

17-OH Progesterone



Enzyme immunoassay for the quantitative determination of 17-OH Progesterone in human serum or plasma

Enzymimmunoassay zur quantitativen Bestimmung von 17-OH Progesteron in humanem Serum oder Plasma

Dosage immunoenzymatique pour la détermination quantitative 17-OH Progesterone dans le sérum ou le plasma humain

Determinazione immunoenzimatica diretta del 17-OH Progesterone nel siero o plasma umano

Immunoensayo enzimático para la determinación cuantitativa de 17-OH Progesterone en suero o plasma humano

Imunoensaio enzimático para a determinação quantitativa de 17-OH Progesterone em soro ou plasma humano

Only for in-vitro diagnostic use

English.....	2
Deutsch	9
Français.....	16
Italiano.....	23
Español	30
Português	37
Bibliography / Literatur / Bibliographie / Bibliografia / Bibliografía / Bibliografia	46
Packaging materials/Verpackungsmaterialien/Matériels d'emballage/Materiali d'imballaggio/Materiales de embalaje/Materiais de embalagem.....	46
Symbols Key / Symbolschlüssel / Explication des Symboles / Legenda / Símbolos / Tabela de símbolos	47
Summary of Test Procedure / Kurzanleitung Testdurchführung / Résumé de la procédure de test / Schema della procedura / Resumen de la técnica / Resumo do Procedimento de Teste	48

REF

DNOV004 (96 Determinations)

ENGLISH

1. INTRODUCTION

17-OH Progesterone (17-OH P) is an important intermediate of steroid biosynthesis. Elevated levels of 17-OH P are linked to dysfunction of steroid biosynthetic pathway that leads to an androgen excess. Therefore, measurements of 17-OH P are useful for the differential diagnosis of clinical conditions related to an hyperandrogenic phenotype and linked to adrenal disfunctions in both sexes.

Congenital Adrenal Hyperplasia (CAH) is a group of autosomal recessive disorders characterised by impaired cortisol synthesis¹⁻⁴. The predominant cause of the condition (95 % of cases) is mutations of the CYP21A2 gene that encodes the adrenal steroid 21-hydroxylase. 21-hydroxylase is responsible for conversion of 17-OHP to 11-deoxycortisol and progesterone to deoxycorticosterone. Assessment of 17-OH P levels provides supporting information for the differential diagnosis of CAH caused by mutations of the genes involved in cortisol synthesis from CYP21A2 gene mutations.

Measurement of 17-OH P is also considered useful in supporting diagnosis of other conditions characterised by hyperandrogenism such as polycystic ovarian syndrome (PCOS)⁵ and hirsutism in women, precocious puberty⁶ and precocious adrenarche. Determination of 17-OH P levels are used in such cases to exclude a diagnosis of CAH and non-classical CAH.

Patients affected by CAH shall be treated with glucocorticoids and mineral-corticoids. Treatment with glucocorticoids are of particular importance to avoid adrenal crisis and virilization due to excessive androgen synthesis^{2,4,7}. Since the goal of glucocorticoid treatments is not the complete suppression of 17-OH P synthesis, it is important to ensure appropriate monitoring of treatment to evaluate the correct dosage of the drugs. This is managed by the regular assessment of 17-OH P (and androstenedione) levels as traditional indicators of the adequacy of glucocorticoids treatment in CAH⁵.

2. INTENDED USE

Competitive immunoenzymatic colorimetric method (ELISA) for quantitative determination of 17-OH Progesterone in human serum or plasma (obtained by Lithium-heparine, Sodium-heparine or potassium EDTA).

3. PRINCIPLE OF THE ASSAY

Microtiter strip wells are precoated with anti-17-OH Progesterone antibodies (solid-phase). 17-OH Progesterone in the sample competes with added horseradish peroxidase labelled 17-OH Progesterone (enzyme-labelled antigen) for antibody binding. After incubation a bound/free separation is performed by solid-phase washing. The immune complex formed by enzyme-labelled antigen is visualized by adding Tetramethylbenzidine (TMB) substrate which gives a blue reaction product. The intensity of this product is inversely proportional to the amount of 17-OH Progesterone in the sample. Sulphuric acid is added to stop the reaction. This produces a yellow endpoint colour. Absorption at 450 nm is read using an ELISA microwell plate reader.

4. MATERIALS

4.1. Reagents supplied

- **Anti-17-OH Progesterone Coated Wells:** 12 break-apart 8-well snap-off strips coated with anti-17-OH Progesterone; in resealable aluminium foil.
- **Stop Solution:** 1 bottle containing 15 mL sulphuric acid, 0.15 mol/L (avoid any skin contact).
- **17-OH Progesterone-HRP Conjugate:** 1 bottle containing 22 mL of horseradish peroxidase labelled 17-OH Progesterone.
- **TMB Substrate Solution:** 1 bottle containing 15 mL 3,3',5,5'-tetramethylbenzidine (H₂O₂-TMB 0.26 g/L) (avoid any skin contact).
- **Wash solution 10x conc.:** 1 bottle containing 50 mL of a 10x concentrated solution of phosphate buffer 0.2 M, Proclin < 0.0015 %
- **17-OH Progesterone control A:** 1 bottle containing 1 mL of a lot-specific, ready to use control solution. The concentration is stated on the label.
- **17-OH Progesterone control B:** 1 bottle containing 1 mL of a lot-specific, ready to use control solution. The concentration is stated on the label.
- **17-OH Progesterone Standards:** 6 bottles, 1 mL each
 - Standard 0: 0 ng/mL
 - Standard 1: 0.2 ng/mL
 - Standard 2: 0.6 ng/mL
 - Standard 3: 2.0 ng/mL
 - Standard 4: 6.0 ng/mL
 - Standard 5: 16.0 ng/mL

4.2. Materials supplied

- 1 Cover foil
- 1 Instructions for use (IFU)

4.3. Materials and Equipment needed

- ELISA microwell plate reader, equipped for the measurement of absorbance at 450 nm, 620-630 nm
- Incubator 37 °C
- Manual or automatic equipment for rinsing wells
- Pipettes to deliver volumes between 10 and 1000 µL
- rotating mixer
- Distilled water
- Disposable tubes
- Timer

5. STABILITY AND STORAGE

Store all reagents at 2...8 °C in dark; the kit is stable up to the expiry date stated on label and on the Certificate of Analysis. Do not use the kit or its components after the expiry date.

Once opened, the kit is stable 6 months when stored at 2...8 °C.

6. REAGENT PREPARATION

It is very important to bring all reagents, samples and standards/controls to room temperature (22...28 °C) for at least 30 minutes before starting the test run! At the end of the assay, store immediately the reagents at 2...8 °C; avoid long exposure to room temperature.

6.1. Coated snap-off Strips

The ready to use break apart snap-off strips are coated with anti-17-OH Progesterone antibodies. Store at 2...8 °C. Open the bag only when it is at room temperature. Immediately after removal of strips, the remaining strips should be resealed in the aluminium foil along with the desiccant supplied and stored at 2...8 °C.

6.2. Conjugate

17-OH Progesterone-HRP Conjugate is a ready to use solution.

6.3. Standards

The standards are ready to use and have the following concentration of 17-OH Progesterone:

Standard 0:	0 ng/mL
Standard 1:	0.2 ng/mL
Standard 2:	0.6 ng/mL
Standard 3:	2.0 ng/mL
Standard 4:	6.0 ng/mL
Standard 5:	16.0 ng/mL

After first use the standards are still stable for another 6 months if stored at 2...8 °C, but no longer than the stated expiry date of the kit.

6.4. Controls

The bottles contain each 1 mL of a lot-specific control solution. The concentration is indicated on the label.

6.5. TMB Substrate Solution

The bottle contains 15 mL of a tetramethylbenzidine/hydrogen peroxide system. The reagent is ready to use and has to be stored at 2...8 °C in the dark. *The solution should be colourless or could have a slight blue tinge. If the substrate turns into blue, it may have become contaminated and should be thrown away.*

6.6. Stop Solution

The bottle contains 15 mL 0.15 M sulphuric acid solution. This ready to use solution has to be stored at 2...8°C.

6.7. Wash Solution

Dilute the content of the vial "10X Conc. Wash Solution" with distilled water to a final volume of 500 mL prior to use. For smaller volumes respect the 1:10 dilution ratio. The diluted wash solution is stable for 30 days at 2...8 °C. In concentrated wash solution it is possible to observe the presence of crystals, in this case mix at room temperature until complete dissolution of crystals; for greater accuracy dilute the whole bottle of concentrated wash solution to 500 mL on taking care also transfer the crystals, then mix until crystals are completely dissolved.

7. SPECIMEN COLLECTION AND PREPARATION

Use human serum or plasma (obtained by Lithium-heparine, Sodium-heparine or potassium EDTA) samples with this assay. If the assay is performed within 4 days (96 hours) after sample collection, the samples should be kept at 2...8 °C; otherwise, they should be aliquoted and stored frozen. If samples are stored frozen, mix thawed samples well before testing. Avoid repeated freezing and thawing. Heat inactivation of samples is not recommended.

8. ASSAY PROCEDURE

8.1. Test Preparation

Please read the test instructions for use carefully **before** performing the assay. Result reliability depends on strict adherence to the instructions for use as described. Prior to commencing the assay, the distribution and identification plan for all specimens and standards/controls should be carefully established. Select the required number of microtiter strips or wells and insert them into the holder. Pipetting of samples should not extend beyond ten minutes to avoid assay drift. If more than one plate is used, it is recommended to repeat the dose response curve. Please allocate at least:

1 well	(e.g. A1)	for the substrate blank
2 wells	(e.g. B1+C1)	for standard 0
2 wells	(e.g. D1+E1)	for standard 1
2 wells	(e.g. F1+G1)	for standard 2
2 wells	(e.g. H1+A2)	for standard 3
2 wells	(e.g. B2+C2)	for standard 4
2 wells	(e.g. D2+E2)	for standard 5
2 wells	(e.g. F2+G2)	for control A
2 wells	(e.g. H2+A3)	for control B

It is necessary to determine standards/controls and patient samples in duplicate.

Perform all assay steps in the order given and without any appreciable delays between the steps.

A clean, disposable tip should be used for dispensing each standard/control and each patient sample.

1. Dispense 25 µL standards, controls and samples into their respective wells. Leave well A1 for substrate blank.
2. Add 200 µL 17-OH Progesterone-HRP Conjugate to each well. Leave well A1 for substrate blank.
3. Cover wells with the foil supplied in the kit.
4. **Incubate for 1 hour at 37 °C.**
5. When incubation has been completed, remove the foil, aspirate the content of the wells, and wash each well 6 times with 300 µL of diluted wash solution. Avoid overflows from the reaction wells. During each washing step, gently shake the plate for 5 seconds and remove excess solution by tapping the inverted plate on an absorbent paper towel.

Note: Washing is critical! Insufficient washing results in poor precision and falsely elevated absorbance values.

6. Dispense 100 µL TMB Substrate Solution into all wells.
7. **Incubate for exactly 15 min at room temperature (22...28 °C) in the dark.**
8. Dispense 100 µL Stop Solution into all wells in the same order and at the same rate as for the TMB Substrate Solution. Shake the microplate gently.
Any blue colour developed during the incubation turns into yellow.
9. Measure the absorbance of the specimen at 450 nm against a reference wavelength of 620-630 nm or against blank within 5 minutes.

8.2. Measurement

Adjust the ELISA Microwell Plate Reader **to zero** using the **substrate blank in well A1**.

If - due to technical reasons - the ELISA reader cannot be adjusted to zero using the substrate blank in well A1, subtract the absorbance value of well A1 from all other absorbance values measured in order to obtain reliable results!

Measure the absorbance of all wells at **450 nm** and record the absorbance values for each standard and sample.

Where applicable calculate the **mean absorbance values** of all duplicates.

9. CALCULATION OF RESULTS

A variety of data reduction software packages are available, which may be employed to generate the mean calibration curve and to calculate the mean concentrations of unknown samples and controls. A 4-parameter logistic (4PL) curve fit, **including Standard 0 is required**.

Alternatively, a calibration curve may be prepared on semi-log graph paper by plotting mean absorbance on the Y-axis against concentration of analyte on the X-axis. Standard 0 should be included in the calibration curve. Read the mean absorbance value of each unknown sample off the curve.

10. QUALITY CONTROL

Good Laboratory Practice (GLP) requires the use of quality control specimens in each series of assays in order to check the performance of the assay. Controls should be treated as unknown samples, and the results analysed with appropriate statistical methods. The kit controls provided in the kit should be tested as unknowns and are intended to assist in assessing the validity of results obtained with each assay plate.

We recommend the users to maintain graphic records of the control values generated with each assay run, including the running means, SDs and %CVs. This information will facilitate the controls trending analysis relating to the performance of current and historical control lots. The trending will assist in the identification of assays which give control values significantly different from their average range.

When interpreting control data, users should note that this product was designed and developed as a manual product. The range stated on the Certificate of Analysis (CoA) should be appropriate for assays that are performed manually and with strict adherence to the Assay Procedure described above. It is recognised by Quality Control professionals, that as a result of differences in conditions and practices, there will always be variability in the mean values and precision of control measurements between different laboratories⁸.

11. MEASURING RANGE

The assay measuring range (AMR) is 0.26 – 16 ng/mL.

Any value that reads below 0.26 ng/mL should be reported as “< 0.26 ng/mL”. Any value that reads above 16 ng/mL should be reported as “> 16 ng/mL”.

12. METROLOGY AND TRACEABILITY

The 17-OH Progesterone ELISA has been standardised against internal reference standards (serum matrix) which have been value assigned to a commercially available LC-MS/MS method.

13. EXPECTED VALUES

The following ranges were determined using the 17-OH Progesterone ELISA and are provided for information only. The 95 % reference interval for apparently healthy adults were calculated by a non-parametric method following guidance from CLSI C28-A “Defining, Establishing and Verifying Reference Intervals in the Clinical Laboratory”.

		n°	Median (ng/mL)	Reference interval (ng/mL)
WOMEN	luteal phase	123	0.45	<LoQ – 2.19
	follicular phase	122	0.32	<LoQ – 2.10
	post-menopausal	122	<LoQ	<LoQ – 0.95
MEN		122	0.75	<LoQ – 1.97
CHILDREN (3 – 18 years)		124	<LoQ	<LoQ – 1.48

The above ranges should be considered as guidelines only; it is recommended that each laboratory establish its own expected range based upon its own patient population.

14. PERFORMANCE AND CHARACTERISTICS

14.1. Detection Capability

The limit of blank (LoB), limit of detection (LoD) and limit of quantitation (LoQ) were determined with guidance from CLSI EP17-A, “Protocols for Determination of Limits of Detection and Limits of Quantitation” using 6 blanks and 6 low level samples.

Sensitivity	Concentration
Limit of Blank (LoB)	0.02 ng/mL
Limit of Detection (LoD)	0.11 ng/mL
Limit of Quantitation (LoQ)	0.26 ng/mL

14.2. Trueness

Trueness has been demonstrated through method comparison of the 17-OH Progesterone ELISA to a commercially available LC-MS/MS using native donor samples – refer to section 14.5.

14.3. Precision

Precision of the 17-OH Progesterone ELISA was determined by performing a complex precision study.

Repeatability (within laboratory)

A total of 6 serum samples were assayed in 5 replicates, once a day for 5 days by 3 operators.

Data from one representative lot is shown below:

Sample	n	Mean Conc. (ng/mL)	Within run (Repeatability)	
			SD	CV%
1	75	0.90	0.10	11.4%
2	75	1.45	0.15	10.0%
3	75	2.10	0.20	9.3%
4	75	5.14	0.49	9.5%
5	75	8.94	0.74	8.3%
6	75	14.50	1.11	7.6%

Reproducibility

A total of 6 serum samples were assayed in 5 replicates, once a day for 5 days by 3 operators. Data from one representative lot is shown below:

Sample	n	Mean Conc. (ng/mL)	Within Laboratory (Reproducibility)	
			SD	CV%
1	75	0.90	0.12	13.0%
2	75	1.45	0.17	11.6%
3	75	2.10	0.23	11.1%
4	75	5.14	0.55	10.7%
5	75	8.94	0.82	9.2%
6	75	14.50	1.29	8.9%

14.4. Linearity

Linearity was evaluated based on CLSI EP-06, "Evaluation of the Linearity of Quantitative Measurement Procedures". For 17-OH Progesterone concentration by 17-OH Progesterone ELISA, the measurement procedure shows linearity for the interval from 0.2 to 17.22 ng/mL within the allowable deviation of linearity (ADL) of $\pm 15\%$.

14.5. Method comparison

The 17-OH Progesterone ELISA was compared against a commercially available LC-MS/MS method following CLSI EP-9A, "Method Comparison and Bias Estimation Using Patient Samples". A total of 120 samples, selected to represent a wide range of 17-OH Progesterone concentrations was assayed by each method. Passing-Bablok regression analysis was performed on the comparative data:

n	Slope [95% CI]	Intercept (ng/mL) [95% CI]	Correlation coefficient (r)
120	0.91 [0.87 to 0.97]	0.21 [0.16 to 0.28]	0.99

14.6. Cross-Reactivity

The analytical specificity was assessed with the following cross-reactants.

Cross-reactant	Concentration tested (unit)	Mean %Cross reactivity
11-deoxycortisol	80 ng/mL	2.15%
Progesterone	2000 ng/L	0.47%
Pregnenolone	2000 ng/mL	0.15%
Testosterone	2000 ng/mL	0.07%
17 β -Estradiol	2000 ng/mL	0.01%
Aldosterone	2000 ng/mL	0.00%
Estriol	2000 ng/mL	0.00%
Estrone-3-Sulphate	2000 ng/mL	0.00%
Spironolactone	2000 ng/mL	0.00%
Androstenedione	2000 ng/mL	0.05%
Androsterone	2000 ng/mL	0.04%
Corticosterone	2000 ng/mL	0.09%
Cortisol	2000 ng/mL	0.10%
Cortisone	2000 ng/mL	0.07%
DHEA	2000 ng/mL	0.07%
DHEA-S	20000 ng/mL	0.01%
DHT	2000 ng/mL	0.04%
Prednisolone	3000 ng/mL	0.02%
Prednisone	2000 ng/mL	0.01%

14.7. Interference

The following substances do not interfere with a bias of $\geq \pm 15\%$ in the 17-OH Progesterone ELISA when the concentrations are below the stated threshold presented in the following table.

Substance	Threshold Concentration
Bilirubin, conjugated	20 mg/dL
Bilirubin, unconjugated	20 mg/dL
Hemoglobin	200 mg/dL
Triglycerides	600 mg/dL

14.8. Serum-plasma study

The 17-OH Progesterone ELISA matrix comparison study was performed to evaluate the difference across tube types (serum separator tubes (SST), lithium heparin plasma, sodium heparin plasma and K2 EDTA plasma) versus the control samples (red top serum, without additive) following CLSI (EP9-A) guidelines. A total of 27 samples (23 native, 4 spiked) to cover the assay range were evaluated. Passing-Bablok regression analysis was performed on the comparative data:

Sample	Slope [95% CI]	Intercept (ng/mL) [95% CI]	Correlation coefficient (r)
SST	1.02 [0,91 to 1,13]	-0.03 [-0,21 to 0,11]	0.99
Lithium Heparin	1.00 [0,87 to 1,04]	0.00 [-0,07 to 0,08]	0.99
Sodium Heparin	1.00 [0,94 to 1,10]	-0.02 [-0,14 to 0,03]	0.99
EDTA	1.04 [0,90 to 1,12]	-0.03 [-0,19 to 0,09]	0.99

15. LIMITATIONS OF THE PROCEDURE

- As in the case of any diagnostic procedure, results must be interpreted in conjunction with the patient's clinical presentation and other information available to the physician.
- Heterophilic antibodies in human serum can react with reagent immunoglobulins, interfering with *in vitro* immunoassays⁹. Patients routinely exposed to animals or to animal serum products can be prone to this interference and anomalous values may be observed.

16. PRECAUTIONS AND WARNINGS

- The test procedure, the information, the precautions and warnings in the instructions for use have to be strictly followed. The use of the testkits with analyzers and similar equipment has to be validated. Any change in design, composition and test procedure as well as for any use in combination with other products not approved by the manufacturer is not authorized; the user himself is responsible for such changes. The manufacturer is not liable for false results and incidents for these reasons. The manufacturer is not liable for any results by visual analysis of the patient samples.
- Only for in-vitro diagnostic use by professional persons. Not for internal or external use in humans or animals.
- Use appropriate personal protective equipment while working with the reagents provided.
- All components of human origin used for the production of these reagents have been tested for anti-HIV 1+2 antibodies, anti-HCV antibodies and HBsAg and have been found to be non-reactive. Nevertheless, all materials should still be regarded and handled as potentially infectious.
- Material of animal origin used in the preparation of the kit has been obtained from animals certified as healthy and the bovine protein has been obtained from countries not affected by BSE, but these materials should be handled as potentially infectious.
- Do not interchange reagents or strips of different production lots.
- No reagents of other manufacturers should be used along with reagents of this test kit.
- Do not use reagents after expiry date stated on the label.
- Use only clean pipette tips, dispensers, and lab ware.
- Do not interchange screw caps of reagent vials to avoid cross-contamination.
- Close reagent vials tightly immediately after use to avoid evaporation and microbial contamination.
- After first opening and subsequent storage check conjugate and control vials for microbial contamination prior to further use.
- When using automatic equipment, the user has the responsibility to make sure that the kit has been appropriately tested. To improve the performance of the kit on ELISA automatic systems, it is recommended to increase the number of washes.
- To avoid cross-contamination and falsely elevated results pipette patient samples and dispense conjugate without splashing accurately to the bottom of wells.
- Do not use heavily haemolysed or highly lipemic samples.
- Maximum precision is required for dispensation of the reagents.
- The TMB substrate contains an irritant, which may be harmful if inhaled, ingested, or absorbed through the skin. To prevent injury, avoid inhalation, ingestion or contact with skin and eyes. It may react with lead or copper plumbing to form potentially explosive metal azides. If you use a sink to remove the reagents, wash through with large amounts of water to prevent azide build-up.

- The stop solution consists of a diluted sulphuric acid solution. Sulphuric acid is poisonous and corrosive and can be toxic if ingested. To prevent chemical burns, avoid contact with skin and eyes.
- Avoid the exposure of TMB substrate to direct sunlight, metal or oxidants. Do not freeze the solution.
- This method allows the determination of 17-OH Progesterone from 0.2 – 20 ng/mL.
- Treatment of the patient with cortisone, natural or synthetic steroids can impair 17-OH Progesterone determination.
- Some reagents contain small amounts of Sodium Azide or Proclin 300™ as preservative. Avoid the contact with skin or mucosa.
- Sodium Azide may be toxic if ingested or absorbed through the skin or eyes: moreover, it may react with lead or copper plumbing to form potentially explosive metal azides. If you use a sink to remove the reagents, allow scroll through large amounts of water to prevent azide build-up.
- The ELISA is only designed for qualified personnel following the standards of good laboratory practice (GLP).

WARNING: Sulphuric acid irritates eyes and skin. Keep out of the reach of children. Upon contact with the eyes, rinse thoroughly with water and consult a doctor!

16.1. Disposal Considerations

Residues of chemicals and preparations are generally considered as hazardous waste. The disposal of this kind of waste is regulated through national and regional laws and regulations. Contact your local authorities or waste management companies which will give advice on how to dispose hazardous waste.

For information about the packaging materials refer to PACKAGING MATERIALS.

17. ORDERING INFORMATION

REF	DNOV004	17-OH Progesterone	(96 Determinations)
-----	---------	--------------------	---------------------

DEUTSCH

1. EINLEITUNG

17-OH Progesteron (17-OH P) ist ein wichtiges Zwischenprodukt der Steroidbiosynthese. Erhöhte 17-OH P-Werte werden mit einer Störung des Steroidbiosynthesewegs in Verbindung gebracht, die zu einem Androgenüberschuss führt. Daher sind Messungen von 17-OH P hilfreich für die Differenzialdiagnose von klinischen Zuständen, die mit einem hyperandrogenen Phänotyp zusammenhängen und mit Funktionsstörungen der Nebennieren bei beiden Geschlechtern verbunden sind.

Die kongenitale Nebennierenhyperplasie (CAH) ist eine Gruppe autosomal rezessiver Erkrankungen, die durch eine gestörte Cortisol-Synthese gekennzeichnet sind¹⁻⁴. Die vorherrschende Ursache für diese Erkrankung (95% der Fälle) sind Mutationen des CYP21A2-Gens, das für die 21-Hydroxylase der Nebennierensteroiden kodiert. Die 21-Hydroxylase ist für die Umwandlung von 17-OH P in 11-Desoxycortisol und Progesteron in Desoxycorticosteron verantwortlich. Die Bestimmung des 17-OH P-Spiegels liefert unterstützende Informationen für die Differenzialdiagnose von CAH, das durch Mutationen der an der Cortisol-Synthese beteiligten Gene verursacht wird, gegenüber CYP21A2-Genmutationen.

Die Messung von 17-OH P gilt auch als nützlich zur Unterstützung der Diagnose anderer Erkrankungen, die durch Hyperandrogenismus gekennzeichnet sind, wie das polyzystische Ovarialsyndrom (PCOS)⁵ und Hirsutismus bei Frauen, frühe Pubertät⁶ und frühe Adrenarche. Die Bestimmung des 17-OH P-Spiegels wird in solchen Fällen verwendet, um die Diagnose CAH und nicht-klassisches CAH auszuschließen.

Von CAH betroffene Patienten sollten mit Glukokortikoiden und Mineralkortikoiden behandelt werden. Die Behandlung mit Glukokortikoiden ist besonders wichtig, um eine Nebennierenkrise und eine Virilisierung aufgrund einer übermäßigen Androgensynthese zu vermeiden^{2,4,7}. Da das Ziel der Behandlung mit Glukokortikoiden nicht die vollständige Unterdrückung der 17-OH P-Synthese ist, ist es wichtig, eine angemessene Überwachung der Behandlung zu gewährleisten, um die richtige Dosierung der Medikamente zu bewerten. Dies wird durch die regelmäßige Bestimmung der 17-OH P- (und Androstendion-) Werte als traditionelle Indikatoren für die Angemessenheit der Glukokortikoidbehandlung bei CAH⁵ erreicht.

2. VERWENDUNGSZWECK

Kompetitive immunoenzymatische kolorimetrische Methode (ELISA) für die quantitative Bestimmung von 17-OH Progesteron in humanem Serum oder Plasma (gewonnen durch Lithium-Heparin, Natrium-Heparin oder Kalium EDTA).

3. TESTPRINZIP

Die Mikrotiterplatte ist mit Antikörpern gegen 17-OH Progesteron beschichtet. 17-OH Progesteron in der Probe konkurriert mit dem zugegebenen, 17-OH Progesteron-HRP (Enzym-markiertes Antigen) um die Bindung an den Antikörpern auf der Mikrotiterplatte. Ungebundene Substanzen werden bei dem anschließenden Waschschrift entfernt. Die gebildeten Immunkomplexe werden durch die Zugabe von Tetramethylbenzidin (TMB) Substrat, welches ein blaues Reaktionsprodukt bildet, sichtbar gemacht. Die Intensität dieses Produktes ist **invers** proportional zur 17-OH Progesteron-Konzentration in der Probe. Die Zugabe von Schwefelsäure (Stopplösung) beendet die Enzymreaktion und färbt das Reaktionsprodukt gelb, welches bei 450 nm nachgewiesen werden kann.

4. MATERIAL

4.1. Mitgelieferte Reagenzien

- **Beschichtete Mikrotiterplatte:** 12 teilbare 8er-Streifen, beschichtet mit Antikörpern gegen 17-OH Progesteron; in Aluminiumbeutel.
- **Stopplösung:** 1 Flasche mit 15 mL Schwefelsäure, 0,15 mol/L (Hautkontakt vermeiden).
- **17-OH Progesteron-HRP Konjugat:** 1 Flasche mit 22 mL HRP-markiertem 17-OH Progesteron.
- **TMB Substrat Solution:** 1 Flasche mit 15 mL 3,3',5,5'-Tetramethylbenzidin (H₂O₂-TMB 0,26 g/L) (Hautkontakt vermeiden).
- **Waschlösung 10x konz.:** 1 Flasche mit 50 mL 10x konzentrierter Waschlösung, (0,2 M Phosphatpuffer, Proclin < 0,0015 %).
- **17-OH Progesteron Kontrolle A:** 1 Flasche mit 1 mL einer lot-spezifischen, gebrauchsfertigen Kontrolllösung. Die Konzentration ist auf dem Etikett angegeben.
- **17-OH Progesteron Kontrolle B:** 1 Flasche mit 1 mL einer lot-spezifischen, gebrauchsfertigen Kontrolllösung. Die Konzentration ist auf dem Etikett angegeben.
- **17-OH Progesteron Standards:** 6 Flaschen mit je 1 mL Standardlösung:
 - Standard 0: 0 ng/mL
 - Standard 1: 0,2 ng/mL
 - Standard 2: 0,6 ng/mL
 - Standard 3: 2,0 ng/mL
 - Standard 4: 6,0 ng/mL
 - Standard 5: 16,0 ng/mL

4.2. Mitgeliefertes Zubehör

- 1 selbstklebende Abdeckfolie
- 1 Gebrauchsanweisung

4.3. Erforderliche Materialien und Geräte

- Mikrotiterplatten-Photometer mit Filtern 450/620 nm, 620-630 nm
- Inkubator 37 °C
- Manuelle oder automatische Waschvorrichtung für Mikrotiterplatten
- Mikropipetten (10 - 1000 µL)
- Vortex-Mischer
- Destilliertes Wasser
- Plastikröhrchen für den einmaligen Gebrauch
- Timer

5. STABILITÄT UND LAGERUNG

Alle Reagenzien bei 2...8 °C im Dunkeln lagern. Das Kit ist bis zu dem auf dem Etikett und dem Analysenzertifikat angegebenen Verfallsdatum stabil. Verwenden Sie das Kit oder seine Komponenten nicht nach Ablauf des Verfallsdatums.

Das Kit ist nach dem Öffnen bei 2...8 °C 6 Monate haltbar.

6. VORBEREITUNG DER REAGENZIEN

Alle Reagenzien, Proben und Kontrollen sind vor ihrer Verwendung für mindestens 30 Minuten auf Raumtemperatur (22...28° C) zu bringen! Nach Ende der Messung sind die Reagenzien unverzüglich wieder bei 2...8 °C zu lagern. Längeres Aufbewahren bei Raumtemperatur ist zu vermeiden.

6.1. Beschichtete abbrechbare Streifen

Die abbrechbaren Streifen sind mit Antikörpern gegen 17-OH Progesteron beschichtet. Die gebrauchsfertigen Vertiefungen sind bei 2...8 °C aufzubewahren. Den Aluminiumbeutel nur öffnen, wenn er Raumtemperatur hat. Nichtverbrauchte Vertiefungen im Aluminiumbeutel zusammen mit dem Trockenmittel sofort wieder verschließen und bei 2...8 °C lagern.

6.2. Konjugat

Das 17-OH Progesteron-HRP Konjugat ist gebrauchsfertig.

6.3. Standards

Die Standards sind gebrauchsfertig und enthalten die folgenden Konzentrationen an 17-OH Progesteron:

Standard 0:	0 ng/mL
Standard 1:	0,2 ng/mL
Standard 2:	0,6 ng/mL
Standard 3:	2,0 ng/mL
Standard 4:	6,0 ng/mL
Standard 5:	16,0 ng/mL

Nach dem ersten Öffnen sind die Standards für weitere 6 Monate bei 2...8 °C haltbar, jedoch nicht länger als das angegebene Verfallsdatum des Kits.

6.4. Kontrollen

Die Flaschen enthalten 1 mL einer gebrauchsfertigen lot-spezifischen Kontrolllösung. Die Konzentration ist auf dem Etikett angegeben.

6.5. TMB Substratlösung

Das Fläschchen enthält 15 mL eines Tetramethylbenzidin/Wasserstoffperoxidgemisches. Die gebrauchsfertige Lösung ist bei 2...8 °C vor Licht geschützt aufzubewahren. *Die Lösung ist leicht hellblau. Sollte die TMB-Substratlösung dunkelblau sein, ist sie kontaminiert und kann nicht im Test verwendet werden.*

6.6. Stopplösung

Das Fläschchen enthält 15 mL 0,15 M Schwefelsäure. Die gebrauchsfertige Lösung ist bei 2...8 °C aufzubewahren.

6.7. Waschlösung

Die 10fach-konzentrierte Waschlösung mit destilliertem Wasser auf 500 mL Gesamtvolumen verdünnen. Bei kleineren Volumina bitte das 1:10 Verhältnis beachten. Die verdünnte Waschlösung ist bei 2...8 °C 30 Tage haltbar. Sollten Kristalle im Konzentrat auftreten, die Lösung bei Raumtemperatur bis zur vollständigen Auflösung der Kristalle gut mischen. Um die Genauigkeit zu erhöhen, die gesamte Flasche konzentrierte Waschlösung auf 500 mL verdünnen. Darauf achten, auch die Kristalle zu übernehmen und so lange mischen, bis die Kristalle vollständig aufgelöst sind.

7. ENTNAHME UND VORBEREITUNG DER PROBEN

Es sollten humane Serum- oder Plasmaproben (erhalten durch Lithium-Heparin, Natrium-Heparin oder Kalium EDTA) verwendet werden. Werden die Bestimmungen innerhalb von 4 Tagen (96 Stunden) nach Blutentnahme durchgeführt, können die Proben bei 2...8 °C aufbewahrt werden, sonst aliquotieren und gefrieren. Wieder aufgetaute Proben vor der Testdurchführung gut schütteln. Wiederholtes Tiefgefrieren und Auftauen vermeiden! Hitzeinaktivierung der Proben wird nicht empfohlen.

8. TESTDURCHFÜHRUNG

8.1. Testvorbereitung

Gebrauchsanweisung **vor** Durchführung des Tests sorgfältig lesen. Für die Zuverlässigkeit der Ergebnisse ist es notwendig, die Gebrauchsanweisung genau zu befolgen. Vor Testbeginn die Verteilung bzw. Position der Patientenproben und Standards/Kontrollen auf den Mikrotiterstreifen genau festlegen. Die benötigte Anzahl von Mikrotiterstreifen (Kavitäten) in den Streifenhalter einsetzen. Das Pipettieren der Proben sollte maximal 10 Minuten dauern, um einen Assay-Drift zu vermeiden. Wenn mehr als eine Mikrotiterplatte gemessen wird, wird empfohlen für jede Platte eine Standardkurve zu erstellen.

Bitte mindestens folgendes vorsehen:

1 Vertiefung	(z.B. A1)	Blank
2 Vertiefungen	(z.B. B1+C1)	für Standard 0
2 Vertiefungen	(z.B. D1+E1)	für Standard 1
2 Vertiefungen	(z.B. F1+G1)	für Standard 2
2 Vertiefungen	(z.B. H1+A2)	für Standard 3
2 Vertiefungen	(z.B. B2+C2)	für Standard 4
2 Vertiefungen	(z.B. D2+E2)	für Standard 5
2 Vertiefungen	(z.B. F2+G2)	für die Kontrolle A
2 Vertiefungen	(z.B. H2+A3)	für die Kontrolle B

Es ist notwendig, Standards/Kontrollen und Patientenproben in Doppelbestimmung durchzuführen.

Den Test in der angegebenen Reihenfolge und ohne Verzögerung durchführen.

Für jeden Pipettierschritt der Standards/Kontrollen und Proben saubere Einmalspitzen verwenden.

1. Je 25 µL Standards, Kontrollen und Proben in die entsprechenden Vertiefungen pipettieren. Vertiefung A1 ist für den Substratleerwert vorgesehen.
2. 200 µL 17-OH Progesteron-HRP Konjugat in jede Vertiefung mit Ausnahme des Substratleerwerts geben.
3. Die Streifen mit der mitgelieferten Abdeckfolie bedecken.
4. **Inkubiere für 1 h bei 37 °C.**
5. Nach der Inkubation die Abdeckfolie entfernen und die Inkubationsflüssigkeit aus den Teststreifen absaugen. Anschließend sechsmal mit 300 µL verdünnter Waschlösung waschen. Überfließen von Flüssigkeit aus den Vertiefungen vermeiden. Während jedes Waschschritts die Platte 5 Sekunden lang vorsichtig schütteln und überschüssige Lösung durch Klopfen der umgedrehten Platte auf Fliesspapier entfernen.
Beachte: Der Waschvorgang ist wichtig, da unzureichendes Waschen zu schlechter Präzision und falsch erhöhten Messergebnissen führt!
6. 100 µL TMB-Substratlösung in alle Vertiefungen pipettieren.
7. **Inkubiere für genau 15 min bei Raumtemperatur (22...28 °C) im Dunkeln.**
8. In alle Vertiefungen 100 µL Stopplösung in der gleichen Reihenfolge und mit den gleichen Zeitintervallen wie bei der TMB-Substratlösung Zugabe pipettieren. Mikrotiterplatte leicht schütteln.
Während der Inkubation gebildete blaue Farbe schlägt in gelb um.
9. Die Extinktion der Lösung in jeder Vertiefung bei 450/620-630 nm innerhalb von 5 min nach Zugabe der Stopplösung messen.

8.2. Messung

Mit Hilfe des Substratleerwertes (Blank) in **A1** den **Nullabgleich** des Mikrotiterplatten-Photometers (ELISA-Readers) vornehmen.

Falls diese Eichung aus technischen Gründen nicht möglich ist, muss nach der Messung der Extinktionswert der Position A1 von allen anderen Extinktionswerten abgezogen werden, um einwandfreie Ergebnisse zu erzielen!

Extinktion aller Kavitäten bei **450 nm** messen und die Messwerte der Kontrollen und Proben notieren.

Falls Doppel- oder Mehrfachbestimmungen durchgeführt wurden, den **Mittelwert der Extinktionswerte** berechnen.

9. BERECHNUNG DER ERGEBNISSE

Es gibt eine Reihe von Softwareprogrammen zur Datenverarbeitung, die zur Erstellung der mittleren Kalibrierkurve und zur Berechnung der mittleren Konzentrationen der unbekannten Proben und Kontrollen verwendet werden können. Eine 4-Parameter Logistik (4PL) Kurvenanpassung, **einschließlich Standard 0, ist erforderlich.**

Alternativ kann eine Kalibrierkurve auf halblogarithmischem Millimeterpapier erstellt werden, indem die mittlere Absorption auf der Y-Achse gegen die Konzentration des Analyten auf der X-Achse aufgetragen wird. Der Standard 0 sollte in der Kalibrierungskurve enthalten sein. Lesen Sie den mittleren Absorptionswert jeder unbekannten Probe an der Kurve ab.

10. QUALITÄTSKONTROLLE

Die gute Laborpraxis (GLP) erfordert die Verwendung von Qualitätskontrollproben in jeder Testreihe, um die Leistungsfähigkeit des Tests zu überprüfen. Die Kontrollen sollten wie unbekannte Proben behandelt und die Ergebnisse mit geeigneten statistischen Methoden ausgewertet werden. Die im Kit enthaltenen Kontrollen sollten als unbekannte Proben getestet werden und dienen dazu, die Gültigkeit der mit jeder Testplatte erzielten Ergebnisse zu beurteilen.

Wir empfehlen den Anwendern, grafische Aufzeichnungen über die Kontrollwerte zu führen, die bei jedem Testdurchlauf erzeugt werden, einschließlich der laufenden Mittelwerte, SDs und %CVs. Diese Informationen erleichtern die Trendanalyse der Kontrollen in Bezug auf die Leistung der aktuellen und historischen Kontrollchargen im Vergleich zu den gelieferten Qualitätskontrolldaten. Die Trendanalyse hilft bei der Identifizierung von Assays, deren Kontrollwerte signifikant von ihrem durchschnittlichen Bereich abweichen.

Bei der Interpretation der Kontrolldaten sollten Sie beachten, dass dieses Produkt als manuelles Produkt konzipiert und entwickelt wurde. Der auf dem *Certificate of Analysis (CoA)* angegebene Bereich sollte für Assays geeignet sein, die manuell und unter strikter Einhaltung des oben beschriebenen Assay-Verfahrens durchgeführt werden. Bei Qualitätskontrollexperten ist anerkannt, dass es aufgrund unterschiedlicher Bedingungen und Praktiken immer zu Abweichungen bei den Mittelwerten und der Präzision der Kontrollmessungen zwischen verschiedenen Labors kommen wird⁸.

11. MESSBEREICH

Der Messbereich des Tests (AMR - assay measuring range) ist 0,26 - 16 ng/mL.

Jeder Wert, der unter 0,26 ng/mL liegt, sollte als "< 0,26 ng/mL" angegeben werden. Jeder Wert, der über 16 ng/mL liegt, sollte als "> 16 ng/mL" angegeben werden.

12. METROLOGIE UND RÜCKVERFOLGBARKEIT

Der 17-OH Progesterone ELISA wurde gegen interne Referenzstandards (Serummatrix) standardisiert, deren Werte einer kommerziell erhältlichen LC-MS/MS-Methode zugeordnet wurden.

13. ERWARTETE WERTE

Die folgenden Bereiche wurden mit dem 17-OH Progesterone ELISA bestimmt und dienen nur zur Information. Das 95 % Referenzintervall für offensichtlich gesunde Erwachsene wurde mit einer nicht-parametrischen Methode berechnet, die sich an der CLSI C28-A Leitlinie "Defining, Establishing and Verifying Reference Intervals in the Clinical Laboratory" orientiert.

		n°	Median (ng/mL)	Referenzintervall (ng/mL)
FRAUEN	Lutealphase	123	0,45	<LoQ – 2,19
	Follicularphase	122	0,32	<LoQ – 2,10
	Postmenopause	122	<LoQ	<LoQ – 0,95
MÄNNER		122	0,75	<LoQ – 1,97
KINDER (3 – 18 Jahre)		124	<LoQ	<LoQ – 1,48

Die oben genannten Bereiche sollten nur als Richtlinien betrachtet werden; es wird empfohlen, dass jedes Labor seinen eigenen erwarteten Bereich auf der Grundlage seiner eigenen Patientenpopulation festlegt.

14. TESTMERKMALE

14.1. Nachweisvermögen

Die (LoB - Limit of Blank), LoD (Detektionsgrenze) und LoQ- (LoQ- Limit of Quantitation), wurden anhand der CLSI EP17-A, "Protocols for Determination of Limits of Detection and Limits of Quantitation" unter Verwendung von 6 Leerwert- und 6 niedrig konzentrierten Proben bestimmt.

Sensitivität	Konzentration
LoB	0,02 ng/mL
LoD	0,11 ng/mL
LoQ	0,26 ng/mL

14.2. Richtigkeit

Die Richtigkeit wurde durch einen Methodenvergleich des 17-OH Progesterone ELISA mit einem kommerziell erhältlichen LC-MS/MS unter Verwendung nativer Spenderproben nachgewiesen - siehe Abschnitt 14.5.

14.3. Präzision

Die Präzision des Kits wurde durch Wiederholbarkeit im Rahmen von Labor- und Reproduzierbarkeitsstudien bewertet.

Wiederholbarkeit (innerhalb des Labors)

Es wurden insgesamt 6 Serumproben in 5 Replikaten, einmal pro Tag für 5 Tage von 3 Mitarbeitern untersucht. Im Folgenden sind die Daten eines repräsentativen Lots dargestellt:

Probe	n	Mittelwert (ng/mL)	Innerhalb des Laufs (Wiederholbarkeit)	
			SD	VK%
1	75	0,90	0,10	11,4%
2	75	1,45	0,15	10,0%
3	75	2,10	0,20	9,3%
4	75	5,14	0,49	9,5%
5	75	8,94	0,74	8,3%
6	75	14,50	1,11	7,6%

Reproduzierbarkeit

6 Proben wurden in 5 Replikaten für 5 Tage von 3 verschiedenen Bedienern und verschiedenen Laborgeräten untersucht.

Im Folgenden sind die Daten eines repräsentativen Lots dargestellt:

Probe	n	Mittelwert (ng/mL)	Innerhalb des Labors (Reproduzierbarkeit)	
			SD	VK%
1	75	0,90	0,12	13,0%
2	75	1,45	0,17	11,6%
3	75	2,10	0,23	11,1%
4	75	5,14	0,55	10,7%
5	75	8,94	0,82	9,2%
6	75	14,50	1,29	8,9%

14.4. Linearität

Die Linearität wurde gemäß CLSI EP-06, "Evaluation of the Linearity of Quantitative Measurement Procedures" bewertet. Für die 17-OH Progesteron-Konzentration mittels 17-OH Progesterone ELISA zeigt das Messverfahren Linearität für den Bereich von 0,2 bis 17,22 ng/mL innerhalb der zulässigen Linearitätsabweichung (ADL) von $\pm 15\%$.

14.5. Methodenvergleich

Der 17-OH Progesterone ELISA wurde mit einer kommerziell erhältlichen LC-MS/MS-Methode gemäß CLSI EP-9A, "Method Comparison and Bias Estimation Using Patient Samples" verglichen. Insgesamt 120 Proben, die so ausgewählt waren, dass sie ein breites Spektrum von 17-OH Progesteron-Konzentrationen repräsentieren, wurden mit beiden Methoden untersucht. Die Vergleichsdaten wurden einer Passing-Bablok-Regressionsanalyse unterzogen:

n	Steigung [95% CI]	Achsenabschnitts (ng/mL) [95% CI]	Korrelationskoeffizient (r)
120	0,91 [0,87 to 0,97]	0,21 [0,16 to 0,28]	0,99

14.6. Kreuzreaktivität

Die analytische Spezifität wurde mit den folgenden Kreuzreaktanten bewertet.

Kreuzreaktant	Testkonzentration (Einheit)	Mittelwert %Kreuzreaktivität
11-Deoxycortisol	80 ng/mL	2,15%
Progesteron	2000 ng/L	0,47%
Pregnenolon	2000 ng/mL	0,15%
Testosteron	2000 ng/mL	0,07%
17 β -Estradiol	2000 ng/mL	0,01%
Aldosteron	2000 ng/mL	0,00%
Estriol	2000 ng/mL	0,00%
Estrone-3-Sulphat	2000 ng/mL	0,00%
Spirolacton	2000 ng/mL	0,00%
Androstendion	2000 ng/mL	0,05%
Androsteron	2000 ng/mL	0,04%
Corticosteron	2000 ng/mL	0,09%

Kreuzreaktant	Testkonzentration (Einheit)	Mittelwert %Kreuzreaktivität
Cortisol	2000 ng/mL	0,10%
Cortison	2000 ng/mL	0,07%
DHEA	2000 ng/mL	0,07%
DHEA-S	20000 ng/mL	0,01%
DHT	2000 ng/mL	0,04%
Prednisolon	3000 ng/mL	0,02%
Prednison	2000 ng/mL	0,01%

14.7. Interferenzen

Die folgenden Substanzen haben keine Interferenzen mit einer Abweichung von $> \pm 15\%$ im 17-OH Progesterone ELISA, wenn die Konzentrationen unter dem in der folgenden Tabelle angegebenen Schwellenwert liegen.

Substanz	Schwellenwert Konzentration
Bilirubin, konjugiert	20 mg/dL
Bilirubin unkonjugiert	20 mg/dL
Hämoglobin	200 mg/dL
Triglyceride	600 mg/dL

14.8. Serum-Plasma Studie

Die 17-OH Progesterone ELISA Matrixvergleichsstudie wurde durchgeführt, um den Unterschied zwischen den verschiedenen Röhrchentypen (Serumseparatorröhrchen (SST), Lithium-Heparin-Plasma, Natrium-Heparin-Plasma und K2 EDTA-Plasma) im Vergleich zu den Kontrollproben (Red Top Serum, ohne Additiv) gemäß den CLSI (EP9-A) Richtlinien zu bewerten. Insgesamt wurden 27 Proben (23 nativ, 4 gespiked) ausgewertet, um den Assay-Bereich abzudecken. Die Vergleichsdaten wurden einer Passing-Bablok-Regressionsanalyse unterzogen:

Probe	Steigung [95% CI]	Achsenabschnitt (ng/mL) [95% CI]	Korrelationskoeffizient (r)
SST	1,02 [0,91 to 1,13]	-0,03 [-0,21 to 0,11]	0,99
Lithium Heparin	1,00 [0,87 to 1,04]	0,00 [-0,07 to 0,08]	0,99
Natrium Heparin	1,00 [0,94 to 1,10]	-0,02 [-0,14 to 0,03]	0,99
EDTA	1,04 [0,90 to 1,12]	-0,03 [-0,19 to 0,09]	0,99

15. GRENZEN DES VERFAHRENS

- Wie bei jedem diagnostischen Verfahren müssen die Ergebnisse in Verbindung mit dem klinischen Bild des Patienten und anderen dem Arzt vorliegenden Informationen interpretiert werden.
- Heterophile Antikörper im Humanserum können mit Reagenz-Immunglobulinen reagieren und In-vitro-Immunoassays stören⁹. Patienten, die routinemäßig mit Tieren oder tierischen Serumprodukten in Kontakt kommen, können für diese Interferenz anfällig sein, und es können anomale Werte beobachtet werden.

16. SICHERHEITSMASSNAHMEN UND WARNHINWEISE

- Die Testdurchführung, die Information, die Sicherheitsmaßnahmen und Warnhinweise in der Gebrauchsanweisung sind strikt zu befolgen. Bei Anwendung des Testkits auf Diagnostika-Geräten ist die Testmethode zu validieren. Jede Änderung am Aussehen, der Zusammensetzung und der Testdurchführung sowie jede Verwendung in Kombination mit anderen Produkten, die der Hersteller nicht autorisiert hat, ist nicht zulässig; der Anwender ist für solche Änderungen selbst verantwortlich. Der Hersteller haftet für falsche Ergebnisse und Vorkommnisse aus solchen Gründen nicht. Auch für falsche Ergebnisse aufgrund von visueller Auswertung wird keine Haftung übernommen.
- Nur für in-vitro-Diagnostik durch Fachpersonal, welches die Arbeitstechniken einwandfrei beherrscht.
- Bei der Arbeit mit den mitgelieferten Reagenzien geeignete persönliche Schutzausrüstung verwenden.
- Alle für die Herstellung verwendeten Komponenten menschlichen Ursprungs wurden auf Anti-HIV 1+2-Antikörper, Anti-HCV-Antikörper und HBsAg getestet und haben sich als nicht reaktiv erwiesen. Dennoch sollten alle Materialien als potenziell infektiös betrachtet und behandelt werden.
- Das für die Herstellung des Kits verwendete Material tierischen Ursprungs stammt von Tieren, die als gesund zertifiziert wurden, und Rinderprotein wurde aus Ländern bezogen, die nicht von BSE betroffen sind, aber diese Materialien sollten als potenziell infektiös behandelt werden.
- Reagenzien unterschiedlicher Chargen nicht untereinander austauschen.
- Keine Reagenzien anderer Hersteller zusammen mit den Reagenzien dieses Testkits verwenden.
- Nicht nach Ablauf des Verfallsdatums verwenden.
- Nur saubere Pipettenspitzen, Dispenser und Labormaterialien verwenden.
- Die Deckel der Fläschchen nicht vertauschen, um Kreuzkontaminationen zu vermeiden.
- Verschlusskappen der einzelnen Reagenzien nicht untereinander vertauschen.

- Flaschen sofort nach Gebrauch fest verschließen, um Verdunstung und mikrobielle Kontamination zu vermeiden.
- Nach dem ersten Öffnen Konjugat- und Standardfläschchen vor weiterem Gebrauch auf mikrobielle Kontamination prüfen.
- TMB Substrat keinem direkten Sonnenlicht, Metall oder Oxidantien aussetzen. Das Substrat nicht einfrieren.
- Das Rekonstituieren und Pipettieren der Reagenzien erfordert maximale Präzision
- Das TMB Substrat enthält einen Reizstoff, der schädlich sein kann beim Inhalieren, Verschlucken oder Hautkontakt. Zur Vermeidung von Verletzungen sollte die Inhalation, das Verschlucken sowie Haut- und Augenkontakt vermieden werden.
- Die Stopplösung besteht aus verdünnter Schwefelsäure. Schwefelsäure ist giftig und korrosiv und kann beim Verschlucken toxisch wirken. Zur Vorbeugung von chemischen Verbrennungen sollte der Kontakt mit Haut und Augen vermieden werden. Es kann mit Blei- oder Kupferrohren reagieren und explosive Metallazide bilden. Wenn Sie ein Spülbecken verwenden, um die Reagenzien zu entsorgen, spülen Sie es mit großen Mengen Wasser aus, um die Bildung von Aziden zu verhindern.
- Durch die Zugabe des TMB Substrates wird eine chemische Reaktion gestartet, die durch die Zugabe der Stopplösung beendet wird. Daher sollten das TMB Substrat und die Stopplösung in der gleichen Reihenfolge zugegeben werden, um jegliche Zeitunterschiede während der Inkubation zu vermeiden.
- Zur Vermeidung von Kreuzkontamination und falsch erhöhten Resultaten Patientenproben und Konjugat sorgfältig in die Kavitäten pipettieren.
- Den Kontakt mit Reagenzien, die Wasserstoffperoxid, Schwefelsäure und Konservierungsmittel enthalten, die beim Verschlucken toxisch sein können, vermeiden.
- Nicht mit dem Mund pipettieren.
- Die Behandlung mit Kortison, natürlichen oder synthetischen Steroiden kann die 17-OH Progesteronbestimmung stören.
- Einige Reagenzien enthalten geringe Mengen an Natriumazid oder Proclin 300™ als Konservierungsmittel. Der Kontakt mit Haut und Schleimhäuten ist zu vermeiden.
- Der ELISA ist nur für qualifiziertes Personal bestimmt, das den Standards der Guten Laborpraxis (GLP) folgt.

WARNUNG: Schwefelsäure reizt Augen und Haut. Nach Berührung mit den Augen gründlich mit Wasser spülen und einen Arzt aufsuchen.

16.1. Entsorgungshinweise

Rückstände von Chemikalien und Zubereitungen werden im Allgemeinen als gefährliche Abfälle betrachtet. Die Entsorgung dieser Art von Abfällen wird durch nationale und regionale Gesetze und Vorschriften geregelt. Wenden Sie sich an Ihre örtlichen Behörden oder an Abfallentsorgungsunternehmen, die Sie über die Entsorgung von Sondermüll beraten.

Informationen zu den Verpackungsmaterialien finden Sie unter VERPACKUNGSMATERIALIEN.

17. BESTELLINFORMATION

REF	DNOV004	17-OH Progesterone	(96 Bestimmungen)
------------	---------	--------------------	-------------------

FRANÇAIS

1. INTRODUCTION

La 17-OH Progestérone (17-OH P) est un intermédiaire important de la biosynthèse des stéroïdes. Des niveaux élevés de 17-OH P sont liés à un dysfonctionnement de la voie de biosynthèse des stéroïdes qui conduit à un excès d'androgènes. Par conséquent, les mesures de la 17-OH P sont utiles pour le diagnostic différentiel des conditions cliniques liées à un phénotype hyperandrogène et liées à des dysfonctionnements surrénaliens dans les deux sexes. L'hyperplasie congénitale des surrénales (HCS) est un groupe de troubles autosomiques récessifs caractérisés par une altération de la synthèse du cortisol¹⁻⁴. La cause prédominante de cette affection (95 % des cas) est une mutation du gène CYP21A2 qui code pour la 21-hydroxylase des stéroïdes surrénaliens. La 21-hydroxylase est responsable de la conversion du 17-OH P en 11-déoxycortisol et de la progestérone en déoxycorticostérone. L'évaluation des niveaux de 17-OH P fournit des informations complémentaires pour le diagnostic différentiel de l'HCA causée par des mutations des gènes impliqués dans la synthèse du cortisol par rapport aux mutations du gène CYP21A2.

La mesure de la 17-OH P est également considérée comme utile pour étayer le diagnostic d'autres affections caractérisées par une hyperandrogénie telles que le syndrome des ovaires polykystiques (SOPK)⁵ et l'hirsutisme chez la femme, la puberté précoce⁶ et l'adénarcho précoce. La détermination des taux de 17-OH P est utilisée dans de tels cas pour exclure un diagnostic d'HCA et d'HCA non classique.

Les patients atteints d'HCA doivent être traités avec des glucocorticoïdes et des minéralo-corticoïdes. Le traitement par glucocorticoïdes est particulièrement important pour éviter une crise surrénalienne et une virilisation due à une synthèse excessive d'androgènes^{2,4,7}. L'objectif des traitements par glucocorticoïdes n'étant pas la suppression complète de la synthèse de 17-OH P, il est important d'assurer une surveillance appropriée du traitement afin d'évaluer le dosage correct des médicaments. Ceci est géré par l'évaluation régulière des taux de 17-OH P (et d'androstèdione) comme indicateurs traditionnels de l'adéquation du traitement par glucocorticoïdes dans le CAH⁵.

2. INDICATION D'UTILISATION

Méthode immunoenzymatique colorimétrique par compétition (ELISA) pour la détermination quantitative de la concentration de 17-OH Progesterone dans le sérum ou le plasma humain (obtenu par Lithium-heparine, Sodium-heparine ou potassium EDTA).

3. PRINCIPE DU DOSAGE

Les puits des bandes de microtitration sont pré-revêtus d'anticorps anti-17-OH Progestérone (phase solide). La 17-OH Progestérone de l'échantillon entre en compétition avec la 17-OH Progestérone marquée à la peroxydase de raifort ajoutée (antigène marqué par une enzyme) pour la liaison des anticorps. Après incubation, une séparation lié/libre est effectuée par lavage en phase solide. Le complexe immunitaire formé par l'antigène marqué par une enzyme est visualisé en ajoutant le substrat de tétraméthylbenzidine (TMB) qui donne un produit de réaction bleu. L'intensité de ce produit est **inversement** proportionnelle à la quantité de 17-OH Progestérone dans l'échantillon. De l'acide sulfurique est ajouté pour arrêter la réaction. Cela produit une couleur jaune au point final. L'absorption à 450 nm est lue à l'aide d'un lecteur de microplaques ELISA.

4. MATERIELS

4.1. Réactifs fournis

- **Puits recouverts d'Anti-17-OH Progesterone** : 12 bandes détachables de 8 puits enduites d'Anti-17-OH Progesterone, en sachet d'aluminium refermable.
- **Solution stop** : 1 flacon contenant 15 mL d'acide sulfurique, 0,15 mol/L (éviter tout contact avec la peau).
- **Conjugué 17-OH Progesterone-HRP** : 1 flacon contenant 22 mL de 17-OH Progesterone marqué à la peroxydase de raifort.
- **Solution de substrat TMB** : 1 flacon contenant 15 mL de 3,3',5,5'-Tétraméthylbenzidine (H₂O₂-TMB 0,26g/L) (éviter tout contact avec la peau).
- **Solution de lavage (concentrée x10)** : 1 flacon contenant 50 mL d'une solution de tampon phosphate concentrée 10 fois Tampon phosphaté 0,2 M, Proclin < 0,0015%
- **Contrôle de 17-OH Progesterone A** : 1 flacon contenant 1 mL d'un lot spécifique d'une solution de contrôle prête à l'emploi. La concentration est indiquée sur l'étiquette.
- **Contrôle de 17-OH Progesterone B** : 1 flacon contenant 1 mL d'un lot spécifique d'une solution de contrôle prête à l'emploi. La concentration est indiquée sur l'étiquette.
- **Etalons 17-OH Progesterone** : 6 flacons, 1 mL chacun
 - Etalon 0: 0,0 ng/mL
 - Etalon 1: 0,2 ng/mL
 - Etalon 2: 0,6 ng/mL
 - Etalon 3: 2,0 ng/mL
 - Etalon 4: 6,0 ng/mL
 - Etalon 5: 16,0 ng/mL

4.2. Matériels fournis

- 1 couvercle autocollante
- 1 notice d'utilisation

4.3. Matériels et équipements requis

- Lecteur de microplaques ELISA, pour mesure l'absorbance à 450 nm, 620-630 nm
- Incubateur 37 °C
- Laveur manuel ou automatique pour le lavage des puits
- Pipettes pour utilisation entre 10 et 1000 µL
- Vortex
- Eau distillée
- Tubes jetables
- Chronomètre

5. STABILITE ET CONSERVATION

Conservez tous les réactifs à 2...8 °C à l'abri de la lumière; la trousse est stable jusqu'à la date de péremption indiquée sur l'étiquette et sur le certificat d'analyse. Évitez d'utiliser le kit ou ses composants après la date de péremption.

Une fois ouvert, le kit est stable 6 mois lorsqu'il est stocké à 2...8 °C.

6. PREPARATION DES REACTIFS

Il est très important que tous les réactifs, échantillons et contrôles soient portés à température ambiante (22...28 °C) pendant au moins 30 minutes avant de commencer le dosage ! À la fin de l'essai conservent les réactifs immédiatement à 2...8 °C ; évitez la longue exposition à température ambiante.

6.1. Bandes détachables enduites

Les bandes détachables sont enduites d'anticorps d'anti 17-OH Progesterone et sont prêtes à l'emploi. Conserver entre 2...8 °C. N'ouvrir l'emballage que si la pièce est à température ambiante. *Après avoir prélevé les bandes nécessaires, refermer immédiatement les autres dans le sachet d'aluminium avec le déshydratant fourni et les conserver entre 2...8 °C.*

6.2. Conjugué

Le conjugué à 17-OH Progesterone-HRP prête à l'emploi.

6.3. Etalons

Les étalons sont prêts à l'emploi et ont les concentrations de 17-OH Progesterone suivantes :

Etalon 0:	0,0 ng/mL
Etalon 1:	0,2 ng/mL
Etalon 2:	0,6 ng/mL
Etalon 3:	2,0 ng/mL
Etalon 4:	6,0 ng/mL
Etalon 5:	16,0 ng/mL

Après la première utilisation les étalons sont encore stables pendant encore 6 mois s'ils sont conservés à 2...8 °C, mais pas plus longtemps que la date d'expiration indiquée sur le kit.

6.4. Contrôle

Les flacons contiennent chacune 1 mL d'une solution de contrôle spécifique au lot. La concentration est indiquée sur l'étiquette.

6.5. Solution de substrat TMB

Le flacon contient 15 mL d'un mélange de peroxyde d'hydrogène et de tétraméthylbenzidine. Le réactif est prêt à l'emploi et doit être conservé 2...8 °C dans l'obscurité. *La solution doit être incolore ou peut avoir une légère teinte bleue. Si le substrat devient bleu, il a pu être contaminé et doit être remplacé.*

6.6. Solution stop

Le flacon contient 15 mL d'une solution d'acide sulfurique 0.15 M. Cette solution est prête à l'emploi et doit être conservée entre 2...8 °C.

6.7. Solution de lavage

Diluer le contenu de la solution de lavage concentrée 10x avec de l'eau distillée jusqu'à un volume final de 500 mL avant utilisation. Pour les petits volumes respecter le rapport de dilution de 1 :10. La solution de lavage diluée est stable pendant 30 jours entre 2...8 °C. Dans une solution de lavage concentrée, il est possible d'observer la présence de cristaux ; dans ce cas, mélanger à température ambiante jusqu'à dissolution complète des cristaux; pour une plus grande précision, diluez la totalité de la bouteille de solution de lavage concentrée à 500 mL en prenant soin de transférer également les cristaux, puis mélangez jusqu'à dissolution complète des cristaux.

7. PRELEVEMENT ET PREPARATION DES ECHANTILLONS

Utiliser des échantillons humains de sérum ou plasma (obtenus par héparine de lithium, héparine de sodium ou potassium EDTA) pour ce test. Si le test est réalisé dans les 4 jours (96 heures) après le prélèvement, les échantillons doivent être conservés à 2...8 °C ; autrement ils doivent être aliquotés et conservés surgelés. Si les échantillons sont conservés congelés, bien mélanger les échantillons décongelés avant le test. Éviter les cycles répétés de congélation et décongélation. L'inactivation par la chaleur des échantillons n'est pas recommandée.

8. PROCEDE DU DOSAGE

8.1. Préparation du dosage

Lire attentivement la notice d'utilisation **avant de** réaliser le dosage. La fiabilité des résultats dépend du suivi strict d'utilisation comme décrit. Avant de commencer le dosage, déterminer le plan de distribution et d'identification des échantillons et des contrôles. Sélectionner le nombre de bandes ou de puits nécessaires et les placer sur le support. Le pipetage des échantillons ne doit pas prendre plus de 10 minutes afin d'éviter toutes dérives du dosage. Si cela dure plus de 10 minutes, suivre le même ordre d'utilisation. Si plusieurs plaques sont utilisées, il est recommandé de répéter la courbe dose/réponse.

Réserver au moins :

1 puits	(ex. A1)	Pour le blanc
2 puits	(ex. B1+C1)	Pour l'étalon 0
2 puits	(ex. D1+E1)	Pour l'étalon 1
2 puits	(ex. F1+G1)	Pour l'étalon 2
2 puits	(ex. H1+A2)	Pour l'étalon 3
2 puits	(ex. B2+C2)	Pour l'étalon 4
2 puits	(ex. D2+E2)	Pour l'étalon 5
2 puits	(ex. F2+G2)	Pour le contrôle A
2 puits	(ex. H2+A3)	Pour le contrôle B

Il est nécessaire de déterminer les contrôles et les échantillons du patient en doublets.

Réaliser toutes les étapes du dosage dans l'ordre donné et sans interruption entre les étapes.

Un cône de pipette propre et jetable doit être utilisé pour distribuer chaque contrôle et échantillon.

1. Pipeter 25 µL d'étalons, de contrôles et d'échantillons dans leurs puits respectifs. Garder le puits A1 pour le blanc.
2. Ajouter 200 µL de conjugué dans chaque puits. Garder le puits A1 pour le blanc.
3. Couvrir les puits avec le couvercle fourni dans le kit.
4. **Incuber pendant 1 heure à 37 °C.**
5. À la fin de l'incubation, enlever le couvercle, aspirer le contenu des puits et laver chaque puits 6 fois avec 300 µL de solution de lavage diluée. Eviter les débordements de puits de réaction. Pendant chaque pas de lessive, secouez doucement la plaque depuis 5 secondes et enlevez la solution d'excès en tapant la plaque inversée sur un essuie-mains en papier absorbant.

Note : L'étape de lavage est très importante ! Un lavage insuffisant peut conduire à une précision faible et des valeurs d'absorbance faussement élevées.

6. Pipeter 100 µL de solution de TMB dans tous les puits.
7. **Incuber pendant exactement 15 min à température ambiante (22...28 °C) dans l'obscurité.**
8. Pipeter 100 µL de solution stop dans tous les puits dans le même ordre à la même vitesse que pour la solution de TMB. Secouer doucement la microplaque.
La couleur bleue développée pendant l'incubation vire au jaune.
9. Mesurer l'absorbance (E) des échantillons à 450 nm contre une longueur d'onde de référence de 620-630 nm ou contre le blanc au cours de 5 minutes après l'adjonction de la solution stop.

8.2. Mesure

Faire le **zéro** du lecteur ELISA à l'aide du blanc dans le puits A1.

Si - pour des raisons techniques - le lecteur d'ELISA ne peut pas être ajusté à zéro en utilisant le blanc dans le puits A1, soustraire la valeur d'absorbance du puits A1 de toutes les autres valeurs d'absorbance mesurées afin d'obtenir des résultats fiables !

Mesurer l'absorbance de tous les puits à **450 nm** et enregistrer les valeurs d'absorbance pour chaque contrôle et échantillon.

Calculer les **valeurs moyennes d'absorbance pour tous les doublets**, si nécessaires.

9. CALCUL DES RESULTATS

Il existe une grande variété de logiciels de réduction des données, qui peuvent être utilisés pour générer la courbe d'étalonnage moyenne et pour calculer les concentrations moyennes des échantillons inconnus et des contrôles. Un ajustement de courbe logistique à 4 paramètres (4PL), **incluant l'étalon 0 est nécessaire.**

Il est également possible de préparer une courbe d'étalonnage sur du papier graphique semi-logarithmique en traçant l'absorbance moyenne sur l'axe des Y en fonction de la concentration de l'analyte sur l'axe des X. L'étalon 0 doit être inclus dans la courbe d'étalonnage. Lisez la valeur d'absorbance moyenne de chaque échantillon inconnu sur la courbe.

10. CONTROLE QUALITE

Les bonnes pratiques de laboratoire (BPL) exigent l'utilisation d'échantillons de contrôle de qualité dans chaque série de tests afin de vérifier la performance du test. Les contrôles doivent être traités comme des échantillons inconnus, et les résultats analysés avec des méthodes statistiques appropriées. Les contrôles fournis dans le kit doivent être testés comme des inconnus et sont destinés à aider à évaluer la validité des résultats obtenus avec chaque plaque de test.

Nous recommandons aux utilisateurs de conserver des enregistrements graphiques des valeurs de contrôle générées avec chaque série de tests, y compris les moyennes courantes, les écarts types (SD- Standard Deviations) et les %CV. Ces informations faciliteront l'analyse des tendances des contrôles concernant la performance des lots. L'analyse des tendances aidera à identifier les essais qui donnent des valeurs de contrôle significativement différentes de leur plage moyenne.

Lors de l'interprétation des données de contrôle, les utilisateurs doivent noter que ce produit a été conçu et développé comme un produit manuel. La plage indiquée sur le *Certificate of Analysis (CoA)* doit être appropriée pour les analyses effectuées manuellement et en respectant strictement la procédure d'analyse décrite ci-dessus. Les professionnels du contrôle de la qualité reconnaissent qu'en raison des différences de conditions et de pratiques, il y aura toujours une variabilité des valeurs moyennes et de la précision des mesures de contrôle entre les différents laboratoires⁸.

11. INTERVALLE DE MESURE

La plage de mesure du test (AMR) est de 0,26 - 16 ng/mL.

Toute valeur inférieure à 0,26 ng/mL doit être signalée comme "< 0,26 ng/mL". Toute valeur supérieure à 16 ng/mL doit être signalée comme "> 16 ng/mL".

12. MÉTROLOGIE ET TRAÇABILITÉ

Le test 17-OH Progesterone ELISA a été normalisé par rapport à des normes de référence internes (matrice sérique) dont la valeur a été attribuée à une méthode LC-MS/MS disponible dans le commerce.

13. VALEURS ATTENDUES

Les intervalles suivants ont été déterminées à l'aide du test 17-OH Progesterone ELISA et sont fournis à titre d'information uniquement. L'intervalle de référence de 95 % pour les adultes apparemment en bonne santé a été calculé par une méthode non paramétrique selon les directives de la norme CLSI C28-A "Defining, Establishing and Verifying Reference Intervals in the Clinical Laboratory".

		n°	Médiane (ng/mL)	Intervalle de référence (ng/mL)
FEMMES	phase lutéinique	123	0,45	<LoQ – 2.19
	phase folliculaire	122	0,32	<LoQ – 2.10
	post-ménopausique	122	<LoQ	<LoQ – 0,95
HOMMES		122	0,75	<LoQ – 1,97
ENFANTS (3 - 18 ans)		124	<LoQ	<LoQ – 1,48

Les intervalles ci-dessus doivent être considérés comme des lignes directrices uniquement ; il est recommandé que chaque laboratoire établisse ses propres intervalles attendus en fonction de sa propre population de patients.

14. PERFORMANCES DU TEST

14.1. Capacité de détection

La limite du blanc (LoB), la limite de détection (LoD) et la limite de quantification (LoQ) ont été déterminées selon les directives de CLSI EP17-A, "Protocols for Determination of Limits of Detection and Limits of Quantitation" en utilisant 6 blancs et 6 échantillons de faible niveau.

Sensibilité	Concentration
Limite du Blanc (LoB)	0,02 ng/mL
Limite de Détection (LoD)	0,11 ng/mL
Limite de Quantification (LoQ)	0,26 ng/mL

14.2. Justesse

La justesse a été démontrée par la comparaison de la méthode 17-OH Progesterone ELISA avec un test LC-MS/MS disponible dans le commerce utilisant des échantillons de donneurs natifs, voir section 14.5.

14.3. Précision

La précision du test 17-OH Progesterone ELISA a été déterminée en effectuant une étude de précision complexe.

Répétabilité (dans le laboratoire)

Un total de 6 échantillons de sérum a été analysé en 5 répétitions, une fois par jour pendant 5 jours par 3 opérateurs. Les données d'un lot représentatif sont présentées ci-dessous :

Échantillon	n	Conc. moyenne (ng/mL)	Au cours d'une même série (répétabilité)	
			Écarts types	CV%
1	75	0,90	0,10	11,4%
2	75	1,45	0,15	10,0%
3	75	2,10	0,20	9,3%
4	75	5,14	0,49	9,5%
5	75	8,94	0,74	8,3%
6	75	14,50	1,11	7,6%

Reproductibilité

Un total de 6 échantillons de sérum a été analysé en 5 répétitions, une fois par jour pendant 5 jours par 3 opérateurs. Les données d'un lot représentatif sont présentées ci-dessous :

Échantillon	n	Conc. moyenne (ng/mL)	Au sein du laboratoire (Reproductibilité)	
			Écarts types	CV%
1	75	0,90	0,12	13,0%
2	75	1,45	0,17	11,6%
3	75	2,10	0,23	11,1%
4	75	5,14	0,55	10,7%
5	75	8,94	0,82	9,2%
6	75	14,50	1,429	8,9%

14.4. Linéarité

La linéarité a été évaluée selon la norme CLSI EP-06, "Evaluation of the Linearity of Quantitative Measurement Procedures". Pour la concentration de progestérone 17-OH par 17-OH Progesterone ELISA la procédure de mesure montre une linéarité pour l'intervalle de 0,2 à 17,22 ng/mL dans la déviation admissible de linéarité (ADL) de ± 15 %.

14.5. Comparaison des méthodes

Le test 17-OH Progesterone ELISA a été comparé à une méthode LC-MS/MS disponible dans le commerce, conformément à la norme CLSI EP-9A, "Method Comparison and Bias Estimation Using Patient Samples". Un total de 120 échantillons, sélectionnés pour représenter une large gamme de concentrations de 17-OH Progestérone, a été dosé par chaque méthode. Une analyse de régression Passing-Bablok a été effectuée sur les données comparatives :

n	Pente [95% CI]	Ordonnée à l'origine (ng/mL) [95% CI]	Coefficient de corrélation (r)
120	0,91 [0,87 à 0,97]	0,21 [0,16 à 0,28]	0,99

14.6. Réaction Croisée

La spécificité a été évaluée avec les réactifs croisés suivants :

Cross-reactant	Conc.	Interference
11-deoxycortisol	80 ng/mL	2,15%
Progesterone	2.000 ng/L	0,47%
Pregnenolone	2.000 ng/mL	0,15%
Testosterone	2.000 ng/mL	0,07%
17 β -Estradiol	2.000 ng/mL	0,01%
Aldosterone	2.000 ng/mL	0,00%
Estriol	2.000 ng/mL	0,00%
Estrone-3-Sulphate	2.000 ng/mL	0,00%
Spironolactone	2.000 ng/mL	0,00%
Androstenedione	2.000 ng/mL	0,05%
Androsterone	2.000 ng/mL	0,04%

Cross-reactant	Conc.	Interference
Corticosterone	2.000 ng/mL	0,09%
Cortisol	2.000 ng/mL	0,10%
Cortisone	2.000 ng/mL	0,07%
DHEA	2.000 ng/mL	0,07%
DHEA-S	20.000 ng/mL	0,01%
DHT	2.000 ng/mL	0,04%
Prednisolone	3.000 ng/mL	0,02%
Prednisone	2.000 ng/mL	0,01%

14.7. Interférence

Les substances suivantes n'interfèrent pas avec un biais de $\pm 15\%$ dans le test 17-OH Progesterone ELISA lorsque les concentrations sont inférieures au seuil indiqué présenté dans le tableau suivant.

Substance	Concentration seuil
Bilirubine, conjuguée	20 mg/dL
Bilirubine, non conjuguée	20 mg/dL
Hémoglobine	200 mg/dL
Triglycérides	600 mg/dL

14.8. Étude sérum-plasma

L'étude de comparaison matricielle 17-OH Progesterone ELISA a été réalisée pour évaluer la différence entre les types de tubes (tubes séparateurs de sérum (SST), plasma à l'héparine de lithium, plasma à l'héparine de sodium et plasma à l'EDTA K2) par rapport aux échantillons de contrôle (sérum rouge supérieur, sans additif) conformément aux directives CLSI (EP9-A). Un total de 27 échantillons (23 natifs, 4 dopés) pour couvrir la gamme de dosage a été évalué. Une analyse de régression Passing-Bablok a été effectuée sur les données comparatives :

Echantillon	Pente [IC 95%]	Ordonnée à l'origine (ng/mL) [IC 95%]	Coefficient de corrélation (r)
SST Serum	1,02 [0,91 to 1,13]	-0,03 [-0,21 to 0,11]	0,99
Plasma héparine de lithium	1,00 [0,87 to 1,04]	0,00 [-0,07 to 0,08]	0,99
Plasma héparine de sodium	1,00 [0,94 to 1,10]	-0,02 [-0,14 to 0,03]	0,99
EDTA plasma	1,04 [0,90 to 1,12]	-0,03 [-0,19 to 0,09]	0,99

15. LIMITES DE LA TECHNIQUE

- Comme dans le cas de toute procédure de diagnostic, les résultats doivent être interprétés en conjonction avec la présentation clinique du patient et les autres informations dont dispose le médecin.
- Les anticorps hétérophiles présents dans le sérum humain peuvent réagir avec les immunoglobulines des réactifs, interférant ainsi avec les immunodosages in vitro. Les patients exposés régulièrement à des animaux ou à des produits sériques animaux peuvent être sujets à cette interférence et des valeurs anormales peuvent être observées.

16. PRECAUTIONS ET AVERTISSEMENTS

- La procédure de dosage, l'information, les précautions et mises en garde du mode d'emploi doivent être suivies de façon stricte. L'utilisation de ces kits avec des automates ou dispositifs similaires doit être validée. Aucun changement de la conception, composition et procédure de dosage, ainsi que l'utilisation avec d'autres produits non approuvés par le fabricant, ne sont autorisés; seul l'utilisateur est responsable de tels changements. Le fabricant n'est pas responsable des faux résultats et des incidents dus à ces modifications. Le fabricant n'est pas responsable des résultats fournis par analyse visuelle des échantillons des patients.
- Uniquement pour diagnostic in vitro.
- Utilisez un équipement de protection individuelle approprié lorsque vous travaillez avec les réactifs fournis.
- Tous les composants d'origine humaine utilisés pour la fabrication de ces réactifs ont été analysés et ont été testés non réactifs aux antigènes HBs, en anticorps anti-VIH et en anticorps anti-VHC. Néanmoins, tous les produits doivent être considérés et traités comme étant potentiellement infectieux.
- Les matériaux d'origine animale utilisés dans la préparation de ce kit ont été obtenus à partir d'animaux sains, et les protéines bovines ont été obtenues dans des pays sans ESB (Encéphalopathie Spongiforme Bovine).
- Ne pas échanger les réactifs ou les bandes provenant de différents lots de production.
- Ne pas utiliser de réactifs provenant d'autres fabricants avec les réactifs de ce kit.
- Ne pas utiliser les réactifs après la date de péremption indiquée sur l'étiquette.
- Utiliser seulement des cônes de pipette, des distributeurs et du matériel de laboratoire propres.
- Ne pas échanger les bouchons des flacons, pour éviter la contamination croisée

- Fermer les flacons de réactifs immédiatement après l'utilisation pour éviter l'évaporation et la contamination microbienne.
- Avant une nouvelle utilisation, vérifier les flacons de conjugué et de contrôle, déjà utilisés, pour exclure une contamination microbienne.
- Pour éviter la contamination croisée et des résultats faussement élevés, introduire les échantillons de patients et le conjugué exactement au fond des puits en évitant les éclaboussures.
- Quand l'utilisation a automatisé l'équipement, l'utilisateur a la responsabilité de s'assurer que le kit a été convenablement évalué. Pour améliorer la performance du kit sur les systèmes automatiques ELISA, on recommande d'augmenter le nombre de se lave.
- Les réactifs contiennent de petites quantités d'azide de sodium ou de Proclin 300™ en tant que conservateur. Evitez le contact avec la peau ou les muqueuses.
- Le TMB est irritant, ce qui peut être nocif s'il est inhalé, ingéré ou absorbé à travers la peau. Eviter toute inhalation, ingestion ou contact avec la peau et les yeux pour prévenir de ces risques. Il peut réagir avec la plomberie en plomb ou en cuivre pour former des azides métalliques potentiellement explosifs. Si vous utilisez un évier pour retirer les réactifs, lavez-le avec de grandes quantités d'eau pour éviter l'accumulation d'azides.
- La solution stop est une solution d'acide sulfurique diluée. L'acide sulfurique est un poison corrosif et peut être toxique s'il est ingéré. Eviter tout contact avec la peau ou les yeux pour prévenir des brûlures chimiques.
- L'addition de la solution de substrat initie la réaction cinétique qui se termine par l'ajout de solution stop. Par conséquent, l'addition de solution de substrat et de solution stop doit être fait durant la manipulation pour éliminer tous risques de dépassement de la durée de réaction.
- Suivre la notice pour les contrôles qualité dans les laboratoires médicaux en dosant les contrôles et/ou les sérums.
- Les échantillons microbiologiquement contaminés ne doivent pas être utilisés pour le dosage. Les échantillons hautement lipémiques ou hémolysés ne doivent pas être utilisés non plus.
- Les lecteurs de microplaques mesurent verticalement. Ne pas toucher le fond des puits.
- La méthode ELISA est destinée à un personnel qualifié qui est familiarisé avec les Bonnes Pratiques de Laboratoire (BPL).

AVERTISSEMENT : L'acide sulfurique irrite les yeux et la peau. Tenir hors de portée des enfants. En cas de contact avec les yeux, rincez abondamment à l'eau et consultez un médecin !

16.1. Elimination des déchets

Les résidus des produits chimiques et des préparations sont considérés en général comme des déchets dangereux. L'élimination de ce type de déchet est réglementée par des lois et réglementations nationales et régionales. Contacter les autorités compétentes ou les sociétés de gestion des déchets pour obtenir des renseignements sur l'élimination des déchets dangereux.

Pour plus d'informations sur les matériaux d'emballage, reportez-vous à la section MATÉRIELS D'EMBALLAGE.

17. INFORMATION POUR LES COMMANDES

REF	DNOV004	17-OH Progesterone	(96 Dosages)
-----	---------	--------------------	--------------

ITALIANO

1. INTRODUZIONE

Il 17-OH progesterone (17-OHP) è un importante composto intermedio della biosintesi degli steroidi. Livelli elevati di 17-OHP sono legati alla disfunzione della via di biosintesi steroidea che porta a un eccesso di androgeni. Pertanto, le misurazioni di 17-OHP sono utili per la diagnosi differenziale delle condizioni cliniche legate a un fenotipo iperandrogenico e correlate a disfunzioni surrenali in entrambi i sessi.

L'iperplasia surrenale congenita (CAH) è un gruppo di malattie autosomiche recessive caratterizzate da un'alterata sintesi del cortisolo¹⁻⁴. La causa predominante della patologia (nel 95% dei casi) è la mutazione del gene CYP21A2 che codifica lo steroide 21-idrossilasi surrenale. La 21-idrossilasi è responsabile della conversione del 17-OHP in 11-deossicortisolo e del progesterone in deossicorticosterone. La valutazione dei livelli di 17-OHP fornisce informazioni di supporto per la diagnosi differenziale di CAH causata da mutazioni dei geni coinvolti nella sintesi del cortisolo da mutazioni del gene CYP21A2.

La misurazione di 17-OHP è anche considerata utile per sostenere la diagnosi di altre patologie caratterizzate da iperandrogenismo, quali la sindrome dell'ovaio policistico (PCOS)⁵ e l'irsutismo nelle donne, la pubertà precoce⁶ e l'adrenarca precoce. La determinazione dei livelli di 17-OHP viene utilizzata in questi casi per escludere una diagnosi di CAH classica e non classica.

I pazienti affetti da CAH devono essere trattati con glucocorticoidi e mineralcorticoidi. Il trattamento con glucocorticoidi è di particolare importanza per evitare la crisi surrenale e la virilizzazione dovuta all'eccessiva sintesi degli androgeni^{2,4,7}. Poiché l'obiettivo dei trattamenti con glucocorticoidi non è la soppressione completa della sintesi di 17-OHP, è importante garantire un adeguato monitoraggio del trattamento per valutare il corretto dosaggio dei farmaci. Questo è gestito dalla valutazione regolare dei livelli di 17-OHP (e di androstenedione) come indicatori tradizionali dell'adeguatezza del trattamento con glucocorticoidi nella CAH⁵.

2. USO PREVISTO

Metodo competitivo immunoenzimatico colorimetrico per la determinazione quantitativa del 17-OH Progesterone (ELISA) nel siero o plasma umano (ottenuto da Litio-Eparina, Sodio-Eparina o EDTA di potassio).

3. PRINCIPIO DEL TEST

Il 17-OH Progesterone (antigene) presente nel campione, compete con l'antigene marcato con perossidasi nei confronti dell'anticorpo anti-17-OH Progesterone adsorbito su micropiastre (fase solida). La separazione libero-legato si ottiene mediante semplice lavaggio della fase solida. L'enzima presente nella frazione legata, reagendo con il Substrato (H₂O₂) ed il Cromogeno (TMB), sviluppa una colorazione blu che vira al giallo dopo aggiunta della Stop soluzione. L'intensità del colore sviluppato è proporzionale alla concentrazione di antigene marcato e quindi inversamente proporzionale alla concentrazione del 17-OH Progesterone presente nel campione.

4. MATERIALI

4.1. Reagenti forniti

- **Anti-17-OH Progesterone micropiastre rivestite:** 12 strisce divisibili in 8 pozzetti, rivestite con anticorpo 17-OH Progesterone; dentro una busta d'alluminio richiudibile.
- **Soluzione Bloccante:** 1 flacone contenente 15 mL acido solforico 0,15 mol/L (evitare il contatto con la pelle)
- **17-OH Progesterone-HRP Coniugato:** 1 flacone contenente 22 mL 17-OH Progesterone coniugato con Perossidasi.
- **Soluzione Substrato TMB:** 1 flacone contenente 15 mL di 3,3',5,5'-Tetrametilbenzidina (TMB, 0,26 g/L) (evitare il contatto con la pelle).
- **Tampone di Lavaggio 10X Conc.:** 1 flacone contenente 50 mL Tampone fosfato 0,2M, Proclin < 0,0015%.
- **17-OH Progesterone Controllo A:** 1 flacone, 1 mL, pronto all'uso. La concentrazione è indicata sull'etichetta.
- **17-OH Progesterone Controllo B:** 1 flacone, 1 mL, pronto all'uso. La concentrazione è indicata sull'etichetta.
- **17-OH Progesterone Standards:** 6 flaconi, contenenti 1 mL
 - Standard 0: 0 ng/mL
 - Standard 1: 0,2 ng/mL
 - Standard 2: 0,6 ng/mL
 - Standard 3: 2,0 ng/mL
 - Standard 4: 6,0 ng/mL
 - Standard 5: 16,0 ng/mL

4.2. Accessori forniti

- 1 pellicola adesiva
- 1 istruzioni per l'uso

4.3. Materiali e attrezzature necessari

- Fotometro per micropiastre con filtri da 450 nm, 620-630 nm
- Incubatore a 37°C
- Lavatore di micropiastre
- Micropipette con punte monouso 10 - 1000 µL
- Vortex-Mixer
- Provette monouso

- Supporto per provette
- Acqua deionizzata o distillata.
- Timer

5. MODALITÀ DI CONSERVAZIONE

Conservare tutti i reagenti a 2...8 °C al buio; il kit è stabile fino alla data di scadenza indicata sull'etichetta e sul certificato di analisi. Evitare di utilizzare il kit o i suoi componenti dopo la data di scadenza.

Una volta aperto, il kit è stabile per 6 mesi se conservato a 2...8 °C.

6. PREPARAZIONE DEI REAGENTI

È molto importante portare tutti i reagenti e campioni a temperatura ambiente (22...28 °C) prima dell'uso per almeno 30 minuti. Al termine del test riporre immediatamente tutti i reagenti a 2...8 °C; evitare lunghi periodi d'esposizione a temperatura ambiente.

6.1. Micropiastre

I pozzetti sono separabili, sottovuoto e rivestite con anticorpo 17-OH Progesterone. I pozzetti, pronti all'uso, devono essere conservati tra 2...8 °C. Riporre i pozzetti non utilizzati nel sacchetto con il gel essiccante di silice. Il prodotto è stabile fino alla data di scadenza se conservato tra 2...8 °C.

6.2. Coniugato

Il coniugato 17-OH Progesterone- Coniugato HRP è una soluzione pronta all'uso.

6.3. Standard

Gli standard sono pronti all'uso e hanno la seguente concentrazione di 17-OH Progesterone:

Standard 0:	0 ng/mL
Standard 1:	0,2 ng/mL
Standard 2:	0,6 ng/mL
Standard 3:	2,0 ng/mL
Standard 4:	6,0 ng/mL
Standard 5	16,0 ng/mL

Dopo il primo utilizzo gli standard sono ancora stabili per altri 6 mesi se conservati a 2...8 °C, ma non oltre la data di scadenza indicata del kit.

6.4. Controlli

Il flacone contiene ciascuno 1 mL, pronto all'uso. La concentrazione del controllo è lotto-specifica ed è indicata sull'etichetta.

6.5. Soluzione Substrato TMB

Il flacone contiene 15 mL di 3,3',5,5'-Tetrametilbenzidina (TMB) e perossido di idrogeno pronto all'uso. Deve essere conservato a 2...8 °C al buio. La soluzione deve essere incolore o potrebbe avere una leggera sfumatura blu. *Nel caso in cui diventasse blu, significa che è contaminata e deve essere gettato via.*

6.6. Solution Bloccante

Il flacone contiene 15 mL di acido solforico, 0,15 M, pronto all'uso. Una volta aperto, il prodotto è stabile fino alla data di scadenza se conservato tra 2...8 °C.

6.7. Tampone di Lavaggio

Prima dell'uso, diluire il contenuto di ogni fiala di "10X Conc. Wash Solution" con acqua distillata fino al volume di 500 mL. Per preparare volumi minori rispettare il rapporto di diluizione di 1:10. La soluzione di lavaggio diluita è stabile a 2...8 °C per almeno 30 giorni. Nella wash soluzione concentrata è possibile osservare la presenza di cristalli; in tal caso agitare a temperatura ambiente fino a completa dissoluzione dei cristalli; per una maggiore precisione diluire tutto il flacone della soluzione di lavaggio concentrata a 500 mL, avendo cura di trasferire anche i cristalli, poi agitare fino a completa dissoluzione dei cristalli.

7. PRELIEVO E PREPARAZIONE DEI CAMPIONI

Per questo test si prega di usare campioni di siero o plasma umano (ottenuto da Litio-Eparina, Sodio-Eparina o EDTA di potassio). Se il test è fatto entro 4 giorni (96 ore) dal prelievo i campioni possono essere conservati tra 2...8 °C. Altrimenti devono essere aliquotati e congelati tra. Se i campioni sono conservati congelati, mescolare bene i campioni scongelati prima del test. Evitare cicli ripetuti di congelamento/scongelamento. L'inattivazione dei campioni per mezzo del calore non è raccomandata.

8. PROCEDIMENTO

8.1. Procedura del Test

Leggere bene le istruzioni per l'uso **prima** di iniziare il test. L'affidabilità dei risultati dipende dalla stretta aderenza alle istruzioni per l'uso di prova come descritto. Stabilire innanzitutto il piano di distribuzione ed identificazione dei campioni e standard/controlli. Selezionare il numero richiesto di strisce o pozzette inserirli nel supporto. Il tempo di dispensazione dei pozzetti non deve essere superiore a (10) minuti. Se si utilizza più di una piastra, si raccomanda di ripetere la curva di risposta al dosaggio. Utilizzare almeno:

1 pozzetto (e.g. A1)	bianco
2 pozzetti (e.g. B1+C1)	standard 0
2 pozzetti (e.g. D1+E1)	standard 1
2 pozzetti (e.g. F1+G1)	standard 2
2 pozzetti (e.g. H1+A2)	standard 3
2 pozzetti (e.g. B2+C2)	standard 4
2 pozzetti (e.g. D2+E2)	standard 5
2 pozzetti (ex. F2+G2)	Controllo A
2 pozzetti (ex. H2+A3)	Controllo B

È necessario determinare gli standard/controlli e i campioni dei pazienti in duplicato.

Eseguire il test nell'ordine stabilito dalle istruzioni, senza pause.

Utilizzare puntali nuovi e puliti per ogni campione e standard/controllo.

1. Pipettare 25 µL di standard e di campione nei relativi pozzetti. Usare il pozzetto A1 per il bianco-substrato.
2. Pipettare 200 µL di 17-OH Progesterone-HRP in tutti i pozzetti, escludendo quello con il bianco-substrato (blank)
3. Coprire i pozzetti con la pellicola adesiva.
4. **Incubare 1 ora a 37 °C.**
5. Al termine dell'incubazione, togliere la pellicola ed aspirare il liquido dai pozzetti. Successivamente lavare i pozzetti 6 volte con 300 µL di tampone di lavaggio. Evitare che la soluzione trabocchi dai pozzetti. L'intervallo tra il lavaggio e l'aspirazione deve essere > 5 sec. Dopo il lavaggio picchiettare delicatamente i pozzetti su una carta assorbente per togliere completamente il liquido, prima del passo successivo!
Attenzione: Il lavaggio è una fase molto importante. Da lavaggio insufficiente risulta una bassa precisione e risultati falsi.
6. Pipettare 100 µL di Soluzione TMB in tutti i pozzetti.
7. **Incubare precisamente per 15 min a temperatura ambiente (22...28 °C) al buio.**
8. Pipettare 100 µL di Soluzione Stop in tutti i pozzetti, nello stesso ordine della soluzione TMB. Agitare delicatamente la micropiastra. *Durante l'incubazione il colore cambia dal blu al giallo.*
9. Leggere l'assorbanza (E) a 450 nm contro una lunghezza d'onda di riferimento di 620-630 nm oppure contro il Bianco entro 5 minuti.

8.2. Misurazione

Regolare il fotometro per le micropiastre (ELISA-Reader) **a zero** usando il bianco (blank) **in A1**.

Se, per motivi tecnici, non è possibile regolare il fotometro sottrarre l'assorbanza del bianco da tutti i valori delle altre assorbanze.

Misurare l'assorbanza di tutti i pozzetti a **450 nm** e registrare tutti i valori misurati.

È raccomandato fare una misurazione delle densità ottiche a doppia lunghezza d'onda utilizzando i 620 nm come lunghezza di riferimento.

Dove sono state misurate in doppio, calcolare **la media delle assorbanze**.

9. CALCOLO DEI RISULTATI

Sono disponibili vari pacchetti software di elaborazione dei dati, che possono essere utilizzati per generare la curva di calibrazione media e per calcolare le concentrazioni medie di campioni e controlli sconosciuti. **È necessario** un adattamento della curva logistica a 4 parametri (4PL) **che includa lo standard 0**.

In alternativa, è possibile preparare una curva di calibrazione su carta millimetrata semilogaritmica tracciando un grafico con l'assorbanza media sull'asse delle ordinate e la concentrazione dell'analita sull'asse delle ascisse. Nella curva di calibrazione deve essere incluso il standard 0. Leggere il valore medio dell'assorbanza di ciascun campione sconosciuto dalla curva.

10. CONTROLLO QUALITÀ

Le buone prassi di laboratorio (GLP) richiedono l'inclusione di campioni per il controllo della qualità in ogni serie di dosaggi al fine di verificare le prestazioni del dosaggio. I controlli devono essere trattati come campioni sconosciuti e i risultati devono essere analizzati con metodi statistici appropriati. I controlli forniti nel kit devono essere testati come se fossero sconosciuti e hanno lo scopo di agevolare la valutazione della validità dei risultati ottenuti in ogni piastra di dosaggio.

Raccomandiamo agli utenti di conservare le annotazioni grafiche dei valori di controllo generati con ciascun dosaggio, tra cui medie mobili, DS e CV%. Queste informazioni faciliteranno l'analisi delle tendenze dei controlli per quanto

riguarda le prestazioni dei lotti. Le tendenze aiuteranno a identificare i dosaggi che generano valori di controllo significativamente diversi dal rispettivo intervallo medio.

Quando si interpretano i dati dei controlli, occorre tenere conto del fatto che il prodotto è stato progettato e sviluppato come prodotto per l'utilizzo manuale. L'intervallo riportato sul *Certificate of Analysis (CoA)* deve essere appropriato per i dosaggi eseguiti manualmente e rispettando rigorosamente la procedura di dosaggio descritta sopra. Gli esperti del controllo di qualità riconoscono che, a causa delle differenze di condizioni e di prassi, si avrà sempre una variabilità nei valori medi e nella precisione delle misurazioni dei controlli eseguite da laboratori diversi⁸.

11. CAMPO DI MISURA

L'intervallo di misurazione del test (AMR) è 0,26-16 ng/mL.

Qualsiasi valore inferiore a 0,26 ng/mL deve essere indicato come "< 0,26 ng/mL". Qualsiasi valore superiore a 16 ng/mL deve essere indicato come "> 16 ng/mL".

12. METROLOGIA E TRACCIABILITÀ

Il 17-OH Progesterone ELISA è stato standardizzato rispetto a standard di riferimento interni (matrice sierica) che sono stati assegnati a un metodo LC-MS/MS disponibile in commercio.

13. VALORI ATESSI

I seguenti intervalli sono stati determinati utilizzando il test 17-OH Progesterone ELISA e sono forniti unicamente a scopo informativo. Il 95% degli intervalli di riferimento per adulti apparentemente sani è stato calcolato attraverso un metodo non parametrico secondo le linee guida tratte dal documento CLSI C28-A "Defining, Establishing and Verifying Reference Intervals in the Clinical Laboratory".

		n°	mediana (ng/mL)	Intervallo di riferimento (ng/mL)
DONNE	Fase luteinica	123	0,45	< LoQ - 2,19
	Fase follicolare	122	0,32	< LoQ - 2,10
	Post-menopausa	122	<LoQ	< LoQ - 0,95
UOMINI		122	0,75	< LoQ - 1,97
BAMBINI (3 -18 anni)		124	<LoQ	< LoQ - 1,48

Gli intervalli sopraindicati devono essere considerati solo come linee guida; si raccomanda a ogni laboratorio di stabilire i propri intervalli di valori attesi sulla base della propria popolazione di pazienti.

14. CARATTERISTICHE DEL TEST

14.1. Capacità di rilevamento

Il limite del bianco (LoB), il limite di rilevamento (LoD) e il limite della determinazione quantitativa (LoQ) sono stati definiti basandosi sulla procedura CLSI EP17-A, "Protocols for Determination of Limits of Detection and Limits of Quantitation" utilizzando 6 bianchi e 6 campioni a basso livello.

Sensibilità	Concentrazione
Limite del bianco (LoB)	0,02 ng/mL
Limite di rilevamento (LoD)	0,11 ng/mL
Limite della determinazione quantitativa (LoQ)	0,26 ng/mL

14.2. Esattezza

L'esattezza è stata dimostrata attraverso il confronto del test 17-OH Progesterone ELISA mediante un LC-MS/MS disponibile in commercio utilizzando campioni di donatori nativi. Fare riferimento alla sezione 14.5.

14.3. Precisione

La precisione del test 17-OH Progesterone ELISA è stata determinata eseguendo un complesso studio di precisione.

Ripetibilità (all'interno di un laboratorio)

Un totale di 6 campioni di siero è stato analizzato in 5 repliche, una volta al giorno per 5 giorni da 3 operatori. I dati di un lotto rappresentativo sono mostrati di seguito:

Campione	n	Conc. media (ng/mL)	Intra-test (ripetibilità)	
			DS	CV%
1	75	0,90	0,10	11,4%
2	75	1,45	0,15	10,0%
3	75	2,10	0,20	9,3%
4	75	5,14	0,49	9,5%
5	75	8,94	0,74	8,3%
6	75	14,50	1,11	7,6%

Riproducibilità

Un totale di 6 campioni di siero è stato analizzato in 5 repliche, una volta al giorno per 5 giorni da 3 operatori.

I dati di un lotto rappresentativo sono mostrati di seguito:

Campione	n	Conc. media (ng/mL)	All'interno del laboratorio (riproducibilità)	
			DS	CV%
1	75	0,90	0,12	13,0%
2	75	1,45	0,17	11,6%
3	75	2,10	0,23	11,1%
4	75	5,14	0,55	10,7%
5	75	8,94	0,82	9,2%
6	75	14,50	1,29	8,9%

14.4. Linearità

La linearità è stata valutata secondo le linee guida basate su CLSI EP-06, "Evaluation of the Linearity of Quantitative Measurement Procedures". Per la concentrazione di 17-OH progesterone mediante il test 17-OH Progesterone ELISA, la procedura di misurazione mostra linearità per l'intervallo da 0,2 a 17,22 ng/mL entro la deviazione ammissibile di linearità (ADL) di $\pm 15\%$.

14.5. Confronto del metodo

Il test 17-OH Progesterone ELISA è stato confrontato con un metodo LC-MS/MS disponibile in commercio seguendo la procedura CLSI EP-9A, "Method Comparison and Bias Estimation Using Patient Samples". Ogni metodo ha esaminato un totale di 120 campioni, selezionati per rappresentare un ampio intervallo di concentrazioni di 17-OH Progesterone. L'analisi di regressione di Passing-Bablok è stata effettuata su dati comparativi:

n	Pendenza [IC 95%]	Intercetta (ng/mL) [IC 95%]	Coefficiente di correlazione (r)
120	0,91 [0,87 to 0,97]	0,21 [0,16 to 0,28]	0,99

14.6. Cross-reattività

La specificità è stata valutata con i seguenti reagenti crociati:

Reagente crociato	Concentrazione testata (unità)	Reattività crociata media %
11-deossicortisolo	80 ng/mL	2,15%
Progesterone	2.000 ng/L	0,47%
Pregnenolone	2.000 ng/mL	0,15%
Testosterone	2.000 ng/mL	0,07%
17 β -Estradiolo	2.000 ng/mL	0,01%
Aldosterone	2.000 ng/mL	0,00%
Estriolo	2.000 ng/mL	0,00%
Estrone-3-solfato	2.000 ng/mL	0,00%
Spironolaztone	2.000 ng/mL	0,00%
Androstenedione	2.000 ng/mL	0,05%
Androsterone	2.000 ng/mL	0,04%
Corticosterone	2.000 ng/mL	0,09%
Cortisolo	2.000 ng/mL	0,10%
Cortisone	2.000 ng/mL	0,07%
DHEA	2.000 ng/mL	0,07%
DHEA-S	20.000 ng/mL	0,01%
DHT	2.000 ng/mL	0,04%
Prednisolone	3.000 ng/mL	0,02%
Prednisone	2.000 ng/mL	0,01%

14.7. Interferenza

Le seguenti sostanze non interferiscono con un bias $> \pm 15\%$ nel test 17-OH Progesterone ELISA quando le concentrazioni sono inferiori alla soglia dichiarata presentata nella tabella seguente.

Sostanza	Concentrazione soglia
Bilirubin, coniugada	20 mg/dL
Bilirubina, non coniugada	20 mg/dL
Hemoglobina	200 mg/dL
Trigliceridi	600 mg/dL

14.8. Studio su siero-plasma

È stato condotto uno studio di confronto tra matrici del test 17-OH Progesterone ELISA per valutare la differenza tra i tipi di provette (provette per la separazione del siero (SST), per plasma in litio eparina, per plasma in sodio eparina e plasma in K2 EDTA) rispetto ai campioni di controllo (siero tappo rosso, senza additivo) secondo le linee guida CLSI (EP9-A). È stato valutato un totale di 27 campioni (23 nativi, 4 additivati) per coprire l'intervallo. L'analisi di regressione di Passing-Bablok è stata effettuata su dati comparativi:

Tipo di campione	Pendenza [IC 95%]	Intercetta (ng/mL) [IC 95%]	Coefficiente di correlazione (r)
SST	1,02 [0,91 to 1,13]	-0,03 [-0,21 to 0,11]	0,99
Litio eparina	1,00 [0,87 to 1,04]	0,00 [-0,07 to 0,08]	0,99
Sodio eparina	1,00 [0,94 to 1,10]	-0,02 [-0,14 to 0,03]	0,99
EDTA	1,04 [0,90 to 1,12]	-0,03 [-0,19 to 0,09]	0,99

15. LIMITAZIONI

- Come nel caso di qualsiasi procedura diagnostica, i risultati devono essere interpretati unitamente ai dati clinici del paziente e alle altre informazioni a disposizione del medico.
- Gli anticorpi eterofili nel siero umano possono reagire con le immunoglobuline dei reagenti, interferendo con gli immunodosaggi in vitro⁹. I pazienti regolarmente esposti agli animali o a prodotti derivati da siero animale possono essere soggetti a questa interferenza, quindi si potrebbero osservare valori anomali.

16. PRECAUZIONI E AVVERTENZE

- La procedura analitica, le informazioni, le precauzioni e le avvertenze contenute nelle istruzioni per l'uso devono essere seguite scrupolosamente. L'uso dei kit con analizzatori e attrezzature similari deve essere previamente convalidato. Qualunque cambiamento nello scopo, nel progetto, nella composizione o struttura e nella procedura analitica, così come qualunque uso dei kit in associazione ad altri prodotti non approvati dal produttore non è autorizzato; l'utilizzatore stesso è responsabile di questi eventuali cambiamenti. Il produttore non è responsabile per falsi risultati e incidenti che possano essere causati da queste ragioni. Il produttore non è responsabile per qualunque risultato ottenuto attraverso esame visivo dei campioni dei pazienti.
- Solo per uso diagnostico in-vitro da eseguire da parte di personale esperto. Non per uso interno o esterno su esseri umani o animali.
- Utilizzare adeguati dispositivi di protezione individuale durante il lavoro con i reagenti forniti.
- Tutto il materiale di origine umana utilizzato nella preparazione dei reagenti è stato testato e risultato negativo per gli anticorpi dell'HIV 1 e 2, HbsAg e HCV. Nessun metodo di prova, tuttavia, può offrire la completa garanzia che HIV, HBV, HCV o altri agenti infettivi siano assenti. Pertanto, i calibratori e i controlli devono essere manipolati allo stesso modo del materiale potenzialmente infettivo.
- Materiali di origine animale usati per la preparazione di questo kit sono stati ottenuti da animali sani e le proteine bovine sono state ottenute da paesi non affetti da BSE, ma comunque questi materiali dovrebbero essere usati come potenzialmente contagiosi.
- Non scambiare reagenti e micropiastre di lotti diversi.
- Non utilizzare reagenti di altri produttori insieme con i reagenti di questo kit.
- Non usare dopo la data di scadenza indicata sull'etichetta.
- Utilizzare soltanto attrezzatura pulita.
- Non scambiare i tappi dei flaconi di reagenti per evitare la contaminazione crociata.
- Richiudere i flaconi immediatamente dopo l'uso per evitare la vaporizzazione e contaminazione microbica.
- Una volta aperti e dopo relativo stoccaggio verificare i reagenti per una loro eventuale contaminazione prima dell'uso.
- Qualora si utilizzi strumentazione automatica, è responsabilità dell'utilizzatore assicurarsi che il kit sia stato opportunamente validato. Per migliorare le prestazioni del kit su strumentazione automatica ELISA, si consiglia di aumentare il numero di lavaggi.
- Per evitare contaminazioni crociate e risultati erroneamente alti pipettare i campioni e reagenti con molta precisione nei pozzetti.
- Evitare l'esposizione del reattivo TMB alla luce solare diretta, metalli o ossidanti. No congelare la soluzione.
- Alcuni reagenti contengono piccole quantità di ProClin™ 300 come conservante. Evitare il contatto con la pelle e le mucose.

- Il TMB Substrato contiene un irritante, che può essere dannoso se inalato, ingerito o assorbito attraverso la cute. Per prevenire lesioni, evitare l'inalazione, l'ingestione o il contatto con la cute e con gli occhi; inoltre, può reagire con le tubature di piombo o rame per formare azoturi metallici potenzialmente esplosivi. Se si utilizza un lavandino per rimuovere i reagenti, lavare con abbondante acqua per evitare l'accumulo di azoturi.
- La Stop Solution è costituita da una soluzione di acido solforico diluito. L'acido solforico è velenoso e corrosivo e può essere tossico se ingerito. Per prevenire possibili ustioni chimiche, evitare il contatto con la cute e con gli occhi.
- La somministrazione di steroidi naturali o sintetici può alterare i livelli ematici di 17-OH Progesterone.
- L'ELISA è progettato solo per il personale qualificato che segue le norme di buona pratica di laboratorio (Good Laboratory Practice, GLP).

ATTENZIONE: L'acido solforico irrita occhi e pelle! Dopo il contatto sciacquare immediatamente e abbondantemente. Contattare un medico.

16.1. Smaltimento

I residui di prodotti chimici e preparati sono generalmente considerati come rifiuti pericolosi. Lo smaltimento di questo tipo di rifiuti è regolato da leggi e regolamenti nazionali e regionali. Contattare le autorità locali o le società di gestione dei rifiuti che daranno consigli su come smaltire i rifiuti pericolosi.

Per informazioni sui materiali d'imballaggio fare riferimento a MATERIALI D'IMBALLAGGIO.

17. INFORMAZIONI PER GLI ORDINI

REF	DNOV004	17-OH Progesterone	(96 determinazioni)
------------	---------	--------------------	---------------------

ESPAÑOL

1. INTRODUCCIÓN

La progesterona 17-OH (17-OH P) es un producto intermedio importante de la biosíntesis de esteroides. Los niveles elevados de 17-OH P están vinculados a un mal funcionamiento de la vía de biosíntesis de esteroides que deriva en un exceso de andrógenos. Por tanto, las mediciones de 17-OH P son útiles para el diagnóstico diferencial de las afecciones clínicas asociadas a un fenotipo hiperandrogénico y vinculado a disfunciones suprarrenales en ambos sexos.

La hiperplasia adrenal congénita (CAH) es un grupo de trastornos recesivos autosómicos que se caracteriza por una disfunción de la síntesis de cortisol¹⁻⁴. La causa predominante de la afección (95 % de los casos) son mutaciones del gen CYP21A2, el cual codifica el esteroide adrenal 21-hidroxilasa. La 21-hidroxilasa se encarga de la conversión de la 17-OHP en 11-desoxicortisol y de la progesterona en desoxicorticosterona. Una evaluación de los niveles de 17-OH P ofrece información que respalda el diagnóstico diferencial de la CAH derivada de mutaciones de los genes que intervienen en la síntesis del cortisol a partir de mutaciones del gen CYP21A2.

La medición de la 17-OH P también se considera un pilar útil del diagnóstico de otros trastornos caracterizados por el hiperandrogenismo, como el síndrome de ovario poliquístico (PCOS)⁵ y el hirsutismo en mujeres, la pubertad precoz⁶ y la adrenarquia precoz. La determinación de los niveles de 17-OH se utiliza en esos casos para excluir el diagnóstico de la CAH y la CAH no clásica.

A los pacientes afectados de CAH se les tratará con glucocorticoides y mineralcorticoides. El tratamiento con glucocorticoides es de especial importancia para evitar las crisis adrenales y la virilización derivadas de una síntesis excesiva de andrógenos^{2,4,7}. Como la finalidad de los tratamientos con glucocorticoides no es la supresión completa de la síntesis de 17-OHP, es importante asegurarse de supervisar debidamente el tratamiento a fin de evaluar la posología correcta de los fármacos. Esto se hace mediante la evaluación regular de los niveles de 17-OH P (y androstenediona) como indicadores tradicionales de la idoneidad del tratamiento con glucocorticoides en la CAH⁵.

2. USO PREVISTO

Método colorimétrico inmunoenzimático competitivo (ELISA) para la determinación cuantitativa de 17-OH Progesterone en suero o plasma humano (obtenido de heparina de litio, heparina de sodio o EDTA de potasio).

3. PRINCIPIO DEL ENSAYO

Tiras de pozos de micro titulación son pre cubiertos con anticuerpos anti-17-OH progesterona (fase sólida). La 17-OH progesterona en la muestra compite con la 17-OH progesterona conjugada con peroxidasa de rábano picante (antígeno marcado enzimáticamente) por la unión a los anticuerpos. Después de la incubación una separación de lo unido/libre es realizada a la fase sólida mediante lavado. El complejo inmune formado por el antígeno marcado enzimáticamente se visualiza mediante la adición del sustrato Tetrametilbenzidina (TMB) el cual genera un producto de reacción azul. La intensidad de este producto es **inversamente** proporcional a la cantidad de 17-OH progesterona en la muestra. Se adiciona ácido sulfúrico para detener la reacción. Esto produce un color de punto final amarillo. La absorción a 450 nm se lee usando un lector de placa de micro pozos de ELISA.

4. MATERIALES

4.1. Reactivos suministrados

- **Anti-17-OH progesterone Microplaca recubierta:** 12 tiras separadas rompibles de 8 pozos recubiertas con anticuerpos anti-17-OH progesterona; en bolsa de aluminio resellable.
- **Solución de parada:** 1 botella contiene 15 mL de ácido sulfúrico, 0,15 mol/L (evitar cualquier contacto con la piel).
- **17-OH progesterone-HRP Conjugado:** 1 botella contiene 22 mL de 17-OH progesterona conjugada con peroxidasa de rábano picante.
- **Solución sustrato TMB:** 1 botella contiene 15 mL 3,3', 5,5'-tetramethylbenzidine (H₂O₂-TMB 0,26 g/L) (evitar cualquier contacto con la piel).
- **Solución de lavado concentrada 10x:** 1 vial de 50 mL tampón fosfato 0,2 M, Proclin < 0,0015 %
- **Control A 17-OH Progesterone:** 1 botella contiene 1 mL de una solución de control específica de lote lista para usar. La concentración está marcada en la etiqueta.
- **Control B 17-OH Progesterone:** 1 botella contiene 1 mL de una solución de control específica de lote lista para usar. La concentración está marcada en la etiqueta.
- **Estándares 17-OH Progesterone:** 6 botellas, 1 mL cada una
 - Estándar 0: 0,0 ng/mL
 - Estándar 1: 0,2 ng/mL
 - Estándar 2: 0,6 ng/mL
 - Estándar 3: 2,0 ng/mL
 - Estándar 4: 6,0 ng/mL
 - Estándar 5: 16,0 ng/mL

4.2. Materiales suministrados

- 1 lámina autoadhesiva
- 1 instrucciones de uso

4.3. Materiales e instrumentos necesarios

- Lector de placa de micro pozos de ELISA, equipado para la medición de absorbancias a 450 nm, 620-630 nm
- Equipo manual o automático para el lavado de pozos
- Pipetas para medir volúmenes entre 10 y 1000 µL
- Vortex mezclador de tubos
- Agua destilada
- Tubos desechables
- Cronómetro

5. ESTABILIDAD Y ALMACENAMIENTO

Almacene todos los reactivos a 2...8 °C en la oscuridad; el kit es estable hasta la fecha de caducidad indicada en la etiqueta y en el Certificado de Análisis. Evite utilizar el kit o sus componentes después de la fecha de caducidad. Una vez abierto, el kit es estable 6 meses cuando se almacena a 2...8 °C.

6. PREPARACION DE LOS REACTIVOS

¡Es muy importante llevar todos los reactivos, muestras y estándares a temperatura ambiente (22...28 °C) durante al menos 30 minutos antes de empezar la corrida! ¡Al final del ensayo inmediatamente poner todos los reactivos a 2...8 °C para evitar largos periodos a temperatura ambiente!

6.1. Tiras rompibles recubiertas

Las tiras rompibles separadas listas para usar están recubiertas con anticuerpos anti-17-OH progesterona. Almacenar a 2...8 °C. Abrir la bolsa solo cuando estén a temperatura ambiente. Inmediatamente después de remover las tiras, las tiras restantes deberán guardarse en la bolsa de aluminio junto con el desecante suministrado y almacenarse a 2...8 °C; la estabilidad es hasta la fecha de expiración.

6.2. Conjugado

El conjugado 17-OH progesterona es una solución lista para usar.

6.3. Estándares

Los estándares están listos para usar y tienen las siguientes concentraciones de 17-OH progesterona:

Estándar 0:	0,0 ng/mL
Estándar 1:	0,2 ng/mL
Estándar 2:	0,6 ng/mL
Estándar 3:	2,0 ng/mL
Estándar 4:	6,0 ng/mL
Estándar 5:	16,0 ng/mL

Después del primer uso, los estándares son todavía estables por otros 6 meses si se almacenan a 2...8 °C, pero no más allá de la fecha de caducidad indicada del kit.

6.4. Controles

Los frascos contienen cada 1 mL de una solución de control específica del lote, lista para usar. La concentración se indica en la etiqueta.

6.5. Solución sustrato TMB

La botella contiene 15 mL de un sistema de Tetrametilbenzidina/Peróxido de Hidrógeno. El reactivo está listo para usar y debe ser almacenado a 2...8 °C en la oscuridad. *La solución debe ser incolora o puede tener una ligera tinción azul. Si el sustrato se vuelve azul, este puede haberse contaminado y debe ser descartado.*

6.6. Solución de Parada

La botella contiene 15 mL de solución de ácido sulfúrico 0,15 M. Solución lista para usar debe ser almacenada a 2...8 °C.

6.7. Solución de lavado

Diluir la solución de lavado concentrada con agua destilada para alcanzar un volumen final de 500 mL antes de emplearla. Para volúmenes más pequeños, asegúrese de respetar una relación de 1:10. La solución de lavado diluida es estable durante 30 días si se almacena a 2...8 °C. En la solución de lavado concentrada es posible observar la presencia de cristales. En ese caso, agitar a temperatura ambiente hasta que los cristales se disuelvan por completo. Para una mayor precisión, diluir todo el frasco de la solución de lavado concentrada en 500 mL teniendo cuidado para transferir también los cristales y, a continuación, agitar hasta que se disuelvan por completo.

7. RECOLECCION DE MUESTRAS Y PREPARACION

Usar muestras de suero o plasma humano (obtenido de heparina de litio, heparina de sodio o EDTA de potasio). Si el ensayo se realiza dentro de 4 días (96 horas) después de la toma de sangre, las muestras pueden ser almacenadas de 2...8 °C, en caso contrario deben ser alicotadas y almacenadas congeladas. Agitar bien las muestras descongeladas antes de diluirlas. Evitar congelaciones y descongelaciones repetidas. No se recomienda la inactivación por calor de las muestras.

8. PROCEDIMIENTO DEL ENSAYO

8.1. Preparación de la prueba

Por favor, leer cuidadosamente las instrucciones de uso del ensayo **antes** de realizar el ensayo. Para el buen funcionamiento de la técnica es necesario seguir las instrucciones. Antes de comenzar, especificar exactamente la repartición y posición de las muestras y de los estándares/controles. Seleccione el número necesario de tiras de microtitulación o pozos e insértelos en el soporte. El pipeteo de muestras no debe tomar más de diez minutos para evitar la deriva del análisis. Si utiliza más de una placa, se recomienda repetir la curva dosis-respuesta. Por favor, destinar al menos:

1 pozo	(ej. A1)	para el blanco
2 pozos	(ej. B1+C1)	para estándar 0
2 pozos	(ej. D1+E1)	para estándar 1
2 pozos	(ej. F1+G1)	para estándar 2
2 pozos	(ej. H1+A2)	para estándar 3
2 pozos	(ej. B2+C2)	para estándar 4
2 pozos	(ej. D2+E2)	para estándar 5
2 pozos	(ej. F2+G2)	para control A
2 pozos	(ej. H2+A3)	para control B

Es necesario determinar los estándares/controles y las muestras de pacientes por duplicado.

Realizar todos los pasos del ensayo en el orden dado y sin ningún retraso apreciable entre los pasos.

Se debe usar una punta limpia y desechable para el dispensado de cada estándar y de cada muestra de paciente.

1. Dispensar 25 µL de estándares, control y muestras en los respectivos pozos. Dejar el pozo A1 para el blanco de sustrato.
2. Adicionar 200 µL de conjugado 17-OH progesterona-HPR a cada pozo. Dejar el pozo A1 para el blanco de sustrato.
3. Cubrir los pozos con la lámina autoadhesiva suministrado
4. en el kit.
5. **Incubar por 1 hora a 37 °C.**
6. Una vez finalizada la incubación, retire la lámina autoadhesiva, aspire el contenido de los pocillos y lave cada pocillo 6 veces con 300 µl de solución de lavado diluida. Evite el desbordamiento de los pozos de reacción. Durante cada paso de lavado, agitar suavemente la placa durante 5 segundos y eliminar el exceso de solución golpeando la placa invertida sobre una toalla de papel absorbente.
Nota: ¡El lavado es crítico! Lavados insuficientes resultan en baja precisión y valores de absorbancia falsamente elevados.
7. Dispensar 100 µL de solución sustrato TMB en todos los pozos.
8. **Incubar por exactamente 15 minutos a temperatura ambiente (22...28 °C) en la oscuridad.**
9. Dispensar 100 µL de solución de parada en todos los pozos en el mismo orden y a la misma velocidad que para la Solución de Sustrato TMB. Mezclar suavemente la microplaca.
Cualquier color azul desarrollado durante la incubación se volverá amarillo.
10. Agitar la microplaca suavemente. Leer la absorbancia (E) a 450 nm frente a una longitud de onda de referencia de 620-630 nm o contra el blanco dentro de los primeros 5 minutos.

8.2. Medición

Ajustar el lector de placa de micro pozos ELISA a cero usando el blanco de sustrato en el pozo A1.

¡Si - por razones técnicas - el lector de ELISA no se puede ajustar a cero con el blanco del sustrato en el pozo A1, restar el valor de absorbancia del pocillo A1 de todos los otros valores de absorbancia medidos con el fin de obtener resultados fiables!

Medir la absorbancia de todos los pozos a 450 nm y anotar los valores de absorbancia de cada estándar y muestra de paciente.

Donde aplique calcular la media de los valores de absorbancia para todos los duplicados.

9. CÁLCULO DE RESULTADOS

Hay disponibles diversos paquetes de software de reducción de datos que se pueden utilizar para generar el promedio de la curva de calibración y para calcular el promedio de las concentraciones de muestras y controles desconocidos. **Es necesario** un ajuste de curva logístico de 4 parámetros (4PL), **incluido el Estándar 0**.

También se puede preparar una curva de calibración en papel semilogarítmico mediante el trazado de la absorbancia media en el eje Y frente a la concentración de analitos en el eje X. El Estándar 0 debe incluirse en la curva de calibración. Lea el valor de absorbancia medio de cada muestra desconocida que se encuentra fuera de la curva.

10. CONTROL DE CALIDAD

Las buenas prácticas de laboratorio (BPL) requieren el uso de muestras de control de calidad en cada serie de ensayos para comprobar el rendimiento del ensayo. Los controles deberán tratarse como muestras desconocidas y los resultados deberán analizarse con métodos estadísticos adecuados. Los controles incluidos en el kit deberán ser probados como desconocidos y están destinados a ayudar a evaluar la validez de los resultados obtenidos con cada placa de ensayo.

Recomendamos a los usuarios mantengan registros gráficos de los valores de control que se generan con cada ensayo, incluida la media de ejecución, la DE (desviación estándar) y el % CV. Esta información facilitará los ensayos de tendencia de los controles relacionados con el rendimiento de lotes. La tendencia facilitará la identificación de los análisis que generan valores de control significativamente distintos de su intervalo medio.

Al interpretar los datos de control, los usuarios deberán tener en cuenta que este producto fue diseñado y desarrollado como un producto manual. El rango establecido en el *Certificate of Analysis (CoA)* deberá ser adecuado para los ensayos que se realizan manualmente y en estricto cumplimiento del procedimiento de ensayo anteriormente descrito. Los profesionales del control de calidad reconocen que, como resultado de las diferencias en las condiciones y en las prácticas, siempre habrá variaciones en los valores medios y en la precisión de las mediciones de control entre distintos laboratorios⁹.

11. INTERVALO DE MEDICIÓN

El rango de medición del ensayo (AMR) es de 0,26–16 ng/mL.

Cualquier valor que sea inferior a 0,26 ng/mL debe informarse como “<0,26 ng/mL”. Cualquier valor que sea superior a 16 ng/mL debe informarse como “>16 ng/mL”.

12. METROLOGÍA Y TRAZABILIDAD

El 17-OH Progesterone ELISA ha sido estandarizado con respecto a los estándares de referencia internos (matriz de suero), cuyo valor ha sido asignado a un método LC-MS/MS disponible.

13. VALORES ESPERADOS

Los rangos siguientes se determinaron usando el 17-OH Progesterone ELISA y se facilitan solo con fines informativos. El intervalo de referencia del 95 % para adultos aparentemente sanos se calcularon mediante un método no paramétrico siguiendo la orientación de CLSI C28-A “Defining, Establishing and Verifying Reference Intervals in the Clinical Laboratory”.

		n°	Mediana (ng/mL)	Intervalo de referencia (ng/mL)
MUJERES	fase luteínica	123	0,45	< LoQ - 2,19
	fase folicular	122	0,32	< LoQ - 2,10
	postmenopáusica	122	<LoQ	< LoQ - 0,95
HOMBRES		122	0,75	< LoQ - 1,97
NIÑOS (3–18 años)		124	<LoQ	< LoQ - 1,48

Los rangos anteriores deberán ser considerados como directrices solamente; se recomienda que cada laboratorio establezca su propio rango previsto en función de su propia población de pacientes.

14. CARACTERÍSTICAS ESPECÍFICAS DE DESEMPEÑO

14.1. Capacidad de detección

El límite de blanco (LoB), el límite de detección (LoD) y el límite de cuantificación (LoQ) se determinaron con orientación del documento CLSI EP17-A, “Protocols for Determination of Limits of Detection and Limits of Quantitation, usando 6 blancos y 6 muestras de bajo nivel.

Sensibilidad	Concentración
Límite de blanco (LoB)	0,02 ng/mL
Límite de detección (LoD)	0,11 ng/mL
Límite de cuantificación (LoQ)	0,26 ng/mL

14.2. Veracidad

Se ha demostrado la veracidad mediante la comparación del método 17-OH Progesterone ELISA con un LC-MS/MS disponible en el mercado que utiliza muestras de donantes nativos; consulte la sección 14.5.

14.3. Precisión

La precisión de 17-OH Progesterone ELISA se determinó mediante la realización de un estudio de precisión complejo.

Repetibilidad (en el laboratorio)

Se analizaron un total de 6 muestras de suero en 5 réplicas, una vez al día durante 5 días por 3 operadores.

A continuación se muestran los datos de un lote representativo:

Muestra	n	Conc. media (ng/mL)	Intra-test (repetibilidad)	
			DE	CV%
1	75	0,90	0,10	11,4%
2	75	1,45	0,15	10,0%
3	75	2,10	0,20	9,3%
4	75	5,14	0,49	9,5%
5	75	8,94	0,74	8,3%
6	75	14,50	1,11	7,6%

Reproducibilidad

Se analizaron un total de 6 muestras de suero en 5 réplicas, una vez al día durante 5 días por 3 operadores.

A continuación se muestran los datos de un lote representativo:

Muestra	n	Conc. media (ng/mL)	En el laboratorio (reproducibilidad)	
			DE	CV%
1	75	0,90	0,12	13,0%
2	75	1,45	0,17	11,6%
3	75	2,10	0,23	11,1%
4	75	5,14	0,55	10,7%
5	75	8,94	0,82	9,2%
6	75	14,50	1,29	8,9%

14.4. Linealidad

La linealidad se evaluó en base a CLSI EP-06, "Evaluation of the Linearity of Quantitative Measurement Procedures". Para la concentración de progesterona 17-OH mediante 17-OH Progesterone ELISA, la medición muestra linealidad para el intervalo de 0,2 a 17,22 ng/mL dentro de la desviación de linealidad permitida (ADL) de ± 15 %.

14.5. Comparación de métodos

El 17-OH Progesterone ELISA se comparó con un método LC-MS/MS disponible en el mercado de conformidad con CLSI EP-9A, "Method Comparison and Bias Estimation Using Patient Samples". Con cada método se realizó el ensayo de un total de 120 muestras seleccionadas para representar un amplio intervalo de concentraciones de progesterona 17OH. Se realizó el análisis de regresión de Passing y Bablock en los datos comparativos:

n	Pendiente [IC del 95%]	Intersección (ng/mL) [IC del 95%]	Coefficiente de correlación (r)
120	0,91 [0,87 to 0,97]	0,21 [0,16 to 0,28]	0,99

14.6. Reactividad cruzada

La especificidad analítica se evaluó con los siguientes reaccionantes cruzados.

Reagente crociato	Concentrazione testata (unità)	Reattività crociata promedio en %
11-deossicortisol	80 ng/mL	2,15%
Progesterona	2.000 ng/L	0,47%
Pregnenolona	2.000 ng/mL	0,15%
Testosterona	2.000 ng/mL	0,07%
17 β -Estradiol	2.000 ng/mL	0,01%
Aldosterona	2.000 ng/mL	0,00%
Estriolo	2.000 ng/mL	0,00%
Estrona-3-sulfato	2.000 ng/mL	0,00%
Espironolazona	2.000 ng/mL	0,00%
Androstenediona	2.000 ng/mL	0,05%
Androsterona	2.000 ng/mL	0,04%
Corticosterona	2.000 ng/mL	0,09%

Reagente crociato	Concentrazione testata (unità)	Reattività crociata promedio en %
Cortisol	2.000 ng/mL	0,10%
Cortisona	2.000 ng/mL	0,07%
DHEA	2.000 ng/mL	0,07%
DHEA-S	20.000 ng/mL	0,01%
DHT	2.000 ng/mL	0,04%
Prednisolona	3.000 ng/mL	0,02%
Prednisona	2.000 ng/mL	0,01%

14.7. Interferencia

Las siguientes sustancias no interfieren con un sesgo de $> \pm 15\%$ en la 17-OH Progesterone ELISA cuando las concentraciones están por debajo del umbral indicado presentado en la siguiente tabla.

Sustancia	Concentración
Bilirrubina, conjugada	20 mg/dL
Bilirrubina, no conjugada	20 mg/dL
Hemoglobina	200 mg/dL
Triglicéridos	600 mg/dL

14.8. Estudio del tipo de muestra

El estudio de comparación de la matriz de 17-OH Progesterone ELISA se realizó para evaluar la diferencia entre los tipos de tubos (tubos separadores de suero [SST], plasma de heparina de litio, plasma de heparina sódica y plasma K2 EDTA) frente a las muestras de control (tapón rojo para suero, sin aditivos) siguiendo las directrices CLSI (EP9-A). Se evaluó un total de 27 muestras (23 nativas, 4 con aditivos) para cubrir el intervalo. Se realizó el análisis de regresión de Passing y Bablock en los datos comparativos:

Tipo di muestra	Pendiente [IC de 95%]	Intersección (ng/mL) [IC 95%]	Coefficiente de correlación (r)
SST	1,02 [0,91 to 1,13]	-0,03 [-0,21 to 0,11]	0,99
Litio eparina	1,00 [0,87 to 1,04]	0,00 [-0,07 to 0,08]	0,99
Sodio eparina	1,00 [0,94 to 1,10]	-0,02 [-0,14 to 0,03]	0,99
EDTA	1,04 [0,90 to 1,12]	-0,03 [-0,19 to 0,09]	0,99

15. LIMITACIONES DEL ENSAYO

- Como en cualquier procedimiento diagnóstico, los resultados se deberán interpretar junto con los hallazgos clínicos del paciente y otra información de la que el médico disponga.
- Los anticuerpos heterofílicos en el suero humano pueden presentar reacciones con las inmunoglobulinas reactivas, que interfieren con los inmunoensayos in vitro⁹. Los pacientes que se exponen habitualmente a animales o a productos de suero animal pueden ser propensos a esta interferencia y puede que se observen valores anómalos.

16. PRECAUCIONES Y ADVERTENCIAS

- El procedimiento de la prueba, la información, las precauciones y advertencias en las instrucciones para uso deben ser estrictamente seguidas. El uso de los kits de prueba con analizadores y equipos similares debe ser validado. Cualquier cambio en el diseño, composición y procedimiento del test así como cualquier uso en combinación con otros productos no aprobados por el fabricante no está autorizado; el usuario es responsable por tales cambios. El fabricante no es responsable por falsos resultados e incidentes por estas razones. El fabricante no es responsable de cualquier resultado por análisis visual de las muestras de pacientes.
- Utilice el equipo de protección personal adecuado mientras trabaja con los reactivos suministrados
- Solo para uso diagnóstico in-vitro por personal experto. No es para uso interno o externo en humanos o animales.
- Todos los componentes de origen humano usados para la producción estos reactivos han sido probados para anticuerpos anti-VIH 1+2, anticuerpos anti-VHC y HBsAg y se han encontrado como no reactivos. Sin embargo, todos los materiales deben ser considerados y manipulados como potencialmente infecciosos.
- Materiales de origen animal utilizados para la elaboración de este kit se obtuvieron a partir de animales sanos y las proteínas de bovino se obtuvieron de los países no afectados por la EEB, aun así estos materiales se deben manejar como potencialmente infecciosos.
- No intercambiar reactivos o tiras de diferentes lotes de producción.
- Reactivos de otros fabricantes no deben ser usados junto con reactivos de este kit de prueba.
- No usar reactivos después de la fecha de expiración marcada en la etiqueta.
- Usar solo puntas de pipeta, dispensadores y material de laboratorio limpios.
- No intercambiar tapas rosca de viales de reactivos para evitar contaminación cruzada.

- Cerrar los viales de los reactivos herméticamente inmediatamente después del uso para evitar evaporación y contaminación microbiana.
- Si utiliza un equipo automático, es responsabilidad del usuario asegurar que la metodología aplicada haya sido debidamente validada. Para mejorar el rendimiento del kit en los sistemas automatizados de ELISA, se recomienda aumentar el número de lavados.
- Después de la primera apertura y subsecuente almacenamiento verificar los viales de controles y conjugado para contaminación bacteriana antes de uso futuro.
- Para evitar contaminación cruzada y resultados falsamente elevados pipetear las muestras de pacientes y dispensar el conjugado sin salpicaduras exactamente en el fondo de los pozos.
- No usar muestras fuertemente hemolizadas o altamente lipémicas.
- Se requiere máxima precisión para el dispensado de los reactivos.
- Evitar la exposición del sustrato TMB a la luz solar directa, metales u oxidantes. No congelar la solución.
- El sustrato TMB contiene una sustancia irritante que puede ser nociva si es inhalada, ingerida o absorbida por la piel. Para evitar lesiones, evite la inhalación, ingestión o contacto con la piel y los ojos; además, puede reaccionar con las tuberías de plomo o cobre para formar azidas metálicas potencialmente explosivas. Si elimina los reactivos en un fregadero, lávelos con gran cantidad de agua para evitar la acumulación de azida.
- La solución de parada consiste en una solución de ácido sulfúrico diluida. El ácido sulfúrico es venenoso y corrosivo y puede ser tóxico si es ingerido. Para evitar quemaduras, evite el contacto con la piel y los ojos.
- El tratamiento del paciente con cortisona, esteroides naturales o sintéticos pueden afectar la determinación de 17-OH progesterona.
- Algunos reactivos contienen pequeñas cantidades de Proclin 300™ como conservante. Evite el contacto con la piel o mucosas.
- El ELISA sólo está diseñado para personal cualificado siguiendo las normas de buenas prácticas de laboratorio (Good Laboratory Practice, GLP).

ADVERTENCIA: ¡El ácido sulfúrico irrita los ojos y la piel! Mantener fuera del alcance de los niños. ¡Si entra en contacto con los ojos, enjuagar exhaustivamente con agua y consultar con un médico!

16.1. Consideraciones de Eliminación

Los residuos de productos químicos y preparados se consideran generalmente como residuos peligrosos. La eliminación de este tipo de residuos está regulada por leyes y reglamentos nacionales y regionales. Póngase en contacto con las autoridades locales o con las empresas de gestión de residuos, que le asesorarán sobre cómo eliminar los residuos peligrosos.

Para obtener información sobre los materiales de embalaje, consulte MATERIALES DE EMBALAJE.

17. INFORMACION PARA PEDIDOS

REF	DNOV004	17-OH Progesterone	(96 Determinaciones)
------------	---------	--------------------	----------------------

PORTUGUÊS

1. INTRODUÇÃO

17-OH Progesterona (17-OH P) é um intermediário importante da biossíntese de esteróides. Níveis elevados de 17-OH P estão ligados à disfunção da via biossintética dos esteróides que leva a um excesso de androgênio. Portanto, as medidas de 17-OH P são úteis para o diagnóstico diferencial de condições clínicas relacionadas a um fenótipo hiperandrogênico e ligadas a disfunções supra-renais em ambos os sexos.

Hiperplasia Adrenal Congênita (CAH) é um grupo de desordens autossômicas recessivas caracterizadas por síntese de cortisol deficiente¹⁻⁴. A causa predominante da doença (95% dos casos) são mutações do gene CYP21A2 que codifica o esteróide adrenal 21-hidroxilase. A 21-hidroxilase é responsável pela conversão do 17-OH P em 11-deoxicortisol e progesterona em desoxicorticosterona. A avaliação dos níveis de 17-OH P fornece informações de apoio para o diagnóstico diferencial de CAH causado por mutações dos genes envolvidos na síntese do cortisol a partir de mutações do gene CYP21A2.

A medida do 17-OH P também é considerada útil para apoiar o diagnóstico de outras condições caracterizadas pelo hiperandrogenismo, tais como síndrome dos ovários policísticos (PCOS)⁵ e hirsutismo em mulheres, puberdade precoce⁶ e adrenarcho precoce. A determinação dos níveis de 17-OH P é usada em tais casos para excluir o diagnóstico de CAH e CAH não-clássica.

Os pacientes afetados pela HAC devem ser tratados com glicocorticóides e corticóides minerais. O tratamento com glicocorticóides é de particular importância para evitar crises adrenais e virilização devido à síntese excessiva de androgênio^{2,4,7}. Como o objetivo do tratamento com glicocorticóides não é a supressão completa da síntese de 17-OH P, é importante assegurar o monitoramento apropriado do tratamento para avaliar a dosagem correta dos medicamentos. Isso é gerenciado pela avaliação regular dos níveis de 17-OH P (e androstenedione) como indicadores tradicionais da adequação do tratamento com glicocorticóides no CAH⁵.

2. UTILIZAÇÃO PRETENDIDA

Método imunoenzimático colorimétrico competitivo (ELISA) para determinação quantitativa de 17-OH Progesterona em soro ou plasma humano (obtido por Lítio-heparina, Sódio-heparina ou potassium EDTA).

3. PRINCÍPIO DO ENSAIO

Os poços das tiras de microtitulação são pré-revestidos com anticorpos anti-17-OH progesterona (fase sólida). A 17-OH progesterona na amostra compete com a adição de peroxidase de rábano rotulada com 17-OH progesterona (antígeno marcado com enzima) para ligação de anticorpos. Após a incubação é realizada uma separação do conjugado não ligado através da lavagem da fase sólida. O complexo imunológico formado pelo antígeno marcado com enzima é visualizado pela adição de substrato de Tetramethylbenzidine (TMB) que dá um produto de reação azul. A intensidade deste produto é inversamente proporcional à quantidade de 17-OH progesterona na amostra. O ácido sulfúrico é adicionado para parar a reação. Isto produz uma cor amarela no ponto final. A absorção a 450 nm é lida utilizando um leitor de placas de micropoços ELISA.

4. MATERIAIS

4.1. Reagentes fornecidos

- **Poços revestidos com Anti-17-OH Progesterone:** 12 tiras de 8 poços separáveis revestidas com anticorpos anti-17-OH progesterona, em bolsas de alumínio seláveis.
- **Solução de Paragem:** 1 frasco contendo 15 mL de ácido sulfúrico; 0,15 mol/L (evitar qualquer contacto com a pele).
- **Conjugado de 17-OH Progesterone:** 1 frasco contendo 22 mL de 17-OH progesterona conjugada com peroxidase de rábano.
- **Solução de substrato TMB:** 1 frasco contendo 15 mL 3,3',5,5' tetrametilbenzidina (H_2O_2 -TMB 0,26g/l), evitar qualquer contacto com a pele.
- **Solução de lavagem conc.10x:** 1 frasco contendo 50 mL de uma solução concentrada 10x de tampão fosfato 0,2 M, Proclina < 0,0015%.
- **Controlo de 17-OH Progesterone A:** 1 frasco contendo 1 mL de solução de controlo específica por lote. A concentração está indicada no rótulo do frasco.
- **Controlo de 17-OH Progesterone B:** 1 frasco contendo 1 mL de solução de controlo específica por lote. A concentração está indicada no rótulo do frasco.
- **Calibradores de 17-OH Progesterone :** 6 frascos de 1 mL cada, com as seguintes concentrações:
 - Calibrador 0: 0 ng/mL
 - Calibrador 1: 0,2 ng/mL
 - Calibrador 2: 0,6 ng/mL
 - Calibrador 3: 2,0 ng/mL
 - Calibrador 4: 6,0 ng/mL
 - Calibrador 5: 16,0 ng/mL

4.2. Materiais fornecidos

- 1 Película de cobertura
- 1 Instruções de utilização

4.3. Materiais e Equipamento necessário

- Leitor de microplacas ELISA , equipado para medir absorvâncias a 450 nm, 620-630 nm
- Incubadora a 37 °C.
- Equipamento de lavagem de poços manual ou automático.
- Pipetas para medir volumes entre 10 e 1000 µL
- Misturador rotativo
- Água destilada.
- Tubos descartáveis
- Cronómetro

5. ESTABILIDADE E ARMAZENAMENTO

Armazene todos os reagentes a 2...8 °C no escuro; o kit é estável até a data de validade indicada no rótulo e no Certificado de Análise. Evite usar o kit ou seus componentes após a data de validade.

Uma vez aberto, o kit é estável 6 meses quando armazenado a 2...8 °C.

6. PREPARAÇÃO DOS REAGENTES

É muito importante que todos os reagentes, amostras e controlos atinjam a temperatura ambiente (20...28 °C) durante pelo menos 30 minutos antes de iniciar o teste! No final do ensaio, imediatamente armazenar os reagentes a uma temperatura de 2...8 °C; evitar a exposição prolongada à temperatura ambiente.

6.1. Tiras revestidas separáveis

As tiras separáveis são revestidas com o anticorpo anti- 17-OH progesterona e estão prontas a utilizar. Armazenar a 2...8 °C. Abrir a bolsa apenas quando esta estiver à temperatura ambiente. Após a retirada das tiras necessárias, fechar imediatamente as restantes no saco de alumínio com o desumidificante fornecido e armazenar a 2...8 °C; são estáveis até à data de validade.

6.2. Conjugado

O Conjugado 17-OH Progesterona-HRP está pronto para uso.

6.3. Calibradores

Os calibradores estão prontos para uso e têm a seguinte concentração de 17-OH progesterona:

Padrão 0: 0 ng/mL

Padrão 1: 0,2 ng/mL

Padrão 2: 0,6 ng/mL

Padrão 3: 2,0 ng/mL

Padrão 4: 6,0 ng/mL

Padrão 5: 16,0 ng/mL

Após a primeira utilização, os calibradores continuam a ser estáveis durante 6 meses se armazenados a 2...8 °C, mas não mais do que a data de validade do kit.

6.4. Controles

Os frascos contêm 1 mL de solução de controlo específica por lote. A concentração está indicada no rótulo.

6.5. Solução de Substrato TMB

O frasco contém 15 mL de uma mistura de tetrametilbenzidina e peróxido de hidrogénio. O reagente está pronto a ser utilizado e deve ser armazenado a 2...8 °C resguardado da luz. A solução deve ser incolor ou ter uma leve coloração azulada. Se o substrato ficar azul, pode ter sido contaminado e deve ser eliminado.

6.6. Solução de Paragem

O frasco contém 15 mL de solução de ácido sulfúrico 0,15 M. Esta solução está pronta para uso e deve ser armazenada a 2...8°C.

6.7. Solução de Lavagem

Antes de usar, dilua o conteúdo do tampão de lavagem concentrado 10X "com água destilada até um volume de 500 mL. Para preparar volumes menores, respeite a razão de diluição de 1:10. A solução de lavagem diluída é estável durante 30 dias a 2... 8 °C. Na solução de lavagem concentrada é possível observar a presença de cristais. Nesse caso, mexa à temperatura ambiente até que os cristais se dissolvam completamente. Para maior precisão, dilua o frasco inteiro da solução de lavagem concentrada em 500 mL, tomando cuidado para também transferir os cristais e, em seguida, agitar até que estejam completamente dissolvidos.

7. COLHEITA E PREPARAÇÃO DAS AMOSTRAS

Usar com este ensaio amostras de soro ou plasma humanos (obtido por Lithium-heparine, Sodium-heparine ou potassium EDTA). Se o ensaio for realizado dentro de 4 dias (96 horas) após colheita da amostra, o espécime deve ser mantido a 2...8 °C; caso contrário devem ser alicotadas e armazenadas congeladas (-70...-20 °C). Se as amostras forem armazenadas congeladas, misturar bem as amostras descongeladas antes de testar. Evitar congelar e descongelar repetidamente. Não é recomendada a inativação por calor das amostras.

8. PROCEDIMENTO DO ENSAIO

8.1. Preparação do teste

Por favor, ler atentamente as instruções de utilização **antes** de realizar o teste. A fiabilidade dos resultados depende da adesão estrita às instruções de utilização, conforme descritas. Antes de iniciar o teste, o plano de distribuição e identificação para todos as amostras e controlos deve ser cuidadosamente estabelecido. Selecione o número necessário de tiras ou poços de microtitulação e insira-os no suporte. A pipetagem das amostras não deve demorar além de dez minutos de modo evitar o desvio do ensaio. Se mais de uma placa for utilizada, recomenda-se repetir a curva de resposta da dose.

Por favor, alocar pelo menos:

1 poço (e.g. A1)	para o branco do substrato
2 poços (e.g. B1+C1)	para o calibrador 0
2 poços (e.g. D1+E1)	para o calibrador 1
2 poços (e.g. F1+G1)	para o calibrador 2
2 poços (e.g. H1+A2)	para o calibrador 3
2 poços (e.g. B2+C2)	para o calibrador 4
2 poços (e.g. D2+E2)	para o calibrador 5
2 poços (e.g. F2+G2)	para o controlo A
2 poços (e.g. H2+A3)	para o controlo B

É necessária a determinação duplicada dos calibradores, controlos e amostras do paciente.

Realizar todas as etapas do ensaio na ordem determinada e sem grandes atrasos entre as etapas.

Deve ser utilizada uma ponta descartável nova para cada calibrador e para cada amostra de doente.

1. Dispensar 25 µL dos calibradores, controlos e amostras nos poços respectivos. Deixar o poço A1 vazio para o branco do substrato.
2. Adicionar 200 µL de Progesterona 17-OH Conjugado de PRH a cada poço. Deixar o poço A1 para o substrato em branco.
3. Cobrir os poços com a película fornecida com o kit.
4. **Incubar durante 1 hora a 37 °C.**
5. Após a incubação, remover a película, aspirar o conteúdo dos poços e lavar cada poço 6 vezes com 300 µL de solução diluída de lavagem. Evitar que os poços de reacção transbordem. Durante cada ciclo de lavagem, agitar suavemente a placa por 5 segundos e remover o excesso da solução, batendo a placa invertida em um papel absorvente.

Nota: A lavagem é crítica! Lavagem insuficiente resulta em baixa precisão e valores de absorvância falsamente elevados.

6. Dispensar 100 µL de Solução de Substrato TMB em todos os poços.
7. **Incubar durante exactamente 15 minutos à temperatura ambiente (22...28 °C), no escuro.**
8. Dispensar 100 µL de Solução de Paragem em todos os poços, pela mesma ordem e à mesma velocidade a que foi dispensada a Solução de Substrato TMB. *Agitar suavemente a microplaca.*
A cor azul desenvolvida durante o período de incubação se transforma em amarelo.
9. Medir a absorvância (E) da amostra contra o branco a 450 nm contra um comprimento de onda de referência de 620-630 nm ou contra branco em 5 minutos.

8.2. Medição

Ajustar o Leitor de Microplacas ELISA a **zero** usando o **branco substrato no poço A1**.

Se - devido a razões técnicas – o leitor ELISA não puder ser ajustado a zero usando o branco substrato no poço A1, subtrair o valor da absorvância do poço A1 a todos os outros valores de absorvância medidos de forma a obter resultados fiáveis!

Medir a absorvância de todos os poços a **450 nm** e registar os valores da absorvância para cada calibrador e amostra.

Quando aplicável, calcular os **valores médios da absorvância** de todos os duplicados.

9. CÁLCULO DOS RESULTADOS

Uma variedade de pacotes software de redução de dados está disponível, que podem ser empregados para gerar a curva média de calibração e para calcular as concentrações médias de amostras e controlos desconhecidos. **É necessária** uma curva logística de 4 parâmetros (4PL) que se ajuste, **incluindo o Calibrador 0**.

Alternativamente, uma curva de calibração pode ser preparada em papel gráfico semi- logarítmico, traçando a absorção média no eixo Y contra a concentração de analito no eixo X. O Calibrador 0 deve ser incluído na curva de calibração. Leia o valor médio da absorvância de cada amostra desconhecida fora da curva.

10. CONTROLO DE QUALIDADE

As Boas Práticas de Laboratório (BPL) exigem a inclusão de amostras de controle de qualidade em cada série de ensaios para verificar o desempenho dos ensaios. Os controlos devem ser tratados como amostras desconhecidas e os resultados analisados com métodos estatísticos apropriados. Os controlos fornecidos no kit devem ser testados como se fossem desconhecidos e se destinam a facilitar a avaliação da validade dos resultados obtidos em cada placa de ensaio.

Recomendamos que os usuários mantenham registros gráficos dos valores de controle gerados com cada ensaio, incluindo meios de execução, desvio padrão (SD- Standard Deviations) ou e %CVs. Essas informações facilitarão a análise das tendências de controle relativas ao desempenho dos lotes. As tendências ajudarão a identificar os ensaios que geram valores de controle significativamente diferentes de sua respectiva faixa média.

Ao interpretar os dados de controle, os usuários devem observar que esse produto foi projetado e desenvolvido como um produto manual. A faixa indicada no *Certificate of Analysis (CoA)* deve ser apropriada para ensaios que são executados manualmente e com estrita adesão ao Procedimento de Ensaio descrito acima. É reconhecido por profissionais de Controle de Qualidade, que como resultado de diferenças nas condições e práticas, sempre haverá variabilidade nos valores médios e precisão das medidas de controle entre diferentes laboratórios⁸.

11. INTERVALO DE MEDIÇÃO

O intervalo de medição do teste (AMR) é de 0,26 - 16 ng/mL.

Qualquer valor que esteja abaixo de 0,26 ng/mL deve ser informado como "< 0,26 ng/mL". Qualquer valor acima de 16 ng/mL deve ser reportado como "> 16 ng/mL".

12. METROLOGIA E RASTREABILIDADE

A 17-OH Progesterone ELISA foi padronizada em relação aos padrões internos de referência (matriz de soro), os quais foram atribuídos valores a um método LC-MS/MS comercialmente disponível.

13. VALORES ESPERADOS

As seguintes faixas foram determinadas usando a 17-OH Progesterone ELISA e são fornecidas apenas a título de informação. O intervalo de referência de 95% para adultos aparentemente saudáveis foi calculado por um método não paramétrico seguindo a orientação do CLSI C28-A "Definindo, estabelecendo e verificando intervalos de referência no laboratório clínico".

		n°	Media (ng/mL)	Intervalo de referência (ng/mL)
MULHERES	fase luteínica	123	0,45	< LoQ - 2,19
	fase folicular	122	0,32	< LoQ - 2,10
	postmenopáusia	122	<LoQ	< LoQ - 0,95
HOMENS		122	0,75	< LoQ - 1,97
CRIANÇAS (3–18 anos)		124	<LoQ	< LoQ - 1,48

As faixas acima devem ser consideradas apenas como diretrizes; recomenda-se que cada laboratório estabeleça sua própria faixa esperada com base em sua própria população de pacientes.

14. CARACTERÍSTICAS DE DESEMPENHO ESPECÍFICAS

14.1. Capacidade de detecção

O limite de branco (LoB), limite de detecção (LoD) e limite de quantificação (LoQ) foram determinados com orientação do CLSI EP17-A, "Protocols for Determination of Limits of Detection and Limits of Quantitation", usando 6 espaços em branco e 6 amostras de baixo nível.

Sensibilidade	Concentração
Limite Branco (LoB)	0,02 ng/mL
Limite de Detecção (LoD)	0,11 ng/mL
Limite de Quantificação (LoQ)	0,26 ng/mL

14.2. Veracidade

A veracidade foi demonstrada através da comparação do método de 17-OH Progesterone ELISA com um LC MS/MS disponível comercialmente usando amostras de doadores nativos - consulte a seção 14.5.

14.3. Precisão

A precisão da 17-OH Progesterone ELISA foi determinada pela realização de um complexo estudo de precisão.

Repetibilidade (dentro do laboratório)

Um total de 6 amostras de soro foram analisadas em 5 réplicas, uma vez por dia, durante 5 dias, por 3 operadores. Apresentamos a seguir os dados de um lote representativo:

Amostra	n	Conc. Média (ng/mL)	Dentro de uma mesma série (repetibilidade)	
			Desvio padrão	CV%
1	75	0,90	0,10	11,4%
2	75	1,45	0,15	10,0%
3	75	2,10	0,20	9,3%
4	75	5,14	0,49	9,5%
5	75	8,94	0,74	8,3%
6	75	14,50	1,11	7,6%

Reprodutibilidade

Um total de 6 amostras de soro foram analisadas em 5 réplicas, uma vez por dia, durante 5 dias, por 3 operadores. Apresentamos a seguir os dados de um lote representativo:

Amostra	n	Conc. media (ng/mL)	Dentro do laboratório (reprodutibilidade)	
			Desvio padrão	CV%
1	75	0,90	0,12	13,0%
2	75	1,45	0,17	11,6%
3	75	2,10	0,23	11,1%
4	75	5,14	0,55	10,7%
5	75	8,94	0,82	9,2%
6	75	14,50	1,29	8,9%

14.4. Linearidade

A linearidade foi avaliada com base CLSI EP-06, "Evaluation of the Linearity of Quantitative Measurement Procedures. Para concentração de Progesterona 17-OH através do teste 17-OH Progesterone ELISA, o procedimento de medição mostra linearidade para o intervalo de 0,2 a 17,22 ng/mL dentro do desvio admissível de linearidade (ADL) de $\pm 15\%$.

14.5. Comparação de métodos

O 17-OH Progesterone ELISA foi comparado com um método LC-MS/MS comercialmente disponível, seguindo o CLSI EP-9A, "Method Comparison and Bias Estimation Using Patient Samples". Um total de 120 amostras, selecionadas para representar uma ampla gama de concentrações de Progesterona 17-OH, foi testado por cada método. A análise de regressão de Passing-Bablok foi feita com base nos dados comparativos:

N	Pendente [IC de 95%]	Intercepção (ng/mL) [IC de 95%]	Coefficiente de correlação (r)
120	0,91 [0,87 to 0,97]	0,21 [0,16 to 0,28]	0,99

14.6. Reatividade cruzada

A especificidade analítica foi avaliada com os seguintes reagentes cruzados.

Reagente crociato	Concentrazione testata (unità)	Reattività crociata media %
11-deossicortisol	80 ng/mL	2,15%
Progesterona	2.000 ng/L	0,47%
Pregnenolona	2.000 ng/mL	0,15%
Testosterona	2.000 ng/mL	0,07%
17 β -Estradiolo	2.000 ng/mL	0,01%
Aldosterona	2.000 ng/mL	0,00%
Estriolo	2.000 ng/mL	0,00%
Estrone-3-solfato	2.000 ng/mL	0,00%
Spironolaztona	2.000 ng/mL	0,00%
Androstenediona	2.000 ng/mL	0,05%
Androsterona	2.000 ng/mL	0,04%
Corticosterona	2.000 ng/mL	0,09%
Cortisol	2.000 ng/mL	0,10%
Cortisona	2.000 ng/mL	0,07%
DHEA	2.000 ng/mL	0,07%
DHEA-S	20.000 ng/mL	0,01%
DHT	2.000 ng/mL	0,04%
Prednisolone	3.000 ng/mL	0,02%
Prednisone	2.000 ng/mL	0,01%

14.7. Interferência

As seguintes substâncias não interferem com um viés de $> \pm 15\%$ na 17-OH Progesterone ELISA quando a concentrações estão abaixo do limite indicado apresentado na tabela abaixo:

Substância	Concentração do Limiar
Bilirubin, conjugada	20 mg/dL
Bilirubin, não conjugada	20 mg/dL
Hemoglobina	200 mg/dL
Triglicérides	600 mg/dL

14.8. Estudo do tipo de amostra

O estudo de comparação de matriz do 17-OH Progesterone ELISA foi feito para avaliar a diferença entre os tipos de tubos (tubos separadores de soro (SST), plasma de heparina de lítio, plasma de heparina de sódio e plasma K2 EDTA) versus as amostras de controle (soro tampa vermelha, sem aditivo) seguindo as diretrizes do CLSI (EP9-A). Um total de 27 amostras (23 nativas, 4 com aditivo) para cobrir o intervalo foram avaliadas. A análise de regressão de Passing-Bablok foi feita com base nos dados comparativos:

Amostra	Pendente [IC de 95%]	Intercepção (ng/mL) [IC de 95%]	Coefficiente de correlação (r)
SST	1,02 [0,91 to 1,13]	-0,03 [-0,21 to 0,11]	0,99
Lithium Heparin	1,00 [0,87 to 1,04]	0,00 [-0,07 to 0,08]	0,99
Sodium Heparin	1,00 [0,94 to 1,10]	-0,02 [-0,14 to 0,03]	0,99
EDTA	1,04 [0,90 to 1,12]	-0,03 [-0,19 to 0,09]	0,99

15. LIMITAÇÕES DO PROCEDIMENTO

- Como no caso de qualquer procedimento diagnóstico, os resultados devem ser interpretados em conjunto com a apresentação clínica do paciente e outras informações disponíveis para o médico.
- Os anticorpos heterofílicos no soro humano podem reagir com imunoglobulinas reagentes, interferindo com os imunoenaios in vitro. Pacientes expostos rotineiramente a animais ou a produtos de soro animal podem ser propensos a essa interferência e valores anômalos podem ser observados.

16. PRECAUÇÕES E AVISOS

- O procedimento de teste, as informações, as precauções e as advertências nas instruções de uso devem ser rigorosamente seguidas. O uso dos testkits com analisadores e equipamentos similares tem que ser validado. Qualquer alteração no projeto, composição e procedimento de teste, bem como para qualquer uso em combinação com outros produtos não aprovados pelo fabricante não é autorizada; o próprio usuário é responsável por tais alterações. O fabricante não se responsabiliza por resultados falsos e incidentes por estes motivos. O fabricante não se responsabiliza por quaisquer resultados através da análise visual das amostras dos pacientes.
- Somente para uso diagnóstico in-vitro por profissionais. Não para uso interno ou externo em humanos ou animais.
- Utilizar equipamentos de proteção individual apropriados enquanto estiver trabalhando com os reagentes fornecidos.
- Todos os componentes de origem humana utilizados para a produção destes reagentes foram testados para anticorpos anti-HIV 1+2, anticorpos anti-HCV e HBsAg e foram considerados como não reactivos. No entanto, todos os materiais ainda devem ser considerados e manipulados como potencialmente infecciosos.
- Não troque reagentes ou tiras de diferentes lotes de produção.
- Nenhum reagente de outros fabricantes deve ser usado junto com os reagentes deste kit de teste.
- Não use reagentes após a data de validade indicada no rótulo.
- Use apenas pontas de pipeta, dispensadores e artigos de laboratório limpos.
- Não troque as tampas de rosca dos frascos de reagentes para evitar contaminação cruzada.
- Feche bem os frascos de reagente imediatamente após o uso para evitar evaporação e contaminação microbiana.
- Após a primeira abertura e posterior armazenagem, verifique os frascos conjugados e controle de contaminação microbiana antes de continuar o uso.
- Ao utilizar equipamento automático, o usuário tem a responsabilidade de certificar-se de que o kit foi adequadamente testado. Para melhorar o desempenho do kit nos sistemas automáticos ELISA, é recomendável aumentar o número de lavagens.
- Para evitar contaminação cruzada e resultados falsamente elevados pipetar amostras de pacientes e dispensar conjugado sem salpicar com precisão até o fundo dos poços.
- Não utilizar amostras altamente hemolisadas ou altamente lipêmicas.
- É necessária a máxima precisão para a dispensação dos reagentes.
- O substrato da TMB contém um irritante, que pode ser prejudicial se inalado, ingerido ou absorvido através da pele. Para evitar lesões, evite inalação, ingestão ou contato com a pele e os olhos.

- A solução de parada consiste em uma solução diluída de ácido sulfúrico. O ácido sulfúrico é venenoso e corrosivo e pode ser tóxico se ingerido. Para evitar queimaduras químicas, evite o contato com a pele e os olhos.
- Evite a exposição do substrato de TMB à luz solar direta, metal ou oxidantes. Não congele a solução.
- O tratamento do paciente com cortisona, esteróides naturais ou sintéticos pode prejudicar a determinação da 17-OH Progesterona.
- Alguns reagentes contêm pequenas quantidades de Azida de Sódio ou Proclin 300™ como conservante. Evite o contato com a pele ou mucosa.
- A azida sódica pode ser tóxica se ingerida ou absorvida através da pele ou dos olhos: além disso, pode reagir com chumbo ou encanamento de cobre para formar azidas metálicas potencialmente explosivas. Se você usar uma pia para remover os reagentes, deixe passar por grandes quantidades de água para evitar a formação de azidas.
- O ELISA é projetado apenas para pessoal qualificado seguindo as normas de boas práticas de laboratório (Good Laboratory Practice, GLP).

AVISO: O ácido sulfúrico irrita os olhos e a pele. Manter fora do alcance das crianças. Ao entrar em contato com os olhos, enxágüe bem com água e consulte um médico!

16.1. Considerações de eliminação

Os resíduos de produtos químicos e preparações são geralmente considerados como resíduos perigosos. A eliminação deste tipo de resíduos é regulamentada através de leis e regulamentos nacionais e regionais. Contacte as suas autoridades locais ou empresas de gestão de resíduos que darão conselhos sobre como eliminar os resíduos perigosos.

Para informações sobre os materiais de embalagem, consulte MATERIAIS DE EMBALAGEM.

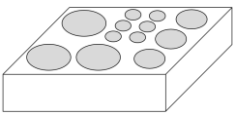
17. INFORMAÇÃO DE PEDIDO

REF	DNOV004	17-OH Progesterone	(96 Determinações)
------------	---------	--------------------	--------------------

BIBLIOGRAPHY / LITERATUR / BIBLIOGRAPHIE / BIBLIOGRAFIA / BIBLIOGRAFÍA / BIBLIOGRAFIA

1. Honour JW. 17-Hydroxyprogesterone in children, adolescents and adults. *Ann Clin Biochem*. 2014 Jul;51(Pt 4):424-40.
2. Speiser PW, Arlt W, Auchus RJ, Baskin LS, Conway GS, Merke DP, Meyer-Bahlburg HFL, Miller WL, Murad MH, Oberfield SE, White PC. Congenital Adrenal Hyperplasia Due to Steroid 21-Hydroxylase Deficiency: An Endocrine Society Clinical Practice Guideline. *J Clin Endocrinol Metab*. 2018 Nov 1;103(11):4043-4088.
3. Bornstein SR, Allolio B, Arlt W, Barthel A, Don-Wauchope A, Hammer GD, Husebye ES, Merke DP, Murad MH, Stratakis CA, Torpy DJ. Diagnosis and Treatment of Primary Adrenal Insufficiency: An Endocrine Society Clinical Practice Guideline. *J Clin Endocrinol Metab*. 2016 Feb;101(2):364-89.
4. Sharma R, Seth A. Congenital adrenal hyperplasia: issues in diagnosis and treatment in children. *Indian J Pediatr*. 2014 Feb;81(2):178-85.
5. Legro RS, Arslanian SA, Ehrmann DA, Hoeger KM, Murad MH, Pasquali R, Welt CK; Endocrine Society. Diagnosis and treatment of polycystic ovary syndrome: an Endocrine Society clinical practice guideline. *J Clin Endocrinol Metab*. 2013 Dec;98(12):4565-92.
6. Grandone A, Marzuillo P, Luongo C, Toraldo R, Mariani M, Miraglia Del Giudice E, Perrone L. Basal levels of 17-hydroxyprogesterone can distinguish children with isolated precocious pubarche. *Pediatr Res*. 2018 Oct;84(4):533-536.
7. Rachoń D. Differential diagnosis of hyperandrogenism in women with polycystic ovary syndrome. *Exp Clin Endocrinol Diabetes*. 2012 Apr;120(4):205-9.
8. Basic QC Practices On-line Course; <http://www.Westgard.com>.
9. Boscatto, LM. and Stuart, MC., 'Heterophilic antibodies: a problem for all immunoassays'. *Clin Chem*, 34, 1988, pp 27-33

PACKAGING MATERIALS/VERPACKUNGSMATERIALIEN/MATÉRIELS D'EMBALLAGE/MATERIALI D'IMBALLAGGIO/MATERIALES DE EMBALAJE/MATERIAIS DE EMBALAGEM

 PAP 21	 PAP 21	 PAP 22	MTP  ALU / LDPE 90
---	---	--	--

SYMBOLS KEY / SYMBOLSCHLÜSSEL / EXPLICATION DES SYMBOLES / LEGENDA / SÍMBOLOS / TABELA DE SÍMBOLOS

	Manufactured by / Hergestellt von/ Fabriqué par/ Prodotto da/ Fabricado por / Fabricado por
IVD	In Vitro Diagnostic Medical Device/ In Vitro Diagnosticum/ Dispositif médical de diagnostic <i>in vitro</i> / Diagnostico <i>in vitro</i> / Producto para diagnóstico In vitro / Dispositivo Médico para Diagnóstico In-Vitro
LOT	Lot Number/ Chargenbezeichnung/ Numéro de lot/ Lotto/ Número de lote / Número de lote
	Expiration Date/ Verfallsdatum/ Date de péremption/ Scadenza/ Fecha de caducidad / Data de Validade
	Storage Temperature/ Lagertemperatur/ Température de conservation/ Temperatura di conservazione / Temperatura de almacenamiento / Temperatura de Armazenamento
	Keep away from sunlight / Vor direkter Sonneneinstrahlung schützen / Protéger de rayonnement solaire / Mantener alejado de la luz solar
CE	CE Mark/ CE-Zeichen/ Marquage CE / Marchio CE/ Marca CE / Marca CE
UDI	Unique Device Identifier / Eindeutige Produktidentifizierung / identification unique des dispositifs / identificazione unica del dispositivo / identificación única del producto / identificação única dos dispositivos
REF	Catalogue Number/ Katalog Nummer/ Référence du catalogue/ Numero di codice/ Número de Catálogo / Número de Catálogo
	Consult Instructions for Use/ Gebrauchsanweisung beachten/ Consulter la notice d'utilisation/ Consultare le istruzioni/ Consulte las Instrucciones de Uso / Consultar as Instruções de Utilização
MTP	Microplate/ Mikrotiterplatte/ Microplaque/ Micropiastra/ Microplaca / Microplaca
CONJ	Conjugate/ Konjugat/ Conjugué/ Coniugato/ Conjugado / Conjugado
CONTROL A	Control A/ Kontrolle A/ contrôle A/ controllo A/ control A/ controle A/ controle A
CONTROL B	Control B/ Kontrolle B / Contrôle B / Controllo B / Control B / Controle B
CAL	Calibrator resp. Standard/ Kalibrator bzw. Standard/ Calibrateur resp. Etalon / Calibratore ossia Standard / Calibrador o bien Estándar / Calibrador
SOLN STOP	Stop solution/ Stopplösung/ Solution d'arrêt / Stop solution/ Soluzione bloccante / Solução de paragem
SUB TMB	TMB Substrate solution/ TMB-Substratlösung/ Substrat TMB / soluzione substrato TMB/ solución substrato TMB / Solução substrato TMB
WASH BUF 10x	Washing solution 10x concentrated/ Waschlösung 10x konzentriert/ Solution de lavage concentré 10 x/ soluzione di lavaggio concentrazione x10/ solución de lavado concentrado x10 / Solução de lavagem concentrada 10x
	Contains sufficient for "n" tests/ Ausreichend für "n" Tests/ Contenu suffisant pour "n" tests/ Contenuto sufficiente per "n" saggi/ Contenido suficiente para "n" tests / Conteúdo suficiente para "n" testes

SCHEME OF THE ASSAY

17-OH Progesterone

Test Preparation

Prepare reagents and samples as described.
Establish the distribution and identification plan for all specimens and controls.
Select the required number of microtiter strips or wells and insert them into the holder.

Assay Procedure

	Substrate blank	Standard 0 - 5	Control A/B	Sample
Standard 0 - 5	-	25 µL	-	-
Control A/B	-	-	25 µL	-
Sample	-	-	-	25 µL
Conjugate	-	200 µL	200 µL	200 µL
Cover wells with foil supplied in the kit Incubate for 1 h at 37 °C Wash each well six times with 300 µL diluted wash solution. In case you automatic equipment, wash the wells at least 5 times				
TMB Substrate	100 µL	100 µL	100 µL	100 µL
Incubate for exactly 15 min at room temperature in the dark				
Stop Solution	100 µL	100 µL	100 µL	100 µL
Shake the microplate gently. Photometric measurement at 450 nm/620-630 nm				



Gold Standard Diagnostics Frankfurt GmbH

Waldstrasse 23 A6

63128 Dietzenbach, Germany

Tel.: +49 6074 23698-0

Fax: +49 6074 23698-900

E-Mail: info.frankfurt@eu.goldstandarddiagnostics.com

Website: clinical.goldstandarddiagnostics.com

DNOV004_17-OHP_IFU_rev01_fromLot_6009BN