣ

Η ανθρώπινη φυλοδεσμευτική σφαιρίνη (hSHBG) είναι μια κυκλοφορούσα γλυκοπρωτεΐνη με μοριακό βάρος περίπου 90000 (ο πιο σημαντικός ρόλος της SHBG είναι ως πρωτεΐνη μεταφοράς για οιστρογόνα και ανδρογόνα στην περιφερική κυκλοφορία).

Το επίπεδο της ανθρώπινης φυλοδεσμευτικής σφαιρίνης αυξάνεται από τα οιστρογόνα κατά τη διάρκεια της κύησης και από τις θυρεοειδικές ορμόνες. Το επίπεδο της SHBG μειώνεται από τα ανδρογόνα (εξωτερική ή εσωτερική παραγωγή) και μερικά φάρμακα.

Η μέτρηση της SHBG στον ορό αποτελεί επίσης ένα πολύ σημαντικό δείκτη εξελιξιμότητας για παθήσεις που δεν συνδέονται αυστηρά με τα στεροειδή. Τα επίπεδα της SHBG συσχετίζονται καλά με τη λειτουργία του θυρεοειδούς και βρίσκονται υψηλές τιμές σε περιπτώσεις μειωμένης ηπατικής λειτουργίας όπως στην κίρρωση του ήπατος.

2. ΒΑΣΙΚΗ ΑΡΧΗ ΤΟΥ ΠΡΟΣΔΙΟΡΙΣΜΟΥ

Αυτό το kit προσδιορισμών είναι μία ανοσοραδιομετρική μέθοδος (IRMA), η οποία βασίζεται σε σωληνάρια επιστρωμένα με μονοκλωνικά αντισώματα που κατευθύνονται σε διακριτά επίπεδα του μορίου της SHBG.

Δύο αντισώματα δεσμεύσης επιστρώνονται στο εσωτερικό τοίχωμα των σωληναρίων. Η SHBG των βαθμονομητών ή των δειγμάτων δεσμεύεται από αυτά τα αντισώματα. Προσθήκη του τρίτου αντισώματος που είναι σημασμένο με ¹²⁵Iώδιο ολοκληρώνει το σύστημα, επιτρέποντας το σχηματισμό μιας γέφυρας ανάμεσα στα επιστρωμένα αντισώματα και το σημασμένο αντίσωμα.

Μετά την πλύση, η υπολειπόμενη ραδιενέργεια που δεσμεύεται στα σωληνάρια σχετίζεται άμεσα με τη συγκέντρωση της SHBG στους βαθμονομητές ή τα δείγματα.

Η προσεκτική επιλογή των τριών μονοκλωνικών αντισωμάτων επιτρέπει υψηλή ειδικότητα και υψηλή ευαισθησία και αποτρέπει την υπερβολική ειδικότητα που αποδίδεται μερικές φορές σε ανοσομετρικούς προσδιορισμούς με δύο μονοκλωνικά μόνο.

3. ΠΑΡΕΧΟΜΕΝΑ ΥΛΙΚΑ

- Τα αντιδραστήρια επαρκούν για 100 προσδιορισμούς.
- Φυλάσσετε το kit και τα αντιδραστήρια στους 2-8°C.
- Η ημερομηνία λήξης κάθε αντιδραστηρίου αναγράφεται στην ετικέτα.

- Ραδιενεργός ιχνηθέτης:** 1 φιαλίδιο με 22 ml αντι-hSHBG σημασμένη με ¹²⁵I, σε ρυθμιστικό διάλυμα φωσφορικών που περιέχει BSA. Ραδιενέργεια: ± 275 kBq. Συντηρητικά: NaN₃ < 0,1%.
- Βαθμονομητές:** 7 φιαλίδια που περιέχουν 0,7 ml hSHBG σε ορό αλόγου, προαραιωμένο. Έτοιμο για χρήση Συγκεντρώσεις: 0 - 10 - 25 - 40 - 75 - 125 - 250 nmol/l. Συντηρητικό: NaN₃ < 0,1%.
- Ορός ελέγχου:** 1 φιαλίδιο που περιέχει 0,7 ml ανθρώπινο ορού προαραιωμένου. Έτοιμο για χρήση Για τις ακριβείς τιμές, ανατρέξτε στις τιμές που αναφέρονται στο φύλλο δεδομένων ποιοτικού ελέγχου. Συντηρητικό: NaN₃ < 0,1%.

4. **Επιστρωμένα σωληνάκια:** 100 σωληνάκια επιστρωμένα με δύο μονοκλωνικά αντισώματα ποντικού που κατευθύνονται στην hSHBG. Τα μη χρησιμοποιημένα σωληνάκια πρέπει να φυλάσσονται σε θερμοκρασία 2-8° C, προστατευμένα από την υγρασία.
5. **Διάλυμα πλύσης (συμπυκνωμένο 50 x):** 1 φιαλίδιο με 20 ml ρυθμιστικού διαλύματος TRIS-HCl με απορρυπαντικό και συντηρητικό: $\text{NaN}_3 < 0,1\%$. Συμπληρώστε απεσταγμένο νερό μέχρι τα 1000 ml. Το αραιωμένο διάλυμα πλύσης είναι σταθερό για 2 μήνες στους 2-8° C.
6. **Αραιωτικό:** 1 φιαλίδιο που περιέχει 100 ml ρυθμιστικού διαλύματος φωσφορικών με BSA Συντηρητικό: $\text{NaN}_3 < 0,1\%$. Έτοιμο για χρήση

4. ΥΛΙΚΑ ΠΟΥ ΑΠΑΙΤΟΥΝΤΑΙ ΑΛΛΑ ΔΕΝ ΠΑΡΕΧΟΝΤΑΙ

- Πλαστικά δοκιμαστικά σωληνάκια
- Βάσεις δοκιμαστικών σωληναρίων.
- Ρυθμιζόμενες, αυτόματες μικροπιπέτες με αναλώσιμα ρύγχη.
- Αναμείκτης στροβιλισμού (τύπου vortex)
- Διαβαθμισμένος κύλινδρος.
- Αντλία αναρρόφησης ή αυτοματοποιημένη συσκευή πλύσης.
- Μετρητής σπινθηρισμών γ ακτινοβολίας.
- Απεσταγμένο νερό.
- Αναδευτήρας τροχιακής κίνησης ρυθμιζόμενος στα 150 rpm.

5. ΠΡΟΕΙΔΟΠΟΙΗΣΕΙΣ ΚΑΙ ΠΡΟΦΥΛΑΞΕΙΣ

Προκειμένου να πάρετε αναπαραγώγιμα αποτελέσματα, θα πρέπει να τηρηθούν οι ακόλουθοι κανόνες:

- Μην αναμειγνύετε αντιδραστήρια διαφορετικών παρτίδων.
- Μη χρησιμοποιείτε αντιδραστήρια μετά την ημερομηνία λήξης τους.
- Χρησιμοποιείτε πολύ καθαρά γυάλινα δοχεία.
- Χρησιμοποιείτε απεσταγμένο νερό, αποθηκευμένο σε καθαρούς περιέκτες.
- Αποφύγετε τη μόλυνση από δείγμα σε δείγμα. Για το σκοπό αυτό, θα πρέπει να χρησιμοποιούνται για κάθε δείγμα και αντιδραστήριο ρύγχη μιας χρήσης.

Προκειμένου να αποφευχθεί η μόλυνση σε ανθρώπους και στο περιβάλλον, θα πρέπει να ληφθούν οι ακόλουθες προφυλάξεις:

- Χρησιμοποιείτε γάντια μιας χρήσης όταν χειρίζεστε δυνητικώς μολυσματικό υλικό και εκτελείτε τον προσδιορισμό.
- Μην διανέμετε τα αντιδραστήρια με πιπέτα χρησιμοποιώντας το στόμα σας.
- Μην καπνίζετε, μην τρώτε, μην πίνετε και μη χρησιμοποιείτε καλλυντικά κατά τη διάρκεια του προσδιορισμού.
- Όλα τα υλικά ανθρώπινης προέλευσης που χρησιμοποιούνται για την παρασκευή αυτού του kit εξετάστηκαν και βρέθηκαν αρνητικά για HBsAg, αντι-HIV και αντι-HCV. Επειδή επί του παρόντος καμία εξέταση δεν μπορεί να εγγυηθεί την πλήρη απουσία των ιών αυτών, όλα τα δείγματα και τα αντιδραστήρια που χρησιμοποιούνται για τον προσδιορισμό πρέπει να θεωρούνται ως δυνητικώς μολυσματικά. Επομένως, τα απόβλητα μετά τον προσδιορισμό πρέπει να υποβάλλονται σε απολύμανση και να απορρίπτονται σύμφωνα με τις καθιερωμένες διαδικασίες ασφαλείας.

- Τα εύφλεκτα υλικά μίας χρήσης πρέπει να αποτεφρώνονται. Τα μη εύφλεκτα υλικά μίας χρήσης πρέπει να αποστειρώνονται σε αυτόκαυστο επί τουλάχιστον 1 ώρα σε θερμοκρασία 121° C.
- Στα υγρά απόβλητα πρέπει να προστίθεται υποχλωριώδες νάτριο σε τελική συγκέντρωση 3%. Αφήστε το υποχλωριώδες νάτριο να δράσει επί τουλάχιστον 30 λεπτά. Τα υγρά απόβλητα που περιέχουν οξύ πρέπει να υποβάλλονται σε εξουδετέρωση με τις κατάλληλες ποσότητες βάσης πριν την επεξεργασία με το υποχλωριώδες νάτριο.
- Αποφύγετε το πιπίλισμα και το σχηματισμό αερολύματος. Σε περίπτωση που χυθεί το υγρό, πλύνετε προσεκτικά με διάλυμα υποχλωριώδους νατρίου 3% και απορρίψτε αυτό το καθαριστικό υγρό ως δυνητικώς μολυσματικό υλικό.
- Μερικά αντιδραστήρια περιέχουν αζίδιο του νατρίου ως συντηρητικό. Για να αποφύγετε τη συσσώρευση εκρηκτικών αζιδίων μετάλλων στους σωλήνες της αποχέτευσης που είναι από μόλυβδο και χαλκό, τα αντιδραστήρια πρέπει να απορρίπτοντας ξεπλύνοντας ταυτόχρονα την αποχέτευση με μεγάλες ποσότητες νερού.
- Η λήψη, χρήση και απόρριψη ραδιενεργών υλικών (υγρών και στερεών) υπόκειται στους κανονισμούς και τις διατάξεις των τοπικών αρχών.

6. ΣΥΛΛΟΓΗ ΔΕΙΓΜΑΤΩΝ

Μπορεί να χρησιμοποιηθεί μόνο δείγμα ορού. Δείγματα υψηλά λιπαιμικά ή αιμολυμένα πρέπει να απορρίπτονται. Διατηρήστε τα δείγματα στους 2-8° C για 7 ημέρες. Για μεγαλύτερες περιόδους, συνιστούμε να καταψύχετε τα δείγματα σε κλάσματα, σε θερμοκρασία -20° C. Η επανειλημμένη κατάψυξη και απόψυξη των δειγμάτων θα πρέπει να αποφεύγεται.

Πριν την ανάλυση, τα δείγματα πρέπει να αραιώνονται σε αναλογία 1/51 με το αραιωτικό SHBG ως εξής:

Δείγμα 20 μl + Αραιωτικό SHBG 1 ml

Μην επιχειρήσετε να αραιώσετε τους βαθμονομητές και τον ορό ελέγχου. Είναι ήδη προαραιωμένοι και έτοιμοι για χρήση.

7. ΔΙΑΔΙΚΑΣΙΑ ΜΕΘΟΔΟΥ:

- Φέρετε όλα τα αντιδραστήρια και τα δείγματα σε θερμοκρασία δωματίου πριν από τη χρήση.
 - Πριν από τη χρήση, αναμείξτε τα δείγματα με αναστροφή.
 - Για όλους τους βαθμονομητές, συνιστάται διπλή μέτρηση.
1. Προετοιμάστε απλά σωληνάκια για τις μετρήσεις του ιχνηθέτη ^{125}I ("total") και επιστρωμένα σωληνάκια για τους βαθμονομητές, τα δείγματα και τον ορό ελέγχου.
 2. Διανείμετε με πιπέτα 50 μl τους βαθμονομητές, τον ορό ελέγχου και τα προαραιωμένα δείγματα μέσα στα κατάλληλα επιστρωμένα σωληνάκια. Διανείμετε με την πιπέτα κατευθείαν στον πυθμένα των σωληναρίων.
 3. Προσθέστε 200 μl ραδιενεργού ιχνηθέτη (αντι-hSHBG σημασμένη με ^{125}I) σε όλα τα σωληνάκια. Αναμείξτε απαλά τα σωληνάκια με vortex και επώαστε επί 90 λεπτά σε έναν αναδευτήρα τροχιακής κίνησης ρυθμισμένο στα 150 rpm.
 4. Αναρροφήστε το περιεχόμενο κάθε σωληναρίου, με εξαίρεση εκείνα που αφορούν τις μετρήσεις του ιχνηθέτη ^{125}I ("total").
 5. Προσθέστε 2 ml αραιωμένου διαλύματος πλύσης σε κάθε σωληνάριο, με εξαίρεση εκείνα που αφορούν τις μετρήσεις του ιχνηθέτη ^{125}I ("total") και αναρροφήστε τελείως ή μεταγγίστε το περιεχόμενο σε απορροφητικό χαρτί.
 6. Μετρήστε τη ραδιενέργεια που έχει δεσμευτεί στα σωληνάκια επί 1 λεπτό σε μετρητή γ ακτινοβολίας. Προτείνουμε να ελέγξετε το υπόβαθρο του οργάνου πριν μετρήσετε τον προσδιορισμό. Προκειμένου να αποφύγετε αποκλίσεις στην ευαισθησία του συστήματος, το υπόβαθρο πρέπει να μειωθεί στο ελάχιστο ή να ρυθμιστεί κατάλληλα.

ΣΧΗΜΑ ΤΗΣ ΜΕΘΟΔΟΥ

Σωληνάρια	Μέτρηση ιχνηθέτη ¹²⁵ I (total)	Βαθμονομητές	Ορός ελέγχου	Δείγματα
Αντιδραστήριο				
Βαθμονομητές	----	50 µl	----	----
Ορός ελέγχου	----	----	50 µl	----
Δείγματα Ιχνηθέτης	----	----	----	50 µl
	200 µl	200 µl	200 µl	200 µl

- Επώαστε: 90 λεπτά, θερμοκρασία δωματίου, ανάδευση (150 rpm)
 - Αναρροφήστε και πλύνετε: 1 x 2 ml
 - Μετρήστε

8. ΥΠΟΛΟΓΙΣΜΟΣ ΤΩΝ ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΩΝ

Σχεδιάστε την καμπύλη βαθμονόμησης σε χαρτί λογαριθμικών/γραμμικών γραφημάτων αποτυπώνοντας το Β/Τ (%) που υπολογίζεται για κάθε βαθμονομητή (άξονας των γ) έναντι της σχετικής συγκέντρωσης (άξονας των χ). Υπολογίστε το Β/Τ (%) κάθε δείγματος και διαβάστε τη συγκέντρωση με αναγωγή στην καμπύλη βαθμονόμησης.

ΠΑΡΑΔΕΙΓΜΑ ΥΠΟΛΟΓΙΣΜΟΥ

Οι τιμές που αναφέρονται πιο κάτω πρέπει να θεωρηθούν ως παράδειγμα και δεν μπορούν να χρησιμοποιηθούν αντί πειραματικών δεδομένων

Περιγραφή	Μέση τιμή cpm.	Β/Τ (%)	SHBG (nmol/l)
Μέτρηση ιχνηθέτη ¹²⁵ I (T)	109800	-	-
CAL 0	140	0,1	0
CAL 1	3572	3,3	10
CAL 2	10255	9,3	25
CAL 3	15037	13,7	40
CAL 4	28925	26,3	75
CAL 5	44924	40,9	125
CAL 6	64577	58,8	250
ΟΡΟΣ ΕΛΕΓΧΟΥ	28855	26,3	74,8
P1	22839	20,8	59,2
P2	45754	41,7	133,0

9. ΤΙΜΕΣ ΑΝΑΦΟΡΑΣ

Συνιστάται κάθε εργαστήριο να προσδιορίσει το δικό του πεδίο τιμών αναφοράς. Οι τιμές που αναφέρονται πιο κάτω είναι απλώς ενδεικτικές.

	SHBG (nmol/l) πεδίο τιμών	N
Γυναίκες	20 - 85	49
Άνδρες	9 - 55	50

Παιδιά: Υψηλή συγκέντρωση SHBG που πέφτει, κατά τις περιόδους της προεφηβείας, εφηβείας και ενηλικιότητας, στα επίπεδα των ενηλίκων.

Ηλικιωμένοι ενήλικοι: Έχει αναφερθεί ότι το επίπεδο της SHBG αυξάνεται με την ηλικία στους ενήλικους.

Κύηση: Κατά τη διάρκεια της κύησης, το επίπεδο της SHBG αυξάνεται αισθητά, έως 200 - 400 nmol/l κατά τη διάρκεια του 3^{ου} τριμήνου⁴.

Κίρρωση του ήπατος: Αυξημένη τιμή

Το επίπεδο της SHBG ποικίλλει σε διάφορες παθοφυσιολογικές καταστάσεις:

- Η SHBG αυξάνεται με τα συνθετικά οιστρογόνα, ανάλογα με τη δόση και τον τύπο του οιστρογόνου³.
 - Έχει αναφερθεί ότι η SHBG μειώνεται με τη λεβονοργεστρέλη⁶.
- Η συγκέντρωση της SHBG μπορεί να χρησιμοποιηθεί για υπολογισμό του "Δείκτη Ελεύθερου Ανδρογόνου" (FAI) :

$$FAI = \frac{\text{Ολική τεστοστερόνη (nmol/l)}}{\text{SHBG (nmol/l)}} \times 100$$

Ο "Δείκτης Ελεύθερου Ανδρογόνου" αποτελεί πολύ χρήσιμη παράμετρο για την αξιολόγηση της υπερανδρογοναιμίας σε γυναίκες^{5,11}.

Η SHBG μπορεί επίσης να χρησιμοποιηθεί για τον υπολογισμό των συγκεντρώσεων ελεύθερης τεστοστερόνης και ελεύθερης οιστραδιόλης σύμφωνα με το νόμο δράσης της μάζας¹².

10. ΑΠΟΔΟΣΗ ΤΗΣ ΜΕΘΟΔΟΥ

ΕΥΑΙΣΘΗΣΙΑ

Αναλυτική ευαισθησία

Η ευαισθησία υπολογίστηκε με βάση την καμπύλη βαθμονόμησης και εκφράστηκε ως η ελάχιστη δόση που δείχνει σημαντική διαφορά από το μηδενικό βαθμονομητή (μέση τιμή + 2 T.A.). Η δόση αυτή είναι 0,26 nmol/l.

Λειτουργική ευαισθησία

Η λειτουργική ευαισθησία του προσδιορισμού είναι η χαμηλότερη τιμή που μετράται με ακρίβεια μέγιστης διακύμανσης 20% μεταξύ διαφορετικών προσδιορισμών. Για την SHBG, η τιμή αυτή είναι μικρότερη από 0,3 nmol/l.

ΑΚΡΙΒΕΙΑ

Η ακρίβεια αξιολογήθηκε με βάση τη μεταβλητότητα για τον ίδιο προσδιορισμό και μεταξύ διαφορετικών προσδιορισμών, σε διαφορετικές συγκεντρώσεις αναλυόμενης ουσίας.

Για τον ίδιο προσδιορισμό

Ορός	Μέση τιμή ± Τυπ. απόκλιση (nmol/l)	Τυπ. απόκλιση η (%)	Σ.Δ. (%)	N
1	15,1 ± 0,5	3,3	20	
2	44,7 ± 1,3	2,9	20	
3	151,5 ± 7,9	5,2	20	

Μεταξύ διαφορετικών προσδιορισμών

Ορός	Μέση τιμή ± Τυπ. απόκλιση (nmol/l)	Τυπ. απόκλιση η (%)	Σ.Δ. (%)	N
1	15,5 ± 0,5	2,9	9	
2	45,1 ± 2,1	4,6	9	
3	163,3 ± 9,4	5,8	9	

ΟΡΘΟΤΗΤΑ

Η ορθότητα της μεθόδου έχει αξιολογηθεί με δοκιμασίες ανάκτησης και παραλληλισμού.

Δοκιμασία ανάκτησης

Υποβλήθηκαν σε δοκιμασία δείγματα αναμειγμένα με ίσους όγκους από κάθε βαθμονομητή.

	Αναμενόμενη συγκέντρωση η (nmol/l)	Μετρηθείσα συγκέντρωση (nmol/l)	Ανάκτηση (%)
S1	-	29,1	-
S1 + CAL 1	19,5	16,9	86,3
S1 + CAL 2	27,0	25,4	93,8
S1 + CAL 3	34,5	32,6	94,3
S1 + CAL 4	52,0	50,4	96,9
S1 + CAL 5	77,0	75,7	98,2
S1 + CAL 6	139,5	126,4	90,6
S2	-	43,7	-
S2 + CAL 1	26,9	23,8	88,6
S2 + CAL 2	34,4	32,4	94,3
S2 + CAL 3	41,9	39,8	95,0
S2 + CAL 4	59,4	55,7	93,9
S2 + CAL 5	84,4	80,2	95,1
S2 + CAL 6	146,9	131,7	89,7

Δοκιμασία παραλληλισμού

Οροί με υψηλή συγκέντρωση αναλυόμενης ουσίας εξετάστηκαν σε διαφορετικές αραιώσεις με το μηδενικό βαθμονομητή.

Αραίωση	Αναμενόμενη τιμή (nmol/l)	Μετρηθείσα τιμή (nmol/l)	Ανάκτηση (%)
S1 μη αραιωμένο	-	58,1	-
1/1,5	38,7	38,6	99,7
1/2	29,0	26,2	90,2
1/4	15,5	12,3	85,0
1/8	7,3	6,9	94,6
S2 μη αραιωμένο	-	88,0	-
1/1,5	58,7	54,4	92,7
1/2	44,0	43,8	99,6
1/4	22,0	17,7	80,5
1/8	11,0	9,2	83,6

ΦΑΙΝΟΜΕΝΟ ΑΓΚΙΣΤΡΟΥ (HOOK)

Δείγματα που εμβολιάστηκαν με κεκαθαρμένη hSHBG έως 1.000 pmol/l έδωσαν τιμές υψηλότερες από τον τελευταίο βαθμονομητή.

Μπορείτε να κατεβάσετε το παρόν ένθετο φυλλάδιο οδηγιών χρήσης μέσω του διαδικτύου από την ιστοσελίδα www.zentech.be

FRANÇAIS

DOSAGE RADIO-IMMUNOMÉTRIQUE POUR LA DÉTERMINATION QUANTITATIVE DE LA GLOBULINE DE LIAISON DE L'HORMONE SEXUELLE HUMAINE DANS LE SÉRUM HUMAIN R-CC-100 - 100 Déterminations

UNIQUEMENT A USAGE DIAGNOSTIQUE IN VITRO

1. APPLICATIONS CLINIQUES

La globuline de liaison de l'hormone sexuelle humaine (hSHBG) est une glycoprotéine circulante d'un poids moléculaire d'environ 9000 (le rôle principal de la SHBG est le transport des œstrogènes et des androgènes dans la circulation périphérique).

Le taux de la globuline de liaison de l'hormone sexuelle augmente sous l'action des œstrogènes de la grossesse et des hormones thyroïdiennes. Le taux de SHBG diminue sous l'action des androgènes (production externe et interne) et de quelques médicaments.

Le dosage de la SHBG dans le sérum est également un important index d'évolution des maladies non exclusivement liées aux stéroïdes. Les taux de SHBG sont bien corrélés avec la fonction thyroïdienne et augmentent lors d'une diminution de la fonction hépatique et dans la cirrhose.

2. PRINCIPE DE L'ANALYSE

Cette trousse d'analyse est un dosage radio-immunométrique (IRMA) basé sur des tubes tapissés d'anticorps monoclonaux dirigés contre différents épitopes de la molécule de SHBG.

Deux anticorps de capture sont adsorbés sur la paroi intérieure des tubes. La SHBG des calibrateurs ou des échantillons est capturée par ces anticorps. L'addition d'un troisième anticorps marqué à l'iode¹²⁵ complète le système, permettant la formation d'un pont entre les anticorps adsorbés et l'anticorps marqué.

Après lavage, la radioactivité liée restant dans les tubes est directement proportionnelle à la concentration en SHBG des calibrateurs ou des échantillons.

Un choix judicieux des trois anticorps monoclonaux permet d'obtenir une spécificité et une sensibilité élevées et évite l'excès de spécificité qui est parfois reproché aux dosages immunométriques n'utilisant que deux anticorps.

3. RÉACTIFS FOURNIS AVEC LA TROUSSE

- Les réactifs sont suffisants pour 100 déterminations.
- Stocker les kits et les réactifs à 2-8°C.
- La date d'expiration de chaque réactif est inscrite sur l'étiquette.

1. Traceur radioactif: 1 flacon de 22 ml d'anti-hSHBG marqué à l'I¹²⁵ dans un tampon phosphate contenant de la SAB. Radioactivité : ± 275 kBq. Conservateur : NaN₃ < 0,1%.

2. Calibrateurs: 7 flacons contenant 0,7 ml de hSHBG dans du sérum de cheval, pré-dilués. Prêts à l'emploi. Concentrations : 0 - 10 - 25 - 40 - 75 - 125 - 250 nmol/. Conservateur : NaN₃ < 0,1%.

3. Contrôle: 1 flacon contenant 0,7 ml de sérum humain, pré-dilué. Prêt à l'emploi. **Pour la valeur exacte, se référer à la fiche technique du contrôle de qualité.** Conservateur: NaN₃ (<0,1%).

4. Tubes coatés: 100 tubes tapissés de deux anticorps monoclonaux dirigés contre la hSHBG. Les tubes non utilisés doivent être conservés à 2-8°C, protégés de l'humidité.

5. Solution de lavage (concentrée 50 x): 1 flacon de 20 ml de tampon TRIS-HCL avec un détergent. Conservateur : NaN₃ < 0,1%. Porter à 1000 ml avec de l'eau distillée. La solution de lavage diluée est stable pendant 2 mois entre 2 et 8°C.

6. Diluant: 1 flacon contenant 100 ml d'une solution de tampon phosphate avec de la SAB. Conservateur : NaN₃ < 0,1%. Prêt à l'emploi.

4. MATÉRIEL REQUIS MAIS NON FOURNI

- Tubes à essai en plastique.
- Portoir pour tubes à essai.
- Micropipettes automatiques réglables avec pointes jetables.
- Vortex.
- Cylindre gradué.
- Pompe d'aspiration ou dispositif de lavage automatique.
- Compteur de rayons gamma.
- Eau distillée.
- Agitateur orbital réglable à 150 tpm

5. AVERTISSEMENTS ET PRÉCAUTIONS

Afin d'obtenir des résultats reproductibles, les règles suivantes doivent être respectées:

- Ne pas mélanger les réactifs de lots différents.
- Ne pas utiliser de réactifs après leur date de péremption.
- Utiliser de la verrerie parfaitement propre.
- Utiliser de l'eau distillée conservée dans des réservoirs propres.
- Éviter toute contamination des échantillons. Pour ce faire, utiliser des embouts jetables pour chaque échantillon et réactif.

Afin d'éviter une contamination du personnel ou de l'environnement, les précautions suivantes doivent être respectées:

- Utiliser des gants jetables lors de l'utilisation de matériel potentiellement infectieux et de la réalisation du dosage.
- Ne pas pipeter les réactifs avec la bouche.
- Ne pas fumer, manger, boire ou se maquiller durant le dosage.
- Tout le matériel d'origine humaine utilisé pour la préparation de cette trousse a été testé et trouvé négatif pour les HBsAg, anti-HIV et anti-HCV. Étant donné qu'aucun test actuel ne peut garantir totalement l'absence de ces virus, tous les échantillons et réactifs utilisés pour le dosage doivent être considérés comme potentiellement infectieux. Tous les déchets produits lors du dosage doivent dès lors être décontaminés et éliminés en respectant les procédures de sécurité. Le matériel jetable combustible doit être incinéré. Le matériel jetable incombustible doit être stérilisé à l'autoclave pendant au moins 1 heure à 121°C. Il faut ajouter de l'hypochlorite de soude aux déchets liquides de manière à obtenir une concentration finale de 3%. Laisser agir l'hypochlorite pendant au moins 30 minutes. Les déchets liquides contenant de l'acide doivent être neutralisés avec la quantité adéquate de base avant d'être traités à l'hypochlorite de soude.
- Éviter les éclaboussures et la formation d'aérosol. En cas d'éclaboussure, laver soigneusement avec une solution d'hypochlorite de soude à 3% et éliminer ce liquide de lavage avec les déchets potentiellement infectieux.
- Certains réactifs contiennent de l'azoture de sodium comme agent conservateur. Afin de prévenir la formation d'azotures de métal explosifs dans les canalisations de plomb ou de cuivre, éliminer les réactifs en rinçant les canalisations avec une grande quantité d'eau.
- L'acquisition, le stockage, l'utilisation et l'élimination de matériel radioactif (liquide et solide) sont soumis à la réglementation des autorités locales.

6. ÉCHANTILLONS A TESTER

Seuls les échantillons de sérum peuvent être utilisés. Les échantillons hyperlipémiques ou hémolysés doivent être écartés. Conserver les échantillons à 2-8°C pour 7 jours; pour une plus longue période il est conseillé de congeler les échantillons à -20°C. La congélation et la décongélation des échantillons devraient être évitées.

Avant de commencer l'analyse, les échantillons doivent être dilués à 1/51 dans le diluant SHBG de la manière suivante :

20 µl d'échantillon + 1 ml de diluant SHBG.

Ne pas diluer les calibrateurs et le sérum de contrôle. Ils sont déjà pré-dilués et prêts à l'emploi.

7. RÉALISATION DU DOSAGE

- Ramener tous les réactifs et les échantillons à température ambiante avant l'utilisation.
 - Avant l'utilisation, mélanger les échantillons par inversion
 - Pour tous les calibrateurs, un dosage en double est recommandé.
1. Préparer des tubes non coatés pour l'Activité Totale et des tubes coatés pour les calibrateurs, les échantillons et les contrôles.
 2. Pipeter 50 µl de calibrateurs, sérum de contrôle et échantillons pré-dilués dans les tubes coatés correspondants. Pipeter directement dans le fond des tubes.
 3. Ajouter 200 µl de traceur radioactif (anti-hSHBG marqué à I¹²⁵) dans tous les tubes. Mélanger doucement les tubes au vortex et incubé pendant 90 minutes sur un agitateur orbital réglé à 150 tpm.
 4. Aspirer le contenu de chacun des tubes excepté les tubes pour l'activité totale.
 5. Ajouter 2 ml de solution de lavage diluée à chacun des tubes excepté les tubes pour l'activité totale et aspirer à fond tous les tubes ou en décanter le contenu sur du papier absorbant.
 6. Compter la radioactivité dans les tubes pendant 1 minute en utilisant un compteur gamma. Nous suggérons de vérifier le bruit de fond de l'instrument avant de réaliser l'analyse. Afin d'éviter des variations de la sensibilité du système, le bruit de fond devrait être réduit à un minimum ou être ajusté correctement.

SCHEMA DU DOSAGE

Tubes Réactif	Activité Totale	Calibrateurs	Contrôle	Échant.
Calibrateur	----	50 µl	----	----
Contrôles	----	----	50 µl	----
Échantillons	----	----	----	50 µl
Traceur	200 µl	200 µl	200 µl	200 µl

- Incubation: 90 min. à température ambiante sous agitation (150 tpm)
- Aspiration et lavage : 1 x 2 ml
- Comptage

8. CALCUL DES RÉSULTATS

Tracer la courbe d'étalonnage sur un papier semi-logarithmique en reportant le B/T (%) obtenu pour chaque calibrateur (axe des y) en fonction de la concentration relative (axe des x). Calculer le B/T (%) pour chaque échantillon et lire la concentration par interpolation sur la courbe d'étalonnage.

EXEMPLE DE CALCUL

Les valeurs rapportées ci-dessous doivent être considérées comme un exemple et ne peuvent être utilisées à la place des données expérimentales.

Description	Moyenne cpm	B/T (%)	SHBG (nmol/l)
Activité Totale (T)	109800	-	-
CAL 0	140	0,1	0
CAL 1	3572	3,3	10
CAL 2	10255	9,3	25
CAL 3	15037	13,7	40
CAL 4	28925	26,3	75
CAL 5	44924	40,9	125
CAL 6	64577	58,8	250
CONTROLE	28855	26,3	74,8
P1	22839	20,8	59,2
P2	45754	41,7	133,0

9. VALEURS DE RÉFÉRENCE

Il est recommandé que chaque laboratoire détermine ces propres intervalles de référence. Les valeurs rapportées ci-dessous le sont seulement à titre indicatif.

	Fourchette SHBG (nmol/l)	N
Hommes	20 - 85	49
Femmes	9 - 55	50

Enfants : une forte concentration en SHBG diminuant pendant les périodes prépubertaire, pubertaire et l'adolescence jusqu'aux taux adultes.

Personnes âgées : on rapporte que, chez l'adulte, le taux de SHBG augmente avec l'âge.

Grossesse : pendant la grossesse, le taux de SHBG augmente considérablement jusqu'à 200 à 400 nmol/l pendant le 3^e trimestre⁴.

Cirrhose du foie : augmenté.

Le taux de SHBG varie dans différents états pathologiques :

- La SHBG est augmentée par les œstrogènes synthétiques en fonction de la dose et du type d'oestrogène³.
- On a rapporté que la SHBG est diminuée par le levonorgestrel⁶.

La concentration en SHBG peut être utilisée pour calculer l'index d'androgène libre ("Free Androgen" FAI) :

$$\text{FAI} = \frac{\text{Testostérone totale (nmol/l)}}{\text{SHBG (nmol/l)}} \times 100$$

L'index "d'androgène libre" est un paramètre très utile pour évaluer l'hyperandrogénisme chez la femme^{5,11}.

La SHBG peut aussi être utilisée pour calculer les concentrations en testostérone libre et en œstradiol libre selon la loi de l'action de masse¹².

10. PERFORMANCE DU DOSAGE

SENSIBILITÉ

Sensibilité analytique

La sensibilité a été calculée sur base de la courbe d'étalonnage et exprimée comme dose minimale montrant une différence significative du Calibreur Zéro (valeur moyenne + 2 D.S.). Cette dose est 0,26 nmol/l.

Sensibilité fonctionnelle

La sensibilité fonctionnelle d'analyse est la valeur la plus basse qui est mesurée avec une précision de maximum 20% de variation inter-analyse. Pour la SHBG, cette valeur est de 0,3 nmol/l.

PRÉCISION

La précision a été évaluée sur la variabilité intra et inter-analyse à différentes concentrations de l'analyte.

Intra-analyse

Serum	Moyenne ± (nmol/ml)	D.S.	C.V. (%)	N
1	15,1 ±	0,5	3,3	20
2	44,7 ±	1,3	2,9	20
3	151,5 ±	7,9	5,2	20

Inter-analyse

Serum	Moyenne ± (nmol/ml)	D.S.	C.V.	N
1	15,5 ±	0,5	2,9	9
2	45,1 ±	2,1	4,6	9
3	163,3 ±	9,4	5,8	9

EXACTITUDE

L'exactitude de la méthode a été vérifiée par les tests de récupération et de parallélisme.

Test de récupération

Les échantillons, mélangés avec les volumes égaux de chaque calibreur, ont été testés.

	Prévu (nmol/l)	Mesuré (nmol/l)	Récupération (%)
S1	-	29,1	-
S1 + CAL 1	19,5	16,9	86,3
S1 + CAL 2	27,0	25,4	93,8
S1 + CAL 3	34,5	32,6	94,3
S1 + CAL 4	52,0	50,4	96,9
S1 + CAL 5	77,0	75,7	98,2
S1 + CAL 6	139,5	126,4	90,6
S2	-	43,7	-
S2 + CAL 1	26,9	23,8	88,6
S2 + CAL 2	34,4	32,4	94,3
S2 + CAL 3	41,9	39,8	95,0
S2 + CAL 4	59,4	55,7	93,9
S2 + CAL 5	84,4	80,2	95,1
S2 + CAL 6	146,9	131,7	89,7

Test de parallélisme.

Les sérums de concentration élevée en analyte ont été testés à différentes dilutions avec le Calibreur Zéro.

Dilution	Prévu (nmol/l)	Mesuré (nmol/l)	Récupération (%)
S1 non dilué	-	58,1	-
1/1,5	38,7	38,6	99,7
1/2	29,0	26,2	90,2
1/4	15,5	12,3	85,0
1/8	7,3	6,9	94,6
S2 non dilué	-	88,0	-
1/1,5	58,7	54,4	92,7
1/2	44,0	43,8	99,6
1/4	22,0	17,7	80,5
1/8	11,0	9,2	83,6

EFFET CROCHET

Des échantillons enrichis avec de l'hSHBG purifiée jusqu'à 1.000 nmol/l donnent des valeurs supérieures au dernier calibreur.

Ce mode opératoire peut être téléchargé sur notre site www.zentech.be

NEDERLANDS

IMMUNORADIOMETRISCHE ASSAY VOOR DE KWANTITATIEVE BEPALING VAN HUMAAN GESLACHTSHORMOON-BINDEND GLOBULINE IN HUMAAN SERUM

R-CC-100 - 100 tests

UITSLUITEND VOOR DIAGNOSTISCH GEBRUIK IN VITRO

1. KLINISCHE TOEPASSINGEN

Humaan geslachtshormoon-bindend globuline (**hSHBG**) is een circulerend glycoproteïne met een moleculair gewicht van ongeveer 90.000 (de belangrijkste rol van SHBG is die als transporteiwit voor oestrogenen en androgenen in de perifere circulatie).

De concentratie van het geslachtshormoon-bindend globuline verhoogt door oestrogenen, tijdens de zwangerschap en door thyroïdhormonen. De SHBG-concentratie verlaagt door androgenen (externe of interne productie) en door sommige geneesmiddelen.

De meting van SHBG in serum is ook zeer belangrijk om de evolutie te volgen van aandoeningen die niet strikt verband houden met steroïden. SHBG-concentratie staat in nauw verband met de schildklierfunctie en hoge waarden worden waargenomen bij patiënten met een verminderde leverfunctie, zoals bij cirrose.

2. PRINCIPE VAN DE ASSAY

Deze testkit is een immunoradiometrische assay (IRMA), gebaseerd op met monoklonale antilichamen gecoate buisjes, die gericht zijn tegen specifieke epitopen van de molecule van SHBG. De binnenwand van de buisjes zijn met twee vangantilichamen gecoat. SHBG van de kalibratoren of van de monsters wordt door deze antilichamen gevangen. Toevoeging van het derde met ¹²⁵Jood gelabelde antilichaam vervolledigt het systeem, waardoor het mogelijk is een brug te vormen tussen de gecoate antilichamen en het gelabelde antilichaam.

Na het wassen is de resterende radioactiviteit, gebonden aan de buisjes, recht evenredig met de SHBG-concentratie in de kalibratoren of de monsters.

Door de zorgvuldige keuze van de drie monoklonale antilichamen is een hoge specificiteit en een hoge gevoeligheid mogelijk, terwijl een bovenmatige specificiteit – die men soms de immunometrische assays met slechts twee monoklonalen verwijt – wordt vermeden.

3. GELEVERDE MATERIALEN

- De reagentia zijn voldoende voor 100 tests.
- Bewaar de kit en de reagentia bij 2 – 8 °C.
- De houdbaarheidsdatum van elk reagens staat op het etiket vermeld.

1. **Radioactieve tracer:** 1 flacon met 22 ml anti-hSHBG, gelabeld met ¹²⁵I, in een fosfaatbuffer met BSA. Radioactiviteit: ± 275 kBq. Bewaarmiddel: NaN₃ < 0,1%.
2. **Kalibratoren:** 7 flacons met 0,7 ml hSHBG in paardenserum, vooraf verdund. Klaar voor gebruik. Concentraties: 0 – 10 – 25 – 40 – 75 – 125 – 250 nmol/l. Bewaarmiddel: NaN₃ < 0,1%.
3. **Controle:** 1 flacon met 0,7 ml vooraf verdund humaan serum. Klaar voor gebruik. **Raadpleeg de waarden vermeld op het informatieblad van de kwaliteitscontrole voor de exacte waarden.** Bewaarmiddel: NaN₃ < 0,1%.
4. **Gecoate buisjes:** 100 buisjes, gecoat met twee monoklonale antilichamen, gericht tegen hSHBG. Niet-gebruikte buisjes moeten bij 2 – 8 °C en beschermd tegen vocht worden bewaard.

5. **Wasoplossing (50 x geconcentreerd):** 1 flacon met 20 ml TRIS-HCl-buffer met detergens. Bewaarmiddel: NaN₃ < 0,1%. Vul aan tot 1.000 ml met gedestilleerd water. De verdunde wasoplossing blijft gedurende 2 maanden houdbaar bij 2 – 8 °C.
6. **Verduunningsvloeistof:** 1 flacon met 100 ml fosfaatbufferoplossing met BSA. Bewaarmiddel: NaN₃ < 0,1%. Klaar voor gebruik.

4. VEREISTE MAAR NIET GELEVERDE MATERIALEN

- Plastic proefbuisjes.
- Rek voor proefbuisjes.
- Regelbare, automatische micropipetten met wegwerptippen.
- Vortexmenger.
- Maatcilinder.
- Aspiratiepomp of geautomatiseerd wasapparaat.
- Gamma scintillatieteller.
- Gedestilleerd water.
- Rondschudapparaat, instelbaar op 150 toeren per minuut.

5. WAARSCHUWINGEN EN VOORZORGSMAATREGELEN

Om reproduceerbare resultaten te verkrijgen, moeten de volgende regels in acht worden genomen:

- Reagentia van verschillende charges mogen niet worden gemengd.
- Gebruik de reagentia niet langer dan de aangegeven vervaldatum.
- Gebruik glaswerk, dat grondig werd gereinigd is.
- Gebruik gedestilleerd water, dat wordt bewaard in een propere verpakking.
- Vermijd besmettingen bij monsters onderling. Gebruik daarom wegwerptips voor elk monster en reagens.

Om persoonlijke besmetting en besmetting van de omgeving te vermijden, dienen de volgende voorzorgsmaatregelen in acht te worden genomen:

- Gebruik wegwerphandschoenen als u met potentieel infectieus materiaal werkt en als u het assay uitvoert.
- Pipetteer de reagentia niet met de mond.
- Niet roken, eten, drinken of cosmetica aanbrengen tijdens het assay.
- Alle materialen van menselijke oorsprong die voor de bereiding van deze kit worden gebruikt, gaven een negatief resultaat voor HbsAg, anti-HIV en anti-HCV. Aangezien op dit moment geen enkele test de volledige afwezigheid van deze virussen kan garanderen, dienen alle voor dit assay gebruikte monsters en reagentia als potentieel infectieus materiaal te worden beschouwd. Daarom dient het afval naar aanleiding van de test te worden ontsmet en te worden weggegooid in overeenstemming met de vastgelegde veiligheidsprocedures. Ontvlambare wegwerpmaterialen moeten worden verbrand; niet-ontvlambare wegwerpmaterialen moeten gedurende ten minste 1 uur bij 121 °C worden gesteriliseerd in een autoclaaf.
- Aan vloeibaar afval moet natriumhypochloriet met een eindconcentratie van 3% worden toegevoegd. Laat het hypochloriet gedurende ten minste 30 minuten werken. Vloeibaar afval dat een zuur bevat, moet met de desbetreffende hoeveelheid van een base worden geneutraliseerd alvorens te behandelen met natriumhypochloriet.

- Vermijd spatten en aerosolvorming. Indien er werd gemorst, dient er zorgvuldig met een oplossing van 3% natriumhypochloriet te worden gewassen en dient deze reinigingsvloeistof te worden weggegooid als zijnde potentieel infectieus afval.
- Sommige reagentia bevatten natriumazide als conserveermiddel. Om ophoping van explosieve metaalaziden in loden en koperen afvoerleidingen te vermijden, dienen reagentia te worden afgevoerd door de afvoerleidingen ruimschoots met water na te spoelen.
- Aankoop, opslag, gebruik en vernietiging van (vloeibare en vaste) radioactieve materialen zijn onderworpen aan de voorschriften en verordeningen van de lokale autoriteiten.

6. MONSTERNAME

Enkel een serummonster mag worden gebruikt. In hoge mate lipemische of gehemolyseerde monsters moeten worden afgevoerd. Bewaar monsters gedurende 7 dagen bij 2–8 °C. Indien de monsters gedurende langere tijd worden bewaard, verdient het aanbeveling ze in aliquots in te vriezen bij –20 °C. De monsters herhaaldelijk invriezen en ontdooien dient te worden vermeden.

Voorafgaand aan de analyse moeten de monsters 1:51 worden verdund in de SHBG-verdunningsvloeistof. Dat gebeurt als volgt:

20 µl monster + 1 ml SHBG-verdunningsvloeistof

Niet proberen de kalibratoren en het controleserum te verdunnen.

Zij zijn reeds vooraf verdund en zijn klaar voor gebruik.

7. ASSAYPROCEDURE

- Laat alle reagentia en monsters – vóór gebruik – op kamertemperatuur komen.
 - Meng de monsters – vóór gebruik – door ze om te keren.
 - Voor alle kalibratoren wordt een tweede meting aanbevolen.
1. Bereid onbehandelde buisjes voor de totaalstellingen en gecoate buisjes voor de kalibratoren, de monsters en de controle.
 2. Pipetteer 50 µl van de kalibratoren, het controleserum en de vooraf verdunde monsters in het betreffende gecoate buisje. Pipetteer rechtstreeks op de bodem van de buisjes.
 3. Voeg 200 µl radioactieve tracer (met ¹²⁵I gelabeld anti-hSHBG) aan alle buisjes toe. Meng de buisjes voorzichtig op een vortex en incubeer gedurende 90 minuten op een rondschildapparaat, ingesteld op 150 toeren per minuut.
 4. Zuig de inhoud van elk buisje (met uitzondering van de buisjes voor de totaalstellingen) op.
 5. Voeg 2 ml van de verdunde wasoplossing aan elk buisje (met uitzondering van de buisjes voor de totaalstellingen) toe en zuig grondig op of giet de inhoud van alle buisjes over op absorberend papier.
 6. Tel de aan de buisjes gebonden radioactiviteit gedurende 1 minuut in een gammateller. Wij bevelen aan om de achtergrond van het apparaat te controleren alvorens te tellen. Om variaties in de systeemgevoeligheid te voorkomen, moet de achtergrond tot een minimum worden beperkt of op de juiste manier worden aangepast.

SCHEMA VAN DE ASSAY

Buisjes	Totale activiteit	Kalibratoren	Controle	Monsters
Reagens				
Kalibratoren	----	50 µl	----	----
Controle	----	----	50 µl	----
Monsters	----	----	----	50 µl
Tracer	200 µl	200 µl	200 µl	200 µl

- Incubeer: gedurende 90 min. bij kamertemperatuur in een rondschildapparaat (150 toeren per minuut).
- Zuig op en was: 1 x met 2 ml.
- Tel.

8. BEREKENING VAN DE RESULTATEN

Teken de kalibratiecurve op lineair-logaritmisch millimeterpapier door de voor elke kalibrator verkregen B/T (%) (y-as) uit te zetten tegen de relatieve concentratie (x-as). Bereken voor elk monster de B/T (%) en lees door interpolatie de concentratie af op de kalibratiecurve.

VOORBEELD VOOR BEREKENING

De hieronder vermelde waarden moeten als voorbeeld worden beschouwd en mogen niet als experimentele gegevens worden gebruikt.

Beschrijving	Gemiddelde cpm	B/T (%)	SHBG (nmol/l)
Totale activiteit (T)	109800	-	-
CAL 0	140	0,1	0
CAL 1	3572	3,3	10
CAL 2	10255	9,3	25
CAL 3	15037	13,7	40
CAL 4	28925	26,3	75
CAL 5	44924	40,9	125
CAL 6	64577	58,8	250
CONTROL	28855	26,3	74,8
P1	22839	20,8	59,2
P2	45754	41,7	133,0

9. REFERENTIEWAARDEN

Het verdient aanbeveling dat elk laboratorium zijn eigen referentie-interval bepaalt. De hieronder vermelde waarden dienen uitsluitend als richtlijn.

	SHBG (nmol/l) bereik	N
Vrouwen	20 - 85	49
Mannen	9 - 55	50

Kinderen: hoge SHBG-concentratie, die tijdens de pre-puberteit, puberteit en adolescentie daalt tot de concentratie zoals bij een volwassene.

Oudere volwassenen: er is gerapporteerd dat de SHBG-concentratie met de leeftijd toeneemt.

Zwangerschap: tijdens de zwangerschap stijgt de SHBG-concentratie aanzienlijk, tot 200–400 nmol/l tijdens de 3^{de} trimester⁴.

Levercirrose: verhoogd.

De SHBG-concentratie varieert bij verschillende fysiopathologische toestanden:

- SHBG verhoogt door synthetische oestrogenen, afhankelijk van de dosis en het type oestrogeen³.
- Er is gerapporteerd dat SHBG verlaagt door levenorgestrel⁶.

De SHBG-concentratie kan worden gebruikt om de "vrije androgenenindex" (FAI; Free Androgen Index) te berekenen:

$$FAI = \frac{\text{Totaal testosteron (nmol/l)}}{\text{SHBG (nmol/l)}} \times 100$$

De "vrije androgenenindex" is een zeer nuttige parameter om hyperandrogenisme bij vrouwen te beoordelen^{5,11}.

Bovendien kan SHBG worden gebruikt om de spiegel van vrije testosteron en vrije oestradiol te berekenen overeenkomstig de wet van de massawerking¹².

10. EIGENSCHAPPEN VAN DE ASSAY

GEVOELIGHEID

Analytische gevoeligheid

De gevoeligheid werd berekend op basis van de kalibratiecurve en werd uitgedrukt als de minimumdosis die een significant verschil laat zien ten opzichte van de nulkalibrator (gemiddelde waarde + 2 SD). Deze dosis bedraagt 0,26 nmol/l.

Functionele gevoeligheid

De functionele assaygevoeligheid is de laagste waarde die wordt gemeten met een precisie die een variatie van maximaal 20% tussen de tests toelaat. Voor SHBG bedraagt de waarde minder dan 0,3 nmol/l.

PRECISIE

De precisie werd beoordeeld aan de hand van de variabiliteit binnen een test en tussen tests bij verschillende analytconcentraties.

Binnen een test

Serum	Gemiddelde (nmol/l)	±	SD	VC (%)	N
1	15,1	±	0,5	3,3	20
2	44,7	±	1,3	2,9	20
3	151,5	±	7,9	5,2	20

Tussen tests

Serum	Gemiddelde (nmol/l)	±	SD	VC (%)	N
1	15,5	±	0,5	2,9	9
2	45,1	±	2,1	4,6	9
3	163,3	±	9,4	5,8	9

NAUWKEURIGHEID

De nauwkeurigheid van de methode werd beoordeeld door een recovery- en een parallellistmetest.

Recovery-test

Monsters, gemengd met een gelijke hoeveelheid van elke kalibrator, werden getest.

	Verwacht (nmol/l)	Gemeten (nmol/l)	Recovery (%)
M1	-	29,1	-
M1 + CAL 1	19,5	16,9	86,3
M1 + CAL 2	27,0	25,4	93,8
M1 + CAL 3	34,5	32,6	94,3
M1 + CAL 4	52,0	50,4	96,9
M1 + CAL 5	77,0	75,7	98,2
M1 + CAL 6	139,5	126,4	90,6
M2	-	43,7	-
M2 + CAL 1	26,9	23,8	88,6
M2 + CAL 2	34,4	32,4	94,3
M2 + CAL 3	41,9	39,8	95,0
M2 + CAL 4	59,4	55,7	93,9
M2 + CAL 5	84,4	80,2	95,1
M2 + CAL 6	146,9	131,7	89,7

Parallellistmetest

Sera met een hoge analytconcentratie werden bij verschillende verdunningen met de nulkalibrator getest.

Verdunning	Verwacht (nmol/l)	Gemeten (nmol/l)	Recovery (%)
M1 onverdund	-	58,1	-
1/1,5	38,7	38,6	99,7
1/2	29,0	26,2	90,2
1/4	15,5	12,3	85,0
1/8	7,3	6,9	94,6
M2 onverdund	-	88,0	-
1/1,5	58,7	54,4	92,7
1/2	44,0	43,8	99,6
1/4	22,0	17,7	80,5
1/8	11,0	9,2	83,6

"HOOK" EFFECT

Monsters, gespiket met gezuiverd hSHBG tot 1.000 nmol/l, leverden hogere waarden op dan de laatste kalibrator.

Deze bijsluiters kan op www.zentech.be worden gedownload.

POLSKI

TEST RADIOIMMUNOMETRYCZNY DO ILOŚCIOWEGO OZNACZANIA LUDZKIEJ GLOBULINY WIĄZĄCEJ HORMONY PŁCIOWE W LUDZKIEJ SUROWICY KRWI R-CC-100 - 100 oznaczeń

WYŁĄCZNIE DO STOSOWANIA W DIAGNOSTYCE IN VITRO

1. ZASTOSOWANIE KLINICZNE

Ludzka globulina wiążąca hormony płciowe (hSHBG) jest glikoproteiną o ciężarze cząsteczkowym 90000 występującą w krążeniu (najważniejszą rolą SHBG jest funkcja białka przenoszącego dla estrogenów i androgenów w krążeniu obwodowym).

Poziom globuliny wiążącej hormony płciowe zwiększają estrogeny, okres ciąży oraz hormony tarczycy. Poziom SHBG obniżają androgeny (produkcja zewnętrzna lub wewnętrzna) oraz niektóre leki.

Pomiar stężenia SHBG w surowicy stanowi również niezwykle ważny wskaźnik rozwoju chorób nieściśle powiązanych ze steroidami. Poziomy SHBG dobrze koreluje z funkcjonowaniem tarczycy, a wysokie wartości występują w przypadkach zaburzonej funkcji wątroby, np. przy marskości wątroby.

2. ZASADA DZIAŁANIA TESTU

Niniejszy zestaw testowy jest testem immunoradiometrycznym (IRMA) opartym na wykorzystaniu próbek opłaszczonych przeciwciałami monoklonalnymi skierowanymi przeciw różnym epitopom cząsteczki SHBG.

Wewnętrzne ścianki próbek opłaszczonych są dwoma przeciwciałami wychwytyjącymi. SHBG zawarta w kalibratorach lub w próbkach zostaje wychwycona przez te przeciwciała. Dodanie trzeciego przeciwciała znakowanego jodem-125 (125) uzupełnia system, pozwalając na powstanie mostu pomiędzy przeciwciałami opłaszczającymi i przeciwciałem znakowanym.

Po odmyciu, promieniotwórczość, która pozostała w próbkach jest ściśle powiązana ze stężeniem SHBG w kalibratorach lub w próbkach.

Staranny dobór trzech przeciwciał monoklonalnych zapewnia wysoką swoistość i wysoką czułość oraz pozwala uniknąć nadmiernej swoistości, którą czasami zarzuca się testom immunometrycznym wykorzystującym tylko dwa przeciwciała monoklonalne.

3. ODCZYNNIKI DOSTARCZONE W ZESTAWIE

- Ilość odczynników wystarcza na 100 oznaczeń.
- Zestaw i odczynniki przechowywać w temperaturze 2-8°C.
- Data ważności każdego odczynnika podana jest na etykietce.

- Znacznik izotopowy:** 1 fiolka zawierająca 22 ml 125 I anty-hSHBG, w buforze fosforanowym z albuminą surowicy wołowej. Promieniotwórczość: ± 275 kBq/fiolkę. Środek konserwujący: NaN_3 (<0,1%).
- Kalibratory:** 7 fiolek zawierających 0,7 ml hSHBG w surowicy końskiej, wstępnie rozcieńczonej. Gotowe do użycia. Stężenia: 0 - 10 - 25 - 40 - 75 - 125 - 250 nmol/l. Środek konserwujący: NaN_3 (<0,1%).
- Kontrola:** 1 fiolka zawierająca 0,7 ml surowicy ludzkiej wstępnie rozcieńczonej. Gotowe do użycia. **Dokładną wartość należy uzyskać z karty charakterystyki kontroli jakości.** Środek konserwujący: NaN_3 (<0,1%).
- Próbki z warstwą przeciwciał:** 100 próbek opłaszczonych dwoma mysimi przeciwciałami monoklonalnymi skierowanymi przeciw hSHBG. Niewykorzystane próbki należy przechowywać w temperaturze 2-8°C, chronić przed wilgocią.

- 5 - **Roztwór odmywający (50-krotnie stężony):** 1 fiołka z 20 ml bufora Tris-HCl z detergentem i konserwantem NaN_3 (<0.1%). Uzupełnić do 1000 ml wodą destylowaną. Tak rozcieńczony roztwór odmywający jest stabilny przez 2 miesiące przy przechowywaniu w temperaturze 2-8°C.
6. **Rozcieńczalnik:** 1 fiołka zawierająca 100 ml roztworu buforu fosforanowego z albuminą surowicy wołowej. Środek konserwujący: NaN_3 (<0,1%). Gotowe do użycia.

4. MATERIAŁY KONIECZNE A NIEDOSTARCZONE W ZESTAWIE.

- Plastikowe probówki
- Stojaki do probówek.
- Automatyczne mikropipety z jednorazowymi końcówkami.
- Wytrząsarka typu Vortex.
- Mierzurka.
- Myjka lub urządzenie do mycia probówek.
- Licznik scyntylicyjny gamma.
- Woda destylowana.
- Mieszadło z regulacją - 150 obrotów na minutę.

5. OSTRZEŻENIA

Aby otrzymywać powtarzalne wyniki, należy się stosować do następujących zasad:

- Nie mieszać odczynników z różnych partii.
- Nie używać odczynników po upływie terminu ważności.
- Używać dokładnie umytego szkła laboratoryjnego.
- Używać wody destylowanej przechowywanej w czystych pojemnikach.
- Unikać zakażenia próbek, w tym celu należy do każdej próbki i odczynnika używać jednorazowych końcówek.

W celu uniknięcia zakażenia własnego oraz środowiska, należy się stosować do następujących ostrzeżeń:

- Używać jednorazowych rękawiczek podczas pracy z materiałem potencjalnie zakaźnym oraz przy wykonywaniu testu.
- Nie pipetować odczynników ustami.
- Nie palić, nie jeść i nie stosować kosmetyków w trakcie wykonywania testu.
- Wszystkie materiały używane do przygotowania niniejszego testu dały negatywny wynik w testach na obecność HBsAg i przeciwciał anti-HIV oraz anti-HCV. Ponieważ żaden obecnie stosowany test nie może zagwarantować całkowitej nieobecności tych wirusów, wszystkie próbki i odczynniki używane w teście muszą być traktowane jako potencjalnie zakaźne, a zatem odpady po testach muszą być odkażone a ich utylizacja musi przebiegać zgodnie z ustalonymi procedurami bezpieczeństwa. Utylizowany materiał palny musi być spopielony, a niepalny materiał należy wysterylizować w autoklawie przez co najmniej 1 godzinę w temperaturze 121°C. Płynne odpady należy zneutralizować podchlorynem sodu o końcowym stężeniu 3%. Podchloryn powinien działać przez przynajmniej 30 minut. Płynne odpady zawierające kwasy należy zneutralizować odpowiednimi ilościami zasad przed użyciem podchlorynu sodu.
- Unikać rozlewania albo tworzenia aerozoli. W przypadku wylania splukać dokładnie 3% roztworem podchlorynu sodu i utylizować całość jako odpad potencjalnie zakaźny. Niektóre odczynniki zawierają azydek sodu jako środek konserwujący, w celu zapobieżenia gromadzeniu się wybuchowych azydków w przewodach kanalizacyjnych zawierających ołów i miedź. Odczynniki te należy przy wylewaniu splukać dużą ilością wody.
- Nabywanie, przechowywanie, używanie i utylizacja materiałów radioaktywnych (ciekłych i stałych) podlega właściwym przepisom i zaleceniom miejscowych władz.

6. POBIERANIE PRÓBEK

Użyta może zostać jedynie próbka surowicy. Próbki z lipemią albo hemolizą należy odrzucić. Próbki przechowywać w temperaturze 2-8°C przez 7 dni, na dłuższy okres zaleca się zamrażać próbki w -20°C. Należy unikać powtórnego zamrażania rozmrożonych próbek. Przed wykonaniem analizy, próbki należy rozcieńczyć 1/51 w rozcieńczalniku SHBG w następujący sposób:

Próbka 20 μl + Rozcieńczalnik SHBG 1 ml

Nie próbować rozcieńczać kalibratorów ani surowicy kontrolnej.

Są one już wstępnie rozcieńczone i gotowe do użycia.

7. PROCEDURY TESTU

- Doprowadzić wszystkie odczynniki i próbki do temperatury pokojowej.
- Przed użyciem zmieszać próbki przez delikatne wstrząsanie.
- Dla wszystkich kalibratorów zaleca się dwukrotne wykonanie pomiaru.

1. Przygotować zwykłe probówki do zliczeń całkowitych oraz probówki z warstwą przeciwciał do kalibratorów, próbek badanych i kontroli.
2. Pobrać pipetą 50 μl kalibratorów, surowicy kontrolnej oraz rozcieńczonych wstępnie próbek do odpowiednich opłaszczonych probówek. Pipetować bezpośrednio na dno probówek.
3. Dodać po 200 μl znacznika izotopowego do wszystkich probówek. Delikatnie wymieszać probówki na wytrząsarce typu vortex. Inkubować przez 90 minut w temperaturze pokojowej, wytrząsając na mieszadle orbitalnym przy 150 obrotach na minutę.
4. Pobrać zawartość każdej probówki, za wyjątkiem probówek do zliczeń całkowitych.
5. Dodać po 2 ml rozcieńczonego roztworu do odmywania do każdej probówki, za wyjątkiem probówek do zliczeń całkowitych i dokładnie usunąć albo zlać zawartość wszystkich probówek na papier chłonny.
6. Zliczyć radioaktywność dla poszczególnych próbek przez 1 minutę w liczniku gamma. Doradza się sprawdzić poziom tła instrumentu przed zliczaniem testu. Aby uniknąć zmienności czułości systemu, tło należy zredukować do minimum albo brać pod uwagę w obliczeniach.

SCHEMAT TESTU

Probówki	Aktywność całkowita	Kalibratory	Kontrole	Próbki
Odczynnik				
Kalibratory	----	50 μl	----	----
Kontrola	----	----	50 μl	----
Próbki	----	----	----	50 μl
Znacznik	200 μl	200 μl	200 μl	200 μl

- Inkubować przez 90 minut w temp. pokojowej, wytrząsając (150 obrotów na minutę)
- Pobrać i przemyć: 1 x 2 ml
- Wykonać zliczenie

8. OBLICZENIE WYNIKÓW

Wykreślić krzywą kalibracyjną na wykresie log/logit poprzez wykreślenie procenta B/T uzyskanego dla każdego kalibratora (oś y) wobec względnego stężenia (oś x). Obliczyć B/T (%) dla każdej próbki, po czym odczytać stężenie poprzez interpolację na krzywej wzorcowej.

PRZYKŁAD OBLICZENIA

Wartości podane poniżej należy traktować jako przykładowe i nie należy ich podstawiać zamiast danych eksperymentalnych.

Opis	Średnia ilość zliczeń	B/T (%)	Stęż. SHBG (nmol/l)
Aktywność całkowita (T)	109800	-	-
CAL 0	140	0,1	0
CAL 1	3572	3,3	10
CAL 2	10255	9,3	25
CAL 3	15037	13,7	40
CAL 4	28925	26,3	75
CAL 5	44924	40,9	125
CAL 6	64577	58,8	250
Kontrola	28855	26,3	74,8
P1	22839	20,8	59,2
P2	45754	41,7	133,0

9. WARTOŚCI REFERENCYJNE

Zaleca się aby każde laboratorium określiło własny przedział referencyjny. Wartości podane poniżej są wyłącznie orientacyjne.

	SHBG (nmol/l) zakres	N
Kobiety	20 - 85	49
Mężczyźni	9 - 55	50

Dzieci: wysokie stężenie SHBG malejące w okresie przed dojrzewaniem, w okresie dojrzewania oraz w wieku młodocianym do poziomów typowych dla dorosłych.

Osoby starsze: zaobserwowano wzrost poziomu SHBG wraz z wiekiem osoby dorosłej.

Ciąża: podczas ciąży poziom SHBG znacznie wzrasta, aż do 200 – 400 nmol/l w trzecim trymestrze⁴.

Marskość wątroby: poziom zwiększony

Poziom SHBG jest różny dla różnych stanów fizjopatologicznych:

- Poziom SHBG zwiększają estrogeny syntetyczne w zależności od dawki oraz rodzaju estrogenu⁹.
- Zaobserwowano, że lewonorgestrel⁶ obniża poziom SHBG.

Stężenie SHBG może zostać użyte do obliczenia wskaźnika wolnych androgenów⁴ *Free Androgen Index* (FAI)³:

$$FAI = \frac{\text{Testosteron całkowity (nmol/l)}}{\text{SHBG (nmol/l)}} \times 100$$

wskaźnik wolnych androgenów jest parametrem bardzo przydatnym przy ocenie hiperandrogenizmu u kobiet^{5,11}.

Wartości SHBG mogą zostać również użyte do obliczania stężeń wolnego testosteronu oraz wolnego estradiolu, zgodnie z prawem działania mas¹².

10. CHARAKTERYSTYKA TESTU

CZUŁOŚĆ

Czułość analityczna

Czułość obliczono na podstawie krzywej kalibracyjnej i wyrażono w postaci minimalnej dawki dającej istotną różnicę od kalibratora zero (wartość średnia + 2 S.D.). Dawka ta wynosi 0, 26 nmol/l.

Czułość funkcjonalna

Czułość funkcjonalna testu to najniższy poziom który jest mierzony z 20% precyzją zmienności wewnątrztestowej. Dla SHBG, wartość ta jest niższa niż 0,3 nmol/l.

PRECYZJA

Precyzja została wyznaczona ze zmienności wewnątrz- i zmienności międzytestowej przy różnych stężeniach analizowanej substancji.

Wewnątrztestowa

Surowica	Średnia ± (nmol/l)	S.D.	C.V. (%)	N
1	15,1 ±	0,5	3,3	20
2	44,7 ±	1,3	2,9	20
3	151,5 ±	7,9	5,2	20

Międzytestowa

Surowica	Średnia ± (nmol/l)	S.D.	C.V. (%)	N
1	15,5 ±	0,5	2,9	9
2	45,1 ±	2,1	4,6	9
3	163,3 ±	9,4	5,8	9

DOKŁADNOŚĆ

Dokładność metody została sprawdzona przy pomocy testu odzyskania i równoległości.

Test Odzyskania: Testowano próbki zmieszane z równymi objętościami każdego punktu kalibracyjnego.

	Oczekiwana (nmol/l)	Mierzona (nmol/l)	Odzyskania (%)
S1	-	29,1	-
S1 + CAL 1	19,5	16,9	86,3
S1 + CAL 2	27,0	25,4	93,8
S1 + CAL 3	34,5	32,6	94,3
S1 + CAL 4	52,0	50,4	96,9
S1 + CAL 5	77,0	75,7	98,2
S1 + CAL 6	139,5	126,4	90,6
S2	-	43,7	-
S2 + CAL 1	26,9	23,8	88,6
S2 + CAL 2	34,4	32,4	94,3
S2 + CAL 3	41,9	39,8	95,0
S2 + CAL 4	59,4	55,7	93,9
S2 + CAL 5	84,4	80,2	95,1
S2 + CAL 6	146,9	131,7	89,7

Test równoległości: Testowano próbki o wysokim stężeniu substancji analizowanej przy różnych rozcieńczeniach kalibratorem zero.

Rozcieńczenie	Oczekiwana (nmol/l)	Mierzona (nmol/l)	Odzyskania (%)
S1 undiluted	-	58,1	-
1/1.5	38,7	38,6	99,7
1/2	29,0	26,2	90,2
1/4	15,5	12,3	85,0
1/8	7,3	6,9	94,6
S2 undiluted	-	88,0	-
1/1.5	58,7	54,4	92,7
1/2	44,0	43,8	99,6
1/4	22,0	17,7	80,5
1/8	11,0	9,2	83,6

EFEKT WYSOKICH DAWEK (HOOK-EFFECT)

Próbki o stężeniu oczyszczonej hSHBG do 1,000 nmol/l dają odczyt powyżej wartości ostatniego kalibratora.

Niniejszą instrukcję można pobrać ze strony www.zentech.be

PORTUGES

ENSAIO IMUNORADIOMÉTRICO PARA DETERMINAÇÃO QUANTITATIVA DA GLOBULINA TRANSPORTADORA DE HORMONIO SEXUAL NO SORO HUMANO.

R-CC-100 - 100 Determinações

SOMENTE PARA USO DE DIAGNÓSTICO IN VITRO

1. APLICAÇÕES CLÍNICAS

A Globulina transportadora de hormônio sexual (hSHBG) é uma glicoproteína circulante com um peso molecular de aproximadamente 90000 (o papel mais importante de SHBG é como uma proteína de transporte para estrogênios e androgênios na circulação periférica). O nível de globulina transportadora de hormônio sexual é aumentado por estrogênios, durante a gravidez e por hormônios da tireóide. O nível de SHBG é diminuído por androgênios (produção externa ou interna) e por algumas drogas. A medida de SHBG no soro é também um índice muito importante para a evolução de doenças não estritamente relacionadas aos esteróides. Os níveis de SHBG correlacionam bem com a função da tireóide e os valores elevados são encontrados nos casos da função do fígado reduzida como na cirrose.

2. PRINCÍPIO DO ENSAIO

Este kit é um ensaio imunoradiométrico (IRMA) baseado em tubos adsorvidos com anticorpos monoclonais direcionados aos epítomos distintos da molécula de SHBG.

Dois anticorpos de captura são adsorvidos na parede interna dos tubos. SHBG dos calibradores ou das amostras é capturado por estes anticorpos. A adição do terceiro anticorpo marcado com ¹²⁵Iodo completa o sistema, permitindo a formação de uma ponte entre os anticorpos adsorvidos e os anticorpos marcados.

Após a lavagem, a radioatividade restante ligada aos tubos é diretamente relacionada à concentração de SHBG nos calibradores ou nas amostras.

A escolha cuidadosa dos três anticorpos monoclonais permite alta especificidade e sensibilidade e evita o excesso de especificidade que às vezes é reprovado para os ensaios imunométricos usando somente dois monoclonais.

3. MATERIAL FORNECIDO

- Os reagentes são suficientes para 100 determinações.
- Armazene o kit e os reagentes entre 2-8°C.
- A data de validade de cada reagente é mostrada na etiqueta.

1. **Marcador Radioativo:** 1 frasco de 22 ml de anti-hSHBG marcado com ¹²⁵I, em tampão fosfato contendo BSA. Radioatividade: ± 275 kBq. Preservativos: NaN₃ < 0,1%.
2. **Calibradores:** 7 frascos que contêm 0,7 ml de hSHBG em soro equino, pre-diluído. Pronto para uso Concentrações: 0 - 10 - 25 - 40 - 75 - 125 - 250 nmol/l. Preservativo: NaN₃ < 0,1%. 3.
3. **Controle:** 1 frasco que contêm 0,7 ml de soro humano pré-diluído. Pronto para uso. Para os valores exatos, consulte aos valores indicados na folha de dados do controle da qualidade. Preservativo: NaN₃ < 0,1%.
4. **Tubos Adsorvidos:** 100 tubos adsorvidos com os dois anticorpos monoclonais produzidos em camundongo direcionados contra hSHBG. Os tubos não utilizados devem ser armazenados entre 2-8°C, protegidos da umidade.
5. **Solução de lavagem (50 x concentrada):** 1 frasco de 20 ml de tampão TRIS-HCl com detergente. Preservativo: NaN₃ < 0,1%. Complete o volume para 1000ml com água destilada. A solução de lavagem diluída é estável por 2 meses entre 2-8°C.
6. **Diluyente:** 1 frasco de 100 ml que contém a solução de tampão fosfato com BSA. Preservativo: NaN₃ < 0,1%. Pronto para uso.

4. MATERIAL REQUERIDO MAS NÃO FORNECIDO

- tubos de teste plásticos
- estantes para tubos
- micropipetas ajustáveis, automáticas com ponteiros descartáveis.
- vortex.
- cilindro graduado.
- bomba de aspiração ou dispositivo de lavagem automatizado.
- cintilador
- água destilada.
- Agitador orbital ajustável para 150 rpm

5. AVISOS E PRECAUÇÕES

A fim de obter resultados reproduzíveis, as seguintes regras devem ser observadas:

- não misture reagentes de lotes diferentes.
- não use reagentes depois de expirado o prazo de validade
- utilize vidraria completamente limpa.
- Utilize água destilada, armazenada em recipientes limpos.
- Evite qualquer contaminação entre amostras; para isto, ponteiros descartáveis devem ser usadas para cada amostra e reagente.

A fim evitar contaminação pessoal e ambiental, as seguintes precauções devem ser observadas:

- use luvas descartáveis ao manusear material potencialmente infectado e ao executar o ensaio.
- não pipete reagentes com a boca.
- não fume, não coma, não beba e não aplique cosmético durante o ensaio
- Todos os materiais de origem humana usados para a preparação deste kit foram negativos para HBsAg, anti-Anti-HIV e anti-HCV. Até o presente momento não existe nenhum teste que possa garantir a ausência completa destes vírus, portanto, todas as amostras e reagentes usados no ensaio devem ser considerados potencial infectados; conseqüentemente, os resíduos do ensaio devem ser descontaminados e descartados, de acordo com procedimentos de segurança estabelecidos. O material inflamável descartável deve ser incinerado; o material não inflamável descartável deve ser esterilizado em autoclave por pelo menos 1 hora a 121°C.
- os descartes líquidos devem ser colocados em solução de hipoclorito de sódio com uma concentração final de 3% . Deixar o hipoclorito agir por pelo menos 30 minutos. Os descartes líquidos que contêm ácidos devem ser neutralizados com quantidades apropriadas de base antes do tratamento com o hipoclorito de sódio.
- evite espirros e formação de aerossóis; em caso de derramamento, lave cuidadosamente com solução de hipoclorito de sódio a 3% e descarte este líquido como resíduo potencialmente contaminado.
- alguns reagentes contêm azida sódica como o preservativo; para prevenir a deposição de metais azidas explosivos nos encanamentos de chumbo e cobre, os reagentes devem ser descartados utilizando-se grandes quantidades de água.
- a aquisição, o armazenamento, o uso e a eliminação do material radioativo (líquido e sólido) estão sujeitos aos regulamentos e ordens das autoridades locais.

6. COLETA DA AMOSTRA

Somente amostras de soro devem ser usadas. Amostras altamente lipêmicas ou hemolizadas devem ser rejeitadas. Mantenha as amostras entre 2-8°C por 7 dias; para períodos mais longos é aconselhável congelar as alíquotas a -20°C. Evitar congelar e descongelar as amostras.

Antes da análise, as amostras devem ser diluídas 1/51 em SHBG diluente como a seguir:

Amostra **20µl + 1 ml** do diluente SHBG

Não tente diluir os calibradores e os soros controle. Eles são pré-diluídos e prontos para uso.

7. PROCEDIMENTO DO ENSAIO

- Coloque todos os reagentes e amostras à temperatura ambiente antes do uso.
 - Antes do uso, misture as amostras por inversão.
 - Para todos os calibradores, uma medida em duplicata é recomendado.
1. Prepare os tubos lisos para contagens totais, e os tubos adsorvidos para calibradores, amostras e controle.
 2. Pipete **50µl** dos calibradores, do soro controle e das amostras pré-diluídas nos tubos apropriados. Introduza com a pipeta diretamente no fundo dos tubos.
 3. Adicione **200 µl** do marcador radioativo (anti-hSHBG marcado com ¹²⁵I) em todos os tubos. Misture gentilmente os tubos no vortex e incube por 90 minutos em um agitador orbital ajustado para 150 rpm
 4. Aspire os conteúdos de cada tubo, exceto os tubos para contagens totais.
 5. Adicione **2 ml** da solução de lavagem diluída em cada tubo, exceto nos tubos para contagens totais e aspire completamente ou decante o conteúdo de todos os tubos no papel absorvente.
 6. Conte a radioatividade limitando 1 minuto por tubo em um cintilador. Nós sugerimos controlar o "background" do instrumento antes de contar o ensaio. A fim evitar variações na sensibilidade do sistema, o "background" deve ser reduzido a um mínimo ou ser ajustado corretamente.

ESQUEMA DO ENSAIO

Tubos	Atividade Total	Calibradores	Controle	Amostras
Reagentes				
Calibradores	----	50 µl	----	----
Controle	----	----	50 µl	----
Amostras	----	----	----	50 µl
Marcador	200 µl	200 µl	200 µl	200 µl

- Incubar 90 min T.A. sob agitação (150 rpm)
- Aspirar e lavar: 1 x 2 ml
- Contar

8. CÁLCULO DOS RESULTADOS

Desenhe a curva de calibração no gráfico tipo log/lin traçando o B/T (%) obtido para cada calibrador (eixo y) contra a concentração relativa (eixo x). Calcule o B/T (%) de cada amostra e leia a concentração interpolando na curva de calibração.

EXEMPLO DO CÁLCULO

Os valores relatados abaixo devem ser considerados como um exemplo e não podem ser usados no lugar dos dados experimentais

Descrição	Média cpm.	B/T (%)	SHBG (nmol/l)
Atividade Total (T)	109800	-	-
CAL 0	140	0,1	0
CAL 1	3572	3,3	10
CAL 2	10255	9,3	25
CAL 3	15037	13,7	40
CAL 4	28925	26,3	75
CAL 5	44924	40,9	125
CAL 6	64577	58,8	250
CONTROL	28855	26,3	74,8
P1	22839	20,8	59,2
P2	45754	41,7	133,0

9. VALORES DE REFERÊNCIA

É recomendado que cada laboratório determine seu próprio intervalo de referência. Valores relatados abaixo são apenas indicativos.

	SHBG (nmol/l) Intervalo	N
Mulheres	20 - 85	49
Homens	9 - 55	50

Crianças: a concentração elevada de SHBG decresce nos períodos pré-puberdade, puberdade e adolescência até os níveis de adultos.

Idosos: o nível de SHBG aumenta com o avanço da idade.

Gravidez: durante a gravidez, o nível de SHBG aumenta consideravelmente, até 200- 400 nmol/l durante o terceiro trimestre

Cirrose do fígado: aumentado

O nível de SHBG varia em vários estados fisiopatológicos

- SHBG é aumentado por estrogênios sintéticos dependendo da dose e do tipo de estrogênio³.
- SHBG é diminuído por levonorgestrel⁶.

A concentração de SHBG pode ser usada para calcular o índice de androgênio livre (FAI):

$$\text{FAI} = \frac{\text{Testosterona total (nmol/l)} \times 100}{\text{SHBG (nmol/l)}}$$

O Índice de Androgênio Livre é um parâmetro útil para avaliar o hiperandrogenismo em mulheres^{5,11}.

SHBG pode também ser usado para calcular a Testosterona Livre e concentrações livres de estradiol de acordo com a ação maciça¹².

10. DESEMPENHO DO ENSAIO

SENSIBILIDADE

Sensibilidade analítica

A sensibilidade foi calculada baseada na curva de calibração e expressada como a dose mínima que mostra uma diferença significativa do calibrador zero (valor médio + 2 S.D.). Esta dose é de 0,26 nmol/l.

Sensibilidade Funcional

O ensaio de sensibilidade funcional é o valor mais baixo que é medido com uma precisão da variação dentro do ensaio de no máximo 20%. Para o SHBG, este valor é menor que 0,3 nmol/l.

PRECISÃO

A precisão foi avaliada em cima da variabilidade no ensaio e entre ensaios, em diferentes concentrações.

No ensaio

Soro	Média ± (nmol/l)	S.D.	C.V. (%)	N
1	15,1 ±	0,5	3,3	20
2	44,7 ±	1,3	2,9	20
3	151,5 ±	7,9	5,2	20

Entre Ensaios

Soro	Média ± (nmol/l)	S.D.	C.V. (%)	N
1	15,5 ±	0,5	2,9	9
2	45,1 ±	2,1	4,6	9
3	163,3 ±	9,4	5,8	9

ACURÁCIA

A exatidão do método foi avaliada por testes de recuperação e de paralelismo.

Teste de Recuperação

As amostras do teste de recuperação, misturadas com volumes iguais de cada calibrador foram testadas

	Esperado (nmol/l)	Mensurado (nmol/l)	Recuperação (%)
A1	-	29,1	-
A1 + CAL 1	19,5	16,9	86,3
A1 + CAL 2	27,0	25,4	93,8
A1 + CAL 3	34,5	32,6	94,3
A1 + CAL 4	52,0	50,4	96,9
A1 + CAL 5	77,0	75,7	98,2
A1 + CAL 6	139,5	126,4	90,6
A2	-	43,7	-
A2 + CAL 1	26,9	23,8	88,6
A2 + CAL 2	34,4	32,4	94,3
A2 + CAL 3	41,9	39,8	95,0
A2 + CAL 4	59,4	55,7	93,9
A2 + CAL 5	84,4	80,2	95,1
A2 + CAL 6	146,9	131,7	89,7

Teste Paralelismo

Soros com alta concentração foram testados em diferentes diluições com o calibrador Zero

Diluição	Esperado (nmol/l)	Mensurado (nmol/l)	Recuperação (%)
A1 sem diluir	-	58,1	-
1/1.5	38,7	38,6	99,7
1/2	29,0	26,2	90,2
1/4	15,5	12,3	85,0
1/8	7,3	6,9	94,6
A2 sem diluir	-	88,0	-
1/1.5	58,7	54,4	92,7
1/2	44,0	43,8	99,6
1/4	22,0	17,7	80,5
1/8	11,0	9,2	83,6

EFEITO GANCHO

As amostras diluídas de hSHBG purificados até 1.000 nmol/l deram valores mais altos do que o último calibrador

Esta bula está disponível para download no site www.zentech.be

11. BIBLIOGRAPHIE – BIBLIOGRAPHY – BIBLIOΓΡΑΦΙΑ – BIBLIOGRAFIE – BIBLIOGRAFIA - BIBLIOGRAFIA – BIBLIOGRAFÍA

1. Hammond G. L. Molecular Properties of Corticosteroid Binding Globulin and the Sex-Steroid Binding Proteins. *Endocrine Review*, 1990, **11**(1), 65-79.
2. Mendel C. M. Rates of dissociation of sex steroid hormones from human sex hormone-binding globulin: a reassessment. *J. Steroid Biochem. Molec. Biol.*, 1990, **37**(2), 251-255.
3. Murphy A. A., Cropp C. S., Smith B. S., Burkman R. T., Zaccur H. A. Effect of low-dose oral contraceptive on gonadotropins, androgens, and sex hormone binding globulin in nonhirsute women. *Fertility and Sterility*, 1990, **53**(1), 35-39.
4. Cheng C. Y., Bardin C. W., Musto N. A., Gunsalus G. L., Cheng S. L., Ganguly M. Radioimmunoassay of Testosterone-Estradiol-Binding Globulin in Humans: A Reassessment of Normal Values. *J. Clin. Endocr. & Metab.*, 1983, **56**(1), 68-75.
5. Wilke T. J., Utley D. J. Total Testosterone, Free-Androgen Index, Calculated Free Testosterone, and Free Testosterone by Analog RIA Compared in Hirsute Women and in Otherwise-Normal Women with Altered Binding of Sex-Hormone-Binding Globulin. *Clin. Chem.*, 1987, **33**(8), 1372-1375.
6. Farish E., Hart D. M., Gray C. E., Beastall G., Fletcher C. D., Lindsay R. Effects of treatment with Estradiol/Levonorgestrel on bone, lipoproteins and hormone status in postmenopausal women. *Clin. Endocr.*, 1989, **31**, 607-615.
7. Nestler J. E., Powers L. P., Matt D. W., Steingold K. A., Plymate S. R., Rittmaster R. S., Clore J. N., Blackard W. G. A Direct Effect of Hyperinsulinemia on Serum Sex Hormone-Binding Globulin Levels in Obese Women with the Polycystic Ovary Syndrome. *J. Clin. Endocr. & Metab.*, 1991, **72**(1), 83-89.
8. Sarne D. H., Refetoff S., Rosenfield R. L., Farriaux J. P. Sex Hormone-Binding Globulin in the Diagnosis of Peripheral Tissue Resistance to Thyroid Hormone: The Value of Changes after Short Term Triiodothyronine Administration. *J. Clin. Endocr. & Metab.*, 1988, **66**(4), 740-746.
9. Faber J., Perrild H., Johansen J. S. Bone Gla Protein and Sex Hormone-Binding Globulin in Nontoxic Goiter: Parameters for Metabolic Status at the Tissue Level. *Clin. Endocr. & Metab.*, 1990, **70**(1), 49-55.
10. Beck-Peccoz P., Roncoroni R., Mariotti S., Medri G., Marcocci C., Brabant G., Forloni F., Pinchera A., Faglia G. Sex Hormone-Binding Globulin Measurement in Patients with Inappropriate Secretion of Thyrotropin (IST): Evidence against Selective Pituitary Thyroid Hormone Resistance in Nonneoplastic. *J. Clin. Endocr. & Metab.*, 1990, **71**(1), 19-25.
11. See Y. P., Ruse J. L., Wright L. Correlation between Testosterone Not Bound to Sex-Hormone-Binding Globulin (SHBG) and the Testosterone/SHBG Ratio. *Clin. Chem.*, 1988, **34**(10), 2163.
12. Södergård R., Bäckström T., Shanbhag V., Cartensen H. Calculation of free and bound fractions of testosterone and Estradiol-17 β to human plasma proteins at body temperature. *J. Steroid Biochem.*, 1982, **16**, 801-810

Physikalisches Daten of ¹²⁵I
Physical characteristics of ¹²⁵I
Características físicas ¹²⁵I
φυσικά χαρακτηριστικά του ¹²⁵I
Caractéristiques physique de ¹²⁵I
Fysieke kenmerken van ¹²⁵I
Charakterystyka fizyczna I-¹²⁵
Características físicas ¹²⁵I
Физични характеристики на ¹²⁵I

$t_{1/2}$ = 59.9 Tagen, days, dias, ημέρες, jours, dagen, dni, días, дена

Wichtigste Emissionen
Main emissions
Emissiones principales
κύριες εκπομπές
Emissions principales
Hoofduitzendingen
Główne rodzaje promieniowania
Emissões principais
Основни лъчения

	E (MeV)	%
γ	0,035	
X	0,027	114
	0,032	25

