



IVD

CE

# 17OH-PROGESTERONE ELISA

KAP1401



# History

## Summary of change:

Previous Version:	Current Version:																																																
200224-1	220516																																																
Old DiaSource logo 	New DiaSource logo 																																																
<b>IX SPECIMEN COLLECTION AND PREPARATION</b>	<b>IX SPECIMEN COLLECTION AND PREPARATION</b>																																																
<ul style="list-style-type: none"> <li>This kit is suitable for serum, heparinized plasma or EDTA plasma samples.</li> <li>Plasma samples provide similar results than serum:  <math>Y(\text{EDTA plasma}) = 0.97 X(\text{serum}) - 0.01</math> r = 0.99 n=20  <math>Y(\text{heparinized plasma}) = 0.95 X(\text{serum}) - 0.07</math> r = 0.99 n =20</li> <li>Serum or plasma samples must be kept at 2-8°C.</li> <li>If the test is not run within 24 hrs, <b>sampling and storage at -20°C is recommended.</b></li> <li>Avoid subsequent freeze-thaw cycles.</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>This kit is suitable for serum, heparinized plasma or EDTA plasma samples.</li> <li>Plasma samples provide similar results than serum:  <math>Y(\text{EDTA plasma}) = 0.93 X(\text{serum}) - 0.03</math> r = 0.98 n=20  <math>Y(\text{heparinized plasma}) = 0.96 X(\text{serum}) - 0.01</math> r = 0.99 n=20</li> <li>Serum or plasma samples must be kept at 2-8°C.</li> <li>If the test is not run within 24 hrs, <b>sampling and storage at -20°C is recommended.</b></li> <li>Avoid subsequent freeze-thaw cycles.</li> </ul>																																																
<b>V. REAGENTS PROVIDED</b>	<b>V. REAGENTS PROVIDED</b>																																																
<table border="1" style="width: 100%; border-collapse: collapse;"> <thead> <tr> <th style="width: 25%;">CHROM</th><th style="width: 25%;">TMB</th><th style="width: 25%;"></th><th style="width: 25%;"></th></tr> </thead> <tbody> <tr> <td>Chromogenic solution TMB (Tetramethylbenzidine)</td><td>1 vial 12 ml</td><td>orange</td><td>Ready for use</td></tr> <tr> <td>STOP</td><td>SOLN</td><td>1 vial 12 ml</td><td>Ready for use</td></tr> <tr> <td colspan="4">Stop solution HCl 1M</td></tr> </tbody> </table>	CHROM	TMB			Chromogenic solution TMB (Tetramethylbenzidine)	1 vial 12 ml	orange	Ready for use	STOP	SOLN	1 vial 12 ml	Ready for use	Stop solution HCl 1M				<p>Removal of the column relative to color code.</p> <table border="1" style="width: 100%; border-collapse: collapse;"> <thead> <tr> <th style="width: 25%;">CHROM</th><th style="width: 25%;">TMB</th><th style="width: 25%;"></th><th style="width: 25%;"></th></tr> </thead> <tbody> <tr> <td>Chromogenic solution TMB (Tetramethylbenzidine)</td><td>1 vial 13 ml</td><td></td><td>Ready for use</td></tr> <tr> <td>STOP</td><td>SOLN</td><td>1 vial 13 ml</td><td>Ready for use</td></tr> <tr> <td colspan="4">Stop solution 0.2M H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub></td></tr> </tbody> </table>	CHROM	TMB			Chromogenic solution TMB (Tetramethylbenzidine)	1 vial 13 ml		Ready for use	STOP	SOLN	1 vial 13 ml	Ready for use	Stop solution 0.2M H <sub>2</sub> SO <sub>4</sub>																			
CHROM	TMB																																																
Chromogenic solution TMB (Tetramethylbenzidine)	1 vial 12 ml	orange	Ready for use																																														
STOP	SOLN	1 vial 12 ml	Ready for use																																														
Stop solution HCl 1M																																																	
CHROM	TMB																																																
Chromogenic solution TMB (Tetramethylbenzidine)	1 vial 13 ml		Ready for use																																														
STOP	SOLN	1 vial 13 ml	Ready for use																																														
Stop solution 0.2M H <sub>2</sub> SO <sub>4</sub>																																																	
<b>XII. TYPICAL DATA</b>	<b>XII. TYPICAL DATA</b>																																																
The following data are for illustration only and should never be used instead of the real time calibration curve.	The following data are for illustration only and should never be used instead of the real time calibration curve.																																																
<table border="1" style="width: 100%; border-collapse: collapse;"> <thead> <tr> <th colspan="2">17OH-Progesterone ELISA</th><th>mod units</th></tr> </thead> <tbody> <tr> <td>Calibrator</td><td>0 ng/ml</td><td>2922</td></tr> <tr> <td></td><td>0.08 ng/ml</td><td>2768</td></tr> <tr> <td></td><td>0.4 ng/ml</td><td>1904</td></tr> <tr> <td></td><td>1.3 ng/ml</td><td>1088</td></tr> <tr> <td></td><td>2.5 ng/ml</td><td>655</td></tr> <tr> <td></td><td>7.5 ng/ml</td><td>241</td></tr> <tr> <td></td><td>15 ng/ml</td><td>164</td></tr> </tbody> </table>	17OH-Progesterone ELISA		mod units	Calibrator	0 ng/ml	2922		0.08 ng/ml	2768		0.4 ng/ml	1904		1.3 ng/ml	1088		2.5 ng/ml	655		7.5 ng/ml	241		15 ng/ml	164	<table border="1" style="width: 100%; border-collapse: collapse;"> <thead> <tr> <th colspan="2">17OH-Progesterone ELISA</th><th>OD units</th></tr> </thead> <tbody> <tr> <td>Calibrator</td><td>0 ng/ml</td><td>2.306</td></tr> <tr> <td></td><td>0.09 ng/ml</td><td>2.205</td></tr> <tr> <td></td><td>0.4 ng/ml</td><td>1.744</td></tr> <tr> <td></td><td>1.4 ng/ml</td><td>1.075</td></tr> <tr> <td></td><td>2.7 ng/ml</td><td>0.737</td></tr> <tr> <td></td><td>7.9 ng/ml</td><td>0.355</td></tr> <tr> <td></td><td>15.6 ng/ml</td><td>0.235</td></tr> </tbody> </table>	17OH-Progesterone ELISA		OD units	Calibrator	0 ng/ml	2.306		0.09 ng/ml	2.205		0.4 ng/ml	1.744		1.4 ng/ml	1.075		2.7 ng/ml	0.737		7.9 ng/ml	0.355		15.6 ng/ml	0.235
17OH-Progesterone ELISA		mod units																																															
Calibrator	0 ng/ml	2922																																															
	0.08 ng/ml	2768																																															
	0.4 ng/ml	1904																																															
	1.3 ng/ml	1088																																															
	2.5 ng/ml	655																																															
	7.5 ng/ml	241																																															
	15 ng/ml	164																																															
17OH-Progesterone ELISA		OD units																																															
Calibrator	0 ng/ml	2.306																																															
	0.09 ng/ml	2.205																																															
	0.4 ng/ml	1.744																																															
	1.4 ng/ml	1.075																																															
	2.7 ng/ml	0.737																																															
	7.9 ng/ml	0.355																																															
	15.6 ng/ml	0.235																																															
<b>XIII. PERFORMANCE AND LIMITATIONS</b>	<b>XIII. PERFORMANCE AND LIMITATIONS</b>																																																
<b>A. Detection Limit</b>	<b>A. Detection Limit</b>																																																
The LOB was calculated to be 0.04 ng/ml. The LOD was calculated to be 0.07 ng/ml. The LOQ was calculated to be 0.1 ng/ml with CV of 20%.	The LOB was calculated to be 0.03 ng/ml. The LOD was calculated to be 0.06 ng/ml. The LOQ was calculated to be 0.1 ng/ml with CV of 20%.																																																

## B. Specificity

Compound	Added amount (ng/ml)	Cross-Reactivity (%)
17OH-Progesterone	-	100
Progesterone	1000	0.58
17- $\alpha$ -hydroxypregnenolone	1000	0.5
21-deoxycortisol	1000	4.3
Pregnenolone	1000	0.03
11-deoxycortisol	1000	0.29
Corticosterone	10000	0.01
11-deoxycorticosterone	1000	0.28
Testosterone	5000	0.01
Androstenedione	5000	0.01
Estradiol	10000	ND
17- $\alpha$ -hydroxypregnenolone sulfate	5000	0.44

## B. Specificity

Compound	Added amount (ng/ml)	Cross-Reactivity (%)
17OH-Progesterone	-	100
Progesterone	1000	0.45
17- $\alpha$ -hydroxypregnenolone	1000	0.22
21-deoxycortisol	1000	0.96
Pregnenolone	1000	0.01
11-deoxycortisol	1000	0.13
Corticosterone	10000	0.00
11-deoxycorticosterone	1000	0.06
Testosterone	5000	0.01
Androstenedione	5000	0.01
Estradiol	10000	0.00
17- $\alpha$ -hydroxypregnenolone sulfate	5000	ND

Substance	17OH-P (ng/mL)	Concentration of Interferent (mg/dL)	Sample concentration after addition of the 17OH-P (ng/ml)	Mean % Variation
Hemoglobin	0.81	250	0.76	-10.1%
		500	0.74	
	1.83	250	1.69	
		500	1.5	
Bilirubin	0.81	50	0.78	-2.2%
		100	0.78	
	1.83	50	1.92	
		100	1.73	
Triglyceride	0.72	62.5	0.66	-4.6%
		125	0.66	
		250	0.67	
	1.56	62.5	1.65	
		125	1.55	
		250	1.41	

Substance	17OH-P (ng/mL)	Concentration of Interferent (mg/dL)	Sample concentration after addition of the 17OH-P (ng/ml)	Mean % Variation
Hemoglobin	0.55	250	0.60	5.3%
		500	0.60	
	1.24	250	1.25	
		500	1.26	
Bilirubin	0.55	50	0.56	4.5%
		100	0.58	
	1.24	50	1.23	
		100	1.32	
Triglyceride	0.55	62.5	0.56	2.7%
		125	0.54	
		250	0.55	
	1.24	62.5	1.19	
		125	1.23	
		250	1.24	

## C. Precision

INTRA-ASSAY			
Sample	N	$<X> \pm SD$ (ng/ml)	C.V. (%)
A	24	$1.16 \pm 0.05$	4.3
B	24	$2.93 \pm 0.12$	4.1

## C. Precision

INTRA-ASSAY			
Sample	N	$<X> \pm SD$ (ng/ml)	C.V. (%)
A	24	$0.87 \pm 0.04$	4.2
B	24	$1.64 \pm 0.08$	4.8

INTER-ASSAY			
Sample	N	$<X> \pm SD$ (ng/ml)	C.V. (%)
A	14	$0.99 \pm 0.06$	6.1
B	14	$2.32 \pm 0.14$	6.0

INTER-ASSAY			
Sample	N	$<X> \pm SD$ (ng/ml)	C.V. (%)
A	14	$0.35 \pm 0.03$	8.5
B	14	$1.35 \pm 0.11$	8.4

## D. Accuracy

RECOVERY TEST:			
Sample	Added 17-OHP (ng/ml)	Recovered 17-OHP (ng/ml)	Recovery (%)
1	10	9.61	96
	5	4.84	97
	1	0.94	94
	0.5	0.43	86
2	10	9.18	92
	5	4.5	90
	1	0.9	90
	0.5	0.5	100

## D. Accuracy

RECOVERY TEST			
Sample	Expected concentration (ng/ml)	Measured concentration (ng/ml)	Recovery (%)
1	-	0.59	-
	10.59	10.17	96.0
	5.59	4.53	81.0
2	1.59	1.85	116.1
	-	0.82	-
	10.82	12.86	118.9
	5.82	6.08	104.6
	1.82	2.03	111.8

DILUTION TEST:				DILUTION TEST			
Sample dilution	Theoretical concentration (ng/ml)	Measured concentration (ng/ml)	Recovery (%)	Sample dilution	Theoretical concentration (ng/ml)	Measured concentration (ng/ml)	Recovery (%)
1/1	12.01	12.01	100	1/1	-	8.98	-
1/2	6.01	5.51	91.7	1/2	4.49	4.19	93.2
1/4	3.00	2.80	93.2	1/4	2.25	2.17	96.7
1/8	1.50	1.58	105.2	1/8	1.12	1.22	108.4
1/1	10.73	10.73	100	1/16	0.56	0.65	115.0
1/2	5.37	4.77	88.9	1/1	-	8.16	-
1/4	2.68	2.68	99.9	1/2	4.08	3.28	80.3
1/8	1.34	1.43	106.6	1/4	2.04	1.65	80.6
				1/8	1.02	1.03	101.1
				1/16	0.51	0.60	118.4



en

Read entire protocol before use.

## 17OH-PROGESTERONE ELISA

### I. INTENDED USE

Immunoenzymetric assay for the *in vitro* quantitative measurement of human 17- $\alpha$ -hydroxyprogesterone (17-OHP) in serum and plasma.

### II. GENERAL INFORMATION

- A. Proprietary name: DIAsource 17OH-PROGESTERONE ELISA Kit
- B. Catalog number: KAP1401: 96 tests
- C. Manufactured by: DIAsource ImmunoAssays S.A.  
Rue du Bosquet, 2 B-1348 Louvain-la Neuve, Belgium.

For technical assistance or ordering information contact:  
Tel: +32 (0)10 84 99 11    Fax: +32 (0)10 84 99 90

### III. CLINICAL BACKGROUND

#### A. Biological activities of 17- $\alpha$ -hydroxyprogesterone

17- $\alpha$ -hydroxyprogesterone (17-OHP) is a C-21 steroid hormone (molecular weight 330.3) which is produced from 17- $\alpha$ -hydroxy pregnenolone in the adrenals and also in the ovaries, testes and placenta.

17-OHP is hydroxylated at positions 11 and 21 to produce cortisol via 11-deoxycortisol.

#### B. Clinical applications of 17- $\alpha$ -hydroxyprogesterone determination

As a rule, serum or amniotic fluid 17-OHP dosages are relevant to diagnose congenital adrenal hyperplasia (CAH). This CAH is due to a specific enzyme defect (six distinct enzyme deficiencies have been described). As a result of these deficiencies, ACTH increases and produces adrenal hyperplasia and the raise of many steroid precursors. But it is also very interesting to know the value of 17-OHP in patients with varicocele (17-OHP and testosterone represent markers of Leydig cell function) and in ageing male patients to detect Benign Prostatic Hypertrophy (BPH) and carcinoma of the prostate (PCA) (plasma17-OHP is significantly lower in PCA and BPH groups than in normal men).

There are other domains for 17-OHP investigations as: male infertility, girls with peripubertal virilization, children with premature adrenache (in these cases, the values of 17-OHP are increased without or after ACTH stimulation).

#### IV. PRINCIPLES OF THE METHOD

The DIAsource 17OH-PROGESTERONE ELISA kit is a solid phase Enzyme Linked Immunosorbent Assay performed on microtiterplates. During a 1 hour incubation step, at room temperature (18-25°C), with shaking, 17-OHP present in calibrators, controls and samples competes with 17-OHP-HRP conjugate for binding sites of a specific antibody immobilized on the wells of the microtiterplate. After this incubation, microtiterplate is washed to stop the competition reaction. The Chromogenic solution (TMB) is added and incubated for 30 minutes. The reaction is stopped with the addition of Stop Solution and the microtiterplate is then read at the appropriate wavelength. The amount of substrate turnover is determined colourimetrically by measuring the absorbance, which is inversely proportional to the 17-OHP concentration.

A calibration curve is plotted and the 17-OHP concentrations of the samples are determined by dose interpolation from the calibration curve.

#### V. REAGENTS PROVIDED

Reagents			KAP1401	Reconstitution
 Microtiterplate with 96 breakable wells coated with anti17- $\alpha$ -OH- progesterone			1 x 96 wells	Ready for use
CAL   0 Calibrator 0: human serum with gentamycin and Proclin			1 vial 1 ml	Ready for use
CAL   N 17- $\alpha$ -OH-progesterone N = 1 to 6 (see exact values on vial labels) in human serum with gentamycin and Proclin			6 vials 1 ml	Ready for use
CONTROL   N Controls N = 2 in human serum with gentamycin and Proclin			2 vials lyophilised	Add 1 ml distilled water
Ag   HRP   CONC Conjugate: HRP labelled 17- $\alpha$ -OH-progesterone			1 vial 0.3 ml	Dilute 100 x with conjugate buffer
CONJ   BUF Conjugate Buffer with bovine serum albumin			1 vial 30 ml	Ready for use
WASH   SOLN   CONC Wash solution (TRIS-HCl)			1 vial 10 ml	Dilute 200 x with distilled water (use a magnetic stirrer).
CHROM   TMB Chromogenic solution TMB (Tetramethylbenzidine)			1 vial 13 ml	Ready for use
STOP   SOLN Stop solution 0.2M H <sub>2</sub> SO <sub>4</sub>			1 vial 13 ml	Ready for use

**Note:** Use Calibrator 0 for dilution of samples with values above the highest calibrator.

#### VI. SUPPLIES NOT PROVIDED

The following material is required but not provided in the kit:

1. Distilled water
2. Pipettes for delivery of: 25  $\mu$ l, 100  $\mu$ l, 200  $\mu$ l and 1000  $\mu$ l (the use of accurate pipettes with disposable plastic tips is recommended)
3. Vortex mixer

4. Magnetic stirrer
5. Plate shaker (300 to 700 rpm)
6. Washer for microtiterplates
7. Microtiterplate reader capable of reading at 450 nm and 650 nm (bichromatic reading)

#### Optional (for extraction of newborns serum samples)

1. Diethyl ether (analytical grade; purity > 98%)
2. Disposable glass tubes (12 x 75 m), with stoppers.
3. DIAsource Reconstitution Solution for 17-OHP -ELISA ref: 4214024

#### VII. REAGENT PREPARATION

- Controls: Reconstitute the controls with 1 ml distilled water.
- Working 17-OHP-HRP conjugate: Prepare an adequate volume of conjugate solution by adding for example: 20  $\mu$ l of the 100x concentrated 17-OHP -HRP conjugate to 2 ml of conjugate buffer. Use a vortex to homogenize.  
**Extemporaneous preparation is recommended.**
- Working Wash solution: Prepare an adequate volume of Working Wash solution by adding 199 volumes of distilled water to 1 volume of Wash Solution (200x). Use a magnetic stirrer to homogenize. Discard unused Working Wash solution at the end of the day.

#### VIII. STORAGE AND EXPIRATION DATING OF REAGENTS

- Before opening or reconstitution, all kits components are stable until the expiry date, indicated on the label, if kept at 2 to 8°C.
- After reconstitution, controls are stable for 8 weeks at 2 to 8°C. For longer storage periods, aliquots should be made and kept at -20°C for maximum 4 months. Avoid subsequent freeze-thaw cycles.
- Freshly prepared Working Wash solution should be used on the same day.
- Alterations in physical appearance of kit reagents may indicate instability or deterioration.
- The DIAsource reconstitution solution must be kept at 2 to 8°C for 1 month after the first opening.

#### IX. SPECIMEN COLLECTION AND PREPARATION

- This kit is suitable for serum, heparinized plasma or EDTA plasma samples.
- Plasma samples provide similar results than serum:  

$$Y(\text{EDTA plasma}) = 0.93 X(\text{serum}) - 0.03 \quad r = 0.98 \quad n=20$$

$$Y(\text{heparinized plasma}) = 0.96 X(\text{serum}) - 0.01 \quad r = 0.99 \quad n=20$$
- Serum or plasma samples must be kept at 2-8°C.
- If the test is not run within 24 hrs, **sampling and storage at -20°C is recommended.**
- Avoid subsequent freeze-thaw cycles.

#### X. PROCEDURE

##### A. Handling notes

Do not use the kit or components beyond expiry date. Do not mix materials from different kit lots. Bring all the reagents to room temperature (18-25°C) prior to use. Thoroughly mix all reagents and samples by gentle agitation or swirling. Perform calibrators, controls and samples in duplicate. Vertical alignment is recommended. Use a clean plastic container to prepare the Wash Solution. In order to avoid cross-contamination, use a clean disposable pipette tip for the addition of each reagent and sample. For the dispensing of the Chromogenic Solution and the Stop Solution avoid pipettes with metal parts. High precision pipettes or automated pipetting equipment will improve the precision. Respect the incubation times.

**To avoid drift, the time between pipetting of the first calibrator and the last sample must be limited to the time mentioned in section XIII paragraph E (Time delay).**

Prepare a calibration curve for each run, do not use data from previous runs. Dispense the Chromogenic Solution within 15 minutes following the washing of the microtiterplate.

During incubation with Chromogenic Solution, avoid direct sunlight on the microtiterplate.

## B. Extraction for NEWBORN SERUM SAMPLES (optional)

1. Label one glass tube for each sample (do not extract calibrators or controls).
2. Pipette 100 µl of serum, followed by 1.5 ml of diethyl ether (analytical grade; purity > 98%).
3. Vortex all the tubes vigorously (2 x 1 minute).
4. Let stand the tubes for 15 minutes to separate well aqueous phase (lower phase) and organic phase (upper phase).
5. Then place the tubes at -20°C in order to freeze the aqueous phase.
6. Prepare a second series of glass tubes and, for each sample, transfer the organic phase (upper phase) into these new tubes. Avoid contamination by the aqueous phase.
7. Evaporate the organic phase (diethyl ether) completely under a stream of air by placing the tubes at 37°C (water bath). Manipulate under a hood.
8. Dissolve the dry organic extract with 100 µl of Reconstitution solution (not provided, see VI.). Vortex vigorously for 1 minute.
9. Let stand for 10-15 minutes and vortex again for 1 minute. These volumes allow to perform the determination in duplicate.

## C. Procedure

1. Select the required number of strips for the run. The unused strips should be resealed in the bag with a desiccant and stored at 2-8°C.
2. Secure the strips into the holding frame.
3. Pipette 25 µl of each Calibrator, Control and Sample into the appropriate wells.
4. Pipette 200 µl of the working 17-OHP-HRP conjugate solution into all the wells.
5. Incubate for 1 hour at room temperature (18-25°C), on a plate shaker (400 rpm).
6. Aspirate the liquid from each well.
7. Wash the plate 3 times by:
  - dispensing 0.4 ml of Wash Solution into each well
  - aspirating the content of each well
8. Pipette 100 µl of the Chromogenic solution into each well within 15 minutes following the washing step.
9. Incubate the microtiterplate for 30 minutes at room temperature (18-25°C), on a plate shaker (400 rpm), avoid direct sunlight.
10. Pipette 100 µl of Stop Solution into each well.
11. Read the absorbances at 450 nm (reference filter 630 nm or 650 nm) within 1 hour and calculate the results as described in section XI

## XI. CALCULATION OF RESULTS

1. Read the plate at 450 nm against a reference filter set at 650 nm (or 630 nm).
  2. Calculate the mean of duplicate determinations.
  3. Calculate for each calibrator, control and sample:
- $$\text{B/B0 (\%)} = \frac{\text{OD (Calibrator, Control or Sample)}}{\text{OD (Zero Calibrator)}} \times 100$$
4. Plot the (B/B0(%)) values for each calibrator point as a function of the 17OH Progesterone concentration of each calibrator point. Reject obvious outliers.
  5. Computer assisted methods can also be used to construct the calibration curve. If automatic result processing is used, a 4-parameter logistic function curve fitting is recommended.
  6. By interpolation of the sample (B/B0 (%)) values, determine the 17OH-Progesterone concentrations of the samples from the calibration curve

## XII. TYPICAL DATA

The following data are for illustration only and should never be used instead of the real time calibration curve.

17OH-Progesterone ELISA		mOD units
Calibrator	0 ng/ml	2.306
	0.09 ng/ml	2.205
	0.4 ng/ml	1.744
	1.4 ng/ml	1.075
	2.7 ng/ml	0.737
	7.9 ng/ml	0.355
	15.6 ng/ml	0.235

### Conversion factor:

From ng/ml to nmol/L: x 3.03

From nmol/L to ng/ml: x 0.33

To the best of our knowledge, no international reference material exists for this parameter.

## XIII. PERFORMANCE AND LIMITATIONS

### A. Detection Limit

The Limit of Blank (LoB), Limit of Detection (LoD), and the Limit of Quantitation (LoQ), were determined in accordance with the CLSI guideline EP17-A.

The LOB (Limit of Blank) was calculated by measuring the blank several times and was calculated as the mean – 1.65 standard deviations of the distribution of the test values. The LOB was calculated to be 0.03 ng/ml.

The LOD (Limit of Detection) was calculated as the LOB – 1.65 standard deviations of a low concentration sample tested in 10 different runs. The LOD was calculated to be 0.06 ng/ml.

The LOQ (Limit of Quantification) was calculated by testing 7 samples of low value 10 times. The LOQ was calculated to be 0.1 ng/ml with CV of 20%.

### B. Specificity

The specificity was estimated by spiking a pool of 17-OHP samples ( $\pm 0.6$  ng/ml) with steroids which might be present in patient samples.

Compound	Added amount (ng/ml)	Cross-Reactivity (%)
17OH-Progesterone	-	100
Progesterone	1000	0.45
17- $\alpha$ -hydroxypregnenolone	1000	0.22
21-deoxycortisol	1000	0.96
Pregnenolone	1000	0.01
11-deoxycortisol	1000	0.13
Corticosterone	10000	0.00
11-deoxycorticosterone	1000	0.06
Testosterone	5000	0.01
Androstanedione	5000	0.01
Estradiol	10000	0.00
17- $\alpha$ -hydroxypregnenolone sulfate	5000	ND

ND: non detectable

The effect of potential interfering substances on samples using the DIAsource 17-OHP ELISA test was evaluated. Different levels of Hemoglobin, Bilirubin and Triglyceride in serum samples were tested on samples with different 17-OHP concentrations. Our acceptance criteria was to have interference of less than 15%. The tested substances did not affect the performance of the DIAsoure 17-OHP ELISA.

Substance	17OH-P (ng/mL)	Concentration of Interferent (mg/dL)	Sample concentration after addition of the 17OH-P (ng/ml)	Mean % Variation
Hemoglobin	0.55	250	0.60	5.3%
		500	0.60	
	1.24	250	1.25	
		500	1.26	
Bilirubin	0.55	50	0.56	4.5%
		100	0.58	
	1.24	50	1.23	
		100	1.32	
Triglyceride	0.55	62.5	0.56	2.7%
		125	0.54	
		250	0.55	
	1.24	62.5	1.19	
		125	1.23	
		250	1.24	

### Conversion factor:

From ng/ml to nmol/L: x 3.03

From nmol/L to ng/ml: x 0.33

## C. Precision

INTRA-ASSAY			
Sample	N	$\text{\bar{x}} \pm \text{SD}$ (ng/ml)	C.V. (%)
A	24	$0.87 \pm 0.04$	4.2
B	24	$1.64 \pm 0.08$	4.8

INTER-ASSAY			
Sample	N	$\text{\bar{x}} \pm \text{SD}$ (ng/ml)	C.V. (%)
A	14	$0.35 \pm 0.03$	8.5
B	14	$1.35 \pm 0.11$	8.4

SD: Standard Deviation; CV: Coefficient of variation

## D. Accuracy

RECOVERY TEST			
Sample	Expected concentration (ng/ml)	Measured concentration (ng/ml)	Recovery (%)
1	-	0.59	
	10.59	10.17	96.0
	5.59	4.53	81.0
	1.59	1.85	116.1
2	-	0.82	
	10.82	12.86	118.9
	5.82	6.08	104.6
	1.82	2.03	111.8

DILUTION TEST			
Sample dilution	Theoretical concentration (ng/ml)	Measured concentration (ng/ml)	Recovery (%)
1/1	-	8.98	-
1/2	4.49	4.19	93.2
1/4	2.25	2.17	96.7
1/8	1.12	1.22	108.4
1/16	0.56	0.65	115.0
1/1	-	8.16	-
1/2	4.08	3.28	80.3
1/4	2.04	1.65	80.6
1/8	1.02	1.03	101.1
1/16	0.51	0.60	118.4

Samples were diluted with the zero calibrator.

## E. Time delay between last calibrator and sample dispensing

As shown hereafter, assay results remain accurate even when Working 17-OHP-HRP Conjugate is dispensed 10 and 15 minutes after the calibrator has been added in the coated wells.

TIME DELAY			
	0' (ng/ml)	10' (ng/ml)	15' (ng/ml)
Sample 1	0.68	0.71	0.74
Sample 2	2.81	3.30	3.14

## F. Limitations for newborn samples

Very young children (< 3 months old) present high levels of 17OH pregnenolone sulphate. Despite the fact that there is almost no cross reaction with this molecule, we recommend to apply the extraction procedure (X. B.)

## XIV. INTERNAL QUALITY CONTROL

- If the results obtained for Control 1 and/or Control 2 are not within the range specified on the vial label, the results cannot be used unless a satisfactory explanation for the discrepancy has been given.
- If desirable, each laboratory can make its own pools of control samples, which should be kept frozen in aliquots. Controls which contain azide will interfere with the enzymatic reaction and cannot be used.
- Acceptance criteria for the difference between the duplicate results of the samples should rely on Good Laboratory Practises.
- It is recommended that Controls be routinely assayed as unknown samples to measure assay variability. The performance of the assay should be monitored with quality control charts of the controls.
- It is good practise to check visually the curve fit selected by the computer.

## XV. EXPECTED VALUES

These values are given only for guidance; each laboratory should establish its own normal range of values.

	Concentration range (2.5 to 97.5 percentiles) (ng/ml)	Number of subjects
Normal males	0.37 – 2.38	38
Normal Females		
Follicular phase	0.32 – 0.82	28
Luteal phase	0.79 - 3.29	34
Pregnancy		
First and second trimester	1.3 – 3.9	25
Third trimester	2.2 – 12.4	14

Children:	Nb of subjects:	KAP1401 without extraction Concentration range (2.5 to 97.5 percentiles) ng/ml	KAP1401 with extraction Concentration range (2.5 to 97.5 percentiles) ng/ml
Newborns:			
0 to 1 month	20	1.41 – 16.81	0.36 - 2.5
1 to 2 months	44	1.44 – 8.27	0.37 - 1.68
2 to 3 months	27	1.11 – 6.01	0.25 - 1.83
3 to 4 months	4	1.58 – 6.39	0.56 - 2.14
1 to 2 years	20	0.11 – 0.50	NA
2 to 10 years	40	0.11 – 1.04	NA
11 to 14 years	12	0.40 – 2.00	NA
14 to 18 years	11	0.69 – 2.95	NA

## XVI. PRECAUTIONS AND WARNINGS

### Safety

For *in vitro* diagnostic use only.

The human blood components included in this kit have been tested by European approved and/or FDA approved methods and found negative for HBsAg, anti-HCV, anti-HIV-1 and 2. No known method can offer complete assurance that human blood derivatives will not transmit hepatitis, AIDS or other infections. Therefore, handling of reagents, serum or plasma specimens should be in accordance with local safety procedures.

All animal products and derivatives have been collected from healthy animals. Bovine components originate from countries where BSE has not been reported. Nevertheless, components containing animal substances should be treated as potentially infectious.

Avoid any skin contact with all reagents, Stop Solution contains H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>. In case of contact, wash thoroughly with water.

Do not smoke, drink, eat or apply cosmetics in the working area. Do not pipette by mouth. Use protective clothing and disposable gloves.

## XVII. BIBLIOGRAPHY

- ANDO S. et al (1983) Plasma levels of 17-OH-progesterone and testosterone in patients with varicoceles. Acta Endocrinologica, 102,463-469.

2. BONACCORSI A. et al (1987)  
**Male infertility due to congenital adrenal hyperplasia: testicular biopsy findings, hormonal evaluation, and therapeutic results in three patients.**  
Fertility and Sterility, 47, 4, 664-670.

3. CACCIARE et al (1987)  
**Neonatal screening program for congenital adrenal hyperplasia in a homogeneous Caucasian population.**

Annals New York Academy of sciences 85-88.

4. DRAFTA D. et al (1982)  
**Plasma steroids in benign prostatic hypertrophy and carcinoma of the prostate.**  
J. Steroid Biochem. 17, 689-693.

5. GRANOFF A. et al (1985)  
**17-hydroxyprogesterone responses to adrenocorticotropin in children with premature adrenarche.**  
Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism, 3, 409-415.

6. NEW M. et al (1983)  
**Genotyping steroid 21-hydroxylase deficiency hormonal reference data.**  
Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism 57, 320-326.

7. SOLYOM J. et al (1987)  
**Detection of late-onset adrenal hyperplasia in girls with peripubertal virilization.**  
Acta Endocrinologica (Copenh.) 115, 413-418.

#### XVIII. SUMMARY OF THE PROTOCOL

	CALIBRATORS ( $\mu$ l)	SAMPLE(S) CONTROLS ( $\mu$ l)
Calibrators (0-6)	25	-
Controls, Samples or Extracted Samples	-	25
Working 17-OHP HRP Conjugate	200	200
Incubate for 1 hour at room temperature (18-25°C) with continuous shaking at 400 rpm. Aspirate the contents of each well. Wash 3 times with 400 $\mu$ l of Wash Solution and aspirate.		
Chromogenic Solution	100	100
Incubate for 30 min at room temperature (18-25°C) with continuous shaking at 400 rpm		
Stop Solution	100	100
Read on a microtiterplate reader. Record the absorbance of each well at 450 nm (versus 630 or 650 nm).		

DIAsource's Instrumentation Service can offer you the possibility of acquiring a protocol adapted for this kit to be used on the Stratec Gemini 2PS + Combo platform including protocol assay file, reagent file and tips for the good use of the kit on the instrument.

If you need any additional information please contact [Instrumentation@diасource.be](mailto:Instrumentation@diасource.be)

Other translations of this Instruction for Use can be downloaded from our website: <https://www.diасource-diagnostics.com/>

DIAsource Catalogue Nr: KAP1401	Revision nr: 220516
------------------------------------	------------------------



es

**Lea todo el protocolo antes de usar.**

## **ELISA 17OH-PROGESTERONA**

## I. INDICACIONES

## Ensayo inmunoenzimétrico para la determinación cuantitativa *in vitro* de 17- $\alpha$ -hidroxiprogesterona (17-OHP) humana en suero y plasma.

## II. INFORMACIÓN GENERAL

- A. Nombre comercial:** DIAsource 17OH-PROGESTERONE ELISA Kit

**B. Número de catálogo:** KAP1401: 96 pruebas

**C. Fabricado por:** DIAsource ImmunoAssays S.A.  
Rue du Bosquet, 2, B-1348 Louvain-la-Neuve, Bélgica.

**Para recibir asistencia técnica o información sobre pedidos contacte con:**  
**Tel: +32 (0)10 84 99 11** **Fax: +32 (0)10 84 99 90**

### III. ANTECEDENTES CLÍNICOS

#### A. Actividades biológicas de la 17- $\alpha$ -hidroxiprogesterona

La 17- $\alpha$ -hidroxiprogesterona (17-OHP) es una hormona esteroidea C-21 (peso molecular 330,3) que se produce a partir de la 17- $\alpha$ -hidroxipregnenolona en las glándulas suprarrenales, así como en los ovarios, testículos y la placenta.

La 17-OHP se hidroxila en las posiciones 11 y 21 para producir cortisol vía 11-desoxicortisol.

#### B. Aplicaciones clínicas de la determinación de la 17- $\alpha$ -hidroxiprogesterona

Por lo general, los niveles de 17-OHP en suero o líquido amniótico son de relevancia en el diagnóstico de la hiperplasia suprarrenal congénita (HSC). Esta HSC se debe a un defecto enzimático específico (se han descrito seis deficiencias enzimáticas diferentes). Como resultado de estas deficiencias, aumenta la ACTH produciéndose hiperplasia suprarrenal y el aumento de muchos precursores esteroideos. Pero además es muy interesante saber el valor de la 17-OHP en pacientes con varicocele (la 17-OHP y la testosterona representan marcadores de la función de las células de Leydig) y en pacientes mayores de sexo masculino para detectar la hipertrofia benigna de próstata (HBP) y el carcinoma de próstata (CAP) (la 17-OHP en plasma es significativamente inferior en los grupos con CAP y HBP que en los hombres normales).

Existen otros campos de investigación de la 17-OHP como: la infertilidad masculina, niñas con virilización peripuberal, niños/as con adrenarquia prematura (en estos casos, los valores de la 17-OHP aumentan sin estimulación de la ACTH o después de esta).

#### IV. PRINCIPIOS DEL MÉTODO

El kit DIAsource 17OH-PROGESTERONE ELISA es un ensayo inmunoabsorbente ligado a enzimas en fase sólida que se realiza en placas de microvaloración. Durante un paso de incubación de 1 hora, a temperatura ambiente (18-25°C) y con agitación, la 17-OHP presente en los calibradores, controles y muestras compite con conjugado de 17-OHP-HRP por sitios de unión de un anticuerpo específico inmovilizado en los pocillos de la placa de microvaloración. Tras esta incubación, se lava la placa de microvaloración para detener la reacción de competición. Se añade la solución cromogénica (TMB) y se incuba durante 30 minutos. Se detiene la reacción añadiendo solución de parada y a continuación se lee la placa de microvaloración a la longitud de onda adecuada. La cantidad de sustrato transformado se determina colorimétricamente midiendo la absorbancia, que es inversamente proporcional a la concentración de 17-OHP.

Se representa una curva de calibración y se determinan las concentraciones de 17-OHP de las muestras mediante interpolación de la dosis en la curva de calibración.

#### V. REACTIVOS PROPORCIONADOS

Reactivos	KAP1401	Reconstitución
<b>PLA</b> Placa de microvaloración con 96 pocillos separables recubiertos con anti17- $\alpha$ -OH-progesterona	1 x 96 pocillos	Lista para usar
<b>CAL 0</b> Calibrador 0: suero humano con gentamicina y Proclin	1 vial 1 ml	Listo para usar
<b>CAL N</b> 17- $\alpha$ -OH-progesterona N = 1 a 6 (véanse los valores exactos en la etiqueta del vial) en suero humano con gentamicina y Proclin	6 viales 1 ml	Lista para usar
<b>CONTROL N</b> Controles N = 2 en suero humano con gentamicina y Proclin	2 viales liofilizados	Añadir 1 ml de agua destilada
<b>Ag HRP CONC</b> Conjugado: 17- $\alpha$ -OH-progesterona marcada con HRP	1 vial 0,3 ml	Diluir 100 x con tampón conjugado
<b>CONJ BUF</b> Tampón conjugado con albúmina de suero bovino	1 vial 30 ml	Listo para usar
<b>WASH SOLN CONC</b> Solución de lavado (TRIS-HCl)	1 vial 10 ml	Diluir 200 x con agua destilada (usar un agitador magnético)
<b>CHROM TMB</b> Solución cromogénica (TMB) (Tetrametilbencidina)	1 vial 13 ml	Listo para usar
<b>STOP SOLN</b> Solución de parada 0,2M H <sub>2</sub> SO <sub>4</sub>	1 vial 13 ml	Listo para usar

**Nota:** Usar el calibrador 0 para la dilución de muestras con valores por encima del calibrador más alto.

#### VI. SUMINISTROS NO PROPORCIONADOS

El material siguiente es necesario pero no se proporciona en el kit:

1. Agua destilada
2. Pipetas para dispensación de: 25  $\mu$ l, 100  $\mu$ l, 200  $\mu$ l y 1000  $\mu$ l (se recomienda usar pipetas de precisión con puntas de plástico desechables)
3. Agitador tipo vórtex
4. Agitador magnético
5. Agitador de placas (300 a 700 rpm)
6. Lavador de placas de microvaloración
7. Lector de placas de microvaloración con capacidad para leer a 450 nm y a 650 nm (lectura bicromática)

#### Opcional (para la extracción de muestras de suero en neonatos)

1. Éter dietílico (calidad analítica; pureza > 98 %)
2. Tubos de vidrio desechables (12 x 75 mm), con tapones
3. Solución de reconstitución de DIAsource para ELISA 17-OHP ref: 4214024

#### VII. PREPARACIÓN DE LOS REACTIVOS

- A. **Controles:** reconstituya los controles con 1ml de agua destilada.
- B. **Conjugado de 17-OHP-HRP de trabajo:** prepare un volumen adecuado de solución del conjugado añadiendo por ejemplo: 20  $\mu$ l del conjugado concentrado al 100x de 17-OHP-HRP a 2 ml del tampón conjugado. Utilice un vórtex para homogeneizar.  
**Se recomienda preparar en el momento de usar.**
- C. **Solución de lavado de trabajo:** prepare un volumen adecuado de solución de lavado de trabajo añadiendo 199 volúmenes de agua destilada a 1 volumen de solución de lavado (200x). Use un agitador magnético para homogeneizar. Deseche la solución de lavado de trabajo no utilizada al final de la jornada.

#### VIII. CONSERVACIÓN Y FECHA DE CADUCIDAD DE LOS REACTIVOS

- Antes de abrir o de la reconstitución, todos los componentes del kit son estables hasta la fecha de caducidad, indicada en la etiqueta, si se conservan entre 2 y 8 °C.
- Tras la reconstitución, los controles se mantienen estables durante 8 semanas a 2-8 °C. Para períodos de tiempo más largos, deben tomarse partes alícuotas y conservarse a -20 °C durante 4 meses como máximo. Evite ciclos posteriores de congelación y descongelación.
- La solución de lavado de trabajo recién preparada deberá utilizarse en el mismo día.
- Las alteraciones del aspecto físico de los reactivos del kit pueden indicar inestabilidad o deterioro.
- La solución de reconstitución DIAsource debe mantenerse entre 2 y 8 °C durante 1 mes después de la primera apertura.

#### IX. RECOGIDA Y PREPARACIÓN DE LAS MUESTRAS

- Este kit es adecuado para muestras de suero, plasma heparinizado o plasma con EDTA.
- Las muestras de plasma proporcionan resultados similares al suero:  $Y(\text{plasma con EDTA}) = 0,93 X(\text{suero}) - 0,03 \quad r = 0,98 \quad n = 20$   
 $Y(\text{plasma heparinizado}) = 0,96 X(\text{suero}) - 0,01 \quad r = 0,99 \quad n = 20$
- Las muestras de suero o plasma deben conservarse a 2-8 °C.
- Si la prueba no se realiza antes de 24 horas, **se recomienda obtener y conservar la muestra a -20 °C.**
- Evite ciclos posteriores de congelación y descongelación.

#### X. PROCEDIMIENTO

##### A. Notas sobre la manipulación

- No utilice el kit o sus componentes pasada la fecha de caducidad.  
No mezcle materiales de distintos lotes de kit.  
Todos los reactivos deben estar a temperatura ambiente (18-25°C) antes de usar.  
Mezcle bien todos los reactivos y muestras agitándolos o revolviéndolos suavemente.  
Realice los calibradores, los controles y las muestras por duplicado. Se recomienda alinear verticalmente.  
Utilice un recipiente de plástico limpio para preparar la solución de lavado.  
Para evitar la contaminación cruzada, utilice una punta de pipeta desechable al añadir cada reactivo y muestra.  
No utilice pipetas con partes metálicas para dispensar la solución cromogénica y la solución de parada.

Las pipetas de alta precisión o un equipo de pipeteo automatizado mejorarán la precisión.

Respete los tiempos de incubación.

**Para que no haya desvíos, el tiempo entre el pipeteo del primer calibrador y la última muestra debe limitarse al tiempo indicado en el apartado XIII, párrafo E (Tiempo de demora).**

Prepare una curva de calibración para cada análisis, no utilice datos de análisis anteriores.

Dispense la solución cromogénica antes de transcurridos 15 minutos desde el lavado de la placa de microvaloración.

Durante la incubación con solución cromogénica, evite la luz solar directa en la placa de microvaloración.

## B. Extracción de MUESTRAS DE SUERO EN NEONATOS (opcional)

- Etiquete un tubo de vidrio para cada muestra (no extraiga los calibradores ni los controles).
- Pipetee 100 µl de suero, seguido de 1,5 ml de éter dietílico (calidad analítica; pureza > 98 %).
- Agite con un vórtex energicamente todos los tubos (2 x 1 minuto)
- Deje reposar los tubos durante 15 minutos para separar bien la fase acuosa (fase inferior) y la fase orgánica (fase superior).
- Luego ponga los tubos a -20 °C para congelar la fase acuosa.
- Prepare una segunda serie de tubos de vidrio y transfiera, para cada muestra, la fase orgánica (fase superior) a estos tubos nuevos. Evite la contaminación con la fase acuosa.
- Evapore la fase orgánica (éter dietílico) por completo bajo una corriente de aire poniendo los tubos a 37 °C (baño maría). Manipule debajo de una campana.
- Disuelva el extracto orgánico seco con 100 µl de solución de reconstitución (no suministrada, véase el apartado VI). Agite con un vórtex energicamente durante 1 minuto.
- Deje reposar durante 10-15 minutos y vuelva a agitar con el vórtex durante 1 minuto. Estos volúmenes permiten realizar la determinación por duplicado.

## C. Procedimiento

- Seleccione el número necesario de tiras para el análisis. Las tiras no utilizadas deberían volverse a guardar herméticamente en la bolsa con un desecante y conservarse entre 2 y 8 °C.
- Fije las tiras en el marco de soporte.
- Pipetee 25 µl de cada calibrador, control y muestra en los pocillos adecuados.
- Pipetee 200 µl de la solución del conjugado de 17-OHP-HRP de trabajo en todos los pocillos.
- Incube durante 1 hora a temperatura ambiente (18-25°C) en un agitador de placas (400 rpm).
- Aspire el líquido de cada pocillo.
- Lave la placa 3 veces:
  - Dispensando 0,4 ml de solución de lavado en cada pocillo
  - Aspirando el contenido de cada pocillo
- Pipetee 100 µl de la solución cromogénica en cada pocillo en los 15 minutos siguientes al paso de lavado.
- Incube la placa de microvaloración durante 30 minutos a temperatura ambiente (18-25°C), en un agitador de placas horizontal (400 rpm), y evite la luz solar directa.
- Pipetee 100 µl de solución de parada en cada pocillo.
- Lea las absorbancias a 450 nm (filtro de referencia a 630 o 650 nm) antes de 1 hora y calcule los resultados conforme se describe en el apartado XI.

## XI. CÁLCULO DE LOS RESULTADOS

- Lea la placa a 450 nm con respecto a un filtro de referencia configurado a 650 nm (o 630 nm).
- Calcule la media de las determinaciones por duplicado.
- Calcule para cada calibrador, control y muestra:

$$\text{B/B0} (\%) = \frac{\text{DO (Calibrador, Control o Muestra)}}{\text{DO (Calibrador cero)}} \times 100$$

- Represente los valores (B/B0(%)) del punto de cada calibrador en función de la concentración de 17OH Progesterona del punto de cada calibrador. Rechace los valores atípicos obvios.
- Se pueden usar también métodos informáticos para generar la curva de calibración. Si se emplea un procesamiento automático de los resultados, se recomienda un ajuste de la curva mediante función logística de 4 parámetros.
- Determine las concentraciones de 17OH-Progesterona de las muestras en la curva de calibración mediante interpolación de los valores (B/B0(%)) de las muestras.

## XII. DATOS TÍPICOS

Los datos siguientes son solo a efectos ilustrativos y no deben utilizarse nunca en lugar de la curva de calibración generada en tiempo real.

17OH-Progesterona ELISA		Unidades de DO
Calibrador	0 ng/ml	2.306
	0.09 ng/ml	2.205
	0.4 ng/ml	1.744
	1.4 ng/ml	1.075
	2.7 ng/ml	0.737
	7.9 ng/ml	0.355
	15.6 ng/ml	0.235

### Factor de conversión:

De ng/ml a nmol/l: x 3,03

De nmol/l a ng/ml: x 0,33

No existe, que nosotros sepamos, ningún material de referencia internacional para este parámetro.

## XIII EFICACIA Y LIMITACIONES

### A. Límite de detección

El Límite de Blanco (LoB), Límite de Detección (LoD) y Límite de Cuantificación (LoQ) se determinaron de acuerdo con la directriz CLSI EP17-A.

El LOB (Límite de Blanco) se calculó midiendo el espacio en blanco varias veces y se calculó como la media - 1,65 desviaciones estándar de la distribución de los valores de prueba. El LOB se calculó en 0.03 ng / ml.

El LOD (Límite de Detección) se calculó como el LOB - 1,65 desviaciones estándar de una muestra de baja concentración probada en 10 carreras diferentes. El LOD se calculó en 0.06 ng / ml.

El LOQ (Límite de Cuantificación) se calculó probando 7 muestras de bajo valor 10 veces. El LOQ se calculó en 0.1 ng / ml con CV de 20%.

### B. Especificidad

La especificidad se estimó añadiendo una mezcla de muestras de 17-OHP ( $\pm 0,6$  ng/ml) con esteroides que podrían estar presentes en las muestras de pacientes.

Compuesto	Cantidad añadida (ng/ml)	Reactividad cruzada (%)
17OH-Progesterona	-	100
Progesterona	1000	0.45
17-α-hidroxipregnenolona	1000	0.22
21-desoxicortisol	1000	0.96
Pregnenolona	1000	0.01
11-desoxicortisol	1000	0.13
Corticosterona	10000	0.00
11-desoxicorticosterona	1000	0.06
Testosterona	5000	0.01
Androstenediona	5000	0.01
Estradiol	10000	0.00
Sulfato de 17-α-hidroxiprogesterona	5000	ND

ND: no detectable

Se evaluó el efecto de posibles sustancias interferentes en las muestras utilizando la prueba de ELISA 17-OHP de DIAsource. Se analizaron distintos niveles de hemoglobina, bilirrubina y triglicéridos de las muestras de suero en muestras con distintas concentraciones de 17-OHP. Nuestro criterio de aceptación fue que hubiera una interferencia menor al 15 %. Las sustancias analizadas no influyeron en la eficacia del ELISA 17-OHP de DIAsource.

Sustancia	17OH-P (ng/ml)	Concentración de interferente (mg/dl)	Concentración de la muestra tras añadir 17OH-P (ng/ml)	% variación medio
Hemoglobina	0.55	250	0.60	5.3%
		500	0.60	
	1.24	250	1.25	
		500	1.26	
Bilirrubina	0.55	50	0.56	4.5%
		100	0.58	
	1.24	50	1.23	
		100	1.32	
Triglicéridos	0.55	62.5	0.56	2.7%
		125	0.66	
		250	0.67	
	1.56	62.5	1.65	
		125	1.55	
		250	1.41	

#### C. Precisión

INTRAENSAYO			
Muestra	N	$\bar{X} \pm DE$ (ng/ml)	C.V. (%)
A	24	$0.87 \pm 0.04$	4.2
B	24	$1.64 \pm 0.08$	4.8
INTERENSAYO			
Muestra	N	$\bar{X} \pm DE$ (ng/ml)	C.V. (%)
A	14	$0.35 \pm 0.03$	8.5
B	14	$1.35 \pm 0.11$	8.4

DE: desviación estándar; CV: coeficiente de variación

#### D. Exactitud

PRUEBA DE RECUPERACION:			
Muestra	Concentración esperada (ng/ml)	Concentración medida (ng/ml)	Recuperación (%)
1	-	0.59	-
	10.59	10.17	96.0
	5.59	4.53	81.0
	1.59	1.85	116.1
2	-	0.82	
	10.82	12.86	118.9
	5.82	6.08	104.6
	1.82	2.03	111.8

Dilución de la muestra	Concentración teórica (ng/ml)	Concentración medida (ng/ml)	Recuperación (%)
1/1	-	8.98	-
1/2	4.49	4.19	93.2
1/4	2.25	2.17	96.7
1/8	1.12	1.22	108.4
1/16	0.56	0.65	115.0
1/1	-	8.16	-
1/2	4.08	3.28	80.3
1/4	2.04	1.65	80.6
1/8	1.02	1.03	101.1
1/16	0.51	0.60	118.4

Las muestras se diluyeron con el calibrador cero.

#### E. Tiempo de demora entre el último calibrador y la dispensación de la muestra

Como se muestra a continuación, los resultados del ensayo siguen siendo precisos incluso cuando se dispensa conjugado de trabajo 17-OHP-HRP 10 y 15 minutos después de haber añadido el calibrador a los pocillos recubiertos.

TIEMPO DE DEMORA			
	0' (ng/ml)	10' (ng/ml)	15' (ng/ml)
Muestra 1	0,68	0,71	0,74
Muestra 2	2,81	3,30	3,14

#### F. Limitaciones de muestras de neonatos

Los bebés muy pequeños (< 3 meses) presentan altos niveles de sulfato de 17OH pregnenolona. A pesar del hecho de que no existe prácticamente ninguna reacción cruzada con esta molécula, recomendamos aplicar el procedimiento de extracción del apartado X. B.

#### XIV CONTROL DE CALIDAD INTERNO

- Si los resultados obtenidos para el control 1 o el control 2 no se encuentran dentro del intervalo especificado en la etiqueta del vial, no se pueden utilizar dichos resultados, salvo que se proporcione una explicación satisfactoria sobre la discrepancia.
- Cada laboratorio puede, si lo desea, realizar sus propias mezclas de muestras control, que deberían conservarse congeladas en alícuotas. Los controles que contienen azida interferirán con la reacción enzimática por lo que no se pueden utilizar.
- Los criterios de aceptación de la diferencia entre los resultados duplicados de las muestras deben basarse en las Buenas Prácticas de Laboratorio.
- Se recomienda analizar los controles de forma rutinaria como muestras desconocidas para medir la variabilidad del ensayo. La eficacia del ensayo debe monitorizarse con gráficas de control de calidad de los controles.
- Es una buena práctica comprobar visualmente el ajuste de la curva seleccionada por el ordenador.

#### XV VALORES ESPERADOS

Estos valores se proporcionan solo como guía; cada laboratorio debería establecer su propio intervalo de valores normales

	Intervalo de concentración (percentiles 2,5 a 97,5 %) (ng/ml)	Número de sujetos
<b>Hombres normales</b>	0.37 – 2.38	38
<b>Mujeres normales</b>		
Fase folicular	0.32 – 0.82	28
Fase lútea	0.79 - 3.29	34
<b>Embarazo</b>		
Primer y segundo trimestre	1.3 – 3.9	25
Tercer trimestre	2.2 – 12.4	14

Niños:	Número de sujetos	KAP1401 sin extracción Rango de concentración (2.5 a 97.5 percentiles) ng / ml	KAP1401 con extracción Rango de concentración (2.5 a 97.5 percentiles) ng / ml
<b>Recién nacidos:</b>			
0 a 1 mes	20	1.41 – 16.81	0.36 - 2.5
1 a 2 meses	44	1.44 – 8.27	0.37 - 1.68
a 3 meses	27	1.11 – 6.01	0.25 - 1.83
3 a 4 meses	4	1.58 – 6.39	0.56 - 2.14
1 a 2 años	20	0.11 – 0.50	NA
2 a 10 años	40	0.11 – 1.04	NA
11 a 14 años	12	0.40 – 2.00	NA
14 a 18 años	11	0.69 – 2.95	NA

## XVI PRECAUCIONES Y ADVERTENCIAS

### Seguridad

Solo para uso diagnóstico *in vitro*.

Los componentes de la sangre humana incluidos en este kit se han analizado mediante métodos europeos aprobados y/o métodos aprobados por la FDA, siendo negativos para HBsAg, anti-VHC y anti-VIH-1 y 2. Ningún método conocido puede ofrecer una garantía total de que los hemoderivados humanos no transmitan hepatitis, SIDA u otras infecciones. Por tanto, la manipulación de reactivos y las muestras de suero o plasma debe realizarse de conformidad con los procedimientos de seguridad locales.

Todos los productos y derivados de animales se han obtenido de animales sanos. Los componentes bovinos son originarios de países en los que no se ha notificado EEB. Sin embargo, los componentes que contengan sustancias animales deben tratarse como potencialmente infecciosos.

Evite el contacto con la piel de los reactivos; la solución de parada contiene H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>. En caso de contacto, lávese bien con agua.

No fume, beba, coma ni use cosméticos en la zona de trabajo. No pipeteé con la boca. Lleve ropa protectora y guantes desechables.

## XVII BIBLIOGRAFÍA

1. ANDO S. et al (1983)

**Plasma levels of 17-OH-progesterone and testosterone in patients with varicoceles.**

Acta Endocrinologica, 102, 463-469.

2. BONACCORSI A. et al (1987)

**Male infertility due to congenital adrenal hyperplasia: testicular biopsy findings, hormonal evaluation, and therapeutic results in three patients.**

Fertility and Sterility, 47, 4, 664-670.

3. CACCIARE et al (1987)

**Neonatal screening program for congenital adrenal hyperplasia in a homogeneous Caucasian population.**

Annals New York Academy of sciences 85-88.

4. DRAFTA D. et al (1982)

**Plasma steroids in benign prostatic hypertrophy and carcinoma of the prostate.**

J. Steroid Biochem. 17, 689-693.

5. GRANOFF A. et al (1985)

**17-hydroxyprogesterone responses to adrenocorticotropin in children with premature adrenarche.**

Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism, 3, 409-415.

6. NEW M. et al (1983)

**Genotyping steroid 21-hydroxylase deficiency hormonal reference data.**

Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism 57, 320-326.

7. SOLYOM J. et al (1987)

**Detection of late-onset adrenal hyperplasia in girls with peripubertal virilization.**

Acta Endocrinologica (Copenh.) 115, 413-418.

## XVIII

## RESUMEN DEL PROTOCOLO

CALIBRADORES (μl)	MUESTRA(S) CONTROLES (μl)
Calibradores (0-6)	25
Controles, muestras o muestras extraídas	-
Conjugado 17-OHP HRP de trabajo	200
Incube durante 1 hora a temperatura ambiente (18-25°C) con agitación continua a 400 rpm. Aspire el contenido de cada pocillo. Lave 3 veces con 400 μl de solución de lavado y aspire.	
Solución cromogénica	100
Incube durante 30 min a temperatura ambiente (18-25°C) con agitación continua a 400 rpm.	
Solución de parada	100
Lea en un lector de placas de microvaloración. Registre la absorbancia de cada pocillo a 450 nm (en comparación con 630 o 650 nm).	

El servicio de instrumentación de Diasource puede ofrecerle la posibilidad de adquirir un protocolo adaptado para este kit que se utilizará en la plataforma Combo Stratec Gemini 2PS + que incluye un archivo de ensayo de protocolo, un archivo de reactivo y consejos para el buen uso del kit en el instrumento. Si necesita información adicional por favor contacte [Instrumentation@diasource.be](mailto:Instrumentation@diasource.be)

Other translations of this Instructions for Use can be downloaded from our website: <https://www.diasource-diagnostics.com/>

N.º de catálogo de DIAsource:

KAP1401

N.º de revisión:

220516

Fecha de revisión: 16/05/2022



pt

**Antes de utilizar, ler o protocolo na íntegra.**

## **ELISA 17OH-PROGESTERONA**

## I. FINALIDADE

Ensaio imunoenzimétrico para medição quantitativa *in vitro* de 17- $\alpha$ -hidroxiprogesterona (17-OHP) em soro e plasma humanos.

## II. INFORMAÇÕES GERAIS

- A. Nome do Proprietário:** Kit ELISA 17OH - PROGESTERONA DIAsource

**B. Número de catálogo** KAP1401: 96 testes

**C. Fabricado por:** DIAsource ImmunoAssays S.A.  
Rue du Bosquet, 2 B-1348 Louvain-la Neuve, Bélgica.

**Para obter assistência técnica ou informações de encomenda, contactar:**  
**Telefone: +32 (0)10 84 99 11**      **Fax: +32 (0)10 84 99 90**

### **III. ANTECEDENTES CLÍNICOS**

#### A. Actividades biológicas de 17 $\alpha$ hidroxiprogesterona

A 17 $\alpha$ -hidroxiprogesterona (17-OHP) é uma hormona esteróide (peso molecular 330,3) produzida a partir da 17 $\alpha$ -hidroxi pregnenolona, nas glândulas supra-renais e, também, nos ovários, testículos e placenta.

17- A OHP é hidroxilada nas posições 11 e 21 para produzir cortisol através de 11-deoxicortisol.

## B. Determinação das aplicações clínicas de 17 $\alpha$ hidroxiprogesterona

Em regra, as concentrações de 17-OHP no soro ou no líquido amniótico são relevantes no diagnóstico da hiperplasia supra-renal congénita (HSRC). A HSRC deve-se a um defeito enzimático específico (foram descritas seis deficiências distintas). Devido a estas deficiências, a ACTH aumenta e produz hiperplasia supra-renal e elevação de muitos precursores esteróides. Mas interessa também saber o valor de 17-OHP em doentes com varicocelo (a 17-OHP e a testosterona representam marcadores de funcionamento de células de Leydig) e em doentes do sexo masculino em envelhecimento para detectar hipertrofia benigna da próstata (HBP) e carcinoma da próstata (CaP) (a concentração de 17-OHP no plasma é significativamente mais baixa nos grupos de CaP e HBP do que nos homens normais).

Existem outros domínios para estudos da 17-OHP, por exemplo: infertilidade masculina, virilização peripubertal em crianças do sexo feminino, crianças com adrenarca prematura (nestes casos, os valores de 17-OHP aumentam sem ou após estimulação da ACTH).

#### IV. PRINCÍPIOS DO MÉTODO

O kit ELISA 17(OH) PROGESTERONA da DIAsource é um ensaio de imunoabsorção enzimática em fase sólida, realizado em microplacas. Durante um estadio de incubação de 1 hora, à temperatura ambiente (18-25°C) e com agitação, a 17-OHP presente nos calibradores, controlos e amostras compete com o conjugado 17-OHP-HRP pelos locais de ligação de um anticorpo específico, imobilizado nos poços da microplaca. Após a incubação, lava-se a microplaca para parar a reacção de competição. Acrescenta-se a solução cromogénica (TMB) e deixa-se incubar durante 30 minutos. Faz-se parar a reacção com adição da solução de paragem, lendo-se depois a microplaca a um comprimento de onda adequado. O valor da eficiência do substrato determina-se por calorimetria, medindo a absorbância, que é inversamente proporcional à concentração de 17-OHP. Traça-se uma curva de calibração e determinam-se as concentrações de 17-OHP nas amostras por interpolação da dose na curva de calibração.

#### V. REAGENTES FORNECIDOS

Reagentes	KAP1401	Reconstituição
 Microplaca com 96 poços quebráveis, revestidos com anti-17- $\alpha$ -OH-progesterona	1 x 96 poços	Pronto a utilizar
CAL 0 Calibrador 0: soro humano com gentamicina e Proclina	1 frasco 1 ml	Pronto a utilizar
CAL N 17- $\alpha$ -OH-progesterona N = 1 a 6 (ver os valores exactos nos rótulos dos frascos) em soro humano com gentamicina e Proclina	6 frascos 1 ml	Pronto a utilizar
CONTROL N Controlos N = 2 em soro humano com gentamicina e Proclina	2 frascos liofilizado	Acrescentar 1 ml de água destilada
Ag HRP CONC Conjugado: 17- $\alpha$ -OH-progesterona com rótulo HRP	1 frasco 0,3 ml	Diluir 100 x com tampão do conjugado
CONJ BUF Tampão de conjugado com albumina sérica de bovino	1 frasco 30 ml	Pronto a utilizar
WASH SOLN CONC Solução de lavagem (TRI-HCl)	1 frasco 10 ml	Diluir 200 x com água destilada (utilizar um misturador magnético).
CHROM TMB Solução cromogénica TMB (Tetrametilbenzidina)	1 frasco 13 ml	Pronto a utilizar
STOP SOLN Solução de paragem 0,2M H <sub>2</sub> SO <sub>4</sub>	1 frasco 13 ml	Pronto a utilizar

**Nota:** Utilizar o calibrador 0 na diluição de amostras com valores superiores ao calibrador mais elevado.

#### VI. MATERIAIS NÃO FORNECIDOS

Os materiais a seguir indicados são necessários, mas não incluídos no kit

- Água destilada
- Pipetas para aplicação, de: 25 µl, 100 µl, 200 µl e 1000 µl (recomenda-se que seja utilizadas pipetas de precisão com pontas de plástico descartáveis)
- Misturador de vórtice
- Misturador magnético
- Agitador de placa (300 a 700 rpm)
- Lavador para microplacas
- Leitor de microplacas com capacidade de leitura a 450 e 650 nm (leitura bicromática)

#### Opcional (para extracção de amostras de soro de recém-nascidos)

- Éter dietílico (grau analítico; pureza > 98%)
- Tubos de vidro descartáveis (12 x 75 m), com tampas.
- Solução de reconstituição DIAsource para ELISA 17-OHP, ref.: 4214024

#### VII. PREPARAÇÃO DOS REAGENTES

- Controlos:** Reconstituir os controlos com 1 ml de água destilada.
- Conjugado de trabalho 17-OHP-HRP:** Preparar o volume adequado de solução do conjugado, acrescentando, por exemplo: 20 µl do concentrado a 100x do conjugado 17-OHP -HRP a 2 ml de tampão do conjugado. Utilizar um misturador de vórtice para homogeneizar. **Recomenda-se a preparação extemporânea.**
- Solução de lavagem de trabalho:** Preparar o volume adequado de solução de lavagem de trabalho, acrescentando 199 volumes de água destilada a 1 volume de solução de lavagem (200x). Utilizar um misturador magnético para homogeneizar. Rejeitar a solução de lavagem não utilizada, ao fim do dia.

#### VIII. CONSERVAÇÃO E PERÍODOS DE VALIDADE DOS REAGENTES

- Antes de abertos ou reconstituídos e quando conservados entre 2 e 8 °C, todos os componentes do kit são estáveis até à data-limite da validade, indicada no rótulo.
- Após a reconstituição, os controlos são estáveis durante 8 semanas, entre 2 e 8 °C. Para períodos de conservação mais prolongados, devem fazer-se alíquotas e mantê-los a -20°C durante, no máximo, 4 meses. Evitar ciclos posteriores de congelação-descongelação.
- A solução de lavagem de trabalho preparada de fresco deve ser utilizada no mesmo dia.
- A alteração da aparência física dos reagentes do kit pode indicar instabilidade ou deterioração.
- A solução de reconstituição do DIAsource deve ser mantida entre 2 e 8 °C durante 1 mês após a primeira abertura.

#### IX. COLHEITA E PREPARAÇÃO DE AMOSTRAS

- Este kit é adequado para amostras de soro, plasma heparinizado ou com EDTA.
- As amostras de plasma produzem resultados semelhantes aos do soro: Y(plasma com EDTA) = 0,93 X(soro) - 0,03      r = 0,98 n=20  
Y(plasma com heparin)= 0,96 X(soro) - 0,01      r = 0,99 n=20
- As amostras de soro ou plasma têm de ser mantidas a 2-8 °C.
- Se os testes não forem efectuados no prazo de 24 horas, **recomenda-se a amostragem e conservação a -20 °C.**
- Evitar ciclos posteriores de congelação-descongelação.

#### X. PROCEDIMENTO

##### A. Recomendações de manipulação

Não utilizar o kit ou os seus componentes depois da data-limite da validade. Não misturar materiais de kits de lotes diferentes. Antes de utilizar, deixar todos os reagentes chegarem à temperatura ambiente (18-25°C). Misturar bem todos os reagentes e amostras por agitação suave ou vórtice. Executar os calibradores, controlos e amostras em duplicado. Recomenda-se o alinhamento vertical. Preparar a solução de lavagem num recipiente de plástico, limpo. Para evitar a contaminação-cruzada, utilizar uma ponta de pipeta descartável e limpa para adicionar cada reagente e amostra. Para pipetar a solução cromogénica e a solução de paragem, evitar pipetas com partes metálicas. A precisão será beneficiada se forem utilizadas pipetas de alta precisão ou equipamento de pipetagem automática. Respeitar os tempos de incubação.

Para evitar desvios, o tempo entre a pipetagem do primeiro calibrador e da última amostra não pode ultrapassar o tempo indicado na Secção XIII, parágrafo E (Atraso).

Preparar uma curva de calibração para cada série; não utilizar dados de séries anteriores.

Distribuir a solução cromogénica nos 15 minutos seguintes à lavagem da microplaca.

Durante a incubação com solução cromogénica, evitar a incidência directa da luz solar sobre a microplaca.

## B. Extracção para AMOSTRAS DE SORO DE RECÉM-NASCIDOS (opcional)

- Etiquetar um tubo de vidro para cada amostra (não extrair calibradores nem controlos).
- Pipetar 100 µl de soro e, a seguir, 1,5 ml de éter dietílico (grau analítico; pureza > 98%).
- Centrifugar vigorosamente todos os tubos (2 x 1 minuto)
- Deixar reposar os tubos durante 15 minutos para separar bem a fase aquosa (fase inferior) e a fase orgânica (fase superior).
- Colocar depois os tubos a -20°C para congelar a fase aquosa.
- Preparar uma segunda série de tubos de vidro e, por cada amostra, transferir a fase orgânica (fase superior) para estes novos tubos. Evitar a contaminação pela fase aquosa.
- Evaporar a fase orgânica (éter dietílico) completamente, por corrente de ar forçada, colocando os tubos a 37 °C (banho de água). Manipular sob um exaustor.
- Dissolver o extracto orgânico seco com 100 µl de solução de reconstituição (não fornecida, consultar a Secção VI.). Centrifugar vigorosamente durante 1 minuto.
- Deixar reposar 10-15 minutos e centrifugar outra vez, durante 1 minuto. Estes volumes permitem efectuar a determinação em duplicado.

## C. Procedimento

- Seleccionar o número de tiras para a série. As tiras não utilizadas devem ser novamente seladas no saco, com um exsicante, e conservadas a 2-8°C.
- Prender as tiras na estrutura de suporte.
- Pipetar 25 µl de cada calibrador, controlo e amostra nos poços adequados.
- Pipetar 200 µl de solução do conjugado de trabalho 17-OHP-HRP em todos os poços.
- Incubar durante 1 hora à temperatura ambiente (18-25°C), num agitador de placa (400 rpm)
- Aspirar o líquido de cada poço.
- Lavar a placa 3 vezes:
  - distribuindo 0,4 ml de solução de lavagem por cada poço
  - aspirando o conteúdo de cada poço
- Nos 15 minutos seguintes à etapa de lavagem, pipetar 100 µl de solução cromogénica em cada poço.
- Incubar a microplaca durante 30 minutos à temperatura ambiente (18-25°C), num agitador de placa (400 rpm)
- Pipetar 100 µl de solução de paragem em cada poço.
- Ler as absorbências a 450 nm (filtro de referência 630 nm ou 650 nm), no prazo de 1 hora, e calcular os resultados como descrito na Secção XI

## XI. CÁLCULO DOS RESULTADOS

- Ler a placa a 450 nm com um filtro de referência regulado a 650 nm (ou 630 nm).
- Calcular a média das determinações duplicadas.
- Efectuar o cálculo para cada calibrador, controlo e amostra:

$$B/B_0 (\%) = \frac{OD \text{ (Calibradores, Controlos ou Amostras)}}{OD \text{ (Calibrador Zero)}} \times 100$$

- Plotar os valores (B/B0(%)) por ponto de cada calibrador, em função da concentração de 17-(OH)-Progesterona de cada ponto do calibrador. Rejeitar os desvios evidentes.
- Podem utilizar-se também métodos informatizados para construir a curva de calibração. Se for utilizado processamento de resultados automático, recomenda-se a distribuição numa curva de função logística de 4 parâmetros.
- Por interpolação dos valores (B/B0 (%)) da amostra, determinar as concentrações de 17OH-Progesterona das amostras, a partir da curva de calibração

## XII. DADOS TÍPICOS

Os dados que se seguem são apenas para ilustração e não devem nunca ser utilizados em vez de uma curva de calibração em tempo real.

	<b>ELISA 17OH-Progesterona</b>	<b>Unidades OD</b>
Calibrado	0 ng/ml	2.306
	0.09 ng/ml	2.205
	0.4 ng/ml	1.744
	1.4 ng/ml	1.075
	2.7 ng/ml	0.737
	7.9 ng/ml	0.355
	15.6 ng/ml	0.235

### Factor de conversão:

De ng/ml para nmol/L: x 3,03

De nmol/L para ng/ml: x 0,33

Até onde nos é dado saber, não existe material de referência internacional para este parâmetro.

## XIII. DESEMPENHO E LIMITAÇÕES

### A. Limite de Detecção

O Limite de Branco (LoB), o Limite de Detecção (LoD) e o Limite de Quantificação (LoQ) foram determinados de acordo com a diretriz CLSI EP17-A.

O LOB (Limite do Branco) foi calculado medindo o branco várias vezes e foi calculado como a média - 1,65 desvios padrão da distribuição dos valores do teste. O LOB foi calculado como sendo 0.03 ng / ml.

O LOD (Limite de Detecção) foi calculado como os desvios padrão do LOB- 1.65 de uma amostra de baixa concentração testada em 10 execuções diferentes. O LOD foi calculado como sendo 0.06 ng / ml.

O LOQ (Limite de Quantificação) foi calculado testando 7 amostras de baixo valor 10 vezes. O LOQ foi calculado para ser 0,1 ng / ml com CV de 20%.

### B. Especificidade

As especificidade foi estimada por injecção de um grupo de amostras de 17- OHP ( $\pm$  0.6 ng/ml) com esteróides que podiam estar presentes nas amostras dos doentes.

<b>Composto</b>	<b>Volume acrescenta do (ng/ml)</b>	<b>Reactividade cruzada (%)</b>
17-(OH)-Progesterona	-	100
Progesterona	1000	0.45
17ahidroxipregnanolona	1000	0.22
21-deoxicortisol	1000	0.96
Pregnenolona	1000	0.01
11-deoxicortisol	1000	0.13
Corticosterona	10000	0.00
11-deoxicorticosterona	1000	0.06
Testosterona	5000	0.01
Androstenediona	5000	0.01
Estradiol	10000	0.00
Sulfato de 17ahidroxipregnanolona	5000	ND

ND: não detectável

Foi avaliado o efeito de potenciais substâncias interferentes nas amostras, utilizando o ensaio ELISA 17-OHP DIAsource. Foram testados os diferentes níveis de hemoglobina, bilirrubina e triglicéridos em amostras de soro, em amostras com diferentes concentrações de 17-OHP. Os nossos critérios de aceitação eram ter uma interferência inferior a 15%. As substâncias testadas não afectaram o desempenho do ensaio ELISA 17-OHP DIAsource.

Substância	17OH-P (ng/mL)	Concentração do interferente (mg/dL)	Concentração da amostra após a adição do interferente 17OH-P (ng/ml)	Variação média (%)
Hemoglobina	0.55	250	0.60	5.3%
		500	0.60	
	1.24	250	1.25	4.5%
		500	1.26	
Bilirrubina	0.55	50	0.56	4.5%
		100	0.58	
	1.24	50	1.23	2.7%
		100	1.32	
Triglicéridos	0.55	62.5	0.56	2.7%
		125	0.66	
		250	0.67	
	1.56	62.5	1.65	2.7%
		125	1.55	
		250	1.41	

#### C. Precisão

##### INTRA-ENSAIO

Amostra	N	$\text{\bar{x}} \pm \text{DP}$ (ng/ml)	C.V. (%)
A	24	$0.87 \pm 0.04$	4.2
B	24	$1.64 \pm 0.08$	4.8

##### INTER-ENSAIO

Amostra	N	$\text{\bar{x}} \pm \text{DP}$ (ng/ml)	C.V. (%)
A	14	$0.35 \pm 0.03$	8.5
B	14	$1.35 \pm 0.11$	8.4

DP: Desvio Padrão; CV: Coeficiente de variação

#### D. Exactidão

ENSAIO DE RECUPERAÇÃO:			
Amostra	Concentração teórica (ng/ml)	Concentração medida (ng/ml)	Recuperação (%)
1	-	0.59	-
	10.59	10.17	96.0
	5.59	4.53	81.0
2	1.59	1.85	116.1
	-	0.82	-
	10.82	12.86	118.9
	5.82	6.08	104.6
	1.82	2.03	111.8

ENSAIO DE DILUIÇÃO:			
Diluição da amostra	Concentração teórica (ng/ml)	Concentração medida (ng/ml)	Recuperação (%)
1/1	-	8.98	-
1/2	4.49	4.19	93.2
1/4	2.25	2.17	96.7
1/8	1.12	1.22	108.4
1/16	0.56	0.65	115.0
1/1	-	8.16	-
1/2	4.08	3.28	80.3
1/4	2.04	1.65	80.6
1/8	1.02	1.03	101.1
1/16	0.51	0.60	118.4

As amostras foram diluídas com o calibrador zero.

#### E. Atraso entre o último calibrador e a distribuição da amostra

Como demonstrado a seguir, os resultados do ensaio permanecem exactos quando se distribui o conjugado de trabalho 17-OHP-HRP 10 a 15 minutos após a adição do calibrador nos poços revestidos.

ATRASO			
	0' (ng/ml)	10' (ng/ml)	15' (ng/ml)
Amostra 1	0,68	0,71	0,74
Amostra 2	2,81	3,30	3,14

#### F. Limitações com amostras de recém-nascidos

As crianças muito jovens (< 3 meses) apresentam níveis elevados de sulfato de 17OH pregnenolona. Embora quase não haja reacção cruzada com esta molécula, recomendamos que se aplique o procedimento de extracção (X. B.)

#### XIV. controlo de qualidade interno

- Se os resultados obtidos para o Controlo 1 e/ou Controlo 2 não ficarem no intervalo especificado no rótulo do frasco, os resultados não poderão ser utilizados, excepto se for dada uma explicação satisfatória para a discrepância.
- Quando desejável, cada laboratório pode fazer os seus grupos de amostras, que deverão ser conservadas congeladas em alíquotas. Os controlos que contenham azida interferem na reacção enzimática, pelo que não podem ser utilizados.
- Os critérios de aceitação relativamente à diferença entre os resultados duplicados das amostras devem assentar em Boas Práticas Laboratoriais.
- Recomenda-se a realização de ensaios de rotina dos controlos como amostras desconhecidas para medir a variabilidade do ensaio. O desempenho do ensaio deve ser monitorizado com gráficos de controlo da qualidade dos controlos.
- É boa prática inspecionar visualmente a configuração da curva seleccionada pelo computador.

#### XV. Valores esperados

Estes valores são fornecidos apenas para orientação; cada laboratório deve estabelecer os valores do seu intervalo normal.

	Faixa de concentração (2,5 a 97,5% dos percentis) (ng / ml)	Número de sujeitos
Machos normais	0.37 – 2.38	38
Fêmeas normais		
Fase folicular	0.32 – 0.82	28
Fase lútea	0.79 - 3.29	34
Gravidez		
Primeiro e segundo trimestre	1.3 – 3.9	25
Terceiro trimestre	2.2 – 12.4	14

Crianças:	Número de sujeitos:	KAP1401 sem extração Faixa de concentração (2,5 a 97,5 percentis) ng / ml	KAP1401 com extração Faixa de concentração (2,5 a 97,5 percentis) ng / ml
Recém-nascidos:			
0 a 1 mês	20	1.41 – 16.81	0.36 - 2.5
1 a 2 meses	44	1.44 – 8.27	0.37 - 1.68
2 a 3 meses	27	1.11 – 6.01	0.25 - 1.83
3 a 4 meses	4	1.58 – 6.39	0.56 - 2.14
1 a 2 anos	20	0.11 – 0.50	NA
2 a 10 anos	40	0.11 – 1.04	NA
11 a 14 anos	12	0.40 – 2.00	NA
14 a 18 anos	11	0.69 – 2.95	NA

## XVI. PRECAUÇÕES E AVISOS

### Segurança

Apenas para diagnóstico *in vitro*.

Os componentes do sangue humano inclusos neste kit foram analisados por métodos aprovados pelas autoridades europeias e/ou pela FDA, tendo produzido resultados negativos a HBsAg, anti-VHC e anti-VIH-1 e 2. Nenhum método conhecido pode garantir em absoluto que os derivados de sangue humano não transmitam hepatite, SIDA ou outras infecções. Por conseguinte, a manipulação de amostras de reagentes, soro ou plasma deve respeitar os procedimentos de segurança locais.

Todos os produtos e derivados de origem animal foram colhidos em animais saudáveis. Os componentes de origem bovina provém de países sem registo de BSE. No entanto, os componentes que contenham substâncias de origem animal devem ser tratados como potencialmente infecciosos.

Evitar o contacto da pele com todos os reagentes; a solução de paragem contém H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>. Em caso de contacto, lavar com água abundante.

Não fumar, beber, comer ou aplicar cosméticos na zona de trabalho. Não pipetar com a boca. Usar vestuário de protecção e luvas descartáveis.

## XVII. BIBLIOGRAFIA

1 ANDO S. et al (1983)

**Plasma levels of 17OHprogesterone and testosterone in patients with varicoceles.**

Acta Endocrinologica, 102,463469.

2 ANDO S. et al (1987)

**Male infertility due to congenital adrenal hyperplasia: testicular biopsy findings, hormonal evaluation, and therapeutic results in three patients.**

Fertility and Sterility, 47, 4, 664670.

3 ANDO S. et al (1987)

**Neonatal screening program for congenital adrenal hyperplasia in a homogeneous Caucasian population.**

Annals New York Academy of sciences 8588.

4 DRAFTA D. et al (1982)

**Plasma steroids in benign prostatic hypertrophy and carcinoma of the prostate.**

J. Steroid Biochem. 17/689693

5 ANDO S. et al (1985)

**17hydroxyprogesterone responses to adrenocorticotropin in children with premature adrenarche.**

Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism, 3, 409415.

6 ANDO S. et al (1983)

**Genotyping steroid 21hydroxylase deficiency hormonal reference data.**

Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism, 57, 320326.

7 SOLYOM J. et al (1987)

**Detection of lateonset adrenal hyperplasia in girls with peripubertal virilization.**

Acta Endocrinologica, 102,463469. 115/413418

## XVIII. RESUMO DO PROTOCOLO

	CALIBRADORES (µl)	AMOSTRA(S) CONTROLOS (µl)
Calibradores (0-6)	25	-
Controlos, amostras ou amostras extraídas	-	25
17-OHP de trabalho Conjugado HRP	200	200
Incubar durante 1 hora à temperatura ambiente (18-25°C), com agitação contínua a 400 rpm. Aspirar o conteúdo de cada poco. Lavar 3 vezes com 400 µl de solução de lavagem e aspirar.		
Solução cromogénica	100	100
Incubar durante 30 minutos à temperatura ambiente (18-25°C), com agitação contínua a 400 rpm.		
Solução de paragem	100	100
Ler num leitor de microplacas. Registrar a absorbância de cada poço a 450 nm (por comparação com 630 ou 650 nm).		

O Serviço de Instrumentação da Diasource pode oferecer a possibilidade de adquirir um protocolo adaptado para este kit para ser usado na plataforma Stratec Gemini 2PS + Combo, incluindo arquivo de ensaio de protocolo, arquivo de reagente e dicas para o bom uso do kit no instrumento. Se precisar de mais informações, entre em contato com [Instrumentation@diasource.be](mailto:Instrumentation@diasource.be)

Nº de Catálogo DIASource:

KAP1401:

Revisão nº:

220516

Data de revisão: 16/05/2022



pl

Przed użyciem należy zapoznać się z całą instrukcją testu.

## 17OH-PROGESTERON ELISA

### I. PRZEZNACZENIE

Test immunoenzymatyczny *in vitro* do ilościowego oznaczania stężenia ludzkiego 17- $\alpha$ -hydroksyprogesteronu (17-OHP) w surowicy i osoczu.

### II. INFORMACJE PODSTAWOWE

A. Nazwa producenta: DIAsource 17OH-PROGESTERONE ELISA Kit

B. Numer katalogowy: KAP1401: 96 tests

C. Wyprodukowany przez: DIAsource ImmunoAssays S.A.  
Rue du Bosquet, 2 B-1348 Louvain-la Neuve, Belgium.

Pomoc w kwestiach technicznych lub informacje dotyczące zamówień:  
Tel: +32 (0)10 84 99 11    Fax: +32 (0)10 84 99 90

### III. PODSTAWY KLINICZNE (ZASTOSOWANIE KLINICZNE)

#### A. Funkcje biologiczne 17- $\alpha$ -hydroksyprogesteronu

17- $\alpha$ -hydroksyprogesteron (17-OHP) jest hormonem steroidowym, zbudowanym z 21 atomów węgla (masa cząsteczkowa 330,3), powstającym z przekształcenia 7- $\alpha$ -hydroksy pregnenolonu w nadnerczach, a także w jajnikach, jądrach i łyżysku.

17-OHP ulega hydroksylacji w pozycji 11 i 21 w procesie powstawania kortyzolu z 11-deoksykortyzolu.

#### B. Zastosowanie kliniczne oznaczeń stężenia 17- $\alpha$ -hydroksyprogesteronu

Badanie stężenia 17-OHP w surowicy lub płynie owodniowym ma zastosowanie w diagnozowaniu wrodzonego przerostu nadnerczy (WPN), spowodowanego niedoborem enzymatycznym (opisano występowanie niedoboru sześciu różnych enzymów). W efekcie tych niedoborów, wzrasta stężenie ACTH powodując przerost nadnerczy oraz wzrost poziomu wielu prekursorów steroidowych. Poziom 17-OHP jest także oznaczany u pacjentów z żylakami (17-OHP i testosteron są markerami stosowanymi do oceny funkcjonowania komórek Laydig'a) oraz do wykrywania łagodnego przerostu prostaty (BPH) i raka prostaty (PCA) u mężczyzn w podeszłym wieku (poziom 17-OHP w osoczu jest znaczco niższy u chorych z BPH i PCA w porównaniu do grupy osób zdrowych).

Badanie poziomu 17-OHP wykonuje się także w diagnozowaniu takich zaburzeń jak: bezpłodność u mężczyzn, wirylizacja u dziewcząt we wczesnej fazie dojrzewania, przedwczesne dojrzewanie płciowe u dzieci (w tych przypadkach występują podwyższone wartości 17-OHP po stymulacji ACTH lub bez takiej stymulacji).

#### IV. PODSTAWY METODYKI TESTU

Zestaw DiAsource 17OH-PROGESTERONE ELISA jest testem immunoenzymatycznym z fazą stałą, wykonywanym na mikropłytkach. Podczas etapu godzinnej inkubacji w temperaturze pokojowej (18-25°C) z wytrząsaniem, 17-OHP obecny w kalibratorach, kontrolach i próbkach badanych współzawodniczy z konjugatem 17-OHP-HRP o miejsca wiążące specyficznych przeciwciał, którymi opłaszczone są dolki na mikropłytkę. Po inkubacji, mikropłytkę jest przemywana w celu zatrzymania procesu współzawodnictwa. W kolejnym etapie dodawany jest roztwór chromogenu (TMB) i przeprowadzana jest kolejna, 30 min. inkubacja. Następnie, po dodaniu roztworu stopującego zatrzymywana jest reakcja, a mikropłytkę jest odczytywana z zastosowaniem światła o odpowiedniej długości fali. Ilość substratu jest mierzona kolorymetrycznie, a uzyskana wartość absorbancji jest odwrotnie proporcjonalna do stężenia 17-OHP. Stężenie 17-OHP w próbках badanych jest odczytywane na postawie wykreślonej krzywej kalibracyjnej.

#### V. ODCZYNNIKI ZNAJDUJĄCE SIĘ W ZESTAWIE

Odczynnik	Ilość	Sposób przygotowania
 Mikropłytkę z 96 rozdzielonymi dolkami opłaszczonymi przeciwcziałami przeciw 17- $\alpha$ -OH-progesteronowi.	1 x 96 dolków	Gotowy do użycia
CAL 0	1 fiolka 1 ml	Gotowy do użycia
Kalibrator 0: surowica ludzka z gentamycyną i substancją konserwującą ProClin.		
CAL N	6 fiolek 1 ml	Gotowy do użycia
17- $\alpha$ -OH-progesteron N = 1 do 6 (wartości stężeń znajdują się na etykietach fiolek), surowica ludzka z gentamycyną i substancją konserwującą ProClin.		
CONTROL N	2 fiołki Liofilizat	Dodać 1ml wody destylowanej
Kontrole N = 2 w surowicy ludzkiej z gentamycyną i substancją konserwującą ProClin.		
Ag HRP CONC	1 fiolka 0,3 ml	Rozcieńczyć 100 x buforem konjugatu
Koncentrat konjugatu: 17- $\alpha$ -OH-progesteron znakowany HRP.		
CONJ BUF	1 butelka 30 ml	Gotowy do użycia
Bufor konjugatu z albuminą surowicy bydlęcej.		
WASH SOLN CONC	1 butelka 10 ml	Rozcieńczyć 200 x wodą destylowaną (z użyciem mieszadła magnetycznego).
Koncentrat roztworu pluczacego (TRIS-HCl)		
CHROM TMB	1 butelka 13 ml	Gotowy do użycia
Roztwór chromogenu TMB (Tetrametylbenzydyna)		
STOP SOLN	1 butelka 13 ml	Gotowy do użycia
Roztwór stopujący 0,2M H <sub>2</sub> SO <sub>4</sub>		

**Uwaga:** kalibrator 0 służy także do rozcieńczania próbek o stężeniu powyżej wartości najwyższej kalibratora.

#### VI. NIEZBĘDNE MATERIAŁY NIE DOSTARCZONE W ZESTAWIE

Następujące materiały dodatkowe są niezbędne, ale nie znajdują się w zestawie:

- Woda destylowana
- Pipety o pojemności: 25 µl, 100 µl, 200 µl i 1000 µl (rekommendowane jest używanie dokładnych pipet z wymiennymi plastikowymi końcówkami)

Wytrząsarka typu vortex

- Mieszadło magnetyczne
- Wytrząsarka do mikropłytek (od 300 do 700 rpm)
- Myjka do mikropłytek
- Czytnik mikropłytek z możliwością pomiaru przy długości światła 450 nm i 650 nm (pomiar bichromatyczny)

#### Opcjonalnie (do ekstrakcji próbek surowicy noworodków)

- Eter dietylowy (do analiz; o czystości > 98%)
- Jednorazowe probówki szklane (12 x 75 mm), z korkami.
- Roztwór przygotowawczy DiAsource do zestawu 17-OHP-ELISA ref: 4214024

#### VII. PRZYGOTOWANIE ODCZYNNIKÓW

- Kontrole:** rozpuścić kontrole w 1ml wody destylowanej.
- Roztwór roboczy konjugatu 17-OHP-HRP:** przygotować odpowiednią objętość roztworu roboczego konjugatu poprzez dodanie przykładowo: 20 µl koncentratu konjugatu 17-OHP -HRP do 2ml buforu konjugatu. Dokładnie wymieszać przy użyciu wytrząsarki typu vortex.

Zalecane jest przygotowanie odpowiedniej objętości dostosowanej do liczby oznaczeń.

- Roztwór roboczy płynu płuczącego:** przygotować odpowiednią objętość roztworu płuczącego poprzez dodanie 199 części wody destylowanej do 1 części koncentratu roztworu płuczącego. Dokładnie wymieszać przy użyciu mieszadła magnetycznego. Odrzucić na koniec dnia niewykorzystaną objętość roztworu roboczego płynu płuczącego.

#### VIII. PRZECHOWYWANIE I CZAS PRZYDATNOŚCI ODCZYNNIKÓW DO UŻYCIA

- Do momentu otwarcia lub rekonstytucji, wszystkie odczynniki w zestawie zachowują stabilność zgodnie z podaną na etykiecie datą ważności, o ile przechowywane były w temperaturze 2 to 8°C.
- Po rekonstytucji, kontrole zachowują stabilność przez 8 tygodni w temperaturze 2 to 8°C lub do 4 miesięcy w temperaturze -20°C. Należy unikać kolejnych cykli rozmrzania i zamrażania materiału kontrolnego.
- Świeżo przygotowany roztwór roboczy płynu płuczącego należy wykorzystać tego samego dnia.
- Zmiany w wyglądzie fizycznym odczynników zestawu mogą oznaczać niestabilność lub pogorszenie ich jakości.

#### IX. POBRANIE I PRZYGOTOWANIE PRÓBEK

- Zestaw przeznaczony do wykonywania oznaczeń w surowicy lub osoczu pobranym na heparynę lub EDTA.
- Oznaczenia wykonane w osoczu dają porównywalne wyniki do oznaczeń wykonanych w surowicy:  

$$Y(\text{osocze EDTA}) = 0,93 X(\text{surowica}) - 0,03 \quad r = 0,98 \quad n=20$$

$$Y(\text{osocze heparynowe}) = 0,96 X(\text{surowica}) - 0,01 \quad r = 0,99 \quad n=20$$
- Próbki surowicy lub osocza powinny być przechowywane w temperaturze 2-8°C.
- Jeżeli badania nie będą wykonywane w ciągu 24h od pobrania próbek, zalecane jest przechowywanie materiału badanego w temperaturze -20°C.
- Należy unikać dalszego rozmrzania i zamrażania materiału.

#### X. WYKONANIE OZNACZEŃ (PROCEDURA BADAWCZA)

##### A. Uwagi dotyczące testu

Nie stosować testu lub jego odczynników po upływie daty ważności. Nie stosować odczynników z zestawów o różnym numerze LOT. Przed użyciem należy ogrzać odczynniki do temperatury pokojowej (18-25°C).

Dokładnie wymieszać wszystkie odczynniki oraz próbki poprzez delikatne potrząsanie lub obracanie.

Zalecane jest wykonanie oznaczeń kalibratorów, kontroli i próbek w duplikatach, ułożonych w porządku pionowym na paskach mikropłytki. Należy używać czystego plastikowego pojemnika do przygotowania roztworu roboczego płynu płuczącego.

W celu uniknięcia wzajemnego zanieczyszczenia krzyżowego, należy stosować czyste końcówki pipet podczas nakładania poszczególnych odczynników i próbek.

Podczas nakładania roztworu chromogenu i roztworu stopującego należy unikać pipet z metalowymi częściami.

Stosowanie pipet o dużej precyzyji lub pipet automatycznych pozwala na uzyskanie większej dokładności wyników oznaczeń.

Należy przestrzegać podanych czasów inkubacji.

W celu uniknięcia zjawiska przesunięcia czasu reakcji, okres pomiędzy nałożeniem pierwszego kalibratora i ostatniej próbki badanej musi się mieścić w limicie podanym w pkt. XIII E (opóźnienie czasowe). Należy wykonać oddzielną krzywą kalibracyjną dla każdej serii oznaczeń. Nie stosować wyników krzywej kalibracyjnej z wcześniejszych badań. Należy nałożyć roztwór chromogenu w ciągu 15 minut od wykonania płukania płytka. Podczas inkubacji z roztworem chromogenu należy unikać wystawiania płytka na bezpośrednie działanie promieni słonecznych.

#### B. Ekstrakcja próbek surowicy noworodków (opcjonalnie)

- Przygotować podpisane szklane probówki dla każdej z próbek (nie należy przeprowadzać ekstrakcji kalibratorów i kontroli).
- Odpipetować po 100 µl surowicy, a następnie po 1,5 ml eteru dietylowego (do analiz; czystość > 98%).
- Energicznie wymieszać wszystkie próbówki (2 x 1 minutę).
- Pozostawić próbówki na 15 minut w celu rozdzielenia się faz wodnej (dolina faza) i organicznej (górsza faza).
- Umieścić próbówki w temperaturze -20°C w celu zamrożenia fazy wodnej.
- Przygotować drugi zestaw szklanych próbówek i przenieść do nich fazę organiczną roztworu (górsza faza). Należy unikać zanieczyszczenia próbek fazą wodną.
- Całkowicie odparować eter dietylowy z fazy organicznej poprzez umieszczenie próbówek w kąpieli wodnej o temp. 37°C. Czynność wykonywać pod wyciągiem.
- Rozpuścić suchy ekstrakt organiczny w 100 µl roztworu przygotowawczego (nie dostarczony w zestawie, patrz pkt. VI.). Mieszać energicznie przez 1 minutę.
- Pozostawić próbówki na 10-15 minut i ponownie mieszać przez 1 minutę. Uzyskana objętość próbki pozwala na wykonanie oznaczeń w duplikatach.

#### C. Procedura badawcza

- Przygotować wymaganą ilość pasków do wykonania danej serii oznaczeń. Pozostałe paski należy odłożyć do opakowania ze środkiem osuszającym i przechowywać w temperaturze 2-8°C.
- Zabezpieczyć przygotowane paski w ramce do mikropłytek.
- Odpipetować po **25 µl** każdego kalibratora, kontroli i próbek badanych do odpowiednich dołków reakcyjnych.
- Odpipetować po **200 µl** roztworu roboczego konjugatu 17-OHP-HRP do każdego dołka reakcyjnego.
- Inkubować przez **1 h** w temperaturze pokojowej (18-25°C), na wytrząsacze do płytek (400 rpm)
- Usunąć płyn z dołków reakcyjnych.
- Wyplukać trzykrotnie płytka poprzez:
  - nałożenie do każdego dołka reakcyjnego po **0,4 ml** roztworu płuczącego
  - usunięcie płynu z każdego dołka reakcyjnego.
- Odpipetować po **100 µl** roztworu chromogenu do każdego dołka reakcyjnego w ciągu 15 min. od zakończenia etapu płukania.
- Inkubować mikropłytkę przez **30 min.** w temperaturze pokojowej (18-25°C), na wytrząsacze do płytek (400 rpm), unikając bezpośrednijej ekspozycji na światło słoneczne.
- Odpipetować po **100 µl** roztworu stopującego do każdego dołka reakcyjnego.
- Zmierzyć absorbancję przy długości fali **450 nm** (filtr referencyjny 630 nm lub 650 nm) w ciągu 1 godziny i dokonać obliczenia uzyskanych wyników zgodnie z wytycznymi zawartymi w pkt. XI.

#### XI. OBLCZANIE WYNIKÓW

- Odczytać płytę przy 450 nm wobec fali referencyjnej 650 nm (lub 630 nm).
  - Obliczyć wartość średnią absorbancji duplikatów.
  - Dokonać obliczeń dla każdego kalibratora, kontroli i próbek:
- $$\text{B/B0 (\%)} = \frac{\text{OD (Kalibrator, kontrola lub próbka)}}{\text{OD (kalibrator zerowy)}} \times 100$$
- Wykreślić wartości B/B0(%) dla każdego kalibratora w odniesieniu do podanych dla nich stężeń 17OH Progesteronu. Odrzucić wyniki wyraźnie odstające.
  - Do wykreślenia krzywej kalibracyjnej można także zastosować systemy komputerowe. W takim przypadku zalecane jest zastosowanie 4-parametrowej funkcji logistycznej do konstruowania krzywej kalibracyjnej.
  - Stężenie 17OH-progesteronu w próbках badanych obliczane jest poprzez ekstrapolację uzyskanej wartości B/B0 (%) dla każdej próbki na otrzymanej krzywej kalibracyjnej.

#### XII. PRZYKŁADOWE WYNIKI

Poniższe wyniki zostały podane jedynie do celów ilustracyjnych i nie powinny być stosowane do wykreślenia krzywych kalibracyjnych.

	17OH-Progesteron ELISA	wartości OD
Kalibrator	0 ng/ml	2.306
	0.09 ng/ml	2.205
	0.4 ng/ml	1.744
	1.4 ng/ml	1.075
	2.7 ng/ml	0.737
	7.9 ng/ml	0.355
	15.6 ng/ml	0.235

#### Współczynniki przeliczeniowe

$$\text{ng/ml} \times 3.03 = \text{nmol/L}$$

$$\text{nmol/L} \times 0.33 = \text{ng/ml}$$

Według naszej najlepszej wiedzy, brak jest międzynarodowych materiałów odniesienia dla tego wskaźnika.

#### XIII. WYDAJNOŚĆ I OGRANICZENIA TESTU

##### A. Granica wykrywalności

Poziom próby ślepej (LoB), granica wykrywalności (LoD) oraz granica oznaczalności (LoQ) zostały wyznaczone zgodnie z wymaganiami CLSI opisany w przewodniku EP17-A.

Poziom próby ślepej (LOB) został wyznaczony na podstawie wielokrotnych pomiarów próbki ślepej i wyliczony jako średnia - 1,65 wartości odchylenia standardowego wyników uzyskanych pomiarów. Wyliczona wartość LOB wynosi 0,03 ng/ml.

Granica wykrywalności (LOD) została wyliczona ze wzoru LOB - 1,65 odchylenia standardowego pomiarów próbek o niskim stężeniu substancji badanej w 10 różnych seriach oznaczeń. Wyliczona wartość LOD wynosi 0,06 ng/ml.

Granica oznaczalności (LOQ) została wyliczona na podstawie 10 krotnych oznaczeń 7 próbek o niskiej zawartości substancji badanej. Wyliczona wartość LOQ wynosi 0,1 ng/ml ze współczynnikiem zmienności (CV) wynoszącym 20%.

##### B. Specyficzność

Specyficzność metody była analizowana w próbках zawierających 17-OHP ( $\pm 0,6$  ng/ml) z dodatkiem związków steroidowych, jakie mogą być obecne w próbках pacjentów.

Składnik	Dodane stężenie (ng/ml)	Reakcja krzyżowa (%)
17OH-Progesteron	-	100
Progesteron	1000	0.45
17- $\alpha$ -hydroksypregnanolon	1000	0.22
21-deoksykortyzol	1000	0.96
Pregnenolon	1000	0.01
11-deoksykortyzol	1000	0.13
Kortykosteron	10000	0.00
11-deoksykortykosteron	1000	0.06
Testosteron	5000	0.01
Androstenedion	5000	0.01
Estradiol	10000	0.00
Siarczan 17- $\alpha$ -hydroksypregnanolonu	5000	ND

ND: nie wykrywalne

Badano wpływ czynników interferujących na oznaczenia przy użyciu zestawów DIAsource 17-OHP ELISA. Oceniano wpływ różnych stężeń hemoglobiny, bilirubiny i triglicerydów w surowicy na wyniki oznaczeń 17-OHP w próbках o różnym jego stężeniu. Przyjęta dopuszczalna granica interferencji wynosiła < 15%. Badane czynniki nie miały istotnego wpływu na wydajność zestawów DIAsource 17-OHP ELISA.

Czynnik	17OH- P (ng/ml)	Stężenie czynnika interferującego (mg/dl)	Uzyskane stężenie 17OH-P po dodaniu czynnika interferującego (ng/ml)	Średnia zmienność
Hemoglobina	0.55	250	0.60	5.3%
		500	0.60	
	1.24	250	1.25	
		500	1.26	
Bilirubina	0.55	50	0.56	4.5%
		100	0.58	
	1.24	50	1.23	
		100	1.32	
Triglicerydy	0.55	62.5	0.56	2.7%
		125	0.66	
		250	0.67	
	1.56	62.5	1.65	
		125	1.55	
		250	1.41	

#### C. Precyzyja

W SERII (powtarzalność)			
Próbka	N	$\text{\timesSD}$ (ng/ml)	C.V. (%)
A	24	$0.87 \pm 0.04$	4.2
B	24	$1.64 \pm 0.08$	4.8

#### MIĘDZY SERIAMI (odtwarzalność)

Próbka	N	$\text{\timesSD}$ (ng/ml)	C.V. (%)
A	14	$0.35 \pm 0.03$	8.5
B	14	$1.35 \pm 0.11$	8.4

SD : odchylenie standardowe; CV: współczynnik zmienności.

#### D. Dokładność

Próbki zostały rozcieńczone przy użyciu kalibratora zerowego

BADANIE ODZYSKU:			
Próbka	Wartość oczekiwana (ng/ml)	Stężenie zmierzone (ng/ml)	Odzysk (%)
1	-	0.59	-
	10.59	10.17	96.0
	5.59	4.53	81.0
2	1.59	1.85	116.1
	-	0.82	
	10.82	12.86	118.9
	5.82	6.08	104.6
	1.82	2.03	111.8

#### E. Opóźnienie czasowe pomiędzy nałożeniem pierwszego kalibratora i ostatniej próbki badanej.

Jak pokazano poniżej, wyniki badań utrzymują dokładność nawet w sytuacji, gdy roztwór roboczy konjugatu 17-OHP-HRP został nałożony 10 i 15 minut po umieszczeniu pierwszego kalibratora w opłaszczonej dolce mikropłytki.

BADANIE WPŁYWU OPÓŹNIENIA CZASOWEGO			
	0' (ng/ml)	10' (ng/ml)	15' (ng/ml)
Próbka 1	0.68	0.71	0.74
Próbka 2	2.81	3.30	3.14

#### F. Ograniczenia dla próbek noworodkowych

U bardzo małych dzieci (< 3 miesiąca życia) występują wysokie stężenia siarczanu 17OH pregnenolonu. Pomimo faktu bardzo niskiego nasilenia reakcji krzyżowej z tym związkiem, zalecane jest stosowanie dla takich próbek procedury ekstrakcji (patrz pkt. X B).

#### XIV. WEWNĘTRZNA KONTROLA JAKOŚCI

- Jeżeli wyniki uzyskane dla materiałów kontrolnych 1 i 2 nie mieszczą się w przyjętych zakresach, zamieszczonych na etykietach fiolek, otrzymane wyniki w próbkach badanych nie mogą być uznane za wiarygodne, o ile nie zostanie uzyskane zadowalające wyjaśnienie tych rozbieżności.
- Jeśli to konieczne, laboratorium może stworzyć własną pulę próbek kontrolnych, które powinny być przechowywane w postaci roztworów w stanie zamrożonym. Materiały kontrolne zawierające azydek interferują z reakcją enzymatyczną testu i nie mogą być stosowane.
- Kryterium akceptowanej wartości różnicy pomiędzy poszczególnymi wynikami oznaczeń w dubletach powinno być przyjęte w oparciu o Dobrą Praktykę Laboratoryjną.
- Zalecane jest, aby kontrole były rutynowo oznaczane także jako nieznana próbka, w celu określenia zmienności analitycznej testu. Na potrzeby stałej weryfikacji jakości testu, wyniki oznaczeń materiału kontrolnego powinny być monitorowane przy użyciu kart kontroli jakości.
- Dobrą praktyką jest sprawdzenie wizualnie dopasowania wybranej przez system komputerowy krzywej.

#### XV. WARTOŚCI OCZEKIWANE

Poniższe wartości podano jedynie w celach orientacyjnych; zaleca się, aby każde laboratorium ustaliło własny zakres odniesienia (wartości referencyjne).

	Zakres stężeń (od 2,5 do 97,5 percentyla) (ng/ml)	Liczba badanych
Mężczyźni	0.37 – 2.38	38
Kobiety		
faza folikularna	0.32 – 0.82	28
faza lutealna	0.79 - 3.29	34
Ciąża		
pierwszy i drugi trymestr	1.3 – 3.9	25
trzeci trymestr	2.2 – 12.4	14

#### BADANIE WPŁYWU ROZCIEŃCZENIA:

Stopień rozcieńczenia próbki	Stężenie zakładane (ng/ml)	Stężenie zmierzone (ng/ml)	Odzysk (%)
1/1	-	8.98	-
1/2	4.49	4.19	93.2
1/4	2.25	2.17	96.7
1/8	1.12	1.22	108.4
1/16	0.56	0.65	115.0
1/1	-	8.16	-
1/2	4.08	3.28	80.3
1/4	2.04	1.65	80.6
1/8	1.02	1.03	101.1
1/16	0.51	0.60	118.4

Dzieci: przedziały wiekowe	Liczba badanych:	KAP1401 bez eksstrakcji Zakres stężeń (2.5 to 97.5 percentyla) ng/ml	KAP1401 z ekstrakcją Zakres stężeń (2.5 to 97.5 percentyla) ng/ml
<b>Noworodki:</b> 0-1 miesiąc	20	1.41 – 16.81	0.36 - 2.5
1-2 miesiące	44	1.44 – 8.27	0.37 - 1.68
2-3 miesiące	27	1.11 – 6.01	0.25 - 1.83
3-4 miesiące	4	1.58 – 6.39	0.56 - 2.14
<b>1-2 lata</b>	20	0.11 – 0.50	B.D.
<b>2-10 lat</b>	40	0.11 – 1.04	B.D.
<b>11-14 lat</b>	12	0.40 – 2.00	B.D.
<b>14-18 lat</b>	11	0.69 – 2.95	B.D.

## XVI. ŚRODKI OSTROŻNOŚCI

### Bezpieczeństwo

Przeznaczone tylko do diagnostyki *in vitro*.

Substancje zawarte w zestawie, będące pochodnymi krwi ludzkiej, były badane metodami posiadającymi akceptację europejską i/lub FDA i uzyskały negatywne wyniki testów na obecność HBsAg, anti-HCV, anti-HIV-1 i 2. Nie istnieje jednak metoda pozwalająca z całkowitą pewnością wykluczyć obecność w materiale czynników chorobotwórczych zapalenia wątroby, AIDS czy innych chorób zakaźnych. Dlatego praca z odczynnikami oraz próbками surowicy lub osocza powinna być prowadzona z zachowaniem wewnętrznych procedur bezpieczeństwa. Wszystkie produkty pochodzenia zwierzęcego zostały pobrane od zdrowych osobników. Składniki pochodzenia bydlęcego uzyskano z krajów, w których nie odnotowano występowania przypadków BSE. Jednakże wszystkie odczynniki, zawierające związki pochodzenia zwierzęcego, powinny być traktowane jako potencjalnie zakaźne.

Należy unikać kontaktu odczynników ze skórą, roztwór stopiący zawiera  $H_2SO_4$ . W przypadku wystąpienia kontaktu, dokładnie przemyć skórę dużą ilością wody.

Nie palić papierosów, nie spożywać napojów i produktów spożywczych oraz nie stosować kosmetyków w miejscu wykonywania oznaczeń. Nie pipetować przy pomocy ust. Stosować odzież ochronną i jednorazowe rękawiczki.

## XVII. BIBLIOGRAPHY

1. ANDO S. et al (1983)  
**Plasma levels of 17-OH-progesterone and testosterone in patients with varicoceles.**  
Acta Endocrinologica, 102, 463-469.
2. BONACCORSI A. et al (1987)  
**Male infertility due to congenital adrenal hyperplasia: testicular biopsy findings, hormonal evaluation, and therapeutic results in three patients.**  
Fertility and Sterility, 47, 4, 664-670.
3. CACCIARE et al (1987)  
**Neonatal screening program for congenital adrenal hyperplasia in a homogeneous Caucasian population.**  
Annals New York Academy of sciences 85-88.
4. DRAFTA D. et al (1982)  
**Plasma steroids in benign prostatic hypertrophy and carcinoma of the prostate.**  
J. Steroid Biochem. 17, 689-693.
5. GRANOFF A. et al (1985)  
**17-hydroxyprogesterone responses to adrenocorticotropin in children with premature adrenarche.**  
Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism, 3, 409-415.
6. NEW M. et al (1983)  
**Genotyping steroid 21-hydroxylase deficiency hormonal reference data.**  
Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism 57, 320-326.
7. SOLYOM J. et al (1987)  
**Detection of late-onset adrenal hyperplasia in girls with peripubertal virilization.**  
Acta Endocrinologica (Copenh.) 115, 413-418.

## XVIII. PODSUMOWANIE PROTOKOŁU BADAWCZEGO

	KALIBRATORY (μl)	PRÓBKИ KONTROLE (μl)
Kalibratory (0-6)	25	-
Kontrole, próbki lub próbki po ekstrakcji	-	25
Roztwór roboczy konjugatu 17-OHP HRP	200	200
Inkubować przez 1 h w temp. pokojowej (18-25°C) ze stałym mieszaniem z szybkością 400 rpm. Usunąć zawartość wszystkich dółków reakcyjnych. Przepiąkać 3-krotnie 400 μl płynu płuczącego, usuwając płyn z dółków reakcyjnych.		
Roztwór chromogenu	100	100
Inkubować przez 30 min. w temp. pokojowej (18-25°C) ze stałym mieszaniem z szybkością 400 rpm		
Roztwór stopujący	100	100
Dokonać pomiarów z użyciem czujnika mikroptytek. Zmierzyć absorbancję w każdym dółku reakcyjnym przy fali 450 nm (wobec fali 630 lub 650 nm).		

Usługa Instrumentacji Diasource może zaoferować możliwość uzyskania protokołu dostosowanego do tego zestawu, który będzie używany na platformie Stratec Gemini 2PS + Combo, w tym pliku testu protokołu, pliku odczynnika i wskazówek dotyczących dobrego korzystania z zestawu na instrumencie.

Jeśli potrzebujesz dodatkowych informacji, skontaktuj się z [Instrumentation@diasource.be](mailto:Instrumentation@diasource.be)

DIAsource Numer katalogowy:

KAP1401

Numer aktualizacji:

220516

Aktualizacja: 16/05/2022

Használat előtt olvassa el a teljes tájékoztatót!

## 17OH-PROGESZTERON ELISA

### I. JAVASOLT HASZNÁLAT

Immunoenzimometrikus assay a humán 17- $\alpha$ -hidroxiprogesteron (17-OHP) szérumból és plazmából történő mennyiségi mérésére.

### II. ÁLTALÁNOS INFORMÁCIÓ

- A. Szabadalmazott név: DIAsource 17OH-PROGESTERONE ELISA Kit  
B. Katalógusszám: KAP1401: 96 teszt  
C. Gyártó: DIAsource ImmunoAssays S.A.  
Rue du Bosquet, 2 B-1348 Louvain-la Neuve, Belgium.

Technikai támogatáshoz vagy rendeléshez szükséges kapcsolat:  
Tel: +32 (0)10 84 99 11 Fax: +32 (0)10 84 99 90

### III. KLINIKAI HÁTTÉR

#### A. A 17- $\alpha$ -hidroxiprogesteron

17- $\alpha$ -hidroxiprogesteron (17-OHP) egy C-21 szteroid hormon (molekulatómege 330.3), mely a mellékvesében továbbá a petefészekben, herében és placentában termelődik 17- $\alpha$ -hidroxipregnenolonból.

A 17-OHP a 21. majd a 11. helyen hidroxilálódva 11 deoxikortizolon keresztül kortizollá alakul.

#### B. A 17- $\alpha$ -hidroxiprogesteron meghatározás klinikai alkalmazása

Előírás-szerűen a szérum vagy amnionfolyadék 17-OHP szintje a megfelelő paraméter a congenitalis adrenalis hyperplasia (CAH) diagnosztizálásához. A CAH egy specifikus enzim defektusa miatt alakul ki (hat különböző enzimdefektust írtak le). Ezen deficienciák következménye, hogy az ACTH-szint emelkedik és ez adrenalis hyperplasiához, továbbá számos szteroid prekurzor szintjének emelkedéséhez vezet. De azt is nagyon fontos ismerni, hogy mennyi a 17OHP értéke varicocelében szenvedőkben (a 17-OHP és a tesztoszteron a Leydig sejt funkció markere) és idősödő férfiak benignus prostat hypertrophiában (BPH) és prosztatrákjában (PCA) (a plazma 17-OHP is szignifikánsan alacsonyabb a PCA és BPH csoportban mint egészséges férfiakban).

A 17-OHP vizsgálatának más területe is létezik: a férfi infertilitás, lányok peripubertális virilizációja, gyermekek idő előtti adrenarchéja (ezekben az esetekben a 17-OHP értéke ACTH stimulációra vagy anélkül emelkedett).

## IV. A MÓDSZER ELVE

A DIAsource 17OH-PROGESTERONE ELISA kitje egy mikrotiterlemezen kivitelezhető szilárd fázisú Enzyme Linked Immunosorbent Assay. A szobahőmérsékleten (18-25°C-on), rázás mellett történő 1 órás inkubációs idő alatt a kalibrátorokban, kontrolökban, mintákban lévő 17-OHP verseng a a mikrotiterlemez mérőcelláihoz kötött 17-OHP-HRP konjugátummal. Az inkubáció után a mikrotiterlemez mosni kell, hogy a vetélkedési reakció leállitsuk. Színképző oldatot (TMB) mérünk hozzá és 30 percen át inkubálunk. A reakciót a stop oldat bemérésével állítjuk le, majd a mikrotiterlemez a megfelelő hullámhosszon leolvassuk. A szubsztrát átalakulás mennyiségekkel kolorimetrikusan, abszorbancia méréssel határozzuk meg, mely fordítottan arányos a 17OHP koncentrációjával.

Kalibrációs görbét szerkesztünk és a minták 17-OHP koncentrációját a kalibrációs görbéről interpolációval számítjuk ki.

## V. A KITBEN TALÁLHAT REAGENSEK

Reagensek	KAP1401	Rekonstrukció
 96-os mikrotiterlemez, anti17- $\alpha$ -OH- progeszteronnal bevont törlő mérőcellákkal	1 x 96 mérőcella	Használatra kész
CAL   0 Kalibrátor 0: gentamycin és Proclint tartalmazó humán szérum	1 üveg 1 ml	Használatra kész
CAL   N 17- $\alpha$ -OH-progeszteron N = 1 - 6 (a pontos érték az üveg címkéjén található) gentamycin és Proclint tartalmazó humán szérumban	6 üveg 1 ml	Használatra kész
CONTROL   N Kontrol N = 2 gentamycin és Proclint tartalmazó humán szérumban	2 üveg liofilizált	Adjon hozzá 1 ml desztillált vizet
Ag   HRP   CONC Konjugátum: HRP-jelzett 17- $\alpha$ -OH-progeszteron	1 üveg 0.3 ml	Hígítsa 100 x konjugátum pufferrel
CONJ   BUF marha szérumalbumint tartalmazó konjugátum puffer	1 üveg 30 ml	Használatra kész
WASH   SOLN   CONC Mosó oldat (TRIS-HCl)	1 üveg 10 ml	Hígítsa 200 x desztillált vizivel (használjon mágneses keverőt).
CHROM   TMB Színképző oldat TMB (Tetrametylbenzidin)	1 üveg 13 ml	Használatra kész
STOP   SOLN Stop oldat 0.2M H <sub>2</sub> SO <sub>4</sub>	1 üveg 13 ml	Használatra kész

**Megjegyzés:** a legmagasabb kalibrátor feletti értéket adó minták hígításához használja a 0 kalibrátorot.

## VI. A KITBEN NEM TALÁLHATÓ, SZÜKSÉGES KIEGÉSZÍTŐK

A következő, kitben nem található anyagok szükségesek:

- Desztillált víz
- Pipetták beméréshez: 25 µl, 100 µl, 200 µl és 1000 µl (megbízható, műanyaghellyel elátott pipetták javasoltak)
- Vortex mixer
- Mágneses keverő
- Lemez rázó (300 to 700 rpm)
- Mikrotiterlemez mosó
- Bikromatikus mérésre alkalmas microtiter leolvasó, mely 450 és 650 nm-es szűrővel ellátott

Opcionálisan (újszülött szérum minták extrakciójához)

- Dietiléter (analitikai minőségű; tiszta: > 98%)
- Eldobható üvegcsopek (12 x 75 mm), kupakkal.
- DIAsource rekonstitúciós oldat (Reconstitution Solution for 17-OHP -ELISA ref: 4214024)

## VII. A REAGENSEK ELŐKÉSZÍTÉSE

- Kontrolök:** Oldja fel a kontrolök 1 ml desztillált vizsel.
- 17-OHP-HRP munka-konjugátum: A megfelelő térfogatú konjugátum oldatot készítse el, pl.: 20 µl 100x koncentrált 17-OHP -HRP konjugátumhoz adjon 2 ml of konjugátum puffert. Vortexet használjon a homogenizálásához.

### Friss elkészítés szükséges!

- Munka mosó-oldat:** A megfelelő mennyiségű (1 térfogatnyi) mosó-oldat koncentrátumhoz adjon 199 térfogatnyi desztillált vizet (200-szoros hígítás). A homogenizáláshoz használjon mágneses keverőt. A fel nem használt munka mosó-oldatot kezelje hulladékként.

## VIII. A REAGENSEK TÁROLÁSA ÉS LEJÁRATI IDEJE

- Kibontás vagy feloldás előtt minden komponens a címkére feljegyzett lejáratideig stabil, amennyiben a kitet 2 - 8°C között tárolták.
- Feloldást követően a kontrolök 2 - 8°C között 8 héten át stabilak. Hosszabb perióduson át történő használat esetén alikvotokba osztva -20°C alatt maximum 4 hónapon át tárolhatók. A többszöri felolasztás-fagyastás ciklust kerülni kell.
- A frissen elkészített munka mosó-oldatot csak a készítés napján lehet használni.
- A reagensek fizikai megjelenésének változása azok instabilitását vagy bomlását jelezhetik.
- A DIAsource reconstitúciós oldatot 2 - 8°C között kerülni tartani, így 1 hónapon át használható a felbontást követően.

## IX. MINTAGYŰJTÉS ÉS ELŐKÉSZÍTÉS

- Ez a kit szérum, heparinizált plazma vagy EDTA plazma minták vizsgálatára alkalmas.
- A plazma minták a széruméhez hasonló eredményt adnak:  
 $Y(\text{EDTA plazma}) = 0.93 X(\text{szérum}) - 0.03 \quad r = 0.98 \quad n=20$   
 $Y(\text{heparinizált plazma}) = 0.96 X(\text{szérum}) - 0.01 \quad r = 0.99 \quad n=20$
- A szérum vagy plazma mintákat 2-8°C között kell tárolni.
- Amennyiben a tesztelés nem történik meg 24 órán belül, a mintákat -20°C alatt tanácsos tárolni.
- Kerüljük a többszöri fagyastás-felolvasztás ciklust.

## X. AZ ELJÁRÁS

### A. Kezelési megjegyzések

Ne használja a kitet vagy komponenseit a lejáratidőn túl. Ne keverje a különböző sarzs-számú kitból származó komponenseket. Használat előtt várja meg, hogy minden komponens elérje a szobahőmérsékletet (18-25°C-t). A reagenseket és mintákat enyhe rázással vagy forgatással alaposan keverje össze. A kalibrátorokat, kontrolókat és a mintákat mérje duplikátumban. Vertikális elrendezés javasolt.

Tiszta műanyagpalackot használjon a munka mosóoldat elkészítéséhez. A keresztszennyeződés elkerülése érdekében használjon tiszta, eldobható pipettahegyeket minden oldathoz és mintához.

A színképző oldat és a stop oldat bemérésékor óvja a pipetták fém kompnenseit!

Nagypontosságú pipetták vagy automata pipettorok javítják a bemérés pontosságát.

Tartsa be pontosan az inkubációs időket.

**A drift elkerülése érdekében az első kalibrátor és az utolsó minta bemérése kötzi időt a XIII. paragrafus E pontjában leírtak szerint korlátok között kell tartani (idő elcsúszás).**

Minden egyes sorozathoz aktuális kalibrációs görbe készítése szükséges, ne használja az előző sorozat kalibrációját. A színképző oldatot a mikrotiterlemez mosását követően 15 percen belül kell bemérni.

A színképző oldattal történő inkubáció alatt nem érheti direkt napfény a mikrotiter lemezét.

## B. Az ÚJSZÜLÖTT SZÉRUM MINTÁK extrakciója (tetszés szerint)

- Jelezzen 1-1 üvegcsövet minden egyes mintához (ne extrahálja a kalibrátorokat és kontrolokat).
- Pipettázzon 100 µl of szérumot, azt követően 1.5 ml of dietil-étert (analitikai minőségű; tisztasága > 98%).
- Erőteljesen vortexeljen minden egyes csövet (2 x 1 percen át).
- Hagyja a csöveget 15 percig állni, hogy jól elkülönüljön a vizes (also) fázis és a szerves (felső) fázis.
- Hűtse a csöveget -20°C alá, hogy a vizes fázis megfagyjon.
- Jelöljön egy második sorozat üvegcsövet minden egyes mintához, majd mérje át az organikus (felső) fázist az új csöveget. Kerülje, hogy a vizes fázissal szennyeződés történjen.
- Párologtassa el teljesen a felső fázist (a dietil-étert) úgy, hogy a csöveget 37°C-os vízhőbe helyezi és áramló levegőt biztosít a párologtatáshoz. Végezze ezt elszívó fülke alatt.
- A szerves fázisos kivonatot oldja vissza 100 µl rekonstitúciós oldattal (külön rendelendő, lásd VI.). Vortexelje erőteljesen 1 percig.
- Hagyja állni az oldatot 10-15 percig, majd ismét vortexelje 1 percig. Az így kapott mennyiséget elegendő a duplikátum meghatározásához.

## C. Az eljárás

- Válassza ki a megfelelő számú csíkot. A nem használt csíkokat vissza kell zárnia a zacskóba, száritószerekkel együtt és 2-8°C-on kell tárolni.
- Helyezze óvatosan a csíkokat egy tartókeretbe.
- Pipettázzon 25 µl-t minden egyes kalibrátorból, kontrolból és mintából a megfelelő mérőcellába.
- Pipettázzon 200 µl 17-OHP-HRP munka-konjugátum oldatot minden egyes mérőcellába.
- Mikrotiterlemez rázon (400 rpm) inkubáljon 1 óra hosszat szobahőmérsékleten (18-25°C-on).
- Szívia le a folyadékot minden egyes mérőcellából.
- Mossa a lemezt 3x:
  - mérjen be 0.4 ml munka mosó-oldatot minden egyes mérőcellába
  - szívia le minden egyes mérőcella tartalmát
- Pipettázzon 100 µl színképző oldatot minden egyes mérőcellába a mosást követő 15 percen belül.
- Incubálja a mikrotiterlemet 30 percen át szobahőmérsékleten (18-25°C-on), lemez rázon (400 rpm), kerülje a közvetlen napfényt.
- Pipettázzon 100 µl stop oldatot minden egyes mérőcellába.
- Olvassa le az abszorbanciát 450 nm-en (referencia szűrő 630 nm vagy 650 nm) 1 órán belül és számítsa ki az eredményeket ahogy azt a XI. fejezetben leírtuk.

## XI. AZ EREDMÉNYEK SZÁMÍTÁSA

- Olvassa le a lemezt 450 nm-en, 650 nm-es (vagy 630 nm-es) referenciaszűrőt alkalmazva.
  - Számolja ki a duplikátum meghatározások átlagát.
  - Számolja ki a kalibrátorokra, kontrolokra, mintákra:
- $$\frac{B/B_0 (\%)}{OD \text{ (Calibrator, Control or Sample)}} = \frac{OD \text{ (Zero Calibrator)}}{OD \text{ (Zero Calibrator)}} \times 100$$
- Készítsen a (B/B0(%)) értékekkel minden kalibrátor ponton áthaladó görbét a kalibrátorok 17OH progeszteron koncentrációjának függvényében. Hagyja ki a nyilvánvalóan kieső értékeket.
  - Komputer-program segítette kalibrációs görbe készítés is használható. Ha automatikus eredménymeghatározást használunk, a 4-paraméteres logisztikus függvény görbe illesztés javasolt.
  - A minták (B/B0 (%)) értékeit interpolálásával a minták 17OH-progeszteron koncentrációi a kalibrációs görbéről meghatározhatók.

## XII. TIPIKUS ADATOK

A következő adatok csak illusztrációként szolgálnak, soha sem használhatók a mintákkal egyidőben meghatározott kalibrációs görbe helyett.

17OH-Progeszteron ELISA		mOD units
Kalibrátor	0 ng/ml	2.306
	0.09 ng/ml	2.205
	0.4 ng/ml	1.744
	1.4 ng/ml	1.075
	2.7 ng/ml	0.737
	7.9 ng/ml	0.355
	15.6 ng/ml	0.235

### Atszámítási faktor:

ng/ml-ről to nmol/L-re: x 3.03

nmol/L-ről to ng/ml-re: x 0.33

Legjobb tudomásunk szerint nemzetközi referenciaanyag nem áll rendelkezésre.

## XIII. TELJESÍTMÉNYJELLEMZŐK ÉS MEGKÖTÉSEK

### A. Kimitathatósági határ

A vak-határt (Limit of Blank, LoB), a kimitathatósági határt (Limit of Detection, LoD), és a mennyiségi mérés határát (Limit of Quantitation, LoQ), a CLSI EP17-A irányelvek alapján határoztuk meg.

Az LOB-t (Limit of Blank) úgy határoztuk meg sokszori vak mérés alapján, hogy a mérésátlagból levontuk a szórás 1.65-szörösét. Az így kapott értéket a kalibrátor görbéről visszaszámolva az LOB 0.03 ng/ml-nek adódott.

Az LOD-t (Limit of Detection) az LOB-ból és egy alacsony koncentrációjú minta szórásából számoltuk: LOB – 1.65x alacsony koncentrációjú minta 10 sorozatmérésből számolt szórása. Az LOD 0.06 ng/ml-nek adódott.

Az LOQ-t (Limit of Quantification) 7 alacsony koncentrációjú minta 10 sorozatban történő mérésére alapján határoztuk meg. Ennek alapján a 20% sorozatok közti CV-vel mérhető minta koncentrációja 0.1 ng/ml-nek adódott.

### B. Specificitás

A specificitást úgy határoztuk meg, hogy ismert 17OHP koncentrációjú (0.6 ng/ml) minta poolhoz a beteg mintában esetleg jelen lévő szteroid származékokat adtunk, majd mértünk.

Vegyület	Hozzáadott mennyiség (ng/ml)	Keresztreaktivitás (%)
17OH -progeszteron	-	100
Progeszteron	1000	0.45
17-a-hidroxipregnanolon	1000	0.22
21-deoxikortizol	1000	0.96
Pregnenolon	1000	0.01
11-deoxikortizol	1000	0.13
Kortikoszteron	10000	0.00
11-deoxikorticoszteron	1000	0.06
Tesztoszteron	5000	0.01
Androszténdion	5000	0.01
Ösztradiol	10000	0.00
17-a-hidroxipregnanolon szulfát	5000	ND

ND: nem detektálható

A mintákban esetlegesen megjelenő, a DiaSource 17-OHP ELISA tesztet zavaró interferáló anyagok hatását vizsgáltuk. Különböző hemoglobin, bilirubin and triglycerid szinteket teszteltünk különböző szérum 17-OHP koncentrációjával mellett. Elfogadható kritériumnak a 15%-osnál kisebb interferenciát tekintettük. Az említett anyagok nem voltak hatással 17-OHP ELISA teszt eredményeire.

Anyag	17OH-P (ng/mL)	Az interferáló komponens koncentrációja (mg/dL)	Minta koncentráció 17OH-P hozzáadása után (ng/ml)	Átlag % variáció
Hemoglobin	0.55	250	0.60	5.3%
		500	0.60	
	1.24	250	1.25	
		500	1.26	
Bilirubin	0.55	50	0.56	4.5%
		100	0.58	
	1.24	50	1.23	
		100	1.32	
Triglycerid	0.55	62.5	0.56	2.7%
		125	0.54	
		250	0.55	
	1.24	62.5	1.19	
		125	1.23	
		250	1.24	

## C. Pontosság

INTRA-ASSAY			
Minta	N	$\text{\langle X \rangle \pm SD$ (ng/ml)	C.V. (%)
A	24	$0.87 \pm 0.04$	4.2
B	24	$1.64 \pm 0.08$	4.8

INTER-ASSAY			
Minta	N	$\text{\langle X \rangle \pm SD$ (ng/ml)	C.V. (%)
A	14	$0.35 \pm 0.03$	8.5
B	14	$1.35 \pm 0.11$	8.4

SD: Standard deviáció; CV: Varációs koefficiens

## D. Valósság

VISSZANYERÉSI TESZT			
Minta	Várt koncentráció (ng/ml)	Mért koncentráció (ng/ml)	Visszanyerés (%)
1	-	0.59	
	10.59	10.17	96.0
	5.59	4.53	81.0
	1.59	1.85	116.1
2	-	0.82	
	10.82	12.86	118.9
	5.82	6.08	104.6
	1.82	2.03	111.8

  

HÍGÍTÁSI TEST			
Minta hígítás	Elméleti koncentráció (ng/ml)	Mért koncentráció (ng/ml)	Visszanyerés (%)
1/1	-	8.98	-
1/2	4.49	4.19	93.2
1/4	2.25	2.17	96.7
1/8	1.12	1.22	108.4
1/16	0.56	0.65	115.0
1/1	-	8.16	-
1/2	4.08	3.28	80.3
1/4	2.04	1.65	80.6
1/8	1.02	1.03	101.1
1/16	0.51	0.60	118.4

A mintákat a 0 kalibrátorral hígítottuk.

## E. Időeltolódás az utolsó kalibrátor és minta bemérése között

Amint lejebb mutatjuk, az assay eredményei megbízhatóak maradtak, amikor a munka 17-OHP-HRP konjugátumot 10 és 15 perccel a kalibrátor bemérése után adtuk a bevonatos mérőcellákhoz.

IDŐ ELTOLODÁS			
	0' (ng/ml)	10' (ng/ml)	15' (ng/ml)
Minta 1	0.68	0.71	0.74
Minta 2	2.81	3.30	3.14

## F. Újszülött mintákkal kapcsolatos megkötések

Nagyon fiatal gyermekek (< 3 hónapos kor) mintáiban magas a 17OH pregnenolon szulfát szintje. Annak ellenére, hogy gyakorlatilag nem találtunk keresztreakciót erre a molekulára, újszülött minták esetén extrakciót javaslunk. (X. B.)

## XIV. BELSŐ MINŐSÉGI KONTROL

- Ha a control 1 és control 2 eredménye nem esik az üveg címkéjén megjelölt tartományba, az eredmények nem használhatók hacsak nem adható ésszerű magyarázat az eltérésre.
- Ha kívánatos, minden laboratórium készíthet saját minta-poolt kontroláláshoz melyet alkvotokban le tud fagyasztni. Ha a kontrol minta azidot tartalmaz, az interferálhat az enzimereakcióval és emiatt nem használható.
- A duplikátum eredmények közti különbség elfogadási kritériumának megállapításához a Good Laboratory Practis előírásaira kell támaszkodni.
- Javasolt, hogy a kontrolokat ismerten mintaként mérjék a rutin meghatározások során, hogy megállapítsák az assay variabilitását. Az assay teljesítményét minőségi kontrol kártyával kellene monitorozni.
- Jó gyakorlat a komputer által kiválasztott görbe illesztés vizuális ellenőrzése.

## XV. VÁRT ÉRTÉKEK

Ezek az értékek csak útmutatásként szolgálnak; minden laboratóriumnak meg kellene határozni a saját referencia tartományát.

	Koncentráció tartomány (2.5 to 97.5% percentilis) (ng/ml)	Páciensek száma
Normál férfiak	0.37 – 2.38	38
Normál nők		
Follicularis fázis	0.32 – 0.82	28
Lutealis fázis	0.79 - 3.29	34
Terhesség		
Első és második trimester	1.3 – 3.9	25
Harmadik trimester	2.2 – 12.4	14

Gyermekek:	Páciensek száma:	KAP1401 extrakció nélküli Koncentráció tartomány (2.5 to 97.5% percentilis) ng/ml	KAP1401 extrakcióval Koncentráció tartomány (2.5 to 97.5% percentilis) ng/ml
Newborns:			
0 - 1 hónapos	20	1.41 – 16.81	0.36 - 2.5
1 - 2 hónapos	44	1.44 – 8.27	0.37 - 1.68
2 - 3 hónapos	27	1.11 – 6.01	0.25 - 1.83
3 - 4 hónapos	4	1.58 – 6.39	0.56 - 2.14
1 - 2 éves	20	0.11 – 0.50	NA
2 - 10 éves	40	0.11 – 1.04	NA
11 - 14 éves	12	0.40 – 2.00	NA
14 - 18 éves	11	0.69 – 2.95	NA

## XVI. ÖVINTÉZKEDÉSEK ÉS FIGYELMEZTETÉSEK

### Safety

Csak *in vitro* diagnosztikai használatra.

A kitben található humán vér komponenseket az Európai Unió és az FDA által engedélyezett módszerekkel vizsgálták és negatívnak találták HBsAg-re, anti-HCV-re, anti-HIV-1-re és 2-re. Nincs olyan módszer, mely teljes biztonsággal tudná bizonyítani, hogy a human vér tartalmazó komponensek nem okoznak hepatitis, AIDS vagy más fertőzést. Ezért a reagenseket, szérum vagy plazma mintákat a helyi biztonsági előírásnak megfelelően kell kezelni.

Minden állati termék és származék egészséges állatokból származik. Marha komponensek olyan országból származnak, ahol nem írták le a BSE előfordulását. Mindamellett az állatból származó komponenseket potenciálisan fertőzőnek kell tekinteni.

Kerlüje, hogy bármelyik komponens bőrével érintkezzen. A stop oldat H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>-t tartalmaz. Ha közvetlenül érintkezne vele, bő vízzel alaposan mosza le.

Ne dohányozzon, igyon, egyen vagy ne használjon kozmetikumot a munkaterületen. Ne pipettázzon szájjal. Használjon védőruházatot és eldobható kesztyűt.

## XVII. IRODALOM

- ANDO S. et al (1983)  
Plasma levels of 17-OH-progesterone and testosterone in patients with varicoceles.  
Acta Endocrinologica, 102,463-469.

2. BONACCORSI A. et al (1987)  
**Male infertility due to congenital adrenal hyperplasia: testicular biopsy findings, hormonal evaluation, and therapeutic results in three patients.**  
Fertility and Sterility, 47, 4, 664-670.

3. CACCIARE et al (1987)  
**Neonatal screening program for congenital adrenal hyperplasia in a homogeneous Caucasian population.**

Annals New York Academy of sciences 85-88.

4. DRAFTA D. et al (1982)  
**Plasma szteroids in benign prostatic hypertrophy and carcinoma of the prostate.**  
J. Szteroid Biochem. 17, 689-693.

5. GRANOFF A. et al (1985)  
**17-hydroxyprogesterone responses to adrenocorticotropin in children with premature adrenarche.**  
Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism, 3, 409-415.

6. NEW M. et al (1983)  
**Genotyping szteroid 21-hydroxylase deficiency hormonal reference data.**  
Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism 57, 320-326.

7. SOLYOM J. et al (1987)  
**Detection of late-onset adrenal hyperplasia in girls with peripubertal virilization.**  
Acta Endocrinologica (Copenh.) 115, 413-418.

#### XVIII. A PROTOKOLL ÖSSZEOGLALÁSA

	KALIBRÁTOROK (µl)	MINTÁ(K) Kontrollok (µl)
Kalibrátors (0-6)	25	-
Kontrollok, minták vagy extrahált minták	-	25
17-OHP HRP Konjugátum	200	200
Mikrotiterlemez rázón (400 rpm) inkubáljon 1 óra hosszat szobahőmérsékleten (18-25°C-on).		
Szívja le a folyadékot minden egyes mérőcellából.		
Mossa a lemezt 3x		
Chromogenic Solution	100	100
Incubálja a mikrotiterlemezt 30 percen át szobahőmérsékleten (18-25°C-on), lemez rázón (400 rpm).		
Stop Solution	100	100
Olvassa le az abszorbanciát 450 nm-en (referencia szűrő 630 nm vagy 650 nm).		

DIAsource's Instrumentation Service felajánlja egy olyan protokoll beszerzési lehetőségét, mely lehetővé teszi a kit felhasználását a Stratec Gemini 2PS + Combo platformon. Ez magában foglalja a protokoll assay file-t, regains file-t és a legjobb felhasználási javaslatokat a kit készüléken történő használatára vonatkozóan.

Amennyibe további információra lenne szüksége lépjünk kapcsolatba velünk:  
[Instrumentation@diasource.be](mailto:Instrumentation@diasource.be)

A használati útmutató további fordításai weboldalunkról letölthető:  
<https://www.diasource-diagnostics.com/>

DIAsource katalógusszám:	Revíziószám:
KAP1401	220516