

Product information

Information about other products is available at: www.demeditec.com



User's Manual

17-OH-Progesterone ELISA

Enzyme immunoassay for the in-vitro diagnostic quantitative determination of 17-OH-Progesterone in human serum and plasma



DEH3322



96 Wells

CONTENTS / INHALTSVERZEICHNIS / CONTENIDO

1	INTRODUCTION	3
2	PRINCIPLE	3
3	WARNINGS AND PRECAUTIONS	4
4	REAGENTS	5
5	SPECIMEN COLLECTION AND PREPARATION	6
6	ASSAY PROCEDURE	6
7	EXPECTED NORMAL VALUES	7
8	QUALITY CONTROL	8
9	PERFORMANCE CHARACTERISTICS	8
10	LIMITATIONS OF PROCEDURE	10
11	LEGAL ASPECTS	11
12	REFERENCES	11
1	EINLEITUNG	12
2	METHODIK UND TESTPRINZIP	12
3	HINWEISE UND VORSICHTSMASSNAHMEN	13
4	KITBESTANDTEILE	14
5	PROBENENTNAHME UND –VORBEREITUNG	15
6	TESTDURCHFÜHRUNG	15
7	ERWARTETE WERTE	16
8	QUALITÄTSKONTROLLE	17
9	ASSAY CHARACTERISTIKA	17
10	GRENZEN DES TESTS	17
11	RECHTLICHE GRUNDLAGEN	18
12	REFERENZEN	18
1	INTRODUCCIÓN	19
2	PRINCIPIO	19
3	ADVERTENCIAS Y PRECAUCIONES	20
4	REACTIVOS	21
5	TOMA Y PREPARACIÓN DE LAS MUESTRAS	22
6	PROCEDIMIENTO DEL ENSAYO	22
7	VALORES ESPERADOS	23
8	CONTROL DE CALIDAD	24
9	CARACTERÍSTICAS DE RENDIMIENTO	24
10	LIMITACIONES DEL PROCEDIMIENTO	26
11	ASPECTOS LEGALES	27
12	REFERENCIAS	27
	SYMBOLS USED WITH DEMEDITEC ELISA 'S	28

1 INTRODUCTION

1.1 Intended Use

Enzyme immunoassay for the in-vitro diagnostic quantitative determination of 17-OH-progesterone in human serum and plasma (EDTA).

1.2 Summary and explanation

The steroid hormone 17-OH-progesterone (17-OHP) is produced in the adrenal cortex and in the gonads. Gestagenic effects exerted by 17-OHP are small. Nevertheless, this hormone is of clinical significance because it represents the ultimate precursor of 11 β -desoxycortisol (compounds, CpS). CpS is formed by hydroxylation of the carbon atom C 21. Enzyme activity of 21-hydroxylase in the adrenal cortex may thus be monitored by analyzing the level of 17-OHP in the blood.

Deficiencies in 21-hydroxylase, most commonly found in congenital adrenal hyperplasia (CAH), result in excessive secretion of 17-OHP and consequently in enhanced blood levels. Deficiencies in 21-hydroxylase, however, merely lead to moderately increased values of 17-OHP. The analysis of this steroid hormone, therefore, plays a significant role in the differential diagnosis of congenital adrenal hyperplasia.

In adult non-pregnant women, 17-OHP levels in the blood depend on the phase of the menstrual cycle. Like progesterone, 17-OHP is secreted by the mature follicle and the corpus luteum. Concentrations are generally higher after ovulation.

In addition, levels of 17-OHP are influenced by daytime rhythms which correlate with the adrenal secretion of cortisol. Maximal levels are found in samples collected between midnight and 8 a.m.

In adult men, there are few indications of similar fluctuations of 17-OHP levels.

During pregnancy, large amounts of 17-OHP are produced by the fetus, the placenta, and the adrenal cortex. The hormone is secreted into the fetal and the maternal blood circulation. Maternal values of 17-OHP strongly increase after the 32. week of pregnancy reaching 4-fold higher levels than during the luteal phase of the menstrual cycle. 17-OHP may also be found in the umbilical cord of newborns.

2 PRINCIPLE

The assay is a solid phase enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) based on the competition principle. An unknown amount of antigen present in the sample and a fixed amount of enzyme labelled antigen compete for the binding sites of the antibodies coated onto the wells. After incubation the wells are washed to stop the competition reaction. After the substrate reaction the intensity of the developed colour is inversely proportional to the amount of the antigen in the sample. Results of samples can be determined directly using the standard curve.

3 WARNINGS AND PRECAUTIONS

1. This kit is for in vitro diagnostic use only. For professional use only.
2. Before starting the assay, read the instructions completely and carefully. Use the valid version of the package insert provided with the kit. Be sure that everything is understood.
3. All human source material used in the preparation of the reagents has been tested and found negative for antibody to HIV 1&2, HbsAg, and HCV. No test method however can offer complete assurance that HIV, HBV, HCV or other infectious agents are absent. Therefore, the reagents should be handled in the same manner as potentially infectious material.
4. The microplate contains break apart strips. Unused wells must be stored at 2 °C to 8 °C in the sealed foil pouch and used in the frame provided.
5. Pipetting of samples and reagents must be done as quickly as possible and in the same sequence for each step.
6. Use reservoirs only for single reagents. This especially applies to the substrate reservoirs. Using a reservoir for dispensing a substrate solution that had previously been used for the conjugate solution may turn solution coloured. Do not pour reagents back into vials as reagent contamination may occur.
7. Mix the contents of the microplate wells thoroughly to ensure good test results. Do not reuse microwells.
8. Do not let wells dry during assay; add reagents immediately after completing the rinsing steps.
9. Allow the reagents to reach room temperature (18-25°C) before starting the test. Temperature will affect the absorbance readings of the assay. However, values for the patient samples will not be affected.
10. Never pipet by mouth and avoid contact of reagents and specimens with skin and mucous membranes.
11. Do not smoke, eat, drink or apply cosmetics in areas where specimens or kit reagents are handled.
12. Wear disposable latex gloves when handling specimens and reagents. Microbial contamination of reagents or specimens may give false results.
13. Handling should be done in accordance with the procedures defined by an appropriate national biohazard safety guideline or regulation.
14. Do not use reagents beyond expiry date as shown on the kit labels.
15. All indicated volumes have to be performed according to the protocol. Optimal test results are only obtained when using calibrated pipettes and microtiterplate readers.
16. Do not mix or use components from kits with different lot numbers. It is advised not to exchange wells of different plates even of the same lot. The kits may have been shipped or stored under different conditions and the binding characteristics of the plates may result slightly different.
17. Avoid contact with Stop Solution. It may cause skin irritation and burns.
18. Chemicals and prepared or used reagents have to be treated as hazardous waste according to the national biohazard safety guideline or regulation.
19. For information please refer to Material Safety Data Sheets. Safety Data Sheets for this product are available upon request directly from Demeditec Diagnostics GmbH.

4 REAGENTS

4.1 Reagents provided

1. **SORB MT** **Microtiter Plate**, 12x8 (break apart) strips, 96 wells; wells coated with an anti-17-OH-progesterone antibody (polyclonal)
2. **CAL 0** **Calibrator 0**, 1 vial, 1 ml, ready to use
3. **CAL 1-5** **Calibrator (Calibrator 1-5)**, 5 vials, 0.5 ml each, ready to use
concentrations: 0.1 - 0.4 - 1.6 - 6.5 - 25 ng/ml
4. **CONTROL 1-2** **Control 1 (low) / Control 2 (high)**, 2 vials, 0.5 ml each, ready to use; containing 17-OH-progesterone in serum. For control values and ranges please refer to QC-Datasheet
5. **ENZ CONJ** **Enzyme Conjugate**, 1 vial, 11 ml, ready to use; 17-OH-progesterone conjugated to horseradish peroxidase
6. **SUB TMB** **Substrate Solution**, 1 vial, 22 ml, ready to use; Tetramethylbenzidine (TMB)
7. **STOP SOLN** **Stop Solution**, 1 vial, 7 ml, ready to use; contains 2 N acidic solution. Avoid contact with the stop solution. It may cause skin irritations and burns.
8. **WASH SOLN 10x** **Wash Solution**, 1 vial, 50 ml (**10X** concentrated); see „Preparation of Reagents“

4.2 Material required but not provided

- Microcentrifuge
- A calibrated microtiter plate reader (450±10 nm)
- Microplate mixer operating at about 600 rpm (optional)
- Vortex mixer
- Calibrated variable precision micropipettes (25 µl, 50 µl 100 µl, 200 µl).
- Absorbent paper
- Distilled or deionized water
- Timer
- Semi logarithmic graph paper or software for data reduction

4.3 Storage conditions

When stored at 2-8 °C unopened reagents will be stable until expiration date. Do not use reagents beyond this date. Opened reagents must be stored at 2-8°C. After first opening the reagents are stable for 30 days if used and stored properly.

Microtiter wells must be stored at 2-8 °C. Once the foil bag has been opened, care should be taken to close it tightly again.

4.4 Reagents preparations

Allow the reagents and the required number of wells to reach room temperature (18-25°C) before starting the test.

Wash Solution

Add deionized water to the 10X concentrated *Wash Solution*. Dilute 50 ml of concentrated *Wash Solution* with 450 ml deionized water to a final volume of 500 ml. *The diluted Wash Solution is stable for 12 weeks at room temperature.*

4.5 Disposal of the kits

The disposal of the kit must be made according to the national regulations. Special information for this product is given in the Material Safety Data Sheet.

4.6 Damaged test kits

In case of any severe damage of the test kit or components, Demeditec has to be informed in writing within one week after receiving the kit. Severely damaged single components should not be used for a test run. They have to be stored until a final solution has been found. After this, they should be disposed according to the official regulations.

5 SPECIMEN COLLECTION AND PREPARATION

For determination of 17-OH-Progesterone **serum or plasma (EDTA)** can be used. The procedure calls for 25 µl sample per well. The samples should be assayed immediately or aliquoted and stored at $\leq -20^{\circ}\text{C}$. Avoid repeated freeze-thaw cycles. Samples expected to contain 17-OH-Progesterone concentrations higher than the highest calibrator (25 ng/ml) should be diluted with the zero calibrator before assay. The additional dilution step has to be taken into account for the calculation of the results. Do not use grossly haemolytic, icteric or grossly lipaemic specimens.

6 ASSAY PROCEDURE

6.1 General remarks

- All reagents and specimens must be allowed to come to room temperature (18-25°C) before use. All reagents must be mixed without foaming.
- Once the test has been started, all steps should be completed without interruption.
- Use new disposal plastic pipette tips for each standard, control or sample in order to avoid cross contamination.
- Absorbance is a function of the incubation time and temperature. Before starting the assay, it is recommended that all reagents are ready, caps removed, all needed wells secured in holder, etc. This will ensure equal elapsed time for each pipetting step without interruption.
- As a general rule the enzymatic reaction is linearly proportional to time and temperature.
- Respect the incubation times as stated in this instructions for use.

6.2 Assay procedure

Each run must include a standard curve.

1. Secure the desired number of coated strips in the frame holder.
2. Dispense **25 µl** of each **Standard, Control and samples** with new disposable tips into appropriate wells.
3. Dispense **100 µl Enzyme Conjugate** into each well.
Thoroughly mix for 10 seconds. It is important to have a complete mixing in this step.
4. Incubate for **60 minutes** at room temperature. Shaking on a horizontal shaker during incubation is not necessary, but it slightly improves the sensitivity of the test.
5. Briskly empty the contents of the wells by aspiration or by decanting.
Rinse the wells 4 times with diluted Wash Solution (300 µl per well). Strike the wells sharply on absorbent paper to remove residual droplets.

Important note:

The sensitivity and precision of this assay is markedly influenced by the correct performance of the washing procedure!

6. Add **200 µl** of **Substrate Solution** to each well.
7. Incubate for **30 minutes** in the dark at room temperature.
8. Stop the enzymatic reaction by adding **50 µl** of **Stop Solution** to each well.
9. Determine the absorbance of each well at **450±10 nm**.
It is recommended to read the wells within 15 minutes.

6.3 Calculation of results

1. Calculate the average absorbance values for each set of standards, controls and patient samples.
2. Construct a standard curve by plotting the mean absorbance obtained from each standard against its concentration with absorbance value on the vertical (Y) axis and concentration on the horizontal (X) axis.
3. Using the mean absorbance value for each sample determine the corresponding concentration from the standard curve.
4. Automated method: The results in the IFU have been calculated automatically using a 4 PL (4 Parameter Logistics) curve fit. 4 Parameter Logistics is the preferred calculation method. Other data reduction functions may give slightly different results.
5. The concentration of the samples can be read directly from this standard curve. Samples with concentrations higher than that of the highest standard have to be further diluted with zero calibrator. For the calculation of the concentrations this dilution factor has to be taken into account.

Conversion to SI units:

17-OH-Progesterone (ng/ml) x 3.03 = nmol/l

6.3.1 Example of typical calibrator curve

The following data is for demonstration only and cannot be used in place of data generations at the time of assay.

Calibrator		OD (450nm)
Calibrator 0	0.0 ng/ml	3.025
Calibrator 1	0.1 ng/ml	2.653
Calibrator 2	0.4 ng/ml	2.308
Calibrator 3	1.6 ng/ml	1.638
Calibrator 4	6.5 ng/ml	0.904
Calibrator 5	25 ng/ml	0.443

7 EXPECTED NORMAL VALUES

Apparently healthy subjects show the following values of 17-OH-progesterone:

Children	3 -14 years	0.05 - 2.0 ng/ml
Reproductive aged women	Follicular phase:	0.1 - 1.0 ng/ml
	Luteal phase:	0.6 - 2.5 ng/ml
	Ovulation:	0.3 - 1.5 ng/ml
	Post ACTH:	< 3.2 ng/ml
	Third trimester:	2.0 - 12 ng/ml
	Postmenopausal women:	0.13 - 0.6 ng/ml
Normal men		0.5 - 3 ng/ml

These results alone should not be the only reason for any therapeutic consequences. They have to be correlated to other clinical observations and diagnostic tests.

It is strongly recommended that each laboratory establishes its own range of normal values.

8 QUALITY CONTROL

Good laboratory practice requires to run controls with each calibration curve. A statistically significant number of controls should be assayed to establish mean values and acceptable ranges to assure proper performance. It is recommended to use control samples according to state and federal regulations. The use of control samples is advised to assure the day to day validity of results. Use controls at both normal and pathological levels. The controls and the corresponding results of the QC-Laboratory are stated in the QC certificate added to the kit. The values and ranges stated on the QC sheet always refer to the current kit lot and should be used for direct comparison of the results.

It is also recommended to make use of national or international Quality Assessment programs in order to ensure the accuracy of the results. Employ appropriate statistical methods for analysing control values and trends. If the results of the assay do not fit to the established acceptable ranges of control materials patient results should be considered invalid. In this case, please check the following technical areas: Pipetting and timing devices, photometer, expiration dates of reagents, storage and incubation conditions, aspiration and washing methods. After checking the above mentioned items without finding any error contact your distributor or DEMEDITEC directly.

9 PERFORMANCE CHARACTERISTICS

9.1 Analytical Sensitivity

The analytical sensitivity of the Demeditec ELISA was calculated by subtracting 2 standard deviations from the mean of twenty (20) replicate analyses of *Calibrator 0*. The analytical sensitivity of the assay is 0.014 ng/ml.

9.2 Specificity (Cross Reactivity)

The following materials have been evaluated for cross reactivity.

Substance	% Cross-reactivity
Androstendione	< 0.1%
Testosterone	< 0.1%
Cortisol	0.05%
11-Desoxycortisol	2.71%
Cortisone	0.19%
Corticosterone	< 0.1%
11-Deoxycorticosterone	0.26%
Progesterone	2.9%
Estradiol	< 0.1%
Estriol	< 0.1%
Estrone	< 0.1%
Pregnenolone	0.17%
Prednisolone	< 0.1%
Prednisone	0.11%
DHEA	< 0.1%
DHEA-S	< 0.1%
Danazol	< 0.1%
Dexamethasone	< 0.1%

9.3 Assay Dynamic Range

The range of the assay is between 0.1 - 25 ng/ml.

9.4 Reproducibility

9.4.1 Intra-Assay

The intra-assay variation was determined by 20 replicate measurements of 3 serum samples within one run using the Demeditec ELISA. The intra-assay variability is shown below:

	Sample 1	Sample 2	Sample 3
Mean (ng/ml)	0.52	2.29	5.86
SD (ng/ml)	0.05	0.16	0.38
CV (%)	8.9	6.9	6.6
n =	20	20	20

9.4.2 Inter-Assay

The inter-assay variation was determined by duplicate measurements of 3 serum samples in 10 different runs using the Demeditec ELISA. The inter-assay variability is shown below:

	Sample 1	Sample 2	Sample 3
Mean (ng/ml)	0.66	2.20	4.91
SD (ng/ml)	0.1	0.18	0.31
CV (%)	14.9	8.0	6.4
n =	10	10	10

9.5 Recovery

Recovery was determined by adding increasing amounts of the analyte to three different samples containing different amounts of endogenous analyte. All samples were then measured by the 17-OH-progesterone assay procedure. The percentage recoveries were determined by comparing expected and measured values of the samples.

Serum	Spiking	Measured concentration (ng/ml)	Expected concentration (ng/ml)	Recovery %
1	-	0.64	-	-
	2 ng/ml	2.55	2.64	97%
	4 ng/ml	3.69	4.64	80%
	6 ng/ml	4.95	6.64	75%
2	-	0.66	-	-
	2 ng/ml	2.57	2.66	97%
	4 ng/ml	4.16	4.66	89%
	6 ng/ml	5.47	6.66	82%
3	-	2.66	-	-
	2 ng/ml	5.68	4.66	122%
	4 ng/ml	7.39	6.66	111%
	6 ng/ml	9.87	8.66	114%

9.6 Linearity

Three serum samples containing different amounts of analyte were assayed undiluted and diluted with the calibrator matrix (Calibrator 0). The percentage recovery was calculated by comparing the expected and measured values for 17-OH-progesterone.

Serum	Dilution	Measured concentration (ng/ml)	Expected concentration (ng/ml)	Recovery %
1	-	21.06	-	-
	1 in 2	10.00	10.53	95%
	1 in 4	4.98	5.26	95%
	1 in 8	2.49	2.63	95%
2	-	15.06	-	-
	1 in 2	7.84	7.53	104%
	1 in 4	4.54	3.77	120%
	1 in 8	2.33	1.88	124%
3	native	23.38	-	-
	1 in 2	11.43	11.69	98%
	1 in 4	5.49	5.84	94%
	1 in 8	2.49	2.92	85%

10 LIMITATIONS OF PROCEDURE

Reliable and reproducible results will be obtained when the assay procedure is performed with a complete understanding of the package insert instruction and with adherence to good laboratory practice. Any improper handling of samples or modification of this test might influence the results.

10.1 Drug Interferences

Until today no substances (drugs) are known to us, which have an influence to the measurement of 17-OH-progesterone in a sample.

11 LEGAL ASPECTS

11.1 Reliability of Results

The test must be performed exactly as per the manufacturer's instructions for use. Moreover the user must strictly adhere to the rules of GLP (Good Laboratory Practice) or other applicable national standards and/or laws. This is especially relevant for the use of control reagents. It is important to always include a sufficient number of controls for validating the accuracy and precision of the test.

The test results are valid only if all controls are within the specified ranges and if all other test parameters are also within the given assay specifications. In case of any doubt or concern please contact Demeditec.

11.2 Therapeutic Consequences

Therapeutic consequences should never be based on laboratory results alone even if all test results are in agreement with the items as stated under point 11.1. Any laboratory result is only a part of the total clinical picture of a patient.

Only in cases where the laboratory results are in acceptable agreement with the overall clinical picture of the patient should therapeutic consequences be derived.

The test result itself should never be the sole determinant for deriving any therapeutic consequences.

11.3 Liability

Any modification of the test kit and/or exchange or mixture of any components of different lots from one test kit to another could negatively affect the intended results and validity of the overall test. Such modification and/or exchanges invalidate any claim for replacement.

Claims submitted due to customer misinterpretation of laboratory results subject to point 11.2. are also invalid. Regardless, in the event of any claim, the manufacturer's liability is not to exceed the value of the test kit. Any damage caused to the test kit during transportation is not subject to the liability of the manufacturer.

12 REFERENCES

1. Abraham, G.E., R.S. Swerdloff, D. Tulchinsky et al: Radioimmunoassay of plasma 17-hydroxyprogesterone. *J. Clin. Endocrinol. Metab.* 33:42, 1971
2. Chrousos, G.P., D. L. Loriaux, D.L. Mann, et al: Late onset 21- hydroxylase deficiency mimicking idiopathic hirsutism or polycystic ovarian disease. *Annals Intern. Med.* 96:143, 1982.
3. Buster, J.E., R.J. Chang, D.L. Preston, et al: Interrelationships of circulating maternal steroids; progesterone, 16 α -hydroxyprogesterone, 17 α -hydroxyprogesterone, 20 α -dihydroprogesterone, gamma- 5-pregnenolone, gamma-5- pregnenolone-sulfate, gamma-5-pregnenolone-sulfate and 17-hydroxy gamma-5-pregnenolone, *J. Clin. Endocrinol. Metab.* 48:133, 1979.
4. New, M.I., B. Dupont, S. Pang, et al: An update on congenital adrenal hyperplasia. *Recent Progress in Hormone Research*, 37:105, 1981.
5. J. Hotchkiss, A. Drash, et al: Micro filter paper method for 17 α -hydroxyprogesterone radioimmunoassay: Its application for rapid screening for congenital adrenal hyperplasia. *J. Clin. Endocrinol. Metab.*, 45:1003, 1977.
6. Lobo, R.A., U. Goebelsmann: Adult manifestation of congenital adrenal hyperplasia due to incomplete 21-hydroxylase deficiency mimicking polycystic ovarian disease. *Am. J. Obstet. Gynecol.*, 138:720, 1980.
7. Urban, M.D., P.A. Lee and C.J. Migeon: Adult high infertility in men with congenital adrenalized hyperplasia. *N. Engl. J. Med.* 299:1392, 1978.
8. Meikle, A.W., R.J. Worley and C.D. West: Adrenal corticoid hyper-response in hirsute women. *Fertil. Steril.* 41:575, 1984
9. Ueshiba, H., Zerah M., New M. I.: Enzyme-linked Immunosorbent assay (ELISA). Method for screening of non-classical steroid 21-Hydroxylase deficiency. *Norm. Metab. Res.* 26:43, 1994
10. Liovic M et al. CYP17 gene analysis in hyperandrogenised women with and without exaggerated 17-hydroxyprogesterone response to ovarian stimulation. *J. Endocrinol. Invest.*, 20:189, 1997

1 EINLEITUNG

1.1 VERWENDUNG

Der Demeditec 17-OH-Progesterone ELISA ist ein Enzymimmunoassay zur quantitativen Bestimmung von 17-OH-Progesteron in humanem Serum und Plasma (EDTA).

1.2 ZUSAMMENFASSUNG UND ERLÄUTERUNG

Das Steroidhormon 17- α -Hydroxyprogesteron (17-OH-Progesteron, 17-OHP) wird sowohl in der Nebennierenrinde als auch in den Gonaden gebildet. Obwohl 17-OH-Progesteron nur eine geringe gestagene Wirkung zeigt, ist es doch von klinischem Interesse, da es eine unmittelbare Vorstufe des 11-Desoxycortisols (Compound S, CpS) ist. CpS wird aus 17-OH-Progesteron durch Hydroxylierung des Kohlenstoffatoms C21 gebildet. Daher ist 17-OH-Progesteron ein nützlicher indirekter Parameter für die 21-Hydroxylase-Enzymaktivität der Nebennierenrinde.

Bei einer angeborenen 21-Hydroxylasestörung, der häufigsten Form der kongenitalen adrenalen Hyperplasie (CAH), wird 17-OH-Progesteron im Überschuss sezerniert und deshalb im Blut in erhöhter Konzentration gefunden. Bei Patienten mit einem 11-Hydroxylasedefekt ist es dagegen mäßig erhöht. Die 17-OH-Progesteron-Bestimmung ist daher bei der Differentialdiagnostik der kongenitalen adrenalen Hyperplasie von großer klinischer Bedeutung.

Bei erwachsenen, nichtschwangeren Frauen im gebärfähigen Alter schwanken die 17-OH-Progesteron-Konzentrationen in Abhängigkeit vom Menstruationszyklus. In der Lutealphase sind die Konzentrationen höher als in der Follikelphase, da 17-OH-Progesteron genauso wie Progesteron vom reifen Follikel, besonders jedoch vom Corpus luteum sezerniert wird.

Die 17-OH-Progesteron-Werte sind tageszeitabhängig. Dieser Tagesrhythmus läuft parallel zu dem der adrenalen Cortisolsekretion ab. Die höchste Konzentration wird in Proben gefunden, die zwischen Mitternacht und 8 Uhr morgens abgenommen wurden.

Bei erwachsenen Männern gibt es nur wenige Hinweise auf systematische Schwankungen der 17-OH-Progesteron-Werte.

Während der Schwangerschaft wird 17-OH-Progesteron in großen Mengen vom Fetus, der Plazenta und der Nebennierenrinde gebildet und sowohl in den Kreislauf des Fetus als auch in den der Mutter abgegeben. Die mütterlichen 17-OH-Progesteron-Werte nehmen nach der 32. Schwangerschaftswoche sehr stark zu und sind am Ende der Schwangerschaft etwa viermal so hoch wie in der Lutealphase. Auch im Blut der Nabelschnur neugeborener Kinder ist 17-OH-Progesteron nachweisbar.

2 METHODIK UND TESTPRINZIP

Der Demeditec 17-OH-Progesterone ELISA ist ein Festphasen-Enzymimmunoassay, der auf dem Prinzip der kompetitiven Bindung basiert. Eine unbekannt Menge an Antigen in der Probe und eine bekannte Menge an enzymmarkiertem Antigen konkurrieren um die Bindungsstellen des an die Vertiefungen der Mikrotiterstreifen gebundenen Antikörpers. Nach der Inkubation wird nicht gebundenes (enzymmarkiertes) Antigen durch Waschen entfernt. Die Intensität der gebildeten Farbe nach der Substratreaktion ist umgekehrt proportional zur Antigen-Konzentration in den Proben. Die Ergebnisse der Proben können direkt anhand der Standardkurve bestimmt werden.

3 HINWEISE UND VORSICHTSMASSNAHMEN

1. Dieser Kit ist nur zum in vitro diagnostischen Gebrauch geeignet und sollte nur von medizinischem Fachpersonal durchgeführt werden.
2. Lesen Sie vor dem Testansatz sorgfältig die Packungsbeilage. Verwenden Sie nur die gültige, im Testkit enthaltene Arbeitsanleitung.
3. Das humane Ausgangsmaterial, das bei der Herstellung der Reagenzien verwendet wird, wurde negativ auf Antikörper gegen HIV 1&2, HbsAg und HCV getestet. Keine Testmethode kann jedoch die vollständige Sicherheit bieten, dass HIV, HBV, HCV oder andere infektiöse Erreger nicht vorhanden sind. Daher sollten die Reagenzien genauso behandelt werden wie potenziell infektiöses Material
4. Die Mikrotiterplatte enthält teilbare, einzeln brechbare Mikrotiterstreifen. Unbenutzte Mikrotiterstreifen sollten im verschlossenen Folienbeutel bei 2-8°C aufbewahrt werden und im mitgelieferten Rahmen verwendet werden.
5. Proben und Reagenzien sollten so schnell wie möglich und in einer gleichbleibenden Sequenz pipettiert werden.
6. Verwenden Sie für jedes Reagenz einen separaten Pipettenaufsatz. Das gilt besonders für die Substrat-Lösung. Wenn der Pipettenaufsatz der Substrat-Lösung vorher z.B. für das Konjugat verwendet wurde, kommt es zu einem Farbumschlag der Substrat-Lösung. Gießen Sie Reagenzien nie zurück ins Fläschchen, da so Reagenz-Kontaminationen verursacht werden können.
7. Mischen Sie den Inhalt der Mikrotiterplatte sorgfältig, um gute Testergebnisse zu gewährleisten. Mikrotiterplatten nicht wiederverwenden!
8. Mikrotiterstreifen nicht austrocknen lassen während des Testlaufes. Nach jedem Waschschrift zügig im Testprotokoll fortfahren.
9. Bringen Sie die Reagenzien vor dem Testansatz auf Raumtemperatur (18-25°C).
10. Nicht mit dem Mund pipettieren und Kontakt von Kitbestandteilen und Proben mit Haut und Schleimhäuten vermeiden.
11. In den Bereichen, in denen Proben oder Kitbestandteile verwendet werden, nicht rauchen, essen oder Kosmetika verwenden.
12. Beim Umgang mit Proben oder Reagenzien Einweg-Latexhandschuhe tragen. Die Verunreinigung von Reagenzien oder Proben mit Mikroben kann zu falschen Ergebnissen führen.
13. Der Gebrauch sollte in Übereinstimmung mit den Verfahren erfolgen, welche durch eine nationale Gefahrenstoff-Sicherheitsrichtlinie festgelegt sind.
14. Reagenzien nicht nach dem auf dem Kit-Etikett angegebenen Verfallsdatum verwenden.
15. Alle in der Packungsbeilage angegebenen Mengen müssen genau eingehalten werden. Optimale Ergebnisse können nur durch Verwendung kalibrierter Pipetten und Mikrotiterplatten-Lesegeräte erreicht werden.
16. Komponenten von Kits mit unterschiedlichen Lotnummern nicht untereinander austauschen oder mischen. Es wird empfohlen, keine Wells von verschiedenen Platten zu verwenden, auch nicht, wenn es sich um das gleiche Lot handelt. Die Kits können unter anderen Bedingungen gelagert oder versendet worden sein, so dass die Bindungscharakteristika der Platten leicht unterschiedlich ausfallen.
17. Der Kontakt mit der Stopp-Lösung sollte vermieden werden, da sie Hautreizungen und Verbrennungen verursachen kann.
18. Die Entsorgung aller Bestandteile sollte gemäß der Vorschriften einer entsprechenden nationalen Gefahrenstoff-Sicherheitsrichtlinie erfolgen.
19. Informationen zu im Kit enthaltenen gefährlichen Substanzen entnehmen Sie bitte dem Material Sicherheitsdatenblatt. Material Sicherheitsdatenblätter für dieses Produkt sind auf Anfrage direkt von der Firma Demeditec Diagnostics GmbH erhältlich.

4 KITBESTANDTEILE

4.1 Mitgelieferte Komponenten

1. **SORB | MT** Mikrotiterplatte, 12 x 8 (einzeln brechbare) Mikrotiterstreifen mit 96 Vertiefungen; beschichtet mit anti-17-OH-Progesteron Antikörper (polyclonal)
2. **CAL | 0** Standard 0 (Nullstandard), 1 Fläschchen, 1 ml, gebrauchsfertig
3. **CAL | 1-5** Standards (Standard 1-5), 5 Fläschchen, je 0,5 ml, gebrauchsfertig
Konzentrationen: 0,1 - 0,4 - 1,6 - 6,5 - 25 ng/ml
4. **CONTROL | 1-2** Kontrolle 1 (niedrig) / Kontrolle 2 (hoch), 2 Fläschchen, je 0.5 ml, gebrauchsfertig; enthalten 17-OH-Progesteron in Serum. Kontrollwerte und -bereiche entnehmen Sie bitte dem QC-Datenblatt.
5. **ENZ | CONJ** Enzymkonjugat, 1 Fläschchen, 11 ml, gebrauchsfertig; 17-OH-Progesteron, konjugiert mit Meerrettichperoxidase
6. **SUB | TMB** Substratlösung, 1 Fläschchen, 22 ml, gebrauchsfertig; Tetramethylbenzidine (TMB)
7. **STOP | SOLN** Stopplösung, 1 Fläschchen, 7 ml, gebrauchsfertig; enthält 2 N Säure. Kontakt mit der Stopplösung vermeiden. Kann Hautreizungen und Verbrennungen verursachen.
8. **WASH | SOLN | 10x** Waschlösung, 1 Fläschchen, 50 ml (10X konzentriert); siehe "Vorbereitung der Reagenzien"

4.2 Nicht im Kit enthaltene aber erforderliche Geräte und Materialien

- Zentrifuge
- Kalibriertes Mikrotiterplatten-Lesegerät mit 450±10 nm Filter
- Mikrotiterplatten-Schüttler mit mind. 600 rpm (optional)
- Vortex-Mixer
- Kalibrierte variable Präzisions-Mikropipetten (25 µl, 50 µl, 100 µl, 200 µl)
- Saugfähiges Papier
- Aqua dest.
- Zeitnahmegerät
- Semilogarithmisches Papier oder Software zur Datenverarbeitung

4.3 Lagerung und Haltbarkeit des Kits

Die ungeöffneten Reagenzien behalten bei Lagerung um 2-8°C ihre Reaktivität bis zum Verfallsdatum. Nach dem Verfallsdatum die Reagenzien nicht mehr verwenden. Nach dem Öffnen sollten alle Reagenzien bei 2-8°C gelagert werden. Nach dem ersten Öffnen sind die Reagenzien bei sachgemäßer Abarbeitung und Lagerung 30 Tage stabil.

Die Mikrotiterstreifen sollten bei 2-8°C gelagert werden. Der einmal geöffnete Folienbeutel sollte stets sehr sorgfältig wieder verschlossen werden.

4.4 Vorbereitung der Reagenzien

Alle Reagenzien sowie die benötigte Anzahl von Mikrotiterstreifen sollen vor dem Gebrauch auf Raumtemperatur (18-25°C) gebracht werden.

Waschlösung

Die 10-fach konzentrierte Waschlösung (50 ml) mit 450 ml destilliertem Wasser auf ein Gesamtvolumen von 500 ml verdünnen. Die verdünnte Waschlösung ist bei Raumtemperatur (18-25°C) für mindestens 12 Wochen stabil.

4.5 Entsorgung des Kits

Die Entsorgung des Kits muss gemäß den nationalen gesetzlichen Vorschriften erfolgen. Spezielle Informationen für dieses Produkt finden Sie im Materialsicherheitsdatenblatt.

4.6 Beschädigte Testkits

Im Falle einer starken Beschädigung des Testkits oder der Komponenten muss die Firma Demeditec in schriftlicher Form spätestens eine Woche nach Erhalt des Kits informiert werden. Stark beschädigte Einzelkomponenten sollten nicht für den Testlauf verwendet werden. Sie müssen gelagert werden, bis eine endgültige Lösung gefunden wurde. Danach sollten sie gemäß den offiziellen Richtlinien entsorgt werden.

5 PROBENENTNAHME UND -VORBEREITUNG

Zur Bestimmung von 17-OH-Progesteron ist **Serum und Plasma (EDTA)** geeignet. Für eine Bestimmung werden 25 µl Probenvolumen benötigt. Die Proben sollten unverzüglich verwendet werden oder aliquotiert bei $\leq -20^{\circ}\text{C}$ gelagert werden. Wiederholte Gefrierzyklen sollten vermieden werden. Proben mit einer erwarteten 17-OH-Progesteron-Konzentration höher als der höchste Standard (25 ng/ml) sollten vor Durchführung des Tests mit Nullstandard verdünnt werden. Die zusätzliche Verdünnung muss in die Kalkulation der Ergebnisse mit berücksichtigt werden. Keine hämolytischen, ikterischen oder lipämischen Proben verwenden.

6 TESTDURCHFÜHRUNG

6.1 Allgemeine Hinweise

- Alle Reagenzien und Proben müssen vor Gebrauch auf Raumtemperatur (18-25°C) gebracht und gut durchgemischt werden. Dabei sollte Schaumbildung vermieden werden.
- Wenn die Testdurchführung einmal begonnen wurde, muss sie ohne Unterbrechung zu Ende geführt werden.
- Für jeden Standard, jede Kontrolle oder Probe sollte eine neue Pipettenspitze verwendet werden, um Verschleppungen zu vermeiden.
- Die Optische Dichte ist abhängig von Inkubationszeit und Temperatur. Deshalb ist es notwendig, vor Beginn der Testdurchführung alle Reagenzien in einen arbeitsbereiten Zustand zu bringen, die Deckel der Fläschchen zu öffnen, alle benötigten Vertiefungen in den Halter zu setzen. Nur eine solche Vorbereitung garantiert gleiche Zeiten für jeden Pipettiervorgang ohne Pausen.
- Als generelle Regel gilt, dass die enzymatische Reaktion linear proportional zu Zeit und Temperatur ist.
- Die in der Gebrauchsanweisung angegebenen Inkubationszeiten müssen eingehalten werden.

6.2 Testdurchführung

Jeder Testlauf muss eine Standardkurve beinhalten.

1. Die benötigte Anzahl an **Mikrotiterstreifen** in der Halterung befestigen.
2. Je **25 µl Standards, Kontrollen und Proben** mit neuen Plastikspitzen in die entsprechenden Vertiefungen geben.
3. **100 µl des Enzymkonjugats** in jede Vertiefung geben.
10 Sekunden gründlich mischen, da eine komplette Vermischung in diesem Schritt sehr wichtig ist.
4. **60 Minuten** bei Raumtemperatur inkubieren. Das Schütteln auf einem Mikrotiterplatten-Schüttler während der Inkubation ist nicht nötig, verbessert aber die Sensitivität geringfügig.
5. Den Inhalt der Vertiefungen kräftig ausschütten. Vertiefungen **4mal** mit verdünnter **Waschlösung** (300 µl pro Vertiefung) waschen. Restliche Flüssigkeit durch Ausklopfen der Mikrotiterplatte auf saugfähigem Papier entfernen.
Achtung: Die Sensitivität und Präzision des Assays wird deutlich durch die korrekte Durchführung des Waschschrilles beeinflusst.
6. **200 µl Substratlösung** in jede Vertiefung geben.
7. **30 Minuten** bei Raumtemperatur im Dunkeln inkubieren.
8. Die enzymatische Reaktion durch Zugabe von **50 µl Stopplösung** in jede Vertiefung abstoppen.
9. Die Optische Dichte bei **450±10 nm** mit einem Mikrotiterplatten-Lesegerät innerhalb von 15 Minuten nach Zugabe der Stopplösung bestimmen.

6.3 Ergebnisermittlung

1. Die Mittelwerte der Optischen Dichte (OD) für jedes Set von Standards, Kontrollen und Patientenproben bestimmen.
2. Eine Standardkurve ermitteln durch Auftragen der mittleren Optischen Dichte jedes Standards gegen die Konzentration, wobei der OD-Wert auf der vertikalen (Y) Achse und die Konzentration auf der horizontalen (X) Achse eingetragen wird.
3. Unter Verwendung der mittleren OD wird für jede Probe die entsprechende Konzentration aus der Standardkurve ermittelt.
4. Automatische Methode: Die in der Arbeitsanleitung ermittelten Werte wurden automatisch mit Hilfe der 4 Parameter Gleichung (4PL, 4 Parameter Logistics) bestimmt. Andere Auswertungsfunktionen können leicht abweichende Werte ergeben.
5. Die Konzentration der Proben kann direkt von der Standardkurve abgelesen werden. Proben, die eine höhere Konzentration als die des höchsten Standards enthalten, müssen mit Nullstandard verdünnt werden. Dieser Verdünnungsfaktor muss bei der Berechnung der Konzentration beachtet werden.

Umrechnung in SI Einheiten:

17-OH-Progesteron (ng/ml) x 3,03 = nmol/l

6.3.1 Beispiel für eine Standardkurve

Nachfolgend wird ein typisches Beispiel für eine Standardkurve gezeigt. Diese darf aber nicht zur Kal-
kulation eines anderen Testlaufes verwendet werden.

Standard	OD (450nm)
Standard 0 0,0 ng/ml	3,025
Standard 1 0,1 ng/ml	2,653
Standard 2 0,4 ng/ml	2,308
Standard 3 1,6 ng/ml	1,638
Standard 4 6,5 ng/ml	0,904
Standard 5 25 ng/ml	0,443

7 ERWARTETE WERTE

Augenscheinlich gesunde Spender zeigten folgende 17-OH-Progesteron-Werte:

Kinder	3 -14 Jahre	0,05 – 2,0 ng/ml
Reproduktionsphase der Frauen	Follikelphase:	0,1 – 1,0 ng/ml
	Lutealphase:	0,6 – 2,5 ng/ml
	Ovulation:	0,3 – 1,5 ng/ml
	nach ACTH-Stimulation:	< 3,2 ng/ml
	Schwangerschaft (3. Trimester):	2,0 - 12 ng/ml
	Postmenopausale Frauen:	0,13 – 0,6 ng/ml
Männer		0,5 – 3,0 ng/ml

Therapeutische Konsequenzen sollten nicht allein auf Basis der mit diesem Test ermittelten Werte getroffen werden, sondern unter Berücksichtigung klinischer Beobachtungen und weiterer diagnostischer Tests. Es wird empfohlen, dass jedes Labor seine eigenen normalen und abnormalen Werte ermittelt.

8 QUALITÄTSKONTROLLE

Es wird empfohlen, die Kontrollproben gemäß den nationalen gesetzlichen Bestimmungen einzusetzen. Durch die Verwendung von Kontrollproben wird eine Tag-zu-Tag-Überprüfung der Ergebnisse erzielt. Es sollten Kontrollen sowohl mit normalen als auch pathologischen Werten eingesetzt werden.

Die Kontrollen mit den entsprechenden Ergebnissen des QC-Labors sind im QC-Zertifikat, das dem Kit beiliegt, aufgeführt. Die im QC-Blatt angegebenen Werte und Bereiche beziehen sich stets auf die aktuelle Kitcharge und sollten zum direkten Vergleich der Ergebnisse verwendet werden. Es wird empfohlen, an den einschlägigen Ringversuchen teilzunehmen.

Es sollten geeignete statistische Methoden zur Analyse von Kontroll-Werten und Trends angewendet werden. Wenn die Ergebnisse des Assays nicht mit den angegebenen Akzeptanzbereichen des Kontrollmaterials übereinstimmen, sollten die Patientenergebnisse als ungültig eingestuft werden.

In diesem Fall überprüfen Sie bitte die folgenden Bereiche: Pipetten und Zeitnehmer, Photometer, Verfallsdatum der Reagenzien, Lagerungs- und Inkubationsbedingungen, Absaug- und Waschmethode. Sollten Sie nach Überprüfung der vorgenannten Bereiche keinen Fehler erkannt haben, setzen Sie sich bitte mit Ihrem Lieferanten oder direkt mit der Firma Demeditec in Verbindung.

9 ASSAY CHARACTERISTIKA

9.1 Analytische Sensitivität

Die analytische Sensitivität, definiert als Mittelwert (n=20) minus der zweifachen Standardabweichung des Standards 0 beträgt 0,014 ng/ml.

9.2 Spezifität der Antikörper (Kreuzreaktivität)

Die Daten entnehmen Sie bitte der ausführlichen englischen Arbeitsanleitung.

9.3 Messbereich

Der Messbereich des Testes liegt zwischen 0,1 - 25 ng/ml.

Die Daten zu:

9.4 Präzision

9.5 Wiederfindung

9.6 Linearität

entnehmen Sie bitte der ausführlichen englischen Arbeitsanleitung.

10 GRENZEN DES TESTS

Jede unsachgemäße Behandlung von Proben oder Modifikationen dieses Tests können die Ergebnisse beeinflussen.

10.1 Beeinflussung durch Medikamente

Uns sind bislang keine Stoffe (Medikamente) bekannt geworden, deren Einnahme die Messung des 17-OH-Progesteron-Gehaltes der Probe beeinflussen würde.

11 RECHTLICHE GRUNDLAGEN

11.1 Zuverlässigkeit der Ergebnisse

Der Test muss exakt gemäß der Testanleitung des Herstellers abgearbeitet werden. Darüber hinaus muss der Benutzer sich strikt an die Regeln der GLP (Good Laboratory Practice) oder andere eventuell anzuwendende Regeln oder nationale gesetzliche Vorgaben halten. Dies betrifft besonders den Gebrauch der Kontrollreagenzien. Es ist sehr wichtig, bei der Testdurchführung stets eine ausreichende Anzahl Kontrollen zur Überprüfung der Genauigkeit und Präzision mitlaufen zu lassen. Die Testergebnisse sind nur gültig, wenn alle Kontrollen in den vorgegebenen Bereichen liegen, und wenn alle anderen Testparameter die vorgegebenen Spezifikationen für diesen Assay erfüllen. Wenn Sie bezüglich eines Ergebnisses Zweifel oder Bedenken haben, setzen Sie sich bitte mit der Firma Demeditec in Verbindung.

11.2 Therapeutische Konsequenzen

Therapeutische Konsequenzen sollten keinesfalls nur aufgrund von Laborergebnissen erfolgen, selbst dann nicht, wenn alle Testergebnisse mit den in 11.1. genannten Voraussetzungen übereinstimmen. Jedes Laborergebnis ist nur ein Teil des klinischen Gesamtbildes eines Patienten. Nur in Fällen, in denen die Laborergebnisse in akzeptabler Übereinstimmung mit dem allgemeinen klinischen Bild des Patienten stehen, sollten therapeutische Konsequenzen eingeleitet werden. Das Testergebnis allein sollte niemals als alleinige Grundlage für die Einleitung therapeutischer Konsequenzen dienen.

11.3 Haftung

Jegliche Veränderungen des Testkits und/oder Austausch oder Vermischung von Komponenten unterschiedlicher Chargen von einem Testkit zu einem anderen, können die gewünschten Ergebnisse und die Gültigkeit des gesamten Tests negativ beeinflussen. Solche Veränderungen und/oder Austausch haben den Ausschluss jeglicher Ersatzansprüche zur Folge. Reklamationen, die aufgrund von Falschinterpretation von Laborergebnissen durch den Kunden gemäß Punkt 11.2 erfolgen, sind ebenfalls abzuweisen. Im Falle jeglicher Reklamation ist die Haftung des Herstellers maximal auf den Wert des Testkits beschränkt. Jegliche Schäden, die während des Transports am Kit entstanden sind, unterliegen nicht der Haftung des Herstellers.

12 REFERENZEN

Angaben zu den Referenzen entnehmen Sie bitte der ausführlichen englischen Arbeitsanleitung.

1 INTRODUCCIÓN

1.1 Intención de Uso

Ensayo inmunoenzimático para la determinación cuantitativa in-vitro de 17-OH-progesterona en suero y plasma (EDTA) humano.

1.2 Resumen y Explicación

La hormona esteroide 17-OH-progesterona (17-OHP) se produce en la corteza suprarrenal y en las gónadas. Efectos gestágenicos ejercidos por 17-OHP son pequeños. Sin embargo, esta hormona es de importancia clínica, ya que representa el último precursor de 11β -desoxicortisol (compuestos, CPS). CPS es formado por la hidroxilación de la actividad enzimática en el átomo de carbono C 21. de 21-hidroxilasa en la corteza suprarrenal por lo tanto pueden ser controlados mediante el análisis del nivel de 17-OHP en la sangre.

Las deficiencias en 21-hidroxilasa, se encuentran más comúnmente en la hiperplasia suprarrenal congénita, resultan en la secreción excesiva de 17-OHP y por consiguiente en los niveles sanguíneos mejorados. Las deficiencias en la 21-hidroxilasa, sin embargo, solamente conducen a valores de 17-OHP moderadamente aumentados. El análisis de esta hormona esteroide, por lo tanto, desempeña un papel significativo en el diagnóstico diferencial de la hiperplasia suprarrenal congénita. En las mujeres adultas, no embarazadas, 17-OHP los niveles en la sangre dependen de la fase del ciclo menstrual. Al igual que la progesterona, 17-OHP es secretada por el folículo maduro y el cuerpo lúteo. Las concentraciones son generalmente más altas después de la ovulación.

Además, los niveles de 17-OHP son influenciados por ritmos diurnos que se correlacionan con la secreción adrenal de cortisol. Los niveles máximos se encuentran en las muestras recogidas entre la media noche y las 8.00 am.

En hombres adultos, hay pocos indicios de fluctuaciones similares de los niveles de 17-OHP.

Durante el embarazo, grandes cantidades de 17-OHP son producidas por el feto, la placenta y la corteza suprarrenal. La hormona se secreta en el feto y la circulación de la sangre materna. Valores maternos de 17-OHP aumentan fuertemente después de la semana 32 de embarazo. Alcanza 4 veces niveles más altos que durante la fase lútea del ciclo menstrual. 17-OHP también se puede encontrar en el cordón umbilical de los recién nacidos.

2 PRINCIPIO

Se trata de un ensayo de inmunoabsorción de una enzima ligada en fase sólida (ELISA) basado en el principio de la competencia. Una cantidad desconocida de antígeno presente en la muestra y una cantidad fija de antígeno marcado con enzima compiten por los sitios de unión de los anticuerpos recubiertas sobre los pocillos. Después de la incubación se lavan los pocillos para detener la reacción de competencia. Después de la reacción del sustrato la intensidad del color desarrollado es inversamente proporcional a la cantidad del antígeno en la muestra. Los resultados de las muestras se pueden determinar directamente usando la curva estándar.

3 ADVERTENCIAS Y PRECAUCIONES

1. Este KIT es sólo para uso diagnóstico in vitro. Sólo para uso profesional.
2. Antes de comenzar el ensayo, lea las instrucciones completa y cuidadosamente. Use la versión válida del prospecto proporcionado con el kit.
3. Todos los reactivos de origen humano usados en la preparación de los reactivos se han comprobado y han resultado negativos para la presencia de anticuerpos anti-VIH, para HbsAg y para anticuerpos anti-VHC. Sin embargo, ningún ensayo ofrece seguridad absoluta de la ausencia de VIH, VHB, VHC o de otros agentes infecciosos. Por lo tanto, los Calibradores y los Controles deben manipularse como material potencialmente infeccioso.
4. La microplaca contiene tiras desprendibles. Pozos no utilizados deben conservarse a 2°C y 8°C en la bolsa de aluminio sellada y utilizarse en el marco o soporte proporcionado.
5. El pipeteo de muestras y reactivos debe realizarse lo antes posible y en la misma secuencia para cada paso.
6. Utilice los embases solamente para los reactivos individuales. Esto se aplica especialmente a los depósitos de sustrato. El uso de un depósito para dispensar una solución de sustrato que habían sido previamente utilizado para la solución de conjugado puede convertirse solución coloreada. No vierta reactivos de nuevo en los viales ya que puede producirse la contaminación de los reactivos.
7. Mezcle el contenido de los pocillos de la microplaca a fondo para asegurar buenos resultados de las pruebas. No reutilice los pocillos.
8. No permita que los pozos se sequen durante el ensayo; añadir los reactivos inmediatamente después de completar los pasos de enjuague.
9. Permitir que los reactivos alcancen la temperatura ambiente (18 a 25°C) antes de comenzar la prueba. La temperatura afectará las lecturas de absorbancia del ensayo. Sin embargo, los valores para las muestras de los pacientes no se verán afectados.
10. Nunca pipetear con la boca y evitar el contacto de los reactivos y las muestras con la piel y las mucosas.
11. No fumar, comer, beber o aplicar cosméticos en áreas en las muestras o reactivos del kit que se manejan.
12. Use guantes de látex desechables al manipular muestras y reactivos. La contaminación microbiana de los reactivos o muestras puede dar resultados falsos.
13. La manipulación debe hacerse de acuerdo con los procedimientos definidos por una directriz de seguridad de riesgo biológico o normativas nacionales pertinentes.
14. No utilizar los reactivos después de la fecha de caducidad, que se muestran en las etiquetas del kit.
15. Los volúmenes indicados tienen que ser realizados de acuerdo con el protocolo. Resultados de las pruebas óptimas solamente se obtienen al utilizar pipetas calibradas y lectores automatizados o semiautomatizados.
16. No mezclar o utilizar componentes de kits con diferentes números de lote. Se recomienda no intercambiar pocillos de distintas placas incluso del mismo lote. Los kits pueden haber sido enviados o almacenado en diferentes condiciones y las características de unión de las placas pueden resultar un poco diferente.
17. Evitar el contacto con la solución de parada. Puede causar irritación de la piel y quemaduras.
18. Productos químicos y reactivos preparados o usados deben ser tratados como desechos peligrosos de acuerdo con la directriz o la regulación nacional de seguridad de riesgo biológico.
19. Para más información consulte las hojas de datos de seguridad de Sheets. Safetly de este producto están disponibles bajo petición directamente desde Demeditec Diagnostics GmbH.

4 REACTIVOS

4.1 Reactivos provistos

1. **SORB MT Microplaca**, 12x8 tiras (separables), 96 pozos; Pocillos recubiertos con un anticuerpo anti progesterona-OH-17 (policlonal)
2. **CAL 0 Calibrador 0** frasco, 1 ml, listo para su uso
3. **CAL 1-5 Calibrador** (Calibrador 1-5), 5 viales, 0,5 ml cada uno, listo para su uso
Concentraciones: 0,1 - 0,4 - 1,6 - 6,5 - 25 ng /ml
4. **CONTROL 1-2 Control 1 (bajo) / control 2 (alto)**, 2 viales, 0,5 ml cada uno, listo para su uso; contienen 17-OH-progesterona en suero. Para los valores de control y rangos consulte QC- Hoja de datos
5. **ENZ CONJ Enzima - Conjugado**, 1 vial, 11 ml, listo para su uso; 17-OH-progesterona conjugado con peroxidasa de rábano picante
6. **SUB TMB Solución TMB Sustrato**, 1 vial, 22 ml, listo para su uso; Tetrametilbenzidina (TMB)
7. **STOP SOLN Solución de Parada**, 1 vial, 7 ml, listo para su uso; contiene 2N solución ácida. Evite el contacto con la solución de parada. Puede causar irritaciones y quemaduras en la piel.
8. **WASH SOLN 10x Solución de Lavado**, 1 vial, 50 ml (10 veces más concentrado); consulte la sección "Preparación de los reactivos"

4.2 Material requerido, pero no provisto

- Microcentrífuga
- Un lector calibrado (450 ± 10 nm)
- Mezclador de microplacas que opere a aproximadamente 600 rpm, opcional
- Vortex
- Micropipetas calibradas de precisión variables (25 µl, 50 µl 100 µl, 200 µl)
- Papel absorbente
- Agua destilada o desionizada
- Cronómetro.

4.3 Condiciones de Almacenamiento

Cuando se almacena a 2 y 8°C los reactivos sin abrir son estables hasta la fecha de caducidad. No utilizar los reactivos después de esta fecha. Los reactivos abiertos deben conservarse a 2 y 8°C. Una vez abiertos los reactivos son estables durante 30 días si se realiza y se almacena correctamente. Los pozos se deben almacenar entre 2 y 8°C. Una vez que la bolsa de aluminio se ha abierto, se debe tener cuidado para cerrarla herméticamente de nuevo.

4.4 Preparación de los reactivos

Deje que los reactivos y el número necesario de pozos alcancen la temperatura ambiente (18-25°C) antes de comenzar la prueba.

Solución de Lavado

Añadir agua desionizada al concentrado 10X Solución de Lavado. Diluir 50 ml de solución de lavado concentrado con 450 ml de agua desionizada hasta un volumen final de 500 ml. La solución de lavado diluida es estable durante 12 semanas a temperatura ambiente.

4.5 Eliminación de los Kit

La eliminación del kit debe hacerse de acuerdo con las regulaciones nacionales. Información especial para este producto se presenta en la Hoja de Datos de Seguridad del Material.

4.6 Kits de prueba dañados

En caso de daño severo del kit o componentes de prueba, Demeditec tiene que ser informado por escrito, más tardar una semana después de recibir el kit. Componentes individuales severamente dañados no se deben usar para una prueba de funcionamiento. Ellos tienen que ser almacenados hasta que se encuentre una solución definitiva. Después de esto, deben desecharse de acuerdo con las disposiciones oficiales.

5 TOMA Y PREPARACIÓN DE LAS MUESTRAS

Para la determinación de 17-OH-progesterona muestras de suero y plasma (EDTA) pueden ser utilizadas. El procedimiento requiere 25 µL de muestra por pocillo. Las muestras deben analizarse inmediatamente o alícuotas y se almacenan a $\leq -20^{\circ}\text{C}$. Evite los ciclos de congelación y descongelación repetidas. Las muestras que se esperan que contengan concentraciones de 17-OH-progesterona más altas que el calibrador (más alto 25 ng/ml) se deben diluir con el calibrador cero antes del ensayo. La etapa de dilución adicional tiene que ser tomado en cuenta para el cálculo de los resultados. No utilice muestras hemolizadas, ictéricas o lipémicas.

6 PROCEDIMIENTO DEL ENSAYO

6.1 Observaciones Generales

- Todos los reactivos y las muestras se debe permitir que alcancen la temperatura ambiente antes de su uso. Todos los reactivos deben mezclarse sin formar espuma o burbujas.
- Una vez que se ha iniciado la prueba, todos los pasos deben ser completados sin interrupción.
- Utilizar nuevas puntas de plástico dispuestas para cada estándar, control o muestra con el fin de evitar la contaminación cruzada.
- La absorbancia es una función del tiempo de incubación y la temperatura. Antes de comenzar el ensayo, se recomienda que todos los reactivos están listos, tapas removidas, todos los pocillos necesarios fijados en el soporte, etc. Esto se asegurará la igualdad en el tiempo transcurrido para cada paso de pipeteo sin interrupciones.
- Como regla general la reacción enzimática es linealmente proporcional al tiempo y la temperatura.
- Respetar los tiempos de incubación como se indica en estas instrucciones de uso.

6.2 Procedimiento del Ensayo

Cada corrida debe incluir una curva estándar.

1. Asegure el número deseado de tiras de pozos en el soporte del bastidor.
2. Dispensar 25 µl de cada estándar, control y muestra con puntas nuevas en los pocillos adecuados.
3. Dispensar 100 µl de conjugado en cada pocillo.
4. Mezclar durante 10 segundos. Es importante tener un mezclado completo en este paso.
5. Incubar durante 60 minutos a temperatura ambiente. Sacudir en un agitador horizontal durante la incubación no es necesario, pero mejora ligeramente la sensibilidad de la prueba.
6. Vaciar el contenido de los pocillos enérgicamente mediante aspiración o por decantación.
7. Lavar los pocillos 4 veces con solución de lavado diluido (300 µl por pocillo). Golpee los pozos con fuerza en el papel absorbente para eliminar las gotas residuales.

Nota IMPORTANTE: La sensibilidad y la precisión de este ensayo es marcadamente influenciados por el correcto funcionamiento del procedimiento de lavado!

8. Añadir 200 µl de solución de sustrato a cada pocillo.
9. Incubar durante 30 minutos en la oscuridad a temperatura ambiente.
10. Detenga la reacción enzimática mediante la adición de 50 µl de solución de parada a cada pocillo.
11. Determinar la absorbancia de cada pocillo a 450 ± 10 nm.
12. Se recomienda que los pozos sean leídos dentro de los 15 minutos.

6.3 Cálculo de los resultados

1. Calcular los valores medios de absorbancia para cada conjunto de calibradores, controles y muestras de pacientes.
2. Construir una curva estándar trazando la absorbancia media obtenida de cada estándar frente a su concentración con el valor de la absorbancia en el (Y) eje vertical y la concentración en el eje horizontal (X).
3. Usando el valor de absorbancia media para cada muestra determinar la concentración correspondiente de la curva estándar.
4. Método automatizado: Los resultados en la IFU se han calculado de forma automática utilizando un 4 PL (Logística Parámetro 4) ajuste de la curva. 4 Parametro Logistico es el método de cálculo preferido. Otras funciones de reducción de datos pueden dar resultados ligeramente diferentes.
5. La concentración de las muestras se puede leer directamente de la curva estándar. Las muestras con concentraciones superiores a la del mayor estándar deben ser diluidas con el calibrador cero. Para el cálculo de las concentraciones el factor de dilución tiene que ser tomado en cuenta.

Conversion al S.I de unidades

17-OH-Progesterona (ng/ml) x 3.03 = nmol/l

6.3.1 Ejemplo de una curva de calibración.

Los siguientes datos son sólo para demostración y no puede ser utilizada en lugar de las generaciones de datos reales en el momento de ensayo.

Calibrador		OD (450nm)
Calibrador 0	0.0 ng/ml	3.025
Calibrador 1	0.1 ng/ml	2.653
Calibrador 2	0.4 ng/ml	2.308
Calibrador 3	1.6 ng/ml	1.638
Calibrador 4	6.5 ng/ml	0.904
Calibrador 5	25 ng/ml	0.443

7 VALORES ESPERADOS

Los sujetos aparentemente sanos presentan los siguientes valores de 17-OH-Progesterona:

Niños	3 -14 años	0.05 - 2.0 ng/ml
Mujeres en edad reproductiva	Fase Follicular:	0.1 - 1.0 ng/ml
	Fase Lutea:	0.6 - 2.5 ng/ml
	Ovulacion:	0.3 - 1.5 ng/ml
	Post ACTH:	<3.2 ng/ml
	Tercer Trimestre:	2.0 - 12 ng/ml
	Mujeres Postmenopausicas:	0.13 - 0.6 ng/ml
Hombres Normales		0.5 - 3 ng/ml

Los resultados en sí no deben ser la única razón para un tratamiento. Tienen que correlacionarse con observaciones clínicas y ensayos de diagnóstico. Se recomienda que cada laboratorio establezca su propio rango de valores normales.

8 CONTROL DE CALIDAD

Buenas prácticas de laboratorio requiere que los controles se procesen con cada curva de calibración. Un número estadísticamente significativo de los controles debe ser analizado para establecer los valores medios y rangos aceptables para asegurar un rendimiento adecuado.

Se recomienda el uso de muestras de control de acuerdo con las regulaciones estatales y federales. Se recomienda el uso de muestras de control para asegurar el día a día la validez de los resultados. Utilice los controles en ambos niveles (normales y patológicos).

Los controles y los resultados correspondientes del control de calidad del laboratorio se indican en el certificado de control de calidad añadido al kit. Los valores y rangos indicados en la hoja de control de calidad se refieren siempre al lote del kit actual y deben ser utilizados para la comparación directa de los resultados.

También se recomienda hacer uso de los programas nacionales o internacionales de evaluación de la calidad con el fin de asegurar la exactitud de los resultados.

Emplear métodos estadísticos apropiados para el análisis de los valores de control y las tendencias. Si los resultados del ensayo no se ajustan a los rangos establecidos aceptables de materiales de control de los resultados del paciente debe ser considerado válido.

En este caso, por favor revise las siguientes áreas técnicas: dispositivos de pipeteo y de calendario; fotómetro, fechas de vencimiento de los reactivos, el almacenamiento y las condiciones de incubación, la aspiración y métodos de lavado.

Después de comprobar los puntos mencionados arriba sin encontrar ningún error, contactar con su distribuidor o DEMEDITEC directamente.

9 CARACTERÍSTICAS DE RENDIMIENTO

9.1 Sensibilidad Analítica

La sensibilidad analítica del DEMEDITEC ELISA se calculó restando 2 desviaciones estándar de la media de veinte (20) de análisis duplicados de 0. La sensibilidad analítica del ensayo es de 0,014 ng/ml.

9.2 Especificidad (Reacción Cruzada)

Los siguientes analitos pueden generar reacción cruzada.

Analito	% Reacción Cruzada
Androstendiona	< 0,1%
Testosterona	< 0,1%
Cortisol	0,05%
11-Desoxicortisol	2,71%
Cortisona	0,19%
Corticosterona	<0,1%
11-Deoxycorticosterona	0,26%
Progesterona	2,9%
Estradiol	< 0,1%
Estriol	< 0,1%
Estrona	< 0,1%
Pregnenolona	0,17%
Prednisolona	< 0,1%
Prednisona	0,11%
DHEA	< 0,1%
DHEA-S	< 0,1%
Danazol	< 0,1%
Dexametasona	< 0,1%

9.3 Rango Dinámico de Ensayo

El ensayo se encuentra en el siguiente rango: 0.1 - 25 ng/ml.

9.4 Reproducibilidad

9.4.1 Intra - Ensayo

La variación intra-ensayo se determinó mediante 20 mediciones repetidas de 3 muestras de suero dentro de un plazo utilizando el Demeditec ELISA. La variabilidad intra-ensayo se muestra a continuación:

	Muestra 1	Muestra 2	Muestra 3
Media (ng/ml)	0.52	2.29	5.86
SD (ng/ml)	0.05	0.16	0.38
CV (%)	8.9	6.9	6.6
n =	20	20	20

9.4.2 Inter - Ensayo

La variación inter-ensayo se determinó mediante mediciones duplicadas de 3 muestras de suero en 10 corridas diferentes con el DEMEDITEC ELISA. La variabilidad inter-ensayo se muestra a continuación:

	Muestra 1	Muestra 2	Muestra 3
Media (ng/ml)	0.66	2.20	4.91
SD (ng/ml)	0.1	0.18	0.31
CV (%)	14.9	8.0	6.4
n =	10	10	10

9.5 Recuperación

La recuperación se determinó por la adición de cantidades crecientes del analito a tres muestras diferentes que contienen diferentes cantidades del analito endógeno. Todas las muestras se midieron a continuación, por las recuperaciones porcentuales 17-OH-progesterona. El ensayo se determina comparando las medidas esperadas y los valores de las muestras.

Suero	Enriquecimiento	Medida de Concentración (ng/ml)	Concentración Esperada (ng/ml)	Recuperación %
1	-	0,64	-	-
	3 ng/ml	2,55	2,64	97%
	6 ng/ml	3,69	4,64	80%
	9 ng/ml	4,95	6,64	75%
2	-	0,66	-	-
	3 ng/ml	2,57	2,66	97%
	6 ng/ml	4,16	4,66	89%
	9 ng/ml	5,47	6,66	82%
3	-	2,66	-	-
	3 ng/ml	5,68	4,66	122%
	6 ng/ml	7,39	6,66	111%
	9 ng/ml	9,87	8,66	114%

9.6 Linealidad

Tres muestras de suero que contienen diferentes cantidades del analito se ensayaron sin diluir y se diluyeron con la matriz del calibrador. El porcentaje de recuperación se calculó mediante la comparación de los valores esperados y medidos para 17-OH-progesterona.

Suero	Dilucion	Concentración Medida (ng/ml)	Concentración Esperada (ng/ml)	Recuperación %
1	-	21,06	-	-
	1 en 2	10,00	10,53	95%
	1 en 4	4,98	5,26	95%
	1 en 8	2,49	2,63	95%
2	-	15,06	-	-
	1 en 2	7,84	7,53	104%
	1 en 4	4,54	3,77	120%
	1 en 8	2,33	1,88	124%
3	nativo	23,38	-	-
	1 en 2	11,43	11,69	98%
	1 en 4	5,49	5,84	94%
	1 en 8	2,49	2,92	85%

10 LIMITACIONES DEL PROCEDIMIENTO

Se obtendrán resultados fiables y reproducibles cuando el procedimiento de ensayo se realiza con una comprensión completa del prospecto y con el cumplimiento de buenas prácticas de laboratorio. Cualquier manipulación inadecuada de las muestras o modificación de esta prueba podrían influir en los resultados.

10.1 Interferencias Medicamentosas

Hasta hoy no hay sustancias (medicamentos) conocidos por nosotros, que tengan influencia en la medición de 17-OH-progesterona en una muestra.

11 ASPECTOS LEGALES

11.1 Confiabilidad de los resultados

El ensayo debe realizarse exactamente según las instrucciones del fabricante para su uso. Además, el usuario debe seguir estrictamente las reglas de GLP (Good Laboratory Practice) u otras normas y / o leyes nacionales aplicables. Esto es especialmente relevante para el uso de reactivos de control. Es importante incluir siempre, dentro del procedimiento de prueba, un número suficiente de controles para validar la exactitud y precisión de la prueba. Los resultados de las pruebas son válidas sólo si todos los controles están dentro de los rangos especificados y si todos los demás parámetros de ensayo están también dentro de las especificaciones de ensayo dadas. En caso de cualquier duda o inquietud, por favor póngase en contacto con Demeditec.

11.2 Tratamiento

El tratamiento nunca debe basarse en los resultados de laboratorio por sí solos, incluso si todos los resultados de las pruebas están de acuerdo con los artículos según lo indicado en el punto 11.1. Cualquier resultado de laboratorio es sólo una parte del cuadro clínico total de un paciente. Sólo en los casos en que los resultados de laboratorio están en acuerdo con el cuadro clínico general del paciente debe ser derivado en tratamiento. El resultado de la prueba en sí no debe ser el único factor determinante para derivar tratamientos.












11.3 Responsabilidad

Cualquier modificación del kit de prueba y / o canje o la mezcla de los componentes de diferentes lotes de un kit de prueba a otro podría afectar negativamente a los resultados previstos y la validez de la prueba general. Dicha modificación y / o intercambios invalidan cualquier reclamación de reemplazo. Las reclamaciones presentadas debido a la mala interpretación de clientes de los resultados de laboratorio sometidos a punto 11.2. también son válidos. De todos modos, en el caso de cualquier reclamación, la responsabilidad del fabricante es que no exceda el valor del kit de prueba. Cualquier daño causado al equipo de prueba durante el transporte no está sujeto a la responsabilidad del fabricante.

12 REFERENCIAS

1. Abraham, G.E., R.S. Swerdloff, D. Tulchinsky et al: Radioimmunoassay of plasma 17-hydroxyprogesterone. *J. Clin. Endocrinol.Metab.* 33:42, 1971
2. Chrousos, G.P., D. L. Loriaux, D.L. Mann, et al: Late onset 21- hydroxylase deficiency mimicking idiopathic hirsutism or polycystic ovarian disease. *Annals Intern. Med.* 96:143, 1982.
3. Buster, J.E., R.J. Chang, D.L. Preston, et al: Interrelationships of circulating maternal steroids; progesterone, 16 α -hydroxyprogesterone, 17 α -hydroxyprogesterone, 20 α -dihydroprogesterone, gamma- 5-pregnenolone, gamma-5- pregnenolone-sulfate, gamma-5-pregnenolone-sulfate and 17-hydroxy gamma-5-pregnenolone, *J. Clin. Endocrinol.Metab.* 48:133, 1979.
4. New, M.I., B. Dupont, S. Pang, et al: An update on congenital adrenal hyperplasia. *Recent Progress in Hormone Research*, 37:105, 1981.
5. J. Hotchkiss, A. Drash, et al: Micro filter paper method for 17 α -hydroxyprogesterone radioimmunoassay: Its application for rapid screening for congenital adrenal hyperplasia. *J. Clin. Endocrinol.Metab.*, 45:1003, 1977.
6. Lobo, R.A., U. Goebelsmann: Adult manifestation of congenital adrenal hyperplasia due to incomplete 21-hydroxylase deficiency mimicking polycystic ovarian disease. *Am. J. Obstet. Gynecol.*, 138:720, 1980.
7. Urban, M.D., P.A. Lee and C.J. Migeon: Adult high infertility in men with congenital adrenalized hyperplasia. *N. Engl. J. Med.* 299:1392, 1978.
8. Meikle, A.W., R.J. Worley and C.D. West: Adrenal corticoid hyper-response in hirsute women. *Fertil.Steril.* 41:575, 1984
9. Ueshiba, H., Zerah M., New M. I.: Enzyme-linked Immunosorbent assay (ELISA). Method for screening of non-classical steroid 21-Hydroxylase deficiency. *Norm. Metab. Res.* 26:43, 1994
10. Liovic M et al. CYP17 gene analysis in hyperandrogenised women with and without exaggerated 17-hydroxyprogesterone response to ovarian stimulation. *J. Endocrinol. Invest.*,20:189, 1997

SYMBOLS USED WITH DEMEDITEC ELISA'S

Symbol	English	Deutsch	Français	Espanol	Italiano
	European Conformity	CE-Konformitätskennzeichnung	Conforme aux normes européennes	Conformidad europea	Conformità europea
	Consult instructions for use	Gebrauchsanweisung beachten	Consulter les instructions d'utilisation	Consulte las Instrucciones	Consultare le istruzioni per l'uso
	In vitro diagnostic device	In-vitro-Diagnostikum	Ussage Diagnostic in vitro	Diagnóstico in vitro	Per uso Diagnostica in vitro
	For research use only	Nur für Forschungszwecke	Seulement dans le cadre de recherches	Sólo para uso en investigación	Solo a scopo di ricerca
	Catalogue number	Katalog-Nr.	Référence	Número de catálogo	No. di Cat.
	Lot. No. / Batch code	Chargen-Nr.	No. de lot	Número de lote	Lotto no
	Contains sufficient for <n> tests/	Ausreichend für "n" Ansätze	Contenu suffisant pour "n" tests	Contenido suficiente para <n> ensayos	Contenuto sufficiente per "n" saggi
	Note warnings and precautions	Warnhinweise und Vorsichtsmaßnahmen beachten	Avertissements et mesures de précaution font attention	Tiene en cuenta advertencias y precauciones	Annoti avvisi e le precauzioni
	Storage Temperature	Lagerungstemperatur	Temperature de conservation	Temperatura de conservacion	Temperatura di conservazione
	Expiration Date	Mindesthaltbarkeitsdatum	Date limite d'utilisation	Fecha de caducidad	Data di scadenza
	Legal Manufacturer	Hersteller	Fabricant	Fabricante	Fabbricante
<i>Distributed by</i>	Distributor	Vertreiber	Distributeur	Distribuidor	Distributore