

Product information

Information about other products is available at: www.demeditec.com



SHBG ELISA



DE2996



96



Demeditec Diagnostics GmbH
Lise-Meitner-Strasse 2
24145 Kiel – Germany
www.demeditec.com

**Please use only the valid version of the Instructions for Use provided with the kit.
Verwenden Sie nur die jeweils gültige, im Testkit enthaltene, Gebrauchsanweisung.
Si prega di usare la versione valida delle istruzioni per l'uso a disposizione con il kit.
Por favor, se usa solo la version valida de la metodico técnico incluido aqui en el kit.
Utilisez seulement la version valide des Instructions d'utilisation fournies avec le kit.**

**Table of Contents / Inhaltsverzeichnis / Tabella die Contenuti / Tabla de Contenidos /
Sommaire**

1	INTRODUCTION	4
2	PRINCIPLE OF THE TEST	4
3	WARNINGS AND PRECAUTIONS	5
4	REAGENTS.....	6
5	SPECIMEN COLLECTION AND PREPARATION	7
6	ASSAY PROCEDURE	7
7	EXPECTED NORMAL VALUES	9
8	QUALITY CONTROL	9
9	PERFORMANCE CHARACTERISTICS	9
10	LIMITATIONS OF USE	11
11	LEGAL ASPECTS	11
1	EINLEITUNG	12
2	TESTPRINZIP	12
3	VORSICHTSMAßNAHMEN	12
4	BESTANDTEILE DES KITS	13
5	PROBENVORBEREITUNG	14
6	TESTDURCHFÜHRUNG	14
7	ERWARTETE WERTE.....	16
8	QUALITÄTSKONTROLLE.....	16
9	ASSAY-CHARAKTERISTIKA.....	16
10	GRENZEN DES TESTS.....	17
11	RECHTLICHE GRUNDLAGEN	17
1	INTRODUZIONE	18
2	PRINCIPIO DEL TEST	18
3	PRECAUZIONI.....	18
4	COMPONENTI DEL KIT	19
5	CAMPIONI.....	19
6	ATTUAZIONE DEL TEST	20
7	VALORI NORMALI.....	22
8	CONTROLLO QUALITÀ.....	22
9	CARATTERISTICHE DEL TEST.....	22
10	LIMITAZIONE DEL TEST.....	23
11	ASPETTI LEGALI	23

1	INTRODUCCIÓN	24
2	FUNDAMENTO DEL ENSAYO	24
3	PRECAUCIONES.....	24
4	COMPONENTES DEL KIT.....	25
5	MUESTRAS.....	26
6	PROCEDIMIENTO DE ENSAYO	26
7	VALORES ESPERADOS	28
8	CONTROL DE CALIDAD	28
9	CARACTERÍSTICAS DEL ENSAYO	28
10	LIMITACIONES DE USO	29
11	ASPECTOS LEGALES	29
1	INTRODUCTION.....	30
2	PRINCIPE DU TEST	30
3	PRECAUTIONS D'UTILISATION.....	30
4	COMPOSITION DU KIT	31
5	ECHANTILLON	31
6	RÉALISATION DU TEST	32
7	VALEURS ATTENDUES.....	34
8	CONTROLE DE QUALITE	34
9	CARACTERISTIQUES DU TEST	34
10	LIMITES D'UTILISATION.....	35
11	ASPECTS LEGAUX.....	35
12	REFERENCES / LITERATURE	36
	SYMBOLS USED WITH DEMEDITEC ASSAYS	36

1 INTRODUCTION

1.1 Intended Use

The **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)

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 ($FTI (\%) = (\text{total testosterone} / \text{SHBG}) \times 100$).

2 PRINCIPLE OF THE TEST

The 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. During the first incubation, SHBG in the added sample binds to the immobilized antibody. The simultaneously added enzyme conjugate, which contains an anti-SHBG antibody conjugated to horse-radish peroxidase, binds to the SHBG forming a sandwich complex. After a washing step to remove all unbound substances, the solid phase is incubated with the substrate solution. The colorimetric reaction is stopped by addition of stop solution, and optical density (OD) of the resulting yellow product is measured. The intensity of color is proportional to the concentration of the analyte in the sample.

A standard curve is constructed by plotting OD values against concentrations of standards, and concentrations of unknown samples are determined using this standard curve.

3 WARNINGS AND PRECAUTIONS

- This kit is for in vitro diagnostic use only. For professional use only.
- 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.
- Before starting the assay, read the instructions completely and carefully. Use the valid version of instructions for use provided with the kit. Be sure that everything is understood.
- 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.
- Pipetting of samples and reagents must be done as quickly as possible and in the same sequence for each step.
- 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.
- Mix the contents of the microplate wells thoroughly to ensure good test results. Do not reuse microwells.
- Do not let wells dry during assay; add reagents immediately after completing the rinsing steps.
- Allow the reagents to reach room temperature (18 °C to 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.
- Never pipet by mouth and avoid contact of reagents and specimens with skin and mucous membranes.
- Do not smoke, eat, drink or apply cosmetics in areas where specimens or kit reagents are handled.
- Wear disposable latex gloves when handling specimens and reagents. Microbial contamination of reagents or specimens may give false results.
- Handling should be done in accordance with the procedures defined by an appropriate national biohazard safety guideline or regulation.
- Do not use reagents beyond expiry date as shown on the kit labels.
- All indicated volumes have to be performed according to the protocol. Optimal test results are only obtained when using calibrated pipettes and microtiter plate readers.
- 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.
- Avoid contact with Stop Solution containing 0.5 M H₂SO₄. It may cause skin irritation and burns.
- Some reagents contain Proclin 300, BND and/or MIT as preservatives. In case of contact with eyes or skin, flush immediately with water.
- 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.
- Chemicals and prepared or used reagents have to be treated as hazardous waste according to the national biohazard safety guideline or regulation.
- For information on hazardous substances included in the kit please refer to Safety Data Sheets. Safety Data Sheets for this product are available upon request directly from DEMEDITEC.

4 REAGENTS

4.1 Reagents provided

1. **SORB MT Microtiterwells**, 12 x 8 (break apart) strips, 96 wells; Wells coated with anti-SHBG antibody (monoclonal).
2. **CAL 0 - 6 Standard (Standard 0 - 6)**, 7 vials, 0.5 mL each, ready to use; Concentrations: 0 - 4 - 16 - 32 - 65 - 130 - 260 nmol/L. The standards are calibrated against the following reference material: WHO International Standard for Sex Hormone Binding Globulin (08/266). Contain preservative.
3. **CONTROL low & high Control Low & High**, 2 vials, 0.5 mL each, ready to use; For control values and ranges please refer to vial label or QC-Datasheet. Contain preservative.
4. **BUF Assay Buffer**, 1 vial, 125 mL, ready to use; Contains preservative.
5. **ENZ CONJ Enzyme Conjugate**, 1 vial, 14 mL, ready to use; Anti-SHBG antibody conjugated with horseradish peroxidase; Contains preservative.
6. **SUB TMB Substrate Solution**, 1 vial, 14 mL, ready to use; Tetramethylbenzidine (TMB).
7. **STOP SOLN 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.
8. **WASH SOLN 40x Wash Solution**, 1 vial, 30 mL (40X concentrated); See "Reagent Preparation".

4.2 Materials required but not provided

- A microtiter plate calibrated reader (450 ± 10 nm)
- Calibrated variable precision micropipettes.
- Absorbent paper.
- Distilled or deionized water
- Tubes for dilution of standards, controls and samples
- Timer
- Graph paper or software for data reduction

4.3 Storage Conditions

When stored at 2 - 8 °C unopened reagents will retain reactivity until expiration date. Do not use reagents beyond this date. Opened reagents must be stored at 2 - 8 °C. Microtiter wells must be stored at 2 - 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 Preparation

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 1 week 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 Safety Data Sheet, section 13.

4.6 Damaged Test Kits

In case of any severe damage to the test kit or components, DEMEDITEC 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 and citrate plasma samples 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 (e.g. Sarstedt Monovette with the appropriate plasma preparation) and centrifuged immediately after collection.

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 2 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 than the highest standard, 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 prediluted 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 standard, 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 standard curve.

1. Secure the desired number of Microtiter wells in the frame holder.
2. Pipette **50 µL** of each prediluted (1+100) **Standard, Control** and **sample** with new disposable tips into appropriate wells.
3. Incubate for **120 minutes** at room temperature.
4. Wash the wells as follows:
 - If the wash step is performed manually:
Briskly shake out the contents of the wells.
Rinse the wells **3 times** with **300 µL** diluted *Wash Solution* per well.
 - If an automated plate washer is used:
Rinse the wells **3 times** with **400 µL** diluted *Wash Solution* per well.

At the end of the washing step, always strike the wells sharply on absorbent paper to remove residual droplet.

5. Add **100 µL Enzyme Conjugate** into each well.
Thoroughly mix for 10 seconds. It is important to have a complete mixing in this step.
6. Incubate for **30 minutes** at room temperature.
7. Wash the wells as follows:
 - If the wash step is performed manually:
Briskly shake out the contents of the wells.
Rinse the wells **3 times** with **300 µL** diluted *Wash Solution* per well.
 - If an automated plate washer is used:
Rinse the wells **3 times** with **400 µL** diluted *Wash Solution* per well.
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. Measure the optical density of the solution in each well at 450 nm filter (reading) and at 620 nm to 630 nm (background subtraction, recommended).
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 standards, controls and patient samples.
2. Using linear graph paper, construct a standard curve by plotting the mean absorbance obtained from each standard 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 standard curve.
4. Automated method: The results in the Instructions 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 standard curve. Samples with concentrations higher than that of the highest standard 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 Standard Curve

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

	Standard	Optical Units (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 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 DEMEDITEC 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	39	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 DEMEDITEC 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 DEMEDITEC ELISA was calculated by adding 2 standard deviations to the mean of 20 replicate analyses of the *Standard 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	4.7

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	5.2

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 DEMEDITEC 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	87.4
	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	96.1	93.8	94.2	96.2
	to	101.0	100.1	100.4	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 standards 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 DEMEDITEC.

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.

1 EINLEITUNG

Der **SHBG ELISA** wird zur quantitativen Bestimmung des Sexualhormon-bindenden Globulins (SHBG) in Serum oder Plasma (EDTA-, Heparin- oder Zitratplasma) eingesetzt.

Nur für In-vitro Diagnostik.

2 TESTPRINZIP

Der **SHBG ELISA** ist ein Festphasen-Enzymimmunoassay, der auf der **Sandwichtechnik** basiert. Die Wells der Mikrotiterplatten sind mit einem monoklonalen Antikörper (Maus) beschichtet, der gegen eine definierte Antikörper-Bindungsstelle des SHBG-Moleküls gerichtet ist.

Während der ersten Inkubation bindet das SHBG-Molekül in der zugegebenen Probe an den immobilisierten Antikörper. Die Konjugatlösung, die gleichzeitig zugegeben wird und einen an Meerrettichperoxidase konjugierten SHBG-Antikörper enthält, bindet an das SHBG unter Bildung eines Sandwich-Komplexes.

Nach einem Waschschrift, um alle ungebundenen Substanzen zu entfernen, wird die feste Phase mit der Substratlösung inkubiert. Die Farbreaktion wird durch die Zugabe der Stopplösung beendet und die optische Dichte (OD) des resultierenden gelben Produktes gemessen. Die Intensität der Farbe ist proportional zur Konzentration des Analyten in der Probe.

Durch Auftragen der OD-Werte gegen die Konzentrationen der Standards wird eine Standardkurve erstellt, und die Konzentrationen der unbekanntenen Proben werden anhand dieser Standardkurve bestimmt.

3 VORSICHTSMAßNAHMEN

- Dieser Kit ist nur zum in vitro diagnostischen Gebrauch geeignet.
- Nur die gültige, im Testkit enthaltene, Gebrauchsanweisung verwenden.
- Informationen zu im Kit enthaltenen gefährlichen Substanzen entnehmen Sie bitte dem Sicherheitsdatenblatt.
- Alle Bestandteile dieses Testkits, die humanes Serum oder Plasma enthalten, wurden mit FDA-geprüften Methoden auf HIV I/II, HbsAg und HCV getestet und als negativ bestätigt. Jedoch sollten alle Bestandteile im Umgang und bei der Entsorgung wie mögliche Gefahrenstoffe betrachtet werden.
- Der Kontakt mit der *Stop Solution* sollte vermieden werden, da sie 0,5 M H₂SO₄ enthält. Schwefelsäure kann Hautreizungen und Verbrennungen verursachen.
- Nicht mit dem Mund pipettieren und den Kontakt von Kitbestandteilen und Proben mit Haut und Schleimhäuten vermeiden.
- In den Bereichen, in denen Proben oder Kitbestandteile verwendet werden, nicht rauchen, essen oder Kosmetika verwenden.
- Beim Umgang mit Proben oder Reagenzien Einweg-Latexhandschuhe tragen. Die Verunreinigung von Reagenzien oder Proben mit Mikroben kann zu falschen Ergebnissen führen.
- Der Gebrauch sollte gemäß der Vorschriften einer entsprechenden nationalen Gefahrenstoff-Sicherheitsrichtlinie erfolgen.
- Reagenzien nicht nach dem auf dem Kit-Etikett angegebenen Verfallsdatum verwenden.
- Alle im Kit-Protokoll angegebenen Mengen müssen genau eingehalten werden. Optimale Ergebnisse können nur durch Verwendung kalibrierter Pipetten und Mikrotiterplatten-Lesegeräte erreicht werden.
- Komponenten von Kits mit unterschiedlichen Lotnummern nicht untereinander vertauschen. Es wird empfohlen, keine Wells von verschiedenen Platten zu verwenden, auch nicht, wenn es sich um das gleiche Lot handelt. Die Kits können unter anderen Bedingungen gelagert oder versendet worden sein, so dass die Bindungscharakteristik der Platten leicht unterschiedlich ausfällt.
- Chemikalien und zubereitete oder bereits benutzte Reagenzien müssen gemäß den nationalen Gefahrenstoffvorschriften wie gefährlicher Abfall behandelt werden.
- Sicherheitsdatenblätter für dieses Produkt sind auf Anfrage direkt von der Firma Demeditec Diagnostics GmbH erhältlich.

4 BESTANDTEILE DES KITS

4.1 Kitinhalt

1. **SORB MT Microtiterwells**, 96 Wells, 12 x 8 Wells (einzeln brechbar); Mit anti-SHBG-Antikörper (monoklonal) beschichtet.
2. **CAL 0 – 6 Standard (Standard 0 - 6)**, 7 Fläschchen, je 0,5 mL, gebrauchsfertig; ; Konzentrationen: 0 - 4 - 16 - 32 - 65 - 130 - 260 nmol/L. Die Standards sind gegen das folgende Referenzmaterial kalibriert: WHO International Standard for Sex Hormone Binding Globulin (08/266). Enthält Konservierungsmittel.
3. **CONTROL low & high Control Low & High** (Kontrolle), 2 Fläschchen, je 0,5 mL, gebrauchsfertig; Kontrollwerte und -bereiche entnehmen Sie bitte dem Fläschchenetikett oder dem QC-Datenblatt. Enthält Konservierungsmittel.
4. **BUF Assay Buffer** (Assaypuffer), 1 Fläschchen, 125 mL, gebrauchsfertig; Enthält Konservierungsmittel.
5. **ENZ CONJ Enzyme Conjugate** (Enzymkonjugat), 1 Fläschchen, 14 mL, gebrauchsfertig; Anti-SHBG-Antikörper mit Meerrettichperoxidase konjugiert; Enthält Konservierungsmittel.
6. **SUB TMB Substrate Solution** (Substratlösung), 1 Fläschchen, 14 mL, gebrauchsfertig; Substratlösung TMB.
7. **STOP SOLN Stop Solution** (Stopplösung), 1 Fläschchen, 14 mL, gebrauchsfertig; enthält 0,5 M H₂SO₄. Kontakt mit der Stopplösung vermeiden! Kann Hautreizungen und Verbrennungen verursachen.
8. **WASH SOLN 40x Wash Solution** (Waschlösung), 1 Fläschchen, 30 mL, **40X** konzentriert; Siehe „Vorbereitung der Reagenzien“.

4.2 Erforderliche aber nicht enthaltene Geräte und Materialien

- Kalibriertes Mikrotiterplattenlesegerät mit 450 ± 10 nm Filter)
- Kalibrierte variable Präzisions-Mikropipette
- Saugfähiges Papier
- Destilliertes Wasser
- Röhrchen zur Verdünnung von Standards, Kontrollen und Proben
- Laborwecker
- Millimeterpapier oder Software zur Datenauswertung

4.3 Lagerung und Haltbarkeit des Kits

Die ungeöffneten Reagenzien behalten bei Lagerung um 2 - 8 °C ihre Reaktivität bis zum Verfallsdatum. Nach dem Verfallsdatum die Reagenzien nicht mehr verwenden. Nach dem Öffnen sollten alle Reagenzien bei 2 - 8 °C gelagert werden. Die Mikrotiterwells sollten bei 2 - 8 °C gelagert werden. Der einmal geöffnete Folienbeutel sollte stets sehr sorgfältig wieder verschlossen werden. Unter den beschriebenen Lagerbedingungen behalten geöffnete Kits 2 Monate ihre Reaktivität.

4.4 Vorbereitung der Reagenzien

Alle Reagenzien sowie die benötigte Anzahl von Wells sollen vor dem Gebrauch auf Raumtemperatur gebracht werden.

Wash Solution

Die 40-fach konz. *Wash Solution* (30 mL) mit 1170 mL destilliertem Wasser auf ein Gesamtvolumen von 1200 mL verdünnen. *Die verdünnte Waschlösung ist bei Raumtemperatur für 1 Woche stabil.*

4.5 Entsorgung des Kits

Die Entsorgung des Kits muss gemäß den nationalen gesetzlichen Vorschriften erfolgen. Spezielle Informationen für dieses Produkt finden Sie im Sicherheitsdatenblatt, Abschnitt 13.

4.6 Beschädigte Testkits

Im Falle einer starken Beschädigung des Testkits oder der Komponenten muss die Firma DEMEDITEC in schriftlicher Form spätestens eine Woche nach Erhalt des Kits informiert werden. Stark beschädigte Einzelkomponenten sollten nicht für den Testlauf verwendet werden. Sie müssen gelagert werden bis eine endgültige Lösung gefunden wurde. Danach sollten Sie gemäß den offiziellen Richtlinien entsorgt werden.

5 PROBENVORBEREITUNG

Serum oder Plasma (EDTA-, Heparin- oder Zitratplasma) kann in diesem Test als Probenmaterial eingesetzt werden. EDTA- und Zitratplasma können etwas niedrigere Werte ergeben.

Achtung: Proben, die Natriumazid enthalten, sollten nicht verwendet werden.

5.1 Probenentnahme

Serum: Blut durch Venenpunktion entnehmen (z.B. mit Sarstedt Monovette für Serum), gerinnen lassen und das Serum durch Zentrifugation bei Raumtemperatur abtrennen. Vor der Zentrifugation muss die Gerinnung vollständig abgeschlossen sein. Bei Patienten, die Antikoagulantien erhalten, kann die Gerinnungszeit länger dauern.

Plasma: Die Blutentnahme erfolgt mit Röhren, die ein Antikoagulum enthalten (z.B.: Sarstedt Monovette – mit entsprechender Plasma-Präparierung). Das Plasma wird als Überstand nach einer Zentrifugation gewonnen.

5.2 Probenaufbewahrung

Proben sollten stets gut verschlossen sein und können vor Testbeginn bis zu 4 Tage bei 2 °C - 8 °C gelagert werden.

Für eine längere Aufbewahrung (bis zu 2 Monaten) sollten die Proben eingefroren bei -20 °C bis zum Testbeginn gelagert werden. Nur einmal einfrieren. Aufgetaute Proben sollten vor Testbeginn vorsichtig durchmischt werden, ohne Schaumbildung.

5.3 Probenverdünnung

Wenn in einem ersten Testdurchlauf bei einer Probe eine Konzentration höher als der höchste Standard gefunden wird, kann diese Probe mit *Assay Buffer* weiter verdünnt und nochmals bestimmt werden. Die Verdünnung muss jedoch bei der Berechnung der Konzentration beachtet werden.

Beispiel:

- a) Verdünnung 1:10: 10 µL vorverdünnte Probe + 90 µL *Assay Buffer* gründlich mischen)
- b) Verdünnung 1:100: 10 µL Verdünnung a) 1:10 + 90 µL *Assay Buffer* (gründlich mischen).

6 TESTDURCHFÜHRUNG

6.1 Allgemeine Hinweise

- Alle Reagenzien und Proben müssen vor Gebrauch auf Raumtemperatur (18 - 25 °C) gebracht und gut durchmischt werden. Dabei sollte Schaumbildung vermieden werden.
- Wenn die Testdurchführung einmal begonnen wurde, muss sie ohne Unterbrechung zu Ende geführt werden.
- Für jeden Standard, jede Kontrolle oder Probe eine neue Plastikspitze verwenden, um Verschleppungen zu vermeiden.
- Die Optische Dichte ist abhängig von Inkubationszeit und Temperatur. Deshalb ist es notwendig, vor Beginn der Testdurchführung alle Reagenzien in einen arbeitsbereiten Zustand zu bringen, die Deckel der Fläschchen zu öffnen, alle benötigten Wells in den Halter zu setzen. Nur eine solche Vorbereitung garantiert gleiche Zeiten für jeden Pipettiervorgang ohne Pausen.
- Als generelle Regel gilt, dass die enzymatische Reaktion linear proportional zu Zeit und Temperatur ist.

6.2 Vorverdünnung der Standards, Kontrollen und Proben

Vor dem Einsatz im Test müssen Standards, Kontrollen und Patientenproben **1+100** in Assaypuffer verdünnt werden.

Beispiel: 10 µL Probe + 1000 µL *Assay Buffer*

Für 10 Sekunden gut schütteln. Es ist sehr wichtig, in diesem Schritt eine komplette Durchmischung zu erreichen.

Jeweils **50 µL** der vorverdünnten Standards, Kontrollen und Proben werden für den SHBG ELISA benötigt.

6.3 Testdurchführung

Jeder Lauf muss eine Standardkurve beinhalten.

1. Die benötigte Anzahl Wells in der Halterung befestigen.
2. **Je 50 µL** vorverdünnte(n) Standard, Control und **Probe** mit neuen Plastikspitzen in die entsprechenden Wells pipettieren.
3. **120 Minuten** bei Raumtemperatur inkubieren.
4. Die Vertiefungen folgendermaßen waschen:
Wenn der Waschschrift manuell durchgeführt wird:
Den Inhalt der Wells kräftig ausschütteln.
Wells **3-mal** mit **300 µL** verdünnter *Wash Solution* pro Well waschen.

Bei Verwendung eines Waschautomaten:
Wells **3-mal** mit **300 µL** verdünnter *Wash Solution* pro Well waschen.

Am Ende des Waschschrifts die Vertiefungen immer kräftig auf saugfähigem Papier ausklopfen, um verbliebene Flüssigkeit zu entfernen.
5. **100 µL Enzyme Conjugate** in jedes Well geben.
6. **30 Minuten** bei Raumtemperatur inkubieren.
7. Die Vertiefungen folgendermaßen waschen:
Wenn der Waschschrift manuell durchgeführt wird:
Den Inhalt der Wells kräftig ausschütteln.
Wells **3-mal** mit **300 µL** verdünnter *Wash Solution* pro Well waschen.

Bei Verwendung eines Waschautomaten:
Wells **3-mal** mit **300 µL** verdünnter *Wash Solution* pro Well waschen.
8. **100 µL Substrate Solution** in jedes Well geben.
9. **15 Minuten** bei Raumtemperatur inkubieren.
10. Die enzymatische Reaktion durch Zugabe von **100 µL Stop Solution** in jedes Well abstoppen.
11. Die Optische Dichte (OD) der Lösung in jedem Well bei **450 nm (Messwellenlänge) und 620 nm oder 630 nm (Referenzwellenlänge für die empfohlene Hintergrundsubtraktion)** mit einem Mikrotiterplattenleser bestimmen.
Es wird empfohlen, die Vertiefungen **innerhalb von 10 Minuten** nach Zugabe der Stopplösung abzulesen.

6.4 Ergebnisermittlung

1. Die durchschnittlichen Werte der Optischen Dichte (OD) für jedes Set von Standards, Controls und Patientenproben bestimmen.
2. Eine Standardkurve ermitteln durch Auftragen der mittleren Optischen Dichte jedes Standards gegen die Konzentration, wobei der OD-Wert auf der vertikalen (Y) Achse und die Konzentration auf der horizontalen (X) Achse eingetragen wird.
3. Unter Verwendung der mittleren OD wird für jede Probe die entsprechende Konzentration aus der Standardkurve ermittelt.
4. Automatische Methode: Die in der Gebrauchsanweisung angegebenen Werte wurden automatisch mit Hilfe der 4 Parameter-Gleichung bestimmt. (4 Parameter Rodbard oder 4 Parameter Marquardt sind die bevorzugten Methoden.) Andere Auswertungsfunktionen können leicht abweichende Werte ergeben.
5. Die Konzentration der Proben kann direkt von der Standardkurve abgelesen werden. Proben, die eine höhere Konzentration als die des höchsten Standards enthalten, müssen verdünnt werden. Dieser Verdünnungsfaktor muss bei der Berechnung der Konzentration beachtet werden.

6.4.1 Beispiel für eine Standardkurve

Nachfolgend wird ein typisches Beispiel für eine Standardkurve mit dem DEMEDITEC ELISA gezeigt. Diese Werte sollten **nicht** zur Berechnung von Patientendaten verwendet werden.

Standard		Optische Dichte (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 ERWARTETE WERTE

Es wird empfohlen, dass jedes Labor seine eigenen normalen und abnormalen Werte ermittelt. In einer Studie mit dem DEMEDITEC SHBG ELISA wurden die Proben von scheinbar gesunden Probanden OR scheinbar gesunden Erwachsenen untersucht. Dabei ergaben sich folgende Werte:

Population	n	Mittelwert (nmol/L)	Median (nmol/L)	2,5. - 97,5. Perzentile (nmol/L)	Bereich (min. - max.) (nmol/L)
Männer	78	45,3	42,1	17,7 - 92,8	16,8 - 113,2
Frauen	39	65,0	58,2	20,4 - 126,7	16,1 - 128,4

Die mit diesem Testkit erzielten Ergebnisse sollten niemals als alleinige Grundlage für therapeutische Konsequenzen dienen. Die Ergebnisse müssen zusammen mit anderen klinischen Befunden und diagnostischen Tests des Patienten interpretiert werden.

8 QUALITÄTSKONTROLLE

Es wird empfohlen, die Kontrollproben gemäß den nationalen gesetzlichen Bestimmungen einzusetzen. Durch die Verwendung von Kontrollproben wird eine Tag-zu-Tag Überprüfung der Ergebnisse erzielt. Es sollten Kontrollen sowohl mit normalem als auch pathologischem Level eingesetzt werden. Die Kontrollen mit den entsprechenden Ergebnissen des QC-Labors sind im QC-Zertifikat, das dem Kit beiliegt, aufgeführt. Die im QC-Blatt angegebenen Werte und Bereiche beziehen sich stets auf die aktuelle Kitcharge und sollten zum direkten Vergleich der Ergebnisse verwendet werden.

Es wird ebenfalls empfohlen, an nationalen oder internationalen Qualitätssicherungs-Programmen teilzunehmen, um die Genauigkeit der Ergebnisse zu sichern.

Es sollten geeignete statistische Methoden zur Analyse von Kontroll-Werten und Trends angewendet werden. Wenn die Ergebnisse des Assays nicht mit den angegebenen Akzeptanzbereichen des Kontrollmaterials übereinstimmen, sollten die Patientenergebnisse als ungültig eingestuft werden.

In diesem Fall überprüfen Sie bitte die folgenden Bereiche: Pipetten und Zeitnehmer, Photometer, Verfallsdatum der Reagenzien, Lagerungs- und Inkubationsbedingungen, Absaug- und Waschmethode.

Sollten Sie nach Überprüfung der vorgenannten Bereiche keinen Fehler erkannt haben, setzen Sie sich bitte mit Ihrem Lieferanten oder direkt mit der Firma DEMEDITEC in Verbindung.

9 ASSAY-CHARAKTERISTIKA

9.1 Messbereich

Der Messbereich des Testes liegt zwischen 0,408 - 260 nmol/L.

9.2 Spezifität der Antikörper (Kreuzreaktivität)

Die Daten entnehmen Sie bitte der ausführlichen englischen Arbeitsanleitung.

9.3 Sensitivität

Die analytische Sensitivität, definiert als Mittelwert, zuzüglich der zweifachen Standardabweichung, des *Standard 0*

(n = 20), beträgt 0,23 nmol/L.

Der „Limit of Blank“ (LoB) ist 0,23 nmol/L.

Die Nachweisgrenze (LoD) ist 0,408 nmol/L.

Die Quantifizierungsgrenze (LoQ) ist 0,757 nmol/L.

Die Daten zu:

9.4 Reproduzierbarkeit (Präzision)

9.5 Wiederfindung

9.6 Linearität

entnehmen Sie bitte der ausführlichen englischen Version der Gebrauchsanweisung.

10 GRENZEN DES TESTS

Zuverlässige und reproduzierbare Ergebnisse werden erzielt, wenn das Testverfahren mit vollständigem Verständnis der Anweisungen in der Gebrauchsanleitung und unter Befolgung der GLP (Good Laboratory Practice)-Richtlinien durchgeführt wird. Jede unsachgemäße Behandlung von Proben oder Modifikation dieses Tests können die Ergebnisse beeinflussen.

10.1 Interferenzen

Hämoglobin (bis zu 4 mg/mL), Bilirubin (bis zu 0,5 mg/mL) und Triglyceride (bis zu 7,5 mg/mL) haben keinen Einfluss auf das Testergebnis.

10.2 Beeinflussung durch Medikamente

Bislang sind uns keine Substanzen (Medikamente) bekannt geworden, die einen Einfluss auf die Bestimmung von SHBG in einer Probe haben.

10.3 High-Dose-Hook Effekt

Ein Hook-Effekt tritt in diesem Test bis zu einer Konzentration von 11350 nmol/L SHBG nicht auf.

11 RECHTLICHE GRUNDLAGEN

11.1 Zuverlässigkeit der Ergebnisse

Der Test muss exakt gemäß der Testanleitung des Herstellers abgearbeitet werden. Darüber hinaus muss der Benutzer sich strikt an die Regeln der GLP (Good Laboratory Practice) oder andere eventuell anzuwendende Regeln oder nationale gesetzliche Vorgaben halten. Dies betrifft besonders den Gebrauch der Kontrollreagenzien. Es ist sehr wichtig, bei der Testdurchführung stets eine ausreichende Anzahl Kontrollen zur Überprüfung der Genauigkeit und Präzision mitlaufen zu lassen.

Die Testergebnisse sind nur gültig, wenn alle Kontrollen in den vorgegebenen Bereichen liegen, und wenn alle anderen Testparameter die vorgegebenen Spezifikationen für diesen Assay erfüllen. Wenn Sie bezüglich eines Ergebnisses Zweifel oder Bedenken haben, setzen Sie sich bitte mit der Firma DEMEDITEC in Verbindung.

11.2 Therapeutische Konsequenzen

Therapeutische Konsequenzen sollten keinesfalls nur aufgrund von Laborergebnissen erfolgen, selbst dann nicht, wenn alle Testergebnisse mit den in 11.1 genannten Voraussetzungen übereinstimmen. Jedes Laborergebnis ist nur ein Teil des klinischen Gesamtbildes eines Patienten.

Nur in Fällen, in denen die Laborergebnisse in akzeptabler Übereinstimmung mit dem allgemeinen klinischen Bild des Patienten stehen, sollten therapeutische Konsequenzen eingeleitet werden.

Das Testergebnis allein sollte niemals als alleinige Grundlage für die Einleitung therapeutischer Konsequenzen dienen.

11.3 Haftung

Jegliche Veränderungen des Testkits und/oder Austausch oder Vermischung von Komponenten unterschiedlicher Chargen von einem Testkit zu einem anderen, können die gewünschten Ergebnisse und die Gültigkeit des gesamten Tests negativ beeinflussen. Solche Veränderungen und/oder Austausch haben den Ausschluss jeglicher Ersatzansprüche zur Folge.

Reklamationen, die aufgrund von Falschinterpretation von Laborergebnissen durch den Kunden gemäß Punkt 11.2 erfolgen, sind ebenfalls abzuweisen. Im Falle jeglicher Reklamation ist die Haftung des Herstellers maximal auf den Wert des Testkits beschränkt. Jegliche Schäden, die während des Transports am Kit entstanden sind, unterliegen nicht der Haftung des Herstellers.

1 INTRODUZIONE

Il test immuno-enzimatico **SHBG ELISA** contiene materiale per la determinazione quantitativa di SHBG (globulina legante degli ormoni sessuali, sex-hormone-binding globulin) in siero o plasma (plasma EDTA, eparina o citrato).

Questo test kit è adatto soltanto per l'uso diagnostico.

2 PRINCIPIO DEL TEST

Il test SHBG ELISA è un dosaggio immuno-assorbente legato a un enzima a fase solida (ELISA) basato sul principio del legame competitivo.

I pozzetti per microtitolazione sono rivestiti con un anticorpo monoclonale (topo) diretto verso un sito antigenico unico della molecola di SHBG. Durante la prima incubazione, l'analita SHBG nel campione aggiunto compete con il coniugato enzimatico aggiunto, che è SHBG coniugato alla perossidasi di rafano, per legarsi all'anticorpo rivestito. Dopo una fase di lavaggio per rimuovere tutte le sostanze non legate, la fase solida viene incubata con la soluzione di substrato. La reazione colorimetrica viene bruscamente interrotta con l'aggiunta di soluzione di arresto e viene misurata la densità ottica (DO) del prodotto giallo risultante. L'intensità della colorazione è inversamente proporzionale alla concentrazione dell'analita nel campione. Una curva standard viene costruita tracciando i valori di DO rispetto alle concentrazioni di standard; le concentrazioni di campioni sconosciuti vengono determinate usando questa curva standard.

3 PRECAUZIONI

- Questo kit è adatto soltanto per l'uso diagnostico in vitro.
- Si prega di usare la versione valida dell'inserito del pacco a disposizione con il kit.
- Informazioni su sostanze pericolose contenute nel kit sono riportate nel regolamento di sicurezza.
- Tutti i componenti del kit che contengono siero o plasma umano sono controllati e confermati negativi per la presenza di HIV I/II, HbsAg e HCV con metodi conformi alle norme FDA. Ciononostante tutti i componenti dovrebbero essere trattati come potenziali sostanze nocive nella manutenzione e nello smaltimento.
- Il contatto con la *Stop Solution* dovrebbe essere evitato perché contiene 0,5 M H₂SO₄. L'acido solforico può provocare irritazioni cutanee e ustioni.
- Non pipettare con la bocca ed evitare il contatto con componenti del kit con la pelle o con le mucose.
- Nelle aree in cui il test viene utilizzato non fumare, mangiare, bere o fare uso di prodotti cosmetici.
- Nella manutenzione dei campioni o reagenti del kit portare guanti di latex monouso. La contaminazione dei reagenti o dei campioni con microbi può dare risultati falsi.
- L'utilizzo dovrebbe avvenire secondo regole che seguono le rispettive norme di sicurezza nazionali sulle sostanze nocive.
- Non utilizzare i reagenti dopo la scadenza indicata sul kit.
- Ogni indicazione sulla quantità indicata del protocollo del kit deve essere accuratamente seguito. Risultati ottimali possono essere ottenuti soltanto con l'uso di pipette calibrate e spettrofotometro calibrato.
- Componenti del kit con numeri di lotto diversi non devono essere combinati. È consigliabile di non utilizzare pozzetti di piastre diversi, anche se si tratta dello stesso lotto. I kit potrebbero essere stati immagazzinati o spediti a condizioni diverse, cosicché le caratteristiche di legame potrebbero divergere leggermente.
- I componenti chimici e reagenti preparati o già utilizzati devono essere trattati e smaltiti secondo le norme di sicurezza nazionali sulle sostanze nocive.
- I regolamenti di sicurezza di questo prodotto possono essere richiesti direttamente dalla ditta Demeditec Diagnostics GmbH.

4 COMPONENTI DEL KIT

4.1 Contenuto del kit

1. **SORB MT Microtiterwells** (Micropozzetti), 12 x 8 file (separatamente staccabili), 96 pozzetti; Pozzetti ricoperti con l'anti-SHBG anticorpo (monoclonale)
2. **CAL 0 – 6 Standard (Standard 0 - 6)**, 7 flaconi, 0,5 mL ognuno, pronto all'uso; Concentrazione: 0 - 4 - 16 - 32 - 65 - 130 - 260 nmol/L. Gli standard sono standardizzati contro il seguente materiale di riferimento: WHO International Standard for Sex Hormone Binding Globulin (08/266). Contiene conservante.
3. **CONTROL low & high Control Low & High** (Controllo), 2 flaconi, 0,5 mL ognuno, pronto all'uso; I valori dei controlli sono indicati sull'etichetta dei flaconi o sulla descrizione QC. Contiene conservante.
4. **BUF Assay Buffer** (Tampone del test), 1 flacone, 125 mL, pronto all'uso; Contiene conservante senza mercurio
5. **ENZ CONJ Enzyme Conjugate** (Tracciante enzimatico), 1 flacone, 14 mL, pronto all'uso; Anti-SHBG anticorpo coniugato alla perossidasi di rafano; Contiene conservante.
6. **SUB TMB Substrate Solution** (Soluzione di substrato), 1 flacone, 14 mL, pronto all'uso; TMB (benzidine tetrametilico).
7. **STOP SOLN Stop Solution** (Soluzione d'arresto), 1 flacone, 14 mL, pronto all'uso; Contiene 0,5 M H₂SO₄. Evitare il contatto con la soluzione d'arresto. Può causare irritazioni cutanee e ustioni.
8. **WASH SOLN 40x Wash Solution** (Soluzione di lavaggio), 1 flacone, 30 mL (concentrata 40X); vedi „preparazione dei reagenti“.

4.2 Materiali richiesti ma non contenuti nel kit

- Uno spettrofotometro calibrato per micropozzetti (450 ± 10 nm)
- Micropipette calibrate di precisione a volume variabile
- Carta assorbente
- Acqua distillata
- Provetti per la diluizione di standard, controlli e campioni
- Timer
- Carta millimetrata o software per la riduzione dei dati

4.3 Magazzinaggio e stabilità del kit

A 2 °C - 8 °C i reagenti non aperti rimangono reattivi fino alla data di scadenza indicata. Non usare reagenti oltre questa data.

Tutti i reagenti aperti devono essere magazzinati a 2 °C - 8 °C. I micropozzetti devono essere magazzinati a 2 °C - 8 °C. Una volta aperti i pacchi, questi devono essere richiusi accuratamente.

Test kits aperti rimangono attivi per 2 mesi se magazzinati alle condizioni sopra descritte.

4.4 Preparazione dei reagenti

Prima dell'uso portare tutti i reagenti e il numero necessario di pozzetti a temperatura ambiente.

Wash Solution

Diluire 30 mL *Wash Solution* concentrata con 1170 mL di acqua deionizzata fino ad un volume finale di 1200 mL.

La soluzione di lavaggio diluita è stabile per 1 settimana a temperatura ambiente.

4.5 Smaltimento del kit

Lo smaltimento del kit deve avvenire secondo le regole a norma di legge. Informazioni particolareggiate per questo prodotto si trovano nel regolamento di sicurezza, capitolo 13.

4.6 Test kits danneggiati

Nel caso di gravi danneggiamenti del kit o dei suoi componenti deve avvenire una dichiarazione scritta alla ditta DEMEDITEC, al più tardi una settimana dopo il ricevimento del kit. Componenti danneggiati non dovrebbero essere utilizzati per il test. Questi componenti devono essere magazzinati fino alla soluzione del problema. Dopo di che essi devono essere smaltiti secondo le norme ufficiali.

5 CAMPIONI

Siero o plasma (plasma EDTA, eparina o citrato) può essere usato per questo test.

Il plasma EDTA e citrato possono dare risultati leggermente inferiori.

Attenzione: Se i campioni contengono sodio azide non devono essere utilizzati per questo test.

5.1 Collezione dei campioni

Siero: Collezionare sangue tramite puntura venale (p.es. Sarstedt Monovette per siero), far coagulare e separare il siero centrifugando a temperatura ambiente. Non centrifugare prima che la coagulazione sia completata. Campioni di pazienti con una terapia anti-coagulante possono richiedere più tempo per la coagulazione.

Plasma: Il sangue dovrebbe essere collezionato in tubetti da centrifuga contenenti un anticoagulante (p. es. Sarstedt Monovette con un'adeguata preparazione per il plasma) e centrifugando immediatamente dopo la puntura.

5.2 Magazzinaggio dei campioni

I campioni dovrebbero essere magazzinati ben chiusi fino a 4 giorni a 2 °C - 8 °C. Campioni magazzinati per un periodo più lungo (fino a 2 mesi) dovrebbero essere congelati solo una volta a -20 °C prima dell'analisi. Congelare soltanto una volta. Invertire campioni scongelati alcune volte prima dell'uso.

5.3 Diluizione dei campioni

Se in un campione di siero viene trovata una concentrazione oltre lo standard più alto, questo campione può essere diluito con *Assay Buffer* e nuovamente determinato. Della diluizione deve essere però tenuto conto.

Esempio:

- a) diluizione 1:10: 10 µL campione prediluito + 90 µL *Assay Buffer* (agitare bene)
- b) diluizione 1:100: 10 µL della diluizione a) + 90 µL *Assay Buffer* (agitare bene)

6 ATTUAZIONE DEL TEST

6.1 Indicazioni generali

- Tutti i reagenti e i campioni devono essere portati a temperatura ambiente (18 °C a 25 °C) e ben mescolati prima dell'uso. Evitare la formazione di schiume.
- Una volta iniziato il procedimento del test, questo deve essere portato alla fine senza interruzione.
- Per ogni componente, standard, controllo o campione è necessario utilizzare una nuova punta monouso per evitare reazioni incrociate.
- La densità ottica dipende dal tempo d'incubazione e dalla temperatura. Perciò si rende necessario di preparare tutti i reagenti, di aprire i tappi dei flaconi e di appostare tutti i pozzetti nelle appropriate posizioni. Soltanto una tale preparazione garantisce gli stessi tempi per ogni processo di pipetamento.
- Come regola generale vale che la reazione enzimatica si svolge linearmente proporzionale con il tempo e con la temperatura.

6.2 Prediluizione di standard, controlli e campioni

Prima dell'analisi, tutti gli standard, i controlli e i campioni dei pazienti devono essere diluiti **1+100** nel tampone del test.

Esempio: 10 µL campione + 1000 µL *Assay Buffer*

Mescolare bene per 10 secondi. È importante avere una miscelazione completa in questo passaggio.

Ogni **50 µL** di standard, controlli e campioni prediluiti sono richiesti per SHBG ELISA.

6.3 Esecuzione del test

Ogni analisi deve includere una curva standard.

1. Fissare i pozzetti necessari sul supporto.
2. Pipettare **50 µL** di ogni **Standard, Control e campione prediluito** nei pozzetti, cambiando ogni volta la punta monouso.
3. Incubare per **120 minuti** a temperatura ambiente.
4. Lavare i pozzetti nel modo seguente:
Qualora la fase di lavaggio venga eseguita manualmente:
Agitare energicamente il contenuto dei pozzetti.
Risciacquare ogni pozzetto **3 volte** con **300 µL** di soluzione di lavaggio diluita.
Qualora si usi un dispositivo di lavaggio di micropiastre automatizzato:
Risciacquare ogni pozzetto **3 volte** con **300 µL** di soluzione di lavaggio diluita.
Al termine della fase di lavaggio, scuotere sempre energicamente i pozzetti su carta assorbente per rimuovere le gocce residue.
5. Pipettare **100 µL Enzyme Conjugate** in ogni pozzetto.
6. Incubare per **30 minuti** a temperatura ambiente.
7. Lavare i pozzetti nel modo seguente:
Qualora la fase di lavaggio venga eseguita manualmente:
Agitare energicamente il contenuto dei pozzetti.
Risciacquare ogni pozzetto **3 volte** con **300 µL** di soluzione di lavaggio diluita.
Qualora si usi un dispositivo di lavaggio di micropiastre automatizzato:
Risciacquare ogni pozzetto **3 volte** con **300 µL** di soluzione di lavaggio diluita.
8. Aggiungere **100 µL** della **Substrate Solution** ad ogni pozzetto.
9. Incubare per **15 minuti** a temperatura ambiente.
10. Fermare la reazione enzimatica aggiungendo **100 µL** della **Stop Solution** ad ogni pozzetto.
11. Misurare la densità ottica (DO) della soluzione in tutti i pozzetti a **450 nm (lunghezza d'onda di misurazione) e a 620 nm o 630 nm (lunghezza d'onda di riferimento per la sottrazione dello sfondo raccomandata)** utilizzando un lettore per piastre per microtitolazione.

6.4 Rilevamento dei risultati

1. Determinare i valori medi della densità ottica per ogni set di standard, controlli e campioni.
2. Costruire una curva standard: riportare i valori medi della densità ottica (OD) di ogni standard contro la rispettiva concentrazione dove i valori delle OD si devono trovare sull'asse verticale (Y) e le concentrazioni sull'asse orizzontale (X).
3. Utilizzando il valore medio delle OD per ogni campione si determina la rispettiva concentrazione dalla curva standard.
4. Metodo automatico: I valori riportati in queste istruzioni per l'uso sono stati determinati tramite l'equazione a 4 parametri. (I metodi preferiti sono 4 Parameter Rodbard oppure 4 Parameter Marquardt.) Altri funzioni usati per l'elaborazione dei dati possono dare risultati leggermente differenti.
5. La concentrazione dei campioni può essere determinata direttamente dalla curva standard. Campioni con una concentrazione più elevata dello standard più concentrato devono essere diluiti. Di questo fattore di diluizione deve essere tenuto conto per il calcolo della concentrazione.

6.4.1 Esempio di una curva standard tipica

I seguenti dati sono a scopo dimostrativo soltanto e **non possono** sostituire i dati generati dall'esecuzione del test.

Standard		Densità ottiche (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 VALORI NORMALI

È consigliabile che ogni laboratorio determini i propri valori normali e anormali.

In uno studio condotto con soggetti apparentemente sani, usando il DEMEDITEC SHBG ELISA, i seguenti valori sono stati trovati:

Popolazione	n	Media (nmol/L)	Mediano (nmol/L)	2,5. - 97,5. percentile (nmol/L)	Intervallo (min. - max.) (nmol/L)
Uomini	78	45,3	42,1	17,7 - 92,8	16,8 - 113,2
Donne	39	65,0	58,2	20,4 - 126,7	16,1 - 128,4

Come per tutti i test diagnostici, una diagnosi clinica definitiva **non** dovrebbe basarsi sui risultati di un singolo dosaggio.

Una diagnosi clinica dovrebbe essere formulata dal medico in seguito ad un'attenta valutazione di tutti gli aspetti clinici assieme ai dati di laboratorio.

8 CONTROLLO QUALITÀ

È consigliabile utilizzare i campioni controllo secondo le norme di legge. Attraverso l'utilizzo dei campioni controllo si può raggiungere una verifica dei risultati giorno per giorno. Dovrebbero essere adoperati campioni controllo sia con un livello normale sia con uno patologico.

Le referenze con i rispettivi risultati del laboratorio QC sono elencati nel QC certificato, che è allegato al kit. I valori riportati nel QC certificato si riferiscono al lotto del kit attuale e dovrebbero essere utilizzati per un raffronto dei risultati.

È altresì consigliabile di partecipare a programmi di sicurezza sulla qualità nazionali o internazionali, per assicurarsi dell'esattezza dei risultati.

Appropriati metodi statistici per l'analisi dei valori controllo e delle rappresentazioni grafici dovrebbero essere adoperati. Nel caso che i risultati del test non combaciano con il campo di accettazione indicato dal materiale di controllo, i risultati dei pazienti devono essere considerati invalidi. In questo caso si prega di controllare i seguenti fattori d'errore: pipette, cronometri, fotometro, data di scadenza dei reagenti, condizione di magazzinaggio e d'incubazione, metodi di aspirazione e di lavaggio.

Se dopo il controllo dei suddetti fattori non è rilevabile alcun errore, si prega di contattare il fornitore o direttamente la ditta DEMEDITEC.

9 CARATTERISTICHE DEL TEST

9.1 Assay Dynamic Range

Le concentrazioni determinabili con questo test stanno tra 0,408 - 260 nmol/L.

9.2 Specificità degli anticorpi (reazioni ad incrocio)

Per dettagli più precisi consultare la metodica in inglese.

9.3 Sensitività analitica

La sensitività analitica è stata calcolata dai valori medi, più due volte la deviazione standard, di venti (20) repliche dello *Standard 0* ed erano 0,23 nmol/L.

Il limite del bianco (LoB) è 0,23 nmol/L.

Il limite di rilevabilità (LoD) è 0,408 nmol/L.

Il limite di quantificazione (LoQ) è 0,757 nmol/L.

Dati dettagliati su

9.4 Precisione

9.5 Recupero

9.6 Linearità

si prega di consultare le dettagliate istruzioni per l'uso in inglese.

10 LIMITAZIONE DEL TEST

Risultati affidabili e riproducibili saranno ottenuti quando il procedimento del test è seguito con una comprensione completa delle istruzioni all'uso e seguendo una buona pratica di laboratorio (GLP). Ogni manutenzione impropria dei campioni o modificazione al saggio può influenzare i risultati.

10.1 Sostanze interferenti

Emoglobina (fino a 4 mg/mL), bilirubina (fino a 0,5 mg/mL) e trigliceridi (fino a 7,5 mg/mL) non influenzano i risultati di questo test.

10.2 Droghe interferenti

Fino ad oggi nessuna sostanza (farmaco) è conosciuta a noi che abbia influenzato la determinazione di SHBG nel campione.

10.3 Effetto Hook (Gancio) ad alto dosaggio

Nessun effetto Hook (gancio) è stato osservato in questo prodotto fino a 11350 nmol/L di SHBG.

11 ASPETTI LEGALI

11.1 Affidabilità dei risultati

Il test deve essere eseguito esattamente secondo il protocollo dato dal produttore. Inoltre l'utente deve seguire le regole del GLP (Good Laboratory Practice) o eventualmente altre regole comportamentali o disposizioni legali. Questo vale soprattutto per l'uso delle referenze. È molto importante utilizzare un numero appropriato di referenze in parallelo ai campioni test per poter controllare l'esattezza e la precisione del test.

I risultati del test sono validi soltanto se tutte le referenze cadono nei margini prestabiliti e se tutti gli altri parametri del test soddisfano la specificazione per questo test. Se esistono dubbi o domande su questi risultati, si prega di contattare la ditta DEMEDITEC.

11.2 Conseguenze terapeutiche

Soltanto sulla base dei risultati dei laboratori non dovrebbero essere intraprese delle conseguenze terapeutiche di alcun tipo, anche se i risultati del test sono d'accordo con gli aspetti articolati nel punto 11.1. Ogni risultato di laboratorio è soltanto una parte di un quadro clinico completo di un paziente. Soltanto in casi in cui i risultati di un test del laboratorio si accordano con il quadro clinico dell'ammalato, si possono intraprendere delle conseguenze terapeutiche.

Il risultato del test da solo non è base sufficiente per lo stabilimento di una terapia.

11.3 Responsabilità legali

Ogni cambiamento del protocollo del test e/o lo scambio o il mescolamento di componenti provenienti da cariche diverse possono influenzare negativamente i risultati e compromettere la validità del test. Questi cambiamenti e/o scambi annullano ogni diritto al risarcimento.

Si respingano inoltre tutti i richiami risultanti da interpretazioni sbagliate da parte dell'utente secondo il paragrafo 11.2. Nel caso di reclamazione, la garanzia del produttore è limitato al valore massimo del test kit. Ogni danno provocato durante il trasporto del kit non sottostà alla responsabilità del produttore.

1 INTRODUCCIÓN

El **Kit de inmunoensayo enzimático DEMEDITEC 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 DEMEDITEC SHBG ELISA es un ensayo inmunoabsorbente ligado a enzimas (ELISA) en fase sólida basado en el principio de sándwich.

Los pocillos de microtítulo están recubiertos de un anticuerpo monoclonal (ratón) que tiene como diana una única zona antigénica de la molécula de SHBG. Durante la primera incubación, el SHBG de la muestra añadida se une al anticuerpo inmovilizado. El conjugado enzimático añadido simultáneamente, que contiene un anticuerpo de anti-SHBG conjugado con peroxidasa de rábano, se une al SHBG para formar un compuesto de tipo sándwich. Tras un proceso de lavado para eliminar cualquier sustancia sin unir, la fase sólida se incuba con la solución de sustrato. La reacción colorimétrica se detiene añadiendo una solución de parada, y se realiza una medición de la densidad óptica (DO) del producto amarillo resultante. La intensidad del color es proporcional a la concentración del analito en la muestra. Se crea una curva estándar cotejando los valores de DO con las concentraciones de estándares, y las concentraciones de las muestras desconocidas se determinan usando esta curva estándar.

3 PRECAUCIONES

- Este kit es solamente para diagnóstico *in vitro*.
- Por favor, se usa solo la versión válida de la metodología técnica incluido 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 H₂SO₄ 0,5 M. Puede provocar irritación y quemaduras en la piel.
- Nunca pipetear 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 Demeditec Diagnostics GmbH.

4 COMPONENTES DEL KIT

4.1 Componentes del Kit

1. **SORB** **MT** **Microtiterwells** (Placas multipocillo), 12 x 8 tiras separables, 96 pocillos; Pocillos recubiertos con anticuerpo anti-SHBG (monoclonal).
2. **CAL** **0 - 6** **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** **low & high** **Control Low & High** (Control), 2 viales, 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. **BUF** **Assay Buffer** (Tampón de ensayo), 1 vial, 125 mL, listo para usar; Contiene conservante.
5. **ENZ** **CONJ** **Enzyme Conjugate** (Conjugado enzimático), 1 vial, 14 mL, listo para usar; Anticuerpo anti-SHBG conjugado con la Peroxidasa de rábano; Contiene conservante.
6. **SUB** **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 0.5 M H₂SO₄. Evitar el contacto con la Solución de parada. Puede causar irritación y quemaduras en al piel.
8. **WASH** **SOLN** **40x** **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)
- Micropipetas de precisión variable calibradas
- Papel absorbente
- Agua destilada
- Tubos para la dilución de estándares, controles y muestras
- Temporizador
- Papel cuadriculado o software para la reducción de datos

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 1 semana 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 DEMEDITEC, 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 centrifuga que contengan anticoagulante (Ej. Sarstedt Monovette con una preparación adecuada para el plasma) y centrifugar inmediatamente tras la recogida.

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 2 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.

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. Pipetee **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. Lave los pocillos del siguiente modo:
Si el paso de lavado se efectúa manualmente:
Agite enérgicamente el contenido de los pocillos.
Enjuague los pocillos **3 veces** con **300 µL** de solución de lavado diluida por pocillo.
Si se usa un aparato de lavado automático de placas:
Enjuague los pocillos **3 veces** con **300 µL** de solución de lavado diluida por pocillo.
Al término de cada paso de lavado, frote bien los pocillos con papel absorbente para eliminar las gotas residuales!
5. Pipetee **100 µL** de **Enzyme Conjugate** a cada pocillo.
6. Incubar durante **30 minutos** a temperatura ambiente.
7. Lave los pocillos del siguiente modo:
Si el paso de lavado se efectúa manualmente:
Agite enérgicamente el contenido de los pocillos.
Enjuague los pocillos **3 veces** con **300 µL** de solución de lavado diluida por pocillo.
Si se usa un aparato de lavado automático de placas:
Enjuague los pocillos **3 veces** con **300 µL** de solución de lavado diluida por pocillo.
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. Mida la densidad óptica (DO) de la solución a **450 nm (longitud de onda de medición) y entre 620 nm o 630 nm (longitud de onda de referencia para la sustracción de fondo recomendada)** con un lector de placas de microtítulo. Se recomienda realizar la lectura de los pocillos **en los 10 minutos** siguientes a la incorporación de la solución de parada.

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.) Otras funciones de regresión darán lugar a resultados sensiblemente diferentes.
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 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 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 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 DEMEDITEC 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	39	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 acompañan 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 DEMEDITEC 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.

10.1 Sustancias que pueden interferir

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

10.2 Interferencias con drogas

Hasta ahora no se han encontrado sustancias (drogas) conocidas por nosotros, que tengan influencia en la medida de SHBG en una muestra.

10.3 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 DEMEDITEC.

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.

1 INTRODUCTION

Le kit de dosage immuno-enzymatique **DEMEDIATEC SHBG ELISA** propose les matériaux requis pour la mesure quantitative de 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 PRINCIPE DU TEST

Le DEMEDIATEC SHBG ELISA est un dosage d'immunoabsorption par enzyme (ELISA) en phase solide reposant sur le principe de sandwich. Les puits de microtitration sont recouverts d'un anticorps monoclonal (souris) dirigé vers un site antigénique unique de la molécule de SHBG. Pendant la première incubation, la SHBG dans l'échantillon ajouté se lie à l'anticorps immobilisé. Le conjugué enzymatique ajouté simultanément, qui contient un anticorps dirigé contre SHBG conjugué à de la peroxydase de raifort, se lie au SHBG en formant un complexe en sandwich. Après une étape de lavage pour éliminer toutes les substances non liées, la phase solide est incubée avec la solution de substrat. La réaction colorimétrique est arrêtée par l'ajout d'une solution d'arrêt, et la densité optique (DO) du produit jaune résultant est mesurée. L'intensité de couleur est proportionnelle à la concentration de l'analyte dans l'échantillon. Une courbe standard est construite en traçant les valeurs de DO en fonction des concentrations des standards, et les concentrations des échantillons inconnus sont déterminées en utilisant cette courbe standard.

3 PRECAUTIONS D'UTILISATION

- Ce kit est uniquement destiné aux tests diagnostiques in vitro.
- Utilisez uniquement la version valide d'instructions d'utilisation qui est incluse dans le kit.
- Les informations concernant la toxicité des réactifs contenus dans ce kit sont présentées dans la fiche de sécurité (« Safety Data Sheets »).
- 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.
- Éviter les contacts avec la *Stop Solution*, celle-ci contient 0,5 M de H₂SO₄. Cela pourrait engendrer irritations ou brûlures de la peau.
- Ne jamais pipeter avec la bouche, et éviter tout contact de la peau ou des muqueuses avec les réactifs ou les échantillons.
- Ne pas fumer, manger, boire ou utiliser des produits cosmétiques dans les zones où les échantillons ou le kit ont été maniés.
- 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.
- 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.
- Ne pas utiliser les réactifs au-delà de la date d'expiration inscrite sur l'emballage.
- 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.
- 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.
- 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.
- La fiche de sécurité concernant ce produit peut être obtenue en contactant directement Demeditec Diagnostics GmbH.

4 COMPOSITION DU KIT

4.1 Contenu du kit

1. **SORB MT 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. **CAL 0 – 6 Standard (Standard 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.
3. **CONTROL low & high Control Low & High** (Contrôle), 2 flacons, 0,5 mL chacun, prêts à l'emploi; Les valeurs contrôles et limites sont indiquées sur l'étiquette du flacon ou sur la fiche QC. Contient agent de conservation.
4. **BUF Assay Buffer** (Tampon d'essai), 1 flacon, 125 mL, prêt à l'emploi; Contient agent de conservation.
5. **ENZ CONJ Enzyme Conjugate** (Conjugué enzymatique), 1 flacon, 14 mL, prêt à l'emploi ; Anticorps anti-SHBG conjugué à la HRP; Contient agent de conservation.
6. **SUB TMB Substrate Solution** (Solution substrat), 1 flacon, 14 mL, prêt à l'emploi; Tétraméthylbenzidine (TMB).
7. **STOP SOLN Stop Solution** (Solution d'arrêt), 1 flacon, 14 mL, prêt à l'emploi; Contient 0,5 M de H₂SO₄. Éviter les contacts avec la solution stop. Cela pourrait engendrer irritations ou brûlures de la peau.
8. **WASH SOLN 40x Wash Solution** (Solution de lavage), 1 flacon, 30 mL (concentré 40X) ; Voir « Préparation des réactifs ».

4.2 Equipement et matériel requis, mais non fournis

- Un spectrophotomètre lecteur de micro-plaques calibré (450 ± 10 nm)
- 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 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 à 8 °C. Les micro-plaques doivent être stockées à 2 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.

Wash Solution

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 1 semaine 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 la DEMEDITEC, 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 ou 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 (Sarstedt Monovette avec une préparation appropriée de plasma) et centrifugé immédiatement après le prélèvement.

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 2 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 de l'échantillon

Si, lors d'un test préliminaire, la concentration de l'échantillon se révèle être supérieure à celle du standard 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).

6 RÉALISATION DU TEST

6.1 Remarques générales

- Tous les réactifs et échantillons doivent être amenés à température ambiante (18 °C à 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 standard, 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 Prédilution 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. Pipeter 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. Laver les puits comme suit:
 - Si l'étape de lavage est effectuée à la main:
 - Agiter énergiquement le contenu des puits.
 - Rincer les puits à **3 reprises** avec **300 µL** de solution de lavage diluée par puits.
 - Si un laveur de plaques automatique est utilisé:
 - Rincer les puits à **3 reprises** avec **300 µL** de solution de lavage diluée par puits.

À la fin de l'étape de lavage, toujours frapper énergiquement les puits sur du papier absorbant pour éliminer les gouttelettes résiduelles.
5. Pipeter **100 µL d'Enzyme Conjugate** dans chaque puits.
6. Incuber pendant **30 minutes** à température ambiante.
7. Laver les puits comme suit:
 - Si l'étape de lavage est effectuée à la main:
 - Agiter énergiquement le contenu des puits.
 - Rincer les puits à **3 reprises** avec **300 µL** de solution de lavage diluée par puits.
 - Si un laveur de plaques automatique est utilisé:
 - Rincer les puits à **3 reprises** avec **300 µL** de solution de lavage diluée par puits.
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. Mesurer la densité optique (DO) de la solution dans chaque puits à 450 nm (longueur d'onde de mesure) et à 620 nm ou 630 nm (longueur d'onde de référence pour la soustraction de l'arrière-plan recommandée) avec un lecteur de microplaques.
Il est recommandé de lire les puits dans un délai de 10 minutes après l'ajout de la solution d'arrêt.

6.4 Calcul des résultats

1. Calculer les valeurs moyennes des densités optiques pour chaque série de standards, contrôles et échantillons.
2. Etablir la courbe étalon en reportant la densité optique moyenne de chaque valeur standard 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 standard 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 standard 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 SHBG ELISA de DEMEDITEC, 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	39	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 QUALITE

Il est recommandé d'utiliser les échantillons contrôles selon les réglementations nationales en vigueur. L'utilisation des échantillons contrôles est recommandée 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 considérées comme non valides.

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

Après avoir testé les points mentionnés, si aucune erreur n'est détectée, contacter votre distributeur ou directement la DEMEDITEC.

9 CARACTERISTIQUES 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.

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 réplicats 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

9.3 Précision

9.4 Récupération

9.5 Linéarité

consulter la version anglaise détaillée du mode d'emploi.

10 LIMITES D'UTILISATION

Les résultats seront fiables et reproductibles si la procédure de dosage est effectuée dans le respect le plus strict des instructions et des bonnes pratiques de laboratoire. Toute manipulation incorrecte des échantillons ou toute modification de ce test peut affecter 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

Aucun effet de surdosage n'a été observé pour ce test jusqu'à une concentration de 11350 nmol/L de SHBG.

11 ASPECTS LEGAUX

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 la DEMEDITEC.

11.2 Conséquences thérapeutiques

Les suites thérapeutiques ne devront jamais être basées sur les résultats de laboratoire seuls, même si 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 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. 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 luteinizing hormone (LH), follicle-stimulating hormone (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.

SYMBOLS USED WITH DEMEDITEC ASSAYS

Symbol	English	Deutsch	Française	Espanol	Italiano
	European Conformity	CE-Konformitätskennzeichnung	Conforme aux normes européennes	Conformidad europea	Conformità europea
	Consult instructions for use	Gebrauchsanweisung beachten	Consulter les instructions d'utilisation	Consulte las Instrucciones	Consultare le istruzioni per l'uso
	In vitro diagnostic device	In-vitro-Diagnostikum	utilisation Diagnostic in vitro	Diagnóstico in vitro	Per uso Diagnostica in vitro
	For research use only	Nur für Forschungszwecke	Seulement dans le cadre de recherches	Sólo para uso en investigación	Solo a scopo di ricerca
	Catalogue number	Katalog-Nr.	Référence	Número de catálogo	No. di catalogo
	Lot. No. / Batch code	Chargen-Nr.	No. de lot	Número de lote	Lotto no
	Contains sufficient for <n> tests/	Ausreichend für "n" Ansätze	Contenu suffisant pour "n" tests	Contenido suficiente para <n> ensayos	Contenuto sufficiente per "n" saggi
	Note warnings and precautions	Warnhinweise und Vorsichtsmaßnahmen beachten	Avertissements et mesures de précaution font attention	Tiene en cuenta y advertencias precauciones	Annoti avvisi e le precauzioni
	Storage Temperature	Lagerungstemperatur	Température de conservation	Temperatura de conservación	Temperatura di conservazione
	Expiration Date	Mindesthaltbarkeitsdatum	Date limite d'utilisation	Fecha de caducidad	Data di scadenza
	Legal Manufacturer	Hersteller	Fabricant	Fabricante	Fabbricante
<i>Distributed by</i>	Distributed by	Vertrieb durch	Distribution par	Distribución por	Distribuzione da parte di
	Version	Version	Version	Versión	Versione
	Single-use	Einmalverwendung	À usage unique	Uso único	Uso una volta