



IVD

CE

SHBG-ELISA

KAPD2996



DIAsource ImmunoAssays S.A. - Rue du Bosquet, 2 - B-1348 Louvain-la-Neuve - Belgium

Version: 230710

History

Summary of change :

Previous Version :	Current Version :
200224-1	230710
Old DiaSource logo	New DiaSource logo on the front page



SHBG ELISA

en

KAPD2996

IN VITRO DIAGNOSTIC USE

DIAsource ImmunoAssays SA - Rue du Bosquet 2, B-1348 Louvain-la-Neuve, Belgium-Tel: +32 10 84 99 11 - Fax : +32 10 84 99 90

1 INTRODUCTION

1.1 Intended Use

The DIAsource SHBG ELISA is an enzyme immunoassay for the quantitative *in vitro diagnostic* measurement of the sex-hormone-binding globulin (SHBG) in serum or plasma (EDTA-, heparin- or citrate plasma).

This product is intended for professional *in vitro diagnostic* use only.

1.2 Summary and Explanation

Sex-hormone-binding globulin (SHBG), a homodimeric glycoprotein of 95 kD, is synthesized in the liver and has a half-values time of 7 days in plasma. SHBG specifically binds steroid hormones with high affinity (DHT > testosterone > estrone/estradiol > DHEA/androstenedione/ estriol), and its main function is sex-steroid transport within the blood stream and to extravascular target tissues. SHBG also plays a key role in regulating bioavailable sex-steroid concentrations through competition of sex steroids for available binding sites and fluctuations in SHBG concentrations. SHBG concentration in blood shows high inter-individual variability and is influenced by androgen/estrogen balance, nutritional status, body mass index, sex, insulin concentration among others. SHBG levels in pre-pubertal children are higher than in adults. Men have lower levels compared to women.

SHBG levels are increased in older men, during pregnancy, hormone replacement therapy, liver cirrhosis, hyperthyroidism, hypogonadism, androgenization in women, and after intake of contraceptives or anti-epileptics. SHBG levels are decreased in obesity, polycystic ovary syndrome (PCOS), Cushing Syndrome, hypothyroidism and after glucocorticoid therapy.

In postmenopausal women, SHBG may also predict the future development of type 2 diabetes mellitus. Moreover, the free testosterone index (FTI) can help to identify women with androgenization (FTI (%) = (total testosterone / SHBG) × 100).

2 PRINCIPLE OF TEST

The DIAsource SHBG ELISA is a solid phase enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) based on the sandwich principle.

The microtiter wells are coated with a monoclonal (mouse) antibody directed towards a unique antigenic site of the SHBG molecule. An aliquot of patient sample containing endogenous SHBG is incubated in the coated well with enzyme conjugate, which is an anti-SHBG antibody conjugated with horseradish peroxidase. After incubation the unbound conjugate is washed off.

The amount of bound peroxidase conjugate is proportional to the concentration of SHBG in the sample.

Having added the substrate solution, the intensity of colour developed is proportional to the concentration of SHBG in the patient sample.

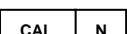
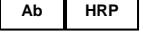
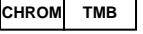
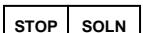
3 WARNINGS AND PRECAUTIONS

1. This kit is for *in vitro diagnostic* use only. For professional use only.
2. All reagents of this test kit which contain human serum or plasma have been tested and confirmed negative for HIV I/II, HBsAg and HCV by FDA approved procedures. All reagents, however, should be treated as potential biohazards in use and for disposal.
3. Before starting the assay, read the instructions completely and carefully. Use the valid version of the instructions for use provided with the kit. Be sure that everything is understood.
4. The microplate contains snap-off strips. Unused wells must be stored at 2 °C to 8 °C in the sealed foil pouch and used in the frame provided.
5. Pipetting of samples and reagents must be done as quickly as possible and in the same sequence for each step.
6. Use reservoirs only for single reagents. This especially applies to the substrate reservoirs. Using a reservoir for dispensing a substrate solution that had previously been used for the conjugate solution may turn solution colored. Do not pour reagents back into vials as reagent contamination may occur.
7. Mix the contents of the microplate wells thoroughly to ensure good test results. Do not reuse microwells.
8. Do not let wells dry during assay; add reagents immediately after completing the rinsing steps.
9. Allow the reagents to reach room temperature (18-25°C) before starting the test. Temperature will affect the absorbance readings of the assay. However, values for the patient samples will not be affected.
10. Never pipet by mouth and avoid contact of reagents and specimens with skin and mucous membranes.
11. Do not smoke, eat, drink or apply cosmetics in areas where specimens or kit reagents are handled.
12. Wear disposable latex gloves when handling specimens and reagents. Microbial contamination of reagents or specimens may give false results.
13. Handling should be done in accordance with the procedures defined by an appropriate national biohazard safety guideline or regulation.
14. Do not use reagents beyond expiry date as shown on the kit labels.
15. All indicated volumes have to be performed according to the protocol. Optimal test results are only obtained when using calibrated pipettes and microtiterplate readers.
16. Do not mix or use components from kits with different lot numbers. It is advised not to exchange wells of different plates even of the same lot. The kits may have been shipped or stored under different conditions and the binding characteristics of the plates may result slightly different.
17. Avoid contact with *Stop Solution* containing 0.5 M H₂SO₄. It may cause skin irritation and burns.
18. Some reagents contain Proclin 300, BND and/or MIT as preservatives. In case of contact with eyes or skin, flush immediately with water.

19. TMB substrate has an irritant effect on skin and mucosa. In case of possible contact, wash eyes with an abundant volume of water and skin with soap and abundant water. Wash contaminated objects before reusing them. If inhaled, take the person to open air.
20. Chemicals and prepared or used reagents have to be treated as hazardous waste according to the national biohazard safety guideline or regulation.
21. For information on hazardous substances included in the kit please refer to Material Safety Data Sheets. Material Safety Data Sheets for this product are available upon request directly from DIAsource.

4 REAGENTS

4.1 Reagents provided

1.  **Microplates.** 12 x 8 (break apart) strips, 96 wells : wells coated with anti-SHBG antibody (monoclonal).
2.  **Assay Buffer**, 1 vial, 125 mL. Ready to use.
Contains preservative.
3.  **SHBG Calibrators**. N= 0 to 6
7 vials, 0.5 mL each, ready to use
Concentrations : 0 – 4 – 16 – 32 - 65 – 130 – 260 nmol/L
The calibrators are calibrated against the following reference material: WHO International Standard for Sex Hormone Binding Globulin (08/226).
Contain preservative.
4.  **Controls**, N=2, 2 vials, 0.5 mL, ready to use.
For control values and ranges please refer to vial label or QC-Datasheet.
Contain preservative.
5.  **Enzyme Conjugate**, 1 vial, 14 mL, ready to use.
Anti-SHBG antibody conjugated with horseradish peroxidase.
Contains preservative.
6.  **Wash Solution**, 1 vial, 30 mL (40x concentrated).
See „Reagent Preparation“.
7.  **TMB Substrate Solution**, 1 vial, 14 mL, ready to use.
Tetramethylbenzidine (TMB).
8.  **Stop Solution**, 1 vial, 14 mL, ready to use.
Contains 0.5 M H₂SO₄.
Avoid contact with the stop solution. It may cause skin irritations and burns.

4.2 Materials required but not provided

- A microtiter plate calibrated reader (450 +/- 10 nm) (e.g. the DIAsource Elisa Plate Reader)
- Calibrated variable precision micropipettes
- Absorbent paper
- Distilled or deionized water
- Tubes for dilution of standards, controls and samples
- Timer
- Semi logarithmic graph paper or software for data reduction

4.3 Storage Conditions

When stored at 2 °C- 8 °C unopened reagents will retain reactivity until expiration date. Do not use reagents beyond this date. Opened reagents must be stored at 2 °C - 8 °C. Microtiter wells must be stored at 2 °C - 8 °C. Once the foil bag has been opened, care should be taken to close it tightly again. Opened kits retain activity for 2 months if stored as described above.

4.4 Reagent Conditions

Bring all reagents and required number of strips to room temperature prior to use.

Wash Solution

Add deionized water to the 40X concentrated Wash Solution.
Dilute 30 mL of concentrated *Wash Solution* with 1170 mL deionized water to a final volume of 1200 mL.
The diluted Wash Solution is stable for 2 weeks at room temperature.

4.5 Disposal of the kit

The disposal of the kit must be made according to the national regulations. Special information for this product is given in the Material Safety Data Sheet.

4.6 Damaged Test Kits

In case of any severe damage to the test kit or components, DIAsource has to be informed in writing, at the latest, one week after receiving the kit. Severely damaged single components should not be used for a test run. They have to be stored until a final solution has been found. After this, they should be disposed according to the official regulations.

5 SPECIMEN COLLECTION AND PREPARATION

Serum or plasma (EDTA-, heparin-, or citrate plasma) can be used in this assay.

EDTA-plasma may give slightly lower results.

Please note: Samples containing sodium azide should not be used in the assay.

5.1 Specimen Collection

Serum:

Collect blood by venipuncture (e.g. Sarstedt Monovette for serum), allow to clot, and separate serum by centrifugation at room temperature. Do not centrifuge before complete clotting has occurred. Patients receiving anticoagulant therapy may require increased clotting time.

Plasma:

Whole blood should be collected into centrifuge tubes containing anti coagulant and centrifuged immediately after collection.

(E.g. for Heparin plasma Sarstedt Monovette – orange cap - # 02.165.001)

5.2 Specimen Storage and Preparation

Specimens should be capped and may be stored for up to 4 days at 2 °C - 8 °C prior to assaying.

Specimens held for a longer time (up to 3 months) should be frozen only once at -20°C prior to assay. Thawed samples should be inverted several times prior to testing.

5.3 Specimen Dilution

If in an initial assay, a specimen is found to contain more SHBG than the highest calibrator, the specimens can be further diluted with Assay Buffer and re-assayed as described in Assay Procedure.

For the calculation of the concentrations this dilution factor has to be taken into account.

Example:

- a) dilution 1:10: 10 µL pre-diluted sample + 90 µL Assay Buffer (mix thoroughly)
- b) dilution 1:100: 10 µL dilution a) 1:10 + 90 µL Assay Buffer (mix thoroughly).

6 ASSAY PROCEDURE

6.1 General Remarks

- All reagents and specimens must be allowed to come to room temperature before use. All reagents must be mixed without foaming.
- Once the test has been started, all steps should be completed without interruption.
- Use new disposal plastic pipette tips for each calibrator, control or sample in order to avoid cross contamination.
- Absorbance is a function of the incubation time and temperature. Before starting the assay, it is recommended that all reagents are ready, caps removed, all needed wells secured in holder, etc. This will ensure equal elapsed time for each pipetting step without interruption.
- As a general rule the enzymatic reaction is linearly proportional to time and temperature.

6.2 Predilution of standards, controls and samples

Prior to the assay, all standards, controls and patient samples need to be diluted 1+100 in Assay Buffer.

Example: 10 µL sample + 1000 µL Assay Buffer

Thoroughly mix for 10 seconds. It is important to have a complete mixing in this step.

Take 50 µL of the prediluted standards, controls and samples for the SHBG ELISA

6.3 Test Procedure

Each run must include a calibration curve.

1. Secure the desired number of Microtiter wells in the frame holder.
2. Dispense **50 µL** of each prediluted **Standard, Control** and **sample** with new disposable tips into appropriate wells.
3. Incubate for **120 minutes** at room temperature.
4. Briskly shake out the contents of the wells.
Rinse the wells **3 times with 300 µL - 400 µL** diluted Wash Solution per well. Strike the wells sharply on absorbent paper to remove residual droplets.
- Important note:**
The sensitivity and precision of this assay is markedly influenced by the correct performance of the washing procedure!
5. Dispense **100 µL Enzyme Conjugate** into each well.
6. Incubate for **30 minutes** at room temperature.
7. Briskly shake out the contents of the wells.
Rinse the wells **3 times with 300 µL - 400 µL** diluted Wash Solution per well. Strike the wells sharply on absorbent paper to remove residual droplets.
8. Add **100 µL of Substrate Solution** to each well.
9. Incubate for 15 minutes at room temperature.

10. Stop the enzymatic reaction by adding **100 µL of Stop Solution** to each well.
11. Determine the absorbance (OD) of each well at **450 ± 10 nm** with a microtiter plate reader.
It is recommended that the wells be read **within 10 minutes** after adding the Stop Solution.

6.4 Calculation of Results

1. Calculate the average absorbance values for each set of calibrators, controls and patient samples.
2. Using linear graph paper, construct a calibration curve by plotting the mean absorbance obtained from each calibrator against its concentration with absorbance value on the vertical (Y) axis and concentration on the horizontal (X) axis.
3. Using the mean absorbance value for each sample determine the corresponding concentration from the calibration curve.
4. Automated method: The results in the Instruction for Use have been calculated automatically using a 4 Parameter curve fit. (4 Parameter Rodbard or 4 Parameter Marquardt are the preferred methods.) Other data reduction functions may give slightly different results.
5. The concentration of the samples can be read directly from this calibration curve. Samples with concentrations higher than that of the highest calibrator have to be further diluted or reported as > 260 nmol/L. For the calculation of the concentrations this dilution factor has to be taken into account.

6.4.1 Example of Typical Calibration Curve

The following data is for demonstration only and **cannot** be used in place of data generations at the time of assay.

Calibrator	Optical Units (450 nm)
Calibrator 0 (0 nmol/L)	0.02
Calibrator 1 (4 nmol/L)	0.09
Calibrator 2 (16 nmol/L)	0.27
Calibrator 3 (32 nmol/L)	0.49
Calibrator 4 (65 nmol/L)	0.84
Calibrator 5 (130 nmol/L)	1.36
Calibrator 6 (260 nmol/L)	1.93

7 EXPECTED NORMAL VALUES

It is strongly recommended that each laboratory should determine its own normal and abnormal values.

In a study conducted with apparently healthy subjects, using the DIAsource SHBG ELISA the following data were observed:

Population	N	Mean (nmol/L)	Median (nmol/L)	2.5 th – 97.5 th Percentile (nmol/l)	Range (min. – max.) (nmol/L)
Males	78	45.3	42.1	17.7 – 92.8	16.8 – 113.2
Females	40	65.0	58.2	20.4 – 126.7	16.1 – 128.4

The results alone should not be the only reason for any therapeutic consequences. The results should be correlated to other clinical observations and diagnostic tests.

8 QUALITY CONTROL

Good laboratory practice requires that controls be run with each calibration curve. A statistically significant number of controls should be assayed to establish mean values and acceptable ranges to assure proper performance.

It is recommended to use control samples according to state and federal regulations. The use of control samples is advised to assure the day to day validity of results. Use controls at both normal and pathological levels.

The controls and the corresponding results of the QC-Laboratory are stated in the QC certificate added to the kit. The values and ranges stated on the QC sheet always refer to the current kit lot and should be used for direct comparison of the results.

It is also recommended to make use of national or international Quality Assessment programs in order to ensure the accuracy of the results.

Employ appropriate statistical methods for analysing control values and trends. If the results of the assay do not fit to the established acceptable ranges of control materials patient results should be considered invalid.

In this case, please check the following technical areas: Pipetting and timing devices; photometer, expiration dates of reagents, storage and incubation conditions, aspiration and washing methods.

After checking the above mentioned items without finding any error contact your distributor or DIAsource directly.

9 PERFORMANCE CHARACTERISTICS

9.1 Assay Dynamic Range

The range of the assay is between 0.408 – 260 nmol/L.

9.2 Specificity of Antibodies (Cross Reactivity)

The following substances were tested for cross reactivity of the assay:

Substance	% Cross-reactivity
Corticoid binding globulin	< 0.2
Thyroxin binding globulin	< 0.04

9.3 Sensitivity

The analytical sensitivity of the DIAsource ELISA was calculated by adding 2 standard deviations to the mean of 20 replicate analyses of the Calibrator 0 and was found to be 0.23 nmol/L.

The Limit of Blank (LoB) is 0.23 nmol/L.

The Limit of Detection (LoD) is 0.408 nmol/L.

The Limit of Quantification (LoQ) is 0.757 nmol/L.

9.4 Reproducibility

9.4.1 Intra Assay

The within assay variability is shown below:

Sample	n	Mean (nmol/L)	CV (%)
1	10	41.67	2.3
2	10	66.75	4.6
3	10	87.37	3.2
4	10	133.62	4.8

9.4.2 Inter Assay

The between assay variability is shown below:

Sample	n	Mean (nmol/L)	CV (%)
1	30	41.99	5.7
2	30	68.94	6.3
3	30	90.00	6.2
4	30	136.96	15.2

9.4.3 Inter-lot

The inter-assay (between-lots) variation was determined by repeated measurements of samples with 3 different kit lots.

Sample	n	Mean (nmol/L)	CV (%)
1	18	44.04	8.1
2	18	61.32	8.9
3	18	92.27	11.7
4	18	160.92	8.2

9.5 Recovery

Recovery of the DIAsource ELISA was determined by adding increasing amounts of the analyte to different patient samples containing different amounts of endogenous analyte.

	Sample 1	Sample 2	Sample 3	Sample 4
Concentration (nmol/L)	45.5	76.8	85.62	158.6
Average Recovery (%)	95.9	92.6	86.7	89.2
Range of Recovery (%)	from	92.9	88.3	85.5
	to	99.8	96.9	87.7
				90.5

9.6 Linearity

	Sample 1	Sample 2	Sample 3	Sample 4	
Concentration (nmol/L)	44.5	73.4	98.5	177.6	
Average Recovery (%)	98.6	97.3	98.5	99.2	
Range of Recovery (%)	from to	96.1 101.0	93.8 100.1	94.2 100.4	96.2 101.6

10 LIMITATIONS OF USE

Reliable and reproducible results will be obtained when the assay procedure is performed with a complete understanding of the package insert instruction and with adherence to good laboratory practice.

Any improper handling of samples or modification of this test might influence the results.

10.1 Interfering Substances

Haemoglobin, (up to 4 mg/mL), Bilirubin (up to 0.5 mg/mL) and Triglyceride (up to 7.5 mg/mL) have no influence on the assay results.

10.2 Drug Interferences

Until today no substances (drugs) are known to us, which have an influence to the measurement of SHBG in a sample.

10.3 High-Dose-Hook Effect

Hook effect was not observed in this test up to a concentration of 11350 nmol/L of SHBG.

11 LEGAL ASPECTS

11.1 Reliability of Results

The test must be performed exactly as per the manufacturer's instructions for use. Moreover the user must strictly adhere to the rules of GLP (Good Laboratory Practice) or other applicable national calibrators and/or laws. This is especially relevant for the use of control reagents. It is important to always include, within the test procedure, a sufficient number of controls for validating the accuracy and precision of the test.

The test results are valid only if all controls are within the specified ranges and if all other test parameters are also within the given assay specifications. In case of any doubt or concern please contact DIAsource.

11.2 Therapeutic Consequences

Therapeutic consequences should never be based on laboratory results alone even if all test results are in agreement with the items as stated under point 11.1. Any laboratory result is only a part of the total clinical picture of a patient.

Only in cases where the laboratory results are in acceptable agreement with the overall clinical picture of the patient should therapeutic consequences be derived.

The test result itself should never be the sole determinant for deriving any therapeutic consequences.

11.3 Liability

Any modification of the test kit and/or exchange or mixture of any components of different lots from one test kit to another could negatively affect the intended results and validity of the overall test. Such modification and/or exchanges invalidate any claim for replacement.

Claims submitted due to customer misinterpretation of laboratory results subject to point 11.2. are also invalid. Regardless, in the event of any claim, the manufacturer's liability is not to exceed the value of the test kit. Any damage caused to the test kit during transportation is not subject to the liability of the manufacturer.

12 REFERENCES/LITERATURE

1. Moore, JW and Bulbrook RD. The epidemiology and function of sex hormone binding globulin. IN Oxford Reviews of Reproductive Biology, 1988; 10: 180 - 236.
2. Selby, C. Sex hormone binding globulin: origin, function and clinical significance. Ann. Clin. Biochem. 1990; 27: 532 - 541.
3. Tehero A, Despres JP: Sex steroid hormone, sex hormone-binding globulin, and obesity in men and women. Horm. Metab. Res.2000; 32:526-536.
4. Kahn SM, Hryb DJ, Nakhle AM, Romas NA: Sex hormone-binding globulin is synthesized in target cells. J Endocrinol 2002; 175:113-120.
5. Hammond GL: Access of reproductive steroids to target tissues. Obstet Gynecol Clin North Am 2002; 29:411-423.
6. Elmlinger MW, Kuhnel W, Ranke MB: Reference ranges for serum concentrations of lutropin (LH), follitropin (FSH), estradiol (E2), prolactin, progesterone, sex hormone binding globulin (SHBG), dehydroepiandrosterone sulfate (DHEA-S), cortisol and ferritin in neonates, children, and young adults. Clin Chem Lab Med 2002; 40(11):1151-1160.
7. Deswal , Yadav A, Dang AS Sex hormone binding globulin - an important biomarker for predicting PCOS risk: A systematic review and meta-analysis. Syst Biol Reprod Med 2018; 64: 12-24.
8. Sanches de Melo et al. Hormonal contraception in women with polycystic ovary syndrome: choices, challenges, and noncontraceptive benefits. Open Access J Contracept.2017; 2:8:13-23.
9. Pugeat et al. (2018) Hyperandrogenic states in women: pitfalls in laboratory diagnosis. Eur J Endocrin 2018; 178, 141-54.
10. Rothman MS, Wierman ME. How should postmenopausal androgen excess be evaluated? Clin Endocrinol 2011; 75(2):160-4.
11. Wu FCW et al. Identification of Late-Onset Hypogonadism in Middle-Aged and Elderly Men. N Engl J Med 2010; 363:123-35.
12. Tajar A et al. Characteristics of secondary, primary, and compensated hypogonadism in aging men: evidence from the European Male Ageing Study. J Clin Endocrinol Metab 2010 95(4):1810-8.

Other translations of this Instructions for Use can be downloaded from our website: <https://www.diasource-diagnostics.com/>

Revision date: 2023-07-10



SHBG ELISA

fr

KAPD2996

IN VITRO DIAGNOSTIC USE

DIAsource ImmunoAssays SA - Rue du Bosquet 2, B-1348 Louvain-la-Neuve, Belgium-Tel: +32 10 84 99 11 - Fax : +32 10 84 99 90

1 INTRODUCTION

Le kit de dosage immuno-enzymatique DIAsource SHBG ELISA propose les matériaux requis pour la mesure quantitative de la SHBG (Sex Hormone-binding globulin) dans le sérum ou du plasma (plasma d'EDTA, héparine ou citrate). Ce kit est à utiliser uniquement dans le cadre de tests diagnostiques in vitro.

2 PRINCIPLE DU TEST

Le kit DIAsource SHBG ELISA est basé sur une réaction immuno-enzymatique en sandwich en phase solide.

Les microplaques sont recouvertes avec un anticorps monoclonal dirigé contre un antigène spécifique de la molécule SHBG.

Un aliquot de l'échantillon contenant le (la) SHBG endogène est incubé dans un puits avec l'enzyme conjuguée, c'est-à-dire un anticorps anti-SHBG conjuguée avec la peroxydase de Raifort (horseradish peroxidase, HRP). Après l'incubation, le conjugué non-lié est éliminé durant le lavage des puits.

La quantité de conjugué-HRP liée est proportionnelle à la concentration de SHBG contenu(e) dans l'échantillon.

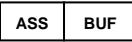
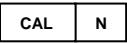
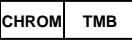
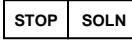
Suite à l'addition de solution substrat, l'intensité de la coloration obtenue est proportionnelle à la concentration de SHBG contenu(e) dans l'échantillon.

3 PRECAUTIONS D'UTILISATION

1. Ce kit est uniquement destiné aux tests diagnostiques in vitro.
2. Utilisez uniquement la version valide d'instructions d'utilisation qui est incluse dans le kit.
3. Les informations concernant la toxicité des réactifs contenus dans ce kit sont présentées dans la fiche de sécurité (« Material Safety Data Sheets »).
4. Tous les réactifs de ce kit contenant du sérum ou du plasma humain ont été testés avec des résultats négatifs pour le VIH I/II, le HBsAg et le HCV selon les normes FDA en vigueur. Néanmoins, lors de leur utilisation, tous les réactifs de ce kit doivent être manipulés avec précaution.
5. Eviter les contacts avec la *Stop Solution*, celle-ci contient 0.5 M de H₂SO₄. Cela pourrait engendrer irritations ou brûlures de la peau.
6. Ne jamais pipeter avec la bouche, et éviter tout contact de la peau ou des muqueuses avec les réactifs ou les échantillons.
7. Ne pas fumer, manger, boire ou utiliser des produits cosmétiques dans les zones où les échantillons ou le kit ont été maniés.
8. Porter des gants d'examen lors de l'utilisation des échantillons ou des réactifs. Une contamination microbienne des échantillons ou des réactifs pourrait fausser les résultats.
9. L'utilisation de ce kit devra être en accord avec les normes ou recommandations nationales de sécurité en vigueur concernant les produits à risque biologique.
10. Ne pas utiliser les réactifs au-delà de la date d'expiration inscrite sur l'emballage.
11. Tous les volumes indiqués doivent être scrupuleusement respectés, comme indiqué dans le protocole expérimental. Seule l'utilisation de pipettes calibrées ou d'un spectrophotomètre lecteur de micro-plaques calibré garantit l'obtention de résultats optimaux à ce test.
12. Ne pas mélanger ou utiliser des réactifs contenus dans des kits de lots différents. Il est conseillé de ne pas échanger les puits de différentes plaques, même si celles-ci proviennent du même lot. Les kits peuvent avoir été transportés ou stockés différemment, et les caractéristiques de liaison de chaque plaque pourraient ainsi être modifiées.
13. L'élimination des solutions chimiques et des réactifs contenus dans ce kit, utilisés ou non, doit être en accord avec la réglementation nationale en vigueur concernant l'élimination des déchets à risque biologique..
14. La fiche de sécurité concernant ce produit peut être obtenue en contactant directement DIAsource ImmunoAssays S.A..

4 COMPOSITION DU KIT

4.1 Contenu du kit

1.  **Microtiterwells** (Plaques de micro-titration), 12 x 8 (à détacher) barrettes, plaques de 96 puits; les puits sont recouverts avec un anticorps anti-SHBG (monoclonal).
2.  **Assay Buffer** (tampon d'essai), 1 flacon, 125 mL, prêt à l'emploi
Contient agent de conservation
3.  **SHBG Calibrators** (calibrateur), N= 0 - 6
7 flacons, 0.5 mL chacun, prêts à l'emploi
Concentrations : 0 – 4 – 16 – 32 – 65 – 130 – 260 nmol/L
Les standards sont étalonnés contre la matériel de référence suivante : WHO International Standard for Sex Hormone Binding Globulin (08/266)
Contient agent de conservation
4.  **Controls** (contrôle), 2 flacon, 0.5 mL, prêt à l'emploi
Les valeurs contrôles et limites sont indiquées sur l'étiquette du flacon ou sur la fiche QC
Contient agent de conservation
5.  **Enzyme Conjugate** (conjugué enzymatique), 1 flacon, 14 mL, prêt à l'emploi
Anticorps anti-SHBG conjugué à la HRP
Contient agent de conservation
6.  **Wash Solution** (solution de lavage), 1 flacon, 30ml (concentré 40 x)
Voir „Préparation des réactifs“
7.  **Substrate Solution** (solution substrat), 1 flacon, 14 mL., prêt à l'emploi
Tétraméthylbenzidine (TMB)
8.  **Stop Solution** (solution d'arrêt), 1 flacon, 14 mL, prêt à l'emploi
Contient 0.5 M H₂SO₄.
Eviter les contacts avec la solution stop. Cela pourrait engendrer irritations ou brûlures de la peau.

4.2 Equipement et matériel requis, mais non fournis

- Un spectrophotomètre lecteur de micro-plaques calibré (450 ± 10 nm) (ex. le lecteur de microplaques de DIAsource).
- Des micro-pipettes de précision variables et calibrées.
- Du papier absorbant.
- De l'eau distillée.
- Tubes pour la dilution des étalons, des contrôles et des échantillons
- Minuteur
- Papier graphique ou software pour la réduction des données

4.3 Stockage et stabilité du kit

Les réactifs contenus dans des flacons non-ouverts, stockés à 2 °C à 8 °C, seront stables jusqu'à la date d'expiration inscrite sur l'étiquette. Ne pas utiliser les réactifs au delà de cette date.

Les réactifs contenus dans des flacons ouverts doivent être stockés à 2 °C à 8 °C. Les micro-plaques doivent être stockées à 2 °C à 8 °C. Une fois la capsule d'aluminium ouverte, attention à bien refermer le flacon.

Les kits ouverts conservent leur activité durant 2 mois s'ils sont stockés comme précédemment mentionné.

4.4 Préparation des réactifs

Amener tous les réactifs et le nombre de barrettes nécessaires au test à température ambiante avant utilisation.

Diluer 30 mL de *Wash Solution* concentrée avec 1170 mL d'eau désionisée, pour un volume final de 1200 mL.
La solution de lavage diluée est stable deux semaines à température ambiante.

4.5 Elimination des déchets relatifs au kit

L'élimination des déchets relatifs au kit doit être réalisée selon les règles nationales en vigueur. Les informations spécifiques au kit sont présentées dans la fiche de sécurité (voir chapitre 13).

4.6 Kits endommagés

Dans le cas de dommages importants survenus au kit ou ses composants, informer DIAsource, au plus tard une semaine après réception du kit. Les composants endommagés ne doivent pas être utilisés pour le test. Ils doivent être stockés jusqu'à ce qu'une solution adaptée ait été trouvée. Après cela, ils doivent être éliminés selon les directives officielles en vigueur.

5 ECHANTILLON

Sérum plasma (plasma d'EDTA, héparine ou citrate) peuvent être utilisés pour ce test. Le plasma d'EDTA et de citrate peuvent donner des résultats légèrement inférieurs.

Remarque : Les échantillons contenant de l'azide de sodium ne doivent pas être utilisés pour ce test.

5.1 Prélèvement et préparation des échantillons

Sérum:

Prélever le sang par ponction veineuse (ex. Sarstedt Monovette pour sérum), laisser coaguler, puis séparer le sérum par centrifugation à température ambiante. Ne pas centrifuger avant que la coagulation ne soit terminée. Les patients sous traitement anti-coagulant peuvent demander un temps de coagulation plus important.

Plasma:

Le sang total doit être prélevé dans des tubes de centrifugation contenant un anti-coagulant et centrifugé immédiatement après le prélèvement.

(Ex. pour héparine plasma : Sarstedt Monovette – bouchon orange - # 02.165.001)

5.2 Conservation des échantillons

Les tubes contenant les échantillons doivent être fermés et peuvent être stockés jusqu'à 4 jours à 2 °C - 8 °C avant d'être testés. Les échantillons stockés pour un temps prolongé (jusqu'à 3 mois) doivent être congelés à -20°C avant d'être testés. Les échantillons décongelés doivent être retournés plusieurs fois avant le test.

5.3 Dilution des échantillons

Si, lors d'un test préliminaire, la concentration de l'échantillon de SHBG se révèle être supérieure à celle du calibrateur le plus concentré, alors l'échantillon doit être dilué avec le Assay Buffer et testé de nouveau, comme décrit dans Réalisation du test. Pour le calcul des concentrations, ce facteur de dilution doit être pris en considération.

Exemple:

- a) dilution 1:10: 10 µL de l'échantillon prédilué + 90 µL Assay Buffer (bien mélanger).
- b) dilution 1:100: 10 µL dilution a) 1:10 + 90 µL Assay Buffer (bien mélanger).

Pour le calcul des concentrations, ce facteur de dilution doit être pris en considération.

6 REALISATION DU TEST

6.1 Remarques générales

- Tous les réactifs et échantillons doivent être amenés à température ambiante (18°C – 25°C) avant utilisation. Tous les réactifs doivent être mélangés, sans formation de mousse.
- Une fois la procédure engagée, toutes les étapes doivent être réalisées sans interruption.
- Utiliser un nouveau cône de pipette pour chaque calibrateur, contrôle ou échantillon, ceci afin d'éviter toute contamination.
- L'absorbance est fonction du temps d'incubation et de la température. Avant de commencer le test, il est recommandé de préparer tous les réactifs, bouchons ouverts, de préparer les puits des microplaques, etc. Cela garantira un intervalle de temps équivalent entre chaque étape, sans interruption.
- En règle générale, la réaction enzymatique est linéairement proportionnelle au temps et à la température.

6.2 Pré-dilution des standards, des contrôles et des échantillons

Avant le test, tous les standards, les contrôles et les échantillons de patients doivent être dilués à 1+100 dans du tampon d'essai.

Exemple: 10 µL de l'échantillon + 1000 µL Assay Buffer

Bien mélanger pendant 10 secondes.

Il est important d'avoir un mélange complet dans cette étape.

Chaque 50 µL d'étalons, de contrôles et d'échantillons prédilués sont requis pour le SHBG ELISA.

6.3 Réalisation du dosage

Chaque test doit inclure une courbe étalon.

1. Disposer le nombre de puits de micro-titration désiré dans le support.
2. Déposer 50 µL de chaque Standard, Control et échantillon prédilué, avec de nouveaux cônes de pipette, dans les puits appropriés.
3. Incuber pendant 120 minutes à température ambiante.
4. Décanter le contenu des puits et rincer les puits 3 fois avec 300 µL - 400 µL de la Wash Solution diluée par puits). Tapoter les puits sur du papier absorbant afin d'éliminer les gouttelettes résiduelles.

Remarque importante:

La sensibilité et la précision de ce test sont fortement dépendantes de la bonne réalisation des étapes de lavage !

5. Déposer 100 µL d'Enzyme Conjugate dans chaque puits.
6. Incuber pendant 30 minutes à température ambiante.
7. Décanter le contenu des puits et rincer les puits 3 fois avec 300 µL - 400 µL de la Wash Solution diluée par puits). Tapoter les puits sur du papier absorbant afin d'éliminer les gouttelettes résiduelles.
8. Ajouter 100 µL de Substrate Solution à chaque puits.
9. Incuber pendant 15 minutes à température ambiante.
10. Stopper la réaction enzymatique en ajoutant 100 µL de Stop Solution à chaque puits.
11. Lire la densité optique à 450 ± 10 nm à l'aide d'un spectrophotomètre lecteur de micro-plaques dans les 10 minutes après avoir ajouté la Stop Solution.

6.4 Calcul des résultats

1. Calculer les valeurs moyennes des densités optiques pour chaque série de calibrateurs, contrôles et échantillons.
2. Etablir la courbe étalon en reportant la densité optique moyenne de chaque valeur calibrateur en fonction de sa concentration, en posant la densité optique en axe des ordonnées et la concentration en axe des abscisses.
3. L'utilisation de la densité optique moyenne pour chaque échantillon détermine la concentration correspondante à partir de la courbe étalon.
4. Méthode automatique. Les résultats dans les instructions d'utilisation ont été calculés de façon automatique en utilisant une courbe de régression 4 Paramètres. (4 paramètres Rodbard ou 4 paramètres Marquardt sont les méthodes favorites) D'autres fonctions logistiques peuvent donner des résultats légèrement différents.
5. La concentration des échantillons peut être lue directement à partir de cette courbe étalon. Les échantillons avec une concentration supérieure à celle du plus haut calibrateur doivent être dilués de nouveau. Pour le calcul des concentrations, ce facteur de dilution doit être pris en considération.

6.4.1 Exemple d'une courbe calibrateur typique

Les résultats suivants sont ici présentés à titre d'exemple et **ne peuvent** être utilisés au moment de l'essai.

Standard	Unités optiques (450 nm)	
Standard 0	0 nmol/L	0,02
Standard 1	4 nmol/L	0,09
Standard 2	16 nmol/L	0,27
Standard 3	32 nmol/L	0,49
Standard 4	65 nmol/L	0,84
Standard 5	130 nmol/L	1,36
Standard 6	260 nmol/L	1,93

7 VALEURS ATTENDUES

Il est fortement recommandé à chaque laboratoire de déterminer ses propres valeurs normales et pathologiques.

Dans une étude menée sur des sujets apparemment sains, à l'aide du test DIAsource SHBG ELISA, les valeurs suivantes ont été observées :

Population	n	Valeur moyenne (nmol/L)	Médiane (nmol/L)	2,5. - 97,5. Percentile (nmol/L)	Portée (min. - max.) (nmol/L)
Hommes	78	45,3	42,1	17,7 - 92,8	16,8 - 113,2
Femmes	40	65,0	58,2	20,4 - 126,7	16,1 - 128,4

Les résultats ne doivent pas être utilisés seuls pour déterminer les décisions thérapeutiques. Ils doivent être corrélés avec d'autres observations cliniques et tests diagnostiques.

8 CONTROLE DE QUALITÉ

Il est recommandé d'utiliser les échantillons contrôles selon les réglementations nationales en vigueur. L'utilisation des échantillons contrôles est recommandé afin de s'assurer jour après jour de la validité des résultats. Utiliser les contrôles de valeurs normales et pathologiques.

Les contrôles et les résultats correspondants issus du laboratoire QC sont mentionnés dans le certificat QC fourni avec le kit. Les valeurs et les limites mentionnées sur la fiche QC font toujours référence au lot de kit courant et doivent être utilisées pour une comparaison directe avec les résultats.

Il est également recommandé d'utiliser les programmes d'évaluation de qualité nationaux ou internationaux, afin de s'assurer de l'exactitude des résultats.

Utiliser les méthodes d'analyses statistiques appropriées pour l'analyse des valeurs contrôles et des tendances. Si les résultats ne correspondent pas aux limites établies des contrôles, les résultats concernant ces patients doivent être considérés comme non valides.

Dans ce cas, tester les zones techniques suivantes : mécanisme de pipettage et temps; spectrophotomètre, dates d'expiration des réactifs, conditions de stockage et d'incubation, méthodes d'aspiration et de lavage.

Après avoir tester les points mentionnés, si aucune erreur n'est détectée, contacter votre distributeur ou directement DIAsource.

9 CARACTÉRISTIQUES DU TEST

9.1 Zone de mesure

Les limites du dosage sont comprises entre 0.408 – 260 nmol/L.

9.2 Spécificité des anticorps (Réaction croisée)

Voir le manuel d'utilisateur en version anglaise.

9.3 Sensibilité de l'analyse

La sensibilité de l'analyse a été calculée à partir de la moyenne, plus deux fois l'écart-type, de l'analyse de 20 répliquats du Standard 0 et a été mesurée à 0,23 nmol/L.

La limite du blanc (LoB) est de 0,23 nmol/L.

La limite de détection (LoD) est de 0,408 nmol/L.

La limite de quantification (LoQ) est de 0,757 nmol/L.

Pour

9.4 Précision

9.5 Recouvrement

9.6 Linéarité

consulter la version anglaise détaillée du mode d'emploi.

10 LIMITES D'UTILISATION

Toute utilisation impropre des échantillons ou toute modification du test peut influencer les résultats.

10.1 Substances parasites

L'hémoglobine (jusqu'à 4 mg/ml), la bilirubine (jusqu'à 0.5 mg/ml) et les triglycérides (jusqu'à 7.5 mg/ml) n'ont aucune influence sur les résultats du dosage.

10.2 Drogues parasites

Jusqu'à présent, nous ne connaissons aucune substance (drogues) capable d'influencer la mesure de SHBG dans un échantillon.

10.3 Effet de surdosage

Jusqu'à 11350 nmol/L de SHBG, aucun effet de surdosage n'a été détecté avec ce test.

11 ASPECTS LÉGAUX

11.1 Fiabilité des résultats

Ce test doit être exactement utilisé selon les instructions d'utilisation du fabricant. De plus, les utilisateurs doivent strictement respecter les règles de la bonne pratique de laboratoire, ou autres lois nationales. Cela est spécialement le cas pour l'utilisation des réactifs contrôles. Pour chaque test, il est important d'inclure un nombre suffisant de contrôles, afin de pouvoir valider l'exactitude et la précision du test.

Les résultats du test sont valides si et seulement si tous les contrôles sont compris dans les gammes de mesure mentionnées et si tous les autres paramètres du test sont également compris dans les instructions de ce test. En cas de doute ou d'inquiétude, contacter DIAsource.

11.2 Conséquences thérapeutiques

Les suites thérapeutiques ne devront jamais être basées sur les résultats de laboratoire seuls, même si les tous les résultats du test sont en accord avec les points mentionnés dans le paragraphe 11.1. Tout résultat n'est qu'une partie du tableau clinique complet d'un patient.

Les suites thérapeutiques peuvent découler des résultats de laboratoire si et seulement si ceux-ci sont en accord avec l'ensemble du tableau clinique du patient.

Le résultat du test en lui-même ne doit en aucun cas être le seul déterminant des suites thérapeutiques à suivre.

11.3 Responsabilité

Toute modification du kit et / ou échange ou mélange d'un des composants de différents lots, d'un kit à un autre, pourrait affecter de façon négative les résultats attendus et la validité du test dans son ensemble. De telles modifications ou échanges invalident toute réclamation pour remplacement.

Toutes les réclamations soumises, relatives au paragraphe 11.2, et dues à une mauvaise interprétation des résultats de laboratoire de la part du client sont également invalides. Néanmoins, en cas de réclamation, la responsabilité du fabricant n'est pas de dépasser les limites de la valeur du kit. Tout dommage causé au kit lors de son transport n'est pas du ressort de la responsabilité du fabricant.

12 REFERENCE/LITÉRATURE

1. Moore, JW and Bulbrook RD. The epidemiology and function of sex hormone binding globulin. IN Oxford Reviews of Reproductive Biology, 1988; 10: 180 - 236.
2. Selby, C. Sex hormone binding globulin: origin, function and clinical significance. Ann. Clin. Biochem. 1990; 27: 532 - 541.
3. Tehernof A, Despres JP: Sex steroid hormone, sex hormone-binding globulin, and obesity in men and women. Horm. Metab. Res.2000; 32:526-536.
4. Kahn SM, Hryb DJ, Nakhlé AM, Romas NA: Sex hormone-binding globulin is synthesized in target cells. J Endocrinol 2002; 175:113-120.
5. Hammond GL: Access of reproductive steroids to target tissues. Obstet Gynecol Clin North Am 2002; 29:411-423.
6. Elmlinger MW, Kuhnel W, Ranke MB: Reference ranges for serum concentrations of lutropin (LH), follitropin (FSH), estradiol (E2), prolactin, progesterone, sex hormone binding globulin (SHBG), dehydroepiandrosterone sulfate (DHEA-S), cortisol and ferritin in neonates, children, and young adults. Clin Chem Lab Med 2002; 40(11):1151-1160.
7. Deswal ., Yadav A, Dang AS Sex hormone binding globulin - an important biomarker for predicting PCOS risk: A systematic review and meta-analysis. Syst Biol Reprod Med 2018; 64: 12-24.
8. Sanches de Melo et al. Hormonal contraception in women with polycystic ovary syndrome: choices, challenges, and noncontraceptive benefits. Open Access J Contracept.2017; 2;8:13-23.
9. Pugeat et al. (2018) Hyperandrogenic states in women: pitfalls in laboratory diagnosis. Eur J Endocrin 2018; 178, 141-54.
10. Rothman MS, Wierman ME. How should postmenopausal androgen excess be evaluated? Clin Endocrinol 2011; 75(2):160-4.
11. Wu FCW et al. Identification of Late-Onset Hypogonadism in Middle-Aged and Elderly Men. N Engl J Med 2010; 363:123-35.
12. Tajar A et al. Characteristics of secondary, primary, and compensated hypogonadism in aging men: evidence from the European Male Ageing Study. J Clin Endocrinol Metab 2010 95(4):1810-8.

Date de révision : 2023-07-10



SHBG ELISA

KAPD2996

es

Para uso diagnóstico in vitro

DIAsource ImmunoAssays S.A. - Rue du Bosquet 2, B-1348 Louvain-la-Neuve, Belgium - Tel: +32 10 84 99 11 - Fax : +32 10 84 99 90

1. INTRODUCCIÓN

El Kit de inmunoensayo enzimático DIAsource SHBG ELISA proporciona los materiales necesarios para la determinación cuantitativa del SHBG (globulina de unión a hormona sexual) en suero o plasma (plasma con EDTA, heparina o citrato). Este ensayo está diseñado solo para diagnóstico *in vitro*.

2. FUNDAMENTO DEL ENSAYO

El Kit DIAsource SHBG ELISA es un ensayo en fase sólida de inmunoabsorción unido a enzimas (ELISA), basado en el principio del sándwich.

Los pocillos de las placas están recubiertos con un anticuerpo monoclonal dirigido contra un único foco antigenético en una molécula de SHBG.

Se incuba una alícuota de una muestra perteneciente a un paciente que contiene SHBG endógena en los pocillos recubiertos con el enzima conjugado, que es un anticuerpo anti-SHBG conjugado con la peroxidasa endógena. Después de la incubación se lava el conjugado que no se ha unido.

La cantidad de peroxidasa unida es proporcional a la concentración de SHBG en la muestra.

Cuando se añade la solución del sustrato de la peroxidasa, la intensidad del color desarrollado es proporcional a la concentración de SHBG en la muestra del paciente.

3. PRECAUCIONES

- Este kit es solamente para diagnóstico *in vitro*.
- Por favor, se usa solo la versión válida de la metodología incluida aquí en el kit.
- Para obtener información de las sustancias peligrosas incluidas en el kit por favor mirar las hojas de los datos de seguridad del material.
- Todos los reactivos en este kit de ensayo que contienen suero o plasma humano se han ensayado y confirmado ser negativos para HIV I/II, HBsAg y HCV mediante procedimientos aprobados por la FDA. Sin embargo, todos los reactivos deben ser tratados tanto en su uso como dispensación como potencialmente biopeligrosos.
- Evitar contacto con *Stop Solution* que contiene H_2SO_4 , 0,5 M. Puede provocar irritación y quemaduras en la piel.
- Nunca pipetejar con la boca y evitar el contacto de los reactivos y las muestras con la piel y con membranas mucosas.
- No fumar, comer, beber o usar cosméticos en áreas donde las muestras o los reactivos del kit están siendo usados.
- Usar guantes de látex cuando se utilicen las muestras y los reactivos. La contaminación microbiana de los reactivos o las muestras puede dar resultados erróneos.
- El manejo debe realizarse de acuerdo a los procedimientos definidos por las guías o regulación nacionales de seguridad de sustancias biopeligrosas.
- No utilizar los reactivos después de su fecha de caducidad que aparece en las etiquetas del kit.
- Todos los volúmenes indicados han de ser realizados de acuerdo con el protocolo. Los resultados óptimos del ensayo se obtienen solo cuando se utilizan pipetas y lectores de microplacas calibrados.
- No mezclar o usar componentes de kits con distinto número de lote. Se recomienda no intercambiar pocillos de distintas placas incluso si son del mismo lote. Los kits pueden haber sido enviados o almacenados bajo diferentes condiciones y las características de unión de las placas pueden resultar diferentes.
- Los compuestos químicos y los reactivos preparados o utilizados han de tratarse como residuos peligrosos de acuerdo con las guías o regulación nacionales de seguridad de sustancias biopeligrosas.
- Las hojas de los datos de seguridad de este producto están disponibles bajo pedido directamente a DIAsource ImmunoAssays S.A..

4. COMPONENTES DEL KIT

4.1 Componentes del Kit

1. 

Microtiterwells (Placas multipocillo), 12 x 8 tiras separables, 96 pocillos; Pocillos recubiertos con anticuerpo anti- SHBG (monoclonal).

2.  CAL N

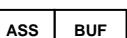
Standard (Standard 0-6), (Estándar), 7 viales, 0,5 mL cada, listos para usar; Concentraciones: 0 – 4 – 16 – 32 – 65 – 130 – 260 nmol/L

Los estándares están calibrado contra el siguiente material de referencia: WHO International Standard for Sex Hormone Binding Globulin (08/266)
Contiene conservante.

3.  CONTROL N

Controls, 2 vials, 0,5 mL cada, listos para usar;

Referir los valores y rangos del control a la etiqueta del vial o a la Hoja de datos QC.
Contiene conservante.

4.  ASS BUF

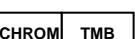
Assay Buffer (Tampón de ensayo), 1 vial, 125 mL, listo para usar,

Contiene conservante.

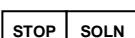
5.  Ab HRP

Enzyme Conjugate (Conjugado enzimático), 1 vial, 14 mL, listo para usar;
Anticuerpo anti- SHBG conjugado con la Peroxidasa de rábano;

Contiene conservante.

6.  CHROM TMB

Substrate Solution (Solución de sustrato), 1 vial, 14 mL, listo para usar,
Tetrametilbencidina (TMB).

7.  STOP SOLN

Stop Solution (Solución de parada), 1 vial, 14 mL, listo para usar,
contiene 0.5M H₂SO₄.

Evitar el contacto con la Solución de parada. Puede causar irritación y quemaduras en al piel.

8.  WASH SOLN CONC

Wash Solution (Solución de lavado), 1 vial, 30 mL (concentrado 40X),
Ver "Preparación de los Reactivos".

4.2 Equipamiento y material requerido pero no provisto

- Lector de microplacas calibrado (450 ± 10 nm) (ej. DIAsource Elisa Plate Reader)
- Micropipetas de precisión variable calibradas
- Papel absorbente
- Agua destilada
- Tubos para la dilución de estándares, controles y muestras
- Temporizador

4.3 Almacenamiento y estabilidad del kit

Cuando se almacena a 2 °C - 8 °C, los reactivos sin abrir mantienen su reactividad hasta la fecha de caducidad. No utilizar los reactivos más allá de esta fecha.

Los reactivos abiertos han de almacenarse a 2 °C - 8 °C. Las placas multipocillo han de almacenarse a 2 °C - 8 °C. Una vez se ha abierto la bolsa hay que tener cuidado y cerrarla de nuevo.

Los kits abiertos conservan su actividad durante 2 meses si se almacenan como se ha descrito arriba.

4.4 Preparación de los Reactivos

Dejar que todos los reactivos y el número requerido de tiras alcancen la temperatura ambiente antes de usarse.

Wash Solution

Mezclar 30 mL de Wash Solution concentrada con 1170 mL de agua desionizada hasta un volumen final de 1200 mL.
La solución del lavado diluida es estable durante 2 semanas a temperatura ambiente.

4.5 Eliminación del Kit

La eliminación del kit debe realizarse de acuerdo con las leyes nacionales. En las hojas de datos de seguridad se proporciona información especial de este producto (ver capítulo 13).

4.6 Kits de ensayo dañados

En caso de que exista cualquier daño severo del kit de ensayo o de sus componentes, ha de informarse por escrito a DIASOURCE IMMUNOASSAYS S.A., no mas tarde de una semana después de recibir el kit. No deben utilizarse componentes dañados para llevar a cabo un ensayo. Han de almacenarse hasta que se encuentre una solución. Después de esto, deben ser eliminados de acuerdo con las leyes oficiales.

5. MUESTRAS

En este ensayo pueden usarse suero o plasma (plasma EDTA, heparina o citrato).

El plasma EDTA y de citrato pueden dar resultados ligeramente inferiores.

Tener en cuenta: No deben usarse muestras que contengan acida sódica.

5.1 Toma de muestras

Suero:

Recoger la sangre por punción en la vena (ej. Sarstedt Monovette para el suero), permitir coagulación, y separar el suero por centrifugación a temperatura ambiente. No centrifugar antes de la coagulación completa. Las muestras de pacientes que reciben terapia anticoagulante requieren más tiempo para coagular.

Plasma:

Toda la sangre ha de recogerse en tubos de centrífuga que contengan anticoagulante y centrifugar inmediatamente tras la recogida.
(Ej. para plasma Heparina Sarstedt Monovette – tapa naranja - # 02.165.001)

5.2 Almacenamiento de las muestras

Las muestras deben ser tapadas y pueden ser almacenadas hasta 4 días a 2 °C - 8 °C antes del ensayo.

Las muestras almacenadas por un período de tiempo mas largo (hasta 3 meses) han de congelarse sólo una vez a -20°C antes del ensayo.
Las muestras descongeladas deben invertirse varias veces antes del ensayo.

5.3 Dilución de las muestras

Si en un ensayo inicial, se encuentra una muestra que presenta valores mayores que el estándar mas concentrado, ha de diluirse con Assay Buffer y volver a ensayarse como se describe en el Procedimiento de Ensayo.
Para el cálculo de las concentraciones habrá que tener en cuenta el factor de dilución.

Ejemplo:

- a) dilución 1:10: 10 µL muestra prediluido + 90 µL Assay Buffer (mezclar totalmente)
- b) dilución 1:100: 10 µL dilución a) 1:10 + 90 µL Assay Buffer (mezclar totalmente).

6. PROCEDIMIENTO DE ENSAYO

6.1 Consideraciones generales

- Todos los reactivos y muestras han de estar a temperatura ambiente (18°C a 25°C) antes de su uso. Todos los reactivos deben mezclarse sin formar espuma.
- Una vez se ha comenzado el ensayo deben completarse todos los pasos sin interrupción.
- Utilizar puntas de pipeta de plástico nuevas para cada estándar, control o muestra para evitar combinaciones cruzadas.
- La absorbancia es función del tiempo de incubación y la temperatura. Antes de comenzar el ensayo, se recomienda que todos los reactivos estén preparados, tapas removidas, todos los pocillos que se necesiten asegurados en recipiente, etc. Esto asegurará un tiempo similar para cada paso de pipeteo sin que haya interrupciones.
- Como regla general, la reacción enzimática es linealmente proporcional al tiempo y a la temperatura.
- El pipeteo de las muestras no debe exceder los 10 minutos para evitar desviaciones. Si se utiliza más de una placa en el mismo ensayo, se recomienda incluir una curva estándar en cada placa.

6.2 Predilución de estándares, controles y muestras

Antes del ensayo, todos los estándares, controles y muestras de pacientes deben diluirse 1+100 en tampón de ensayo.

Ejemplo: 10 µL muestra + 1000 µL Assay Buffer

Mezcle bien por 10 segundos. Es importante tener una mezcla completa en este paso.

Cada **50 µL** de estándares, controles y muestras prediluidos son necesarios para SHBG ELISA.

6.3 Procedimiento de ensayo

Cada uno debe incluir una curva de estándares.

1. Asegurar el número deseado de pocillos en el recipiente.
2. Dispensar 50 µL de cada Standard, Control y muestras prediluido con puntas nuevas en los pocillos adecuados.
3. Incubar durante 120 minutos a temperatura ambiente.
4. Sacudir energicamente el contenido de los pocillos.
Lavar los pocillos 3 veces con 300 µL - 400 µL Wash Solution diluida por pocillo. Realizar un golpe seco de los pocillos contra el papel absorbente para eliminar las gotas residuales.
Nota importante:
La sensibilidad y la precisión de este ensayo se ve marcadamente influenciada por la realización correcta del proceso de lavado!
5. Dispensar 100 µL de Enzyme Conjugate a cada pocillo.
6. Incubar durante 30 minutos a temperatura ambiente.
7. Sacudir energicamente el contenido de los pocillos.
Lavar los pocillos 3 veces con 300 µL - 400 µL Wash Solution diluida por pocillo. Realizar un golpe seco de los pocillos contra el papel absorbente para eliminar las gotas residuales.
8. Adicionar 100 µL de Substrate Solution a cada pocillo.
9. Incubar durante 15 minutos a temperatura ambiente.
10. Parar la reacción enzimática mediante la adición de 100 µL de Stop Solution a cada pocillo.
11. Leer la OD a 450 ± 10 nm con un lector de microplacas dentro de los 10 minutos después de la adición de la Stop Solution.

6.4 Cálculo de los Resultados

1. Calcular los valores de absorbancia media para cada conjunto de estándares, controles y muestras de pacientes.
2. Construir una curva estándar mediante la representación de la absorbancia media obtenida para cada estándar frente a su concentración con el valor de absorbancia en el eje vertical (Y) y la concentración en el eje horizontal (X).
3. Usando el valor de absorbancia media de cada muestra determinar la concentración correspondiente a partir de la curva estándar.
4. Método automatizado: Los resultados en las instrucciones de uso se han calculado automáticamente usando una curva de regresión 4 Parámetros. (4 Parámetros Rodbard o 4 Parámetros Marquardt son los métodos preferidos)
5. La concentración de las muestras puede leerse directamente de la curva de estándares. Las muestras con concentraciones superiores al mayor estándar han de diluirse. Para el cálculo de las concentraciones hay que tener en cuenta el factor de dilución.

6.4.1.1 Ejemplo de una Curva Estándar Típica

Los siguientes datos son solamente para la explicación y **no** pueden ser utilizados en lugar de los datos generados en el momento del ensayo.

Estándar	Unidades Ópticas (450 nm)
Standard 1 (0 nmol/L)	0.02
Standard 2 (4 nmol/L)	0.09
Standard 3 (16 nmol/L)	0.27
Standard 4 (32 nmol/L)	0.49
Standard 5 (65 nmol/L)	0.84
Standard 6 (130 nmol/L)	1.36
Standard 7 (260 nmol/L)	1.93

7. VALORES ESPERADOS

Se recomienda encarecidamente que cada laboratorio determine sus valores normales e inusuales.

En un estudio llevado a cabo con individuos aparentemente sanos , usando el DIASOURCE SHBG ELISA, se obtuvieron los siguientes valores:

Población	n	Media (nmol/L)	Mediana (nmol/L)	Percentil 2,5 - 97,5 (nmol/L)	Rango (min. - max.) (nmol/L)
Hombres	78	45,3	42,1	17,7 - 92,8	16,8 - 113,2
Mujeres	40	65,0	58,2	20,4 - 126,7	16,1 - 128,4

Los resultados obtenidos no deberían ser el único motivo para una intervención terapéutica. Los resultados han de correlacionarse con otras observaciones clínicas y tests de diagnóstico.

8. CONTROL DE CALIDAD

Se recomienda usar muestras control de acuerdo con las leyes estatales y federales. El uso de muestras control se recomienda para asegurar la validez diaria de los resultados. Usar controles tanto a niveles normal como patológico.

Los controles y los correspondientes resultados del Laboratorio de control de calidad están fijados en el certificado de control de calidad que acompaña al kit. Los valores y los rangos fijados en la hoja del control de calidad se refieren siempre al kit actual y deben usarse para la comparación directa de los resultados.

Es recomendable también hacer uso de programas de Aseguramiento de la Calidad nacionales o internacionales para asegurar la exactitud de los resultados.

Utilizar métodos estadísticos apropiados para el análisis de los valores y tendencia de los controles. Si los resultados del ensayo no se ajustan a los rangos aceptables establecidos en los controles, los resultados obtenidos de los pacientes han de considerarse inválidos.

En este caso, por favor comprobar las siguientes áreas técnicas: Pipeteo y tiempo empleado, fotómetro, fecha de caducidad de los reactivos, condiciones de almacenamiento e incubación, métodos de aspiración y lavado.

Después de comprobar los asuntos arriba mencionado sin encontrar ningún error, contactar con su distribuidor o con DIAsource ImmunoAssays S.A. directamente.

9. CARACTERÍSTICAS DEL ENSAYO

9.1 Rango dinámico del ensayo

El rango del ensayo se encuentra entre 0.408 – 260 nmol/L.

9.2 Especificidad de los Anticuerpos (Reactividad Cruzada)

Consultar el manual de usuario en inglés.

9.3 Sensibilidad Analítica

La sensibilidad analítica se calculó a partir de la media, mas dos veces la desviación estándar, de veinte (20) réplicas del Standard 0 y resultó ser 0,23 nmol/L.

El límite del blanco (LoB) es 0,23 nmol/L.

El Límite de Detección (LoD) es 0,408 nmol/L.

El Límite de Cuantificación (LoQ) es 0,757 nmol/L.

Para información sobre

9.4 Precisión

9.5 Recuperación

9.6 Linealidad

por favor consulte la versión detallada en inglés de las Instrucciones de Uso.

10. LIMITACIONES DE USO

Únicamente se obtendrán resultados fiables y reproducibles, cuando el procedimiento del ensayo se realice entendiendo las instrucciones de uso correctamente y desarrollando buenas prácticas de laboratorio.

Cualquier manejo impropio de las muestras o modificación del test puede influenciar los resultados. **Sustancias que pueden interferir**
Hemoglobina, Bilirrubina y Triglicéridos no influencian los resultados del ensayo.

10.1 Interferencias con drogas

Hemoglobina (hasta 4 mg/mL), Bilirrubina (hasta 0,5 mg/mL) y Triglicéridos (hasta 7,5 mg/mL) no influencian los resultados del ensayo.

10.2 Efecto de Alta Concentración (Gancho)

No se ha observado efecto gancho en este ensayo hasta 11350 nmol/L de SHBG.

11. ASPECTOS LEGALES

11.1 Fiabilidad de los Resultados

El ensayo debe realizarse exactamente de acuerdo a las instrucciones del fabricante. Mas aún, el usuario debe ajustarse estrictamente a las reglas BPL (Buenas Prácticas de Laboratorio) o a otros estándares y/o leyes nacionales aplicables. Esto es especialmente relevante para el uso de reactivos control. Es importante incluir siempre, dentro del procedimiento de ensayo, un número suficiente de controles para validar la exactitud y la precisión del ensayo.

Los resultados del ensayo son válidos sólo si todos los controles se encuentran dentro de los rangos especificados y si todos los otros parámetros del ensayo se encuentran dentro de las especificaciones dadas para el ensayo. En caso de alguna duda o inquietud, por favor, contactar con DIASOURCE IMMUNOASSAYS S.A.

11.2 Consecuencias Terapéuticas

Las consecuencias terapéuticas nunca deben basarse sólo en los resultados de laboratorio incluso si todos los resultados del ensayo están de acuerdo con los asuntos fijados en el punto 11.1. Cualquier resultado de laboratorio es solamente una parte del cuadro clínico de un paciente.

Solamente en los casos donde los resultados de laboratorio están en acuerdo con todo el cuadro clínico de un paciente, se pueden derivar consecuencias terapéuticas.

Nunca deben derivarse consecuencias terapéuticas a partir de solamente el resultado obtenido en el ensayo

11.3 Responsabilidad

Cualquier modificación del kit y/o cambio o mezcla de cualquier componente procedentes de kits de lotes diferentes puede afectar negativamente a los resultados esperados y en la validez de todo el test. Esas modificaciones y/o cambios invalidan cualquier reclamación de reposición.

Las reclamaciones emitidas debidas a una mala interpretación de los resultados de laboratorio por parte del comprador referidos al punto 11.2 son también inválidas. A pesar de todo, en el caso de cualquier reclamación, la responsabilidad del fabricante no excede el valor del kit. Cualquier daño provocado al kit durante su transporte no está sujeto a la responsabilidad del fabricante.

12. REFERENCIAS

1. Moore, JW and Bulbrook RD. The epidemiology and function of sex hormone binding globulin. IN Oxford Reviews of Reproductive Biology, 1988; 10: 180 - 236.
2. Selby, C. Sex hormone binding globulin: origin, function and clinical significance. Ann. Clin. Biochem. 1990; 27: 532 - 541.
3. Tehernof A, Despres JP: Sex steroid hormone, sex hormone-binding globulin, and obesity in men and women. Horm. Metab. Res. 2000; 32:526-536.
4. Kahn SM, Hryb DJ, Nakhle AM, Romas NA: Sex hormone-binding globulin is synthesized in target cells. J Endocrinol 2002; 175:113-120.
5. Hammond GL: Access of reproductive steroids to target tissues. Obstet Gynecol Clin North Am 2002; 29:411-423.
6. Elmlinger MW, Kuhnel W, Ranke MB: Reference ranges for serum concentrations of lutropin (LH), follitropin (FSH), estradiol (E2), prolactin, progesterone, sex hormone binding globulin (SHBG), dehydroepiandrosterone sulfate (DHEA-S), cortisol and ferritin in neonates, children, and young adults. Clin Chem Lab Med 2002; 40(11):1151-1160.
7. Deswal ., Yadav A, Dang AS Sex hormone binding globulin - an important biomarker for predicting PCOS risk: A systematic review and meta-analysis. Syst Biol Reprod Med 2018; 64: 12-24.
8. Sanches de Melo et al. Hormonal contraception in women with polycystic ovary syndrome: choices, challenges, and noncontraceptive benefits. Open Access J Contracept.2017; 2;8:13-23.
9. Pugeat et al. (2018) Hyperandrogenic states in women: pitfalls in laboratory diagnosis. Eur J Endocrin 2018; 178, 141-54.
10. Rothman MS, Wierman ME. How should postmenopausal androgen excess be evaluated? Clin Endocrinol 2011; 75(2):160-4.
11. Wu FCW et al. Identification of Late-Onset Hypogonadism in Middle-Aged and Elderly Men. N Engl J Med 2010; 363:123-35.
12. Tajar A et al. Characteristics of secondary, primary, and compensated hypogonadism in aging men: evidence from the European Male Ageing Study. J Clin Endocrinol Metab 2010 95(4):1810-8.

fecha de revisión : 2023-07-10