



**НАБІР ІФА  
для визначення  
ГЛОБУЛІНУ,  
ЗВ'ЯЗУЮЧОГО СТАТЕВИЙ ГОРМОН**

**Кат. №** : EIA-2996  
**Кількість** : 96  
**Виробник** : DRG (Німеччина)

Методика від 04-2012

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

## 1. ВСТУП

### Призначення

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

### 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 проєїн зв'язаним та вільним станами.

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 «сандвічу».

Мікروتитраційні 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.

## ПЕРЕСТОРОГИ І ПОПЕРЕДЖЕННЯ

1. Тільки для діагностичного використання "in vitro". Для використання тільки кваліфікованим персоналом.
2. Методів, які б з остаточно 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. Уникайте контакту зі стоп-розчином (0,5 М H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>). Це може спричинити подразнення шкіри і опіки.
4. Не піпуйте реагенти ротом і уникайте контакту реагентів і зразків з шкірою і слизовими.
5. Не їжте, не пийте і не курить в приміщеннях, де використовуєте зразки чи реагенти.
6. Одягайте рукавиці при роботі із зразками і реагентами. Мікробіологічне забруднення реагентів чи зразків може дати помилкові результати.
7. Використання набору повинно проводитись згідно з вимогами по техніці безпеки.
8. Не використовуйте реагенти після закінчення терміну придатності.
9. Необхідно дотримуватись об'ємів, вказаних в інструкції. Оптимальні результати будуть отримані при використанні каліброваних піпеток.

10. Не змішуйте реагенти різних серій і різних наборів, оскільки ці набори могли транспортуватись чи зберігатись при різних умовах.
11. Щодо інформації відносно небезпечних речовин дивіться Паспорт Безпеки Матеріалів.
12. Хімічні речовини і приготвлені чи використані реагенти повинні бути оброблені відповідно до вимог по техніці безпеки.
13. Паспорт Безпеки Матеріалів доступний на запит.

## 4. РЕАГЕНТИ

### 4.1 Реагенти, які постачаються

1. **Мікروتитраційні лунки**, 12 x 8 сиріпів, 96 лунок на планшеті, покритих моноклональними мишиними анти-СГЗГ-антитілами, запаковані у ламінований пакет. Готові до використання.
2. **Стандарт (А-Е)**, 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.
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 0,5 М H<sub>2</sub>O<sub>4</sub>.
7. **Стоп-розчин**, 1 флакон, 14 мл. Готовий до використання. Містить 0,5 М H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>. 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

- Мікротитраційний планшетний відкалібрований рідер (450±10нм).
- 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<sup>0</sup>С активність реагентів буде збережена до дати закінчення терміну придатності. Не використовуйте після цієї дати.

Відкриті реагенти та лунки повинні зберігатись при 2-8<sup>0</sup>С.

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

Добавте 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 Знищення 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 Збір зразків

#### Сироватка:

Проведіть забір крові венепункцією (напр. Sarstedt Monovette # 02.1388.001); дозвольте їй зсістись; 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 зберігатися 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 виконуватися 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 однакових інтервалів часу.
- За загальним правилом ферментативна реакція прямо пропорційна часу і температурі інкубації.
- Розкапування зразків не повинно перевищувати 10 хвилин задля уникнення зміщення аналізу в часі. Пи використанні більш ніж одного планшета в одній процедурі, рекомендується застосовувати до кожного планшета калібрувальну криву.

#### 6.2 Процедура дослідження

Кожна процедура повинна включати калібрувальну криву.

1. Закріпіть необхідну кількість мікротитраційних лунок у штативі рамки.
  2. Розбавте кожного стандарту, контролю та зразку 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 хв** 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 хв** при кімнатній температурі (20-25°C).  
**8 хв** 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 мікротитраційного 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-вісі проти відповідних концентрацій на Х-вісі.
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 зчитуватися 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** використовуватися 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 використовуватися для порівняння результатів.

Також рекомендується використовуватися 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 межі 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 доавання 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	Кі-ть	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	Кі-ть	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	Ендогенний СГЗГ, нмоль/л	Доданий СГЗГ (очік. значення), нмоль/л	Вимір. знач. СГЗГ (заг.), нмоль/л	Вимір. знач за мінусом ендог. знач. (отрим. знач.) нмоль/л	Відтворюваність, %
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	Нерозбавлений 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 проводитиметься 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-ефекта 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.

#### ЛІТЕРАТУРА

(Див. в оригіналі інструкції).

#### ІНФОРМАЦІЯ ДЛЯ ЗАМОВЛЕННЯ:

**ПМП «ДІАМЕБ»**  
вул. Чорновола, 97, м. Івано-Франківськ, 76005  
Тел.: (0342) 775122  
Тел/факс: (0342) 775612  
E-mail: [info@diameb.ua](mailto:info@diameb.ua)  
[www.diameb.ua](http://www.diameb.ua)