

НАБІР РЕАГЕНТІВ

СГЗГ (СТАТЕВОГО ГОРМОНУ ЗВ'ЯЗУЮЧИЙ БІЛОК-3) ELISA SHBG

Каталог. №: **EIA-2996**

Дата випуску інструкції: **2013/03**
Версія **19.0**



Основою при проведенні аналізу є оригінал інструкції англійською мовою, вкладеної в набір. Номер і дата версії оригіналу та перекладу інструкції повинні співпадати.

1. ВСТУП

1.1 Призначення

Набір **DRG SHBG ELISA** є ферментним імуноаналізом для кількісного діагностичного вимірювання *in vitro* СГЗГ в сироватці або гепариновій плазмі.

1.2 Короткий опис та роз'яснення

Глобулін, зв'язуючий статевий гормон (СГЗГ) є бета-глобуліном, що специфічно зв'язує стероїдні гормони. Його молекулярна маса складає 86 кДа/моль. Основна частина його синтезується в гепатоцитах. Вироблення регулюється рівновагою андроген/естрогенів, тиреоїдними гормонами, інсуліном, і серед інших – харчовими факторами. СГЗГ бере участь в транспортуванні статевих гормонів в плазмі. Його концентрація є основним фактором, регулюючим їхній розподіл між протеїн-зв'язаним та вільним станом.

Визначення концентрації СГЗГ має значення в основному для виявлення незначних розладів метаболізму андрогенів, а також у жінок з гірсутизмом, які можуть бути чутливі до терапії естрогенами.

Співвідношення тестостерон/СГЗГ корелюється як з виміряним, так і вирахованим рівнями вільного тестостерону і дозволяє провести диференціювання між здоровими та індивідуумами з надмірним виробленням естрогену.

2. ПРИНЦИП АНАЛІЗУ

Набір **DRG SHBG ELISA** є твердофазним ферментно-зв'язаним імуносорбентним аналізом (ELISA), який базується на принципі «сендвічу». Мікротитрові лунки покриті моноклональним (мишиним) антитілом, спрямованим на особливу антигенну зону молекули СГЗГ. Порція зразка пацієнта, який містить ендогенний СГЗГ, інкубується в обробленій лунці. Після етапу промивання додається ферментний кон'югат, який являє собою моноклональне анти-СГЗГ антитіло, кон'юговане пероксидазою хрому. Після інкубації незв'язаний кон'югат вимивається.

Об'єм зв'язаної пероксидази пропорційний концентрації СГЗГ у зразку.

Після додавання розчину субстрату інтенсивність сформованого кольору пропорційна концентрації СГЗГ в зразку пацієнта.

3. ЗАСТЕРЕЖЕННЯ І ПОПЕРЕДЖЕННЯ

1. Тільки для діагностичного використання *"in-vitro"*. Для використання тільки кваліфікованим персоналом.
2. Методів, які б з остаточною впевненістю переконали, що такі інфекційні агенти як вірус гепатиту В, ВІЛ-вірус чи інші в компонентах набору відсутні не існує. Тому, зразки і матеріали треба вважати потенційно інфекційними і використовувати з відповідною обережністю.
3. Перед початком аналізу повністю та уважно прочитати інструкцію. Використовувати дійсну версію інструкції. Впевніться, що все зрозуміло.
4. Мікропланшет складається з відривних смужок. Невикористані лунки зберігати при 2-8 °С запакованими, та використовувати рамку, яка постачається.
5. Піпетування взірців та реагентів проводити як можна швидше та з однаковими інтервалами для кожного кроку.
6. Використовувати пробірки тільки для одного реагенту. Це особливо відноситься до пробірок з субстратами. Використання резервуару для дозування розчину субстрату, який раніше був використаний для кон'югатного розчину, може призвести до забарвлення розчину. Не виливайте реагенти назад у флакон, оскільки забруднення може статися.
7. Змішуйте вміст лунок мікропланшетів повністю, щоб забезпечити хороші результати тесту. Не використовуйте повторно лунки.
8. Не дозволяйте лункам висихати під час аналізу; додавати реагенти негайно після закінчення полювання.

9. Дозволити реагентам досягти кімнатної температури (21-26 °С) до початку тесту. Температура може вплинути на значення оптичної щільності.
10. Не піпетуйте реагенти ротом і уникайте контакту реагентів і зразків з шкiрою і слизовими.
11. Не їжте, не пийте і не куріть в приміщеннях, де використовуєте зразки чи реагенти.
12. Одягайте рукавички при роботі із зразками і реагентами. Мікробіологічне забруднення реагентів чи зразків може дати помилкові результати.
13. Використання набору повинно проводитись згідно з вимогами по техніці безпеки.
14. Не використовуйте реагенти після закінчення терміну придатності.
15. Необхідно дотримуватись об'ємів, вказаних в інструкції. Оптиміальні результати будуть отримані при використанні каліброваних піпеток.
16. Не змішуйте реагенти різних серій і різних наборів, оскільки ці набори могли транспортуватись чи зберігатись при різних умовах.
17. Щодо інформації відносно небезпечних речовин дивіться Паспорт Безпеки Матеріалів.
18. Хімічні речовини і приготовлені чи використані реагенти повинні бути оброблені відповідно до вимог по техніці безпеки.
19. Паспорт Безпеки Матеріалів доступний за запитом.

4. РЕАГЕНТИ

4.1 Реагенти, які постачаються

1. **Мікротитрові лунки**, 12 x 8 стрипів, 96 лунок на планшеті, покриті моноклональними мишиними анти-СГЗГ-антитілами, запаковані у ламінований пакет. Готові до використання.
2. **Стандарт (0-4)**, 5 флаконів, 0,5 мл. Готові до використання. Концентрації: 0, 4, 16, 65, і 260 нмоль/л. Містять консервант.
3. **Контроль**, 1 флакон, 0,5 мл. Готовий до використання. Контрольні значення та діапазони вказані на наклейці флакону або на бланку КЯ. Містить консервант.
4. **Робочий буфер**, 1 флакон, 80 мл. Готовий до використання. Містить консервант.
5. **Ферментний кон'югат**, 1 флакон, 14 мл. Готовий до використання. Мишаче моноклональне антитіло до СГЗГ, кон'юговане пероксидазою хрому. Містить консервант.
6. **Розчин субстрату**, 1 флакон, 14 мл. Готовий до використання. Містить ТМБ.
7. **Стоп-розчин**, 1 флакон, 14 мл. Готовий до використання. Містить 0,5 М H₂SO₄. Уникайте контакту, це може викликати подразнення шкіри та опіки.
8. **Промивний розчин**, 1 флакон, 25 мл (40х конц.). (Див. «Підготовка реагентів»).

4.2 Необхідні матеріали та обладнання, які не постачаються

- Мікротитровий планшетний відкалібрований рідер (450±10nm).
- Відкалібровані мікропіпетки змінного об'єму.
- Промокальний папір.
- Дистильована або деіонізована вода.
- Пробірки для розведення зразків/стандартів.
- Таймер.
- Графічний папір або ПЗ для обробки даних.

4.3 Умови зберігання

При зберіганні при температурі 2-8°C активність реагентів буде збережена до дати закінчення терміну придатності. Не використовуйте після цієї дати.

Відкриті реагенти та лунки повинні зберігатись при 2-8°C.

Після відкриття мішечка із фольги треба знову його герметично закрити. Відкритий набір стабільний два місяці при зберіганні, як вказано вище.

4.4 Підготовка реагентів

Перед використанням доведіть всі реагенти та потрібну кількість стрипів до кімнатної температури.

Промивний розчин

Додайте деіонізовану воду до 40х концентрованого промивного розчину. Розведіть 25 мл концентрованого промивного розчину 975 мл деіонізованої води до об'єму 1000 мл.

Примітка: розведений промивний розчин стабільний впродовж 2 тижнів при КТ.

4.5 Утилізація набору

Знищення набору повинно проводитись відповідно до вимог техніки безпеки. Спеціальна інформація для цих продуктів вказана в Листі Даних Безпеки.

4.6 Пошкодження набору

При пошкодженні набору чи його компонентів необхідно повідомити в письмовій формі виробника впродовж одного тижня після отримання виробу. Окремі пошкоджені компоненти не слід використовувати.

5. ЗАБІР І ПІДГОТОВКА ЗРАЗКІВ

Сироватка або гепаринова плазма бути використані в цьому аналізі. Не використовувати гемолітичні, іктеричні чи ліпемічні зразки.

Увага: зразки, які містять азид натрію, не повинні використовуватись в аналізі.

5.1 Забір зразків

Сироватка:

Проведіть забір крові венепункцією (напр. Sarstedt Monovette # 02.1388.001); дозвольте їй згорнутися; і відділіть сироватку, центрифугуючи при кімнатній температурі. Не центрифугуйте до повного зсідання крові. Пацієнтам, які проходять терапію антикоагулянтами, може знадобитися більше часу для зсідання крові.

Плазма:

Цільну кров необхідно забрати в центрифужні пробірки, які містять антикоагулянти і центрифугувати негайно після забору. (Наприклад, для гепаринової плазми – Sarstedt Monovette – помаранчева кришка - # 02.165.001).

5.2 Підготовка та зберігання зразків

Зразки повинні бути закриті і в такому вигляді можуть зберігатись при 2-8°C до 2 днів перед дослідженням.

Для довшого зберігання зразки повинні бути заморожені до -20°C. Після розморожування зразки необхідно кілька разів перевернути перед дослідженням.

5.3 Розведення зразків

Якщо при початковому аналізі зразок сироватки показує значення вище за найвищий стандарт, зразки можуть бути розведені робочим буфером і проаналізовані як описано в процедурі аналізу.

Для вирахування концентрацій необхідно брати до уваги наступний коефіцієнт розведення.

Приклад:

Розведення 1:10: 10 мкл зразка + 90 мкл робочого буферу (ретельно змішайте)

Розведення 1:100: 10 мкл розведення а) 1:10 + 90 мкл робочого буферу (ретельно змішайте).

6. ПРОЦЕДУРА АНАЛІЗУ

6.1 Загальні зауваження

- Доведіть всі реагенти до кімнатної температури перед початком дослідження. Всі реагенти змішуйте без піноутворення.
- Після початку дослідження всі кроки повинні виконуватись без затримки.
- Використовуйте нові насадки для піпеток перед кожним використанням.
- Абсорбція залежить від температури і часу інкубації. Тому, перед початком дослідження необхідно прослідкувати, щоб все було готово: ковпачки зняті, реагенти приготовлені, лунки позначені і таке інше. Це дозволить проводити всі кроки за однакові інтервали часу.
- За загальним правилом ферментативна реакція прямо пропорційна часу і температурі інкубації.
- Піпетування зразків не повинно перевищувати 10 хвилин задля уникнення зміщення аналізу в часі. При використанні більш ніж одного планшету в одній процедурі, рекомендується застосовувати до кожного планшету калібрувальну криву.

6.2 Процедура дослідження

Кожна процедура повинна включати калібрувальну криву.

1. Закріпіть необхідну кількість мікротитрових лунок у штативі рамки.
2. Розведіть кожний стандарт, контроль та зразок 1:20 робочим буфером (1 частина стандарту/контролю/зразку + 19 частин робочого буферу).

Приклад: 10 мкл стандарту + 190 мкл робочого буферу.

3. Додайте в кожну лунку по **100 мкл** робочого буферу.
4. Додайте **25 мкл** кожного **розведеного стандарту, контролю і зразку новим одноразовим наконечником** у відповідні лунки. Ретельно потрусіть планшет 5 секунд. На цьому етапі важливо провести повне змішування.
5. **Інкубуйте** при кімнатній температурі **30 хв.**
6. Вилийте різко вміст лунок. Промийте лунки **3 рази** розведеним промивним розчином (**300-400 мкл** на лунку). Переверніть лунки на абсорбуючий папір для видалення залишків.

Важливе зауваження:

Чутливість і точність цього аналізу залежить від правильності проведення процедури промивання.

7. Внесіть по **100 мкл** розведеного ферментного кон'югату в кожну лунку.
8. Інкубуйте **15 хвилин** при кімнатній температурі.
9. Вилийте різко вміст лунок. Промийте лунки **3 рази** розведеним промивним розчином (**300-400 мкл** на лунку). Переверніть лунки на абсорбуючий папір для видалення залишків.
10. Додайте **100 мкл** розчину субстрату в кожну лунку.
11. Інкубуйте:
12 хвилин при кімнатній температурі (20-25 °C).
8 хвилин при кімнатній температурі (26 °C і більше).
12. Зупиніть ферментативну реакцію, додавши по **100 мкл** стоп-розчину в кожну лунку.
13. Визначте абсорбцію (ОЩ) кожної лунки при **450±10** нм за допомогою мікротитрового планшет-рідера. Рекомендується проводити зчитування лунок **впродовж 10 хвилин** після додавання стоп-розчину.

6.3 Розрахунок результатів

1. Визначте значення середньої абсорбції для кожного набору стандартів, зразків і контролів.
2. Побудуйте стандартну криву, відкладаючи середню абсорбцію для кожного стандарту на У-осі проти відповідних концентрацій на Х-осі.
3. Використовуючи значення середньої абсорбції для кожного зразка, визначте відповідну концентрацію зі стандартної кривої.
4. Автоматичні дані, комп'ютерні програми, кубічний сплін, 4 PL або логарифмічний також дають хороші результати.
5. Концентрація зразків може зчитуватись з стандартної кривої. Зразки з концентрацією вище найвищого стандарту необхідно розвести або вважати як > 260 нмоль/мл. При вирахуванні концентрації необхідно враховувати цей фактор розведення.

6.3.1 Приклад типової калібрувальної кривої

Наступні дані наведені тільки для наочності та **не повинні** використовуватись замість отриманих даних в процесі аналізу.

Стандарт	нмоль/мл	Оптичні одиниці (450 нм)
Стандарт А	0	0.01
Стандарт В	4	0.08
Стандарт С	16	0.30
Стандарт D	65	1.07
Стандарт Е	260	2.04

7. ОЧІКУВАНІ ЗНАЧЕННЯ НОРМИ

Рекомендується, щоб кожна лабораторія встановлювала власні нормальні і патологічні значення.

Популяція	Кількість	СГЗГ, нмоль/л	
		середнє	діапазон
Чоловіки	102	43	15-100
Жінки	44	62	15-120

Окремо взяті результати не повинні бути єдиною підставою для терапевтичних висновків. Результати повинні співставлятися з іншими клінічними даними та діагностичними дослідженнями.

8. КОНТРОЛЬ ЯКОСТІ

Рекомендується використовувати контролю згідно державним і місцевими нормами. Використання контролю дає можливість щоденної оцінки достовірності результатів. Використовуйте контролю і нормального рівня, і патологічного.

Контролі і відповідні результати QC лабораторії вказані в QC сертифікаті, що поставляється з набором. Величини, вказані в даному сертифікаті відповідають лоту набору і повинні використовуватись для порівняння результатів.

Також рекомендується використовуватись національні і міжнародні програми оцінки якості для підтвердження достовірності результатів.

Використовуйте відповідний статистичний метод для аналізу величин контролю. Якщо результати аналізу не попадають в установленні границі матеріалів контролю, результати являються не достовірними.

В такому випадку перевірте наступні дані: пристрої піпетування і вимірювання часу; фотометр; дати придатності реагентів, умови зберігання і інкубації, методи аспірації і промивання.

Якщо не знайдено помилки, зверніться до Вашого постачальника.

9. РОБОЧІ ХАРАКТЕРИСТИКИ

9.1 Динамічний діапазон аналізу

Діапазон аналізу знаходиться між 0.77-260 нмоль/л.

9.2 Специфічність антитіл (перехресна реактивність)

Специфічність набору DRG SHBG ELISA була досліджена шляхом вимірювання реакції СГЗГ, викликані високими рівнями ТЗГ (тироксин зв'язуючого глобуліну) та КЗГ (кортизол-зв'язуючого глобуліну).

Не спостерігалось перехресних реакцій при дослідженні ТЗГ та КЗГ до 500 мг/л.

9.3 Чутливість

Аналітична чутливість набору була визначена шляхом додавання 2 стандартних відхилень до середнього значення 20 реплікатів аналізів 0 стандарту і склала 0.77 нмоль/л.

9.4 Відтворюваність

9.4.1 В аналізі

Точність в аналізі вказана нижче:

Зразок	Кількість	Середнє, нмоль/л	КВ, %
1	16	10.3	9.0
2	16	44.0	5.4
3	16	76.1	4.0
4	16	109.6	5.3

9.4.1 Між аналізами

Точність між аналізами вказана нижче:

Зразок	Кількість	Середнє, нмоль/л	КВ, %
1	16	9.8	8.0
2	16	44.9	3.0
3	16	73.4	5.3
4	16	106.8	3.1

9.5 Відтворюваність

До сироваток 3 пацієнтів було додано відому кількість СГЗГ і вимірювалась відтворена концентрація. Результати показані в наступній таблиці.

Зразок	Енд. СГЗГ, нмоль/л	Доданий СГЗГ (оч. значення, нмоль/л)	Вимір. знач. СГЗГ (заг.), нмоль/л	Вимір. знач. За мінусом енд. знач. (отрим. знач.), нмоль/л	Відтв., %
1	8.2	32	39.0	30.8	96
	8.2	16	23.1	14.9	93
2	10.8	32	39.0	28.8	90
	10.8	16	26.7	15.9	99
3	11.3	32	37.4	26.1	82
	11.3	16	25.2	13.9	87

9.6 Лінійність

Три зразки пацієнтів були розбавлені робочим буфером 1:2, 1:4 і 1:8. Були визначені величини СГЗГ і результати скоректовані на фактор розведення.

Дані відображені в наступній таблиці.

Таблиця 4

Зразок	Нерозведений СГЗГ, нмоль/л	Відтворюваність, %		
		1:2	1:4	1:8
1	89	101	92	110
2	99	97	96	91
3	177	99	86	81

10. ОБМЕЖЕННЯ ПРОЦЕДУРИ

Надійні та відтворювані результати будуть отримані коли процедура дослідження проводиться з повним розумінням цієї інструкції, з дотриманням вимог професійної лабораторної практики.

Будь-яке неправильне поводження зі зразками або зміна цього дослідження може вплинути на результати.

10.1 Перехресно діючі речовини

Не впливають на результати гемоглобін, білірубін і тригліцериди.

10.2 Вплив лікарських засобів

На сьогодні не відомо жодних речовин (лікарських засобів), що впливають на вимірювання СГЗГ в зразку.

10.3 «Хук-ефект» високої дози

Не спостерігалось хук-ефекту в цьому дослідженні до 40 000 нмоль/л СГЗГ.

11. ПРАВОВІ АСПЕКТИ

11.1 Достовірність результатів

Дослідження необхідно проводити точно у відповідності з інструкцією виробника. Також користувачу необхідно слідувати правилам техніки

безпеки, національним стандартам. Особливо це стосується використання контрольних реагентів.

Результати дослідження вважаються достовірними, якщо контролю знаходяться в указаних межах і якщо інші параметри дослідження також відповідають характеристикам процедури.

11.2 Терапевтичні висновки

Терапевтичні висновки не повинні базуватись на результатах одного дослідження і повинні враховувати всю клінічну картину пацієнта.

Тільки якщо лабораторні дані повністю збігаються з клінічною картиною, можна встановлювати терапевтичні висновки для пацієнта.

11.3 Відповідальність

Будь-які зміни дослідження чи зміна компонентів різних лотів може негативно відобразитись на результатах дослідження. Такі зміни та модифікації не можуть бути приводом для заміни набору.

Будь-які пошкодження набору при транспортуванні не відносяться до відповідальності виробника.



ВИРОБНИК

DRG Instrumente GmbH
вул. Фраунберг 18, 35039
м. Марбург, Німеччина
Тел: +49(0)64 21/170 00
Факс: +49(0)64 21/17 00 50
www.drq-diagnostics.de
e-mail: drq@drq-diagnostics.de



УПОВНОВАЖЕНИЙ ПРЕДСТАВНИК

ТОВ «ДІАМЕБ ТРЕЙД»
вул. Симона Петлюри, 25
м. Івано-Франківськ, 76014
тел.: +38 (0342) 775 122
факс: +38 (0342) 775 123
e-mail: info@diameb.ua
www.diameb.ua

