



SHBG kit

ELISA Testkit zur quantitativen Bestimmung des Sexualhormon-bindenden Globulins in humanem Blutserum
(*Gebrauchsanweisung: Seite 3*)

Enzyme immunoassay for quantitative determination of sex hormone-binding globulin in human serum
(*Instructions for use: page 24*)















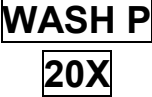









21-01



96 determinations

1. KENNZEICHEN / SYMBOLS LEGEND

	In-vitro Diagnostika In vitro diagnostic medical device		EG-Konformitätserklärung EC Declaration of conformity
	Bestellnummer Catalogue number		Chargenbezeichnung Batch code
	Verwendbar bis Use by		Hersteller Manufacturer
	Herstellungsdatum Date of manufacture		Gebrauchsanweisung beachten Consult operating instructions
	Temperaturbegrenzung Temperature limitation		Biogefährdung Biological risks
	Auflösen mit angegebenem Volumen Reconstitute with specified volume of liquid		Konjugat Conjugate
	Beschichtete Mikrotiterplatte (96 Kavitäten) Coated microplate (96 wells)		Substrat Substrate
	Waschlösung, 20x konzentriert Wash solution, 20X concentrated		Stopplösung Stop solution
	Kalibratoren Calibrators		Probenverdünnungspuffer Sample Diluent
	Kontrolle Control		Optische Dichte Optical density
	Ausreichend für < n > Prüfungen Contains sufficient for <n> tests		Deionisiertes, destilliertes Wasser Deionized or distilled water

2. VERWENDUNGSZWECK

Der **SHBG Testkit** ist für die **quantitative Bestimmung der Konzentration des Sexualhormon-bindenden Globulins (SHBG) in humanem Blutserum** bestimmt.

SHBG ist ein Serumprotein, welches steroidale Sexualhormone bindet. SHBG wird in der Leber synthetisiert. Es ist ein dimeres Glykoprotein mit einer Molekülmasse von 80 bis 100 kDa (je nach Glykolysierungsgrad). Jedes Dimer bindet ein Molekül des Steroids. Das Protein ist spezifisch für 5-Alpha-Dihydrotestosteron, Testosteron und 17-Beta-Estradiol.

Steroidhormone zirkulieren im Blut teilweise frei und teilweise an Albumin oder andere spezifische Proteine gebunden vor (SHBG im Fall von Sexualhormonen). Nur der ungebundene Anteil eines Steroidhormons kann biologisch aktiv werden und in den Zielzellen seine regulatorische Funktion erfüllen. Die Bindung von Steroidhormonen an Albumin hat eine schwache Bindungsstärke, so dass die Diffusion der Hormone in die Zielzellen nicht verhindert wird.

SHBG ist das primäre Transportprotein für Sexualhormone und an der metabolischen „Clearance“-Rate im Blutplasma der Steroide beteiligt. Folglich reguliert der SBHG-Level die Bioverfügbarkeit dieser Hormone für das Zielgewebe. SHBG hat eine maximale Bindungsaffinität zu Androgenen und eine geringere zu Östrogenen. Die Sexualsteroiden beeinflussen die Synthese des SHBGs.

Östrogene haben eine stimulierende Wirkung auf die SHBG-Synthese während Androgene hemmend wirken.

Die SHBG-Konzentration im Blut variiert bei gesunden Menschen stark.

Frauen haben durchschnittlich höhere SHBG-Werte als Männer. Die Konzentration des SHBG steigt bei Hyperthyroidismus, Hyperöstrogenämie (Lutealphase, Schwangerschaft, Einnahme Östrogenen-haltiger oraler Kontrazeptiva, Leberzirrhose usw.).

Bei erwachsenen Männern sinkt die Konzentration des bioaktiven Testosterons im Alter allmählich aufgrund einer Konzentrationssteigerung des SHBGs.

Bei den Frauen korreliert eine Verringerung der SHBG-Konzentration mit dem Vorhandensein hyperandrogener Zustände (polyzystische Eierstöcke, angeborene Dysfunktion der Nebennierenrinden, Hirsutismus). Eine mäßige Reduzierung des SHBG wird auch bei Hypothyroidismus, Cushing-Syndrom, Hyperprolaktinämie, Akromegalie, sowie nach einer Androgen-Therapie oder Gestagen-Therapie, die eine androgene Wirkung haben, beobachtet.

Die SHBG-Konzentration wird bei der Bestimmung des freien Androgen-Indexes verwendet (Verhältnis von Gesamt-Testosteron zu SHBG).

3. TESTPRINZIP

Der **SHBG Testkit** ist ein "Sandwich"-Typ des Festphasen-Enzymimmunoassays, basierend auf zwei monoklonalen Antikörpern, die spezifisch an unterschiedliche Epitope des SHBG-Moleküls binden.

Einer dieser Antikörper ist mit der Meerrettich Peroxidase (HRP) konjugiert, der zweite ist an die Innenfläche der Kavität gebunden.

Die SHBG-Moleküle der Blutserumprobe binden sowohl den immobilisierten Antikörper als auch das Anti-SHBG-Peroxidase-Konjugat (Abb. 1).

Beim Waschen der Kavitäten mit der Waschlösung werden alle ungebundenen Komponenten entfernt. Die Menge des gebundenen Konjugates ist direkt proportional zur SHBG-Konzentration in der Probe. Während der Inkubation mit der TMB-Lösung entwickelt sich die Farbreaktion. Die Farbintensität ist direkt proportional zur SHBG-Konzentration der Probe. Die SHBG-Konzentration in der Patientenprobe wird mit einer Standardkurve, die mit dem Testkit erarbeitet wird, ausgelesen.

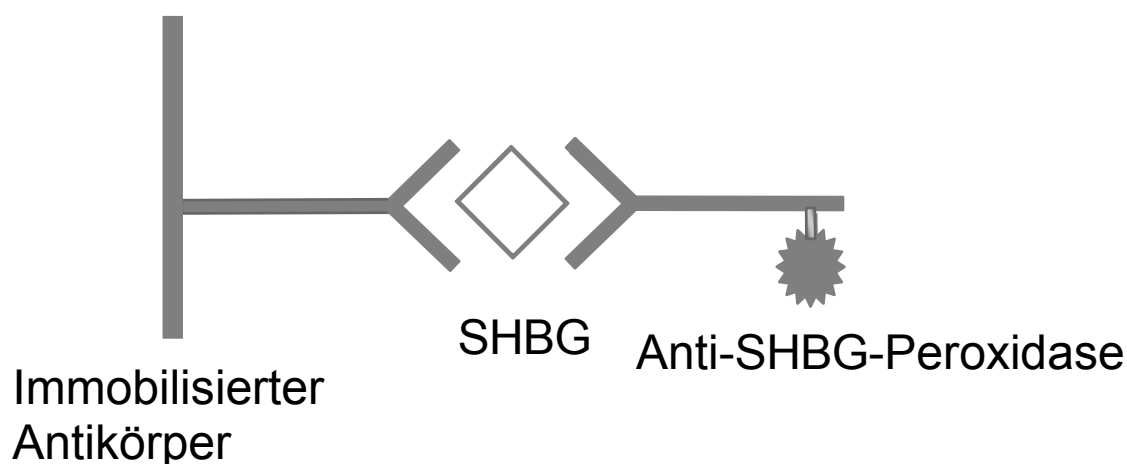


Abb. 1 Testschema

4. PACKUNGSIHALT

MP	Mikrotiterplatte: Zwölf Streifen mit acht Kavitäten (insgesamt 96 Kavitäten), beschichtet mit monoklonalen Anti-SHBG-Antikörpern	1 Platte
CONJ	Konjugat: Lösung aus monoklonalen Anti-SHBG-Antikörpern konjugiert mit Meerrettich Peroxidase (HRP)	14 ml gebrauchsfertig
0-5 CAL	SHBG Kalibratoren: Protein-Puffer oder Lyophilisate mit definierten SHBG-Konzentration: 0; 5; 20; 50; 100; 200 nmol/l. Die exakten SHBG-Konzentrationen sind auf den Flaschenetiketten angegeben.	6 Fläschchen mit je 0,5 ml gebrauchsfertig
CONTROL	SHBG Kontrolle: Protein-Puffer oder Lyophilisate mit definierter SHBG-Konzentration. Der exakte SHBG-Konzentrationsbereich ist auf dem Flaschenetikett angegeben.	0,5 ml gebrauchsfertig
SUB	Substrat (TMB-Lösung): 3,3',5,5'-Tetramethylbenzidin in Citrat-Puffer, mit Wasserstoffperoxid	14 ml gebrauchsfertig
WASH P 20X	Waschlösung P, 20x, konzentriert: Tensid in Salzlösung, ausreichend für die Vorbereitung von 280 ml Lösung.	14 ml konzentriert
STOP	Stopplösung: 1 M HCl-Lösung	14 ml gebrauchsfertig
DIL	Probenverdünnungspuffer: Protein-Puffer mit einem Stabilisator	20 ml gebrauchsfertig

5. ERFORDERLICHE, ABER NICHT MITGELIEFERTE MATERIALIEN

- geeichte, verstellbare Einkanal-Pipetten mit Einweg-Pipettenspitzen;
- geeichte, verstellbare 8-Kanal-Pipette mit Einweg-Pipettenspitzen;
- Mikrotiterplatten-Inkubator/-Schüttler (+37 °C, 400-800 rpm);
- Equipment zum manuellen oder automatischen Waschen;
- Spektralphotometer für Mikrotiterplatten (450 nm);
- Vortex Mixer;
- Destilliertes oder deionisiertes Wasser;
- Messzylinder, Becherglas;
- Labor-Handschuhe;
- Behälter zum Pipettieren mit 8-Kanal-Pipette;
- Desinfektionsmittel;
- Absorbierendes Material (zum manuellen Waschen).

6. LAGERUNG UND STABILITÄT DES TESTKITS

Das Verfallsdatum des kompletten Testkits ist auf dem Außenetikett angegeben; das Verfallsdatum jeder einzelnen Testkomponente ist auf dem jeweiligen Etikett angegeben.

Der **SHBG Testkit** ist nach dem Empfang bei +2...+8 °C in der Originalverpackung des Herstellers bis zum Ablauf der Haltbarkeit zu lagern. Eine Lagerung bei Temperaturen bis +25 °C ist maximal für 5 Tage zulässig.

Die Haltbarkeitsdauer des Kits beträgt 12 Monate.

Nach dem Öffnen ist der Testkit bei einer Lagerung von +2...+8 °C bis zum Verfallsdatum haltbar.

Wenn der Testkit in mehreren getrennten Experimenten verwendet wird, ist der Inhalt nach dem Öffnen wie folgt zu lagern:

- Die ungenutzten Mikrotiterplatten-Streifen: in einem fest verschlossenen Druckverschlussbeutel bei einer Temperatur von +2...+8 °C bis zum Verfallsdatum;
- Fläschchen mit Konjugat, Kalibratoren und Kontrolle (gebrauchsfertig) und Probenverdünnungspuffer: bei einer Temperatur von +2...+8 °C bis zum Verfallsdatum; Fläschchen mit Kalibratoren und Kontrolle (gelöst aus Lyophilisat): bei +2...+8 °C für maximal 1 Monat nach dem Öffnen;
- Fläschchen mit Substrat-Lösung: bei einer Temperatur von +2...+8 °C bis zum Verfallsdatum, **lichtgeschützt**;
- Fläschchen von Waschlösung-Konzentrat und Stopplösung: bei +2...+8 °C bis zum Verfallsdatum;
- Gebrauchsfertige Waschlösung: in einem dicht verschlossenen Behälter bei Raumtemperatur (+18...+25 °C) für maximal 5 Tage oder bei +2...+8°C für maximal 4 Wochen.

Beschädigte Testkits

Im Falle einer schweren Beschädigung des Testkits oder der Komponenten muss Astra Biotech GmbH schriftlich innerhalb einer Woche nach dem Empfang der Ware informiert werden. Der Gebrauch stark beschädigter Komponenten für einen Testlauf wird nicht empfohlen.

7. PROBENGEWINNUNG UND -LAGERUNG

Blut durch Venenpunktion entnehmen. Nach der Gerinnung wird das Serum durch Zentrifugation abgetrennt.

Es ist nicht zulässig, für eine Analyse Blutplasma, hämolysiertes (hell rot) oder lipämisches (milchig) Serum sowie Natriumazid-haltige Serumproben zu benutzen.

Die Proben sind bei der Temperatur von +2...+8 °C nicht länger als 2 Tage zu lagern. Bei Notwendigkeit einer dauerhaften Aufbewahrung wird empfohlen, die Probe zu aliquotieren und bei Temperatur von ≤ -20 °C gefroren zu lagern. Ein wiederholtes Einfrieren ist zu vermeiden.

8. TESTABLAUF

Der SHBG Testkit ist für 96 Untersuchungen bestimmt. Vorbehaltlich einer gleichzeitigen Anwendung aller Streifen reicht ein Testkit für eine Doppelbestimmung von 40 Serumproben, 6 Kalibratoren, 1 Kontrolle und 1x Blank (=OD der TMB-Lösung).

8.1 Reagenzienvorbereitung

Vor der Testdurchführung müssen alle Reagenzien auf Raumtemperatur gebracht und gründlich gemischt werden.

MP Die Verpackung mit der **Mikrotiterplatte** vor der Öffnung mindestens 30 Minuten bei Raumtemperatur (+18...+25 °C) lagern. Notwendige Anzahl der Streifen in den Rahmen einsetzen. Die unbenutzten Streifen in einen Druckverschlussbeutel legen und gut verschließen.

CAL CONTROL Kalibratoren und Kontrolle

Flüssige Kalibratoren und die flüssige Kontrolle sind gebrauchsfertig.

Die lyophilisierten Kalibratoren und die Kontrolle wie folgt vorbereiten: Durch leichtes Klopfen auf den Deckel wird der Feststoff vom Flaschenrand gelöst. Die Fläschchen werden vorsichtig geöffnet und die Deckelkappen umgedreht auf eine trockene und saubere Oberfläche gelegt.

0,5 ml destilliertes oder deionisiertes Wasser wird jeweils in die lyophilisierten Kalibratoren und die Kontrolle pipettiert, diese wieder mit dem jeweiligen Deckel verschlossen und 10 Minuten bei Raumtemperatur ohne Mischen inkubiert. Danach unter Vermeidung einer Schaumbildung sorgsam rühren bis der Feststoff komplett gelöst ist.

Weitere 10 Minuten bei Raumtemperatur unter periodischem Schütteln inkubieren. Es darf kein Feststoff im Deckel oder an den Wänden der Fläschchen zurückbleiben.

WASH P Zubereitung der benötigten Menge der **Waschlösung** durch 20fache Verdünnung des Konzentrates mit destilliertem oder deionisiertem Wasser:

5 ml **WASH P 20X** + 95 ml Wasser

Sorgfältig mischen, Schaumbildung vermeiden.

SUB Substrat vor direktem Licht schützen.

8.2 Probenvorbereitung

Vor dem Gebrauch müssen die Proben auf Raumtemperatur (+18...+25 °C) gebracht und gründlich, unter Vermeidung von Schaumbildung, vermischt werden, um Homogenität zu erreichen.

Vor dem Gebrauch müssen alle Proben (außer Kalibratoren und Kontrolle) mit dem Verdünnungspuffer **DIL** 20fach verdünnt werden.

Ist die zu erwartende SHBG-Konzentration in den Proben höher als in dem Kalibrator Nr. 5, müssen die Proben ergänzend mit **DIL** Probenverdünnungspuffer 20-fach verdünnt werden:

Probe 1: (**20-fache Verdünnung**)

380 µl **DIL** Probenverdünnungspuffer + 20 µl Serumprobe
Probe gründlich mischen.

Probe 2: (**zusätzlich 20-fache Verdünnung**)

380 µl **DIL** Probenverdünnungspuffer + 20 µl der Probe 1.
Probe gründlich mischen.

8.3 Testdurchführung

(siehe Testschema Abschnitt 15)

- A. 20 µl** der **Kalibratoren** **CAL**, **Kontrolle** **CONTROL** und **Serumproben in Zweifachbestimmung** in entsprechende Kavitäten pipettieren. **Kavitäten A1-A2 bleiben frei (Blank)**.
- B. 100 µl Konjugat** **CONJ** in alle Kavitäten **außer A1-A2** pipettieren.
- C. 60 Minuten** bei **+37 °C** unter Schütteln (**500 bis 800 rpm**) inkubieren.
- D. 5x**, wie unten beschrieben, waschen.
- E. 100 µl Substrat** **SUB** in jede Kavität pipettieren; Streifen entweder bei **Raumtemperatur** (**+18...+25 °C**) **im Dunkeln** für **15–30 Minuten** (abhängig von der Farbintensität) oder für **10 Minuten** bei **+37 °C** unter Schütteln (**500-800 rpm**) inkubieren.
- F. 100 µl Stopplösung** **STOP** in alle Kavitäten (auch Blank) in selber Reihenfolge und Geschwindigkeit wie das Substrat pipettieren und für **1-2 Minuten** bei **Raumtemperatur schütteln**.
- G. Messen der Optischen Dichte** bei **450 nm** **innerhalb von 20 Minuten**.

Waschen

Es wird empfohlen, ein automatisches Mikroplatten-Waschgerät mit 5 Waschzyklen und einem jeweiligen Wasch-Volumen von 300 µl pro Kavität und Zyklus zu benutzen.

Die Waschprozedur kann ebenso manuell durchgeführt werden:

- Überstand aus den Kavitäten in einem Behälter mit Desinfektionsmittel verwerfen;
- 300 µl der vorbereiteten Waschlösung (Abschnitt 8.1) in jede Kavität geben, die Platte für 5-10 Sekunden sorgfältig schütteln und den Überstand verwerfen, 5 Mal wiederholen;
- Ausklopfen der Kavitäten auf einer saugfähigen Unterlage bis alle Flüssigkeit entfernt ist.

8 DATENVERARBEITUNG

Bei Benutzung eines Photometers, welcher keine Nullstellung erlaubt, wird der OD-Wert der Kavitäten A1-A2 (Blank) von allen anderen OD-Werten vor weiterer Kalkulation subtrahiert. Beispiel:

OD (Kalibrator 5) gemessen = 2,28 und OD (Blank) = 0,06;

OD (Kalibrator 5) berechnet = $2,28 - 0,06 = 2,22$.

8.4 Datenverlässlichkeit (OD_{450 nm})

Die Daten sollten folgende Kriterien erfüllen:

- Mittelwert der OD des Blank (der Kavitäten A1-A2) $\leq 0,100$;
- Mittelwert der OD des Kalibrators 5 $\geq 1,0$ (nach Blank Subtraktion);
- Konzentration der Kontrolle muss innerhalb des Bereiches liegen, welcher auf dem Flaschenetikett angegebenen ist.

Sollten die gemessenen Daten die Bedingungen nicht erfüllen, werden die Resultate als unzulässig betrachtet und der Test sollte wiederholt werden.

8.5 Quantitative Bestimmung

Eine spezialisierte Software zur quantitativen Bestimmung wird empfohlen. Die Mittelwerte der OD der Kalibratoren bei 450 nm werden gegen deren jeweilige SHBG-Konzentration mittels **4PL oder 5PL Näherung** (Abb. 2 Typische Standardkurve) aufgetragen. Die Berechnung der SHBG-Konzentration der Proben erfolgt anhand der Standardkurve.

Eine Extrapolation der Standardkurve für SHBG-Konzentrationswerte, die die Konzentration des Kalibrators 5 überschreiten, ist nicht zulässig.

In diesem Fall muss die Probe 20fach mit dem Probenverdünnungspuffer verdünnt und erneut getestet werden. Die gemessenen Konzentrationen der vor-verdünnten Proben sind mit dem Verdünnungsfaktor (20x) zu multiplizieren.

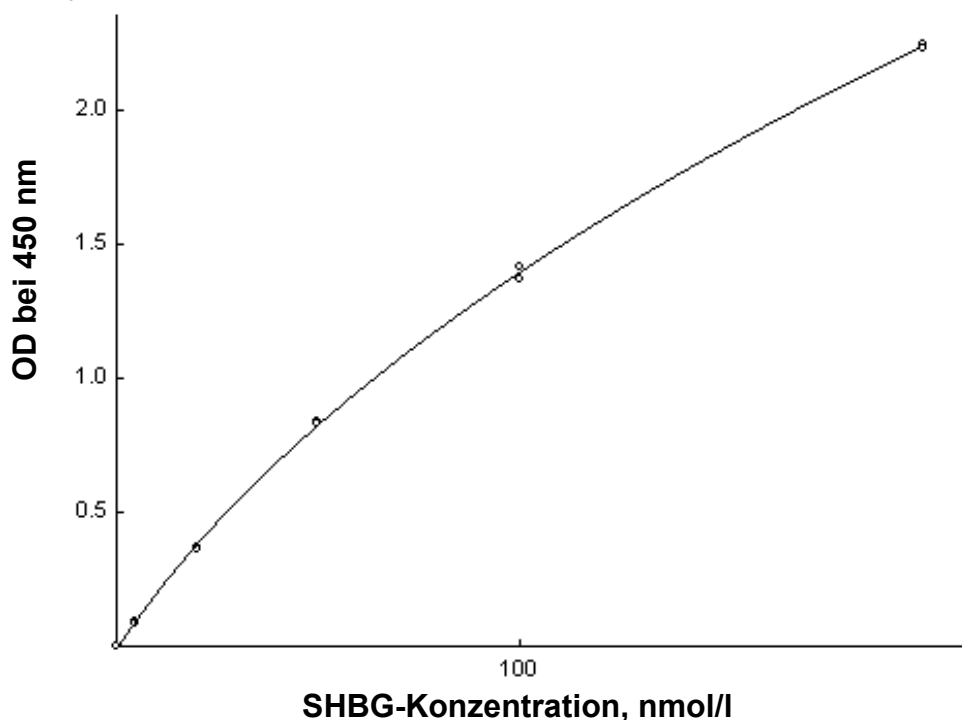


Abb.2 Typische Standardkurve

Beispielstandardkurve! Nicht zur Auswertung benutzen

9 REFERENZWERTE

Mit Hilfe des **SHBG Testkits** wurden Blutserumproben von gesunden Blutspendern beider Geschlechter (21-45 Jahre) untersucht. Die ermittelten Konzentrationswerte sind in folgender Tabelle dargestellt. Der angegebene Bereich dient jedoch nur als eine Orientierungshilfe.

Es wird ausdrücklich empfohlen, dass jedes Labor einen eigenen Referenzbereich für SHBG–Normkonzentrationen bestimmt.

Gruppe	SHBG-Konzentrationsbereich (nmol/l)	Mittelwert (nmol/l)
Gesunde Männer (N=70)	12,4 – 78,4	38,5
Gesunde, nicht schwangere Frauen (N=85)	14,1 – 129	67

11. QUALITÄTSKONTROLLE

Es wird empfohlen, Kontrollproben entsprechend der nationalen und regionalen Vorschriften zu benutzen. Der Einsatz der Kontrollproben sichert die Tag-zu-Tag Gültigkeit der Ergebnisse.

12. TESTCHARAKTERISTIKA

12.1 Eichung:

Der **SHBG Testkit** wurde gegen den ersten internationalen Standard WHO 95/560 kalibriert.

12.2 Spezifität:

Laut der Produktspezifikation des Lieferanten wurde keine Kreuzreaktion der beiden im Testkit verwendeten monoklonalen Antikörpern mit humanem Serumalbumin (HSA) beobachtet.

Die monoklonalen HRP-konjugierten Anti-SHBG-Antikörper zeigten zudem keine Kreuzreaktion mit Thyroxin-bindenden Globulin (TBG), Kortikosteroid-bindenden Globulin (Transkortin), AFP oder humanem IgG.

12.3 Analytische Sensitivität:

Die analytische Sensitivität des **SHBG Testkits**, d.h. die minimale Konzentration, die sich vom Kalibrator 0 sicher unterscheiden lässt, beträgt 2,0 nmol/l. Zur Ermittlung wurde der Mittelwert einer 10fach-Bestimmung der OD des Kalibrators 0 unter Berücksichtigung der Standardabweichung (+ 2 SD) gebildet.

12.4 Messbereich:

Der **SHBG Testkit** ist validiert für die Detektion eines SHBG-Konzentrationsbereiches von 2- 200 nmol/l validiert.

12.5 High-Dose-Hook-Effekt:

Der High-Dose-Hook-Effekt wurde bei SHBG-Konzentrationen bis zu 10 000 nmol/l nicht beobachtet. Der High-Dose-Hook-Effekt wurde durch Aufstocken des Kalibrator 0 mit Antigen bestimmt.

12.6 Intra-assay und Inter-assay Varianz:

Um einen **intra-assay Variationskoeffizienten** festzulegen, wurden 8 Blutserumproben, jeweils in 9fach-Bestimmung untersucht. Die Testresultate sind in der Tabelle dargestellt:

Probe	Mittlere SHBG-Konzentration, nmol/l	Intra-assay VK	
		SD	VK, %
1	10,8	0,51	4,7
2	22,7	0,81	3,6
3	27,9	0,68	2,4
4	30,7	0,81	2,6
5	40,1	1,60	4,0
6	56,8	1,60	2,8
7	95,3	2,84	3,0
8	150	7,4	4,9

Um einen **inter-assay Variationskoeffizient** festzulegen, wurden 8 Blutserumproben drei Mal mit einem Intervall von einer Woche von verschiedenen Anwendern untersucht. Jede Probe wurde 9 Mal gemessen. Die Testergebnisse sind in der Tabelle dargestellt:

Probe	Mittlere SHBG-Konzentration, nmol/l			Inter-assay VK	
	1. Test	2. Test	3. Test	SD	VK, %
1	29,4	32,3	31,0	1,45	4,7
2	46,6	49,4	50,9	2,18	4,5
3	61,7	67,8	67,4	3,41	5,2
4	68,9	76,1	77,1	4,47	6,0
5	78,6	85,9	87,7	4,82	5,7
6	88,7	96,1	98,4	5,07	5,4
7	99,9	108	108	4,7	4,4
8	153	165	160	6,0	3,8

12.7 Linearitätstest:

Mit dem **SHBG Testkit** wurde eine Verdünnungsreihe von drei humanen Blutserumproben mit bekannter SHBG-Konzentration untersucht. Die Resultate sind in der folgenden Tabelle dargestellt:


Probe	Verdünnung	Gemessene Konzentration, nmol/l	Erwartete Konzentration, nmol/l	Verhältnis gemessener zu erwarteter Konzentration, %
1	20x	144,0		
	1:2	67,5	72,0	94
	1:4	34,3	36,0	95
	1:8	18,6	18,0	103
	1:16	9,35	9,0	104
2	20x	102,0		
	1:2	47,3	51,0	93
	1:4	24,3	25,5	95
	1:8	12,2	12,8	96
	1:16	6,27	6,38	98
3	20x	86,5		
	1:2	41,8	43,2	97
	1:4	22,8	21,6	105
	1:8	11,9	10,8	110
	1:16	6,18	5,4	114




13 GRENZEN DER METHODE

Eine klinische Diagnose sollte nicht allein mit Hilfe der Ergebnisse einer einzelnen diagnostischen Methode erhoben werden. Zur Diagnosestellung sollten vom Arzt alle verfügbaren klinischen und Laborbefunde berücksichtigt werden.

14 VORSICHTSMAßNAHMEN

- **Der Testkit ist ausschließlich zum in vitro–Gebrauch bestimmt.** Um zuverlässige Testergebnisse zu erhalten, ist die Arbeitsanleitung strikt einzuhalten. Diese Gebrauchsanweisung ist nur für den vorliegenden Testkit mit dem aufgeführten Inhalt gültig. Jeglicher Austausch der Kitkomponenten ist durch die CE-Regularien nicht gestattet.
- Der Testkit oder einzelne Kit-Komponenten dürfen nach Ablauf des auf der Verpackung angegebenen Verfallsdatums nicht mehr verwendet werden. Die Haltbarkeit der verdünnten Komponenten muss ebenfalls berücksichtigt werden.
- Das Mischen oder die gleichzeitige Verwendung von Reagenzien verschiedener Testchargen, ausgenommen Substrat, Stopp- und Waschlösung, ist nicht gestattet.
- Substrat, Stopplösung und Waschlösung anderer Hersteller nicht verwenden.
- Nur “P”-gekennzeichnete Astra Biotech Waschlösung benutzen.
- Die Stopplösung ist eine 1 M Salzsäure (HCl–Lösung). Vermeiden Sie Haut- und Schleimhautkontakt. Bei Kontakt den betroffenen Bereich mit fließendem Wasser spülen und gegebenenfalls einen Arzt aufsuchen.
- Bitte folgende bekannte Verfahrensregeln beachten:
 - Reagenzien unmittelbar nach dem Waschen in die Kavitäten pipettieren;
 - Kontamination der Lösungen vermeiden;
 - Bei teilweiser Nutzung des Testkits nur benötigtes Volumen in ein gesonderten Behälter geben,

- Nicht benutzte Reagenzien NICHT zurück in die ursprünglichen Original-Fläschchen füllen;
- Direkte Sonneneinstrahlung während der Inkubation vermeiden;
- Reagenzien in gleicher Reihenfolge pipettieren, um Unterschiede in den Reaktionszeiten zwischen den Kavitäten zu vermeiden. Die gesamte Pipettierzeit für Kalibratoren, Kontrolle und Proben darf 15 Minuten nicht überschreiten;
- Die Temperatur der Inkubation aller immunologischen Reaktionen muss bei +37 °C liegen;
- Den Boden der Kavitäten nicht berühren;
- Kalibratoren müssen bei jedem Testlauf gemessen werden. Es wird außerdem empfohlen, die SHBG-Konzentration der Kontrolle immer zu bestimmen.
- Die TMB-Lösung sollte farblos sein. Eine helle Färbung der Lösung ist zulässig. Vermeiden Sie direkte Sonneneinstrahlung des Substrates.
-  Alle Reagenzien dieses Testkits, die humanen Ursprungs sind, ergaben bei der Prüfung auf HBsAg (Hepatitis B surface Antigen) bzw. Antikörper gegen HIV („Human Immunodeficiency Virus“) und HCV (Hepatitis C Virus) ein negatives Ergebnis. Dennoch kann das Vorhandensein infektiöser Erreger durch keinen Test mit absoluter Sicherheit ausgeschlossen werden. Die Reagenzien und Proben sollten deshalb immer wie potentiell infektiöses Material behandelt werden.

-  Nach dem Gebrauch werden Streifen, Kalibratoren, Kontrollen, Proben und alle Verbrauchsmittel (Reaktionsgefäße, Fläschchen, Handschuhe, Pipettenspitzen), die mit den Proben während der Bearbeitung oder Lagerung in Kontakt kamen, separat gesammelt und autoklaviert. Pipettenspitzen können anstelle des Autoklavierens durch Inkubation in desinfizierenden Substanzen sterilisiert werden. Nach der Sterilisation können alle Komponenten und Einmal-Artikel als nicht gefährlicher Müll behandelt werden. Andere Kitbestandteile werden auf konventionelle Weise entsorgt.
-  Während der manuellen Waschprozedur Überstände nicht in den Abfluss geben, sondern in einen Behälter mit Desinfektionsmittel.
-  Beim Umgang mit potentiell infektiösem Material müssen die folgenden Vorsichtsmaßnahmen beachtet werden:
 - Im Laborraum nicht rauchen, nicht trinken und nicht essen;
 - Schutzhandschuhe verwenden;
 - Nie mit dem Mund pipettieren;
 - Verspritzen von Flüssigkeiten vermeiden. Sollte doch Flüssigkeit vergossen worden sein, diese sofort aufnehmen und die verschmutzte Oberfläche desinfizieren.
 - Bei der Verwendung des Testkits müssen die Anforderungen der guten Laborpraxis (GLP) inklusive aller Richtlinien beachtet werden.



Der Testkit beinhaltet Reizstoffe (**CONJ**, **DIL**, **CAL**, **CONTROL**). Daher sollten folgende Vorsichtsmaßnahmen beachtet werden:

- P261 - Einatmen von Staub / Rauch / Gas / Nebel / Dampf / Aerosol vermeiden;
 - P272 - Kontaminierte Arbeitskleidung nicht außerhalb des Arbeitsplatzes tragen;
 - P280 - Schutzhandschuhe / Schutzkleidung / Augenschutz / Gesichtsschutz tragen;
 - P302+P352 - Bei Berührung mit der Haut: Mit viel Wasser und Seife waschen;
 - P333+P313 - Bei Hautreizung oder -ausschlag: Ärztlichen Rat einholen / ärztliche Hilfe hinzuziehen;
 - P363 - Kontaminierte Kleidung vor erneutem Tragen waschen;
 - P501 - Inhalt/Behälter den nationalen Vorschriften entsprechend der Entsorgung zuführen.
-
- Die Vorsichtsmaßnahmen entsprechen der Verordnung EG Nr. 1272/2008.

15 TESTSCHEMA

Kavität	«Blank»	CAL CONTROL	Proben
Reagenzien			
CAL CONTROL	–	20 µl	–
Proben	–	–	20 µl
CONJ	–	100 µl	100 µl
Inkubation No.1	60 min, +37 °C, 500–800 rpm		
WASH P (verdünnt)	5 x 300 µl		
SUB	100 µl	100 µl	100 µl
Inkubation No.2	15–30 min, +18-...+25 °C, im Dunkeln		
	10 min, +37 °C, 500–800 rpm		
STOP	100 µl	100 µl	100 µl
Rühren	1–2 min, +18...+25 °C		
OD-Messung	450 nm		
Berechnung	Spezielle Software		

2. INTENDED USE

The **SHBG kit** is provided for the **quantitative determination of sex hormone-binding globulin (SHBG) in human serum.**

SHBG is a serum protein that binds steroid sex hormones. SHBG is synthesized in the liver. It is a dimeric glycoprotein with a molecular mass of 80 to 100 kDa (depending on the degree of glycosilation). Each dimer binds one molecule of steroid. The protein is specific for 5-alpha-dihydrotestosterone, testosterone, and 17-beta-estradiol.

Steroid hormones circulate in blood partly in their free form and partly as a complex with albumin or corresponding specific protein (SHBG in the case of sex steroids). Fraction of sex steroid hormone that is not bound to SHBG (so-called bioavailable hormone) can perform its regulatory function in target cells. Steroids bound to albumin are also bioavailable, because such binding is weak and does not block the diffusion of the hormone into target cells. SHBG is the primary carrier protein for sex steroid hormones. It participates in plasma metabolic clearance rate of steroid hormones. Thus, the level of SHBG regulates the bioavailability of these hormones to target tissues.

SHBG shows maximal affinity to androgens and less – to estrogens. SHBG synthesis is affected by sex steroids. Estrogens show stimulating effect, whereas androgens inhibit its synthesis.

In healthy individuals SHBG concentration may vary over a wide range. In general, its concentration in females is higher than in males.

SHBG concentration increases in the case of hyperthyroidism or hyperestrogenia (luteal phase of the cycle, pregnancy, intake of estrogen-containing oral contraceptives, cirrhosis etc.). In adult males the concentration of bioavailable testosterone decreases with age due to increased concentration of SHBG. In females decreased concentration of SHBG correlates with hyperandrogenic status (polycystic ovary syndrome, congenital dysfunctions of adrenal cortex, hirsutism). Moderate decrease in SHBG concentration is also observed in the case of hypothyroidism, Cushing disease, hyperprolactinemia, acromegalia and after the treatment with androgens or progestins that have androgenic effect.

SHBG concentration is used for calculation of free androgen index (ratio between concentrations of total testosterone and SHBG).

3. PRINCIPLE OF TEST

The **SHBG kit** is a “sandwich” type of solid-phase enzyme immunoassay, based on two monoclonal antibodies that are specific for different epitopes of SHBG molecule. One of these antibodies is conjugated with horseradish peroxidase (HRP); the other is coated onto the inner surface of microwells. SHBG molecules from the serum sample bind to both immobilized antibody and anti-SHBG-peroxidase conjugate.

Then the wells are washed with wash solution to remove any material not bound to the inner surface of the wells. Quantity of the bound conjugate is directly proportional to SHBG level in the sample.

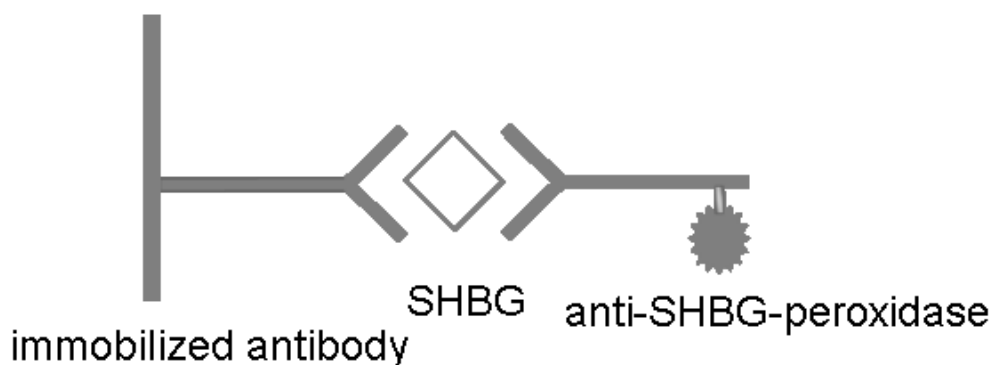


Fig. 1 Assay scheme

During the incubation with TMB solution the colour is developing. The intensity of the colour is directly proportional to SHBG concentration in specimens. SHBG concentration in the patient sample is read from a standard curve that is processed in each assay.

4. MATERIALS PROVIDED

MP	Microplate: 12 breakable 8-well strips (total 96 wells) coated with anti-SHBG monoclonal antibodies	1 pcs
CONJ	Conjugate: solution contains anti-SHBG monoclonal antibodies conjugated with HRP	14 mL, ready to use
0-5 CAL	SHBG calibrators: protein-based solution or lyophilized preparations containing known SHBG concentrations - 0; 5; 20; 50; 100; 200 nmol/L. For exact SHBG concentrations, see vial labels	6 vials, 0.5 mL each; ready to use or lyophilized preparations
CONTROL	SHBG control: protein-based solution or lyophilized preparation containing known SHBG concentration. For exact range of SHBG concentration, see vial label	0.5 mL, ready to use or lyophilized preparation

SUB	Substrate (TMB solution): 3,3',5,5'-tetramethylbenzidine solution in citrate buffer containing hydrogen peroxide	14 mL, ready to use
WASH P 20X	Wash solution P, 20X concentrated: surfactant in buffered saline, sufficient for preparation of 280 mL of solution	14 mL, concentrated
STOP	Stop solution: 1 M HCl solution	14 mL, ready to use
DIL	Sample diluent: protein-based solution with stabilizers	20 mL, ready to use

5. EQUIPMENT AND MATERIALS REQUIRED BUT NOT PROVIDED

- 1-channel calibrated variable precision pipettes, with disposable tips;
- 8-channel calibrated variable precision pipette, with disposable tips;
- microplate incubator/shaker (+37 °C, 400–800 rpm);
- manual or automatic equipment for rinsing wells;
- calibrated microplate reader (450 nm);
- vortex tube mixer;
- deionized or distilled water;
- graduated beaker and cylinder of appropriate volume;
- latex or plastic gloves;
- trays for pipetting reagents with 8-channel pipette;
- disinfectant;
- absorbent material (for manual wash).

6. STORAGE AND STABILITY OF THE KIT

The expiration date of the kit is printed on the box label; the expiration date for each component is printed on the respective label.

The **SHBG kit** should be stored at +2...+8 °C upon receipt, preferably in the original kit box, until the expiration date. Storage at +25 °C is allowed but for no more than 5 days.

Shelf life of the kit is 12 months.

After initial opening the kit is stable until the expiration date if stored at +2...+8 °C.

If used in several separate experiments, after initial opening kit contents should be stored as follows:

- unused strips: in a firmly closed resealable zipper bag at +2...+8 °C until the expiration date;
- vials with conjugate, calibrators and control (ready-to-use) and sample diluent: at +2...+8 °C until the expiration date; vials with calibrators and control (reconstituted): at +2...+8 °C for no more than 1 month after opening;
- vial with substrate: at +2...+8 °C until the expiration date, protected from light;
- vials with concentrated wash solution and stop solution: at +2...+8 °C until the expiration date;
- wash solution prepared for use: at room temperature (+18...+25 °C) for no more than 5 days or at +2...+8 °C for no more than 4 weeks in a firmly closed bottle.

Damaged Test Kits

In case of any severe damage of the test kit or components, Astra Biotech GmbH has to be informed in writing, during one week after receiving the kit. Usage of severely damaged single components for a test run is not recommended.

7. SAMPLE COLLECTION AND STORAGE

Collect blood by venipuncture. After clotting, the serum is separated by centrifugation.

Do not use plasma, haemolyzed (bright red) or lipaemic (milky) serum samples as well as samples containing sodium azide as preservative.

Store serum samples at +2...+8 °C for no more than 2 days. Aliquot and freeze the samples for a longer storage ($\leq -20^{\circ}$). Avoid repeated freezing.

8. TEST PROCEDURE

The **SHBG kit** is designed for 96 tests. This is sufficient for 40 unknowns, 6 calibrators, 1 control and 1 blank (OD of TMB solution) in duplicates, provided that all the strips are used simultaneously.

8.1. Reagent Preparation

Allow all the reagents to reach room temperature, and then thoroughly stir.

MP Keep the **microplate** at room temperature (+18...+25 °C) for at least 30 minutes before opening the bag. Place required number of strips onto strip holder. Place unused strips into the resealable zipper bag and reseal duly.

CAL CONTROL Calibrators and Control

Liquid calibrators and control are ready to use.

Prepare lyophilized calibrators and control as follows. Gently tap on the vial caps to knock off all the dry matter. Open the vials and carefully place the caps upside down on the clean dry surface. Add 0.5 mL of distilled or deionized water to each vial with lyophilized calibrators and control, close vials with the corresponding caps and leave for 10 min at room temperature without stirring. Then stir gently avoiding foaming, until the dry matter is completely dissolved. Leave for another 10 minutes at room temperature stirring gently periodically. Make sure that no dry matter is left on the caps and walls of the vials.

WASH P Prepare required volume of **wash solution** by dilution of the concentrate 20-fold with distilled or deionized water. For example:

5 mL **WASH P 20X** + 95 mL water

Mix thoroughly, avoid foaming.

SUB Protect **substrate** from direct light.

8.2. Sample Preparation

Allow samples to reach room temperature. Stir samples gently in order to ensure homogeneity.

Before the analysis all the serum samples (except calibrators and control) should be diluted 20-fold with sample diluent. If expected SHBG concentration in the serum sample is higher than in calibrator 5, the sample should be additionally diluted 20-fold with sample diluent:

Sample 1 (20-fold dilution):

380 μ L sample diluent **DIL** + 20 μ L serum sample

Sample 2 (additional 20-fold dilution):
380 μL sample diluent **DIL** + 20 μL Sample 1

Mix thoroughly after each dilution.

8.3 Assay Procedure

(assay scheme section 15)

- A.** Pipette **20 μL** of **calibrators** **CAL**, **control** **CONTROL** and **patient's samples in duplicates** into the respective wells; **Leave wells A1-A2 empty for blank!**
- B.** Pipette **100 μL** of **conjugate** **CONJ** into each well, **except wells A1-A2.**
- C.** Incubate for **60 minutes at +37 °C while shaking (500–800 rpm).**
- D.** Wash 5 times, as described below.
- E.** Pipette **100 μL** of **substrate** **SUB** into each well (including blank); incubate strips **at room temperature (+18...+25 °C) in the dark for 15-30 minutes** (depending on the colour intensity) or **10 minutes while shaking (500-800 rpm) at +37 °C.**
- F.** Pipette **100 μL** of **stop solution** **STOP** to all the wells in the same sequence and at the same speed as used for dispensing TMB substrate. Shake for 1–2 min at room temperature.
- G.** Read **OD at 450 nm within 20 min.**

8.4. Wash Procedure

It is advisable to use an automatic microplate washer set at 5 wash cycles and a volume of 300 μ L of wash solution per well per cycle.

If an automatic washer is not available, the wash procedure can be carried out manually:

- remove the contents of the wells into a container with disinfectant;
- dispense 300 μ L of wash solution (section 8.1) into each well, shake the plate carefully for 5–10 sec and remove the contents of the wells; repeat 5 times;
- strike the wells sharply on absorbent material to remove any liquid residue.

9. DATA PROCESSING

If the reader cannot be adjusted to zero using the substrate blank in wells A1-A2, subtract mean OD value of wells A1-A2 from all OD values before further calculations.

Example:

OD (Cal 5) measured = 2.28 and OD (blank) = 0.06;

OD (Cal 5) calculated = $2.28 - 0.06 = \underline{2.22}$

9.1. Data Reliability (for OD_{450 nm})

The data should meet the following criteria:

- average blank OD (in wells A1-A2) ≤ 0.100 ;
- average OD of Cal 5 ≥ 1.0 (after blank subtraction);
- control's concentration must fall within the acceptability range that is shown on the vial label.

If the data obtained do not meet the criteria, the results are considered unreliable and the test should be repeated.

9.2. Quantitative Determination

Specialized software for quantitative determination is recommended. Mean OD values of the calibrators at 450 nm versus their respective SHBG concentrations using **4PL or 5PL fit** (Fig. 2 Typical standard curve). Calculate concentration of SHBG in samples using standard curve.

Any extrapolation of the standard curve to SHBG concentration above the nominal value of calibrator 5 is forbidden. In this case the sample should be diluted 20-fold with sample diluent and re-tested. Multiply the measured concentration of additionally pre-diluted samples by additional dilution factor (20-fold).

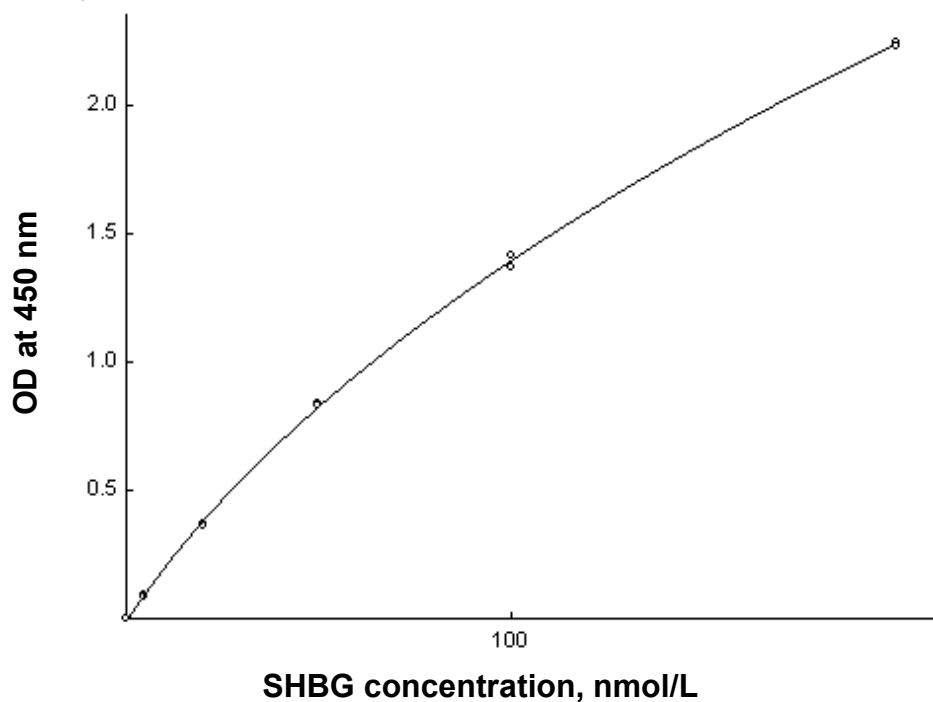


Fig. 2 Example of typical standard curve

Do not use for evaluation of real assay data!

10. EXPECTED VALUES

Serum samples collected from apparently healthy people (both males and females) at the age 21– 45, were assayed with **SHBG kit**. The results are listed below. These limits should be considered as guidelines only.

Study Group	SHBG concentration range (nmol/L)	Median (nmol/L)
Healthy men (n =70)	12.4 – 78.4	38.5
Healthy non-pregnant women (n = 85)	14.1 – 129	67

It is highly recommended laboratory to determine its own reference range of SHBG concentrations.

11. QUALITY CONTROL

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.

12. PERFORMANCE CHARACTERISTICS OF THE ASSAY

12.1 Calibration – Traceability:

The **SHBG kit** was calibrated against 1st WHO International Standard 95/560.

12.2 Specificity:

According to Product specification provided by the supplier, both monoclonal antibodies used in the assay do not show cross-interaction with human serum albumin (HSA).

Anti-SHBG monoclonal antibodies conjugated with HRP also do not show cross-reaction with thyroxin-binding globulin (TBG), corticosteroid-binding globulin (transcortin), AFP and human IgG.

12.3 Analytical Sensitivity:

Analytical sensitivity of **SHBG kit**, i.e. concentration that can be distinguished from zero calibrator, is 2.0 nmol/L. It is defined as mean OD of 10 replicates of calibrator 0 plus 2 SD.

12.4 Measurement Range:

The **SHBG kit** was validated for measurement of SHBG concentration within the concentration diapason (without dilution) of 2 -200 nmol/L.

12.5 Hook Effect:

For **SHBG kit** high dose hook effect was not detected for concentrations up to 10 000 nmol/L. High dose hook effect was determined by spiking calibrator 0 matrix with antigen.

12.6 Intra- and Inter-Assay Variation:

For **intra-assay CV** determination 8 serum samples were assayed in 9 replicates each. The results are shown below.

Sample	Mean SHBG concentration, nmol/L	Intra-assay CV	
		SD	CV, %
1	10.8	0.51	4.7
2	22.7	0.81	3.6
3	27.9	0.68	2.4
4	30.7	0.81	2.6
5	40.1	1.60	4.0

6	56.8	1.60	2.8
7	95.3	2.84	3.0
8	150	7.4	4.9

For **inter-assay CV** determination 8 serum samples were assayed 3 times by different operators with 1-week interval. Each specimen was assayed in 9 replicates. The results are shown below.

Sample	Mean SHBG concentration, nmol/L			Inter-assay CV	
	1 assay	2 assay	3 assay	SD	CV, %
1	29.4	32.3	31.0	1.45	4.7
2	46.6	49.4	50.9	2.18	4.5
3	61.7	67.8	67.4	3.41	5.2
4	68.9	76.1	77.1	4.47	6.0
5	78.6	85.9	87.7	4.82	5.7
6	88.7	96.1	98.4	5.07	5.4
7	99.9	108	108	4.7	4.4
8	153	165	160	6.0	3.8

12.7 Dilution Parallelism of Serum Samples:

Serial dilutions of three human serum samples with predetermined SHBG concentration in sample diluent were assayed with **SHBG kit** with the following result:

Sample	Dilution	Measured concentration, nmol/L	Expected concentration, nmol/L	Measured/expected concentration ratio, %
1	20x	144.0		
	1:2	67.5	72.0	94
	1:4	34.3	36.0	95
	1:8	18.6	18.0	103
	1:16	9.35	9.0	104

Sample	Dilution	Measured concentration, nmol/L	Expected concentration, nmol/L	Measured/ expected concentration ratio, %
2	20x	102.0		
	1:2	47.3	51.0	93
	1:4	24.3	25.5	95
	1:8	12.2	12.8	96
	1:16	6.27	6.38	98
3	20x	86.5		
	1:2	41.8	43.2	97
	1:4	22.8	21.6	105
	1:8	11.9	10.8	110
	1:16	6.18	5.4	114





13. LIMITATION OF THE METHOD

Clinical diagnoses should not be based on the results of in vitro diagnostic methods alone. To make a diagnosis, the physician should consider all available clinical and laboratory findings.

14. SAFETY PRECAUTIONS

- **This kit is for in vitro diagnostic use only.** Operator should follow the manual closely in order to ensure reliable data. The manual is valid for the present kit only, within the listed composition. Any substitution of kit components is not allowed by CE regulations.
- Do not use kit or its components after the expiration date indicated on the label. Take into account stability period for reconstituted reagents.

- Do not mix or use together reagents from different lots of the kit except substrate, stop solution and wash solution.
- Do not use substrate, stop solution and wash solution supplied by other vendors.
- Use only “P”-labeled Astra Biotech wash solution.
- Note that stop solution is 1 M HCl solution. Avoid contacts with skin and mucosa. In case of contact rinse affected area thoroughly with plenty of water and seek medical advice.
- Take into account the following common procedural notes:
 - always pipette reagents into wells immediately after washing procedure;
 - avoid contamination of the solutions;
 - in case of partial use of the kit, dispense only required volume of the reagent into the tray;
 - do not pour unused reagents back into the original vials;
 - avoid exposure to direct sunlight during incubations;
 - always pipette reagents in the same order to minimize reaction time differences between wells; the total dispensing time for the calibrators and samples must not exceed 15 min;
 - the incubation temperature for all the immunological reactions must be kept at +37 °C;
 - do not touch the bottom of the wells;
 - calibrators should be measured in each separate assay. It is also recommended to measure each time SHBG concentration in the control.
- TMB solution should be colourless. Light colouring of solution is admissible. Avoid direct exposure of substrate to sunlight.

-  Source materials of human origin used for kit components preparation were tested and found negative for HBsAg, anti-HIV and anti-HCV antibodies. However, none of known laboratory test guarantees absence of these viral agents. Therefore, all kit components and patient's samples should be handled as potentially hazardous.
-  After usage strips, calibrators, control, specimens and all consumables which contacted with specimens during handling, storage or assay (tubes, vials, gloves, pipette tips etc.) should be collected separately and sterilized by autoclaving. Instead of autoclaving pipette tips may be sterilized by disinfectant treatment. After sterilization all components and expendable materials may be utilized as non-dangerous garbage. Other components of the kit should be discarded into conventional garbage.
-  During manual washing procedure do not discard the contents of the wells directly to drainage. Use a container with disinfectant solution.
-  As the kit contains potentially hazardous material, the following precautions should be taken:
 - do not smoke, eat or drink while performing the assay;
 - always use protective gloves;
 - never pipette material by mouth;
 - in case of spilling, wipe up the spills promptly and wash affected area thoroughly using decontaminant.
 - GLP including all general and individual regulations should be applied for the kit usage.



As the kit contains irritant (**CONJ**, **DIL**, **CAL**, **CONTROL**), the following precautions should be observed:

- P261 - Avoid breathing spray;
 - P272 - Contaminated work clothing should not be allowed out of the workplace;
 - P280 - Wear protective gloves/protective clothing/eye protection;
 - P302+P352 - IF ON SKIN: Wash with plenty of soap and water;
 - P333+P313 - If skin irritation or rash occurs: Get medical advice/attention;
 - P363 - Wash contaminated clothing before reuse;
 - P501 - Dispose of contents/container in accordance with national regulation.
-
- Precautionary statements according to Regulation EC № 1272/2008.

15. ASSAY SCHEME

Wells	«Blank»	CAL CONTROL	Samples
Reagents			
CAL CONTROL	–	20 µL	–
Samples	–	–	20 µL
CONJ	–	100 µL	100 µL
Incubation No.1	60 min, +37 °C, 500–800 rpm		
WASH P (diluted)	5 x 300 µL		
SUB	100 µL	100 µL	100 µL
Incubation No.2	15–30 min, +18...+25 °C, in the dark		
	10 min, +37 °C, 500–800 rpm		
STOP	100 µL	100 µL	100 µL
Stirring	1–2 min, +18...+25 °C		
OD measuring	450 nm		
Calculations	Corresponding software		

January, 26, 2016



Astra Biotech GmbH
Rudower Chaussee 29
12489 Berlin, Germany
Telefon: +49 (0)30 74 69 65 09
E-Mail: info@astrabiotech.de
www.astrabiotech.de