



IVD

CE

17 α -HYDROXYPROGESTERONE (17-OHP)-RIA-CT

KIP1409

Version : 230911

Date of issue : 11/09/2023

Revision date: 11/09/2023

History

Summary of change:

Current Version: 230123	Current Version: 230911
	Correction in the Korean translation only : Addition of the Extraction protocol for newborn samples Other languages remain unchanged

Read entire protocol before use.

17 α -HYDROXYPROGESTERONE (17-OHP)-RIA-CT

I. INTENDED USE

Radioimmunoassay for the *in vitro* quantitative measurement of human 17 α -hydroxyprogesterone (17-OHP) in serum and plasma.

II. GENERAL INFORMATION

- A. **Proprietary name :** DIAsource 17 α -HYDROXYPROGESTERONE (17-OHP)-RIA-CT Kit
- B. **Catalog number :** KIP1409 : 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 84.99.91

III. CLINICAL BACKGROUND

A. *Biological activities of 17-hydroxyprogesterone*

17 α -hydroxyprogesterone (17-OHP) is a C-21 steroid hormone (molecular weight 330.3) which is produced from 17 α -hydroxypregnenolone 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 α -hydroxyprogesterone determination*


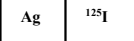

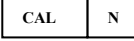


As a rule, serum or amniotic fluid 17-OHP dosages are relevant to diagnose congenital adrenal hyperplasia (CAH). This CAH is due to a specific enzyme defect (six distinct enzyme deficiencies have been described). As a result of these deficiencies, ACTH increases and produces adrenal hyperplasia and the 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) (plasma 17-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

A fixed amount of ¹²⁵I labelled steroid competes with the steroid to be measured present in the sample or in the calibrator for a fixed amount of antibody sites immobilized on the wall of a polystyrene tube. Neither extraction nor chromatography is required because of the high specificity of the coated antibodies. After 3 hours incubation at 37°C, an aspiration step terminates the competition reaction. The tubes are then washed with 3 ml of washing solution and aspirated. 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	96 Test Kit	Reconstitution
 Tubes coated with anti 17-OHP	2 x 48	Ready for use
 TRACER: ¹²⁵ Iodine labelled 17-OHP (HPLC grade) in phosphate/citric acid buffer with bovine casein and azide (<0.1%)	1 vial 55 ml 190 kBq	Ready for use
 Zero calibrator in human serum and azide (0.5%)	1 vial 3 ml	Ready for use
 Calibrators 17-OHP N = 1 to 5 (see exact values on vial labels) in human serum and azide (0.5%)	5 vials 0.5 ml	Ready for use
 Wash solution (TRIS-HCl)	1 vial 10 ml	Dilute 70 x with distilled water (use a magnetic stirrer).
 Controls - N = 1 or 2 in human plasma and thymol	2 vials lyophilized	Add 0.5 ml distilled water

Note : Use the zero calibrator for sample dilutions.

VI. SUPPLIES NOT PROVIDED

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

- Distilled water
- Pipettes for delivery of: 25 µl, 500 µl and 3 ml (the use of accurate pipettes with disposable plastic tips is recommended)
- Vortex mixer
- Magnetic stirrer
- Water bath at 37°C
- 5 ml automatic syringe (Cornwall type) for washing
- Aspiration system (optional)
- Any gamma counter capable of measuring ¹²⁵I may be used (minimal yield 70%).
- Incubator at 37°C
- Optional (for extraction)**
- Diethyl ether (analytical grade; purity > 98%)
- Disposable glass tubes (12 x 75 mm), with stoppers.
- DIAsource Reconstitution Solution for (17-OHP)-RIA-CT. ref: 32.140.74.

VII. REAGENT PREPARATION

- Controls** : Reconstitute the controls with 0.5 ml distilled water.
- Working Wash solution** : Prepare an adequate volume of Working Wash solution by adding 69 volumes of distilled water to 1 volume of Wash Solution (70x). 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 kit components are stable until the expiry date, indicated on the label, if kept at 2 to 8°C.
- After reconstitution, controls are stable for one week at 2 to 8°C. For longer storage periods, aliquots should be made and kept at -20°C for 3 months.
- Freshly prepared Working Wash solution should be used on the same day.
- After its first use, tracer is stable until expiry date, if kept in the original well-closed vial at 2 to 8°C.
- Alterations in physical appearance of kit reagents may indicate instability or deterioration.

IX. SPECIMEN COLLECTION AND PREPARATION

- Serum or plasma samples must be kept at 2-8°C.
- If the test is not run within 48 hrs., storage at -20°C is recommended.
- Avoid successive freezing and thawing.
- Heparinized plasma provide 10% lower results than serum :
Y (hep. plasma) = 0.9 x (Serum) + 0.20 r = 0.92 n = 20
- EDTA plasma provides 10% lower results than serum :
Y (EDTA plasma) = 0.9 x (Serum) + 0.18 r = 0.87 n = 20

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 prior to use.
Thoroughly mix all reagents and samples by gentle agitation or swirling.
Use a clean disposable pipette tip for addition of each different reagent and sample in order to avoid cross-contamination. High precision pipettes or automated pipetting equipment will improve the precision.
Respect the incubation times.
Prepare a calibration curve for each run, do not use data from previous runs.

B. Extraction of newborn samples (optional) – FOR SERUM SAMPLE

- Label one glass tube for each sample (**do not extract calibrators or controls**).
- Pipette 75 µl of serum, followed by 2.25 ml of diethyl ether.
- Vortex all the tubes vigorously (2 x 1 minute)
- Let stand on the table for 5 minutes
- Place the tubes at -20°C in order to freeze the aqueous phase.
- Prepare a second series of glass tubes and, for each sample, transfer the organic phase into these new tubes. Avoid contamination by the aqueous phase.
- Evaporate the organic (ether) phase completely under a stream of air or by placing the tubes at 37°C (water bath). Manipulate under a hood.
- Dissolve the dry ether extract with 150 µl of Reconstitution solution (**not provided, see VI**). Vortex vigorously for 1 minute.
- Let stand for 10-15 minutes and vortex again for 1 minute. These volumes allow to perform the determination in duplicate.

C. Procedure

- Label coated tubes in duplicate for each calibrator, sample and control. For the determination of total counts, label 2 normal tubes
- Briefly vortex calibrators, samples and controls and dispense 25µl of each into respective tubes. **For extracted newborn samples, pipette 50 µl instead of 25 µl.**
- Dispense 0.5 ml of ¹²⁵Iodine labelled 17-OHP into each tube, including the uncoated tubes for total counts.
- Shake the tube rack gently by hand, to liberate any trapped bubbles.
- Incubate for 3 hours at 37°C.
- Aspirate (or decant) the content of each tube (except total counts). Be sure that the plastic tip of the aspirator reaches the bottom of the coated tube in order to remove all the liquid.
- Wash tubes with 3 ml Working Wash solution (except total counts) and aspirate (or decant). Avoid foaming during the addition of the Working Wash solution.
- Let the tubes stand upright for two minutes and aspirate the remaining drop of liquid.
- Count tubes in a gamma counter for 60 seconds.

XI. CALCULATION OF RESULTS

- Calculate the mean of duplicate determinations.
- Calculate the bound radioactivity as a percentage of the binding determined at the zero calibrator point (0) according to the following formula :

$$B/B_0(\%) = \frac{\text{Counts (Calibrator or sample)}}{\text{Counts (Zero Calibrator)}} \times 100$$

- Using a 3 cycle semi-logarithmic or logit-log graph paper, plot the (B/B₀(%)) values for each calibrator point as a function of the 17-OHP concentration of each calibrator point, reject obvious outliers.
- 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.
- By interpolation of the sample (B/B₀(%)) values, determine the 17-OHP concentrations of the samples from the reference curve.
- The obtained concentration for extracted newborn samples (see X.B.) can be read directly on the curve (no correction factor needed)
- For each assay, the percentage of total tracer bound in the absence of unlabelled 17-OHP (B₀/T) must be checked.

XII. TYPICAL DATA

The following data, obtained with a 6 weeks old tracer, are for illustration only and should never be used instead of the real time calibration curve.

(17-OHP)-RIA-CT	cpm	B/B ₀ (%)
Total count	32363	
Calibrator		
0.00 ng/ml	12596	100.0
0.17 ng/ml	9769	77.6
0.59 ng/ml	6529	51.8
1.4 ng/ml	3752	29.8
4.3 ng/ml	1396	11.1
14.0 ng/ml	479	3.8

XIII. PERFORMANCE AND LIMITATIONS

A. Sensitivity

The LoB (Limit of Blank) was tested by measuring 20 times the blank and was calculated as the mean ± 2 Standard Deviation of the distribution of test values.

LoB was calculated at 0.03 ng/ml.

The LoD (Limit of Detection) was calculated as the LoB ± 1.645 Standard Deviation of a low concentration sample measured in 10 different tests.

The LoD was calculated at 0.09 ng/ml.

The LoQ (Limit of Quantification) was calculated by testing 4 low concentration samples, in 10 different assays.

The LoQ was calculated at 0.14 ng/ml.

B. Specificity

The specificity was estimated by spiking a pool of 17-OHP samples (± 0.5 ng/ml) with steroids which might be present in patient samples.

Compound	Added amount (ng/ml)	Cross-Reactivity (%)
17α-hydroxyprogesterone	-	100
Progesterone	500	0.7
17α-hydroxypregnenolone	1000	0.3
21-deoxycortisol	1000	1.07
Pregnenolone	500	0.02
11-deoxycortisol	500	0.21
Corticosterone	1000	0.008
11-deoxycorticosterone	500	0.24
Cortisol	5000	0.005
Testosterone	5000	0.004
Androstenedione	5000	0.01
Estradiol	1000	0.008
17α-hydroxypregnenolone sulfate	5000	0.34

The effect of potential interfering substances on samples using the DIASource 17OHP-RIA-CT was evaluated. Different levels of Hemoglobin, Bilirubin, Triglyceride and Bilirubin Conjugate in serum samples were tested on samples with different 17α-hydroxyprogesterone concentrations. Our acceptance criteria was to have interference of less than 10%. The tested substances did not affect the performance of the DIASource 17OHP-RIA-CT test.

Substance	17OHP (ng/ml)	Concentration of interferent (mg/dl)	Mean Variation
Hemoglobin	0.57	250	98.6%
		500	
	1.8	250	
Bilirubin Conjugated	0.57	50	95.1%
	1.8	50	
Bilirubin unconjugated	0.57	50	99.2%
		100	
	1.8	50	
Triglyceride	0.57	50	97.0%
		100	
		250	
		500	
		1000	
	1.54	50	
		100	
		250	
		500	
		1000	

C. Precision

INTRA-ASSAY

INTRA-ASSAY

AFTER EXTRACTION

Serum	N	<X> ± SD (ng/ml)	CV (%)	Serum	N	<X> ± SD (ng/ml)	CV (%)
A	20	0.73 ± 0.05	6.8	C	24	0.56 ± 0.06	10.7
B	20	1.94 ± 0.09	4.6	D	24	1.81 ± 0.17	9.4

SD : Standard Deviation; CV: Coefficient of variation

INTER-ASSAY

INTER-ASSAY

AFTER EXTRACTION

Serum	N	<X> ± SD (ng/ml)	CV (%)	Serum	N	<X> ± SD (ng/ml)	CV (%)
A	12	0.69 ± 0.06	8.7	A	8	0.72 ± 0.13	18
B	12	2.08 ± 0.16	7.6	B	8	2.03 ± 0.39	19.2

SD : Standard Deviation; CV: Coefficient of variation

D. Accuracy

DILUTION TEST

Serum	Dilution	Theoretical Concent. (ng/ml)	Measured Concent. (ng/ml)
	1/1	-	3.3
	1/2	1.65	1.79
	1/4	0.83	1.0
	1/8	0.42	0.5
	1/16	0.21	0.27

Samples were diluted with the zero calibrator.

RECOVERY TEST

Sample	added 17-OHP (ng/ml)	Recovered 17-OHP (ng/ml)	Recovered (%)
1	6	5.7	95
	3	2.99	99
	1.5	1.64	109
	0.75	0.81	108
2	6	5.27	87
	3	2.86	95
	1.5	1.49	99
	0.75	0.74	98

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.

E. Time delay between last calibrator and sample dispensing

As shown hereafter, assay results remain accurate even when a sample is dispensed 40 minutes after the calibrator has been added to coated tubes.

TIME DELAY

Sample (ng/ml)	0'	10'	30'	40'
Sample 1	0.63	0.65	0.73	0.74
Sample 2	2.03	2.4	2.37	2.2

F. Limitations for newborn samples

Very young children (< 3 months old) present high levels of 17 α -hydroxypregnenolone 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

- The percentage of total tracer bound in the absence of unlabelled 17-OHP (B0/T) must be > 25%.
- 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. Do not freeze-thaw more than twice.
- Acceptance criteria for the difference between the duplicate results of the samples should rely on Good Laboratory Practises.

XV. REFERENCE INTERVALS

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	0.67 – 3.32	79
Normal Females		
. Follicular phase	0.41 – 2.27	50
. Luteal phase	0.23 – 3.87	28
Pregnancy		
. First trimester	2.60 – 7.95	30
. Second trimester	1.83 – 9.74	30
. Third trimester	3.54 – 18.97	15
Newborns (after extraction)	0.34 – 1.96	23 (0 to 3 months)

XVI. PRECAUTIONS AND WARNINGS

Safety

For in vitro diagnostic use only.

This kit contains ¹²⁵I (half-life: 60 days) ,emitting ionizing X (28 keV) and γ (35.5 keV) radiations.

This radioactive product can be transferred to and used only by authorized persons. Purchase, storage, use and exchange of radioactive products are subject to the legislation of the end user's country. In no case the product must be administered to humans or animals.

All radioactive handling should be executed in a designated area, away from regular passage. A logbook for receipt and storage of radioactive materials must be kept in the lab. Laboratory equipment and glassware, which could be contaminated with radioactive substances, should be segregated to prevent cross contamination of different radioisotopes.

Any radioactive spills must be cleaned immediately in accordance with the radiosafety procedures. The radioactive waste must be disposed of following the local regulations and guidelines of the authorities holding jurisdiction over the laboratory. Adherence to the basic rules of radiation safety provides adequate protection.

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 reagents (sodium azide as preservative). Azide in this kit may react with lead and copper in the plumbing and in this way form highly explosive metal azides. During the washing step, flush the drain with a large amount of water to prevent azide build-up.

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

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. SUMMARY OF THE PROTOCOL

	TOTAL COUNTS (μl)	CALIBR ATORS (μl)	SAMPLE(S) CONTROLS (μl)	EXTRACTED SAMPLES (μl)
Calibrators (0-5)	-	25	-	-
Samples, controls	-	-	25	-
Extracted samples	-	-	-	50
Tracer	500	500	500	500
Incubation	3 hours at 37°C			
Separation Working Wash solution Separation	-	aspirate 3.0 ml aspirate carefully		
Counting	Count tubes for 60 seconds			

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

Lire entièrement le protocole avant utilisation.

17 α -HYDROXYPROGESTERONE (17-OHP)-RIA-CT

I. BUT DU DOSAGE

Trousse de dosage radio-immunologique pour la mesure quantitative *in vitro* de la 17 α -hydroxyprogestérone (17-OHP) dans le sérum et le plasma humain.

II. INFORMATIONS GENERALES

- A. **Nom du produit :** DIAsource 17 α -HYDROXYPROGESTERONE (17-OHP)-RIA-CT kit
- B. **Numéro de catalogue:** KIP1409 : 96 tests
- C. **Fabriqué par :** DIAsource ImmunoAssays S.A.
Rue du Bosquet, 2, B-1348 Louvain-la-Neuve, Belgique.

Pour une assistance technique ou une information sur une commande :

Tel: +32 (0) 10 84.99.11

Fax: +32 (0) 10 84.99.91

III. CONTEXTE CLINIQUE

A. *Activités biologiques de la 17 α -hydroxyprogestérone*

La 17 α -hydroxyprogestérone (17-OHP) est une hormone C-21 stéroïde (poids moléculaire 330.3) produite à partir de la 17 α -hydroxypregnénolone dans les glandes surrénales et aussi dans les ovaires, les testicules et le placenta. La 17-OHP est hydroxylée aux positions 11 et 21 pour produire du cortisol via le 11-deoxycortisol.


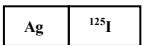
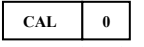

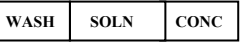
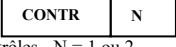
B. *Applications cliniques de la détermination de la 17 α -hydroxyprogestérone*

En général, le sérum ou les doses de liquide amniotique 17-OHP sont importants pour le diagnostic de l'hyperplasie surrénale congénitale (CAH). Cette CAH est due à une insuffisance d'enzyme spécifique (six déficiences d'enzymes distinctes ont été décrites). Par suite de ces déficiences, l'ACTH augmente et cause l'hyperplasie surrénale et le développement de beaucoup de précurseurs de stéroïdes. Mais il est aussi très intéressant de connaître la quantité de 17-OHP présente chez les patients atteints de varicèle (la 17-OHP et la testostérone représentent des marqueurs de la fonction cellulaire de Leydig) et chez les patients masculins vieillissants pour détecter l'hypertrophie prostatique bénigne (BPH) et le carcinome de la prostate (PCA) (plasma 17-OHP est considérablement plus bas dans les groupes PCA et BPH que dans les hommes normaux). Il y a d'autres domaines pour l'investigation de la 17-OHP comme: l'infertilité masculine, des filles avec une virilisation péripubérale, des enfants avec l'adrénarcho prématurée (dans ces cas les valeurs de 17-OHP ont augmenté sans ou après la stimulation ACTH).

IV. PRINCIPE DU DOSAGE

Une quantité fixe de 17-OHP marquée à ^{125}I est en compétition avec la 17-OHP à mesurer et présente dans l'échantillon ou dans le calibrateur pour une quantité fixe d'anticorps immobilisés sur les parois du tube en polystyrène. Aucune extraction ni chromatographie n'est requise à cause de la haute spécificité de l'anticorps fixé. Après 3 heures d'incubation à 37°C, le liquide est aspiré pour terminer la réaction de compétition. Les tubes sont lavés avec 3 ml de Solution de Lavage et aspirés à nouveau. Une courbe de calibration est réalisée et la concentration en 17-OHP des échantillons est déterminée par interpolation de la dose sur la courbe de calibration.

V. REACTIFS FOURNIS

Réactifs	96 Tests	Reconstitution
 Tubes recouverts avec l'anti 17-OHP	2 x 48	Prêt à l'emploi
 TRACEUR: 17-OHP marquée à ^{125}I Iodine (grade HPLC) dans un tampon phosphate / acide citrique avec de la caséine bovine et de l'azide de sodium (<0,1%)	1 flacon 55 ml 190 kBq	Prêt à l'emploi
 Calibrateur zéro dans du sérum humain et de l'azide de sodium (0,5%)	1 flacon 3 ml	Prêt à l'emploi
 Calibrateurs 17-OHP - N = 1 à 5 (cfr. valeurs exactes sur chaque flacon) dans du sérum humain et de l'azide de sodium (0,5%)	5 flacons 0,5 ml	Prêt à l'emploi
 Solution de lavage (TRIS-HCl)	1 flacon 10 ml	Diluer 70x avec de l'eau distillée (utiliser un agitateur magnétique).
 Contrôles - N = 1 ou 2 dans du plasma humain et thymol	2 flacons lyophilisés	Ajouter 0,5 ml d'eau distillée

Note : Utiliser le calibrateur "0" pour la dilution des échantillons.

VI. MATERIEL NON FOURNI

Le matériel mentionné ci-dessous est requis mais non fourni avec la trousse:

- Eau distillée
- Pipettes pour distribuer: 25 μl , 500 μl et 3 ml (l'utilisation de pipettes précises et de pointes jetables en plastique est recommandée)
- Agitateur vortex
- Agitateur magnétique
- Bain d'eau à 37°C
- Seringue automatique de 5 ml (type Cornwall) pour les lavages
- Système d'aspiration
- Tout compteur gamma capable de mesurer ^{125}I peut être utilisé (rendement minimum 70%).
- Incubateur à 37°C
- Optionnel (pour l'extraction)**
- Diethyl ether (p.a., pureté >98%)**
- Tubes en verres (12 x 75 mm) avec bouchons**
- Solution de Reconstitution pour la (17OHP)-RIA-CT. DIAsource réf :32.140.74**

VII. PREPARATION DES REACTIFS

- Contrôles :** Reconstituer les contrôles avec 0,5 ml d'eau distillée.
- Solution de Lavage :** Préparer un volume adéquat de Solution de Lavage en ajoutant 69 volumes d'eau distillée à 1 volume de Solution de Lavage (70x). Utiliser un agitateur magnétique pour homogénéiser. Eliminer la Solution de Lavage non utilisée à la fin de la journée.

VIII. STOCKAGE ET DATE D'EXPIRATION DES REACTIFS

- Avant l'ouverture ou la reconstitution, tous les composants de la trousse sont stables jusqu'à la date d'expiration, indiquée sur l'étiquette, si la trousse est conservée entre 2 et 8°C.
- Après reconstitution, les contrôles sont stables pendant une semaine entre 2 et 8°C. Pour de plus longues périodes de stockage, des aliquots devront être réalisés et ceux-ci seront gardés à -20°C pour 3 mois.
- La Solution de Lavage préparée doit être utilisée le jour même.
- Après la première utilisation, le traceur est stable jusqu'à la date d'expiration, si celui-ci est conservé entre 2 et 8°C dans le flacon d'origine correctement fermé.
- Des altérations dans l'apparence physique des réactifs de la trousse peuvent indiquer une instabilité ou une détérioration.

IX. PREPARATION ET STABILITE DE L'ECHANTILLON

- Les échantillons de sérum ou de plasma doivent être gardés entre 2 et 8°C.
- Si le test n'est pas réalisé dans les 48 heures, un stockage à -20°C est recommandé.
- Eviter des cycles de congélation et décongélation successifs.
- Le plasma hépariné donne des résultats de 10% inférieurs à ceux du sérum
 $Y(\text{plasma hép}) = 0,9 \times (\text{Sérum}) + 0,20$ $r = 0,92$ $n = 20$
- Le plasma EDTA donne des résultats de 10% inférieurs à ceux du sérum :
 $Y(\text{plasma EDTA}) = 0,9 \times (\text{Sérum}) + 0,18$ $r = 0,87$ $n = 20$

X. MODE OPERATOIRE

A. Notes de manipulation

Ne pas utiliser la trousse ou ses composants après avoir dépassé la date d'expiration. Ne pas mélanger de matériel provenant de trousses de lots différents. Mettre tous les réactifs à température ambiante avant utilisation.
Mélanger à fond tous les réactifs et les échantillons sous agitation douce. Pour éviter toute contamination croisée, utiliser une nouvelle pointe de pipette pour l'addition de chaque réactif et échantillon. Des pipettes de haute précision ou un équipement de pipetage automatique permettent d'augmenter la précision. Respecter les temps d'incubation. Préparer une courbe de calibration pour chaque nouvelle série d'expériences, ne pas utiliser les données d'expériences précédentes.

B. Extraction des échantillons des nouveau-nés (optionnelle) – POUR ECHANTILLON SERIQUÉ

- Identifier un tube en verre pour chaque échantillon (**ne pas extraire les calibrateurs / contrôles**)
- Distribuer 75 μl de sérum, suivi de 2,25 ml de diethyl ether.
- Vortexer tous les tubes vigoureusement (2 x 1 minute).
- Laisser reposer les tubes droits durant 5 minutes.
- Placer les tubes à -20°C afin de congeler la phase aqueuse.
- Préparer une seconde série de tubes en verre et, pour chaque échantillon, transférer la phase organique dans ces nouveaux tubes. Eviter la contamination par la phase aqueuse.
- Evaporer complètement la phase organique (ether) sous flux d'air continu ou en plaçant les tubes à 37°C (bain-marie). Effectuer la manipulation sous une hotte.
- Dissoudre l'extrait sec avec 150 μl de solution de reconstitution (**non fourni, voir VI**). Vortexer vigoureusement durant 1 minute.
- Laisser reposer les tubes droit 10-15 minutes et vortexer à nouveau durant 1 minute. Ces volumes permettent d'effectuer les déterminations en duplicat.

C. Mode opératoire

- Identifier les tubes recouverts fournis dans la trousse en double pour chaque calibrateur, échantillon, contrôle. Pour la détermination de l'activité totale, identifier 2 tubes non recouverts.
- Agiter au vortex brièvement les calibrateurs, les échantillons et les contrôles. Puis distribuer 25 μl de chacun d'eux dans leurs tubes respectifs. Pour les échantillons extraits des nouveau-nés, distribuer 50 μl au lieu de 25 μl .
- Distribuer 0,5 ml de 17-OHP marquée à ^{125}I dans chaque tube, y compris les tubes sans anticorps pour la détermination de l'activité totale.
- Agiter gentiment le portoir de tube pour libérer toute bulle d'air emprisonnée.
- Incuber pendant 3 heures à 37°C.
- Aspirer le contenu de chaque tube (à l'exception des tubes utilisés pour la détermination de l'activité totale). Assurez-vous que la pointe utilisée pour aspirer le liquide des tubes atteint le fond de chacun d'eux pour éliminer toute trace de liquide.
- Laver les tubes avec 3 ml de Solution de Lavage (à l'exception des tubes utilisés pour la détermination de l'activité totale) et aspirer. Eviter la formation de mousse pendant l'addition de la Solution de Lavage.
- Laisser les tubes droits pendant 2 minutes et aspirer le reste de liquide.

9. Placer les tubes dans un compteur gamma pendant 60 secondes pour quantifier la radioactivité.

XI. CALCUL DES RESULTATS

- Calculer la moyenne de chaque détermination réalisée en double.
- Calculer la capacité de liaison de l'essai comme un pourcentage de liaison déterminé au point de calibration (0) en suivant la formule ci-dessous :

$$B/B_0(\%) = \frac{\text{moyenne des cpm (CAL ou échantillon)}}{\text{moyenne des cpm (CAL 0)}} \times 100$$

- Utiliser un "3 cycle semi-logarithmique" ou un papier graphique "logit-log", porter en ordonnée les valeurs exprimées en pourcentage de liaison (B/B₀(%)) de chaque point de calibration et en abscisse leur concentration respective en 17-OHP, écarter les valeurs aberrantes.
- Des méthodes informatiques peuvent aussi être utilisées pour construire la courbe de calibration. Si un système d'analyse de traitement informatique des données est utilisé, il est recommandé d'utiliser la fonction « 4 paramètres » du lissage de courbes.
- L'interpolation des valeurs de chaque échantillon (B/B₀(%)) détermine les concentrations en 17-OHP à partir de la courbe de calibration.
- Les concentrations obtenue pour les échantillons extraits des nouveau-nés (voir X.B.) peuvent être lues directement sur la courbe de calibration (il n'y a pas de facteur de correction)
- Pour chaque essai, le pourcentage total de traceur lié en absence de 17-OHP non marquée (B₀/T) doit être vérifié.

XII. DONNEES TYPES

Les données représentées ci-dessous, obtenues avec un traceur de 6 semaines, sont données pour information et ne peuvent jamais être utilisées à la place d'une courbe de calibration.

(17-OHP)-RIA-CT		cpm	B/Bo (%)
Activité totale		32363	
Calibrateur	0,00 ng/ml	12596	100,0
	0,17 ng/ml	9769	77,6
	0,59 ng/ml	6529	51,8
	1,4 ng/ml	3752	29,8
	4,3 ng/ml	1396	11,1
	14,0 ng/ml	479	3,8

XIII. PERFORMANCE ET LIMITES DU DOSAGE

A. Sensibilité

La LoB (Limite de Blanc) a été testée en mesurant 20 fois le blanc et a été calculée comme la moyenne \pm 2 Déviations Standards de la distribution des valeurs d'essai.

La LoB a été calculée à 0,03 ng/ml.

La LoD (Limite de Détection) a été calculée comme étant la LoB \pm 1.645 Déviations Standards d'un échantillon de faible concentration mesuré dans 10 essais différents.

La LoD a été calculée à 0.09 ng/ml.

La LoQ (Limite de Quantification) a été calculée en testant 4 échantillons de faible concentration, dans 10 essais différents.

La LoQ a été calculée à 0,14 ng/ml.

B. Spécificité

La spécificité a été estimée en ajoutant les stéroïdes qui peuvent être présents dans les échantillons des patients à un pool d'échantillons de 17-OHP (\pm 0.5 ng/ml).

Composé	Quantité ajoutée (ng/ml)	Réactivité Croisée (%)
17 α -hydroxyprogestérone	-	100
Progestérone	500	0,7
17 α -hydroxypregnénone	1000	0,3
21-deoxycortisol	1000	1,07
Pregnénone	500	0,02
11-deoxycortisol	500	0,21
Corticostérone	1000	0,008
11-deoxycorticostérone	500	0,24
Cortisol	5000	0,005
Testostérone	5000	0,004
Androsténédione	5000	0,01
Estradiol	1000	0,008
17 α -hydroxypregnénone sulfate	5000	0,34

L'effet de substances susceptibles d'interférer avec les échantillons soumis au test DIASource 17OHP-RIA-CT a été évalué. Différentes concentrations d'hémoglobine, de bilirubine, de triglycérides et de conjugué de bilirubine dans les échantillons sériques ont été testées sur des échantillons contenant de la 17 α -hydroxyprogestérone à des concentrations différentes. Nos critères d'acceptation étaient d'avoir une interférence inférieure à 10%. Les substances testées n'ont pas affecté les performances du test DIASource 17OHP-RIA-CT.

Substance	17OHP (ng/ml)	Concentration de l'agent interférent (mg/dl)	Moyenne de variation	
Hémoglobine	0,57	250	98.6%	
		500		
		250		
Bilirubine conjuguée	0,57	50	95.1%	
		1,8		50
		0,57		50
Bilirubine non conjuguée	1,8	50	99.2%	
		100		
		50		
Triglycéride	0.57	50	97.0%	
		100		
		250		
		500		
		1000		
		50		
	1.54	100		
		250		
		500		
		1000		
		50		
		1000		

C. Précision

INTRA-ESSAI

INTRA-ESSAI

APRÈS EXTRACTION

Sérum	N	<X> \pm SD (ng/ml)	CV (%)	Sérum	N	<X> \pm SD (ng/ml)	CV (%)
A	20	0,73 \pm 0,05	6,8	A	24	0,56 \pm 0,06	10,7
B	20	1,94 \pm 0,09	4,6	B	24	1,81 \pm 0,17	9,4

SD : Déviation Standard ; CV : Coefficient de variation

INTER-ESSAI

INTER-ESSAI

APRÈS EXTRACTION

Sérum	N	<X> \pm SD (ng/ml)	CV (%)	Sérum	N	<X> \pm SD (ng/ml)	CV (%)
A	12	0,69 \pm 0,06	8,7	A	8	0,72 \pm 0,13	18
B	12	2,08 \pm 0,16	7,6	B	8	2,03 \pm 0,39	19,2

SD : Déviation Standard ; CV : Coefficient de variation

D. Exactitude

TEST DE DILUTION

Echantillon	Dilution	Concent. Théorique (ng/ml)	Concent. Mesurée (ng/ml)
	1/1	-	3,3
	1/2	1,65	1,79
	1/4	0,83	1,0
	1/8	0,42	0,5
	1/16	0,21	0,27

L'échantillon a été dilué avec le calibrateur zéro.

TEST DE RECUPERATION

Echantillon	17-OHP ajouté (ng/ml)	17-OHP récupéré (ng/ml)	Recupération (%)
1	6	5,7	95
	3	2,99	99
	1,5	1,64	109
	0,75	0,81	108
2	6	5,27	87
	3	2,86	95
	1,5	1,49	99
	0,75	0,74	98

Facteur de conversion:

De ng/ml à nmol/L : x 3,03

De nmol/L à ng/ml : x 0,33

A notre connaissance, aucun matériel de référence internationale n'existe pour ce paramètre.

E. Délai entre la distribution du dernier calibrateur et celle de l'échantillon

Comme montré ci-dessous, les résultats d'un essai restent précis même quand un échantillon est distribué 40 minutes après que le calibrateur a été ajouté aux tubes avec l'anticorps.

DELAI

Echantillon (ng/ml)	0'	10'	30'	40'
Echantillon 1	0,63	0,65	0,73	0,74
Echantillon 2	2,03	2,4	2,37	2,2

F. Restriction pour les échantillons de nouveau-nés

Les enfants très jeunes (< 3mois) présentent des concentrations très élevées de 17 α -hydroxypregnénolone sulfate. Malgré le fait qu'il n'y ait presque pas de cross-réaction avec cette molécule, nous recommandons d'appliquer la procédure d'extraction (X.B.)

XIV. CÔNTRÔLE QUALITE INTERNE

- Le pourcentage de traceur total lié en l'absence de 17-OHP non-marquée (B0/T) doit être > 25%.
- Si les résultats obtenus pour le(s) contrôle(s) 1 et/ou 2 ne sont pas dans l'intervalle spécifié sur l'étiquette du flacon, les résultats ne peuvent pas être utilisés à moins que l'on ait donné une explication satisfaisante de la non-conformité.
- Chaque laboratoire est libre de faire ses propres stocks d'échantillons contrôles, lesquels doivent être congelés aliquotés. Ne pas congeler – décongeler plus de deux fois.
- Les critères d'acceptation pour les écarts des valeurs en doublet des échantillons doivent être basés sur les pratiques de laboratoire courantes.

XV. VALEURS ATTENDUES

Les valeurs sont données à titre d'information; chaque laboratoire doit établir ses propres écarts de valeurs.

	Plage de concentration (2,5 à 97,5% percentiles) (ng/ml)	Nombre de sujets
Hommes normaux	0.67 – 3.32	79
Femmes normales		
. Phase folliculaire	0.41 – 2.27	50
. Phase lutéale	0.23 – 3.87	28
Grossesse		
. Premier trimestre	2.60 – 7.95	30
. Second trimestre	1.83 – 9.74	30
. Troisième trimestre	3.54 – 18.97	15
Nouveau-nés (après extraction)	0.34 – 1.96	23 (0 à 3 mois)

XVI. PRECAUTIONS ET AVERTISSEMENTS

Sécurité

Pour utilisation en diagnostic *in vitro* uniquement.

Cette trousse contient de l'¹²⁵I (demi-vie: 60 jours), une matière radioactive émettant des rayonnements ionisants X (28 keV) et γ (35.5 keV).

Ce produit radioactif peut uniquement être reçu, acheté, possédé ou utilisé par des personnes autorisées; l'achat, le stockage, l'utilisation et l'échange de produits radioactifs sont soumis à la législation du pays de l'utilisateur final. Ce produit ne peut en aucun cas être administré à l'homme ou aux animaux.

Toutes les manipulations radioactives doivent être exécutées dans un secteur désigné, éloigné de tout passage. Un journal de réception et de stockage des matières radioactives doit être tenu à jour dans le laboratoire. L'équipement de laboratoire et la verrerie, qui pourrait être contaminée avec des substances radioactives, doivent être isolés afin d'éviter la contamination croisée de plusieurs isotopes.

Toute contamination ou perte de substance radioactive doit être réglée conformément aux procédures de radio sécurité. Les déchets radioactifs doivent être placés de manière à respecter les réglementations en vigueur. L'adhésion aux règles de base de sécurité concernant les radiations procure une protection adéquate

Les composants de sang humain inclus dans ce kit ont été évalués par des méthodes approuvées par l'Europe et/ou la FDA et trouvés négatifs pour HBsAg, l'anti-HCV, l'anti-HIV-1 et 2. Aucune méthode connue ne peut offrir l'assurance complète que des dérivés de sang humain ne transmettront pas d'hépatite, le sida ou toute autre infection. Donc, le traitement des réactifs, du sérum ou des échantillons de plasma devront être conformes aux procédures locales de sécurité. Tous les produits animaux et leurs dérivés ont été collectés d'animaux sains. Les composants bovins proviennent de pays où l'ESB n'a pas été détectée. Néanmoins, les composants contenant des substances animales devront être traités comme potentiellement infectieux.

L'azide de sodium est nocif s'il est inhalé, avalé ou en contact avec la peau (l'azide de sodium est utilisé comme agent conservateur). L'azide dans cette trousse pouvant réagir avec le plomb et le cuivre dans les canalisations et donner des composés explosifs, il est nécessaire de nettoyer abondamment à l'eau le matériel utilisé.

Ne pas fumer, ni boire, ni manger, ni appliquer de produits cosmétiques dans les laboratoires où des produits radioactifs sont utilisés. Ne pas pipeter avec la bouche. Utiliser des vêtements protecteurs et des gants à usage unique.

XVII. BIBLIOGRAPHIE

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 adrenceance.
Journal of Clinical Endrocrinology 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. RESUME DU PROTOCOLE

	ACTIVITE TOTAL E (µl)	CALIBRA- TEUR S (µl)	ECHAN- TILLON (S) (µl)	ECHAN- TILLONS EXTRAITS (µl)
Calibrateurs (0 à 5) Echantillons, contrôles	- -	25 -	- 25	- -
Echantillons extraits Traceur	- 500	- 500	- 500	50 500
Incubation	3 heures à 37°C			
Séparation Solution de Lavage Séparation	-	aspiration 3,0 ml aspiration		
Comptage (radioactivité)	Temps de comptage des tubes : 60 secondes			

Lees het hele protocol vóór gebruik.

17 α -HYDROXYPROGESTERONE (17-OHP)-RIA-CT

I. *BEOOGD GEBRUIK*

Radioimmunoassay voor de kwantitatieve bepaling *in vitro* van menselijk 17 α -hydroxyprogesteron (17-OHP) in serum en plasma.

II. *ALGEMENE INFORMATIE*

- A. **Gedeponeerd handelsmerk:** DIAsource 17 α -HYDROXYPROGESTERONE (17-OHP)-RIA-CT kit
- B. **Catalogusnummer:** KIP1409: 96 testen.
- C. **Geproduceerd door:** DIAsource ImmunoAssays S.A.
Rue du Bosquet, 2, B-1348 Louvain-la-Neuve, België.

Voor technische assistentie of voor bestelinformatie
kunt u contact opnemen met :
Tel: +32 (0)10 84.99.11 Fax: +32 (0)10 84.99.91

III. *KLINISCHE ACHTERGROND*

A *Biologische activiteiten van 17 α -hydroxyprogesteron*

17 α -hydroxyprogesteron (17-OHP) is een C-21 steroïde hormoon (moleculair gewicht 330.3 Da) dat wordt geproduceerd van 17 α -hydroxyprogesteronolone in de bijnieren en ook in de eierstokken, testes en placenta. 17-OHP wordt gehydroxyleerd bij 11 en 21 posities om cortisol te produceren via 11-deoxycortisol.


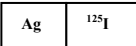
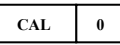
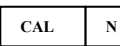
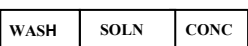
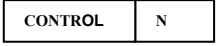
B. *Klinische toepassingen van 17 α -hydroxyprogesteron-determinatie*

In de regel zijn 17 OH bepalingen in serum of amniotisch vocht, relevant voor de diagnose van congenitale adrenale hyperplasie (CAH). Deze CAH is te wijten aan een specifiek enzymdefect (zes verschillende enzymdeficiënties zijn beschreven). Ten gevolge deze deficiënties verhoogt ACTH en veroorzaakt adrenale hyperplasie en de bevordering van vele steroïdeprecursoren. Maar het is ook interessant de waarde van 17-OHP te kennen in patiënten met varicocele (17-OHP en testosteron stellen markers van de Leydig-celfunctie voor) en in ouder wordende mannelijke patiënten om goedaardige prostaathypertrofie (BPH) en prostaatcarcinoom (PCA) te detecteren (plasma 17-OHP is beduidend lager in PCA and BPH-groepen dan bij normale mannen). Er zijn andere domeinen voor 17-OHP-onderzoeken zoals: mannelijke onvruchtbaarheid, meisjes met peripubere virilizatie, kinderen met premature adrenarche (in deze gevallen zijn de waarden van 17-OHP verhoogd zonder of na ACTH-stimulatie).

IV. BESCHRIJVING VAN DE METHODE

Een vaste hoeveelheid ^{125}I gelabeld 17-OHP concurreert met 170H dat bepaald moet worden en aanwezig is in het monster of in de kalibrator voor een vast aantal plaatsen met antilichamen die geïmmobiliseerd zijn aan de wand van een buisje van polystyreen. Vanwege de hoge specificiteit van de gecoate antilichamen is er geen extractie of chromatografie vereist. Na een incubatieperiode van 3 uur bij 37°C wordt de concurrentiereactie beëindigd door een aspiratiefase. Daarna worden de buisjes gewassen met 3 ml werkwasoplossing en opnieuw afgezogen. Een kalibratiecurve wordt uitgezet en de concentraties van 17-OHP van de monsters worden bepaald door dosisinterpolatie van de kalibratiecurve.

V. GELEVERDE REAGENTIA

Reagens	Kit voor 96 testen	Reconstitutie
 Buisjes gecoat met anti 17-OHP	2 x 48	Klaar voor gebruik
 Tracer: 17-OHP gelabeld met ^{125}I jood (HPLC-kwaliteit) in fosfaat / citroenzuur buffer met runder caseïne en azide (< 0,1%)	1 flacon 55 ml 190 kBq	Klaar voor gebruik
 Nulkalibrator: Humaan serum met azide (0,5%)	1 flacon, 3 ml	Klaar voor gebruik
 Kalibrators 17-OHP: N = 1 tot 5 (zie de exacte waarden op de flaconetiketten) in humaan serum met azide (0,5%)	5 flacons, 0,5 ml	Klaar voor gebruik
 Wasoplossing 70x: TRIS-HCl	1 flacon 10 ml	70x met gedistilleerd water verdunnen (gebruik een magnetische roerder)
 Controles: N = 1 of 2 in humaan plasma met thymol	2 flacons, gevriesd droogd	0,5 ml gedistilleerd water toevoegen

Opmerking: Gebruik Nulkalibrator voor monsterverdunningen.

VI. NIET MEEGELEVERDE MATERIALEN

De volgende materialen zijn noodzakelijk maar worden niet meegeleverd met de kit:

- Gedistilleerd water.
- Pipetten voor een volume van 25 μl , 500 μl en 3 ml (het gebruik van nauwkeurige pipetten met plastic wegwerptips wordt aanbevolen).
- Vortex-mixer.
- Magnetische roerder.
- Waterbad op 37°C
- Automatische spuit van 5 ml (type Cornwall) voor de wasfase.
- Afzuigsysteem (facultatief).
- Een gammateller die geschikt is voor de bepaling van ^{125}I . Een maximale tel-efficiëntie moet worden gegarandeerd.
- Incubator op 37°C
- Optioneel (voor extractie)**
- Di-ethylether (analytische kwaliteit; zuiverheid > 98%)**
- Glazen wegwerpbuisjes (12 x 75 mm), met stoppen.**
- DIASource reconstitutieoplossing voor (17-OHP)-RIA-CT. ref: 32.140.74.**

VII. BEREIDING VAN HET REAGENS

- Controles:** Reconstitueer de controles met 0,5 ml gedistilleerd water.
- Werk-wasoplossing:** Bereid een voldoende hoeveelheid werk-wasoplossing door 69 eenheden gedistilleerd water toe te voegen aan 1 eenheid wasoplossing. Gebruik een magnetische roerder voor de homogenisering. Op het eind van de dag moet de ongebruikte werk-wasoplossing afgevoerd worden.

VIII. OPSLAG EN VERVALDATUM VAN REAGENTIA

- Vóór opening of reconstitutie zijn alle kitcomponenten houdbaar tot de vervaldatum, zoals vermeld op het etiket, indien zij bewaard werden bij 2 tot 8°C .
- Na reconstitutie zijn de controles gedurende één week houdbaar bij 2 tot 8°C . Voor een langere bewaartermijn moeten aliquots gemaakt worden, die bij -20°C bewaard moeten worden gedurende maximaal 3 maanden.
- Een vers bereide werk-wasoplossing moet op dezelfde dag nog gebruikt worden.
- Na het eerste gebruik is de tracer houdbaar tot de vervaldatum, indien bewaard bij 2 tot 8°C in de oorspronkelijke, goed afgesloten flacon.**
- Wijzigingen in het fysieke aspect van kitreagentia kunnen wijzen op instabiliteit of op een kwaliteitsvermindering.

IX. MONSTERAFNAME EN MONSTERBEREIDING

- Serum- of plasmamonsters moeten bij $2-8^\circ\text{C}$ bewaard worden.
- Indien de bepaling niet binnen 48 uur uitgevoerd wordt, dan wordt aanbevolen om ze bij -20°C te bewaren.
- Vermijd herhaalde invriezing en ontdooiing.
- Gehepariniseerd plasma geeft resultaten die 10% lager liggen dan die van serum:
 $Y (\text{hep. plasma}) = 0,9 \times (\text{Serum}) + 0,20 \quad r = 0,92 \quad n = 20$
- EDTA-plasma geeft resultaten die 10% lager liggen dan die van serum:
 $Y (\text{EDTA plasma}) = 0,9 \times (\text{Serum}) + 0,18 \quad r = 0,87 \quad n = 20$

X. PROCEDURE

A. Opmerkingen bij de procedure

Gebruik de kit of de componenten niet langer dan de aangegeven vervaldatum. Materialen van kits van verschillende loten mogen niet gemengd worden. Laat alle reagentia op kamertemperatuur komen vóór gebruik.

Meng alle reagentia en monsters goed door ze voorzichtig te bewegen of door er voorzichtig mee te draaien. Om kruisbesmetting te vermijden, moet een propere wegwerpbare pipettip gebruikt worden voor toevoeging van elk reagens en monster.

Pipetten met een grote precisie of geautomatiseerde pipetteapparatuur zullen de precisie verhogen. Respecteer de incubatietijden.

Bereid een kalibratiecurve voor elke run; men mag geen gegevens gebruiken van voorafgaande runs.

B. Extractie van monsters van pasgeborenen (optioneel) – VOOR SERUMMONSTER

- Etiketeer één glazen buisje voor elk monster (**pas geen extractie toe op kalibrators of controles**).
- Pipetteer 75 μl serum en daarna 2,25 ml di-ethylether.
- Meng alle buisjes krachtig met de vortex-mixer (2 x 1 minuut).
- Laat ze 5 minuten op de tafel staan.
- Plaats de buisjes in een omgeving van -20°C om de waterige fase te laten bevriezen.
- Maak een tweede reeks glazen buisjes gereed en breng voor elk monster de organische fase over in deze nieuwe buisjes. Voorkom verontreiniging met de waterige fase.
- Laat de organische (ether) fase volledig indampen onder een luchtstroom of door de buisjes in een omgeving van 37°C (waterbad) te plaatsen. Werk in een zuurkast.
- Los het droge etherextract op met 150 μl reconstitutieoplossing (**niet bijgeleverd, zie VI**). Meng 1 minuut krachtig met de vortex-mixer.
- Laat 10-15 minuten staan en meng nogmaals 1 minuut met de vortex-mixer. Met deze volumes kan de bepaling twee keer worden uitgevoerd.

C. Procedure

- Etiketeer de gecoate buisjes in duplo voor elke kalibrator, voor elk monster, voor elke controle. Etiketeer 2 normale buisjes voor de bepaling van de totaal tellingen.
- Vortex de kalibrators, monsters en controles gedurende korte tijd en pipetteer 25 μl van elk in het desbetreffende buisje. **Pipetteer voor geëxtraheerde monsters van pasgeborenen 50 μl in plaats van 25 μl .**
- Pipetteer 0,5 ml 17-OHP dat met ^{125}I gelabeld werd in elk buisje, inclusief de niet gecoate buisjes voor de totaal tellingen.
- Schud het rek met de buisjes voorzichtig zodat eventuele ingesloten luchtballen vrijkomen.
- Incubeer gedurende 3 uur bij 37°C .
- Zuig de inhoud van elk buisje (met uitzondering van de totaal tellingen) op. Zorg ervoor dat de plastic tip van de aspirator tot aan de bodem van het gecoate buisje komt zodat alle vloeistof verwijderd wordt.

- Was de buisjes met 3 ml werk-wasvloeistof (met uitzondering van de totaaltellingen) en zuig op. Vermijd schuimvorming tijdens toevoeging van de werk-wasvloeistof.
- Na de wasfase moeten de buisjes gedurende twee minuten rechtop blijven staan en zuig daarna de overblijvende vloeistof op.
- Tel de buisjes in een gammateller gedurende 60 seconden.

XI. BEREKENING VAN DE RESULTATEN

- Bereken het gemiddelde voor de bepalingen in duplo.
- Bereken het percentage binding van de gebonden radioactiviteit, bepaald op het punt van de nulkalibrator (0), aan de hand van de volgende formule:

$$B/B_0(\%) = \frac{\text{cpm (Kalibrator of monster)}}{\text{cpm (Nulkalibrator)}} \times 100$$

- Zet de (B/B₀(%)) waarden uit voor elk kalibratorpunt, als een functie van de 17-OHP concentratie van elk kalibratorpunt, op 3-cyclisch semi-logaritmisch of dubbellogaritmisch papier, verwerp hierbij de duidelijke uitschieters.
- Ook computergestuurde methoden kunnen worden gebruikt om de kalibratiecurve te vormen. Indien de resultaten automatisch verwerkt worden, wordt de 4 parameter logistische functie aanbevolen voor de gepaste curve.
- Bepaal de 17-OHP concentraties van de monsters uit de referentiecurve door de monsterwaarden (B/B₀(%)) te interpoleren.
- De verkregen concentratie voor geëxtraheerde monsters van pasgeborenen (zie X.B.) kan direct op de curve worden afgelezen (er is geen correctiefactor nodig)
- Voor elke bepaling moet het totaalpercentage van de tracer, gebonden in afwezigheid van ongelabeld 17-OHP (B₀/T), gecontroleerd worden.

XII. KENMERKENDE GEGEVENS

De volgende gegevens, verkregen met een 6 weken oude tracer, dienen enkel ter illustratie en mogen in geen geval gebruikt worden ter vervanging van de real time kalibratiecurve.

(17-OHP)-RIA-CT		cpm	B/Bo (%)
Totaaltelling		32363	
Kalibrator	0,00 ng/ml	12596	100,0
	0,17 ng/ml	9769	77,6
	0,59 ng/ml	6529	51,8
	1,4 ng/ml	3752	29,8
	4,3 ng/ml	1396	11,1
	14,0 ng/ml	479	3,8

XIII. EIGENSCHAPPEN EN GRENZEN

A. Gevoeligheid

De LoB (Limit of Blank) werd getest door 20 keer de blanco te meten en werd berekend als de gemiddelde ± 2 standaarddeviatie van de verdeling van testwaarden.

LoB werd berekend op 0,03 ng/ml.

De LoD (detectielimiet) werd berekend als de LoB ± 1.645 standaarddeviatie van een monster met lage concentratie, gemeten in 10 verschillende tests.

De LoD werd berekend op 0,09 ng/ml.

De LoQ (Limit of Quantification) werd berekend door 4 monsters met een lage concentratie te testen in 10 verschillende assays.

De LoQ werd berekend op 0,14 ng/ml.

B. Specificiteit

De specificiteit werd geschat door steroïden die aanwezig kunnen zijn in monsters van patiënten toe te voegen aan een pool van 17-OHP-stalen ($\pm 0,5$ ng/ml).

Bestanddeel	Toegevoegde hoeveelheid (ng/ml)	Kruisreactiviteit (%)
17 α -hydroxyprogesteron	-	100
Progesteron	500	0,7
17 α -hydroxypregnenolone	1000	0,3
21-deoxycortisol	1000	1,07
Pregnenolone	500	0,02
11-deoxycortisol	500	0,21
Corticosteron	1000	0,008
11-deoxycorticosterone	500	0,24
Cortisol	5000	0,005
Testosteron	5000	0,004
Androstenedione	5000	0,01
Estradiol	1000	0,008
17 α -hydroxy-pregnenolonsulfaat	5000	0,34

Het effect van mogelijk versturende stoffen op monsters voor DIASource 17OHP-RIA-CT werd onderzocht. Verschillende gehalten van hemoglobine, bilirubine, triglyceride en geconjugeerde bilirubine in serummonsters werden getest op monsters met verschillende concentraties van 17 α -hydroxyprogesteron. Ons criterium voor aanvaardbaarheid was een verstoring $< 10\%$. De geteste stoffen hadden geen invloed op de werking van de DIASource 17OHP-RIA-CT-test.

Stof	17OHP (ng/ml)	Concentratie van de versturende stof (mg/dl)	Gemiddelde variatie
Hemoglobine	0,57	250	98.6%
		500	
	1,8	250	
		500	
Geconjugeerd bilirubine	0,57	50	95.1%
	1,8	50	
Ongeconjugeerd bilirubine	0,57	50	99.2%
		100	
	1,8	50	
		100	
Triglyceride	0,57	50	97.0%
		100	
		250	
		500	
		1000	
	1,54	50	
		100	
		250	
		500	
		1000	

C. Precisie

PRECISIE BINNEN EEN TEST

PRECISIE BINNEN EEN TEST

NA EXTRACTIE

Serum	N	<X> \pm SD (ng/ml)	VC (%)	Serum	N	<X> \pm SD (ng/ml)	VC (%)
A	20	0,73 \pm 0,05	6,8	C	24	0,56 \pm 0,06	10,7
B	20	1,94 \pm 0,09	4,6	D	24	1,81 \pm 0,17	9,4

SD: standaarddeviatie; VC: variatiecoëfficiënt

PRECISIE BINNEN EEN TEST

PRECISIE BINNEN EEN TEST

NA EXTRACTIE

Serum	N	<X> \pm SD (ng/ml)	VC (%)	Serum	N	<X> \pm SD (ng/ml)	VC (%)
A	12	0,69 \pm 0,06	8,7	A	8	0,72 \pm 0,13	18
B	12	2,08 \pm 0,16	7,6	B	8	2,03 \pm 0,39	19,2

SD: standaarddeviatie; VC: variatiecoëfficiënt

D. Nauwkeurigheid

VERDUNNINGSTEST

Serum	Verdunning	Theoretische concentratie (ng/ml)	Concentratie die bepaald werd (ng/ml)
	1/1	-	3,3
	1/2	1,65	1,79
	1/4	0,83	1,0
	1/8	0,42	0,5
	1/16	0,21	0,27

Monsters werden verdund met de nulkalibrator.

RECOVERY-TEST

Monster	17-OHP toegevoegd (ng/ml)	Recovery van 17-OHP (ng/ml)	Recovery (%)
1	6	5,7	95
	3	2,99	99
	1,5	1,64	109
	0,75	0,81	108
2	6	5,27	87
	3	2,86	95
	1,5	1,49	99
	0,75	0,74	98

Conversiefactor :

Van ng/ml naar nmol/L : x 3,03

Van nmol/L naar ng/ml : x 0,33

Naar ons beste weten bestaat er geen internationaal referentiemateriaal voor deze parameter.

E. Tijd tussen de laatste kalibrator en distributie van het monster

Zoals hieronder weergegeven wordt, blijven de resultaten van de bepaling nauwkeurig, zelfs wanneer een monster 40 minuten na toevoeging van de kalibrator in de gecoatete buisjes gepipetteerd wordt.

TIJDSPANNE

Monster (ng/ml)	0'	10'	30'	40'
Monster 1	0,63	0,65	0,73	0,74
Monster 2	2,03	2,4	2,37	2,2

F. Beperkingen voor monsters van pasgeborenen

Heel jonge kinderen (< 3 maanden oud) hebben hoge spiegels 17 α -hydroxy-pregnenolonsulfaat. Hoewel er bijna geen kruisreactie met dit molecuul is, raden we toch aan de extractieprocedure toe te passen (X. B.).

XIV. INTERNE KWALITEITSCONTROLE

- Het percentage totale tracer gebonden in de afwezigheid van ongelabelde 17-OHP (B0/T) moet > 25% zijn.
- Indien de resultaten, die verkregen werden voor controle 1 en/of controle 2, niet binnen het bereik vallen zoals vermeld op het flaconetiket, dan mogen de resultaten niet gebruikt worden tenzij een bevredigende uitleg gegeven wordt voor de discrepantie.
- Indien gewenst, kan elk laboratorium zijn eigen pools voor controlemonsters maken, die dan in aliquots bewaard moeten worden in de diepvriezer. Gelieve niet meer dan twee keer in te vriezen en te ontdooien.
- Aanvaardingscriteria voor het verschil tussen de resultaten in duplo van monsters moeten steunen op gangbare laboratoriumpraktijken.

XV. REFERENTIE-INTERVALS

Deze waarden worden slechts als leidraad gegeven; elk laboratorium moet zijn eigen normaal bereik van waarden uitmaken.

	Concentratiebereik (2,5 tot 97,5% percentielen) (ng/ml)	Aantal subjecten
Normale mannen	0.67 – 3.32	79
Normale vrouwen		
· Folliculaire fase	0.41 – 2.27	50
· Luteale fase	0.23 – 3.87	28
Zwangerschap		
· Eerste trimester	2.60 – 7.95	30
· Tweede trimester	1.83 – 9.74	30
· Derde trimester	3.54 – 18.97	15
Pasgeborenen (na extractie)	0.34 – 1.96	23 (0 tot 3 maanden)

XVI. VOORZORGSMAATREGELEN EN WAARSCHUWINGEN

Veiligheid

Uitsluitend voor in vitro diagnostisch gebruik.

Deze kit bevat ¹²⁵I (halfwaardetijd: 60 dagen), dat ioniserende X- (28 keV) en γ -stralen (35.5 keV) uitzendt.

Dit radioactieve product mag enkel overhandigd worden aan en gebruikt worden door bevoegd personeel; ontvangst, opslag, gebruik en overdracht van radioactieve producten zijn onderworpen aan de wetgeving van het land van de eindgebruiker. In geen geval mag het product toegediend worden aan mensen of dieren.

Alle handelingen met radioactief materiaal moeten plaatsvinden in een daartoe bestemde ruimte, waar uitsluitend bevoegd personeel toegelaten wordt. Een logboek met ontvangst en opslag van radioactieve materialen moet worden bijgehouden in het laboratorium. Laboratoriumapparatuur en glaswerk, dat eventueel gecontamineerd werd met radioactieve bestanddelen, moeten worden gesegregeerd om kruisbesmetting van verschillende radioisotopen te vermijden.

Als radioactief materiaal gemorst werd, dan moet dat onmiddellijk gereinigd worden in overeenstemming met de procedure voor stralingsveiligheid. Het radioactieve afval moet worden weggegooid in overeenstemming met de plaatselijke voorschriften en richtlijnen van de autoriteiten waaronder het laboratorium valt. Naleving van de basisregels van stralingsveiligheid zorgt voor een juiste bescherming.

De componenten, afkomstig van menselijk bloed, in deze kit werden getest door in Europa goedgekeurde en/of door de Amerikaanse FDA goedgekeurde methoden op aanwezigheid van HBsAg, anti-HCV, anti-HIV-1 en 2 en gaven een negatief resultaat. Geen enkele bekende methode kan echter volledige garantie bieden dat derivaten van menselijk bloed geen hepatitis, aids of andere infecties overdragen. Daarom moet men reagentia, serum- of plasmamonsters behandelen in overeenstemming met de plaatselijke veiligheidsprocedures.

Alle producten en derivaten van dierlijke oorsprong zijn afkomstig van gezonde dieren. Boviene componenten komen uit landen waar BSE niet gerapporteerd werd. Toch moeten componenten die bestanddelen van dierlijke oorsprong bevatten, behandeld worden als potentieel besmettelijk.

Vermijd dat de reagentia (natriumazide als conserveermiddel) in contact komen met de huid. Azide in deze kit kan reageren met lood en koper in de afvoerleidingen en op die manier zeer explosieve metaalaziden vormen. Tijdens de wasfase moeten de afvoerleidingen ruimschoots met water nagespoeld worden om ophoping van azide te vermijden.

Niet roken, drinken, eten of cosmetica aanbrengen in de werkrimte. Niet met de mond pipetteren. Draag beschermende kleding en gebruik wegwerphandschoenen.

XVII. BIBLIOGRAFIE

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 adrenance.
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. SAMENVATTING VAN HET PROTOCOL

	TOTAAL- TELLINGEN (µl)	KALIBR- ATORS (µl)	MONSTER(S) CONTROLES (µl)	GEËXTR. MONSTERS (µl)
Kalibrators (0-5)	-	25	-	-
Monsters, controles	-	-	25	-
Geëxtr. monsters	-	-	-	50
Tracer	500	500	500	500
Incubatie	3 uur bij 37°C			
Scheiding Werkwasoplos- sing Scheiding	-	opzuigen 3,0 ml opzuigen		
Telling	Tel buisjes gedurende 60 seconden			

Vor Gebrauch des Kits lesen Sie bitte diese Packungsbeilage.

17 α -HYDROXYPROGESTERON (17-OHP)-RIA-CT

I. VERWENDUNGSZWECK

Ein Radio-Immunoassay für die quantitative *in vitro* Bestimmung von humanem 17 α -Hydroxyprogesteron (17-OHP) in Serum und Plasma.

II. ALLGEMEINE INFORMATION

- A. **Handelsbezeichnung :** DIASource 17 α -HYDROXYPROGESTERONE (17-OHP)-RIA-CT Kit
- B. **Katalognummer :** KIP1409 : 96 Tests
- C. **Hergestellt von:** DIASource ImmunoAssays S.A.
Rue du Bosquet, 2, B-1348 Louvain-la-Neuve, Belgien.

Für technische Unterstützung oder Bestellungen wenden Sie sich bitte an:

Tel : +32 (0)10 84.99.11 Fax : +32 (0)10 84.99.91

Für Deutschland : Kostenfreie Rufnummer : 0800 1 00 85 74 - Kostenfreie Faxnummer : 0800 1 00 85 75

E-mail Ordering : ordering@diasource.be

III. KLINISCHER HINTERGRUND

A. *Biologische Aktivität von 17 α -Hydroxyprogesteron*

17 α -Hydroxyprogesteron (17-OHP) ist ein C-21 Steroidhormon (Molekulargewicht 330,3), das in den Nebennieren sowie in den Eierstöcken, Hoden und in der Plazenta aus 17 α -Hydroxypregnenolon produziert wird. 17-OHP wird an den Positionen 11 und 21 hydroxyliert, um über 11-Deoxycortisol Cortisol zu produzieren.

B. *Klinische Anwendungen der 17 α -Hydroxyprogesteron-Bestimmung*


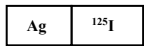
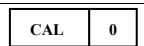
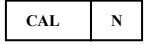


17-OHP-Dosierungen in Serum oder Fruchtwasser sind in der Regel für die Diagnostizierung einer kongenitalen Nebennierenhyperplasie (KNH) relevant. Diese KNH wird durch einen spezifischen Enzymdefekt verursacht (in der Literatur sind sechs verschiedene Enzymmängel bekannt). Infolge dieser Mängel steigt das ACTH und führt zu einer Nebennierenhyperplasie sowie zum Anstieg vieler Steroidvorläufer. Es ist aber auch sehr interessant, den 17-OHP-Wert von Patienten zu ermitteln, bei denen eine Varikozele festgestellt wurde (17-OHP und Testosteron sind Marker der Leydig-Zellfunktion), sowie bei älteren, männlichen Patienten, um eine benigne Prostatahypertrophie (BPH) und ein Prostatakarzinom (PKA) festzustellen (der Wert von 17-OHP im Plasma ist in den PKA- und BPH-Gruppen signifikant niedriger als bei gesunden Männern).

Weitere Bereiche für 17-OHP-Untersuchungen sind männliche Sterilität, Mädchen mit peripubertärer Virilisierung, Kinder mit prämaturer Adrenarche (in diesen Fällen sind die 17-OHP-Werte ohne oder nach der ACTH-Stimulation erhöht).

IV. GRUNDSÄTZLICHES ZUR DURCHFÜHRUNG

Eine festgesetzte Menge an ¹²⁵I-markiertem 17-OHP konkurriert mit dem zu messenden, in der Probe oder in dem Kalibrator vorhandenen, 17-OHP um eine Menge an Antikörperbindungsstellen, die an der Wand des Polystyren-Röhrchens immobilisiert sind. Aufgrund der hohen Spezifität der beschichteten Antikörper sind weder Extraktion noch Chromatographie erforderlich. Nach 3 Stunden Inkubation bei 37 °C, beendet das Absaugen die Verdrängungsreaktion. Die Röhrchen werden anschliessend mit Waschlösung gewaschen, danach wird nochmals abgesaugt. Eine Standardkurve wird gedruckt und die 17-OHP-Konzentrationen der Proben werden über Dosis-Interpolation der Kalibrationskurve bestimmt.

V. MITGELIEFERTE REAGENZIEN

Reagenz	96 Test Kit	Rekonstitution
 Mit anti 17-OHP-beschichtete Röhrchen	2 x 48	gebrauchsfertig
 Tracer : ¹²⁵ Iod markiertes 17-OHP (HPLC grade) in Phosphat-/Zitronensäurepuffer mit Rinderkasein und Azid (<0,1%)	1 Gefäß 55 ml 190 kBq	gebrauchsfertig
 Null-Kalibrator: Humanserum und Azid (0,5%)	1 Gefäß 3 ml	gebrauchsfertig
 Kalibratoren 17-OHP : N = 1 bis 5 (genaue Werte auf Gefäß-Etiketten) in Humanserum und Azid (0,5%)	5 Gefäße 0.5 ml	gebrauchsfertig
 Waschlösung (TRIS-HCl)	1 Gefäß 10 ml	70x mit dest. Wasser (Magnetrührer verwenden) verdünnen .
 Kontrollen : N = 1 oder 2 in Humanplasma und Thymol	2 Gefäße lyophilisiert	0,5 ml dest. Wasser zugeben

Bemerkung: Benutzen Sie den Null-Kalibrator für Probenverdünnungen.

VI. ZUSÄTZLICH BENÖTIGTES MATERIAL

Folgendes Material wird benötigt, aber nicht mit dem Kit mitgeliefert:

1. Dest. Wasser
2. Pipetten: 25 µl, 500 µl und 3 ml (Verwendung von Präzisionspipetten mit Einwegpipettenspitzen wird empfohlen)
3. Vortexmischer
4. Magnetrührer
5. Wasserbad (37 °C)
6. 5 ml automatische Spritze (Cornwall-Typ) zum Waschen
7. Absaugsystem (optional)
8. Jeder Gamma-Counter, der ¹²⁵I messen kann, kann verwendet werden. Maximale Messeffizienz sollte gewährleistet sein.
9. Inkubator bei 37 °C
Optional (für Extraktion)
10. Diethylether (Analysequalität; Reinheit > 98 %)
11. Einwegglasröhrchen (12 x 75 mm), mit Stoppern.
12. DIAsource-Rekonstitutionslösung für (17-OHP)-RIA-CT. Best.-Nr. 32.140.74.

VII. VORBEREITUNG DER REAGENZIEN

- A. **Kontrollen** : Rekonstituieren Sie die Kontrollen mit 0,5 ml dest. Wasser.
- B. **Waschlösung**: Zur Vorbereitung eines angemessenen Volumens Waschlösung, mischen Sie zu einem Volumen Waschlösung (70x) 69 Volumen destilliertes Wasser. Benutzen Sie einen Magnetrührer. Entsorgen Sie nach jedem Arbeitstag die überflüssige Waschlösung.

VIII. AUFBEWAHRUNG UND LAGERUNG DER REAGENZIEN

- Vor dem Öffnen und Rekonstituieren sind alle Kitkomponenten bei 2 bis 8 °C bis zu dem auf dem Etikett angegebenen Verfallsdatum haltbar.
- Nach der Rekonstitution sind Kontrollen eine Woche bei 2 bis 8 °C stabil. Für eine längere Aufbewahrung für bis zu 3 Monaten sollten diese Reagenzien aliquotiert und bei -20 °C eingefroren werden.
- Die Waschlösung sollte frisch hergestellt und am selben Tag aufgebraucht werden.
- Wenn der Tracer nach der ersten Benutzung wieder im gutverschlossenen Originalgefäß bei 2 bis 8 °C aufbewahrt wird, ist er bis zum angegebenen Verfallsdatum haltbar.
- Veränderungen im Aussehen der Kitkomponenten können auf Instabilität bzw. Zerfall hindeuten.

IX. PROBENSAMMLUNG UND -VORBEREITUNG

- Serum- oder Plasmaproben müssen bei 2-8 °C aufbewahrt werden.
- Falls der Test nicht innerhalb von 48 Std. durchgeführt wird, müssen die Proben bei -20 °C aufgehoben werden.
- Vermeiden Sie wiederholtes Einfrieren und Auftauen.
- Heparinisiertes Plasma liefert um 10 % niedrigere Ergebnisse als Serum
 $Y (\text{hep. Plasma}) = 0,9 \times (\text{Serum}) + 0,20 \quad r = 0,92 \quad n = 20$
- EDTA-Plasma liefert um 10 % niedrigere Ergebnisse als Serum :
 $Y (\text{EDTA Plasma}) = 0,9 \times (\text{Serum}) + 0,18 \quad r = 0,87 \quad n = 20$

X. DURCHFÜHRUNG

A. Bemerkungen zur Durchführung

Verwenden Sie den Kit oder dessen Komponenten nicht nach dem Ablaufdatum. Vermischen Sie nie Materialien von unterschiedlichen Kit-Chargen. Bringen Sie alle Reagenzien vor der Verwendung auf Raumtemperatur. Mischen Sie alle Reagenzien und Proben gründlich durch sanftes Schütteln oder Rühren. Verwenden Sie saubere Einwegpipettenspitzen, um Kreuzkontamination zu vermeiden. Präzisionspipetten oder ein automatisches Pipettiersystem erhöhen die Präzision. Achten Sie auf die Einhaltung der Inkubationszeiten. Erstellen Sie für jeden Durchlauf eine Kalibrationskurve, verwenden Sie nicht die Daten von früheren Durchläufen.

B. Extraktion von Neugeborenenproben (optional) – FÜR SERUMPROBE

1. Beschriften Sie ein Glasröhrchen für jede Probe (**keinesfalls Kalibratoren oder Kontrollen extrahieren**).
2. Pipettieren Sie 75 µl Serum, anschließend 2,25 ml Diethylether.
3. Vortexen Sie alle Röhrchen kräftig (2 x 1 Minute).
4. Lassen Sie die Röhrchen 5 Minuten stehen.
5. Kühlen Sie die Röhrchen bei -20 °C, um die wässrige Phase zu gefrieren.
6. Bereiten Sie eine zweite Reihe von Glasröhrchen vor und übertragen Sie die organische Phase in diese neuen Röhrchen. Vermeiden Sie eine Kontamination durch die wässrige Phase.
7. Lassen Sie die organische Phase (Etherphase) unter einem Luftstrom vollständig verdampfen oder indem Sie die Röhrchen bei 37 °C in ein Wasserbad stellen. Unter einer Haube arbeiten.
8. Lösen Sie das trockene Etherextrakt in 150 µl Rekonstitutionslösung (**nicht im Lieferumfang enthalten, siehe VI**). Vortexen Sie 1 Minute lang kräftig.
9. Lassen Sie es 10-15 Minuten lang stehen und vortexen Sie erneut 1 Minute lang. Diese Volumina ermöglichen die Durchführung des Nachweises in doppelter Form.

C. Durchführung

1. Beschriften Sie je 2 beschichtete Röhrchen für jeden Kalibrator, jede Probe und jede Kontrolle. Zur Bestimmung der Gesamtaktivität, beschriften Sie 2 normale Röhrchen. Vortexen Sie Kalibratoren, Proben und Kontrollen kurz und geben Sie 25 µl von jedem in ihre Röhrchen. **Für extrahierte Neugeborenenproben 50 µl statt 25 µl pipettieren**.
2. Geben Sie 0,5 ml des ¹²⁵I-markierten 17-OHP in jedes Röhrchen, einschließlich der unbeschichteten Röhrchen für die Gesamtaktivität.
3. Schütteln Sie vorsichtig die Halterung mit den Röhrchen um Blasen zu entfernen.
4. Inkubieren Sie 3 Stunden bei 37 °C.
5. Saugen Sie den Inhalt jedes Röhrchens ab (außer Gesamtaktivität). Vergewissern Sie sich, dass die Plastikspitze des Absaugers den Boden des beschichteten Röhrchens erreicht, um die gesamte Flüssigkeit zu entfernen.
6. Waschen Sie die Röhrchen mit 3 ml Waschlösung (außer Gesamtaktivität) und saugen Sie ab. Vermeiden Sie Schaumbildung bei Zugabe der Waschlösung.
7. Lassen Sie die Röhrchen 2 Minuten aufrecht stehen, und saugen Sie den verbleibenden Flüssigkeitstropfen ab.
8. Werten Sie die Röhrchen in einem Gamma-Counter über 60 Sekunden aus.

XI. BERECHNUNG DER ERGEBNISSE

- Berechnen Sie den Durchschnitt aus den Doppelbestimmungen.
- Berechnen Sie die gebundene Radioaktivität als Prozentsatz des am Null-Kalibratorpunkt (0) bestimmten Wertes nach folgender Formel:

$$B/B_0(\%) = \frac{\text{Aktivität (Kalibrator oder Probe)}}{\text{Aktivität (Null-Kalibrator)}} \times 100$$
- Verwenden Sie semi-logarithmisches oder doppelt-logarithmisches Millimeterpapier (über 3 Größenordnungen), tragen Sie die (B/B₀(%))-Werte für jeden Kalibratorpunkt ein als Funktion der 17-OHP-Konzentration für jeden Kalibratorpunkt, schließen Sie offensichtliche „Ausreißer“ aus.
- Computergestützte Methoden können ebenfalls zur Erstellung der Kalibrationskurve verwendet werden. Wir empfehlen die Berechnung mit einer „4 Parameter“-Kurvenfunktion.
- Bestimmen Sie die 17-OHP-Konzentrationen der Proben über Interpolation der Probenwerte B/B₀(%) der Referenzkurve.
- Die erzielte Konzentration für extrahierte Neugeborenenproben (siehe X.B.) kann direkt aus der Kurve abgelesen werden (kein Korrekturfaktor erforderlich).
- Bei jedem Assay muss der Prozentsatz des gesamten gebundenen Tracers ohne unmarkiertes 17-OHP (B₀/T) geprüft werden.

XII. TYPISCHE WERTE

Die folgenden Daten wurden mithilfe eines 6 Wochen alten Tracers erhalten, dienen nur zu Demonstrationszwecken und können nicht als Ersatz für die Echtzeitkalibrationskurve verwendet werden.

(17-OHP)-RIA-CT		cpm	B/Bo (%)
Gesamtaktivität		32363	
Kalibrator	0,00 ng/ml	12596	100,0
	0,17 ng/ml	9769	77,6
	0,59 ng/ml	6529	51,8
	1,4 ng/ml	3752	29,8
	4,3 ng/ml	1396	11,1
	14,0 ng/ml	479	3,8

XIII. LEISTUNGSMERKMALE UND GRENZEN DER METHODIK

A. Empfindlichkeit

Der LoB (Limit of Blank) wurde durch Messung des 20-fachen Blindwerts getestet und als Mittelwert ± 2 Standardabweichung der Verteilung der Testwerte berechnet.

LoB wurde mit 0,03 ng/ml berechnet.

Die Nachweisgrenze (LoD) wurde als LoB ± 1.645 Standardabweichung einer Probe mit niedriger Konzentration, gemessen in 10 verschiedenen Tests, berechnet.

Der LoD wurde mit 0,09 ng/ml berechnet.

Die LoQ (Quantifizierungsgrenze) wurde durch Testen von 4 Proben mit niedriger Konzentration in 10 verschiedenen Tests berechnet.

Der LoQ wurde mit 0,14 ng/ml berechnet.

B. Spezifität

Die Spezifität wurde bestimmt, indem Steroide, die in Patientenproben vorkommen könnten, zu einem Pool von 17-OHP-Proben (± 0,5 ng/ml) hinzugefügt wurden.

Substanz	Zugeg. Menge (ng/ml)	Kreuzreaktivität (%)
17α-Hydroxyprogesteron	-	100
Progesteron	500	0,7
17α-Hydroxypregnenolon	1000	0,3
21-Deoxycortisol	1000	1,07
Pregnenolon	500	0,02
11-Deoxycortisol	500	0,21
Corticosteron	1000	0,008
11-Deoxycorticosteron	500	0,24
Cortisol	5000	0,005
Testosteron	5000	0,004
Androstendion	5000	0,01
Östradiol	1000	0,008
17α-Hydroxypregnenolonsulfate	5000	0,34

Die Wirkung potenzieller Interferenten auf Proben wurde mit dem DIASource 17OHP-RIA-CT ausgewertet. Verschiedene Konzentrationen von Hämoglobin,

Bilirubin, Triglyzerid und Serum-Bilirubinkonjugatproben wurden an Proben mit unterschiedlichen 17α-Hydroxyprogesteron-Konzentrationen getestet. Unser Akzeptanzkriterium war eine Interferenz von weniger als 10 %. Die getesteten Substanzen beeinträchtigten nicht die Performance des DIASource 17OHP-RIA-CT-Tests.

Substanz	17OHP (ng/ml)	Konzentration des Interferenten (mg/dl)	Mittelwert Streuung
Hämoglobin	0,57	250	98,6%
		500	
		250	
Konjugiertes Bilirubin	0,57	50	95,1%
		1,8	
		50	
Nicht konjugiertes Bilirubin	0,57	50	99,2%
		100	
		50	
Triglyzerid	0,57	50	97,0%
		100	
		250	
		500	
		1000	
	1,54	50	
		100	
		250	
		500	
		1000	

C. Präzision

INTRA-ASSAY

INTRA-ASSAY

NACH EXTRAKTION

Serum	N	<X> ± SD (ng/ml)	CV (%)	Serum	N	<X> ± SD (ng/ml)	CV (%)
A	20	0,73 ± 0,05	6,8	C	24	0,56 ± 0,06	10,7
B	20	1,94 ± 0,09	4,6	D	24	1,81 ± 0,17	9,4

SD : Standardabweichung; CV: Variationskoeffizient

INTER-ASSAY

INTER-ASSAY

NACH EXTRAKTION

Serum	N	<X> ± SD (ng/ml)	CV (%)	Serum	N	<X> ± SD (ng/ml)	CV (%)
A	12	0,69 ± 0,06	8,7	A	8	0,72 ± 0,13	18
B	12	2,08 ± 0,16	7,6	B	8	2,03 ± 0,39	19,2

SD : Standardabweichung; CV: Variationskoeffizient

D. Genauigkeit

VERDÜNNUNGSTEST

Probe	Verdünnung	Theoretische Konz. (ng/ml)	Gemessene Konz. (ng/ml)
	1/1	-	3,3
	1/2	1,65	1,79
	1/4	0,83	1,0
	1/8	0,42	0,5
	1/16	0,21	0,27

Die Proben wurden mit Null-Kalibrator verdünnt.

WIEDERFINDUNGSTEST

Probe	Zuggeg. 17-OHP (ng/ml)	Wiedergef. 17-OHP (ng/ml)	Wiedergefunden (%)
1	6	5,7	95
	3	2,99	99
	1,5	1,64	109
	0,75	0,81	108
2	6	5,27	87
	3	2,86	95
	1,5	1,49	99
	0,75	0,74	98

Umrechnungsfaktor:

Von ng/ml in nmol/L: x 3,03
 Von nmol/L in ng/ml: x 0,33

Es sind uns keine internationalen Referenzen zu diesen Parametern bekannt.

E. Zeitverzögerung zwischen letzter Kalibrator- und Probenzugabe

Es wird im folgenden gezeigt, dass die Genauigkeit der Tests selbst dann gewährleistet ist, wenn die Probe 40 Minuten nach Zugabe des Kalibrators in die beschichteten Röhren zugegeben wird.

ZEITABSTAND

Probe (ng/ml)	0'	10'	30'	40'
Probe 1	0,63	0,65	0,73	0,74
Probe 2	2,03	2,4	2,37	2,2

F. Einschränkungen für Neugeborenenproben

Sehr kleine Kinder (< 3 Monate alt) verfügen über hohe Werte für 17 α -Hydroxypregnenolonsulfat. Trotz der Tatsache, dass es so gut wie keine Kreuzreaktion mit diesem Molekül gibt, empfehlen wir die Durchführung des Extraktionsverfahrens (X. B.)

XIV. INTERNE QUALITÄTSKONTROLLE

- Der Prozentsatz von insgesamt gebundenem Tracer in Abwesenheit von nicht markiertem 17-OHP (B0/T) muss > 25 % sein.
- Entsprechen die Ist-Werte nicht den auf den Fläschchen angegebenen Soll-Werten, können diese Werte, ohne treffende Erklärung für die Abweichungen, nicht weiterverarbeitet werden.
- Falls weitere Kontrollen erwünscht sind, kann jedes Labor seinen eigenen Pool herstellen, der in Aliquots eingefroren werden sollte. Erinnern Sie sich, dass zwei Gefrier-Auftau-Zyklen erlaubt sind.
- Akzeptanzkriterien für die Differenz zwischen den Resultaten der Wiederholungstests anhand der Proben müssen auf Guter Laborpraxis beruhen.

XV. ZU ERWARTENDER BEREICH

Diese Werte sind nur Richtwerte; jedes Labor muss seinen eigenen Normalwertbereich ermitteln.

	Konzentrationsbereich (2,5 bis 97,5 % Perzentile) (ng/ml)	Anzahl von Personen
Gesunde Männer	0.67 – 3.32	79
Gesunde Frauen	. Follikelsphase	50
	. Lutealphase	28
Schwangerschaft	. 1. Trimester	30
	. 2. Trimester	30
	. 3. Trimester	15
Neugeborene (nach Extraktion)	0.34 – 1.96	23 (0 bis 3 Monate)

XVI. VORSICHTSMASSNAHMEN UND WARNUNGEN

Sicherheit

Nur für diagnostische Zwecke.

Dieser Kit enthält ¹²⁵I (Halbwertszeit: 60 Tagen), das ionisierende X (28 keV) und γ (35.5 keV) Strahlungen emittiert.

Dieses radioaktive Produkt kann nur an autorisierte Personen abgegeben und darf nur von diesen angewendet werden; Erwerb, Lagerung, Verwendung und Austausch radioaktiver Produkte sind Gegenstand der Gesetzgebung des Landes des jeweiligen Endverbrauchers. In keinem Fall darf das Produkt an Menschen oder Tieren angewendet werden.

Der Umgang mit radioaktiven Substanzen sollte fern von Durchgangsverkehr in einem speziell ausgewiesenen Bereich stattfinden. Ein Logbuch für Protokolle und Aufbewahrung muss im Labor sein. Die Laborausrüstung und die Glasbehälter, die mit radioaktiven Substanzen kontaminiert werden können, müssen gesondert werden, um Kreuzkontaminationen mit unterschiedlichen Radioisotopen zu verhindern.

Verschüttete radioaktive Substanzen müssen sofort den Sicherheitsbestimmungen entsprechend entfernt werden. Radioaktive Abfälle müssen entsprechend den lokalen Bestimmungen und Richtlinien der für das Labor zuständigen Behörden gelagert werden. Das Einhalten der Sicherheitsbestimmungen für den Umgang mit radioaktiven Substanzen gewährleistet ausreichenden Schutz.

Die menschlichen Blutkomponenten in diesem Kit wurden mit europäischen und in den USA erprobten FDA-Methoden getestet, sie waren negativ für HBsAg, anti-HCV und anti-HIV 1 und 2. Keine bekannte Methode kann jedoch vollkommene Sicherheit liefern, dass menschliche Blutbestandteile nicht Hepatitis, AIDS oder andere Infektionen übertragen. Deshalb sollte der Umgang mit Reagenzien, Serum oder Plasmaprobe in Übereinstimmung mit den Sicherheitsbestimmungen erfolgen.

Alle tierischen Produkte und deren Derivate wurden von gesunden Tieren gesammelt. Komponenten von Rindern stammen aus Ländern in denen BSE nicht nachgewiesen wurde. Trotzdem sollten Komponenten, die tierische Substanzen enthalten, als potentiell ansteckend behandelt werden.

Vermeiden Sie Hautkontakt mit den Reagenzien (Natriumazid als Konservierungsmittel). Das Azid in diesem Kit kann mit Blei oder Kupfer in den Abflüßrohren reagieren und so hochexplosive Metallazide bilden. Spülen Sie während der Waschschriffe den Abfluß gründlich mit viel Wasser, um die Metallazidbildung zu verhindern.

Bitte rauchen, trinken, essen Sie nicht in Ihrem Arbeitsbereich, und verwenden Sie keine Kosmetika. Pipettieren Sie nicht mit dem Mund. Tragen Sie Schutzkleidung und Wegwerfhandschuhe.

XVII. LITERATUR

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 adreanence.
 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. ZUSAMMENFASSUNG DES PROTOKOLLS

	GESAMT- AKTIVITÄT (μl)	KALIBRATOREN (μl)	PROBE(N)- KONTROLLEN (S) (μl)	Extrahierte Proben (μl)
Kalibratoren (0 à 5)	-	25	-	-
Proben, Kontrollen	-	-	25	-
Extrahierte Proben	-	-	-	50
Tracer	500	500	500	500
Inkubation	3 Std. bei 37°C			
Separation Waschlösung Separation	-	absaugen 3,0 ml absaugen		
Auswertung	Messen der Röhren 60 Sekunden			

Prima di utilizzare il kit leggere attentamente le istruzioni per l'uso

17 α -HYDROXYPROGESTERONE (17-OHP)-RIA-CT

I. USO DEL KIT

Kit radioimmunologico per la determinazione quantitativa in vitro del 17 α -idrossiprogesterone (17-OHP) in siero o plasma.

II. INFORMAZIONI DI CARATTERE GENERALE

- A. Nome commerciale:** DIASource 17 α -HYDROXYPROGESTERONE (17-OHP)-RIA-CT Kit
- B. Numero di catalogo:** KIP1409: 96 test
- C. Prodotto da:** DIASource ImmunoAssays S.A.
Rue du Bosquet, 2, B-1348 Louvain-la-Neuve, Belgio.

Per informazioni tecniche o su come ordinare il prodotto contattare:
Tel: +32 (0) 10 84.99.11 Fax: +32 (0) 10 84.99.91

III. INFORMAZIONI CLINICHE

A Attività biologiche del 17 α -idrossiprogesterone

Il 17 α -idrossiprogesterone (17-OHP) è un ormone steroideo C-21 (peso molecolare 330,3) prodotto, a partire dal 17 α -idrossipregnenolone, nelle ghiandole surrenali e anche in ovaie, testicoli e placenta. Il 17-OHP viene sottoposto ad idrossilazione in posizione 11 e 21 al fine di produrre cortisolo attraverso l'11-deossicortisolo.

B Applicazioni cliniche del dosaggio del 17 α -idrossiprogesterone


Di norma, i dosaggi di 17-OHP del liquido amniotico o del siero sono rilevanti ai fini della diagnosi di iperplasia surrenale congenita (CAH). La CAH è dovuta a un deficit di un enzima specifico (sono stati descritti ben sei diversi deficit enzimatici). In conseguenza di dette carenze si genera un aumento di ACTH che dà luogo a iperplasia surrenale con relativo incremento di numerosi precursori steroidi. Tuttavia è interessante conoscere il valore di 17-OHP nei pazienti affetti da varicocele, (Il 17-OHP e il testosterone rappresentano gli indicatori del funzionamento delle cellule di Leydig) e in pazienti di sesso maschile in età avanzata indica la presenza di ipertrofia prostatica benigna (BPH) e di carcinoma della prostata (PCA) (nei gruppi PCA e BPH il livello di 17-OHP nel plasma risulta notevolmente più basso rispetto a quello riscontrato in uomini in condizioni normali).

Esistono altri domini per le indagini sul 17-OHP, tra i quali figurano: infertilità maschile, ragazze con virilizzazione prepuberale, bambini con dolore surrenale prematuro (in tali casi i valori di 17-OHP risultano aumentati in assenza o a seguito di una stimolazione con ACTH).

IV. PRINCIPIO DEL METODO

Una quantità definita di 17-OHP marcata con ^{125}I compete con il 17-OHP presente in calibratore e campioni per un numero definito di siti di un anticorpo adsorbito sulla superficie interna di provette di polistirene. Poiché l'anticorpo è altamente specifico, non è necessario eseguire estrazioni o separazioni cromatografiche. Dopo 3 ore di incubazione a 37°C , la reazione di competizione viene interrotta per aspirazione della miscela di reazione. Le provette vengono quindi lavate con tampone di lavaggio diluito e aspirate. La concentrazione di 17-OHP nei campioni viene calcolata per interpolazione sulla curva calibratore.

V. REATTIVI FORNITI

Reattivi	Kit da 96 test	Volume di ricostituzione
 Provette sensibilizzate con anticorpo anti 17-OHP	2 x 48	Pronte per l'uso
<div style="border: 1px solid black; display: inline-block; padding: 2px;">Ag</div> <div style="border: 1px solid black; display: inline-block; padding: 2px;">^{125}I</div> Marcato: 17-OHP marcato con ^{125}I (grado HPLC), in tampone fosfato/acido citrico con caseina bovina e azide (<0,1%)	1 flacone 55 ml 190 kBq	Pronto per l'uso
<div style="border: 1px solid black; display: inline-block; padding: 2px;">CAL</div> <div style="border: 1px solid black; display: inline-block; padding: 2px;">0</div> Calibratore zero in siero umano e sodio azoturo (0,5%)	1 flacone 3 ml	Pronto per l'uso
<div style="border: 1px solid black; display: inline-block; padding: 2px;">CAL</div> <div style="border: 1px solid black; display: inline-block; padding: 2px;">N</div> Calibratore 1-5 di 17-OHP, (le concentrazioni esatte degli calibratore sono riportate sulle etichette dei flaconi), in siero umano e sodio azoturo (0,5%)	5 flaconi 0,5 ml	Pronti per l'uso
<div style="border: 1px solid black; display: inline-block; padding: 2px;">WASH</div> <div style="border: 1px solid black; display: inline-block; padding: 2px;">SOLN</div> <div style="border: 1px solid black; display: inline-block; padding: 2px;">CONC</div> Tampone di lavaggio (TRIS-HCl)	1 flacone 10 ml	Diluire 70 x con acqua distillata usando un agitatore magnetico
<div style="border: 1px solid black; display: inline-block; padding: 2px;">CONTROL</div> <div style="border: 1px solid black; display: inline-block; padding: 2px;">N</div> Controlli: N = 1 o 2, in plasma umano e timolo	2 flaconi liofilizzati	Aggiungere 0,5 ml di acqua distillata

Note : Usare lo calibratore zero per diluire i campioni.

VI. REATTIVI NON FORNITI

Il seguente materiale è richiesto per il dosaggio ma non è fornito nel kit.

1. Acqua distillata.
 2. Pipette per dispensare 25 μl , 500 μl e 3 ml (Si raccomanda di utilizzare pipette accurate con puntale in plastica monouso).
 3. Agitatore tipo vortex.
 4. Agitatore magnetico.
 5. Bagno d'acqua a 37°C .
 6. Pipetta a ripetizione automatica 5 ml per i lavaggi.
 7. Sistema di aspirazione dei campioni (facoltativo).
 8. Contatore gamma con finestra per ^{125}I (efficienza minima 70%).
 9. Incubatore a 37°C
- Opzionali (per l'estrazione)**
10. Dietil-etero (per analisi chimiche, purezza > 98%)
 11. Provette di vetro monouso (12 x 75 mm) e relativi tappi.
 12. Soluzione di ricostituzione DIAsource per (17-OHP)-RIA-CT. rif: 32.140.74.

VII. PREPARAZIONE DEI REATTIVI

- A. **Controlli:** Ricostituire i controlli con 0,5 ml di acqua distillata.
- B. **Soluzione di lavoro del tampone di lavaggio:** Preparare la quantità necessaria di soluzione di lavoro del tampone di lavaggio aggiungendo 69 parti di acqua distillata ad una parte di tampone di lavaggio concentrato (70 x). Usare un agitatore magnetico per rendere la soluzione omogenea. La soluzione di lavoro va scartata al termine della giornata.

VIII. CONSERVAZIONE E SCADENZA DEI REATTIVI

- I reattivi non utilizzati sono stabili a $2-8^\circ\text{C}$ fino alla data riportata su ciascuna etichetta.
- Dopo ricostituzione, i controlli sono stabili per 1 settimana a $2-8^\circ\text{C}$ e,

suddivisi in aliquote a -20°C per 3 mesi.

- La soluzione di lavoro del tampone di lavaggio deve essere preparata fresca ogni volta e usata nello stesso giorno della preparazione.
- Dopo apertura del flacone, il marcato è stabile fino alla data di scadenza riportata sull'etichetta, se conservato a $2-8^\circ\text{C}$ nel flacone originale ben tappato.
- Alterazioni dell'aspetto fisico dei reattivi possono indicare una loro instabilità o deterioramento.

IX. RACCOLTA E PREPARAZIONE DEI CAMPIONI

- Conservare i campioni di siero o plasma a $2-8^\circ\text{C}$.
- Se il dosaggio non viene eseguito entro 48 ore dal prelievo, i campioni vanno conservati a -20°C .
- Evitare ripetuti cicli di congelamento-scongelo dei campioni.
- Il plasma eparinizzato fornisce risultati inferiori del 10% rispetto al siero:

$$Y (\text{Plasma epar}) = 0,9 \times (\text{Siero}) + 0,20 \quad r = 0,92 \quad n = 20$$
- Il plasma in EDTA fornisce risultati inferiori del 10% rispetto al siero:

$$Y (\text{Plasma in EDTA}) = 0,9 \times (\text{Siero}) + 0,18 \quad r = 0,87 \quad n = 20$$

X. METODO DEL DOSAGGIO

A. Avvertenze generali

Non usare il kit o suoi componenti oltre la data di scadenza. Non mescolare reattivi di lotti diversi. Prima dell'uso portare tutti i reattivi a temperatura ambiente.

Mescolare delicatamente i campioni per inversione o rotazione. Per evitare contaminazioni incrociate, cambiare il puntale della pipetta ogni volta che si usa un nuovo reattivo o campione.

L'uso di pipette ben tarate e ripetibili o di sistemi di pipettamento automatici migliora la precisione del dosaggio. Rispettare i tempi di incubazione.

Allestire una curva di taratura per ogni seduta analitica, in quanto non è possibile utilizzare per un dosaggio curve di taratura di sedute analitiche precedenti.

B. Estrazione di campioni di neonati (opzionale) – PER CAMPIONI DI SIERO

1. Etichettare una provetta di vetro per ciascun campione (**non estrarre i calibratori o i controlli**).
2. Pipettare 75 μl di siero quindi 2,25 ml di dietil-etero.
3. Vortexare tutte le provette energicamente (2 x 1 minuto).
4. Lasciar riposare sul banco per 5 minuti.
5. Riporre le provette a -20°C per congelare la fase acquosa.
6. Preparare una seconda serie di provette di vetro e, per ciascun campione, trasferirvi la fase organica. Evitare di contaminare con la fase acquosa.
7. Far evaporare completamente la fase organica (etero) sotto un flusso d'aria oppure ponendo le provette a 37°C (bagno d'acqua). Manipolare sotto cappa.
8. Dissolvere l'estratto di dietil-etero in 150 μl di Soluzione di ricostituzione (**non fornita, si veda VI**). Vortexare energicamente per 1 minuto.
9. Lasciar riposare per 10-15 minute quindi vortexare nuovamente per 1 minuto. Questi volumi consentono di eseguire l'analisi in duplicato.

C. Metodo del dosaggio

1. Numerare le provette sensibilizzate necessarie per dosare in duplicato ogni calibratore, campione o controllo. Numerare 2 provette non sensibilizzate per la determinazione dell'attività totale.
2. Agitare brevemente su vortex calibratore, campioni e controlli. Erogare 25 μl di calibratore, campioni e controlli nelle rispettive provette. **Per i campioni di neonato estratti, pipettare 50 μl invece di 25 μl .**
3. Erogare 500 μl di 17-OHP marcato con ^{125}I in tutte le provette, comprese quelle per l'attività totale.
4. Scuotere gentilmente il portaprovette per liberare eventuali bolle d'aria intrappolate nel liquido contenuto nelle provette.
5. Incubare 3 ore 37°C .
6. Aspirare il liquido contenuto in tutte le provette, tranne in quelle per l'attività totale, facendo attenzione che il puntale dell'aspiratore raggiunga il fondo delle provette e che aspiri tutto il liquido.
7. Lavare tutte le provette, tranne quelle per l'attività totale, con 3 ml di soluzione di lavoro di tampone di lavaggio, evitando di provocare la formazione di schiuma.
8. Lasciare decantare le provette in posizione verticale per due minuti circa e aspirare eventuali gocce di liquido residue.
9. Contare tutte le provette per 1 minuto con il contatore gamma.

XI. CALCOLO DEI RISULTATI

1. Calcolare la media delle determinazioni in duplicato.

2. Calcolare il rapporto (rapporto di competizione) tra radioattività legata alle provette di calibratore 1-5, campioni e controlli (B) e la radioattività legata alle provette dello calibratore zero (B0).

$$B/B_0(\%) = \frac{\text{cpm (Calibratore, campioni o controlli)}}{\text{cpm (Zero Calibratore)}} \times 100$$

3. Usando carta semilogaritmica a 3 cicli o logit-log e ponendo in ordinata i rapporti di competizione. B/B0 (%) per ogni calibratore e in ascissa le rispettive concentrazioni di 17-OHP, tracciare la curva di taratura, scartare i valori palesemente discordanti.
4. È possibile utilizzare un sistema di interpolazione dati automatizzato. Con un sistema automatico di interpolazione dati utilizzare la curva a 4 parametri.
5. Per interpolazione sulla curva di taratura dei rapporti di competizione di campioni e controlli, determinare le rispettive concentrazioni di 17-OHP.
6. La concentrazione ottenuta per i campioni di neonato estratti (si veda X.B.) può essere letta direttamente sulla curva (non è necessario alcun fattore di correzione).
7. Per ogni dosaggio determinare la capacità legante B0/T.

XII. CARATTERISTICHE TIPICHE

I dati sotto riportati, ottenuti con un tracciante di 6 settimane, sono forniti a titolo di esempio e non devono essere utilizzati per calcolare le concentrazioni di 17-OHP in campioni e controlli al posto della curva calibratore eseguita contemporaneamente.

(17-OHP)-RIA-CT		cpm	B/Bo (%)
Attività totale		32363	
Calibratore	0,00 ng/ml	12596	100,0
	0,17 ng/ml	9769	77,6
	0,59 ng/ml	6529	51,8
	1,4 ng/ml	3752	29,8
	4,3 ng/ml	1396	11,1
	14,0 ng/ml	479	3,8

XIII. CARATTERISTICHE E LIMITI DEL METODO

A. Sensibilità

Il LoB (limite del bianco) è stato testato misurando 20 volte il bianco ed è stato calcolato come media \pm 2 deviazione standard della distribuzione dei valori del test.

LoB è stato calcolato a 0,03 ng/ml.

Il LoD (limite di rilevamento) è stato calcolato come deviazione standard LoB \pm 1.645 di un campione a bassa concentrazione misurato in 10 diversi test.

Il LoD è stato calcolato a 0,09 ng/ml.

Il LoQ (limite di quantificazione) è stato calcolato testando 4 campioni a bassa concentrazione, in 10 diversi dosaggi.

Il LoQ è stato calcolato a 0,14 ng/ml.

B. Specificità

La specificità è stata calcolata aggiungendo a un pool di campioni di 17-OHP (\pm 0,5 ng/ml) gli steroidi che potrebbero essere presenti nei campioni del paziente.

Composto	Quantitativo aggiunto (ng/ml)	Cross-Reattività (%)
17 α -idrossiprogesterone	-	100
Progesterone	500	0,7
17 α -idrossipregnenolone	1000	0,3
21-deossicortisolo	1000	1,07
Pregnenolone	500	0,02
11-deossicortisolo	500	0,21
Corticosterone	1000	0,008
11-deossicorticosterone	500	0,24
Cortisolo	5000	0,005
Testosterone	5000	0,004
Androstenedione	5000	0,01
Estradiolo	1000	0,008
17 α -idrossipregnenolone solfato	5000	0,34

È stato valutato l'effetto delle potenziali sostanze interferenti sui campioni utilizzando il test DIASource 17OHP-RIA-CT. Sono stati analizzati diversi livelli

di emoglobina, bilirubina, trigliceridi e bilirubina coniugata in campioni di siero a diversa concentrazione di 17 α -idrossiprogesterone. In base ai criteri di accettazione, l'interferenza doveva essere minore del 10%. Le sostanze analizzate non influivano sulle prestazioni del test DIASource 17OHP-RIA-CT.

Sostanza	17OHP (ng/ml)	Concentrazione dell'interferente (mg/dl)	Variazione media	
Emoglobina	0,57	250	98.6%	
		500		
Bilirubina coniugata	1,8	250		
		500		
Bilirubina non coniugata	0,57	50	95.1%	
		50		
Trigliceridi	0,57	50		97.0%
		100		
Trigliceridi	1,54	250		
		500		
Trigliceridi	0,57	50		
		100		
Trigliceridi	1,54	250		
		500		
Trigliceridi	0,57	50		
		100		
Trigliceridi	1,54	250		
		500		
Trigliceridi	0,57	50		
		100		
Trigliceridi	1,54	250		
		500		
Trigliceridi	0,57	50		
		100		
Trigliceridi	1,54	250		
		500		
Trigliceridi	0,57	50		
		100		
Trigliceridi	1,54	250		
		500		
Trigliceridi	0,57	50		
		100		
Trigliceridi	1,54	250		
		500		

C. Precisione

INTRA SAGGIO

INTER SAGGIO

DOPO L'ESTRAZIONE

Siero	N	<X> \pm SD (ng/ml)	CV (%)	Siero	N	<X> \pm SD (ng/ml)	CV (%)
A	20	0,73 \pm 0,05	6,8	C	24	0,56 \pm 0,06	10,7
B	20	1,94 \pm 0,09	4,6	D	24	1,81 \pm 0,17	9,4

SD : Deviazione Standard; CV: Coefficiente di Variazione

INTER-SAGGIO

INTER-SAGGIO

DOPO L'ESTRAZIONE

Siero	N	<X> \pm SD (ng/ml)	CV (%)	Siero	N	<X> \pm SD (ng/ml)	CV (%)
A	12	0,69 \pm 0,06	8,7	A	8	0,72 \pm 0,13	18
B	12	2,08 \pm 0,16	7,6	B	8	2,03 \pm 0,39	19,2

SD : Deviazione Standard; CV: Coefficiente di Variazione

D. Accuratezza

TEST DI DILUIZIONE

Siero	Diluizione	Concentrazione teorica (ng/ml)	Concentrazione misurata (ng/ml)
	1/1	-	3,3
	1/2	1,65	1,79
	1/4	0,83	1,0
	1/8	0,42	0,5
	1/16	0,21	0,27

I campioni sono stati diluiti con calibratore zero.

TEST DI RECUPERO

Campione	17-OHP aggiunto	17-OHP	Recupero
----------	-----------------	--------	----------

	(ng/ml)	recuperato (ng/ml)	(%)
1	6	5,7	95
	3	2,99	99
	1,5	1,64	109
	0,75	0,81	108
2	6	5,27	87
	3	2,86	95
	1,5	1,49	99
	0,75	0,74	98

Fattore di conversione:

ng/ml in nmol/l : x 3,03
nmol/l in ng/ml : x 0,33

Al momento non risulta disponibile uno calibratore di riferimento internazionale per questo parametro.

E. Tempo trascorso tra l'aggiunta dell'ultimo calibratore e il campione

Come mostrato nella seguente tabella, il dosaggio si mantiene accurato anche quando un campione viene aggiunto nelle provette sensibilizzate 40 minuti dopo l'aggiunta del calibratore.

TEMPO TRASCORSO

Campione (ng/ml)	0'	10'	30'	40'
Campione 1	0,63	0,65	0,73	0,74
Campione 2	2,03	2,4	2,37	2,2

F. Limitazioni per i campioni di neonato

I neonati (età < 3 mesi) presentano livelli elevati di 17 α -idrossipregnenolone solfato. Nonostante l'assenza quasi totale di formazione di reazioni incrociate con questa molecola, si raccomanda di eseguire la procedura di estrazione (X.B.)

XIV. CONTROLLO DI QUALITÀ INTERNO

- La percentuale della capacità legante B0/T deve risultare > 25%.
- **Se i risultati ottenuti dosando il Controllo 1 e il Controllo 2 non sono all'interno dei limiti riportati sull'etichetta dei flaconi, non è opportuno utilizzare i risultati ottenuti per i campioni, a meno che non si trovi una giustificazione soddisfacente.**
- Ogni laboratorio può preparare un proprio pool di sieri da utilizzare come controllo, da conservare congelato in aliquote. Non congelare e scongelare un' aliquota più di due volte.
- I criteri di accettazione delle differenze tra i risultati in duplicato dei campioni devono basarsi sulla buona prassi di laboratorio.

XV. INTERVALLI DI RIFERIMENTO

Questi valori sono puramente indicativi, ciascun laboratorio potrà stabilire i propri intervalli di valori normali.

	Intervallo concentrazione (dal 2,5 al 97,5%) (ng/ml)	Numero di soggetti
Maschi normali	0.67 – 3.32	79
Femmine normali		
. Fase follicolare	0.41 – 2.27	50
. Fase luteinica	0.23 – 3.87	28
Gravidanza		
. Primo trimestre	2.60 – 7.95	30
. Secondo trimestre	1.83 – 9.74	30
. Terzo trimestre	3.54 – 18.97	15
Neonati (dopo l'estrazione)	0.34 – 1.96	23 (da 0 a 3 mesi)

XVI. PRECAUZIONI PER L'USO

Sicurezza

Il kit è solo per uso diagnostico in vitro.

Il kit contiene ¹²⁵I (emivita: 60 giorni) emettente raggi X (28 keV) e γ (35.5 keV) ionizzanti.

L'acquisto, la detenzione, l'utilizzo e il trasporto di materiale radioattivo sono soggetti a regolamentazione locale. In nessun caso il prodotto può essere somministrato ad esseri umani o animali.

Usare sempre guanti e camici da laboratorio quando si manipola materiale radioattivo. Le sostanze radioattive devono essere conservate in propri contenitori in appositi locali che devono essere interdetti alle persone non autorizzate. Deve essere tenuto un registro di carico e scarico del materiale radioattivo. Il materiale di laboratorio e la vetreria deve essere dedicato all'uso di isotopi specifici per evitare cross-contaminazioni.

In caso di contaminazione o dispersione di materiale radioattivo, fare riferimento alle norme locali di radioprotezione. I rifiuti radioattivi devono essere smaltiti secondo le norme locali di radioprotezione. Lo scrupoloso rispetto delle norme per l'uso di sostanze radioattive fornisce una protezione adeguata agli utilizzatori.

I reattivi di origine umana presenti nel kit sono stati dosati con metodi approvati da organismi di controllo europei o da FDA e si sono rivelati negativi per HBs Ag, anti HCV, anti HIV1 e anti HIV2. Non sono disponibili metodi in grado di offrire la certezza assoluta che derivati da sangue umano non possano provocare epatiti, AIDS o trasmettere altre infezioni. Manipolare questi reattivi o i campioni di siero o plasma secondo le procedure di sicurezza vigenti.

Tutti i prodotti di origine animale o loro derivati provengono da animali sani. I componenti di origine bovina provengono da paesi dove non sono stati segnalati casi di BSE. E' comunque necessario considerare i prodotti di origine animale come potenziali fonti di infezioni.

Evitare ogni contatto dell'epidermide con i reattivi contenenti sodio azoturo come conservante. Il sodio azoturo può reagire con piombo rame o ottone presenti nelle tubature di scarico per formare metallo-azoturi esplosivi. Smaltire questi reattivi facendo scorrere abbondante acqua negli scarichi.

Nei luoghi dove si usano sostanze radioattive non è consentito consumare cibi o bevande, fumare o usare cosmetici. Non pipettare i reattivi con pipette a bocca.

XVII. RIFERIMENTI BIBLIOGRAFICI

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 adrenance.
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. SCHEMA DEL DOSAGGIO

	Attività totale (μ l)	Calibratore (μ l)	Campioni Controlli (S) (μ l)	Campioni estratti (μ l)
Calibratore (0 à 5)	-	25	-	-
Campioni, controlli	-	-	25	-
Campioni estratti	-	-	-	50
Marcato	500	500	500	500
Incubazione	3 ore a 37°C			
Separazione Soluzione di lavoro del tampone di lavaggio Separazione	-	Aspirare 3,0 ml Aspirare con cautela		
Conteggio	Contare le provette per 1 minuto			

Leer el protocolo completo antes de usar.

17 α -HYDROXYPROGESTERONE (17-OHP)-RIA-CT

I. INSTRUCCIONES DE USO

Radioinmunoensayo para la determinación cuantitativa *in vitro* de la 17 α -hidroxiprogesterona (17-OHP) humana en suero y plasma.

II. INFORMACIÓN GENERAL

- A. **Nombre:** DIAsource 17 α -HYDROXYPROGESTERONE (17-OHP)-RIA-CT Kit
- B. **Número de Catálogo:** KIP1409: 96 test
- C. **Fabricado por:** DIAsource ImmunoAssays S.A.
Rue du Bosquet, 2, B-1348 Louvain-la-Neuve, Belgium.

Para cuestiones técnicas y información sobre pedidos contactar:
Tel: +32 (0) 10 84.99.11 Fax: +32 (0) 10 84.99.91

III. INFORMACIÓN CLÍNICA

A. *Actividades biológicas de 17 α -hidroxiprogesterona*

17 α -hidroxiprogesterona (17-OHP) es una hormona C-21 esteroide (peso molecular 330.3) producida de 17 α -hidroxipregnenolona en la glándula suprarrenal y también en los ovarios, los testículos y la placenta. 17-OHP es hidroxilada en las posiciones 11 y 21 para producir cortisol vía 11-desoxicortisol.

B. *Aplicaciones clínicas de la determinación de 17 α -hidroxiprogesterona*


Por lo general las dosis de líquido amniótico 17-OHP son importantes para el diagnóstico de hiperplasia suprarrenal congénita (CAH). Esta CAH es causada por un defecto de enzima específico (seis deficiencias distintas han sido descritas). Debido a estas deficiencias, ACTH aumenta y causa hiperplasia suprarrenal y el desarrollo de muchos precursores esteroideos. Pero es también interesante que se conozca el valor de 17-OHP en pacientes con varicocele (17-OHP y testosterona marcan la función celular Leydig) y en pacientes masculinos envejecidos para detectar hipertrofia prostática benigna (BPH) y carcinoma de la próstata (PCA) (el 17-OHP es considerablemente más bajo en grupos con PCA y BPH que en hombres normales).

Hay otros campos para investigaciones con 17-OHP como: esterilidad masculina, niñas con virilización peripuberal, niños con adrenarquia prematura (en estos casos, los valores de 17-OHP están aumentados sin o después del estímulo con ACTH).

IV. PRINCIPIOS DEL MÉTODO

Una cantidad fija de 17-OHP marcada con I^{125} compete con el 17-OHP a medir, presente en la muestra ó en el calibrador, por los puntos de unión del anticuerpo inmovilizado en las paredes de un tubo de poliestireno. No se requiere ni extracción ni cromatografía debido a la alta especificidad de los anticuerpos utilizados. Después de 3 horas de incubación a 37°C, una aspiración termina con la reacción de competición. Los tubos se lavan con 3 ml de Solución de lavado y se aspiran otra vez. Se dibuja la curva de calibración y las concentraciones de 17-OHP de las muestras se determinan por interpolación de la dosis en la curva de calibración.

V. REACTIVOS SUMINISTRADOS

Reactivos	Kit 96 test	Reconstitución			
 Tubos recubiertos con anti 17-OHP	2 x 48	Listo para uso			
<table border="1" data-bbox="119 629 255 678"> <tr> <td>Ag</td> <td>^{125}I</td> </tr> </table> <p>TRAZADOR:17-OHP marcado con I^{125} (grado HPLC) en tampón fosfato/ácido cítrico con caseína bovina y azida (<0,1%)</p>	Ag	^{125}I	1 vial 55 ml 190 kBq	Listo para uso	
Ag	^{125}I				
<table border="1" data-bbox="124 801 252 846"> <tr> <td>CAL</td> <td>0</td> </tr> </table> <p>Calibrador cero en suero humano y azida (0,5%)</p>	CAL	0	1 vial 3 ml	Listo para uso	
CAL	0				
<table border="1" data-bbox="124 929 263 974"> <tr> <td>CAL</td> <td>N</td> </tr> </table> <p>Calibradores 17-OHP - N = 1 al 5 (mirar los valores exactos en las etiquetas) en suero humano y azida (0,5%)</p>	CAL	N	5 viales 0,5 ml	Listo para uso	
CAL	N				
<table border="1" data-bbox="76 1093 343 1137"> <tr> <td>WASH</td> <td>SOLN</td> <td>CONC</td> </tr> </table> <p>Solución de lavado (TRIS-HCl)</p>	WASH	SOLN	CONC	1 vial 10 ml	Diluir 70 x con agua destilada (utilizar agitador magnético)
WASH	SOLN	CONC			
<table border="1" data-bbox="87 1227 263 1272"> <tr> <td>CONTROL</td> <td>N</td> </tr> </table> <p>Controles - N = 1 o 2 en plasma humano y timol</p>	CONTROL	N	2 viales liofilizados	Añadir 0,5 ml de agua destilada	
CONTROL	N				

Nota: Para diluciones de muestras utilizar estándar cero

VI. MATERIAL NO SUMINISTRADO

El material mencionado a continuación es necesario y no esta incluido en el kit

1. Agua destilada
2. Pipetas de 25µl, 500µl y 3 ml (Se recomienda el uso de pipetas precisas con puntas desechables de plástico)
3. Vórtex
4. Agitador magnético
5. Baño con agua a 37°C
6. Jeringa automática 5 ml (tipo Cornwall) para el lavado
7. Sistema de aspiración (opcional)
8. Contador de radiaciones gamma para medir I^{125} (mínima eficiencia 70%)
9. Incubadora a 37 °C
- Opcional (para extracción)**
10. Dietiléter (grado analítico; pureza > 98%)
11. Tubos de vidrio desechables (12 x 75 mm), con tapones.
12. Solución de reconstitución DIAsource para (17-OHP)-RIA-CT. ref.: 32.140.74.

VII. PREPARACIÓN DE REACTIVOS

- A. **Controles:** Reconstituir los controles con 0,5 ml de agua destilada.
- B. **Solución de lavado de trabajo:** Preparar el volumen necesario de Solución de lavado de trabajo mezclando 69 partes de agua destilada por 1 parte de Solución de lavado (70x). Utilizar un agitador magnético para homogeneizar. Desechar la solución de lavado de trabajo no utilizada al final del día.

VIII. ALMACENAJE Y CADUCIDADES DE LOS REACTIVOS

- Antes de abrir ó reconstituir todos los componentes de los kits son estables hasta la fecha de caducidad indicada en la etiqueta, si se guardan a 2-8°C.
- Después de su reconstitución los controles son estables durante una semana a 2-8°C. Para periodos más largos, alícuotar y guardar a -20°C durante 3 meses.
- La solución de lavado de trabajo recién preparada solo debe utilizarse en el mismo día.
- Después del primer uso, el trazador es estable hasta la fecha de caducidad, si se guarda en el vial original cerrado a 2-8°C.
- Las alteraciones de los reactivos en el aspecto físico pueden indicar inestabilidad ó deterioro.

IX. RECOGIDA Y PREPARACIÓN DE MUESTRAS

- Las muestras de suero ó plasma deben ser guardadas a 2-8°C.
- Si el ensayo no se realiza en 48 hrs., almacenar las muestras a -20°.
- Evitar congelar y descongelar sucesivamente.
- El plasma heparinizado da resultados 10% más bajos que el suero:
 $Y(\text{hep. plasma}) = 0,9 \times (\text{Suero}) + 0,20 \quad r = 0,92 \quad n = 20$
- El plasma con EDTA da resultados 10% más bajos que el suero:
 $Y(\text{plasma EDTA}) = 0,9 \times (\text{Suero}) + 0,18 \quad r = 0,87 \quad n = 20$

X. PROTOCOLO

A. Notas de manejo

No utilizar el kit ó componentes después de la fecha de caducidad. No mezclar reactivos de diferente numero de lote. Llevar todos los reactivos a temperatura ambiente antes de su uso. Agitar minuciosamente todos los reactivos y muestras, agitándolos o girándolos suavemente. Con el fin de evitar ninguna contaminación utilizar puntas de pipetas desechables y limpias para la adición de cada reactivo y muestra. El uso de pipetas de precisión ó equipamiento de dispensación automática mejorara la precisión. Respetar los tiempos de incubación. Preparar la curva de calibración en cada ensayo, no utilizar los datos de un ensayo previo.

B. Extracción de muestras de recién nacidos (opcional) – PARA MUESTRAS DE SUERO

1. Marcar un tubo de vidrio para cada muestra (**no extraer calibradores ni controles**).
2. Pipetear 75 µl de suero y seguidamente 2,25 ml de dietiléter.
3. Mezclar todos los tubos vigorosamente en el vórtex (2 x 1 minutos).
4. Dejarlos reposar sobre la mesa durante 5 minutos.
5. Guardar los tubos a -20 °C para congelar la fase acuosa.
6. Preparar una segunda serie de tubos de vidrio y transferir la fase orgánica de cada muestra en los nuevos tubos. Evitar la contaminación que puede provocar la fase acuosa.
7. Evaporar completamente la fase orgánica (éter) bajo un chorro de aire o llevando los tubos a una temperatura de 37°C (baño con agua). Manipular llevando una capucha.
8. Disolver el extracto de éter seco con 150 µl de solución de reconstitución (**no se suministra, ver VI**). Mezclar vigorosamente en el vórtex durante 1 minuto.
9. Dejar reposar durante 10-15 minutos y volver a mezclar en el vórtex durante 1 minuto. Estos volúmenes permiten realizar la determinación por duplicado.

C. Protocolo

1. Marcar los tubos recubiertos por duplicado para cada unos de los estándares, muestras y controles. Para la determinación de las Cuentas Totales, marcar 2 tubos normales.
2. Agitar brevemente los calibradores, muestras y controles y dispensar 25 µl de cada uno en sus respectivos tubos. **Para muestras extraídas de recién nacidos, pipetear 50 µl en vez de 25 µl.**
3. Dispensar 0,5 ml de 17-OHP marcado con I^{125} en cada tubo, incluyendo los tubos destinados a las Cuentas Totales.
4. Agitar suavemente la gradilla de tubos para soltar cualquier burbuja adherida a las paredes de los tubos.
5. Incubar durante 3 horas a 37°C.
6. Aspirar el contenido de cada tubo (excepto los de Cuentas Totales). Asegurarse que la punta de la pipeta de aspiración toca el fondo del tubo con el fin de aspirar todo el líquido.

- Lavar los tubos con 3 ml de Solución de lavado de trabajo (excepto los de Cuentas Totales) y aspirar. Evitar la formación de espuma durante la adición de la Solución de lavado
- Dejar los tubos en posición inversa durante 2 minutos y aspirar el líquido restante.
- Medir la actividad de cada tubo durante 60 segundos en un Contador Gamma.

XI. CÁLCULO DE RESULTADOS

- Calcular la media de los duplicados.
- Calcular la radiactividad enlazada como un porcentaje de la unión con respecto al calibrador cero (0) de acuerdo con la siguiente fórmula:

$$B/B_0(\%) = \frac{\text{Cuentas (Calibrador ó muestra)}}{\text{Cuentas (Calibrador Cero)}} \times 100$$

- Utilizando papel 3 ciclo semilogarítmico ó logit-log, representar los valores de (B/B₀%) de cada calibrador frente a las concentraciones del 17-OHP de cada calibrador, rechazando los puntos exteriores.
- Métodos computarizados de computación de resultados pueden ser utilizados para la construcción de la curva de calibración. Si se utiliza un sistema automático de cálculo de resultados, se recomienda usar la representación gráfica "4 parámetros".
- Por interpolación de los valores (B/B₀%) de las muestras, se determinan los valores de las concentraciones de las mismas desde la curva de calibración.
- La concentración obtenida para las muestras extraídas de recién nacidos (ver X.B.) puede leerse directamente en la curva (no se necesita factor de corrección).
- El porcentaje total de enlace del trazador en ausencia de 17-OHP no marcado (B₀/T) debe ser calculado en cada ensayo.

XII. EJEMPLO DE RESULTADOS

Los datos mostrados a continuación, fue obtenida con un trazador de 6 semanas, sirven como ejemplo y nunca deberán ser usados como una calibración real.

(17-OHP)-RIA-CT		cpm	B/Bo (%)
Cuentas Totales		32363	
Calibrador	0,00 ng/ml	12596	100,0
	0,17 ng/ml	9769	77,6
	0,59 ng/ml	6529	51,8
	1,4 ng/ml	3752	29,8
	4,3 ng/ml	1396	11,1
	14,0 ng/ml	479	3,8

XIII. REALIZACIÓN Y LIMITACIONES

A. Sensibilidad

El LoB (límite del blanco) se probó midiendo 20 veces el blanco y se calculó como la desviación estándar media ± 2 de la distribución de los valores de prueba.

LoB se calculó a 0,03 ng/ml.

El LoD (Límite de detección) se calculó como el LoB ± 1.645 Desviación estándar de una muestra de baja concentración medida en 10 pruebas diferentes.

El LoD se calculó en 0,09 ng/ml.

El LoQ (límite de cuantificación) se calculó analizando 4 muestras de baja concentración, en 10 ensayos diferentes.

El LoQ se calculó en 0,14 ng/ml.

B. Especificidad

La especificidad fue estimada por la adición de esteroides que pueden ser presentes en las muestras de los pacientes a un pool de muestras de 17-OHP ($\pm 0,5$ ng/ml).

Componente	Cantidad añadida (ng/ml)	Reacción-cruzada (%)
17 α -hidroxiprogesterona	-	100
Progesterona	500	0,7
17 α -hidroxipregnenolona	1000	0,3
21-deoxicortisol	1000	1,07
Pregnenolona	500	0,02
11-deoxicortisol	500	0,21
Corticosterona	1000	0,008
11-deoxicorticosterona	500	0,24
Cortisol	5000	0,005
Testosterona	5000	0,004
Androstenediona	5000	0,01
Estradiol	1000	0,008
Sulfato de 17 α hidroxipregnenolona	5000	0,34

Se evaluó el efecto de sustancias potencialmente interferentes en las muestras utilizando el DIASource 17OHP-RIA-CT. Se probaron muestras de suero con diferentes niveles de Hemoglobina, Bilirrubina, Triglicéridos y Bilirrubina Conjugada en muestras con diferentes concentraciones de 17 α -hidroxiprogesterona. Nuestro criterio de aceptación fue tener una interferencia de menos de 10%. Las sustancias analizadas no afectaron el desempeño de la prueba DIASource 17OHP-RIA-CT.

Sustancia	17OHP (ng/ml)	Concentración del interferente (mg/dl)	Variación media
Hemoglobina	0,57	250	98.6%
		500	
	1,8	250	
		500	
Bilirrubina Conjugada	0,57	50	95.1%
	1,8	50	
Bilirrubina no conjugada	0,57	50	99.2%
		100	
	1,8	50	
		100	
Triglicéridos	0,57	50	97.0%
		100	
		250	
		500	
		1000	
	1,54	50	
		100	
		250	
		500	
		1000	

C. Precisión

INTRA-ENSAYO

INTRA-ENSAYO

DESPUÉS DE LA EXTRACCIÓN

Suero	N	<X> \pm DE (ng/ml)	CV (%)	Suero	N	<X> \pm DE (ng/ml)	CV (%)
A	20	0,73 \pm 0,05	6,8	C	24	0,56 \pm 0,06	10,7
B	20	1,94 \pm 0,09	4,6	D	24	1,81 \pm 0,17	9,4

DE: Desviación Estándar; CV: Coeficiente de variación

ENTRE-ENSAYO

ENTRE-ENSAYO

DESPUÉS DE LA EXTRACCIÓN

Suero	N	<X> \pm DE (ng/ml)	CV (%)	Suero	N	<X> \pm DE (ng/ml)	CV (%)
A	12	0,69 \pm 0,06	8,7	A	8	0,72 \pm 0,13	18
B	12	2,08 \pm 0,16	7,6	B	8	2,03 \pm 0,39	19,2

DE: Desviación Estándar; CV: Coeficiente de variación

D. Exactitud

TEST DILUCIÓN

Muestra	Dilución	Concent. Teórica (ng/ml)	Concent. Medida (ng/ml)
	1/1	-	3,3
	1/2	1,65	1,79
	1/4	0,83	1,0
	1/8	0,42	0,5
	1/16	0,21	0,27

Las muestras fueron diluidas con el calibrador cero.

TEST DE RECUPERACIÓN

Muestra	17-OHP añadido (ng/ml)	17-OHP Recuperado (ng/ml)	Recuperado (%)
1	6	5,7	95
	3	2,99	99
	1,5	1,64	109
	0,75	0,81	108
2	6	5,27	87
	3	2,86	95
	1,5	1,49	99
	0,75	0,74	98

Factor de conversión:

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

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

De acuerdo con nuestros conocimientos, no existe ninguna preparación de referencia internacional de este parámetro.

E. Tiempo de espera entre la dispensación del último calibrador y la de la muestra

Como se muestra a continuación la precisión del ensayo se mantiene incluso en el caso de dispensar la muestra 40 minutos después de haberse adicionado el calibrador a los tubos cubiertos.

TIEMPO DE ESPERA

Muestra (ng/ml)	0'	10'	30'	40'
Muestra 1	0,63	0,65	0,73	0,74
Muestra 2	2,03	2,4	2,37	2,2

F. Limitaciones de las muestras de recién nacidos

Los niños muy pequeños (< 3 meses) presentan niveles elevados de sulfato de 17 α -hidroxipregnenolona. A pesar de que prácticamente no existe reacción cruzada con esta molécula, se recomienda aplicar el protocolo de extracción (X. B.).

XIV. CONTROL DE CALIDAD INTERNO

- El porcentaje de trazador total ligado en la ausencia de 17-OHP no marcada (B0/T) tiene que ser > 25%.
- Si los resultados obtenidos para el Control 1 y/o Control 2 no están dentro del rango especificado en la etiqueta del vial, los resultados obtenidos no podrán ser utilizados a no ser que se pueda dar una explicación convincente de dicha discrepancia
- Si es conveniente, - cada laboratorio puede utilizar sus propios pools de controles, los cuales se guardan en alícuotas congeladas. No congelar y descongelar más de dos veces.
- Los criterios de aceptación de la diferencia entre los duplicados de las muestras se apoyan en las prácticas de laboratorio corrientes.

XV. INTERVALOS DE REFERENCIA

Estos valores solamente sirven de pauta; cada laboratorio tiene que establecer sus propios valores normales.

	Alcance de concentración (2,5 a 97,5% percentiles) (ng/ml)	Número de sujetos
Hombres normales	0.67 – 3.32	79
Mujeres normales		
. Fase folicular	0.41 – 2.27	50
. Fase lútea	0.23 – 3.87	28
Embarazo		
. Primer trimestre	2.60 – 7.95	30
. Segundo trimestre	1.83 – 9.74	30
. Tercer trimestre	3.54 – 18.97	15
Recién nacidos (después de la extracción)	0.34 – 1.96	23 (0 a 3 meses)

XVI. PRECAUCIONES Y ADVERTENCIAS

Seguridad

Para uso solo en diagnóstico in vitro.

Este kit contiene I¹²⁵ (vida media: 60 días) emisor de rayos X (28 keV) y de rayos γ (35.5 keV) ionizantes.

Este producto radiactivo solo puede ser manejado y utilizado por personas autorizadas; la compra, almacenaje, uso y cambio de productos radiactivos están sujetos a la legislación del país del usuario. En ningún caso el producto deberá ser suministrado a humanos y animales.

Todo el manejo de producto radiactivo se hará en una área señalizada, diferente de la de paso regular. Deberá de utilizarse un libro de registros de productos radiactivos utilizados. El material de laboratorio, vidrio que podría estar contaminado radiactivamente deberá de descontaminarse para evitar la contaminación con otros isótopos.

Cualquier derramamiento radiactivo deberá ser limpiado de inmediato de acuerdo con los procedimientos de seguridad. Los desperdicios radiactivos deberán ser almacenados de acuerdo con las regulaciones y normativas vigentes de la legislación a la cual pertenezca el laboratorio. El ajustarse a las normas básicas de seguridad radiológica facilita una protección adecuada.

Los componentes de sangre humana utilizados en este kit han sido testados por métodos aprobados por la CEE y/o la FDA dando negativo a HBsAg, anti-HCV, anti-HIV-1 y 2. No se conoce ningún método que asegure que los derivados de la sangre humana no transmitan hepatitis, SIDA ó otras infecciones. Por lo tanto el manejo de los reactivos y muestras se hará de acuerdo con los procedimientos de seguridad locales.

Todos los productos animales y derivados han sido obtenidos a partir de animales sanos. Componentes bovinos originales de países donde BSE no ha sido informado. Sin embargo, los componentes conteniendo sustancias animales deberán ser consideradas como potencialmente infecciosas.

Evitar cualquier contacto de los reactivos con la piel (azida sódica como conservante). La azida en este kit puede reaccionar con el plomo y cobre de las cañerías y producir azidas metálicas altamente explosivas. Durante el proceso de lavado, hacer circular mucha cantidad de agua por el sumidero para evitar el almacenamiento de la azida.

No fumar, beber, comer ó utilizar cosméticos en el área de trabajo. No pipetear con la boca. Utilizar ropa de protección y guantes.

XVII. BIBLIOGRAFIA

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 adrenance.
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

	CUENTAS TOTALES (μ l)	CALIBRA DORES (μ l)	MUESTRA(S) CONTROL(S) (μ l)	MUESTRAS EXTRAÍDAS (μ l)
--	----------------------------------	--------------------------------	--	-------------------------------------

Calibradores (0-5)	-	25	-	-
Muestras, controles	-	-	25	-
Muestras extraídas	-	-	-	50
Trazador	500	500	500	500
Incubación	3 horas a 37°C			
Separación Solución de lavado de trabajo Separación	-	aspirar 3,0 ml aspirar		
Recuento	Contar los tubos durante 60 segundos			

Leia todo o protocolo antes de utilizar.

17 α -HYDROXYPROGESTERONE (17-OHP)-RIA-CT

I. UTILIZAÇÃO PREVISTA

Radioimunoensaio para adeterminação quantitativa *in vitro* do 17 α -hidroxiprogesterona (17-OHP) humano no soro e no plasma.

II. INFORMAÇÕES GERAIS

- A. **Nome do proprietário :** DIAsource-Kit 17 α -HYDROXYPROGESTERONE (17-OHP)-RIA-CT
- B. **Número do catálogo :** KIP1409 : 96 testes
- C. **Produzido por :** DIAsource ImmunoAssays S.A.
Rue du Bosquet, 2, B-1348 Louvain-la-Neuve, Bélgica.

Para obter informações sobre aquisição ou assistência técnica , contacte :
Bélgica Tel : +32 (0)10 84.99.11 Fax : +32 (0)10 84.99.91
Ou o representante local

III. SIGNIFICADO CLÍNICO-

A *Atividade Biológica da 17 α -hidroxiprogesterona*

17 α -hidroxiprogesterona (17-OHP) é um hormônio esteróide C-21 (peso molecular 330.3) que é produzido pela 17 α -hedroxipregnenolona na adrenal e também nos ovários, testículos e placenta. 17-OHP é hidroxilado na posição 11 e 21 para produzir cortisol via 11-deoxicortisol.

B. *Aplicações Clínicas da determinação da 17 α -hidroxiprogesterona*


Como regra, a dosagem de 17-OHP em soro ou fluido amniótico são relevantes para o diagnóstico da hiperplasia adrenal congênita (HAC). Esta HAC é devido ao defeito específico na enzima (seis diferentes deficiências enzimáticas tem sido descritas). Como resultado destas deficiências, há um aumento de ACTH produzindo hiperplasia adrenal e elevação de muitos precursores esteróides . Mas é também muito interessante para conhecer o valor de 17-OHP em pacientes com varicocele. (17-OHP e testosterona representam marcadores da função das células de Leydig) e em pacientes homens mais velhos, para detectar Hipertrofia Prostática Benigna (BPH) e carcinoma de próstata (PCA) (plasma 17-OHP é significativamente baixo em grupos PCA e BPH quando comparados com homens normais).

Existem outros pontos para investigações com 17-OHP como : infertilidade masculina, mulheres com virilização peripubertal, crianças com adrenarca prematura (nestes casos, os valores de 17-OHP são aumentados sem ou após ACTH estimulação).

IV. PRINCÍPIO DO MÉTODO

Uma quantidade fixa de 17-OHP marcado com ^{125}I compete com o 17-OHP a ser medido, que esteja presente na amostra ou no calibrador, para uma quantidade fixa de locais de anticorpo, que é imobilizado nas paredes dos tubos de poliestireno. Nem a extração nem a cromatografia são necessárias, devido à elevada especificidade dos anticorpos revestidos. Após uma incubação de 3 horas à 37°C, a reacção de competição termina com a operação de aspiração. A seguir os tubos são lavados com 3ml de solução de lavagem de trabalho e novamente aspirados. Traça-se uma curva de calibração e as concentrações de 17-OHP nas amostras são determinadas por interpolação da dose a partir da curva de calibração.

V. REAGENTES FORNECIDOS

Reagentes	Kit 96 Testes	Reconstituição			
 Tubos revestidos com anti 17-OHP	2 x 48	Pronto para utilizar			
<table border="1"><tr><td>Ag</td><td>^{125}I</td></tr></table> Marcador: 17-OHP marcado com ^{125}I (grau HPLC) em tampão fosfato/ácido cítrico com caseína bovina e azida (<0,1%)	Ag	^{125}I	1 recipiente 55 ml 190 kBq	Pronto para utilizar	
Ag	^{125}I				
<table border="1"><tr><td>CAL</td><td>0</td></tr></table> Calibrador Zero em soro human e azida (0,5%)	CAL	0	1 recipiente 3 ml	Pronto para utilizar	
CAL	0				
<table border="1"><tr><td>CAL</td><td>N</td></tr></table> Calibradores 17-OHP - N = 1 para 5 (ver os valores exactos nos rótulos do recipiente) em soro human e azida (0,5%)	CAL	N	5 recipientes 0,5 ml	Pronto para utilizar	
CAL	N				
<table border="1"><tr><td>WAS</td><td>SOLN</td><td>70x</td></tr></table> Solução de lavagem (TRIS-HCl)	WAS	SOLN	70x	1 recipiente 10 ml	Dilua 70 x com água destilada (use um agitador magnético).
WAS	SOLN	70x			
<table border="1"><tr><td>CONTR</td><td>N</td></tr></table> Controlos - N = 1 ou 2 No plasma humano e timol	CONTR	N	2 recipientes liofilizados	Adicione 0,5 ml de água destilada	
CONTR	N				

Note : Use o calibrador zero para diluições de amostras.

VI. MATERIAL NÃO FORNECIDO

O seguinte material é necessário, mas não fornecido com o kit:

1. Água destilada
 2. Pipetas automáticas: 25 μl , 500 μl e 3 ml (recomenda-se a utilização de pipetas precisas, com pontas descartáveis)
 3. Misturador de vortex
 4. Agitador magnético
 5. Banho maria à 37°C
 6. Pipeta automática de 5 ml para lavagem (tipo Cornwall)
 7. Sistema de aspiração (opcional)
 8. Qualquer contador gamma capaz de medir ^{125}I pode ser utilizado (min alcance de 70%).
 9. Incubadora a 37°C
- Opcional (para extração)**
10. Dietil éter (qualidade analítica; pureza > 98%)
 11. Tubos descartáveis de vidro (12 x 75 mm), com tampa.
 12. DIAsource Solução de Reconstituição para (17-OHP) -RIA-CT. ref: 32.140.74.

VII. PREPARAÇÃO DOS REAGENTES

- A. **Controlos :** Reconstitua os controlos com 0,5 ml de água destilada.
- B. **Solução de lavagem de trabalho :** Prepare um volume adequado de Solução de lavagem de trabalho ao adicionar 69 volumes de água destilada para 1 volume de solução de lavagem (70x). Use um agitador magnético para homogeneizar. Rejeite a solução não utilizada no final do dia.

VIII. ARMAZENAMENTO E PRAZO DE VALIDADE DOS REAGENTES

- Antes de abrir e reconstituir, todos os componentes do kit são estáveis até ao final do prazo de validade, indicado no rótulo desde que mantido entre 2 to 8°C.
- Após reconstituição, os controlos são estáveis durante 1 semana entre 2 a 8°C. Durante períodos de armazenamento mais longos, devem ser feitas alíquotas e mantidas a -20°C por 3 meses
- A solução de lavagem de trabalho deve ser feita e utilizada no mesmo dia.
- Depois da 1ª utilização o marcador é estável até final do prazo de validade, desde que mantido no recipiente original, bem fechado entre 2 to 8°C.
- Alterações no aspecto dos reagentes do kit podem indicar instabilidade ou degradação.

IX. RECOLHA E PREPARAÇÃO DE AMOSTRAS

- Amostras de soro ou plasma devem ser mantidas entre 2-8°C.
- Se a análise não for realizada em 48 hrs, recomenda-se conservar a -20°C.
- Evite ciclos de congelamento e descongelamento sucessivos.
- Plasma heparinizado fornece resultados 10% mais baixos do que no soro: Y (hep. Plasma) = 0,9 x (soro) + 0,20 r = 0,92 n = 20
- Plasma EDTA fornece resultados 10% mais baixos do que no soro: Y (plasma com EDTA) = 0,9 x (soro) + 0,18 r = 0,87 n = 20

X. PROCEDIMENTO

A. Notas de manipulação

Não utilize o kit ou qualquer componente depois da expiração do prazo de validade. Não misture componentes de diferentes lotes. Antes de utilizar todos os componentes devem estar à temperatura ambiente (TA). Misture bem os reagentes e as amostras, por agitação ou rotação suaves. Para evitar contaminações cruzadas utilize uma ponta de pipeta limpa e descartável, para adição de cada componente. Pipetas de alta precisão ou equipamento automático de pipetagem melhoram a precisão. Respeite os períodos de incubação. Prepare uma curva de calibração para cada análise, não utilize dados de análises prévias.

B. Extração de amostras de recém-nascidos (opcional) - PARA AMOSTRA DE SORO.

1. Identifique um tubo de vidro para cada amostra (**não extrair calibradores ou controlos**).
2. Pipetar 75 μl de soro, seguido por 2,25 ml de éter dietílico.
3. Vortex todos os tubos vigorosamente (2 x 1 minuto)
4. Deixe repousar sobre a mesa por 5 minutos
5. Colocar os tubos a -20 ° C, a fim de congelar a fase aquosa.
6. Prepara-se uma segunda série de tubos de vidro e, para cada amostra, transferir a fase orgânica para estes novos tubos. Evitar contaminação pela fase aquosa.
7. Evapora-se a fase orgânica (éter) completamente sob uma corrente de ar ou colocando os tubos a 37 ° C (banho maria). Manipular sob fluxo.
8. Dissolver o extrato etéreo seco com 150 μl de solução de reconstituição (não fornecida, consulte VI.). Vortex vigorosamente durante 1 minuto.
9. Deixe repousar por 10-15 minutos e vortex novamente por 1 minuto. Estes volumes permitem executar a determinação em duplicata.

C. Procedimento

1. Rotule os tubos revestidos em duplicado, para cada calibrador, amostra, controlo. Para a determinação das contagens totais, rotule 2 tubos normais. Agite ligeiramente no vortex calibradores, amostras e controlos e dispense 25 μl de cada, para os tubos respectivos **Para as amostras extraídas de recém-nascidos, pipetar 50 μl em vez de 25 μl .**
2. Dispense 0,5 ml de 17-OHP marcado com I 125 para cada tubo, incluindo os tubos normais para as contagens totais.
3. Agite suavemente o suporte dos tubos, para libertar possíveis bolhas de ar.
4. Incube durante 3 horas à 37°C.
5. Aspire o conteúdo de cada tubo (excepto os das contagens totais). Assegure-se que a ponta plástica do aspirador atinge o fundo do tubo revestido, para remover todo o líquido.
6. Lave os tubos com 3 ml de solução de lavagem de trabalho (excepto os das contagens totais) e aspire. Evite formação de espuma quando adiciona a solução de lavagem.
7. Depois da lavagem, deixe os tubos direitos durante 2 minutos e seguidamente aspire a última porção de líquido.
8. Conte os tubos num contador gamma durante 60 segundos.

XI. CÁLCULO DOS RESULTADOS

1. Calcule a média das determinações em duplicata.
2. Calcule a radioactividade de ligação como uma percentagem da ligação determinada no ponto do calibrador zero (0), de acordo com a fórmula seguinte:

$$B/B_0(\%) = \frac{\text{Contagens(Calibrador ou amostra)}}{\text{Contagens (calibrador Zero)}} \times 100$$

3. Utilizando um papel de gráfico semi-logarítmico de 3 ciclos ou logit-log trace os valores (B/B₀(%)) para cada ponto de calibração como uma função da concentração do 17-OHP em cada ponto, rejeitando os "outliers" (casos marginais) óbvios.
4. Os métodos informáticos também podem ser utilizados para construir a curva de calibração. Se o processamento dos resultados for automático, ajuste na curva da função logística com 4 parâmetros é recomendado.
5. Por interpolação dos valores das amostras (B/B₀(%)), determine as concentrações de 17-OHP das amostras da curva de referência.
6. A concentração obtida para amostras extraídas de recém-nascidos (ver XB) podem ser lidas diretamente na curva (sem fator de correção necessário).
7. Para cada análise, a percentagem de marcador total ligado na ausência de 17-OHP (B₀/T) marcado, deve ser verificada.

XII. DADOS TÍPICOS

Os dados seguintes, obtido com um marcador de 6 semanas, são apenas para exemplificação e nunca devem ser utilizados em detrimento dos dados reais da curva de calibração.

(17-OHP)-RIA-CT		cpm	B/Bo (%)
Contagens total		32363	
Calibrador	0,00 ng/ml	12596	100,0
	0,17 ng/ml	9769	77,6
	0,59 ng/ml	6529	51,8
	1,4 ng/ml	3752	29,8
	4,3 ng/ml	1396	11,1
	14,0 ng/ml	479	3,8

XIII. DESEMPENHO E LIMITES

A. Sensibilidade

O LoB (Limite do Branco) foi testado medindo 20 vezes o branco e foi calculado como a média \pm 2 Desvio Padrão da distribuição dos valores do teste.

LoB foi calculado em 0,03 ng/ml.

O LoD (Limite de Detecção) foi calculado como LoB \pm 1.645 Desvio Padrão de uma amostra de baixa concentração medida em 10 testes diferentes.

O LoD foi calculado em 0,09 ng/ml.

O LoQ (Limite de Quantificação) foi calculado testando 4 amostras de baixa concentração, em 10 ensaios diferentes.

O LoQ foi calculado em 0,14 ng/ml.

B. Especificidade

A especificidade foi estimada por um pool de amostras 17-OHP (\pm 0.5 ng/ml) reforçadas com esteróides os quais devem estar presentes em amostras dos pacientes.

Composto	Quantidade adicionada (ng/ml)	Reactividade-cruzada (%)
17 α -hidroxiprogesterona	-	100
Progesterona	500	0,7
17 α -hidroxipregnenolona	1000	0,3
21-deoxicortisol	1000	1,07
Pregnenolona	500	0,02
11-deoxicortisol	500	0,21
Corticosterona	1000	0,008
11-deoxicorticosterona	500	0,24
Cortisol	5000	0,005
Testosterona	5000	0,004
Androstenediona	5000	0,01
Estradiol	1000	0,008
17 α -hidroxypregnenolona sulfato	5000	0,34

O efeito de substâncias potencialmente interferentes em amostras usando o DIAsource 17OHP RIA-CT foi avaliada. Diferentes níveis de hemoglobina, bilirrubina, triglicéridos e amostras de soro bilirrubina conjugados foram testados em amostras com diferentes concentrações de 17 α -hidroxiprogesterona. Os nossos critérios de aceitação foi ter interferência inferior a 10%. As substâncias testadas não afetaram o desempenho do teste DIAsource 17OHP RIA-CT.

Substância	17OHP (ng/ml)	Concentração do interferente (mg/dl)	Media Variação
Hemoglobina	0.57	250	98.6%
		500	
	1.8	250	
		500	
Bilirrubina Conjugated	0.57	50	95.1%
	1.8	50	
Bilirrubina não conjugada	0.57	50	99.2%
		100	
	1.8	50	
		100	
Triglicéridos	0.57	50	97.0%
		100	
		250	
		500	
		1000	
	1.54	50	
		100	
		250	
		500	
		1000	

C. Precisão

INTRA-ENSAIO				INTRA-ENSAIO APOS EXTRAÇÃO			
Soro	N	<X> \pm SD (ng/ml)	CV (%)	Serum	N	<X> \pm SD (ng/ml)	CV (%)
A	20	0,73 \pm 0,05	6,8	C	24	0,56 \pm 0,06	10,7
B	20	1,94 \pm 0,09	4,6	D	24	1,81 \pm 0,17	9,4

DP: Desvio Padrão; CV: Coeficiente de variação

INTER-ENSAIO				INTER-ENSAIO APOS EXTRAÇÃO			
Soro	N	<X> \pm SD (ng/ml)	CV (%)	Soro	N	<X> \pm SD (ng/ml)	CV (%)
A	12	0,69 \pm 0,06	8,7	A	8	0,72 \pm 0,13	18
B	12	2,08 \pm 0,16	7,6	B	8	2,03 \pm 0,39	19,2

DP: Desvio Padrão; CV: Coeficiente de variação

D. Exactidão

Amostra	Diluição	Conc. teórico. (ng/ml)	Conc. medida (ng/ml)
	1/1	-	3,3
	1/2	1,65	1,79
	1/4	0,83	1,0
	1/8	0,42	0,5
	1/16	0,21	0,27

As amostras foram diluídas com calibrador zero.

TESTE DE RECUPERAÇÃO

Amostra	17-OHP adicionado (ng/ml)	17-OHP recuperado (ng/ml)	Recuperação (%)
1	6	5,7	95
	3	2,99	99
	1,5	1,64	109
	0,75	0,81	108
2	6	5,27	87
	3	2,86	95
	1,5	1,49	99
	0,75	0,74	98

Fator de conversão :

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

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

Não existe material de referência internacional para este parâmetro, que seja do nosso conhecimento

E. Intervalo de atraso de tempo entre o último calibrador e a dispensa de amostra

Conforme demonstrado a seguir, os resultados das análises continuam precisos, mesmo quando é dispensada uma amostra 40 minutos depois da adição do calibrador aos tubos revestidos.

INTERVALO DE ATRASO DE TEMPO

Amostra (ng/ml)	0'	10'	30'	40'
Amostra 1	0,63	0,65	0,73	0,74
Amostra 2	2,03	2,4	2,37	2,2

F. Limitações para amostras de recém-nascidos

Crianças muito jovens (< 3 meses de idade) apresentam altos níveis de sulfato de 17 α -hidroxipregnenolona. Apesar do fato de que não há quase nenhuma reação cruzada com esta molécula, recomendamos a aplicação do processo de extração (XB)

XIV. CONTROLO DE QUALIDADE INTERNO

- A percentagem total de marcadores ligados na ausência de 17-OHP não marcados (B0/T) deve ser > 25%.
- Se os resultados obtidos para o controlo 1 e/ou controlo 2 não estão dentro do intervalo especificado no rótulo do recipiente, os resultados não podem ser utilizados, a menos que seja dada uma explicação satisfatória para a discrepância encontrada.
- Se for desejável, cada laboratório pode fazer os seus próprios conjuntos de amostras de controlo, que podem ser mantidas congeladas em alíquotas. Não faça ciclos de congelamento/descongelamento mais do que 2 vezes.
- Aceitação do critério para a diferença entre os resultados em duplicatas das amostras devem ser realizadas em Boas Práticas de Laboratório..

XV. INTERVALOS DE REFERÊNCIA

Estes valores são dados apenas por segurança; cada laboratório deve estabelecer seus próprios valores normais.

	Varição de concentração (2,5 a 97,5%) (ng/ml)	Números de indivíduos
Homens normais	0.67 – 3.32	79
Mulheres normais		
· Fase folicular	0.41 – 2.27	50
· Fase Luteal	0.23 – 3.87	28
Gravidez		
· Primeiro trimestre	2.60 – 7.95	30
· Segundo trimestre	1.83 – 9.74	30
· Terceiro trimestre	3.54 – 18.97	15
Recem-nascido (apos extracao)	0.34 – 1.96	23 (0 a 3 meses)

XVI. AVISOS E PRECAUÇÕES

Segurança

Apenas para uso em diagnóstico *in vitro*.

Este kit contém ¹²⁵I (meia-vida: 60 dias), emitindo radiações X (28 keV) e γ (35.5 keV) ionizantes.

Este produto radioactivo pode apenas ser transportado e utilizado por pessoal autorizado: a compra, armazenamento, utilização e troca de produtos radioactivos estão sujeitas à legislação nacional vigente. Em nenhum caso, este produto pode ser administrados a seres humanos ou a animais.

Toda a manipulação readioactiva deve ser efectuada em local próprio e exclusivo para tal. Deve ser mantido no laboratório, um livro de registo para a recepção e armazenamento de material radioactivo. O equipamento do laboratório e equipamento de vidro que possa ser contaminado com radioactividade, deve ser segregado para evitar contaminação cruzada com diferentes isótopos. Qualquer derrame de material radioactivo deve ser imediatamente limpo, de acordo com os procedimentos de radioprotecção. O lixo radioactivo deve ser rejeitado de acordo com a legislação vigente e as regras do laboratório. A adesão às regras básicas da radiosegurança, fornece a protecção adequada.

Os componentes de sangue humano incluídos neste kit foram testados por métodos aprovados pela legislação europeia e/ou FDA e dados como negativos para o HBsAg, anti-HCV, anti-HIV-1 e 2. Não existe nenhum método, até agora conhecido, que ofereça total segurança quanto à impossibilidade de transmissão de hepatite, HIV ou outras infecções, por via do sangue humano. Por isso, deve manipular os reagentes, o soro ou o plasma de acordo com as regras locais de segurança, quanto a materiais potencialmente infecciosos.

Todos os produtos de origem animal e seus derivados foram recolhidos de animais saudáveis. Os componentes bovinos, vieram de países sem casos notificados de BSE. No entanto, todos estes componentes devem ser manipulados como potencialmente infecciosos.

Evite o contacto da pele e mucosas com os reagentes (azida sódica como conservante). A azida pode reagir com o chumbo e o cobre das canalizações e formar compostos explosivos. Rejeitar com abundante quantidade de água corrente para evitar acumulações destes compostos.

Não fume, coma, beba ou aplique cosméticos na area de trabalho. Não pipette com o auxílio da boca. Use vestuário adequado de protecção e luvas.

XVII. BIBLIOGRAFIA

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 adrenance.
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. RESUMO DO PROTOCOLO

	CONTAGENS TOTAIS (μl)	CALIBRADORES (μl)	CONTROLOS DAS AMOSTRAS (μl)	AMOSTRAS EXTRAIDAS (μl)
--	---	---	---	---

Calibradores (0-5)	-	25	-	-
Amostras, controles	-	-	25	-
Amostras extraidas	-	-	-	50
Marcadores	500	500	500	500
Incubação	3 horas a 37°C			
Separação Solução de lavagem de trabalho Separação	-		aspirar 3,0 ml aspirar	
Contagem	Contar os tubos durante 60 segundos			



Διαβάστε ολόκληρο το πρωτόκολλο πριν από τη χρήση.

17α-HYDROXYPROGESTERONE (17-OHP)-RIA-CT

I. ΧΡΗΣΗ ΓΙΑ ΤΗΝ ΟΠΟΙΑ ΠΡΟΟΡΙΖΕΤΑΙ

Ραδιοανοσοπροσδιορισμός για την *in vitro* ποσοτική μέτρηση της ανθρώπινης 17α-υδροξυπρογεστερόνης (17-OHP) στον ορό και το πλάσμα.

II. ΓΕΝΙΚΕΣ ΠΛΗΡΟΦΟΡΙΕΣ

- A. **Εμπορική ονομασία:** Κιτ 17α-HYDROXYPROGESTERONE (17-OHP)-RIA-CT της DIAsource
- B. **Αριθμός καταλόγου:** KIP1409: 96 προσδιορισμοί
- Γ. **Κατασκευάζεται από την:** DIAsource ImmunoAssays S.A.
Rue du Bosquet, 2, B-1348 Louvain-la-Neuve, Belgium.

Για τεχνική βοήθεια ή πληροφορίες σχετικά με παραγγελίες επικοινωνήστε στα:
Τηλ.: +32 (0)10 84.99.11 Φαξ: +32 (0)10 84.99.91

III. ΚΛΙΝΙΚΟ ΥΠΟΒΑΘΡΟ

A. Βιολογική έξ δρᾶση της 17α-υδροξυπρογεστερόνης

Η 17α-υδροξυπρογεστερόνη (17-OHP) είναι μια C-21 στεροειδής ορμόνη (μοριακό βάρος 330,3), η οποία παράγεται από την 17α-υδροξυπρεγνολόνη στα επινεφρίδια και επίσης στις ωοθήκες, τους όρχεις και τον πλακούντα. Η 17-OHP υδροξυλιώνεται στις θέσεις 11 και 21 για την παραγωγή κορτιζόλης μέσω της 11-δεοξυκορτιζόλης.


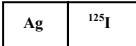
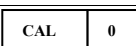



B. Κλινικές εφαρμογές του προσδιορισμού της 17α-υδροξυπρογεστερόνης

Κατά κανόνα, ο προσδιορισμός της 17-OHP στον ορό ή το αμνιακό υγρό είναι σχετικός με τη διάγνωση της συγγενούς υπερπλασίας των επινεφριδίων (CAH). Η CAH οφείλεται στην έλλειψη ενός ειδικού ενζύμου (έχουν περιγραφεί έξι διακριτές ενζυμικές ανεπάρκειες). Ως αποτέλεσμα των ανεπαρκειών αυτών, η ACTH αυξάνεται και προκαλεί υπερπλασία των επινεφριδίων, καθώς και αύξηση πολλών στεροειδών προδρόμων. Αλλά είναι επίσης πολύ ενδιαφέρον να γνωρίζουμε την τιμή της 17-OHP σε ασθενείς με κισσοκήλη (η 17-OHP και η τεστοστερόνη αποτελούν δείκτες της λειτουργίας των κυττάρων Leydig) και σε ηλικιωμένους άνδρες ασθενείς για την ανίχνευση της καλοήθους υπερτροφίας του προστάτη (BPH) και του καρκινώματος του προστάτη (PCA) (η 17-OHP στο πλάσμα είναι κατά πολύ χαμηλότερη στις ομάδες με PCA και BPH από ότι σε φυσιολογικούς άνδρες). Υπάρχουν και άλλοι τομείς για έρευνες σχετικά με την 17-OHP, όπως: ανδρική στειρότητα, κορίτσια με περιφερική αρρενοποίηση, παιδιά με πρόωμη αύξηση της λειτουργίας του φλοιού των επινεφριδίων στην αρχή της εφηβείας (στις περιπτώσεις αυτές, οι τιμές της 17-OHP αυξάνονται χωρίς διέγερση της ACTH ή μετά από αυτήν).

IV. ΒΑΣΙΚΕΣ ΑΡΧΕΣ ΤΗΣ ΜΕΘΟΔΟΥ

Μια σταθερή ποσότητα στεροειδούς σημασμένου με ¹²⁵I ανταγωνίζεται με το στεροειδές που θα μετρηθεί, το οποίο υπάρχει στο δείγμα ή στο βαθμονομητή, για σταθερή ποσότητα θέσεων αντισωμάτων που είναι ακινητοποιημένα στο τοίχωμα ενός σωληναρίου πολυστυρενίου. Δεν απαιτείται εκχύλιση ή χρωματογραφία λόγω της υψηλής ειδικότητας των επιστρωμένων αντισωμάτων. Μετά από επώαση διάρκειας 3 ωρών στους 37° C, η αντίδραση ανταγωνισμού τερματίζεται με ένα βήμα αναρρόφησης. Τα σωληνάρια κατόπιν πλένονται με 3 ml διαλύματος πλύσης και αναρροφούνται. Παριστάνεται γραφικά μια καμπύλη βαθμονόμησης και προσδιορίζονται οι συγκεντρώσεις 17-OHP των δειγμάτων με αναγωγή συγκεντρώσεων από την καμπύλη βαθμονόμησης.

V. ΠΑΡΕΧΟΜΕΝΑ ΑΝΤΙΔΡΑΣΤΗΡΙΑ

Αντιδραστήρια	Κιτ 96 εξετάσεων v	Ανασύσταση
 Σωληνάρια επιστρωμένα με αντι 17-OHP	2 x 48	Έτοιμο για χρήση
 ΙΧΝΗΘΕΤΗΣ: 17-OHP σημασμένη με ¹²⁵ I (κατηγορίας HPLC) σε ρυθμιστικό διάλυμα φωσφορικών/κιτρικού οξέος με βόεια ορολευκωματίνη και αζίδιο (<0,1%)	1 φιαλίδιο 55 ml 190 kBq	Έτοιμο για χρήση
 Μηδενικός βαθμονομητής σε ανθρώπινο ορό και αζίδιο (0,5%)	1 φιαλίδιο 3 ml	Έτοιμο για χρήση
 Βαθμονομητές 17-OHP N = 1 έως 5 (δείτε τις ακριβείς τιμές στις ετικέτες των φιαλιδίων) σε ανθρώπινο ορό και αζίδιο (0,5%)	5 φιαλίδια 0,5 ml	Έτοιμο για χρήση
 Διάλυμα πλύσης (TRIS-HCl)	1 φιαλίδιο 10 ml	Αραιώστε 70 x με απεσταγμένο νερό (χρησιμοποιήστε μαγνητικό αναδευτήρα).
 Οροί ελέγχου N = 1 ή 2 σε ανθρώπινο πλάσμα και θυμόλη	2 φιαλίδια λυοφιλοπο ημένο	Προσθέστε 0,5 ml απεσταγμένου νερού

Σημείωση: Χρησιμοποιείτε το μηδενικό βαθμονομητή για αραιώσεις δειγμάτων.

VI. ΑΝΑΛΩΣΙΜΑ ΠΟΥ ΔΕΝ ΠΑΡΕΧΟΝΤΑΙ

Τα ακόλουθα υλικά απαιτούνται αλλά δεν παρέχονται στο κιτ:

1. Απεσταγμένο νερό
2. Πιπέτες για διανομή: 25 μl, 500 μl και 3 ml (συνιστάται η χρήση πιπέτων ακριβείας με αναλώσιμα πλαστικά ρύγχη)
3. Αναμεικτής στροβιλισμού (τύπου vortex)
4. Μαγνητικός αναδευτήρας
5. Υδατόλουτρο στους 37° C
6. Αυτόματη σύριγγα των 5 ml (τύπου Cornwall) για πλύση
7. Σύστημα αναρρόφησης (προαιρετικό)
8. Μπορεί να χρησιμοποιηθεί οποιοσδήποτε μετρητής γ ακτινοβολίας με δυνατότητα μέτρησης του 125I (ελάχιστη απόδοση 70%).
9. Επωαστήρα στους 37 °C
Προαιρετικά (για την εκχύλιση)
10. Διαθυλαϊθέρας (για αναλύσεις, καθαρότητα > 98%)
11. Γυάλινοι σωλήνες μίας χρήσης (12 x 75 mm), με πόματα.
12. Διάλυμα Ανασύστασης DIASource για (17-OHP) -RIA-CT. ref: 32.140.74.

VII. ΠΑΡΑΣΚΕΥΗ ΑΝΤΙΔΡΑΣΤΗΡΙΟΥ

- A. Οροί ελέγχου:** Ανασυστήστε τα υλικά ελέγχου με 0,5 ml απεσταγμένου νερού.

- B. Διάλυμα πλύσης εργασίας:** Προετοιμάστε επαρκή όγκο διαλύματος πλύσης εργασίας με προσθήκη 69 όγκων απεσταγμένου νερού σε 1 όγκο διαλύματος πλύσης (70x). Χρησιμοποιήστε μαγνητικό αναδευτήρα για την ομογενοποίηση. Απορρίψτε το μη χρησιμοποιημένο διάλυμα πλύσης εργασίας στο τέλος της ημέρας.

VIII. ΦΥΛΑΞΗ ΚΑΙ ΗΜΕΡΟΜΗΝΙΑ ΛΗΞΗΣ ΤΩΝ ΑΝΤΙΔΡΑΣΤΗΡΙΩΝ

- Πριν από το άνοιγμα ή την ανασύσταση, όλα τα συστατικά του κιτ παραμένουν σταθερά έως την ημερομηνία λήξης, η οποία αναγράφεται στην ετικέτα, εφόσον διατηρούνται σε θερμοκρασία 2 έως 8° C.
- Μετά την ανασύσταση, οι οροί ελέγχου παραμένουν σταθεροί για μία εβδομάδα σε θερμοκρασία 2 έως 8° C. Για μεγαλύτερες περιόδους φύλαξης, πρέπει να σχηματίζονται κλάσματα/δόσεις μίας χρήσης και να διατηρούνται στους -20° C για 3 μήνες.
- Φρέσκο, παρασκευασμένο διάλυμα πλύσης εργασίας θα πρέπει να χρησιμοποιείται την ίδια ημέρα.
- Μετά την πρώτη χρήση του, ο ιχνηθέτης παραμένει σταθερός έως την ημερομηνία λήξης, εφόσον διατηρείται στο αρχικό, ερμητικά κλειστό φιαλίδιο σε θερμοκρασία 2 έως 8° C.
- Τυχόν μεταβολές της φυσικής εμφάνισης των αντιδραστηρίων του κιτ ενδέχεται να υποδηλώνουν αστάθεια ή αλλοίωση.

IX. ΣΥΛΛΟΓΗ ΚΑΙ ΠΡΟΕΤΟΙΜΑΣΙΑ ΔΕΙΓΜΑΤΩΝ

- Τα δείγματα ορού ή πλάσματος πρέπει να φυλάσσονται σε θερμοκρασία 2-8° C.
- Εάν η εξέταση δεν πραγματοποιηθεί εντός 48 ωρών, συνιστάται η φύλαξη στους -20° C.
- Αποφεύγετε τη διαδοχική κατάψυξη και απόψυξη.
- Το ηπαρινισμένο πλάσμα παρέχει κατά 10% χαμηλότερα αποτελέσματα από ό,τι ο ορός:
 Y (ηπαρ. πλάσμα) = $0,9 \times (\text{Ορός}) + 0,20$ $r = 0,92$ $n = 20$
- Το πλάσμα με EDTA παρέχει κατά 10% χαμηλότερα αποτελέσματα από ό,τι ο ορός:
 Y (πλάσμα με EDTA) = $0,9 \times (\text{Ορός}) + 0,18$ $r = 0,87$ $n = 20$

X. ΔΙΑΔΙΚΑΣΙΑ

A. Σημειώσεις σχετικά με το χειρισμό

Μη χρησιμοποιείτε το κιτ ή τα συστατικά μετά την ημερομηνία λήξης. Μην αναμειγνύετε υλικά από διαφορετικές παρτίδες κιτ. Φέρετε όλα τα αντιδραστήρια σε θερμοκρασία δωματίου πριν από τη χρήση. Αναμειξτε καλά όλα τα αντιδραστήρια και τα δείγματα με απαλή ανακίνηση ή ανάδευση. Χρησιμοποιείτε ένα καθαρό αναλώσιμο ρύγχος πιπέτας για την προσθήκη κάθε διαφορετικού αντιδραστηρίου και δείγματος προκειμένου να αποφύγετε την εμπόδυνση. Η ακρίβεια βελτιώνεται με χρήση πιπέτων υψηλής ακρίβειας ή αυτοματοποιημένου εξοπλισμού διανομής με πιπέτες. Τηρείτε τους χρόνους επώασης. Προετοιμάστε μια καμπύλη βαθμονόμησης για κάθε ανάλυση και μη χρησιμοποιείτε δεδομένα από προηγούμενες αναλύσεις.

B. Εκχύλιση δειγμάτων νεογνών (προαιρετικά) – ΓΙΑ ΔΕΙΓΜΑ ΟΡΟΥ

1. Σημάνετε ένα γυάλινο σωλήνα για κάθε δείγμα (μη εκχυλίζετε βαθμονομητές ή ορούς ελέγχου).
2. Προσθέστε με πιπέτα 75 μl ορού, ακολουθούμενα από 2,25 ml διαθυλαϊθέρα.
3. Αναμίξτε όλους τους σωλήνες ζωηρά (2 x 1 λεπτό).
4. Αφήστε να σταθούν στο τραπέζι για 5 λεπτά.
5. Τοποθετήστε τους σωλήνες στους -20°C προκειμένου να παγώσει η υδατική φάση.
6. Προετοιμάστε μια δεύτερη σειρά από γυάλινους σωλήνες, και για κάθε δείγμα μεταφέρετε την οργανική φάση στους νέους σωλήνες. Αποφύγετε τη λήψη υδατικής φάσης.
7. Εξατμίστε πλήρως την οργανική (αιθέρας) φάση υπό ροή αέρα ή τοποθετώντας τους σωλήνες στους 37°C (υδατόλουτρο). Εργαστείτε σε απαγωγό.
8. Διαλύστε το ξηρό εκχύλισμα αιθέρα με 150 μl διάλυμα ανασύστασης (δεν παρέχεται, βλ. VI.). Αναμειξτε ζωηρά για 1 λεπτό.
9. Αφήστε να σταθούν για 10-15 λεπτά και αναμειξτε ξανά για 1 λεπτό. Για αυτούς τους όγκους επιτρέπεται ο προσδιορισμός εις διπλούν.

C. Διαδικασία

1. Σημάνετε επιστρωμένα σωληνάρια εις διπλούν για κάθε βαθμονομητή, δείγμα και ορό ελέγχου. Για τον προσδιορισμό των μετρήσεων μόνον με ιχνηθέτη ^{125}I ("total"), σημάνετε 2 κοινά(μη επιστρωμένα σωληνάρια).
2. Αναμίξτε για λίγο (με αναμεικτή στροβίλισμού τύπου vortex) βαθμονομητές, δείγματα και ορούς ελέγχου και διανείμετε 25 μl από έκαστο σε αντίστοιχα σωληνάρια. **Για εκχυλισμένα δείγματα νεογνών, προστίθενται με πιπέτα 50 μl αντί για 25 μl.**
3. Διανείμετε 0,5 ml 17-OHP σημασμένης με ^{125}I σε κάθε σωληνάριο, συμπεριλαμβάνοντας τα μη επιστρωμένα σωληνάρια που αφορούν τις μετρήσεις του ιχνηθέτη ^{125}I ("total").
4. Ανακινήστε απαλά με το χέρι τη βάση στήριξης των σωληναρίων για να απελευθερώσετε τυχόν παγιδευμένες φυσαλίδες.
5. Επωάστε για 3 ώρες στους $+37^\circ\text{C}$.
6. Αναρροφήστε (ή μεταγγίστε) το περιεχόμενο κάθε σωληναρίου (με εξαίρεση εκείνα που αφορούν τις μετρήσεις του ιχνηθέτη ^{125}I ("total")). Βεβαιωθείτε ότι το πλαστικό ρύγχος του αναρροφητή φθάνει στον πυθμένα του επιστρωμένου σωληναρίου προκειμένου να αφαιρεθεί όλη η ποσότητα του υγρού.
7. Πλύνετε τα σωληνάρια με 3 ml διαλύματος πλύσης εργασίας (με εξαίρεση εκείνα που αφορούν τις μετρήσεις του ιχνηθέτη ^{125}I) και αναρροφήστε (ή μεταγγίστε). Αποφύγετε το σχηματισμό αφρού κατά τη διάρκεια της προσθήκης του διαλύματος πλύσης εργασίας.
8. Αφήστε τα σωληνάρια να σταθούν σε όρθια θέση για δύο λεπτά και αναρροφήστε τη σταγόνα υγρού που απομένει.
9. Μετρήστε τα σωληνάρια σε μετρητή γ ακτινοβολίας για 60 δευτερόλεπτα.

XI. ΥΠΟΛΟΓΙΣΜΟΣ ΤΩΝ ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΩΝ

1. Υπολογίστε τη μέση τιμή των διπλών προσδιορισμών.
2. Υπολογίστε τη δεσμευμένη ραδιενέργεια ως ποσοστό της δέσμευσης που προσδιορίζεται στο σημείο μηδενικού βαθμονομητή (0) σύμφωνα με τον ακόλουθο τύπο:

$$B/B_0(\%) = \frac{\text{Μετρήσεις (Βαθμονομητής ή δείγμα)}}{\text{Μετρήσεις (μηδενικός βαθμονομητής)}} \times 100$$

3. Με χρήση ημιλογαριθμικού ή logit-log χαρτιού γραφήματος 3 κύκλων, παραστήστε γραφικά τις τιμές (B/B₀(%)) για κάθε σημείο βαθμονομητή ως συνάρτηση της συγκέντρωσης της 17-OHP για κάθε σημείο βαθμονομητή και απορρίψτε τις εμφανείς μη αποδεκτές τιμές.
4. Για την κατασκευή της καμπύλης βαθμονόμησης είναι δυνατό να χρησιμοποιηθούν επίσης μέθοδοι με τη βοήθεια ηλεκτρονικού υπολογιστή. Εάν χρησιμοποιείται αυτόματη επεξεργασία αποτελεσμάτων, συνιστάται προσαρμογή καμπύλης λογιστικής συνάρτησης 4 παραμέτρων.
5. Με αναγωγή των τιμών των δειγμάτων (B/B₀(%)), προσδιορίστε τις συγκεντρώσεις της 17-OHP των δειγμάτων από την καμπύλη αναφοράς.
6. Η συγκέντρωση που λαμβάνεται για τα εκχυλισμένα δείγματα νεογνών (βλ. X.B.) μπορεί να διαβαστεί απευθείας στην καμπύλη (δεν απαιτείται συντελεστής διόρθωσης).
7. Για κάθε προσδιορισμό, πρέπει να ελέγχεται το ποσοστό του συνολικού ιχνηθέτη που δεσμεύεται εν τη απουσία μη σημασμένης 17-OHP (B₀/T).

XII. ΤΥΠΙΚΑ ΔΕΔΟΜΕΝΑ

Τα ακόλουθα δεδομένα, τα οποία έχουν ληφθεί με ιχνηθέτη 6 εβδομάδων, προορίζονται μόνο ως παράδειγμα και δεν πρέπει να χρησιμοποιούνται ποτέ αντί της καμπύλης βαθμονόμησης πραγματικού χρόνου.

(17-OHP)-RIA-CT	cpm	B/B ₀ (%)
Κρούσεις του ιχνηθέτη ^{125}I ("total")	32363	
Βαθμονομητής		
0,00 ng/ml	12596	100,0
0,17 ng/ml	9769	77,6
0,59 ng/ml	6529	51,8
1,4 ng/ml	3752	29,8
4,3 ng/ml	1396	11,1
14,0 ng/ml	479	3,8

XIII. ΑΠΟΔΟΣΗ ΚΑΙ ΠΕΡΙΟΡΙΣΜΟΙ

A. Ευαισθησία

Το LoB (Limit of Blank) δοκιμάστηκε με μέτρηση 20 φορές το τυφλό και υπολογίστηκε ως η μέση \pm 2 Τυπική Απόκλιση της κατανομής των τιμών δοκιμής.

Το LoB υπολογίστηκε στα 0,03 ng/ml.

Το LoD (Όριο Ανίχνευσης) υπολογίστηκε ως η Τυπική Απόκλιση LoB \pm 1.645 ενός δείγματος χαμηλής συγκέντρωσης που μετρήθηκε σε 10 διαφορετικές δοκιμές.

Το LoD υπολογίστηκε στα 0,09 ng/ml.

Το LoQ (Limit of Quantification) υπολογίστηκε με δοκιμή 4 δειγμάτων χαμηλής συγκέντρωσης, σε 10 διαφορετικές δοκιμασίες.

Το LoQ υπολογίστηκε στα 0,14 ng/ml.

B. Ειδικότητα

Η ειδικότητα υπολογίστηκε με τον εμβολιασμό μιας ποσότητας δειγμάτων 17-OHP (\pm 0,5 ng/ml) με στεροειδή, τα οποία ενδέχεται να υπάρχουν σε δείγματα ασθενών.

Ένωση	Προσπεθείσα ποσότητα (ng/ml)	Διασταυρούμενη αντίδραση (%)
17α-υδροξυπρογεστερόνη	-	100
Προγεστερόνη	500	0,7
17α-υδροξυπρεγνενολόνη	1000	0,3
21-δεοξυκορτιζόλη	1000	1,07
Πρεγνενολόνη	500	0,02
11-δεοξυκορτιζόλη	500	0,21
Κορτικοστερόνη	1000	0,008
11-δεοξυκορτικοστερόνη	500	0,24
Κορτιζόλη	5000	0,005
Τεστοστερόνη	5000	0,004
Ανδροστενεδιόνη	5000	0,01
Οιστραδιόλη	1000	0,008
Θετική 17α-υδροξυπρεγνενολόνη	5000	0,34

Εκτιμήθηκε η επίδραση πιθανών παρεμβαλλόμενων ουσιών στα δείγματα χρησιμοποιώντας το DAsource 17OHP-RIA-CT. Δοκιμάστηκαν διαφορετικά επίπεδα Αιμοσφαιρίνης, Χολερυθρίνης, Τριγλυκεριδίων και Συζευγμένης Χολερυθρίνης δειγμάτων ορού σε δείγματα με διαφορετική συγκέντρωση 17α-υδροξυπρογεστερόνης. Σύμφωνα με τα κριτήρια αποδοχής μας, η παρεμβολή έπρεπε να είναι κάτω από 10%. Οι εξεταζόμενες ουσίες δεν είχαν καμία επίδραση στην απόδοση της δοκιμής με DAsource 17OHP-RIA-CT.

Ουσία	17OHP (ng/ml)	Συγκέντρωση παρεμβαλλόμενης ουσίας (mg/dl)	Μέση απόκλιση
Αιμοσφαιρίνη	0,57	250	98,6%
		500	
		1,8	
Συζευγμένη Χολερυθρίνη	0,57	50	95,1%
		1,8	
		50	
Μη Συζευγμένη Χολερυθρίνη	0,57	50	99,2%
		100	
		50	
Τριγλυκερίδια	0,57	50	97,0%
		100	
		250	
		500	
		1000	
		50	
	1,54	100	
		250	
		500	
		1000	

C. Ακρίβεια

ΓΙΑ ΤΟΝ ΙΔΙΟ ΠΡΟΣΔΙΟΡΙΣΜΟ

ΓΙΑ ΤΟΝ ΙΔΙΟ ΠΡΟΣΔΙΟΡΙΣΜΟ

ΜΕΤΑ ΑΠΟ ΕΚΧΥΛΙΣΗ

Ορός	N	<X> \pm T.A. (ng/ml)	Σ.Δ. (%)	Ορός	N	<X> \pm T.A. (ng/ml)	Σ.Δ. (%)
A	20	0,73 \pm 0,05	6,8	Γ	24	0,56 \pm 0,06	10,7
B	20	1,94 \pm 0,09	4,6	Δ	24	1,81 \pm 0,17	9,4

T.A.: Τυπική απόκλιση, Σ.Δ.: Συντελεστής διακύμανσης

ΜΕΤΑΞΥ ΤΩΝ
ΠΡΟΣΔΙΟΡΙΣΜΩΝ

ΜΕΤΑΞΥ ΤΩΝ ΠΡΟΣΔΙΟΡΙΣΜΩΝ
ΜΕΤΑ ΑΠΟ ΕΚΧΥΛΙΣΗ

Ορός	N	<X> ± T.A. (ng/ml)	Σ.Δ. (%)	Ορός	N	<X> ± T.A. (ng/ml)	Σ.Δ. (%)
A	12	0,69 ± 0,06	8,7	A	8	0,72 ± 0,13	18
B	12	2,08 ± 0,16	7,6	B	8	2,03 ± 0,39	19,2

T.A.: Τυπική απόκλιση, Σ.Δ.: Συντελεστής διακύμανσης

D. Ορθότητα

ΔΟΚΙΜΑΣΙΑ ΑΡΑΙΩΣΗΣ

Ορός	Αραίωση	Θεωρητική συγκέντρωση (ng/ml)	Μετρηθείσα συγκέντρωση (ng/ml)
	1/1	-	3,3
	1/2	1,65	1,79
	1/4	0,83	1,0
	1/8	0,42	0,5
	1/16	0,21	0,27

Τα δείγματα αραιώθηκαν με το μηδενικό βαθμονομητή.

ΔΟΚΙΜΑΣΙΑ ΑΝΑΚΤΗΣΗΣ

Δείγμα	Προσθεθείσα 17-OHP (ng/ml)	Ανακτηθείσα 17-OHP (ng/ml)	Ανακτηθείσα (%)
1	6	5,7	95
	3	2,99	99
	1,5	1,64	109
	0,75	0,81	108
2	6	5,27	87
	3	2,86	95
	1,5	1,49	99
	0,75	0,74	98

Συντελεστής μετατροπής:

Από ng/ml σε nmol/l: x 3,03

Από nmol/l σε ng/ml: x 0,33

Από όσο είναι δυνατό να γνωρίζουμε, δεν υπάρχει διεθνές υλικό αναφοράς για την παράμετρο αυτή.

E. Μεσοδιάστημα μεταξύ της διανομής τελευταίου βαθμονομητή και δείγματος

Όπως φαίνεται στη συνέχεια, τα αποτελέσματα του προσδιορισμού παραμένουν αξιόπιστα ακόμα και όταν διανέμεται ένα δείγμα 40 λεπτά μετά την προσθήκη του βαθμονομητή στα επιστρωμένα σωληνάρια.

ΜΕΣΟΔΙΑΣΤΗΜΑ

Ορός (ng/ml)	0'	10'	30'	40'
Δείγμα 1	0,63	0,65	0,73	0,74
Δείγμα 2	2,03	2,4	2,37	2,2

F. Περιορισμοί για δείγματα νεογνών

Τα πολύ μικρά παιδιά (< 3 μηνών) εμφανίζουν υψηλά επίπεδα της θειικής 17α-υδροξυπρεγκνολόνης. Παρά το γεγονός ότι δεν υπάρχει σχεδόν καμία παράπλευρη αντίδραση με το μόριο αυτό, συνιστούμε την εφαρμογή της διαδικασίας εκχύλισης (X. B.)

XIV. ΕΣΩΤΕΡΙΚΟΣ ΠΟΙΟΤΙΚΟΣ ΕΛΕΓΧΟΣ

- Το ποσοστό του συνολικού ιχνήθετη που δεσμεύεται εν τη απουσία μη σημασμένης 17-OHP (B0/T) πρέπει να είναι > 25%.
- Εάν τα αποτελέσματα που λαμβάνονται για τον ορό ελέγχου 1 ή/και τον ορό ελέγχου 2 δε βρίσκονται εντός του πεδίου τιμών που καθορίζεται

στην ετικέτα του φιαλιδίου, τα αποτελέσματα δεν είναι δυνατό να χρησιμοποιηθούν, εκτός εάν έχει δοθεί ικανοποιητική εξήγηση για την ασυμφωνία.

- Εάν είναι επιθυμητό, κάθε εργαστήριο μπορεί να δημιουργήσει τα δικά του μείγματα δειγμάτων ελέγχου (pools), τα οποία πρέπει να διατηρούνται κατεψυγμένα σε κλάσματα. Μην καταναλώνετε-αποφύγετε περισσότερο από δύο φορές.
- Τα κριτήρια αποδοχής για τη διαφορά μεταξύ των διπλών αποτελεσμάτων των δειγμάτων θα πρέπει να βασίζονται σε ορθές εργαστηριακές πρακτικές.

XV. ΤΙΜΕΣ ΑΝΑΦΟΡΑΣ

Οι τιμές αυτές παρέχονται μόνον ως οδηγός. Κάθε εργαστήριο θα πρέπει να καθιερώσει το δικό του πεδίο φυσιολογικών τιμών.

	Πεδίο τιμών συγκέντρωσης (εκατοστημώρια 2,5 έως 97,5%) (ng/ml)	Αριθμός ατόμων
Φυσιολογικοί άνδρες	0.67 – 3.32	79
Φυσιολογικές γυναίκες		
· Ωοθυλακική φάση	0.41 – 2.27	50
· Ωχρινική φάση	0.23 – 3.87	28
Κύηση	2.60 – 7.95	30
· Πρώτο τρίμηνο	1.83 – 9.74	30
· Δεύτερο τρίμηνο	3.54 – 18.97	15
· Τρίτο τρίμηνο		
Νεογνά (μετά από εκχύλιση)	0.34 – 1.96	23 (0 έως 3 μηνών)

XVI. ΠΡΟΦΥΛΑΞΕΙΣ ΚΑΙ ΠΡΟΕΙΛΟΠΟΙΗΣΕΙΣ

Ασφάλεια

Μόνο για διαγνωστική χρήση in vitro.

Το kit αυτό περιέχει το ¹²⁵I (Χρόνος ημιζωής: 60 ημέρες), μια ραδιενεργή ουσία η οποία εκπέμπει ιονίζουσα ακτινοβολία X (28 keV) και γ (35.5 keV).

Αυτό το ραδιενεργό προϊόν μπορεί να μεταφέρεται και να χρησιμοποιείται μόνον από εξουσιοδοτημένα άτομα. Η αγορά, φύλαξη, χρήση και ανταλλαγή ραδιενεργών προϊόντων υπόκεινται στη νομοθεσία της χώρας του τελικού χρήστη. Σε καμία περίπτωση δεν πρέπει να χορηγείται το προϊόν σε ανθρώπους ή ζώα.

Όλος ο χειρισμός του ραδιενεργού υλικού θα πρέπει να εκτελείται σε καθορισμένο χώρο, μακριά από χώρους τακτικής διέλευσης. Στο εργαστήριο πρέπει να διατηρείται ημερολόγιο για την παραλαβή και τη φύλαξη ραδιενεργών υλικών. Εξοπλισμός και γυάλινα σκεύη του εργαστηρίου, τα οποία θα μπορούσαν να μολυνθούν με ραδιενεργές ουσίες, θα πρέπει να φυλάσσονται σε ξεχωριστό χώρο για την πρόληψη επιμόλυνσης των διαφόρων ραδιοϊσοτόπων.

Τυχόν διαρροές ραδιενεργών υγρών πρέπει να καθαρίζονται αμέσως σύμφωνα με τις διαδικασίες ασφάλειας από ραδιενέργεια. Τα ραδιενεργά απόβλητα πρέπει να απορρίπτονται σύμφωνα με τους τοπικούς κανονισμούς και τις κατευθυντήριες οδηγίες των αρχών που έχουν δικαιοδοσία στο εργαστήριο. Η τήρηση των βασικών κανόνων ασφάλειας από ραδιενέργεια παρέχει επαρκή προστασία.

Τα συστατικά ανθρώπινου αίματος που περιλαμβάνονται στο kit αυτό έχουν ελεγχθεί με μεθόδους εγκεκριμένες στην Ευρώπη ή/και από τον FDA και έχει διαπιστωθεί ότι είναι αρνητικά ως προς την παρουσία HBsAg, αντι-HCV, αντι-HIV-1 και 2. Καμία γνωστή μέθοδος δεν είναι δυνατό να παρέχει πλήρη διασφάλιση ότι παράγωγα του ανθρώπινου αίματος δε θα μεταδώσουν ηπατίτιδα, AIDS ή άλλες λοιμώξεις. Επομένως, ο χειρισμός αντιδραστηρίων, δειγμάτων ορού ή πλάσματος θα πρέπει να γίνεται σύμφωνα με τις τοπικές διαδικασίες περί ασφάλειας.

Όλα τα ζωικά προϊόντα και παράγωγα έχουν συλλεχθεί από υγιή ζώα. Τα βόεια συστατικά προέρχονται από χώρες όπου δεν έχει αναφερθεί BSE. Παρ' όλ' αυτά, συστατικά που περιέχουν ζωικές ουσίες θα πρέπει να αντιμετωπίζονται ως δυνητικώς μολυσματικά.

Αποφεύγετε οποιαδήποτε επαφή του δέρματος με αντιδραστήρια (χρησιμοποιείται αζίδιο του νατρίου ως συντηρητικό). Το αζίδιο στο kit αυτό ενδέχεται να αντιδράσει με μόλυβδο και χαλκό των υδραυλικών σωληνώσεων και να σχηματίσει με τον τρόπο αυτό ιδιαίτερα εκρηκτικά αζίδια μετάλλων.

Κατά τη διάρκεια του βήματος πλύσης, εκπλύνετε την αποχέτευση με μεγάλη ποσότητα νερού, για την πρόληψη τυχόν συσσώρευσης αζιδίου.
Μην καπνίζετε, μην πίνετε, μην τρώτε και μη χρησιμοποιείτε καλλυντικά στο χώρο εργασίας. Μην διανέμετε με πιπέτα χρησιμοποιώντας το στόμα σας. Χρησιμοποιείτε προστατευτική ενδυμασία και γάντια μιάς χρήσης.

XVII. ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ

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 adrenance.
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. ΠΕΡΙΛΗΨΗ ΤΟΥ ΠΡΩΤΟΚΟΛΛΟΥ

	ΚΡΟΥΣΕΙΣ "TOTAL" (μl)	ΒΑΘΜΟΝ Ο-ΜΗΤΕΣ (μl)	ΔΕΙΓΜΑ (ΤΑ ΟΡΟΙ ΕΛΕΓΧΟΥ (S) (μl)	ΕΚΧΥΛΙΣ ΜΕΝΑ ΔΕΙΓΜΑΤΑ (μl)
Βαθμονομητές (0 à 5)	-	25	-	-
Δείγματα, υλικά ελέγχου	-	-	25	-
Εκχυλισμένα δείγματα	-	-	-	50
Ιχνηθέτης	500	500	500	500
Επώαση	3 ώρες στους 37° C			
Διαχωρισμός Διάλυμα πλύσης εργασίας Διαχωρισμός	-		αναρρόφηση 3,0 ml προσεκτική αναρρόφηση	
Μέτρηση	Μέτρηση σωληναρίων επί 60 δευτερόλεπτα			

Przed zastosowaniem należy przeczytać cały protokół.

17 α -HYDROXYPROGESTERONE (17-OHP)-RIA-CT

I. PRZEZNACZENIE

Oznaczenie radioimmunologiczne do ilościowego pomiaru *in vitro* ludzkiego 17 α -hydroksyprogesteron (17-OHP) w surowicy i osoczu.

II. INFORMACJE OGÓLNE

- A. **Nazwa firmowa:** Zestaw DIAsource 17 α -HYDROXYPROGESTERONE (17-OHP)-RIA-CT
- B. **Numer katalogowy:** KIP1409 : 96 oznaczeń
- C. **Wyprodukowano przez:** DIAsource ImmunoAssays S.A.
Rue du Bosquet, 2, B-1348 Louvain-la-Neuve, Belgia.

Dział pomocy technicznej oraz informacje dotyczące zamówień:
Tel: +32 (0)10 84.99.11 Fax: +32 (0)10 84.99.91

III. INFORMACJE KLINICZNE

A. *Aktywność biologiczna 17 α -hydroksyprogesteronu*

17 α -hydroksyprogesteron (17-OHP) jest hormonem steroidowym z grupą hydroksylową przy węglu C-21 (masa cząsteczkowa 330,3) powstającym z 17 α -hydroksypregnenolonu w nadnerczach, jak również w jajnikach, jądrach i łożysku. 17-OHP jest hydroksylowane w pozycjach 11 i 21, co prowadzi do powstania 11-deoksykortyzolu i ostatecznie kortyzolu.

B. *Zastosowania kliniczne oznaczenia 17 α -hydroksyprogesteronu*


Należy przyjąć, że stężenie 17-OHP w surowicy bądź płynie owodniowym pozwala na postawienie rozpoznania wrodzonego przerostu nadnerczy (CAH). Występowanie CAH ma związek z defektem swoistego enzymu (opisano niedobory sześciu różnych enzymów). W wyniku tych niedoborów, dochodzi do zwiększenia wytwarzania ACTH, powstania przerostu nadnerczy i wzrostu stężeń wielu prekursorów steroidów. Ponadto interesująca jest rola 17-OHP u pacjentów z żylakami powrózka nasiennego. (17-OHP i testosteron służą za markery funkcji komórek Leydiga) i u starzejących się mężczyzn są stosowane do wykrywania łagodnego rozrostu stercza (BPH) oraz raka stercza (PCA) (poziom 17-OHP w osoczu jest znacząco niższy w grupach pacjentów z PCA i BPH niż u zdrowych mężczyzn).

Inne obszary badań 17-OHP są następujące: niepłodność męska, dziewczęta z objawami wirylizacji w okresie pokwitania, dzieci z przedwczesnym dojrzewaniem (w tych przypadkach, aktywność 17-OHP jest podwyższona bez, lub po stymulacji ACTH).

IV. ZAGADNIENIA DOTYCZĄCE METODY

W celu pomiaru substancji obecnej w próbce lub w kalibratorze, odpowiednia ilość cząstek steroidu oznakowanych ¹²⁵I współzawodniczy ze steroidem o określonej ilości miejsc na przeciwciałach unieruchomionych na ścianie próbówki polistyrenowej. Z powodu wysokiej swoistości przeciwciał opłaszczonych na ściankach próbówki, ekstrakcja, ani chromatografia nie są potrzebne. Po 3 godzinach inkubacji w temperaturze 37 °C reakcja współzawodnictwa jest przerywana przez aspirację. Następnie próbówki są płukane przy pomocy 3 ml roztworu płuczącego i аспиrowane. Wykreślana jest krzywa kalibracyjna a stężenia 17-OHP w próbkach są określane na podstawie nałożenia dawki na krzywą kalibracyjną.

V. ODCZYNNIKI DOSTARCZONE

Odczynniki	Zestaw 96 oznaczeń	Rekonstrukcja			
 Probówki opłaszczone przeciwciałami anti-17-OHP	2 x 48	Gotowe do zastosowania.			
<table border="1" data-bbox="119 667 255 716"> <tr> <td>Ag</td> <td>¹²⁵I</td> </tr> </table> ZNACZNIK IZOTOPOWY: Znakowany jodem ¹²⁵ 17-OHP (czystości HPLC) w buforze fosforanowym/kwaskiem cytrynowym z kazeiną bydlęcą i azydkiem (<0,1%)	Ag	¹²⁵ I	1 fiolka 55 ml 190 kBq	Gotowe do zastosowania.	
Ag	¹²⁵ I				
<table border="1" data-bbox="119 862 255 907"> <tr> <td>CAL</td> <td>0</td> </tr> </table> Kalibrator zerowy w ludzkiej surowicy z azydkiem (0,5%)	CAL	0	1 fiolka 3 ml	Gotowe do zastosowania.	
CAL	0				
<table border="1" data-bbox="119 963 255 1008"> <tr> <td>CAL</td> <td>N</td> </tr> </table> Kalibratory 17-OHP N = 1 do 5 (dokładne wartości na etykietach fiolek) w ludzkiej surowicy z azydkiem (0,5%)	CAL	N	5 fiolek 0,5 ml	Gotowe do zastosowania.	
CAL	N				
<table border="1" data-bbox="79 1142 335 1187"> <tr> <td>WASH</td> <td>SOLN</td> <td>CONC</td> </tr> </table> Roztwór płuczący (TRIS HCl)	WASH	SOLN	CONC	1 fiolka 10 ml	Rozcieńczyć 70x wodą destylowaną (wykorzystać mieszadło magnetyczne).
WASH	SOLN	CONC			
<table border="1" data-bbox="87 1288 327 1332"> <tr> <td>CONTROL</td> <td>N</td> </tr> </table> Kontrole - N = od 1 do 2 w osocze ludzkiej z tymolem	CONTROL	N	2 fiołki (zawartość liofilizowana)	Dodać 0,5 ml wody destylowanej	
CONTROL	N				

Uwaga: Do rozcieńczania próbek należy użyć kalibratora zerowego.

VI. MATERIAŁY WYMAGANE, ALE NIEDOSTARCZONE

Poniższe materiały są wymagane, ale nie są dostarczone w zestawie:

1. Woda destylowana
2. Pipety do dozowania: 25 µl, 500 µl i 3 ml (zaleca się korzystanie z dokładnych pipet z jednorazowymi końcówkami plastikowymi)
3. Mieszadło wirowe
4. Mieszadło magnetyczne
5. Łaźnia wodna z temperaturą 37 °C
6. Strzykawka automatyczna o objętości 5 ml (rodzaj Cornwall) do płukania
7. Układ do aspiracji (opcjonalnie)
8. Może być wykorzystywany jakikolwiek licznik gamma odpowiedni do pomiaru ¹²⁵I (minimalny uzysk 70%).
9. Inkubatorze w temperaturze 37 °C
Opcjonalnie (do ekstrakcji)
10. Eter dietylowy (do analiz; czystość > 98%)
11. Jednorazowe próbówki szklane (12 x 75 mm), z zatyczkami.
12. Roztwór do odtwarzania DIALsource (17-OHP)-RIA-CT. nr ref: 32.140.74.

VII. PRZYGOTOWANIE ODCZYNNIKÓW

- A. **Kontrola:** Kontrole należy rekonstruować przy pomocy 0,5 ml wody destylowanej.
- B. **Roboczy roztwór płuczący:** Właściwą objętość roboczego roztworu płuczącego należy przygotować dodając 69 objętości wody destylowanej do 1 objętości roztworu płuczącego (70x). Do homogenizacji należy wykorzystać mieszadło magnetyczne. Niewykorzystany roboczy roztwór płuczący należy wylać pod koniec dnia.

VIII. PRZECHOWYWANIE I DATA WAŻNOŚCI ODCZYNNIKÓW

- Przed otwarciem lub rekonstrukcją wszystkie składniki zestawu zachowują trwałość do daty ważności przedstawionej na etykiecie, jeżeli są przechowywane w temperaturze od 2 do 8°C.
- Po rekonstrukcji kontrole zachowują trwałość przez jeden tydzień w temperaturze 2 do 8°C. W razie konieczności przechowywania przez dłuższy okres czasu, należy przygotować niewielkie objętości kontroli, co pozwala przechowywać je w temperaturze -20 °C przez 3 miesiące.
- Świeżo przygotowany roboczy roztwór płuczący powinien być wykorzystany w tym samym dniu.
- Po jego pierwszym zastosowaniu, znacznik izotopowy zachowuje trwałość do podanej daty ważności jeżeli jest przechowywany w oryginalnej, dobrze zamkniętej fiołce w temperaturze od 2 do 8°C.
- Zmiany w wyglądzie fizycznym odczynników w zestawie mogą wskazywać na ich niestabilność lub zużycie.

IX. POBIERANIE I PRZYGOTOWANIE MATERIAŁU DO BADAŃ

- Próbkę surowicy muszą być przechowywane w temperaturze 2-8°C.
- Jeżeli oznaczenie nie jest wykonywane w ciągu 48 godzin, zaleca się przechowywanie w temperaturze -20°C.
- Unikać powtarzanych cykli zamrażania i rozmrażania.
- Osocze krwi pobranej na heparynę powoduje uzyskiwanie wyników 10% niższych niż uzyskiwane z surowicy:
 Y (osocze krwi pobranej na heparynę) = 0,9 x (surowica) + 0,20 $r = 0,92$ $n = 20$
- Osocze krwi pobranej na EDTA powoduje uzyskiwanie wyników o 10% niższych niż surowica:
 Y (osocze krwi pobranej na EDTA) = 0,9 x (surowica) + 0,18 $r = 0,87$ $n = 20$

X. PROCEDURA

A. Uwagi dotyczące obsługi

Nie wolno wykorzystywać składników zestawu po upływie daty ważności.

Nie wolno mieszać materiałów pochodzących z różnych serii zestawów. Przed wykorzystaniem wszystkie odczynniki powinny osiągnąć temperaturę pokojową.

Wszystkie odczynniki i próbki należy dokładnie wymieszać przez delikatne potrząsanie lub obracanie.

Aby uniknąć zanieczyszczenia krzyżowego, do dodawania poszczególnych odczynników i próbek należy wykorzystywać czyste końcówki jednorazowe pipet. Pipety wysokiej precyzji lub pipety automatyczne poprawiają precyzję wykonania oznaczenia.

Przestrzegać czasów inkubacji.

Przygotować krzywą kalibracyjną dla każdego cyklu pomiarowego, nie wolno wykorzystywać danych z poprzednich oznaczeń.

B. Ekstrakcja z próbek od noworodków (opcjonalnie) – PRÓBKI OSOCZA

1. Oznaczyć po jednej próbce szklanej na każdą próbkę (**nie przeprowadzać ekstrakcji kalibratorów ani kontroli**).
2. Pipetą pobrać 75 µl surowicy, a następnie 2,25 ml eteru dietylowego.
3. Energicznie wymieszać wszystkie próbki w mieszadło wirowym (2 x 1 minuta).
4. Pozostawić do odstania na stole przez 5 minut.
5. Umieścić próbki w temperaturze -20 °C w celu zamrożenia fazy wodnej.
6. Przygotować drugą serię próbek szklanych i — w przypadku każdej próbki — przenieść fazę organiczną do nowych próbek. Unikać zanieczyszczenia fazy wodnej.
7. Odparować fazę organiczną (eter) całkowicie w strumieniu powietrza lub poprzez umieszczenie próbek w temperaturze 37°C (Łaźnia wodna). Czynniki wykonać pod wyciągiem.
8. Rozpuścić suchy ekstrakt w 150 µl roztworu do odtwarzania (**niedostarczony, zob. VI**). Energicznie mieszać w mieszadło wirowym przez 1 minutę.
9. Pozostawić do odstania przez 10–15 minut i ponownie wymieszać w mieszadło wirowym przez 1 minutę. Uzyskane objętości pozwalają na dwukrotne przeprowadzenie oznaczenia.

C. Procedura

1. Dla każdego kalibratora, próbki i kontroli należy oznaczyć opłaszczone próbki w badaniach podwójnych. W celu określenia całkowitych zliczeń należy oznaczyć 2 zwykłe próbki
2. Szybko wymieszać wirując: kalibratory, próbki i kontrole, i dozować po 25µl każdej substancji do odpowiednich probówek. **W przypadku próbek od noworodków, uzyskanych w wyniku ekstrakcji: odpipetować 50 µl zamiast 25 µl.**
3. Do każdej próbki, w tym do probówek nieopłaszczonych do całkowitego zliczania, dodać po 0,5 ml 17-OHP oznakowanego jodem¹²⁵.
4. Delikatnie potrząsnąć statywem w celu uwolnienia uwieczonych pęcherzyków powietrza.
5. Inkubować przez 3 godziny w temperaturze 37°C.
6. Aspirować (lub odlać) zawartość każdej próbki (z wyjątkiem probówek do całkowitego zliczania). Aby usunąć cały płyn należy upewnić się, że plastikowa końcówka aspiratora osiągnęła dno opłaszczonej próbki.
7. Przepłukać próbki przy pomocy 3 ml roboczego roztworu płuczącego (z wyjątkiem probówek do całkowitego zliczania) i aspirować zawartość (lub odlać ją). W trakcie dodawania roboczego roztworu płuczającego należy unikać wytwarzania piany.
8. Pozostawić próbki w pozycji stojącej do góry na dwie minuty i aspirować pozostałe krople płynu.
9. Zliczać próbki w liczniku gamma przez 60 sekund.

XI. OBLICZANIE WYNIKÓW

1. Obliczyć średnią oznaczeń podwójnych.
2. Obliczyć związaną radioaktywność jako odsetek wiązania określonego w zerowym punkcie kalibracji (0) zgodnie z poniższym wzorem:

$$B/B0(\%) = \frac{\text{Liczba zliczeń (dla kalibratora lub próbki)}}{\text{Liczba zliczeń (dla kalibratora zerowego)}} \times 100$$

3. Na 3 arkuszach półlogarytmicznych lub papierze milimetrowym wykreślić wartości (B/B0(%)) dla każdego punktu kalibratora jako funkcję stężenia 17-OHP każdego punktu kalibratora. Odrzucić oczywiste wartości graniczne.
4. Do opracowania krzywej kalibracyjnej mogą być wykorzystane również metody wspomagania komputerowego. Jeżeli ma być zastosowane automatyczne przetwarzanie wyników, zaleca się dopasowanie krzywej logistycznej 4 parametrowej.
5. Nakładając wartości (B/B0 (%)) próbki należy określić stężenia 17-OHP w próbkach z krzywej kalibracyjnej.
6. Stężenie w przypadku próbek od noworodków uzyskanych w wyniku ekstrakcji (zob. X.B.) można odczytać bezpośrednio na krzywej (współczynnik korekty nie jest wymagany)
7. Dla każdego oznaczenia należy sprawdzić odsetek całkowitego związanego znacznika izotopowego przy braku nieoznakowanego 17-OHP (B0/T).

XII. PRZYKŁAD DANYCH TYPOWYCH

Poniższe dane, uzyskane dzięki 6-tygodniowemu znacznikowi, są przedstawione wyłącznie w celach przykładowych i nie powinny być nigdy stosowane zamiast rzeczywistych krzywych kalibracyjnych.

(17-OHP)-RIA-CT		cpm	B/Bo (%)
Zliczanie całkowite		32363	
Kalibrator	0,00 ng/ml	12596	100,0
	0,17 ng/ml	9769	77,6
	0,59 ng/ml	6529	51,8
	1,4 ng/ml	3752	29,8
	4,3 ng/ml	1396	11,1
	14,0 ng/ml	479	3,8

XIII. DZIAŁANIE I OGRANICZENIA

A. Wrażliwość

LoB (limit ślepej próby) badano, mierząc 20-krotność próby ślepej i obliczono jako średnią ± 2 odchylenia standardowe rozkładu wartości testowych.

LoB obliczono na 0,03 ng/ml.

LoD (granice wykrywalności) obliczono jako odchylenie standardowe LoB ± 1.645 próbki o niskim stężeniu zmierzonej w 10 różnych testach.

LoD obliczono na 0,09 ng/ml.

LoQ (Limit of Quantification) obliczono, badając 4 próbki o niskim stężeniu w 10 różnych testach.

LoQ obliczono na 0,14 ng/ml.

B. Swoistość

Swoistość oznaczono przez dodanie do próbek zbiorczych oznaczanych na 17-OHP znanych ilości (± 0,5 ng/ml) steroidów, które mogłyby występować w próbkach pobranych od pacjentów.

Składnik	Ilość dodana (ng/ml)	Reaktywność krzyżowa (%)
17α-hydroksyprogesteron	-	100
Progesteron	500	0,7
17α-hydroksypregnenolon	1000	0,3
21-deoksykortyzol	1000	1,07
Pregnenolon	500	0,02
11-deoksykortyzol	500	0,21
Kortykosteron	1000	0,008
11-deoksykortykosteron	500	0,24
Kortyzol	5000	0,005
Testosteron	5000	0,004
Androstenedion	5000	0,01
Estradiol	1000	0,008
Siarczan 17α hydroksypregnenolonu	5000	0,34

Oceniono wpływ potencjalnych substancji zakłócających na próbki, stosując test DIASource 17OHP-RIA-CT. Badano różne stężenia hemoglobiny, bilirubiny, triglicerydów oraz bilirubiny skoniugowanej w próbkach surowicy z różnym stężeniem 17α-hydroksyprogesteronu. Nasze kryteria akceptacji obejmowały interferencję mniejszą niż 10%. Badane substancje nie wpływały na działanie testu DIASource 17OHP-RIA-CT.

Substancja	17OHP (ng/ml)	Stężenie interferentu (mg/dl)	Średnia zmiana	
Hemoglobina	0,57	250	98.6%	
		500		
		250		
Bilirubina skoniugowana	0,57	50	95.1%	
		1,8		50
		0,57		50
Bilirubin nieskoniugowana	1,8	100	99.2%	
		50		
		100		
Triglicerydy	0.57	50	97.0%	
		100		
		250		
		500		
		1000		
	1.54	50		
		100		
		250		
		500		
		1000		

C. Precyzja

W SERII
PO EKSTRAKCJI

Surowica	N	<X> ± SD (ng/ml)	CV (%)	Surowica	N	<X> ± SD (ng/ml)	CV (%)
A	20	0,73 ± 0,05	6,8	C	24	0,56 ± 0,06	10,7
B	20	1,94 ± 0,09	4,6	D	24	1,81 ± 0,17	9,4

SD: odchylenie standardowe; CV: współczynnik zmienności

MIĘDZY SERIAMI
PO EKSTRAKCJI

Surowica	N	<X> ± SD (ng/ml)	CV (%)	Surowica	N	<X> ± SD (ng/ml)	CV (%)
A	12	0,69 ± 0,06	8,7	A	8	0,72 ± 0,13	18
B	12	2,08 ± 0,16	7,6	B	8	2,03 ± 0,39	19,2

SD: odchylenie standardowe; CV: współczynnik zmienności

D. Dokładność**BADANIE ROZCIEŃCZENIA**

Surowica	Rozcieńczenie	Stężenie teoretyczne (ng/ml)	Stężenie zmierzone (ng/ml)
	1/1	-	3,3
	1/2	1,65	1,79
	1/4	0,83	1,0
	1/8	0,42	0,5
	1/16	0,21	0,27

Próbki rozcieńczono kalibratorem zerowym.

BADANIE ODZYSKU

Próbka	Dodany 17-OHP (ng/ml)	Odzysk 17-OHP (ng/ml)	Odzysk (%)
1	6	5,7	95
	3	2,99	99
	1,5	1,64	109
	0,75	0,81	108
2	6	5,27	87
	3	2,86	95
	1,5	1,49	99
	0,75	0,74	98

Współczynnik przeliczeniowy:

Z ng/ml na nmol/l: x 3,03

Z nmol/l na ng/ml: x 0,33

Zgodnie z naszą najlepszą wiedzą, dla tego parametru nie istnieje międzynarodowy odczynnik referencyjny.

E. Opóźnienie pomiędzy oznaczeniem ostatniego kalibratora i dozowaniem próbki

Jak wykazano, wyniki pomiaru pozostają dokładne nawet wówczas, gdy od momentu dodania kalibratora do opłaszczonych próbek minęło 40 minut.

OPÓŹNIENIE

Próbka (ng/ml)	0'	10'	30'	40'
Próbka 1	0,63	0,65	0,73	0,74
Próbka 2	2,03	2,4	2,37	2,2

F. Ograniczenia w przypadku próbek od noworodków

U bardzo małych dzieci (< 3 miesiące) stężenia siarczanu 17 α -hydroksypregnenolonu osiągają bardzo wysokie wartości. Reakcja krzyżowa z niniejszą cząsteczką niemal nie występuje, jednak zalecamy przeprowadzenie procedury ekstrakcji (X. B.).

XIV. WEWNĘTRZNA KONTROLA JAKOŚCI

- Procentowy odsetek całkowitego, związanego znacznika izotopowego przy braku nieoznakowanego 17-OHP (B0/T) musi być > 25%.
- Jeżeli wyniki uzyskane dla kontroli 1 i/lub 2 nie znajdują się w zakresie określonym na etykiecie fiolki, wyniki nie mogą zostać wykorzystane dopóki nie uda się znaleźć właściwego wyjaśnienia tego odchylenia.
- Jeżeli to konieczne, każde laboratorium może wykonać własne próbki zbiorcze w celach kontrolnych, które powinny być zamrożone w małych objętościach. Nie wolno zamrażać i rozmrażać więcej niż dwukrotnie.
- Dopuszczalne kryteria dotyczące różnicy pomiędzy wynikami oznaczeń podwójnych próbek powinny być zgodne z zasadami prawidłowej pracy w laboratorium.

XV. ZAKRESY REFERENCYJNE

Wartości są przedstawione wyłącznie w celach orientacyjnych, każde laboratorium powinno opracować własne wartości referencyjne.

	Zakres stężeń (od 2,5 do 97,5% percentyla) (ng/ml)	Liczba osobników
Zdrowi mężczyźni	0.67 – 3.32	79
Zdrowe kobiety		
. Faza folikularna	0.41 – 2.27	50
. Faza lutealna	0.23 – 3.87	28
Ciąża		
. Pierwszy trymestr	2.60 – 7.95	30
. Drugi trymestr	1.83 – 9.74	30
. Trzeci trymestr	3.54 – 18.97	15
Noworodki (po ekstrakcji)	0.34 – 1.96	23 (od 0 do 3 miesięcy)

XVI. ŚRODKI OSTROŻNOŚCI I OSTRZEŻENIA**Bezpieczeństwo**

Tylko do diagnostyki *in vitro*.

Zestaw zawiera ¹²⁵I (Okres połowicznego rozpadu: 60 dni), emitujący promieniowanie jonizujące X (28 keV) i γ (35,5 keV).

Ten produkt radioaktywny może być transportowany i wykorzystany wyłącznie przez osoby autoryzowane; zakup, przechowywanie, stosowanie i wymiana produktów radioaktywnych podlega regulacjom prawnym kraju użytkownika końcowego. W żadnym wypadku produkt nie może być podawany ludziom lub zwierzętom.

Obsługa materiałów radioaktywnych powinno być przeprowadzana w miejscach do tego przeznaczonych, z dala od miejsc ogólnej użyteczności. W laboratorium musi być przechowywany rejestr przyjęć i przechowywania materiałów radioaktywnych. Wyposażenie laboratorium oraz szkło, które może być skażone substancjami radioaktywnymi powinno być oddzielone w celu uniknięcia krzyżowego zanieczyszczenia różnych radioizotopów.

Wszelkie plamy z substancji radioaktywnych muszą być natychmiast oczyszczone zgodnie z procedurami dotyczącymi bezpieczeństwa radiologicznego. Odpady radioaktywne muszą być usuwane zgodnie z miejscowymi przepisami i ogólnie przyjętymi wytycznymi obowiązującymi w laboratorium. Przestrzeganie podstawowych zasad bezpieczeństwa radiologicznego zapewnia wystarczające zabezpieczenie.

Składniki zawierające ludzką krew, dostarczone w zestawie, zostały przebadane metodami zaaprobowanymi przez instytucje europejskie i/lub FDA. Stwierdzono, że nie zawierają one HbsAg, przeciwciał anty-HCV, anty-HIV-1 i 2. Żadna ze znanych metod nie może dać całkowitej pewności, że materiały pochodzenia ludzkiego nie przeniosą czynników zakaźnych wirusowego zapalenia wątroby, AIDS i innych. Dlatego postępowanie z odczynnikami i próbkami surowicy lub osocza powinno być zgodne z miejscowymi procedurami dotyczącymi bezpieczeństwa.

Produkty pochodzenia zwierzęcego były pobierane od zdrowych zwierząt. Składniki bydłce pochodzą z krajów, w których nie odnotowano występowania BSE. Pomimo to, składniki zawierające substancje pochodzenia zwierzęcego powinny być traktowane jako potencjalnie zakaźne.

Unikać kontaktu skóry z odczynnikami (zawierają azydek sodowy jako środek konserwujący). Azydek znajdujący się w zestawie może reagować z miedzią i ołowiem w układzie kanalizacyjnym tworząc związki o właściwościach wybuchowych. W czasie płukania odprowadzany płyn należy płukać dużymi objętościami wody, aby zapobiec kumulacji azydków.

Nie wolno palić, spożywać napojów ani pokarmów, bądź używać kosmetyków w miejscu pracy. Nie pipetować ustami. Zakładać ubranie ochronne i rękawiczki jednorazowe.

XVII. BIBLIOGRAFIA

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 adrenance.
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

	CALKOWITA LICZBA ZLICZEŃ (μl)	KALIBRATORY (μl)	PRÓBKA(I) KONTROLE (μl)	PRÓBKI PO EKSTRAKCJI (μl)
Kalibratory (0-5)	-	25	-	-
Próbki, kontrole	-	-	25	-
Próbki po ekstrakcji	-	-	-	50
Znacznik izotopowy	500	500	500	500
Inkubacja	3 godziny w 37°C			
Rozdzielenie Roboczy roztwór płuczący Rozdzielenie	-	aspiracja 3,0 ml aspirować z ostrożnością		
Zliczanie	Zliczanie próbek przez 60 sekund			

Használat előtt olvassa el a teljes használati utasítást.

17 α -HYDROXYPROGESTERONE (17-OHP)-RIA-CT

I. VIZSGÁLAT CÉLJA

Immunradiometriás eljárás emberi vérsavó vagy vérplazma 17 α -hidroxiprogesztéron (17-OHP) tartalmának *in vitro* mennyiségi meghatározására.

II. ÁLTALÁNOS INFORMÁCIÓK

- A. **Bejegyzett név:** DIAsource 17 α -HYDROXYPROGESTERONE (17-OHP)-RIA-CT Reagenskészlet
- B. **Katalógusszám:** KIP1409 : 96 vizsgálat
- C. **Gyártó :** DIAsource ImmunoAssays S.A.
Rue du Bosquet, 2, B-1348 Louvain-la-Neuve, Belgium.

Gyakorlati jellegű vagy rendeléssel kapcsolatos kérdésekkel hívja a következő számot:

Tel: +32 (0) 10 84.99.11

Fax: +32 (0) 10 84.99.91

III. KLINIKAI HÁTTER

A 17 α -hidroxiprogesztéron élettani szerepe

17 α -hidroxiprogesztéron (17-OHP) egy 21 szénatomot tartalmazó szteroid hormon (molekulatömege 330,3), melyet a mellékvesék, a petefészkek, a herék, és a méhlepény állítanak elő 17 α -hidroxipregnenolonból. A 17-OHP 11. és 21. szénatomja hidroxilálódik, és így 11-dezoxikortizol, majd kortizol keletkezik.

B. A 17 α -hidroxiprogesztéron mérésének klinikai felhasználása

A vérsavó, illetve az amnionfolyadék 17-OHP szintjének meghatározása alkalmas a veleszületett mellékvese hyperplasia (CAH) diagnosztizálására. A CAH kialakulásának hátterében bizonyos enzimek (hat különböző enzim) funkciózavara áll. Az enzimek hiányos működése miatt az ACTH-szint megemelkedik, így mellékvese hyperplasia alakul ki, illetve számos szteroid prekursorának szintje is megnő. A 17-OHP szint mérésének fontos szerepe lehet más betegségek felderítésében is, például varicocele (here-visszértágulat) esetén (a 17-OHP és a tesztoszteron szint mérésével a Leydig-sejtek működéséről kaphatunk információt), illetve a prosztata idősebb páciensekben előforduló jóindulatú hypertrophiájának (BPH) és karcinómájának (PCA) diagnosztizálásakor is (az ezekben a betegségekben szenvedő férfiak vérplazmájának 17-OHP szintje szignifikánsan alacsonyabb, mint egészséges társaiké).

A 17-OHP szint mérésének indikációja lehet még: férfiak nemzéképtelensége, kislányok peripubertális virilizációja, korai adrenarche (ezekben az esetekben a 17-OHP szintje emelkedett, ACTH stimuláció nélkül, vagy a stimuláció után).

IV. A MÓDSZER ELVE

Ismert mennyiségű ^{125}I -dal jelölt szteroid verseng a mintában vagy a kalibrátorban található szteroiddal a poliszitirén csövek falához rögzített ismert mennyiségű ellenanyag kötőhelyeiért. A csövek falához kötött ellenanyagok nagy mértékű specifikussága miatt nincs szükség sem tisztításra, sem kromatográfiára. A csöveket 3 órán át 37°C -on kell inkubálni, majd a folyadékot el kell távolítani. Ekkor a kompetitív reakció leáll. A csöveket ezután át kell mosni 3 ml hígított mosóoldattal, majd a folyadékot ismét el kell távolítani. A kalibrátorok segítségével felrajzolható egy kalibrációs görbe, amiről a minták 17-OHP-koncentrációi interpolációval olvashatók le.

V. A REAGENSKÉSZLET TARTALMA

Reagens	Mennyiség 96 mintához	Feloldás
Anti-17-OHP borított csövek	2 x 48	Használatra kész
Ag ^{125}I	1 ampulla 55 ml 190 kBq	Használatra kész
TRACER: ^{125}I -dal jelölt 17-OHP (HPLC tisztaságú), szarvasmarha kazein és nátrium-azid (<0,1%) tartalmú foszfor/citromsav pufferben		
CAL 0	1 ampulla 3 ml	Használatra kész
Nulla kalibrátor nátrium-azid (0,5%) tartalmú emberi vérsavóban		
CAL N	5 ampulla 0,5 ml	Használatra kész
Kalibrátorok 17-OHP N = 1 - 5 (a pontos értékeket l. az ampullák címkéin) nátrium-azid (0,5%) tartalmú emberi vérsavóban		
WASH SOLN CONC Mosóoldat (TRIS-HCl)	1 ampulla 10 ml	Hígítsa 70 x desztillált vízzel (használjon mágneses keverőt).
CONTROL N	2 ampulla lioofilizált	Adjon hozzá 0,5 ml desztillált vizet
Kontrollok - N = 1 vagy 2 thymolt tartalmazó humán plazma		

Megjegyzés: Minták hígításához használja a nulla kalibrátort

VI. A FELHASZNÁLÓ ÁLTAL BIZTOSÍTOTT ESZKÖZÖK

A következő eszközöket a készlet nem tartalmazza, de szükségesek a vizsgálat elvégzéséhez:

- Desztillált víz
- Pipetták: 25 μl , 500 μl és 3 ml beméréséhez (ajánlott pontos pipetták és eldobható műanyag pipettahegyek használata)
- Vortex
- Mágneses keverő
- 37°C -os vízfürdő
- 5 ml automata fecskendő (Cornwall) a mosáshoz
- Vízlégszivattyú (választható)
- Bármely, ^{125}I mérésére alkalmas gamma-sugármérő (minimális hozam 70%).
- 37°C -os inkubátorban
- Opcionális (tisztításhoz)**
- Dietil-éter (analitikai minőség; tisztaság > 98%)**
- Eldobható üvegcsövek (12 x 75 mm), dugóval**
- DIAsource feloldó oldat a (17-OHP)-RIA-CT-hez. hiv. sz.: 32.140.74.**

VII. REAGENSEK ELŐKÉSZÍTÉSE

- Kontrollok:** Oldja fel a kontrollokat 0,5 ml desztillált vízben.
- Hígított mosóoldat:** Készítsen megfelelő mennyiségű hígított mosóoldatot úgy, hogy 69 rész desztillált vízhez 1 rész mosóoldatot (70x) kever. Homogenizálja mágneses keverő segítségével. A napi vizsgálatok végeztével öntse ki a megmaradt hígított mosóoldatot.

VIII. A REAGENSEK TÁROLÁSA ÉS ELTARTHATÓSÁGA

- Felnyitás és feloldás nélkül a reagens 2- 8°C -on tárolva a címkén feltüntetett időpontig eltartható.
- Feloldás után a kontrollok 2- 8°C -on egy hétig, több csöbe szétosztva - 20°C -on lefagyasztható legfeljebb 3 hónapig eltartható.
- A frissen készült hígított mosóoldatot még aznap fel kell használni.
- Amennyiben felnyitás után a tracer az eredeti, jól lezárt ampullában 2- 8°C -on tárolja, akkor a címkén feltüntetett időpontig eltartható.
- A reagens fizikai tulajdonságainak megváltozása valószínűleg azt jelzi, hogy megromlottak.

IX. MINTAVÉTEL ÉS ELŐKÉSZÍTÉS

- Tárolja a vérsavó vagy vérplazma mintákat 2- 8°C -on.
- Amennyiben nem végzi el a vizsgálatot 48 órán belül, ajánlott a mintákat - 20°C -on szétosztva tárolni.
- Kerülje a minták többszöri lefagyaszthatását és felolvasztását.
- A heparinos plazma 10%-kal alacsonyabb eredményt ad, mint a szérum: $Y(\text{hep. plazma}) = 0,9 \times (\text{szérum}) + 0,20$ $r = 0,92$ $n = 20$
- Az EDTA-s plazma 10%-kal alacsonyabb eredményt ad, mint a szérum: $Y(\text{EDTA-s plazma}) = 0,9 \times (\text{szérum}) + 0,18$ $r = 0,87$ $n = 20$

X. ELJÁRÁS

A. Tudnivalók

Ne használja a reagenset a lejárat idejűkön túl. Ne keverjen össze eltérő gyártási számú reagenskészletekből származó anyagokat. Használat előtt várja meg, amíg a reagens szobahőmérsékletre melegednek. Óvatos mozgattal vagy keveréssel alaposan homogenizálja a reagenset. Minden reagens és minta beméréséhez használjon tiszta eldobható pipettahegyet, hogy elkerülje az anyagok beszennyeződését. Nagy pontosságú pipetták, vagy automata pipettázó készülék használata javítja a vizsgálat pontosságát. Tartsa be a megadott inkubációs időket. Minden vizsgálathoz készítsen új kalibrációs görbét, ne használja korábbi mérések adatait.

B. Újszülöttektől származó minták tisztítása (opcionális) – SAVÓMINTÁHOZ

- Mindegyik mintához feliratozzon egy üvegcsövet (**ne tisztítsa a kalibrátorokat vagy a kontrollokat**).
- Pipettázzon 75 μl savot, utána pedig 2,25 ml dietil-étert.
- Erőteljesen vortexeljen minden csövet (2x1 perc)
- Hagyja az asztalon állni 5 percig
- A vizes fázis lefagyasztása érdekében helyezze el - 20°C -on a csöveket.
- Készítsen elő egy második sorozatot az üvegcsövekből, majd minden minta esetében helyezze át a szerves fázist ezekbe az új csövekbe. Kerülje a vizes fázis révén történő szennyeződést.
- Légáram vagy annak segítségével, hogy a csöveket 37°C -on (vízfürdő) helyezi el, párologtassa el teljesen a szerves (éter) fázist. Elszívó alatt dolgozzon.
- Oldja fel a száraz éterkivonatot 150 μl feloldóoldattal (**a felhasználó biztosítja, lásd a VI. pontot**). Erőteljesen vortexelje 1 perc.
- Hagyja állni 10-15 percig, majd ismét vortexelje 1 percig. E mennyiségek segítségével párhuzamos mérés végezhető.

C. A vizsgálat menete

- Feliratozzon 2-2 csövet a kalibrátorok, a minták és a kontrollok számára. A teljes radioaktivitás méréséhez használjon 2 reagens nélküli csövet (totálok).
- Rövid vortexelés után mérjen 25 μl -t a kalibrátorokból, kontrollokból és mintákból a megfelelő csövekbe. **Az újszülöttektől származó tisztított minták esetében 25 μl helyett 50 μl -t pipettázzon.**
- Mérjen 0,5 ml ^{125}I -dal jelölt 17-OHP minden csöbe (a totálkba is).
- Kézzel óvatosan rázza meg a kémcsőállványt, hogy a csövekben maradt levegőbuborékok eltávozzanak.
- Inkubálja a csöveket 37°C -on 3 órán át.
- Szívja le (vagy öntse le) a csövek tartalmát (kivéve a totálok). Ügyeljen, hogy a vízlégszivattyú műanyag hegye leérjen a csövek aljáig, és így az összes folyadékot eltávolítsa.
- Mossa a csöveket 3 ml hígított mosóoldattal (kivéve a totálokat), majd távolítsa el a folyadékot. Vigyázzon, hogy a mosóoldat beméréskor ne habosodjon.
- Hagyja állni a csöveket 2 percig, majd távolítsa el a megmaradt folyadékcséppet.
- Mérje a radioaktivitást gamma-sugármérővel 60 másodpercig.

XI. EREDMÉNYEK KISZÁMÍTÁSA

- Számolja ki a párhuzamos mérések átlagát.
- Számítsa ki a megkötött radioaktivitás százalékos értékét a nulla kalibrátorra kapott eredmény felhasználásával az alábbi képlet alapján:

$$B/B_0(\%) = \frac{\text{kontroll vagy minta cpm}}{B_0(\text{nulla kalibrátor}) \text{ cpm}} \times 100$$

- Féllogaritmusos vagy logit-log milliméterpapíron ábrázolja a kalibrátorok B/B₀(%) értékeit a hozzájuk tartozó 17-OHP -koncentrációk függvényében. Hagyja figyelmen kívül a nyilvánvalóan kieső értékeket.
- Számítógép segítségével is felrajzolható a kalibrációs görbe. Ez esetben használjon 4-paraméteres logisztikus görbeillesztést.
- A kalibrációs görbe alapján határozza meg a minták 17-OHP-koncentrációját B/B₀(%) értékeik interpolációjával.
- Az újszülöttektől származó, tisztított minták esetében kapott koncentráció (lásd a X.B. pontot) közvetlenül leolvasható a görbéről (nincs szükség semmilyen korrekciós tényezőre)
- Minden vizsgálat során határozza meg a jelöletlen 17-OHP nélkül bekötődő tracer százalékos mennyiségét (B₀/T).

XII. JELLEMZŐ MÉRÉSI EREDMÉNYEK

A következő adatok, amelyeket 6 hetes tracer segítségével kapnak, csak példaként szolgálnak, soha ne használja őket a valós idejű kalibráció helyett.

(17-OHP)-RIA-CT		cpm	B/Bo (%)
Teljes radioaktivitás		32363	
Kalibrátor	0,00 ng/ml	12596	100,0
	0,17 ng/ml	9769	77,6
	0,59 ng/ml	6529	51,8
	1,4 ng/ml	3752	29,8
	4,3 ng/ml	1396	11,1
	14,0 ng/ml	479	3,8

XIII. A VIZSGÁLAT JELLEMZŐI ÉS KORLÁTAI

A. Érzékenység

A LoB-értéket (Limit of Blank) a vakpróba 20-szorosának mérésével teszteltük, és a tesztértékek eloszlásának átlaga ± 2 standard deviációjaként számítottuk ki.

A LoB-t 0,03 ng/ml-re számítottuk.

A LoD-t (Detection Limit of Detection) egy alacsony koncentrációjú minta LoB ± 1,645 szórásértékeként számítottuk ki 10 különböző tesztben.

Az LoD-t 0,09 ng/ml-re számítottuk.

A LoQ-értéket (Limit of Quantification) 4 alacsony koncentrációjú minta tesztelésével számítottuk ki, 10 különböző vizsgálati eljárásban.

Az LoQ értéke 0,14 ng/ml volt.

B. Specifitás

A specifitást úgy vizsgálták, hogy 17-OHP-tartalmú (± 0,5 ng/ml) mintákhoz olyan szteoidokat adtak, amelyek jelen lehetnek a betegekben.

Vegyület	Hozzáadott mennyiség (ng/ml)	Keresztreaktivitás (%)
17α-hidroxiprogesteron	-	100
Progeszteron	500	0,7
17α-hidroxipregnenolon	1000	0,3
21-deoxikortizol	1000	1,07
Pregnenolon	500	0,02
11-deoxikortizol	500	0,21
Kortikoszteron	1000	0,008
11-deoxikortikoszteron	500	0,24
Kortizol	5000	0,005
Tesztoszteron	5000	0,004
Androsztendion	5000	0,01
Ösztadiol	1000	0,008
17α-hidroxi-pregnenolon-szulfát	5000	0,34

Potenciálisan beavatkozó anyagoknak a DIAsource 17OHP-RIA-CT-t alkalmazó mintákra gyakorolt hatását kiértékeltek. A hemoglobin, bilirubin, triglicerid és konjugált bilirubin a szérummintákban tapasztalható különböző szintjeit vizsgáltuk olyan mintákon, ahol más volt a 17α-hidroxi-progeszteron koncentrációja. Elfogadhatósági kritériumunk úgy szólt, hogy az interferenciának 10%-nál kisebbnek kell lennie. A vizsgált anyagoknak nem volt hatása a DIAsource 17OHP-RIA-CT vizsgálat teljesítményére.

Anyag	17OHP (ng/ml)	Interferens koncentrációja (mg/dl)	Átlagos os eltérés
Hemoglobin	0,57	250	98.6%
		500	
		250	
Konjugált bilirubin	0,57	50	95.1%
		1,8	
		50	
Konjugátlan bilirubin	0,57	50	99.2%
		100	
		50	
Triglicerid	0,57	50	97.0%
		100	
		250	
		500	
		1000	
	1,54	50	
		100	
		250	
		500	
		1000	

C. Reprodukálhatóság

VIZSGÁLATOK KÖZÖTTI, EXTRAHÁLÁS UTÁN

Szérum	N	<X> ± SD (ng/ml)	CV (%)	Szérum	N	<X> ± SD (ng/ml)	CV (%)
A	20	0,73 ± 0,05	6,8	C	24	0,56 ± 0,06	10,7
B	20	1,94 ± 0,09	4,6	D	24	1,81 ± 0,17	9,4

SD: standard deviáció; CV: variációs koefficiens

VIZSGÁLATOK KÖZÖTTI, EXTRAHÁLÁS UTÁN

Szérum	N	<X> ± SD (ng/ml)	CV (%)	Szérum	N	<X> ± SD (ng/ml)	CV (%)
A	12	0,69 ± 0,06	8,7	A	8	0,72 ± 0,13	18
B	12	2,08 ± 0,16	7,6	B	8	2,03 ± 0,39	19,2

SD: standard deviáció; CV: variációs koefficiens

D. Pontosság

HÍGÍTÁSI VIZSGÁLAT

Savó	Hígítás	Elméleti koncentráció (ng/ml)	Mért koncentráció (ng/ml)
	1/1	-	3,3
	1/2	1,65	1,79
	1/4	0,83	1,0
	1/8	0,42	0,5
	1/16	0,21	0,27

A minták hígítása a nulla kalibrátorral történt.

VISSZANYERÉS

Minta	Hozzáadott 17-OHP (ng/ml)	Visszanyert 17-OHP (ng/ml)	Visszanyerés (%)
1	6	5,7	95
	3	2,99	99
	1,5	1,64	109
	0,75	0,81	108
2	6	5,27	87
	3	2,86	95
	1,5	1,49	99
	0,75	0,74	98

Mértékegységek átváltása:

ng/ml-ről nmol/l-re: x 3,03

nmol/l-ről ng/ml-re: x 0,33

Ismerteink szerint jelenleg nem létezik nemzetközi referencia anyag ennek a paraméternek a vizsgálatára.

E. Az utolsó kalibrátor és a minták bemérése között eltelt idő

Ahogy ezt az alábbi adatok is mutatják, a vizsgálat eredményeit nem befolyásolja, ha egy minta bemérése akár 40 perccel az utolsó kalibrátor után történik.

ELTELT IDŐ

Minta (ng/ml)	0'	10'	30	40'
Minta 1	0,63	0,65	0,73	0,74
Minta 2	2,03	2,04	2,37	2,2

F. Az újszülöttektől származó mintákra érvényes korlátozások

Nagyon fiatal (<3 hónapos) gyermekeknél magas a 17 α -hidroxipregnenolon-szulfát szintje. Annak ellenére, hogy szinte egyáltalán nincs keresztreakció ezzel a molekulával, azt javasoljuk, alkalmazza a tisztítási eljárás (X. B.)

XIV. BELSŐ MINŐSÉGELLENŐRZÉS

- Jelöletlen 17-OHP hiányában a teljes megkötött tracer mennyiségének (BO/T) >25%-nak kell lennie.
- Ha a kontroll 1-re és 2-re kapott eredmények kívül esnek az ampullák címkéin feltüntetett tartományon, a vizsgálat eredményei nem használhatók fel, kivéve, ha ismert az eltérés pontos oka.
- Igény esetén bármely laboratórium készíthet egy saját, kontrollként szolgáló savó-poolt, amit azután szétosztva, lefagyaszthat kell tárolni. Ne fagyassza le és olvassza fel őket kettőnél többször.
- A párhuzamos vizsgálatok eredményei közötti eltérés elfogadható mértékét a GLP (Good Laboratory Practises) alapján kell meghatározni.

XV. REFERENCIATARTOMÁNY

Az alábbi értékek csak irányadó jellegűek, minden laboratóriumnak meg kell határoznia saját referenciatartományát.

	Koncentrációtartomány (2,5 to 97,5% percentilis) (ng/ml)	Minták száma
Átlag férfipopuláció	0.67 – 3.32	79
Átlag női populáció		
. Follicularis fázis	0.41 – 2.27	50
. Lutealis fázis	0.23 – 3.87	28
Terhesség		
. Első trimeszter	2.60 – 7.95	30
. Második trimeszter	1.83 – 9.74	30
. Harmadik trimeszter	3.54 – 18.97	15
Újszülöttek (tisztítás után)	0.34 – 1.96	23 (0 és 3 hónap közötti korúak)

XVI. MUNKAVÉDELME

Biztonsági előírások

Csak in vitro diagnosztikai felhasználásra.

A kit röntgen (28 keV) és gamma (35,5 keV) sugárzó ¹²⁵I izotópot (felezési idő: 60 nap) tartalmaz.

A reagenskészletben található radioaktív anyagot csak arra jogosult személyek vehetik át és használhatják fel. Radioaktív termékek beszerzésére, tárolására, használatára, és cseréjére az adott ország törvényei érvényesek. A reagens alkalmazása embereken és állatokon is minden körülmények között tilos.

Minden, radioaktív reagenssel végzett műveletet egy arra kijelölt, elkülönített helyen kell elvégezni. A laboratóriumba érkezett radioaktív anyagok átvételéről és tárolásáról vezetett jegyzőkönyvet a laboratórium területén kell tartani. Azokat a laboratóriumi eszközöket és üvegedényeket, amelyek radioaktív anyaggal szennyeződtek, különítse el, hogy elkerülje a különböző radioizotópokkal történő keresztzennyeződést.

Amennyiben bármilyen radioaktív anyag kiömlik, azonnal takarítsa fel az erre vonatkozó előírásoknak megfelelő módon. A keletkező radioaktív hulladékot a helyi szabályoknak és az illetékes hatóságok erre vonatkozó útmutatásának megfelelően kell kidobni. Ha betartja a radioaktív anyagok kezelésére vonatkozó alapvető szabályokat, megfelelően védett lesz a sugárfertőzéstől.

A készlet emberi vérből készült reagenseit európai szabványok szerinti és/vagy az FDA által minősített módszerrel HBsAg-tól, valamint anti-HCV, és anti-HIV-1 és 2 ellenanyagoktól mentesnek találták. Azonban egyetlen ma ismert módszer alapján sem állítható biztosan, hogy az emberi vérből készült anyagok nem okozhatnak hepatitiszt, AIDS-et vagy más fertőző betegséget. Ezért minden ilyen reagent és minden savó-, illetve plazmamintát a fertőző anyagokra vonatkozó helyi biztonsági előírásoknak megfelelően kell kezelni.

Minden állati eredetű reagens és termék egészséges állatokból származik. A szarvasmarha eredetű reagens olyan országokból származnak, ahonnan eddig nem jelentettek BSE esetet. Ennek ellenére minden állati eredetű anyagot tartalmazó reagent potenciálisan fertőzésveszélyesként kell kezelni.

Vigyázzon, hogy a reagens bőrre ne kerüljenek (tartósítószer: nátrium-azid). A reagensben található nátrium-azid robbanásveszélyes fém-azidokat képezhet ólom és réz csővezetékanyagával. A csövek mosásakor nagy mennyiségű vízzel együtt öntse ki ezeket az anyagokat, hogy megelőzze az azid felgyülemlését.

Ne dohányozzon, ne fogyasszon ételt vagy italt, illetve ne használjon kozmetikumokat a laboratóriumban. Ne pipettázzon szájjal. Munka közben viseljen laborköpenyt és egyszerű használatos kesztyűt.

XVII. IRODALOM

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 adrenance.
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. AZ ELJÁRÁS ÖSSZEFOGLALÁSA

	TOTÁLOK (μ l)	KALIBRÁ TOROK (μ l)	MINTÁK, KONTROLLOK (μ l)	TISZTÍTOT T MINTÁK (μ l)
Kalibrátorok (0-5)	-	25	-	-
Minták, kontrollok	-	-	25	-
Tisztított minták	-	-	-	50
Tracer	500	500	500	500
Inkubáció	3 órán keresztül 37°C-on			
Folyadék eltávolítása	-	Aspirer		
Hígított mosóoldat		3,0 ml		
Folyadék eltávolítása		aspirar		
Mérés	Radioaktivitás mérése 60 másodpercig			



ru

Тщательно ознакомиться перед использованием.

17 α -ГИДРОКСИПРОГЕСТЕРОН (17-ОНР)-RL

I. ПРЕДПОЛАГАЕМОЕ ИСПОЛЬЗОВАНИЕ

Радиоиммунологический анализ *in vitro* для количественного определения 17 α -гидроксипрогестерона (17-ОНР) в образцах человеческой сыворотки и плазмы.

II. ОБЩАЯ ИНФОРМАЦИЯ

- A. Патентованное название:** DIAsource 17 α -HYDROXYPROGESTERONE (17-ОНР)-RIA-CT Kit (17 α -ГИДРОКСИПРОГЕСТЕРОН (17-ОНР)-RIA-CT производства DIAsource в комплекте)
- B. Номер по каталогу:** KIP1409 : 96 тестов
- C. Изготовитель:** DIAsource ImmunoAssays S.A.
Rue du Bosquet, 2, B-1348 Louvain-la-Neuve, Belgium.

**За технической консультацией или по оформлению заказа обращаться:
Тел: +32 (0) 10 84.99.11 Факс: +32 (0) 10 84.99.91**

III. КЛИНИЧЕСКАЯ КАРТИНА

A Биологическая активность 17-гидроксипрогестерона

17 α -гидроксипрогестерон (17-ОНР) является стероидным гормоном C-21(молекулярный вес 330.3), вырабатываемым из 17 α -гидроксипрогестерона в надпочечниках, а также в яичниках, яичках и плаценте. 17-ОНР гидроксилируется в позиции 11 и 21 для выработки кортизола через 11-деоксикортизол.

B. Анализ клинических применений 17 α -гидроксипрогестерона

Как правило, количество 17-ОНР сыворотки или околоплодной жидкости соотносится с диагностикой врожденной гиперплазии надпочечников (ВГН). Такой ВГН возникает из специфической ферментопатии (описано шесть явных случаев дефицита фермента). Как результат недостаточности уровень АКТГА увеличивается, возникает гиперплазия надпочечников и повышение множества стероидных прекурсоров. Также интересно было бы выяснить уровень 17-ОНР у пациентов с варикоцеле (17-ОНР и тестостерон представляют маркеры функции грандулоцита яичка) и у пожилых мужчин для выявления доброкачественной гипертрофии предстательной железы (ДГПЖ) и карциномы простаты (КПЖ) (17-ОНР плазмы значительно ниже в КПЖ и ДГПЖ, чем у обычного мужчины).

Существуют другие домены для анализа 17-ОНР: бесплодие у мужчин, девочки с перипубертальной андрогенизацией, дети с преждевременной активизацией функции надпочечной железы (в таких случаях показатели 17-ОНР увеличиваются без или после АКТГ-стимулирования).

IV. НА ЧЕМ ОСНОВАН МЕТОД

Точное количество меченного стероида ^{125}I конкурентно взаимодействует с измеряемым стероидом, присутствующим в образце либо в калибраторе. Известное количество антител локализовано и иммобилизовано на стенках полистироловой пробирки. Из-за высокой специфичности окрашенных антител необходимость в экстракции либо хроматографии отсутствует. Через 3 часа инкубации при $T\ 37^\circ\text{C}$ наступает аспирационная фаза, и конкурирующая реакция прекращается. Затем пробирки промываются 3 мл моющего раствора и продуваются воздухом. Составляется градуировочная кривая, и определяются концентрации 17-ОНР в образцах интерполяцией дозы на градуировочной кривой.

V. РЕАГЕНТЫ В КОМПЛЕКТЕ

Реагенты	Комплект на 96 тестов	Раствор для разбавления			
Пробирки с анти 17-ОНР покрытием	2 x 48	Готово к использованию			
<table border="1" style="margin-left: 20px;"> <tr> <td>Ag</td> <td>^{125}I</td> </tr> </table> <p>ИНДИКАТОР: 17-ОНР (уровень ЖХВД) с йодной меткой ^{125}I в фосфатном/ лимоннокислом буферном растворе с бычьим казеином и солью азотоводородной кислоты (<0.1%)</p>	Ag	^{125}I	1 флакон 55 мл 190 кБк	Готово к использованию	
Ag	^{125}I				
<table border="1" style="margin-left: 20px;"> <tr> <td>КАЛ</td> <td>0</td> </tr> </table> <p>Нулевой калибратор в сыворотке человека и соли азотоводородной кислоты (0.5%)</p>	КАЛ	0	1 флакон 3 мл	Готово к использованию	
КАЛ	0				
<table border="1" style="margin-left: 20px;"> <tr> <td>КАЛ</td> <td>№</td> </tr> </table> <p>Калибраторы 17-ОНР N = 1 - 5 (см. точный объем на этикетке флакона) в сыворотке человека и соли азотоводородной кислоты (0.5%)</p>	КАЛ	№	5 флаконов 0,5 мл	Готово к использованию	
КАЛ	№				
<table border="1" style="margin-left: 20px;"> <tr> <td>ПРОМЫ В.</td> <td>РАСТВОР</td> <td>КОНЦН ТРТ.</td> </tr> </table> <p>Промывочный раствор (Трис HCl)</p>	ПРОМЫ В.	РАСТВОР	КОНЦН ТРТ.	1 флакон 10 мл	Растворить 70 x дистиллированной водой (использовать магнитный смеситель)
ПРОМЫ В.	РАСТВОР	КОНЦН ТРТ.			
<table border="1" style="margin-left: 20px;"> <tr> <td>КОНТРОЛ</td> <td>№</td> </tr> </table> <p>Контрольный образец - N = 1 или 2 в человеческой плазме и тимоле</p>	КОНТРОЛ	№	2 флакона лиофилизировано	Добавить 0,5 мл дистиллированной воды	
КОНТРОЛ	№				

Примечания: Для разведения образца использовать нулевой калибровочный маркер.

VI. ДОПОЛНИТЕЛЬНЫЕ МАТЕРИАЛЫ И РЕАГЕНТЫ

Необходимы следующие материалы, отсутствующие в комплекте поставки:

1. Дистиллированная вода
 2. Пипетки для отмеривания: 25 μl , 500 μl и 3 мл (рекомендуется использовать мерные пипетки со съёмными пластиковыми наконечниками)
 3. Вортекс-миксер
 4. Магнитный смеситель
 5. Водяная баня 37°C
 6. Шприц-автомат 5 мл (тип "корнуол") для промывки
 7. Аспирационная система (любая)
 8. Любой гамма-счетчик с чувствительностью до 1251 (мин. производительность 70%).
 9. Инкубатор 37°C
- Дополнительно (для экстракции)**
10. Дистилловый эфир (аналитическая степень чистоты > 98%)
 11. Одноразовые стеклянные пробирки (12 x 75 мм) с пробками.
 12. Растворитель DIAsource Reconstitution Solution для (17-ОНР)-RIA-CT. номер: 32.140.74.

VII. ПОДГОТОВКА РЕАГЕНТА

- Контрольные образцы:** Разбавить контрольные вещества в 0,5 мл дистиллированной воды.
- Работа с растворами:** Приготовить достаточный объем рабочего раствора, добавив 69 объемов дистиллированной воды к 1 объему промывочного раствора (70x). Использовать магнитный смеситель для смешивания. Рабочую промывочную жидкость в конце для слить.

VIII. СРОК ГОДНОСТИ И ХРАНЕНИЯ РЕАГЕНТОВ

- В закупоренном исходном состоянии все компоненты в комплекте стабильны до завершения срока годности, указанного на этикетке, при условии хранения от 2 до 8°C .
- После разбавления контрольные вещества сохраняют стабильность в течение недели при условии хранения при T от 2 до 8°C . Для сохранения на более длительный период следует обеспечить аликвоты. Хранить при -20°C в течение 3 месяцев.
- Свежеприготовленный рабочий раствор для промывки следует использовать в тот же день.
- После первого использования маркер остается стабильным до истечения срока годности при условии хранения в оригинальном герметичном флаконе при T от 2 до 8°C .
- Физические изменения внешнего вида реагентов могут указывать на нестабильность или разрушение.

IX. СБОР И ПРИГОТОВЛЕНИЕ ОБРАЗЦОВ

- Образцы сыворотки или плазмы хранить при $T\ 2-8^\circ\text{C}$.
- Если тест в течение 48 часов не осуществлялся, рекомендовано хранить при $T\ -20^\circ\text{C}$.
- Избегать последующих циклов размораживания и замораживания.
- Гепаринизированная плазма обеспечивает на 10% более низкий результат по сравнению с сывороткой:
 Y (геп. плазма) = $0,9 \times$ (сыворотка) + $0,20$ $r = 0,92$ $n = 20$
- Плазма с ЭДТА обеспечивает на 10% более низкий результат по сравнению с сывороткой:
 Y (плазма с ЭДТА) = $0,9 \times$ (сыворотка) + $0,18$ $r = 0,87$ $n = 20$

X. ПОРЯДОК ДЕЙСТВИЙ

- Обращение**
Запрещается использовать компоненты в комплекте после истечения срока годности.
Запрещается смешивать материалы из разных комплектов поставки. До начала пользования довести температуру реагентов до комнатной. Тщательно перемешать все реагенты и образцы умеренным взбалтыванием.
Использовать чистую пипетку с одноразовым наконечником для добавления любого из реагентов и образцов. Избегать загрязнения исходных материалов. Для большей точности рекомендуется использовать высокоточные пипетки или автоматизированное капельное оборудование.
Соблюдать инкубационный период.
Подготовить градуировочную кривую для каждого сеанса. Не допускается использование данных предыдущего сеанса.

B. Отбор образцов от новорожденных (дополнительно) – НА ОБРАЗЕЦ СЫВОРОТКИ

1. Маркировать стеклянные пробирки по одной на каждый образец (**не изымать калибраторы или контрольные маркеры**).
 2. Отмерить пипеткой 75 μl сыворотки, а затем 2,25 мл диэтилового эфира.
 3. Сильно взболтать все пробирки (2 x 1 минута)
 4. Оставить в покое на 5 минут
 5. Поместить пробирки в холод -20°C для заморозки водной фазы.
 6. Подготовить следующую серию стеклянных пробирок и, для каждого образца, поместить органическую фазу в эти новые пробирки. Избегать засорения водной фазой.
 7. Выпарить органическую фазу (эфир) полностью под воздушной струей, либо поместив пробирки в водяную баню 37°C . Манипуляции выполнять под вытяжкой.
 8. Растворить сухой эфирный экстракт растворителем 150 μl (**отсутствует в комплектации, см VI**). Сильно взбалтывать в течение 1 минуты.
 9. Оставить в покое на 10-15 минут и снова взболтать в течение 1 минуты. Таких объемов достаточно для контрольного повтора анализа.
- C. Порядок действий

1. Пометить окрашенные пробирки контрольного повтора для каждого калибратора, образца и контрольного маркера. Для общего подсчета маркировать 2 обычные пробирки
2. Встряхнуть калибраторы, образцы и контрольные маркеры, и поместить 25µl каждого в соответствующую пробирку. **Для отобранных образцов от новорожденных использовать пипетку 50 µl вместо 25 µl.**
3. Развести 0,5 мл 17-ОНР с йодным числом ¹²⁵ в каждой пробирке, включая неокрашенные, для общего подсчета.
4. Умеренно встряхнуть штатив с пробирками вручную для удаления пузырьков воздуха.
5. Поместить в инкубатор на 3 часа при T 37°C.
6. Продуть воздухом (или осушить) содержимое каждой пробирки (за исключением суммарного подсчета). Убедиться, что пластиковый наконечник аспиратора достигает донца окрашенной пробирки, и вся жидкость удалена.
7. Промыть пробирки 3 мл рабочего промывочного раствора (за исключением суммарного подсчета) и продуть (либо осушить). Избегать вспенивания при добавлении рабочего промывочного раствора.
8. Оставить пробирки в вертикальном положении на две минуты. Затем продуть оставшуюся влагу.
9. Осуществить подсчет в пробирках гамма-счетчиком в течение 60 секунд.

XI. ПОДСЧЕТ РЕЗУЛЬТАТА

1. Рассчитать средний показатель контрольного анализа.
2. Рассчитать связанную радиоактивность как процентное соотношение связывающего, выявленного в точке нулевой калибровки (0), по следующей формуле:

$$B/B_0(\%) = \frac{\text{Counts (Calibrator or sample)}}{\text{Counts (Zero Calibrator)}} \times 100$$

3. Используя 3-цикличную полулогарифмическую или разлинованную бумагу для логит-модели, составить показатели (B/B₀(%)) для каждой точки калибровки в виде функции концентрации 17-ОНР в каждой точке калибровки, игнорируя посторонние величины.
4. Для составления градуировочной кривой допускается использование автоматизированных методов. Если используется автоматическая обработка результатов, рекомендуется воспользоваться 4-параметрическим логистическим способом припасовывания кривой.
5. Интерполяцией значений образца (B/B₀(%)) определить концентрации 17-ОНР в образце, начиная с референтной кривой.
6. Полученные значения концентраций для новых экстрагированных образцов (см. X.B.) можно считать непосредственно с кривой (необходимость в поправочном коэффициенте отсутствует).
7. По каждому анализу необходимо проверить процентное соотношение общего маркера, связанного при отсутствии немаркированного 17-ОНР (B₀/T).

XII. ТИПОВЫЕ ДАННЫЕ

Следующие данные, полученные с помощью маркера 6-недельной давности, представлены исключительно для иллюстрации. Не допускается их использование когда-либо вместо градуировочной кривой, отображающей реальное время.

(17-ОНР)-RIA-CT		ц/мин.	B/B ₀ (%)
Общий счет		32363	
Калибратор	0,00	12596	100,0
нг/мл		9769	77,6
	0,17 нг/мл	6529	51,8
	0,59 нг/мл	3752	29,8
	1,4 нг/мл	1396	11,1
	4,3 нг/мл	479	3,8
	14,0 нг/мл		

XIII. ХАРАКТЕРИСТИКИ И ОГРАНИЧЕНИЯ

A. Чувствительность

LoB (предел бланка) тестировали путем измерения 20-кратного значения бланка и рассчитывали как среднее значение ± 2 стандартного отклонения распределения тестовых значений. LoB был рассчитан как 0,03 нг/мл.

LoD (предел обнаружения) рассчитывали как стандартное отклонение LoB ± 1.645 для образца с низкой концентрацией, измеренное в 10 различных тестах.

LoD был рассчитан на уровне 0,09 нг/мл.

LoQ (предел количественного определения) рассчитывали путем тестирования 4 образцов с низкой концентрацией в 10 различных анализах.

LoQ был рассчитан на уровне 0,14 нг/мл.

B. Специфичность

Специфичность определялась по пиковой выборке из образцов 17-ОНР (± 0,5 нг/мл) со стероидами, которые должны присутствовать в пациентских образцах.

Соединение	Добавленное количество (нг/мл)	Перекрестная реактивность (%)
17α-гидроксипрогестерон	-	100
Прогестерон	500	0,7
17α-гидроксипрегненолон	1000	0,3
21-дезоксикортизол	1000	1,07
Прегненолон	500	0,02
11-дезоксикортизол	500	0,21
Кортикостерон	1000	0,008
11-дезоксикортикостерон	500	0,24
Кортизол	5000	0,005
Тестостерон	5000	0,004
Андростендион	5000	0,01
Эстрадиол	1000	0,008
17α-гидроксипрегненолона сульфат	5000	0,34

Исследовалось воздействие потенциально интерферирующих веществ в образцах с помощью DIAsource 17ОНР-RIA-CT. Тестировались различные уровни гемоглобина, билирубинов, триглицерида и билирубина конъюгата в образцах сыворотки с различной концентрацией 17α-гидроксипрогестерона. Приемлемым критерием считалась интерференция менее 10%. Тестируемые вещества никак не влияли на характеристики DIAsource 17ОНР-RIA-CT.

Вещество	17ОНР (нг/мл)	Концентрация интерферента (мг/дл)	Средний отклонения
Гемоглобин	0,57	250	98.6%
		500	
		250	
Связанный билирубин	1,8	50	95.1%
		50	
		50	
Не связанный билирубин	0,57	50	99.2%
		100	
		50	
Триглицерид	0,57	50	97.0%
		100	
		250	
		500	
		1000	
		50	
	1,54	100	
		250	
		500	
		1000	

C. Точность

ВНУТРИАНАЛИТИЧЕСКАЯ

ВНУТРИАНАЛИТИЧЕСКАЯ

ПОСЛЕ ЭКСТРАКЦИИ

Сыворотка	№	<X> ± Ст.О. (нг/мл)	К.В. (%)	Сыворотка	№	<X> ± Ст.О. (нг/мл)	К.В. (%)
A	20	0.73 ± 0.05	6,8	C	24	0.56 ± 0.06	10,7
B	20	1.94 ± 0.09	4,6	D	24	1.81 ± 0.17	9,4

С.О.: Стандартное отклонение; К.В.: Коэффициент вариации

**МЕЖАНАЛИТИЧЕСКАЯ
МЕЖАНАЛИТИЧЕСКАЯ ПОСЛЕ ЭКСТРАКЦИИ**

Сыворотка	№	<X> ± Ст.О. (нг/мл)	К.В. (%)	Сыворотка	№	<X> ± Ст.О. (нг/мл)	К.В. (%)
A	12	0.69 ± 0.06	8,7	A	8	0.72 ± 0.13	18
B	12	2.08 ± 0.16	7,6	B	8	2.03 ± 0.39	19,2

С.О.: Стандартное отклонение; К.В.: Коэффициент вариации

D. Точность

ПРОБА НА РАЗБАВЛЕНИЕ

Сыворотка	Разбавление	Теоретич. концентр. (нг/мл)	Измеренная концентр. (нг/мл)
	1/1	-	3,3
	1/2	1,65	1,79
	1/4	0,83	1,0
	1/8	0,42	0,5
	1/16	0,21	0,27

Образцы разводились нулевым калибратором.

ТЕСТ НА ВОССТАНОВЛЕНИЕ

Образец	добавленный 17-ОНР (нг/мл)	Восстановленный 17-ОНР (нг/мл)	Восстановленный (%)
1	6	5,7	95
	3	2,99	99
	1,5	1,64	109
	0,75	0,81	108
2	6	5,27	87
	3	2,86	95
	1,5	1,49	99
	0,75	0,74	98

Коэффициент преобразования:

Из нг/мл в нмоль/л: x 3.03

Из нмоль/л в нг/мл: x 0.33

Насколько известно, какие-либо референтные материалы для этого параметра отсутствуют.

E. Задержка между временем последнего калибратора и разбавлением образца

Как показано ниже, результаты исследования остаются точными, даже когда образец разбавлялся через 40 минут после добавления калибратора в окрашенные пробирки.

ЗАДЕРЖКА

Образец (нг/мл)	0'	10'	30'	40'
Образец 1	0,63	0,65	0,73	0,74
Образец 2	2,03	2,4	2,37	2,2

F. Ограничения по образцам от новорожденного

У младенцев (< 3 месяцев) обнаружены высокие уровни сульфата 17 α -гидроксипрегненолона. Независимо от того, что с этой молекулой какие-либо перекрестные реакции отсутствуют, мы рекомендуем применить процедуру экстракции (X. В.)

XIV. ВНУТРЕННИЙ КОНТРОЛЬ КАЧЕСТВА

- Процентное соотношение общего маркера, связанного при отсутствии немаркированного 17-ОНР (В0/Т) должно быть > 25%.
- Если результаты, полученные по контрольному образцу 1 и/или 2 находятся за пределами указаний на этикетке, тогда, если отсутствует

удовлетворительное объяснение, такие результаты использовать не допускается.

- Каждая лаборатория может создать собственный комплект контрольных образцов, которые следует хранить в аликвотах замороженными. Не допускается заморозка с последующими циклами разморозки и заморозки.
- Критерием приемлемого на случай расхождений между контрольными результатами по образцам следует считать усредненную лабораторную практику.

XV. РЕФЕРЕНТНЫЕ ИНТЕРВАЛЫ

Показатели предлагаются исключительно в виде руководства. Каждая лаборатория должна самостоятельно установить свой собственный ряд показателей.

	Интервал концентрации (2,5 - 97,5% перцентилей) (нг/мл)	Количество субъектов
Обычные мужчины	0.67 – 3.32	79
Обычные женщины	. Фолликулярная фаза	50
	. Лютеиновая фаза	28
Беременность	. Первый триместр	30
	. Второй триместр	30
	. Третий триместр	15
Младенцы (после экстракции)	0.34 – 1.96	23 (0 - 3 месяца)

XVI. ПРЕДУПРЕЖДЕНИЯ И МЕРЫ ПРЕДОСТОРОЖНОСТИ

Меры безопасности

Только для диагностики in vitro. В одном комплекте ¹²⁵I (период полураспада: 60 дней), активная ионизирующая X (28 keV) и γ (35.5 keV) радиация.

К обращению с этим радиоактивным продуктом допускаются только уполномоченные лица. Приобретение, хранение, пользование и обмен радиоактивных продуктов осуществляется в рамках законодательства страны пользователя. Продукт запрещено применять на людях и животных. Обращение с радиоактивным продуктом осуществляется только в специально подготовленных местах в стороне от оживленных участков деятельности. Лаборатория обязана вести журнал регистрации выдачи и хранения радиоактивных материалов. Загрязненное радиоактивными веществами лабораторное оборудование и стеклянную посуду следует содержать отдельно во избежание перекрестного загрязнения различными радиоизотопами.

Любые утечки радиоактивных веществ должны быть немедленно устранены согласно мерам безопасности по обращению с радиоактивными веществами. Утилизация радиоактивных отходов осуществляется согласно местным предписаниям и указаниям лиц, отвечающих за лабораторию. Соблюдение основных правил безопасности по обращению с радиоактивными веществами обеспечивает должный уровень защиты.

Компоненты человеческой крови, включенные в комплект, тестированы согласно утвержденным европейским методам и/или методике Управления по контролю за продуктами и лекарствами FDA. Они признаны негативными для HbsAg, анти-HCV, анти-HIV-1 и 2. Ни один из известных методов не может гарантировать, что производные человеческой крови не переносят гепатит, СПИД или иные инфекции. Таким образом, с образцами реагента, сыворотки или плазмы следует обращаться согласно местным правилам техники безопасности.

Все продукты животного происхождения отбирались только от здоровых животных. Бычьи компоненты отбираются в странах, где ТГЭ не замечена. Однако компоненты с содержанием животных образцов следует рассматривать как потенциально контагиозные.

Избегать контакта участков оголенной кожи с реагентами (азид натрия в качестве антисептика). Азид в комплекте может реагировать со свинцом и медью на plombировке и, таким образом, создавать взрывоопасные азиды металлов. На этапе промывки раковину следует обильно промывать большим количеством воды во избежание отложения азидов на стенках.

Запрещается курить, пить, принимать пищу или накладывать косметику на рабочем месте. Запрещается осуществлять дозировку ртом. Пользоваться защитной одеждой и одноразовыми перчатками.

XVII. СПИСОК ИСПОЛЬЗОВАННОЙ ЛИТЕРАТУРЫ

1. ANDO S. et al (1983)
Plasma levels of 17OHprogesterone and testosterone in patients with varicoceles.
Acta Endocrinologica, 102,463469.
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, 664670.
3. CACCIARE 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. GRANOFF A. et al (1985)
17hydroxyprogesterone responses to adrenocorticotropin in children with premature adrenance.
Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism, 3, 409415.
6. NEW M. 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 (Copenh.) 115, 413418.

XVIII. СВОДКА ПО ПРОТОКОЛУ

	ОБЩИ Й СЧЁТ µl	КАЛИ БРАТ ОРЫ µl	КОНТРО ЛЬН ЫЙ ОБРАЗ ЕЦ µl	ОБРАЗЕЦ (ОБРАЗЦ Ы) µl
Калибраторы (0 -5)	-	25	-	-
Образцы, контрольные образцы	-	-	25	-
Выделенные образцы	-	-	-	50
Маркер	500	500	500	500
Инкубация	3 часа при T 37°C.			
Сепарация Рабочий промывочный раствор: Сепарация	-	продуть 3,0 мл тщательно продуть воздухом		
Подсчет	Считать пробирки 60 секунд			

DIAsource 17OH RIA [체외진단의료기기]

1. 제품개요

번호	항 목	내 용
1	품목명	내분비물질검사시약
2	제품명	DIAsource 17OH RIA
3	허가번호	수인 15-280 호
4	사용목적	사람의 혈청과 혈장 내 17- α -OH hydroxyprogesterone (17OH) 정량 측정
5	포장단위	96 테스트/키트
6	저장방법	2-8°C, 제조일로부터 70일
7	사용기한	2-8°C, 제조일로부터 70일

2. 측정원리

고정된 양의 ¹²⁵I 표지 steroid가 플라스틱 시험관 아래 내부에 고착시킨 고정된 양의 특이 항체 부위에 대해 검체나 표준용액 내의 측정할 steroid와 경합 반응을 한다. 피복 항체의 높은 특이도 때문에 추출이나 chromatography가 요구되지 않는다. 37°C에서 3시간동안 배양한 후, 흡입 단계가 경합반응을 중지시킨다. 그런 후 시험관을 세척액 3ml로 세척하고 흡입한다. 표준곡선이 작성되고 검체의 17OH 농도는 표준곡선의 내삽으로부터 결정된다.

3. 제공되는 시약

번호	명칭	구성
1	Coated tube	2 X 48
2	Tracer ¹²⁵ I labelled 17-OHP	1 vial, 55ml
3	Calibrator 0	1 vial, 3ml
4	Calibrator 1-5	5 vials, 0.5ml/vial
5	Control I, II	2 vials, 동결건조
6	Wash Solution	1 vial, 10ml

4. 측정방법

- 검체 준비
 - 혈청 또는 혈장을 2~8°C에 보관한다.
 - 측정이 48시간 안에 이루어지지 않는다면 혈청과 혈장 검체는 -20°C에 저장해야 한다.
 - 반복적인 냉,해동은 피한다.
- 시약조제
 - 정도관리 용액: 0.5ml의 증류수로 재구성한다.
 - 세척액: 70배로 희석한다. 균질화하기 위해 마그네틱 교반기를 이용한다.
- 검사방법 (*자동화 장비 : Gamma Pro)
 - 각 재구성 한 표준용액, 정도관리 용액, 트래이서를 pipeting stage에 준비한다.
 - 검체를 25ul 씩 준비하여 시험관 랙에 준비한다.
 - 25ul의 표준용액, 정도관리용액, 트래이서 0.5ml를 차례대로 니들이 흡입한 후, 검체가 든 시험관에 분주한다. 준비된 시험관에 차례대로 분주한다.
 - 분주가 끝난 시험관은 incubation stage로 옮겨져 3시간동안 37°C에서 반응된다.
 - 반응이 끝난 후 rinsing stage로 옮겨져 3ml의 세척액으로 시험관이 세척되고 모두 흡입단계까지 이루어진다.
 - 시험관이 detection stage로 옮겨져 detector로 60초간 시험관의 결과 값을 읽어낸다.
- 결과 판정
 - 자료정리
 - 중복 측정값의 평균값을 구한다.
 - 17OH-Progesterone 농도에 대한 각각의 표준용액에서 얻어진 cpm으로 3 cycle semi logarithmic 또는 logit-log 그래프에 표준곡선을 그린다.
 - 각 정도관리용액과 검체에 대해서 표준곡선에 삽입함으로써 농도를 판독한다.

(2) 참고치

구분	범위(2.5~97.5%) (ng/ml)	n
정상 남성	0.67 - 3.32	79
정상 여성	0.41 - 2.27	
- 난포기	0.23 - 3.87	50
- 황체기	2.60 - 7.95	28
임신 :	1.83 - 9.74	30
- 첫번째 3분기	3.54 - 18.97	30
		15

- 두번째 3분기	0.34 - 1.96	23 (0~3개월)
- 세번째 3분기		
신생아 (출산 후)		

5. 완제품 시험규격

- 외관검사
 - 제조원의 품질관리표준지침서(문서번호 POCQ075)에 따라 시험하고, 확인양식(문서번호 FTPK004)에 기입하고 확인한다.
 - 문서번호 ITPKIP1409에 기입된 대로 구성품이 일치하는지 확인한다
 - 제품 구성표의 lot와 키트안의 구성품이 일치하는지 확인
 - 구성품과 키트의 유효기간을 확인
 - 구성품의 라벨상태를 확인
 - 구성품의 포장상태를 확인(용량, 물질 등)
 - 서류가 맞게 있는지 확인(사용설명서, 품질서류 등)
 - 박스에 라벨이 정확히 부착되어 있는지 확인
 - 검사 후 담당자는 확인양식(FTPK004)에 기입하고 서명한다.
- 성능시험
 - 제조원의 품질관리 표준지침서(문서번호 POCQ006)에 따라 시험한다.
 - 총 계수는 허용범위 (70,000-85,000 cpm) 내에 있어야 한다
 - 표준용액 0의 결합률은 허용범위내에 있어야 한다(18.2-44.6%)
 - 표준용액 1의 결합률은 허용범위내에 있어야 한다 (71.8-86.2%)
 - 표준용액 5의 결합률은 허용범위내에 있어야 한다 (2.7-6.3%)
 - 키트 정도관리용액에서 얻어진 값이 허용범위 내에 있어야 한다

control I	0.7-1.30 ng/ml
control II	1.40-2.60 ng/ml
 - 표준물질은 허용범위 내에 있어야 한다

Calibrator 1	: 0.11-0.20 ng/ml
Calibrator 2	: 0.35-0.65 ng/ml
Calibrator 3	: 1.10-2.0 ng/ml
Calibrator 4	: 3.50-6.50 ng/ml
Calibrator 5	: 10.5-19.5 ng/ml
- 비고 : 각 로트의 허용범위는 방사면역 측정을 위한 표준지침서(문서번호 CACQKIP 1409)에 기록되어 있다.
(허용범위는 평균값의 $\pm 3SD$ 를 기준으로 측정된다)
- 사용시 주의사항
 - 체외진단용으로만 사용하여야 하며, 체외진단용 이외 흡입이나 체내 투여 등을 금지한다.
 - 동 제품에 포함된 방사성동위원소 취급 시 다음 사항을 준수하여야 한다.
 - 방사성동위원소는 지정된 장소에 보관하며, 관련 법령에 따라 자격을 갖춘자가 지정된 장소에서 사용한다.
 - 방사성동위원소를 취급할 때 안전에 영향을 주는 불필요한 행동을 하지 않는다. (예, 음식 섭취, 흡연, 화장 등)
 - 방사성동위원소를 포함한 시약을 분주해야 하는 경우, 입으로 파이펫팅 하지 않는다.
 - 방사성동위원소를 취급할 때에는 장갑 및 실험복을 착용하며, 검사가 완료되면 손을 깨끗이 닦는다.
 - 유출된 모든 물질은 즉시 닦아 낸 후 폐기 또는 취급에 관련된 소관 법령에 따라 처리하여야 하며, 방사성 물질의 오염이나 방사성 물질 등의 분실은 관련 법령에 정한 규정된 절차에 따라 처리한다.
 - 검사를 실시하기 전에 모든 제품(구성품 포함)은 해당 제품별 검사 온도 조건에 따라 실시한다.
 - 그밖에 방사성동위원소의 보관, 이동, 사용 및 폐기 등 취급에 관한 사항은 관련 법규 또는 규정에 따른다.
 - 본 kit 내의 혈액성분은 시험을 거쳤고, HbsAg, 항HIV 1와 항 HIV 2에 대한 반응은 없었다. 알려져 있는 어떠한 방법으로도 간염, AIDS, 감염성혈액 성분 같은 감염성 물질의 부재를 확인시킬 수 없다 그러므로 시약과 환자 검체의 취급은 병원내의 안전절차에 따라야 한다.
 - 시약이 피부에 접촉되지 않게 하라(요오드화나트륨 방부제). 본 kit 내의 요오드화합물은 배관계통의 납과 구리와 반응하여 큰 폭발성을 가진 요오드화합물로 변화할 수 있다. 세척 단계에서 요오드화합물의 생성을 막기 위해 흐르는 물로 배수관을 씻어 내도록 한다.
 - 방사성물질의 취득과 저장에 대한 일지는 실험실 내에 보관되어야 한다. 방사성 물질로 오염될 수 있는 서로 다른 방사성물질에 의한 교차 오염을 예방하기 위해 실험실 기구와 유리제품은 서로 분리 되어져야 한다.
 - 방사성 물질이 쏟아진 경우에는 방사선안전 절차에 따라 즉시 제염하여야 한다. 방사성 폐기물은 특정 규정과 실험실의 관할권을 가지고 있는 신고당국의 지침에 따라 처리되어 야만 한다. 방사선안전에 대한 기본 규칙의 준수는 충분한 방호를 제공한다.

DIAsource 17OH RIA [체외진단의료기기]

Pred použitím si prečítajte celý protokol.

17 α -HYDROXYPROGESTERÓN (17-OHP)-RIA-CT

I. ZAMÝŠĽANÉ POUŽITIE

Rádioimunoanalýza pre kvantitatívne zmeranie *in vitro* humánneho 17 α -hydroxyprogesterónu (17-OHP) v sére a plazme.

II. VŠEOBECNÉ INFORMÁCIE

- A. **Obchodný názov:** DIAsource 17 α -HYDROXYPROGESTERONE (17-OHP)-RIA-CT Kit
- B. **Katalógové číslo:** KIP1409: 96 testov
- C. **Výrobca:** DIAsource ImmunoAssays S.A.
Rue du Bosquet, 2, B-1348 Louvain-la-Neuve, Belgicko.

V prípade potreby technickej pomoci alebo informácií pre objednávku sa obráťte na:

Tel.: +32 (0) 10 84.99.11

Fax: +32 (0) 10 84.99.91

III. KLINICKÉ POZADIE

A. *Biologické činnosti 17-hydroxyprogesterónu*

17 α -hydroxyprogesterón (17-OHP) je C-21 steroidný hormón (molekulárna hmotnosť 330,3), ktorý sa produkuje z 17 α -hydroxypregnenolónu v nadobličkách a vo vaječníkoch, semenníkoch a placentе. 17-OHP je hydroxylovaný na pozíciách 11 a 21 s cieľom produkovať kortizol prostredníctvom 11-deoxykortizolu.

B. *Klinické aplikácie stanovenia 17 α -hydroxyprogesterónu*

Hladiny 17-OHP v séru alebo plodovej vode sú spravidla relevantné pre diagnostiku kongenitálnej adrenálnej hyperplázie (CAH). Túto CAH spôsobuje porucha špecifického enzýmu (bolo opísaných šesť rôznych enzymatických porúch). V dôsledku týchto porúch ACTH narastá a spôsobuje adrenálnu hyperpláziu a nárast mnohých steroidných prekursorov. Je však veľmi zaujímavé poznať hodnotu 17-OHP u pacientov s varikokélou. (17-OHP a testosterón predstavujú markery funkcie Leydigových buniek) a u starších mužských pacientov na detekciu benígnej hypertrofie prostaty (BPH) a karcinómu prostaty (PCA) (plazma 17-OHP je výrazne nižšia v skupinách PCA a BPH ako u normálnych mužov).

Existujú aj iné oblasti výskumu 17-OHP, ako napríklad: mužská neplodnosť, dievčatá s peripubertálnou virilizáciou, deti s predčasnou pubertou (v takýchto prípadoch sa hodnoty 17-OHP zvyšujú bez alebo po stimulácii ACTH).

IV. PRINCÍP METÓDY

Stanovené množstvo steroidu s označením 125I konkuruje steroidu, ktorého prítomnosť sa má merať vo vzorke alebo v kalibrátore pre stanovené množstvo protilátok imobilizovaných na stenu polystyrénovej skúmavky. Nevyžaduje sa ani extrakcia, ani chromatografia z dôvodu vysokej špecifickosti potiahnutých protilátok. Po 3 hodinách inkubácie pri teplote 37 °C sa konkurenčná reakcia ukončí aspiráciou. Skúmavky sa potom premyjú 3 ml premývacím roztokom a odsajú. Zostrojí sa kalibračná krivka a stanovia sa koncentrácie 17-OHP vo vzorkách interpoláciou dávky z kalibračnej krivky.

V. DODÁVANÉ ČINIDLÁ

Činidlá	Sada 96 testov	Obnova			
Skúmavky značené s anti 17-OHP	2 x 48	Pripravené na použitie			
<table border="1"> <tr> <td>Ag</td> <td>¹²⁵I</td> </tr> </table> <p>STOPOVACIA LÁTKA: 17-OHP s označením jódu-¹²⁵ (stupeň HPLC) v pufrí s hovädzím kazeínom a azidom (< 0,1 %)</p>	Ag	¹²⁵ I	1 ampulka 55 ml 190 kBq	Pripravené na použitie	
Ag	¹²⁵ I				
<table border="1"> <tr> <td>CAL</td> <td>0</td> </tr> </table> <p>Nulovací kalibrátor v humánnom sére a azide (0,5 %)</p>	CAL	0	1 ampulka 3 ml	Pripravené na použitie	
CAL	0				
<table border="1"> <tr> <td>CAL</td> <td>N</td> </tr> </table> <p>Kalibrátory 17-OHP</p> <p>N = 1 až 5 (pozri presné hodnoty na štítkoch ampuliek) v humánnom sére a azide (0,5 %)</p>	CAL	N	5 ampuliek 0,5 ml	Pripravené na použitie	
CAL	N				
<table border="1"> <tr> <td>WASH</td> <td>SOLN</td> <td>CONC</td> </tr> </table> <p>Premývací roztok (TRIS-HCl)</p>	WASH	SOLN	CONC	1 ampulka 10 ml	Rozriedte 70 x destilovanou vodou (použitie magnetické miešadlo).
WASH	SOLN	CONC			
<table border="1"> <tr> <td>CONTROL</td> <td>N</td> </tr> </table> <p>Kontrolné séra – N = 1 alebo 2 v humánnej plazme a tymole</p>	CONTROL	N	2 ampulky lyofilizované	Pridajte 0,5 ml destilovanej vody	
CONTROL	N				

Pozn.: Na riedenie vzoriek použite nulovací kalibrátor.

VI. NEDODÁVANÝ MATERIÁL

Tento materiál je potrebný, avšak nedodáva sa so sadou:

- Destilovaná voda
- Pipety na dávkovanie: 25 µl, 500 µl a 3 ml (odporúča sa používať presné pipety s jednorázovými plastovými špičkami)
- Odstredivka
- Magnetické miešadlo
- Vodný kúpeľ s teplotou 37°C
- 5 ml automatická striekačka (typu Cornwall) na premývanie
- Odsávací systém (voliteľné)
- Môže sa použiť akýkoľvek merač žiarenia gama schopný merať 125I (minimálny výnos 70 %).
- Inkubátor s teplotou 37°C
- Voliteľné (na extrakciu)**
- Dietyléter (analyticky čistý; čistota > 98 %)
- Jednorázové sklené skúmavky (12 x 75 mm), so zátkami.
- Roztok na obnovu DIASource pre (17-OHP)-RIA-CT. ref.: 32.140.74.

VII. PRÍPRAVA ČINIDLA

- Kontrolné séra:** Rozpusťte kontrolné séra s 0,5 ml destilovanej vody.
- Pracovný premývací roztok:** Pripravte primerané množstvo pracovného premývacieho roztoku pridaním 69 dielov destilovanej vody do 1 dielu premývacieho roztoku (70 x). Na premiešanie použite magnetické miešadlo. Na záver dňa nepoužijte pracovný premývací roztok zlikvidujte.

VIII. SKLADOVANIE A DÁTUM EXSPIRÁCIE ČINIDIEL

- Pred otvorením alebo obnovou sú všetky komponenty sady stabilné až do dátumu expirácie uvedeného na štítku pod podmienkou uskladnenia pri teplote 2 až 8 °C.
- Po rozpustení budú kontrolné séra stabilné ešte týždeň pri teplote 2 až 8 °C. V prípade dlhodobšieho skladovania by sa mali urobiť alikvotné podiely a uchovávať pri teplote -20 °C najviac počas 3 mesiacov.
- Čerstvo pripravený pracovný premývací roztok by sa mal spotrebovať v ten istý deň.
- Po prvom použití zostane stopovacia látka stabilná až do dátumu expirácie, ak sa uskladní v pôvodnej dobre uzavretej ampulke pri teplote 2 až 8 °C.
- Zmeny vo fyzickom vzhľade činidiel zo sady môžu poukazovať na nestabilitu alebo skazenie.

IX. ODBER VZORIEK A PRÍPRAVA

- Sérové alebo plazmové vzorky sa musia uskladňovať pri teplote 2-8 °C.
- Ak sa skúška nevykoná do 48 hodín, odporúča sa uskladnenie pri teplote -20 °C.
- Vyhýbajte sa opakovanému zmrazovaniu a rozmrazovaniu.
- Heparinizovaná plazma poskytuje o 10 % nižšie výsledky ako sérum: Y (hep. plazma) = 0,9 x (sérum) + 0,20 r = 0,92 n = 20
- EDTA plazma poskytuje o 10 % nižšie výsledky ako sérum: Y (EDTA plazma) = 0,9 x (sérum) + 0,18 r = 0,87 n = 20

X. POSTUP

A. Poznámky k spracovaniu

- Sadu ani jej časti po uplynutí dátumu expirácie nepoužívajte. Nemiešajte materiál z rôznych šarží sad.
- Pred použitím zahrejte všetky činidlá na izbovú teplotu. Všetky činidlá a vzorky riadne zamiešajte jemným potrepáním alebo krúžením.
- Na priadnie jednotlivých činidiel a vzoriek použite čistú jednorázovú špičku pipety, aby sa predišlo krížovej kontaminácii. Vysoko presné pipety alebo automatizované vybavenie zvýši presnosť.
- Dodržiavajte časy inkubácie.
- Pre každý pokus pripravte kalibračnú krivku, nepoužívajte údaje z predchádzajúcich pokusov.

B. Získavanie vzoriek novorodencov (voliteľné) – NA SÉROVÚ VZORKU

- Pre každú vzorku označte jednu sklenú skúmavku (**nedoberajte kalibrátory alebo kontrolné vzorky**).
- Pipetou nadávajte 75 µl séra, potom 2,25 ml dietyléteru.
- Dôkladne odstredte všetky skúmavky (2 x 1 minútu)
- Nechajte 5 minút stáť na stole
- Skúmavky schlaďte na -20 °C s cieľom zmraziť vodnú fázu.
- Pripravte druhú sériu sklených skúmaviek a preneste do nich organickú fázu pre každú vzorku. Predídte kontaminácii vodnou fázou.
- Nechajte úplne odpariť organickú (éterovú) fázu pod prúdom vzduchu alebo zahriatím skúmaviek na teplotu 37°C (vodný kúpeľ). Manipulujte pod krytom.
- Rozpusťte suchý éterový extrakt so 150 µl obnovovacieho roztoku (**nedodáva sa, pozri VI.**). Dôkladne odstredte počas 1 minúty.
- Nechajte odstáť počas 10 – 15 minút a odstredte znova počas 1 minúty. Tieto objemy umožňujú vykonať duplicitné stanovenie.

C. Postup

- Označte potrebné duplicitné skúmavky pre každý kalibrátor, vzorku a kontrolné sérum. Na stanovenie celkového množstva označte 2 normálne skúmavky.
- Krátko odstredte kalibrátory, vzorky a kontrolné séra a nadávajte 25 µl z každého do príslušných skúmaviek. **Pre získanie vzoriek novorodencov napipetujte 50 µl namiesto 25 µl.**
- Do každej skúmavky nadávajte 0,5 ml 17-OHP s označením ¹²⁵jódu vrátane neznačených skúmaviek pre celkové množstvo.
- Rukou jemne poklepte na stojan so skúmavkami s cieľom uvoľniť prípadné bublinky.
- Inkubujte počas 3 hodín pri teplote 37 °C.
- Odsajte (alebo dekantujte) obsah z jednotlivých skúmaviek (okrem celkového množstva). Dbajte, aby sa špička odsávačky dostala až na dno značenej skúmavky s cieľom odsáť všetku kvapalinu.
- Premyte skúmavky 3 ml pracovného premývacieho roztoku (okrem celkového množstva) a odsajte (alebo dekantujte). Počas pridávania pracovného premývacieho roztoku sa vyhýbajte peneniu.
- Skúmavky nechajte stáť zvislo počas dvoch minút a odsajte zostávajúcu kvapalinu.
- Skúmavky zmerajte v merači žiarenia gama počas 60 sekúnd.

XI. VÝPOČET VÝSLEDKOV

1. Vypočítajte priemer duplikátnych stanovení.
2. Vypočítajte viazanú rádioaktivitu ako percentuálny podiel väzby stanovenej pri nulovacom bode kalibrátora (0) podľa tohto vzorca:

$$B/B_0(\%) = \frac{\text{Counts (Calibrator or sample)}}{\text{Counts (Zero Calibrator)}} \times 100$$

3. Pomocou 3 cyklového semi-logaritmickeho alebo logit-logového papiera, zostavte graf (B/B₀(%)) hodnôt pre každý bod kalibrátora ako funkciu koncentrácie 17-OHP každého bodu, kalibrátora, vylúčte zjavné anomálie.
4. Počítačom podporované metódy sa môžu zároveň použiť na zostavenie kalibračnej krivky. V prípade využitia automatickeho spracovania výsledku sa odporúča zostrojenie krivky 4 parametrovej logistickej funkcie.
5. Interpoláciou hodnôt vzorky (B/B₀ (%)) stanovte koncentrácie 17-OHP vzoriek z referenčnej krivky.
6. Získaná koncentrácia pre získané vzorky novorodencov (pozri X.B.) sa dá odčítať priamo na krivke (nevyžaduje sa žiadny korekčný faktor)
7. Pri každom rozbere sa musí skontrolovať percentuálny podiel stopovacej látky viazanej v absencii neoznačeného 17-OHP (B₀/T).

XII. TYPICKÉ ÚDAJE

Nasledujúce údaje získané pomocou 6 týždňov starej stopovacej látky slúžia len na ilustráciu a nesmú sa nikdy použiť namiesto kalibračnej krivky v reálnom čase.

(17-OHP)-RIA-CT	cpm	B/B ₀ (%)
Celkové množstvo	32363	
Kalibrátor		
0,00 ng/ml	12596	100,0
0,17 ng/ml	9769	77,6
0,59 ng/ml	6529	51,8
1,4 ng/ml	3752	29,8
4,3 ng/ml	1396	11,1
14,0 ng/ml	479	3,8

XIII. VÝKONNOSŤ A OBMEDZENIA

A. Citlivosť

LoB (Limit of Blank) bol testovaný meraním 20-násobku slepého pokusu a bol vypočítaný ako priemer ± 2 štandardná odchýlka distribúcie testovaných hodnôt.

LoB bola vypočítaná na 0,03 ng/ml.

LoD (Limit of Detection) sa vypočítal ako LoB ± 1.645 štandardná odchýlka vzorky s nízkou koncentráciou meranej v 10 rôznych testoch.

LoD bola vypočítaná na 0,09 ng/ml.

LoQ (Limit of Quantification) sa vypočítal testovaním 4 vzoriek s nízkou koncentráciou v 10 rôznych testoch.

LoQ bola vypočítaná pri 0,14 ng/ml.

B. Špecifickosť

Špecifickosť sa odhadla obohatením vzoriek 17-OHP (± 0,5 ng/ml) o steroidy, ktoré môžu byť prítomné vo vzorkách pacientov.

Zlúčenina	Pridané množstvo (ng/ml)	Križová reaktivita (%)
17α-hydroxyprogesterón	-	100
Progesterón	500	0,7
17α-hydroxypregnenolón	1000	0,3
21-deoxykortizol	1000	1,07
Pregnenolón	500	0,02
11-deoxykortizol	500	0,21
Kortikosterón	1000	0,008
11-deoxykortikosterón	500	0,24
Kortizol	5000	0,005
Testosterón	5000	0,004
Androstendión	5000	0,01
Estradiol	1000	0,008
17α-hydroxypregnenolón sulfát	5000	0,34

hydroxyprogesterónu boli testované rôzne hladiny hemoglobínu, bilirubínu, triglyceridu a konjugovaného bilirubínu v sére. Naším kritériom prípustnosti bola interferencia menšia ako 10 %. Testované látky neovplyvnili výkonnosť testu DIAsource 17OHP-RIA-CT.

Látka	17OHP (ng/ml)	Koncentrácia rušivej látky (mg/dl)	Priemer Variabilita
Hemoglobín	0,57	250	98.6%
		500	
1,8	250		
	500		
Konjugovaný bilirubín	0,57	50	95.1%
		1,8	
Nekonjugovaný bilirubín	0,57	50	99.2%
		100	
		50	
		100	
Triglycerid	0,57	50	97.0%
		100	
		250	
		500	
		1 000	
	1,54	50	
		100	
		250	
		500	
		1 000	

C. Presnosť

V RÁMCI ROZBORU

V RÁMCI ROZBORU

PO EXTRAKCII

Sérum	N	<X> ± SD (ng/ml)	CV (%)	Sérum	N	<X> ± SD (ng/ml)	CV (%)
A	20	0,73 ± 0,05	6,8	C	24	0,56 ± 0,06	10,7
B	20	1,94 ± 0,09	4,6	D	24	1,81 ± 0,17	9,4

SD: Štandardná odchýlka; CV: variačný koeficient

MEDZI-ROZBORMI

MEDZI-ROZBORMI

PO EXTRAKCII

Sérum	N	<X> ± SD (ng/ml)	CV (%)	Sérum	N	<X> ± SD (ng/ml)	CV (%)
A	12	0,69 ± 0,06	8,7	A	8	0,72 ± 0,13	18
B	12	2,08 ± 0,16	7,6	B	8	2,03 ± 0,39	19,2

SD: Štandardná odchýlka; CV: variačný koeficient

D. Správnosť

SKÚŠKA RIEDENIA

Sérum	Riedenie	Teoretická koncent. (ng/ml)	Meraná koncent. (ng/ml)
	1/1	-	3,3
	1/2	1,65	1,79
	1/4	0,83	1,0
	1/8	0,42	0,5
	1/16	0,21	0,27

Vzorky boli zriedené s nulovacím kalibrátorom.

Bol vyhodnotený účinok potenciálne rušivých látok na vzorky pri použití DIAsource 17OHP-RIA-CT. Na vzorkách s rôznymi koncentraciami 17α-

REGENERAČNÝ TEST

Vzorka		pridaná 17-OHP (ng/ml)	Zregenerovaný 17-OHP (ng/ml)	Zregenerovaný (%)
1		6	5,7	95
		3	2,99	99
		1,5	1,64	109
		0,75	0,81	108
2		6	5,27	87
		3	2,86	95
		1,5	1,49	99
		0,75	0,74	98

Konverzný faktor:

Od ng/ml do nmol/L: x 3,03

Od nmol/L do ng/ml: x 0,33

Pokiaľ je nám známe, pre tento parameter neexistuje žiadny medzinárodný referenčný materiál.

E. Oneskorenie medzi posledným kalibrátorom a dávkovaním vzorky

Ako sa ďalej uvádza, výsledky rozboru zostávajú správne aj po nadávkovaní vzorky 40 minút po pridaní kalibrátora do značených skúmaviek.

ONESKORENIE

Vzorka (ng/ml)	0'	10'	30'	40'
Vzorka 1	0,63	0,65	0,73	0,74
Vzorka 2	2,03	2,4	2,37	2,2

F. Obmedzenia pre vzorky novorodencov

Veľmi malé deti (< 3 mesiace) vykazujú veľmi vysoké hladiny 17 α -hydroxypregnenolón sulfátu. Napriek skutočnosti, že neexistuje takmer žiadna krížová reakcia s touto molekulou, odporúčame dodržiavať postup pre extrakciu (X. B.)

XIV. INTERNÁ KONTROLA KVALITY

- Percentuálny podiel stopovacej látky viazanej v absencii neoznačeného 17-OHP (B0/T) musí byť > 25 %.
- Ak výsledky získané pre kontrolné sérum 1 a/alebo kontrolné sérum 2 nie sú v rozsahu stanovenom na štítku ampulky, nesmú sa použiť, ak sa neuvedie uspokojivé vysvetlenie takejto nezrovnalosti.
- Ak je to vhodné, každé laboratórium môže vytvoriť svoju vlastnú skupiny kontrolných sér, ktoré by sa mali udržiavať zmrazené v alikvotných podieloch. Nezmrazujte a nerozmrazujte viac ako dvakrát.
- Kritériá prípustnosti pre rozdiel medzi duplicitnými výsledkami vzoriek musia vychádzať zo správnej laboratórnej praxe.

XV. REFERENČNÉ INTERVALY

Tieto hodnoty sa uvádzajú len orientačne; každé laboratórium by malo zostaviť svoj vlastný normálny rozsah hodnôt.

	Rozsah koncentrácie (2,5 až 97,5 % percentilu) (ng/ml)	Počet subjektov
Normálni muži	0.67 – 3.32	79
Normálne ženy		
. Folikulárna fáza	0.41 – 2.27	50
. Luteálna fáza	0.23 – 3.87	28
Tehotenstvo		
. Prvý trimester	2.60 – 7.95	30
. Druhý trimester	1.83 – 9.74	30
. Tretí trimester	3.54 – 18.97	15
Novorodenci (po extrakcii)	0.34 – 1.96	23 (0 až 3 mesiace)

XVI. OPATRENIA A UPOZORNENIA

Bezpečnosť

Len na diagnostické účely in vitro.

Táto sada obsahuje ¹²⁵I (polčas: 60 dní), emitujúce ionizujúce X (28 keV) a γ (35,5 keV) žiarenia.

Tento rádioaktívny produkt sa môže odovzdať len oprávneným osobám, ktoré s ním môžu nárábať. Nákup, skladovanie, používanie a výmenu rádioaktívnych produktov upravujú právne predpisy krajiny koncového používateľa. Produkt sa v žiadnom prípade nesmie podávať ľuďom ani zvieratám.

Akkoľvek manipulácia s rádioaktívnymi látkami sa musí vykonávať v určených priestoroch, mimo bežne vykonávanej práce. V laboratóriu musí byť kniha záznamov o prijatí a skladovaní rádioaktívnych materiálov. Laboratórne vybavenie a sklo, ktoré by sa mohli kontaminovať rádioaktívnymi látkami, musia byť oddelené, aby nedošlo ku krížovej kontaminácii rôznymi rádioizotopmi.

Prípadné rádioaktívne úniky sa musia ihneď vyčistiť v súlade s postupmi pre radiačnú bezpečnosť. Rádioaktívny odpad sa musí zlikvidovať v súlade s miestnymi predpismi orgánov príslušných pre dané laboratórium. Dodržiavanie základných pravidiel pre radiačnú bezpečnosť poskytuje primeranú ochranu.

Zložky ľudskej krvi v tejto sade boli odskúšané európskymi a/alebo FDA schválenými metódami a sú negatívne na HBsAg, anti-HCV, anti-HIV-1 a 2. Žiadna známa metóda nie je schopná zabezpečiť úplnú istotu, že v derivátoch ľudskej krvi sa neprenesie hepatitída, AIDS alebo iné infekcie. Z toho dôvodu musí byť manipulácia s činidlami, vzorkami séra alebo plazmy v súlade s miestnymi bezpečnostnými postupmi.

Všetky zvieracie produkty a deriváty boli zozbierané zo zdravých zvierat. Zložky z hovädzieho dobytku pochádzajú z krajín bez hláseného výskytu BSE. Napriek tomu sa so zložkami obsahujúcimi zvieracie látky sa musí zaobchádzať ako s potenciálne infekčnými.

Predchádzajte akémukoľvek kontaktu s činidlami (azid sodný ako konzervačná látka). Azid v tejto sade môže reagovať s olovom a meďou v potrubi a môže tak vytvárať vysoko výbušné kovové azidy. Počas premývania prepláchnite odtok veľkým množstvom vody s cieľom zabrániť hromadeniu azidu.

V pracovných priestoroch nefajčte, nepite, nejedzte a nepoužívajte kozmetiku. Nepipetujte ústami. Používajte ochranné odevy a jednorazové rukavice.

XVII. LITERATÚRA

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 adrenance.
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. ZHRNUTIE PROTOKOLU

	CELKOV Ě MNOŽST VO (μl)	KALIBR ÁTORÝ (μl)	VZORKA(Y) KONTROLN Ě SĚRA (μl)	EXTRAHOVA NĚ VZORKY (μl)
--	-------------------------------------	-------------------------	---	--------------------------------

Kalibrátory (0 – 5)	-	25	-	-
Vzorky, kontrolné séra	-	-	25	-
Extrahované vzorky	500	500	500	500
Stopovacia látka				50
Inkubácia	3 hodiny pri teplote 37 °C			
Separácia Pracovný premyváci roztok Separácia	-	odsávanie 3,0 ml Odsávajte obozretne		
Meranie	Skúmavky merajte počas 60 sekúnd			

Ďalšie preklady tohto návodu na použitie sú k dispozícii na stiahnutie na našej webovej stránke: <https://www.diasource-diagnostics.com/>