



Набір для визначення СТАТЕВОГО ГОРМОНУ ЗВ'ЯЗУЮЧОГО ГЛОБУЛІНУ

Кат. № : 104-2996
Кількість : 96
Виробник : DRG (USA)

Методика від 09-2007

Увага: основою при проведенні аналізу є оригінал інструкції англійською мовою.

1. КЛІНІЧНА ІНФОРМАЦІЯ

Глобулін, зв'язуючий статевий гормон (SHBG) є бета-глобуліном, що специфічно зв'язує стероїдні гормони. Основна частина його синтезується в гепатоцитах. Вироблення регулюється рівновагою андроген/естрогенів, тиреоїдними гормонами, інсуліном, і серед інших - харчовими факторами. SHBG приймає участь в транспорті статевих гормонів в плазмі. Його концентрація є основним фактором, регулюючим величину зв'язаного і вільного їхнього пулу. Визначення концентрації SHBG 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/ SHBG корелює як з вимірним, так і вирахованим рівнями вільного тестостерону і дозволяє провести диференціювання між здоровими та індивідуумами з надмірним виробленням естрогену.

2. ПРИНЦИП АНАЛІЗУ

Моноклональні специфічні до SHBG антитіла іммобілізуються на планшетці, а інші, - також специфічні до SHBG, - кон'юговані з пероксидазою хрому (ПХ). SHBG зразка фіксується до планшетки. Після промивання додається кон'югат ПХ. Після другого промивання додається ферментний субстрат. Ферментна реакція пропорційна кількості SHBG у зразку. Реакцію зупиняють додаванням стоп-розчину. Вимірюється абсорбція на фотометрі.

3. ПОТРІБНІ МАТЕРІАЛИ ТА ОБЛАДНАННЯ, АЛЕ ЯКІ НЕ ПОСТАЧАЮТЬСЯ

- Піпетка зі змінними пластмасовими накінечниками: 25 мкл (стандарті, зразки).
- Багатоканальний дозатор зі змінними пластмасовими накінечниками.
- Кришка або запечатуюча стрічка для мікролуночного планшета.
- Ємкість для реагентів.
- Пристрій для аспірації.
- Фотометр (планшетний або смужковий зчитувач) на 450 нм.

4. ЗАСТЕРЕЖЕННЯ

Тільки для діагностичного використання "in vitro".
Методів, які б з остаточною впевненістю переконали, що такі інфекційні агенти як вірус гепатиту В, С, ВІЛ-вірус чи інші в компонентах набору відсутні, не існує. Тому, зразки і матеріали треба вважати потенційно інфекційними і використовувати з відповідною обережністю.

5. ЗАБІР ТА ПОВОДЖЕННЯ ЗІ ЗРАЗКАМИ

Може використовувати сироватку і гепарінову плазму.
EDTA плазма може дати ледь занижені результати.
Не спостерігається вплив на результати гемолізу, ліпемії чи білірубіну. Зразки можуть зберігатись при 2-8°C впродовж короткого терміну (приблизно два дні). Для довшого зберігання зразки необхідно заморозити. Заморожені зразки необхідно добре перемішати після розтоплення. Уникайте повторних циклів замороження і розмороження.

5.1 Розбавлення зразків

Зразки з концентрацією більше ніж найвищий стандарт необхідно далі розвести робочим буфером.
Скоректуйте результати, використовуючи відповідний коефіцієнт розведення.
(Див. розділ 7.1 Підготовка реагентів та зразків).

6. ВМІСТ НАБОРУ

Кількість реагентів є достатньою для 96 лунок. Набір необхідно зберігати при 2-8°C.

Закритий набір стабільний до закінчення терміну придатності, вказаному на етикетці. Дата придатності таких закритих компонентів вказана на етикетці компонентів.

1. **Відламувані лунки**, 96 лунок на планшеті, покритих моноклональними анти-SHBG –антитілами миші, запаковані у ламінований пакет. Готові до використання.
2. **Робочий буфер**, 1x80 мл. Готовий до використання. Містить 0,05% тімеросал, 0,02% гентаміцин в якості консерванту.
3. **Стандарти SHBG**, стандарти А-Е 0,5 мл. Значення стандартів близько 0, 4, 16, 65, і 260 нмоль/л. Точні значення вказані на етикетці кожного флакону. Готові до використання. (Див. розділ 7.1 Підготовка реагентів та зразків). Містить 0,01% тімеросал, 0,09% гентаміцин в якості консерванту.
4. **Контроль**, 0,5 мл. (Див. розділ 7.1 Підготовка реагентів та зразків). Містить 0,01% тімеросал, 0,09% гентаміцин в якості консерванту.
5. **Ферментний кон'югат**, 14 мл. Готовий до використання. Мишаче моноклональне антитіло до SHBG, кон'юговане з пероксидазою хрому. Містить 0,02% тімеросал, 0,09% гентаміцин в якості консерванту.
6. **Промивний розчин**, 25 мл (40x конц.). (Див. розділ 7.1 Підготовка реагентів та зразків). Містить 0,09% тімеросал в якості консерванта.
7. **Розчин ТМВ субстрату**, 14 мл. Готовий до використання. Містить H₂O₂/ТМВ.
8. **Стоп-розчин**, 14 мл. Готовий до використання. Містить 0,25 М H₂SO₄. Уникайте контакту з очима та шкірою!

7. ПРОЦЕДУРА АНАЛІЗУ

7.1 Підготовка реагентів та зразків

Розбавте **стандарти, контролю та зразки 1:20** робочим буфером (1 частина стандартів/контролів/зразка + 19 частин робочого буферу).
Приклад: 10 мкл стандарту + 190 мкл робочого буферу.

2. Промивний розчин

Розбавте 40x концентрат в 975 мл дистильованої води.

7.2 Процедура аналізу

Доведіть всі реагенти до кімнатної температури перед використанням. Розведіть м'який концентрат.

1. Позначте необхідну кількість лунок. Які використовуватимуться на планшеті.
2. Додайте в кожен лунку **100 мкл** робочого буферу.
3. Додайте **25 мкл розведених стандартів, контролю і зразків сироватки** у відповідні лунки і потрусіть планшет 5 секунд. (Див. розділ 7.1 Підготовка реагентів та зразків).
4. Накрийте кришкою планшет і **інкубуйте** при кімнатній температурі **30 хв.**
5. Аспіруйте і **тричі** промийте лунки **300 мкл** промивного розчину.
6. Розкачайте **100 мкл** ферментного кон'югату у всі лунки.
7. Накрийте планшет і **інкубуйте** при кімнатній температурі **15 хв.**
8. Промийте лунки **тричі** як вказано вище (3x300 мкл).
9. Через рівні проміжки часу додавайте **100 мкл** розчину ТМВ субстрату в кожен лунку.
10. Накрийте планшет і **інкубуйте** при кімнатній температурі (**20-25°C**) **12 хв, або 8 хвилин при 26°C і більше.**
11. Додайте **100 мкл стоп розчину** через ті ж самі проміжки часу, що і в п. 9. Щоб перемішати розчини акуратно струсніть планшет.
12. Виміряйте абсорбцію на фотометрі при **450 нм**, через **5 хвилин** після зупинки субстратної реакції.

8. ЗАУВАЖЕННЯ ПО МЕТОДИЦІ

1. Захищайте планшет від протягів, сонячного проміння під час тестової процедури.
2. Акуратна аспірація м'якого розчину необхідна для точності аналізу.
3. Оскільки час інкубації є важливим для характеристик аналізу, додавайте зразки і кон'югату без перерв. Додавання зразків не повинно перевищувати 10 хв. Якщо використовується більш ніж один планшет, рекомендується включати стандартну криву для кожного планшета.
4. Додавання ТМВ субстрату розпочинає кінетичну реакцію, що зупиняється додаванням стоп розчину. Час інкубації для кожної лунки повинен бути однаковим, завдяки додаванню реагентів в часові інтервали.

- Захищені від світла, значення абсорбції стабільні 60 хвилин.
- Планшетний зчитувач вимірює абсорбцію вертикально. Не торкайтесь дна лунок.

ПІДСУМОК ПРОЦЕДУРИ АНАЛІЗУ

	Стандарти 0-260 нмоль/л (1:20)	Контрольна сироватка (1:20)	Зразки (1:20)
Помітьте смужки			
Розкачайте робочий буфер (мкл)	100	100	100
Розкачайте розбавлені стандарти, контрольну сироватку и зразки (мкл)	25	25	25
Інкубуйте 30 хв при кімнатній температурі			
Промийте 3 рази			
Розкачайте ферментний коньюгат (мкл)	100	100	100
Інкубуйте 15 хв при кімнатній температурі			
Промийте 3 рази			
Розкачайте ТМВ субстрат (мкл)	100	100	100
Інкубуйте: 15 хв при КТ (20-25°C) 8 хв при КТ (26°C і більше)			
Стоп розчин (мкл)	100	100	100
Змішайте			
Виміряйте абсорбцію при 450 нм			

10. РЕЗУЛЬТАТИ

- Визначте значення середньої абсорбції для кожного набору стандартів, зразків і контролів.
- Побудуйте стандартну криву, відкладаючи середню абсорбцію для кожного стандарту на У-вісі проти відповідних концентрацій на Х-вісі в нмоль/л.
- Використовуючи значення середньої абсорбції для кожного зразка, визначіть відповідну концентрацію SHBG зі стандартної кривої.
- Визначте концентрацію зі стандартної кривої.

Приклад робочого листка та стандартної кривої типового аналізу.
Не використовуйте для визначення фактичних результатів (ПРИКЛАД!).

Лунки	Назва	А 450 нм		Конц. нмоль/л
1-2	Ст. 0 нмоль/л	0,041		
3-4	Ст. 4	0,096	0,055	
5-6	Ст. 20	0,236	0,195	
7-8	Ст. 75	0,621	0,580	
9-10	Ст. 300	1,731	1,690	
11-12	Зразок 1	0,203	0,162	16
13-14	Зразок 2 (контроль)	0,461	0,420	54
15-16	Зразок 3	1,153	1,102	190

(Див. зразок стандартної кривої в оригіналі інструкції).

11. КОНТРОЛЬ ЯКОСТІ

Рекомендується використовувати внутрішній контроль якості в кожному аналізі
Результати контролю повинні бути в допустимих межах.

12. ОЧІКУВАНІ ЗНАЧЕННЯ

Подано середні значення здорових жінок та чоловіків, отримані за допомогою набору для визначення SHBG:

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

Кожна лабораторія повинна визначити свій референтний діапазон.

13. РОБОЧІ ХАРАКТЕРИСТИКИ

13.1 Ліміт визначення

На основі результатів визначення 16 реплікантів нульового стандарту, мінімально визначаємо концентрація SHBG складає 0,2

нмоль/л. Мінімальний ліміт визначається як величина відхилення 2 СВ від нульового стандарту.

13.2 Точність

Точність в межах та поза аналізами була визначена шляхом аналізу 3 сироваток пацієнтів з різними концентраціями SHBG. Результати вказані в Таблицях 1 і 2.

Таблиця 1. Точність в межах аналізу

Пацієнти	Кі-ть реплікатів	Середнє, нмль/л	СВ*, нмоль/л	КВ**, %
1	16	4,5	0,39	8,6
2	16	16	0,68	4,3
3	16	57	1,7	3,0
4	16	158	8,4	5,3

Таблиця 2. Точність між аналізами

Пацієнт	Кі-ть реплікатів	Середнє, нмль/л	СВ*, нмоль/л	КВ**, %
1	16	3,8	0,44	11,6
2	16	19	1,6	8,4
3	16	63	5,5	8,7
4	16	194	14	7,2

* - стандартне відхилення;

** - коефіцієнт варіації

13.3 Відтворюваність

До сироваток 3 пацієнтів було додано відому кількість SHBG і вимірювалась відтворена концентрація. Результати показані в Таблиці 3.

Таблиця 3. Відтворюваність

Зразок	Ендогенний SHBG, нмоль/л	Доданий SHBG, нмоль/л	Очікуваний SHBG, нмоль/л	Виміряна концент. SHBG, нмоль/л	Відтворюваність, %
1	39	6,5	45,5	42	92
1	39	28,5	67,5	67	99
1	39	165	204	208	102
2	61	6,5	67,5	63	93
2	61	28,5	89,5	91	102
2	61	165	226	224	99
3	157	6,5	163,5	170	104
3	157	28,5	185,5	210	113
3	157	165	322	307	95

13.4 Лінійність (тест на розведення)

Чотири зразки пацієнтів були розбавлені робочим буфером 1:2, 1:5 і 1:10. Були визначені величини SHBG і результати скоректовані на фактор розведення. Дані показані в Таблиці 4.

Таблиця 4.

Зразок	Нерозбавлений SHBG, нмоль/л	Відтворюваність, %		
		1:2	1:5	1:10
1	58	100	107	97
2	85	100	117	108
3	120	102	100	102
4	185	89	95	96

13.5 Специфічність

Специфічність набору досліджувалась впливом високих доз Тироксин-зв'язуючого глобуліну (ТЗГ) і Кортизол- зв'язуючого глобуліну (КЗГ). Перехресної реактивності не було знайдено при тестуванні аж до 500 мг/л ТЗГ і 500 мг/л КЗГ.

13.6 «Хук-ефект» високої дози

При тестуванні не було виявлено жодних побічних ефектів аж до 10000 нмоль/л SHBG.

Інформація для замовлення:

ПМП "ДІАМЕБ"
Вул. Чорновола, 97, м. Івано-Франківськ, 76005
Тел.: +38 (0342) 775122; Тел/факс: +38 (0342) 775612
E-mail: info@diameb.com