

SHBG [I-125] IRMA KIT

RK-86CT. Estuche para 100 determinaciones

Ensayo inmunoradiométrico para la determinación cuantitativa *in vitro* de la globulina transportadora de hormonas sexuales (SHBG) en suero humano, en el rango de 0-250 nmol/L.

Introducción

La globulina transportadora de hormonas sexuales (SHBG), también conocida como proteína transportadora de esteroides (SBP), es una glicoproteína de aproximadamente 86000 Da producida fundamentalmente por el hígado (otros sitios de producción: ovario, útero, placenta, testis). Su función biológica fundamental es el transporte de las hormonas sexuales esteroideas. Muestra una gran afinidad por la Testosterona, Dihidrotestosterona y Estradiol.

Los niveles de SHBG son relativamente bajos en el momento del nacimiento, aumentan a altos niveles durante la infancia y disminuyen durante la pubertad. Las concentraciones fisiológicas más elevadas se observan a finales del embarazo.

Se observan niveles elevados de SHBG en varias condiciones patológicas, como la obesidad y el hiperandrogenismo femenino (incluyendo el ovario poliquístico). La concentración de SHBG están relacionada inversamente con la concentración de Testosterona libre, que se supone biológicamente activa. En la práctica clínica es de gran utilidad la determinación del "índice de testosterona libre", basado en el porcentaje de Testosterona total/ SHBG.

Principio del ensayo

Este ensayo utiliza el principio del análisis inmunoradiométrico (IRMA) en fase sólida. Para ello emplea dos anticuerpos monoclonales que reconocen dos epítopes diferentes de la molécula. Uno de ellos está marcado con radioyodo (anticuerpo "señal") y el otro, no marcado, funciona como anticuerpo "captura".

El inmunocomplejo formado por el antígeno con los dos anticuerpos ("sándwich") se inmoviliza en la superficie de los tubos de ensayo durante un período de incubación de 2 horas bajo agitación constante. Después se decantan los tubos y se mide la radiactividad enlazada en un contador gamma. La radiactividad presente en los tubos es directamente proporcional a la concentración del antígeno presente en el sistema. Utilizando calibradores de concentración conocida de SHBG se prepara una curva de calibración a partir de la cual se determina por interpolación la concentración de SHBG presente en las muestras.

Contenido del juego

1. TRAZADOR, 1 frasco con 32 mL, listo para usar, contiene < 740 kBq de anti-SHBG marcado con ¹²⁵I y anti-SHBG biotilado en solución tampón con 0,1 % NaN₃ y colorante rojo.

2. CALIBRADORES (S0-S5), 6 frascos listos para usar con 0,5 mL de suero equino con 0,1% NaN₃. Los calibradores contienen: 0, 5, 15, 40, 100, 250 nmol/L y han sido calibrados contra el estándar de referencia WHO 95/560.

3. SUERO CONTROL, 1 frasco, contiene 0,5 mL de suero humano liofilizado con 0,1% NaN₃. La concentración del suero control está especificada en el certificado de calidad incluido.

4. TUBOS RECUBIERTOS: 2x50 tubos de 12x75 mm, empaquetados en cajas plásticas, listos para usar.

5. SOLUCIÓN DE LAVADO, 1 frasco, contiene 20 mL de solución concentrada. Diluir con 700 mL de agua destilada. Contiene 0,2 % NaN₃.

Materiales y equipos necesarios

Gradilla para tubos de ensayo, pipetas de precisión con puntas desechables (10, 300 y 2000 µL), agitador horizontal u orbital, lámina de polietileno, papel absorbente, contador gamma

Materiales y equipos recomendados:

Pipetas de repetición (300 y 2000 µL). Jeringa automática o dispensador para el lavado.

Recolección y almacenamiento de las muestras

Las muestras de suero deben colectarse de acuerdo a los procedimientos habituales que se practican en los laboratorios clínicos. Las muestras pueden conservarse entre 2 y 8 °C si el análisis se efectuará dentro de las 24 horas siguientes a su recolección, de lo contrario deben conservarse congeladas a una temperatura igual o menor que -20 °C hasta 5 meses. Las muestras congeladas deben descongelarse y mezclarse completamente antes de su uso. Evitar la congelación y descongelación repetida de las muestras.

Preparación y conservación de los reactivos

Conservar los reactivos entre 2 y 8 °C después de abiertos. A esta temperatura cada componente es estable hasta la fecha de vencimiento del juego. La fecha de caducidad exacta se especifica en la etiqueta del estuche y en el certificado de calidad.

La solución concentrada de lavado debe diluirse con 700 mL de agua destilada. Así diluida esta solución se conserva entre 2 y 8 °C hasta la fecha de vencimiento del juego.

El suero control se reconstituye con 0,5 mL de agua destilada. Para ello se debe mezclar suavemente evitando la formación de espuma. Permitir que la solución alcance la temperatura ambiente (20 a 30 °C) antes de su uso. Para usos posteriores, conservar entre 2 y 8 °C hasta la fecha de vencimiento del juego.

Procedimiento para el ensayo

(Ver Tabla 1.)

1. Rotular los tubos recubiertos por duplicado para los calibradores (S0-S5), suero control (C) y muestras (Mx). Marcar dos tubos no recubiertos para los totales (T).

- Añadir por duplicado 10 µL de calibrador, suero control y muestras en los tubos apropiados.
- Añadir 300 µL de trazador en cada tubo.
- Fijar la gradilla con los tubos de ensayo firmemente en el agitador horizontal. Cubrir los tubos con una lámina de polietileno. Encender el agitador y ajustar la velocidad de manera tal que el líquido en los tubos esté rotando o agitándose constantemente. Agitar 2 horas a temperatura ambiente.
- Añadir 2 mL de solución de lavado a cada tubo. Aspirar o decantar el líquido de todos los tubos (excepto T) mediante la inversión de la gradilla. Colocar la gradilla sobre un papel absorbente por 2 minutos manteniendo la posición invertida.
- Repetir el procedimiento de lavado según el punto 5.
- Medir la radiactividad de cada tubo por 60 segundos en un contador gamma y calcular la concentración de SHBG en las muestras como se describe a continuación.

Tabla 1. Protocolo del ensayo (volúmenes en microlitros)

	T	S0-S5	C	M
Calibrador		10		
Control			10	
Muestra				10
Trazador	300	300	300	300
Agitar 2 horas a temperatura ambiente				
Solución de lavado		2000	2000	2000
Decantar y secar en papel absorbente				
Solución de lavado		2000	2000	2000
Decantar y secar en papel absorbente				
Medir la radiactividad (60 s/tubo)				
Procesar los datos				

Cálculo de los resultados

En la Tabla 2 y la figura 1 se muestran a manera de ejemplo los cálculos y una curva estándar típica de un ensayo.

Para los cálculos:

Hallar la media de los conteos por minuto (cpm) para cada par de tubos. Restar de cada media el promedio de cpm obtenido para el calibrador de concentración cero (S0 = enlace no específico, NSB). Los valores así corregidos se dividen por la actividad total (T) como se muestra a continuación:

$$B/T (\%) = \frac{S1-5/C/Mx/(\text{cpm}) - S0(\text{cpm})}{T(\text{cpm})} \times 100$$

Construir una curva estándar ploteando las medias de cpm o, alternativamente, los valores B/T% contra la concentración de SHBG de cada calibrador en un papel log-log.

Determinar la concentración de SHBG en las muestras basándose en las respectivas medias de cpm o en los valores B/T%, por interpolación de la curva estándar. No extrapolar valores fuera del rango de la curva.

Para el procesamiento automatizado de los datos, recomendamos el uso del programa de ajuste tipo spline, desarrollado especialmente para el análisis inmunoradiométrico. Existen programas que interpolan los valores que se encuentran entre el calibrador de concentración cero y el primer calibrador. Entre las concentraciones así

calculadas, solo aquellas mayores que el límite de detección del ensayo pueden considerarse como reales (ver sensibilidad).

Tabla 2. Resultados característicos del ensayo

Tubos	Conteos cpm	Media cpm	B/T%	nmol/L
T	303150 294072	298611		
S0	45 40	42	0,014	
S1	3563 3489	3526	1,181	
S2	10799 10842	10821	3,624	
S3	27332 27780	27556	9,228	
S4	61341 62452	61896	20,73	
S5	126134 127507	126820	42,47	
C	29164 29522	29343		42,85

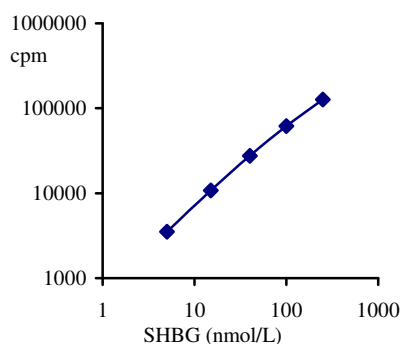


Figura 1

Curva estándar típica (No utilizar para calcular concentraciones de las muestras!)

Características del ensayo

Parámetros característicos

NSB/T < 0,1 %

B_{max}/T: 64,7 – 97,05 %

Sensibilidad

La *sensibilidad analítica* es de 0,11 nmol/L, calculada como la concentración correspondiente al valor de enlace medio más dos desviaciones estándar, para 20 réplicas del calibrador de concentración cero.

La *sensibilidad funcional* es de 0,22 nmol/L, determinada por extrapolación del 20 % del perfil de precisión obtenido con la evaluación de muestras con baja concentración de SHBG en 12 series diferentes.

Especificidad

Con el uso del presente ensayo no se observa reacción cruzada detectable con la IgG humana (hasta 10g/L) y la albúmina sérica humana (hasta 50 g/L).

Precisión

La precisión intra-ensayo fue determinada a partir de 20 réplicas de 6 muestras, medidas en una serie. Para determinar la precisión inter-ensayo se midieron por duplicado 6 muestras, en 12 series independientes. Los valores obtenidos se muestran a continuación.

Intra-ensayo		Inter-ensayo	
Media (nmol/L)	CV %	Media (nmol/L)	CV %
3,11	5,42	3,11	4,10
7,48	5,42	6,62	3,35
28,47	4,99	26,83	6,04
77,20	4,91	72,47	3,83
129,32	7,00	123,80	3,16
207,39	8,58	192,79	4,56

Prueba de recuperación

La recuperación se determinó como la diferencia porcentual entre el incremento observado y el incremento esperado, luego de añadir concentraciones conocidas de SHBG a 3 niveles a 9 muestras de suero diferentes. La recuperación obtenida fue de 94,52 ± 5,21% (media ±SD).

Prueba de dilución (linealidad)

Se diluyeron serialmente 4 muestras con calibrador de concentración cero y se sometieron a ensayo. Se obtuvo la siguiente relación lineal entre los valores medidos (Y) y los valores esperados (X):

$$Y = 0,9301X - 0,5552 \quad R = 0,9962 \quad n = 16$$

Valores de referencia

Se recomienda que cada laboratorio establezca sus propios intervalos de referencia. Los valores que se proporcionan a continuación deben considerarse solo como informativos.

	N	Media	SD	Mín.	Máx.
Mujeres	134	85	65	10	330
Hombres	139	32	12	7,7	81

Limitaciones del procedimiento

- Los reactivos provistos en este juego están optimizados para la medición de SHBG en suero humano.
- Los resultados de este análisis deben ser utilizados conjuntamente a la información clínica pertinente.
- Las muestras hemolizadas, turbias o lipémicas pueden dar resultados falsos, evite su uso.
- No se observa efecto Hook con el uso del presente producto en concentraciones de SHBG hasta 835 nmol/L. Para cualquier muestra con una concentración en el intervalo entre 250-835 nmol/L se obtendrán valores superiores a 250 nmol/L. Estas muestras deben ser diluidas con el calibrador de concentración cero y reanalizadas.

Notas acerca del procedimiento

1) **Fuente de error!** Los tubos recubiertos no están marcados individualmente. Se debe evitar la mezcla con tubos de ensayo comunes. Para minimizar este riesgo, no se deben sacar de la caja más tubos de los necesarios, de igual manera los tubos no utilizados en una serie deben ser guardados de nuevo en su caja. Se recomienda rotular los tubos con marcador permanente.

2) **Fuente de error!** Para asegurar la agitación eficiente de los tubos se debe utilizar una gradilla que los ajuste firmemente. Una agitación inadecuada puede provocar un rendimiento deficiente del ensayo y falsos resultados.

3) **Dosificación de la solución de lavado.** Para la adición de la solución de lavado se recomienda una jeringa automática o dispensador, equipado con un recipiente de 1 litro y un tubo flexible para la dosificación. En su ausencia puede utilizarse una pipeta automática apropiada.

Atención! No mezclar los componentes de lotes diferentes o con productos de otro fabricante!

Precauciones

Material radiactivo

Este producto contiene material radiactivo. Es responsabilidad de cada laboratorio cumplir con las regulaciones locales referentes a la manipulación, conservación y desecho de materiales radiactivos.

Material potencialmente infeccioso

El suero humano utilizado en este producto ha sido analizado con métodos aprobados y no ha presentado positividad para anticuerpos frente a los virus de Inmunodeficiencia Humana (Anti-HIV-1/2) y Hepatitis-C (HCV), anticuerpos anti-Treponema y el antígeno de superficie de la Hepatitis-B (HBsAg). Ninguno de los métodos analíticos disponibles actualmente puede garantizar por completo la eliminación de posibles riesgos biológicos. Se deben manipular todos los reactivos y muestras de sangre como *material potencialmente infeccioso*.

Todos los productos y derivados de origen animal provienen de animales saludables. No obstante, los componentes que contienen suero animal deben considerarse como *material potencialmente infeccioso*.

Peligro químico

Algunos componentes de este juego contienen azida sódica como preservante. Al verter los desechos no radiactivos al sistema de desagüe se debe diluir con grandes cantidades de agua, para evitar la acumulación de azidas metálicas explosivas en las tuberías de plomo y cobre. Este producto contiene en total 75 mg de azida sódica.

	Fecha de vencimiento	LOT	Número de lote
	Almacenar entre 2 y 8 °C	CONTROL	Suero Control
	Precaución	CAL	Calibrador
	Peligro biológico	CT	Tubos recubiertos
	Consulte las instrucciones	TRAC	Trazador
	Dispositivo para diagnóstico <i>in vitro</i>	WASHB	Tampón de lavado
	Fabricante		Material radiactivo
REF	Número de referencia		



Sitio WEB: <http://www.izotop.hu>
E-mail técnico: immuno@izotop.hu
E-mail comercial: commerce@izotop.hu

IZOTOP

INSTITUTE OF ISOTOPES Ltd.
1535 Budapest. Pf.: 851.

Tel.: +36 1 392-2577, Fax: +36 1 395-9247

Edición: Marzo/2020