

Product information

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



17-OH-Progesterone ELISA



DEH3322



96



Demeditec Diagnostics GmbH
Lise-Meitner-Strasse 2
24145 Kiel – Germany
www.demeditec.com

CONTENTS / INHALTSVERZEICHNIS / CONTENIDO

1	INTRODUCTION	3
2	PRINCIPLE	3
3	WARNINGS AND PRECAUTIONS	3
4	REAGENTS	4
5	SPECIMEN COLLECTION AND STORAGE	5
6	ASSAY PROCEDURE	5
7	EXPECTED NORMAL VALUES	7
8	QUALITY CONTROL	7
9	PERFORMANCE CHARACTERISTICS	7
10	LIMITATIONS OF PROCEDURE	9
11	LEGAL ASPECTS	10
12	REVISION HISTORY OF INSTRUCTION FOR USE	10
13	REFERENCES	11
1	EINLEITUNG	12
2	TESTPRINZIP	12
3	WARNUNGEN & VORSICHTSHINWEISE	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	19
11	RECHTLICHE GRUNDLAGEN	20
12	ÄNDERUNGSHISTORIE DER ARBEITSANLEITUNG	20
13	REFERENZEN	21
1	INTRODUCCIÓN	22
2	PRINCIPIO	22
3	ADVERTENCIAS Y PRECAUCIONES	23
4	REACTIVOS	24
5	TOMA Y PREPARACIÓN DE LAS MUESTRAS	25
6	PROCEDIMIENTO DEL ENSAYO	25
7	VALORES ESPERADOS	26
8	CONTROL DE CALIDAD	27
9	CARACTERÍSTICAS DE RENDIMIENTO	27
10	LIMITACIONES DEL PROCEDIMIENTO	29
11	ASPECTOS LEGALES	30
12	HISTORIAL DE MODIFICACIONES DE LAS INSTRUCCIONES DE TRABAJO	30
13	REFERENCIAS	31

1 INTRODUCTION

1.1 Intended use

The Demeditec 17-OH-Progesterone ELISA is an enzyme immunoassay for the quantitative determination of 17-OH-Progesterone in human serum and plasma (Li-Heparin).

The assay is intended for *in-vitro* diagnostic use by professional users only. All therapeutic consequences must take not only the test result but always also all clinical and laboratory diagnostic results into account. The laboratory values themselves must never be the sole reason for therapeutic consequences derived from them. Manual processing is recommended. The usage of laboratory automats is the user's sole responsibility. The kit is intended for single use only.

1.2 Description of the analyte

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 (compound S, CpS). CpS is formed by hydroxylation of the carbon atom C 21 of 17-OHP. 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 11-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 in the early morning.

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 maternal blood circulation. Maternal values of 17-OHP strongly increase after the 32. week of pregnancy reaching fourfold higher levels than during the luteal phase of the menstrual cycle.

2 PRINCIPLE

The Demeditec 17-OH-Progesterone ELISA is a solid phase enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) based on the competition principle. An unknown amount of antigen present in the sample and enzyme-labeled antigen compete for the binding sites of antibodies coated onto the wells. After incubation the unbound conjugate is washed off. The amount of bound peroxidase conjugate is inversely proportional to the concentration of 17-OHP in the sample. After addition of the substrate solution, the intensity of color developed is inversely proportional to the concentration of 17-OHP in the sample. The enzymatic reaction is stopped by addition of stop solution and the optical density (OD) is measured. A standard curve is constructed by plotting OD values against concentrations of standards, and concentrations of unknown samples are determined using this 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 antibodies 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 microtiter plate contains break-apart strips. Unused wells must be stored at 2-8°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 substrate solution that had previously been used for conjugate solution may turn solution colored. Do not pour reagents back into vials as reagent contamination may occur.
7. Mix the contents of the microtiter plate wells thoroughly to ensure good test results. Do not reuse wells.
8. Do not let wells dry during assay, add reagents immediately after completing the washing steps.

9. Allow the reagents to reach room temperature (18-25°C) before starting the test. Temperature will affect the optical density of the assay.
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 protective 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 microtiter plate 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 be slightly different.
17. Avoid contact with Stop Solution. It may cause skin irritation and burns.
18. Some reagents contain Proclin 300, CMIT and/or MIT as preservatives. In case of contact with eyes or skin, flush immediately with water.
19. Chemicals and prepared or used reagents have to be treated as hazardous waste according to the national biohazard safety guideline or regulation.
20. For information on hazardous substances included in the kit please refer to Safety Data Sheets. Safety Data Sheets for this product are available upon request directly from Demeditec Diagnostics GmbH or on Demeditec homepage (www.demeditec.com).
21. All serious incidents occurring in relation to products made available on the EU market in accordance with Article 2(61) of Regulation (EU) 2017/746 shall be notified to the manufacturer and to the competent authority of the Member State where the user or patient is established in accordance with Article 82 of Regulation (EU) 2017/746.
22. If product information, including labeling, is incorrect or inaccurate, please contact the kit manufacturer or supplier.

4 REAGENTS

4.1 Reagents provided

1. **SORB** **MT** **Microtiter Plate**, 12x8 (break-apart) strips, 96 wells; wells coated with a polyclonal anti-17-OH-Progesterone antibody.
2. **CAL** **0** **Calibrator 0**, 1 vial, 1 ml, ready to use; containing steroid free-serum.
3. **CAL** **1 – 5** **Calibrator (Calibrator 1-5)**, 5 vials, 0.5 ml each, ready to use, containing 17-OH-Progesterone in serum. 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; containing <0.01% CMIT/MIT and <0.02% MIT.
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 „Reagent preparation“ (4.4).

4.2 Material required but not provided

- A microtiter plate reader capable for endpoint measurement at 450 nm
- Calibrated variable precision micropipettes and multichannel pipettes with disposable pipette tips
- Microtiter plate mixer operating at 900 rpm
- Manual or automatic equipment for microtiter plate washing
- Absorbent paper
- Deionized water
- Timer
- Semilogarithmic graph paper or software for data reduction
- Vortex mixer

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. Keep away from heat and direct sunlight.

Microtiter plate wells must be stored at 2-8°C. Take care that the foil bag is sealed tightly.

4.4 Reagent preparation

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

Wash Solution

Dilute 50 ml of 10x 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 (18-25°C). Precipitates may form when stored at 2-8°C, which should dissolve again by swirling at room temperature (18-25°C). The Wash Solution should only be used when the precipitates have completely dissolved.

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 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. Afterwards they should be disposed according to the official regulations.

5 SPECIMEN COLLECTION AND STORAGE

For determination of 17-OH-Progesterone **serum or plasma** (Li-Heparin) can be used.

On average EDTA plasma and Citrate plasma values seem to be approx. 10-15% lower than serum values.

The usual precautions for venipuncture should be observed (1). It is important to preserve the chemical integrity of a blood specimen from the moment it is collected until it is assayed. Do not use hemolytic, icteric, or lipemic specimens. Furthermore, special caution is recommended when using gel collection systems, as an influence on the measurement results cannot be excluded in case of improper handling. Samples containing sodium azide should not be used in the assay.

The procedure calls for 25 µl sample per well. The samples should be assayed immediately or aliquoted and stored at ≤-20°C up to 12 months. Thawed samples should be inverted several times prior to testing. Avoid repeated freeze-thaw cycles. Samples expected to contain 17-OH-Progesterone concentrations higher than the highest calibrator (25 ng/ml) must be diluted with Calibrator 0 before assayed. The additional dilution step has to be taken into account for the calculation of the results.

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 must be completed without interruption.
- Use new disposal plastic pipette tips for each Calibrator, Control, and sample in order to avoid cross-contamination.
- Optical density 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.
- Calibrators, Controls, and samples should at least be assayed in double determinations.
- Microtiter plate washing is important. Improperly washed wells will give erroneous results. It is recommended to use a multichannel pipette or a multistepper, respectively, or an automatic microtiter plate washing system. Do not allow wells to dry between incubations. Do not scratch coated wells during rinsing and aspiration. Rinse and fill all reagents with care. While rinsing, check that all wells are filled precisely with Wash Solution, and that there are no residues in the wells.
- A Calibrator curve must be established for every run.

6.2 Assay procedure

1. Prepare a sufficient number of microtiter plate wells to accommodate Calibrators, Controls and Samples in duplicates.
2. Dispense **25 µl** of each **Calibrator**, **Control**, and **Sample** with new disposable tips into appropriate wells.
3. Dispense **100 µl Enzyme Conjugate** into each well.
4. Incubate for **60 minutes** at room temperature (18-25°C) on a microtiter plate shaker (900 rpm).
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** without shaking in the dark at room temperature (18-25°C).
8. Stop the enzymatic reaction by adding **50 µl** of **Stop Solution** to each well.
9. Determine the optical density of each well at 450 nm and read the wells within 15 minutes.

6.3 Calculation of results

1. Calculate the average optical density (OD) values for each set of Calibrators, Controls, and samples.
2. The obtained optical densities of the Calibrators (y-axis, linear) are plotted against their corresponding concentrations (x-axis, logarithmic) either on semi-logarithmic paper or using an automated method.
3. Using the mean OD value for each sample, determine the corresponding concentration from the Calibrator curve.
4. Automated method: The results in the package insert 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 Calibrator curve. Samples with concentrations higher than that of the highest Calibrator have to be further diluted with Calibrator 0. 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

Following data are intended for illustration only and must not be used to calculate results from another run.

Calibrator	Optical Density (450 nm)
Calibrator 0 (0 ng/ml)	2.820
Calibrator 1 (0.1 ng/ml)	2.239
Calibrator 2 (0.4 ng/ml)	1.416
Calibrator 3 (1.6 ng/ml)	0.663
Calibrator 4 (6.5 ng/ml)	0.259
Calibrator 5 (25 ng/ml)	0.127

7 EXPECTED NORMAL VALUES

It is strongly recommended that each laboratory should determine its own normal and pathological values. Samples from apparently normal healthy adults, collected in the morning between 8 and 10 a.m. (with the exception of pregnant women), were analyzed using the Demeditec 17-OH-Progesterone ELISA. Following values are observed:

Population		n	ng/ml			
			Range	Median	2.5 percentile	97.5 percentile
Female <50 years	Follicular phase	20	0.63 - 2.43	1.24	0.70	2.26
	Luteal phase	20	0.94 - 3.66	1.88	0.95	3.63
	Pregnancy 3rd trimester	38	3.03 - 22.42	6.24	3.27	14.52
Female ≥50 years		20	0.22 - 1.44	0.77	0.28	1.42
Male <50 years		20	0.95 - 2.98	1.89	1.00	2.71
Male ≥50 years		20	0.82 - 3.50	1.12	0.84	2.90

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.

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 kit-control values and the corresponding results are stated in the QC certificate present in the kit. The values and ranges stated on the QC certificate 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 analyzing 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 17-OH-Progesterone ELISA was calculated by subtracting two standard deviations from the mean of 20 replicate analyses of Calibrator 0. The analytical sensitivity of the assay is 0.022 ng/ml.

9.2 Specificity (Cross Reactivity)

The following materials have been evaluated for cross reactivity. The percentage indicates cross-reactivity at 50% displacement compared to 17-OH-Progesterone.

Substance	% Cross-reactivity
Androstenedione	0.01
Testosterone	0.02
Cortisol	0.02
11-Desoxycortisol	0.42
Cortisone	< 0.01
Corticosterone	< 0.01
11-Deoxycorticosterone	0.03
Progesterone	1.26
Estradiol	< 0.01
Estriol	< 0.01
Estrone	< 0.01
Pregnenolone	0.21
Prednisolone	0.01
Prednisone	< 0.01
DHEA	0.01
DHEA-S	< 0.01
Danazole	< 0.01
Dexamethasone	< 0.01

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 three serum samples within one run using the Demeditec 17-OH-Progesterone ELISA.

	Sample 1	Sample 2	Sample 3
Mean (ng/ml)	1.11	8.29	12.18
SD (ng/ml)	0.06	0.58	0.82
CV (%)	5.1	6.9	6.7
n =	20	20	20

9.4.2 Inter-Assay

The inter-assay variation was determined by duplicate measurements of three serum samples in ten different runs using the Demeditec 17-OH-Progesterone ELISA.

	Sample 1	Sample 2	Sample 3
Mean (ng/ml)	1.09	7.47	12.80
SD (ng/ml)	0.07	0.39	1.18
CV (%)	6.6	5.2	9.2
n =	10	10	10

9.5 Recovery

Recovery was determined by adding increasing amounts of the analyte to three different serum samples containing different amounts of endogenous analyte. Each sample (non-spiked and spiked) was assayed and analyte concentrations of the samples were calculated from the calibrator curve. The percentage recoveries were determined by comparing expected and measured values of the samples.

Sample	Spiking (ng/ml)	Observed (ng/ml)	Expected (ng/ml)	Recovery (%)
1	native	0.51	-	-
	4	4.92	4.51	109
	8	8.25	8.51	97
	16	16.71	16.51	101
2	native	0.40	-	-
	4	4.76	4.40	108
	8	7.83	8.40	93
	16	14.27	16.40	87
3	native	0.36	-	-
	4	4.01	4.36	92
	8	8.57	8.36	103
	16	15.12	16.36	92

9.6 Linearity

Three serum samples containing different amounts of analyte were assayed undiluted and diluted with Calibrator 0. The percentage linearity was calculated by comparing the expected and measured values for 17-OH-Progesterone.

Sample	Dilution	Observed (ng/ml)	Expected (ng/ml)	Linearity (%)
1	native	17.04	-	-
	1 : 2	8.60	8.52	101
	1 : 4	4.48	4.26	105
	1 : 8	2.26	2.13	106
2	native	8.01	-	-
	1 : 2	3.71	4.01	93
	1 : 4	1.74	2.00	87
	1 : 8	0.84	1.00	84
3	native	9.38	-	-
	1 : 2	4.62	4.69	99
	1 : 4	2.45	2.35	104
	1 : 8	1.14	1.17	97

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 Interfering Substances

- Hemoglobin (up to 250 mg/dl), bilirubin (up to 40 mg/dl), and lipids (up to 30 mg/ml) show no significant influence on the assay results. However, we recommend not to use any hemolytic, icteric, or lipemic specimens to avoid any interferences.
- Samples containing sodium azide should not be used in the assay.
- The result of any immunological test system may be affected by heterophilic antibodies, anti-species antibodies or rheumatoid factors present in human samples (12-14). For example, the presence of heterophilic antibodies in patients who are regularly exposed to animals or animal products may interfere with immunological tests. Therefore, interference with this *in-vitro* immunoassay cannot be excluded. If false results are suspected, they should be considered invalid and verified by further testing. For diagnostic purposes, results should always be considered only in conjunction with the patient's clinical picture and further diagnostic tests.

10.2 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.

The clinical significance of the determination of 17-OH-Progesterone can be invalidated if the patient was treated with natural or synthetic steroids. Any medication should be taken into account when assessing the results.

10.3 High Dose Hook Effect

A High Dose Hook Effect is not detected up to a concentration of 500 ng/ml.

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, Demeditec should be contacted.

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 REVISION HISTORY OF INSTRUCTION FOR USE

Changes from the previous version 9-07/21 to actual version 10-04/22

Cover page	Layout change
General	Complete revision; editorial changes
Chapter 1	Adaptation of sample types in intended use: Li-Heparin plasma added, EDTA plasma removed.
Chapter 2	updated; editorial changes
Chapter 3	additional information
Chapter 4.2	updated
Chapter 5	updated; adaption of sample types: Li-Heparin added, EDTA- and Citrate plasma limited
Chapter 6.1	additional information
Chapter 6.3	updated
Chapter 7	updated normal values
Chapter 9	updated assay characteristics
Chapter 10	additional information, updates, High-Dose-Hook-Effect added (10.3)
Chapter 12	added
Chapter 13	References added

13 REFERENCES

1. Lothar Thomas: Labor und Diagnose 2020 / Clinical Laboratory Diagnostics 2020
2. Abraham, G.E., R.S. Swerdloff, D. Tulchinsky et al: Radioimmunoassay of plasma 17-hydroxyprogesterone. *J. Clin. Endocrinol. Metab.* 33:42, 1971
3. 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.
4. 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.
5. New, M.I., B. Dupont, S. Pang, et al: An update on congenital adrenal hyperplasia. *Recent Progress in Hormone Research*, 37:105, 1981.
6. 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.
7. 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.
8. 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.
9. Meikle, A.W., R.J. Worley and C.D. West: Adrenal corticoid hyper-response in hirsute women. *Fertil. Steril.* 41:575, 1984
10. 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
11. 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
12. Marks V.: False-Positive Immunoassay Results: A Multicenter Survey of Erroneous Immunoassay Results from Assays of 74 Analytes in 10 Donors from 66 Laboratories in Seven Countries *Clinical Chemistry* 2002, 48:11: 2008-2016
13. Tate & Ward (2004) Interferences in Immunoassays, *Clin. Biochem Rev* Vol 25, May 2004
14. Selby (1999): Interference in immunoassays; *Ann. Clin. Biochem* 1999, 36: 704-721

1 EINLEITUNG

1.1 Zweckbestimmung

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

Dieser Test ist nur für *in-vitro* diagnostische Anwendungen durch geschultes Laborpersonal bestimmt. Das Testergebnis muss immer alle klinischen und labordiagnostischen Ergebnisse berücksichtigen. Die Laborwerte selbst dürfen niemals der alleinige Grund für daraus abgeleitete therapeutische Konsequenzen sein. Die manuelle Abarbeitung wird empfohlen. Der darüberhinausgehende Einsatz von Laborautomaten liegt in der Verantwortung des Anwenders. Das Kit ist zum einmaligen Gebrauch bestimmt.

1.2 Beschreibung des Analyten

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-Desoocortisol (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 in den frühen Morgenstunden 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.

2 TESTPRINZIP

Der Demeditec 17-OH-Progesterone ELISA ist ein Festphasen-Enzymimmunoassay, der auf dem Prinzip der kompetitiven Bindung basiert. Eine unbekannte Menge an Antigen in der Probe und das enzymmarkierte Antigen konkurrieren um die Bindungsstellen des an die Wells 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. Nach Zugabe der Substratlösung ist die Intensität der Farbentwicklung umgekehrt proportional zur Konzentration von 17-OHP in der Probe. Die enzymatische Reaktion wird durch Zugabe von Stopplösung gestoppt und die Optische Dichte (OD) gemessen. Es wird eine Standardkurve erstellt, indem die OD-Werte gegen die Konzentrationen der Standards aufgetragen werden, und die Konzentrationen der unbekannt Proben werden anhand dieser Standardkurve bestimmt.

3 WARNUNGEN & VORSICHTSHINWEISE

1. Dieses Kit ist nur zum *in-vitro* diagnostischen Gebrauch geeignet und sollte nur von medizinischem Fachpersonal durchgeführt werden.
2. Vor der Testdurchführung muss die Arbeitsanleitung vollständig und sorgfältig gelesen werden und verstanden worden sein. Die gültige Version aus dem Kit verwenden.
3. Humanes Material, das bei der Herstellung 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 müssen im verschlossenen Folienbeutel bei 2-8°C aufbewahrt werden und im mitgelieferten Rahmen verwendet werden.
5. Proben und Reagenzien müssen so schnell wie möglich und in einer gleichbleibenden Sequenz pipettiert werden.
6. Für jedes Reagenz einen separaten Behälter verwenden. Das gilt besonders für die Substratlösung. Wenn der Behälter der Substratlösung vorher z.B. für das Konjugat verwendet wurde, kommt es zu einem Farbumschlag der Substratlösung. Reagenzien nie zurück ins Fläschchen überführen, da so Reagenz-Kontaminationen verursacht werden können.
7. Den Inhalt der Mikrotiterplatte sorgfältig mischen, um gute Testergebnisse zu gewährleisten. Mikrotiterplatten nicht wiederverwenden!
8. Mikrotiterstreifen nicht austrocknen lassen während des Testlaufes. Nach jedem Waschschrift zügig im Testprotokoll fortfahren.
9. Reagenzien vor dem Testansatz auf Raumtemperatur (18-25°C) bringen. Die Temperatur hat einen Einfluss auf die Bestimmung der Optischen Dichte.
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, trinken oder Kosmetika verwenden.
12. Beim Umgang mit Proben oder Reagenzien Einweg-Handschuhe tragen. Die mikrobielle Verunreinigung von Reagenzien oder Proben 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 Volumina 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 die 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 Stopplösung sollte vermieden werden, da sie Hautreizungen und Verätzungen verursachen kann.
18. Einige Reagenzien enthalten ProClin 300, CMIT und/oder MIT als Konservierungsmittel. Bei Kontakt mit Augen oder Haut sofort mit Wasser spülen.
19. Die Reagenzien des Kits sind als gesundheitsgefährdende Abfälle zu betrachten und gemäß den nationalen Vorschriften zu entsorgen.
20. Informationen zu im Kit enthaltenen gefährlichen Substanzen können dem Sicherheitsdatenblatt entnommen werden. Sicherheitsdatenblätter für dieses Produkt sind auf Anfrage direkt von der Firma Demeditec Diagnostics GmbH erhältlich. Diese sind auch unter www.demeditec.de zum Herunterladen zu finden.
21. Alle im Zusammenhang mit den Produkten, die auf dem EU-Markt bereitgestellt werden, auftretende schwerwiegende Ereignisse gemäß VERORDNUNG (EU) 2017/746 Artikel 2, Absatz 61 sind dem Hersteller und der zuständigen Behörde des Mitgliedstaates, in dem der Anwender oder Patient niedergelassen ist, gemäß VERORDNUNG (EU) 2017/746 Artikel 82 zu melden.
22. Sollten Produktinformationen, einschließlich Etikettierung falsch oder ungenau sein, bitte den Hersteller oder den Lieferanten des Kits kontaktieren.

4 KITBESTANDTEILE

4.1 Mitgelieferte Komponenten

1. **SORB** **MT** **Mikrotiterplatte**, 12 x 8 (einzeln brechbare) Mikrotiterstreifen mit 96 Vertiefungen; beschichtet mit einem polyklonalen anti-17-OH-Progesteron Antikörper
2. **CAL** **0** **Standard 0 (Nullstandard)**, 1 Fläschchen, 1 ml, gebrauchsfertig; enthält steroidfreies Serum.
3. **CAL** **1** – **5** **Standards (Standard 1-5)**, 5 Fläschchen, je 0,5 ml, gebrauchsfertig; enthalten 17-OH-Progesteron in Serum; 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 sind dem QC-Datenblatt zu entnehmen.
5. **ENZ** **CONJ** **Enzymkonjugat**, 1 Fläschchen, 11 ml, gebrauchsfertig; 17-OH-Progesteron konjugiert mit Meerrettichperoxidase; enthält <0.01% CMIT/MIT und <0.02% MIT.
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

- Kalibriertes Mikrotiterplatten-Lesegerät mit 450 nm-Filter
- Kalibrierte variable Präzisions-Mikropipetten und Mehrkanalpipetten mit Einwegspitzen
- Mikrotiterplatten-Schüttler (900 rpm)
- Manuelle oder automatische Geräte zum Waschen von Mikrotiterplatten
- Saugfähiges Papier
- Deionisiertes Wasser
- Zeitnahmegerät
- Semilogarithmisches Papier oder Software zur Datenverarbeitung
- Vortex-Mixer

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. Vor Hitze und direkter Sonneneinstrahlung schützen. 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 zehnfach konzentrierte Waschlösung (50 ml) mit 450 ml deionisiertem Wasser auf ein Gesamtvolumen von 500 ml verdünnen. Die verdünnte Waschlösung ist bei Raumtemperatur (18-25°C) für mindestens zwölf Wochen stabil. Bei einer Lagerung bei 2-8°C können sich Präzipitate bilden, die sich durch Schwenken bei Raumtemperatur wieder auflösen sollten (18-25°C). Die Waschlösung sollte erst verwendet werden, wenn sich die Präzipitate komplett aufgelöst haben.

4.5 Entsorgung des Kits

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

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** (Li-Heparin) geeignet.

Im Durchschnitt werden EDTA-Plasma- und Citrat-Plasma-Werte ca. 10-15% niedriger gefunden als Serumwerte.

Es sollten die üblichen Vorsichtsmaßnahmen für die Venenpunktion beachtet werden (1). Es ist wichtig, die chemische Integrität einer Blutprobe vom Zeitpunkt der Entnahme bis zur Untersuchung zu erhalten. Keine hämolytischen, ikterischen oder lipämischen Proben verwenden. Des Weiteren ist bei der Verwendung von Gel-Entnahmesystemen besondere Vorsicht geboten, da bei unsachgemäßer Handhabung eine Beeinflussung der Messergebnisse nicht ausgeschlossen werden kann.

Proben, die Natriumazid enthalten, sollten nicht verwendet werden.

Für eine Bestimmung werden 25 µl Probenvolumen benötigt. Die Proben sollten unverzüglich verwendet werden oder aliquotiert bei $\leq -20^{\circ}\text{C}$ für bis zu 12 Monate gelagert werden. Aufgetaute Proben sollten vor Testbeginn vorsichtig durchmischt werden. Wiederholte Gefrier-Auftau-Zyklen sollten vermieden werden. Proben mit einer erwarteten 17-OH-Progesteron-Konzentration höher als der höchste Standard (25 ng/ml) müssen vor Durchführung des Tests mit Nullstandard verdünnt werden. Die zusätzliche Verdünnung muss für die Kalkulation der Ergebnisse mit berücksichtigt werden.

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 und jede 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 ist die enzymatische Reaktion linear proportional zu Zeit und Temperatur ist.
- Die in der Arbeitsanleitung angegebenen Inkubationszeiten müssen eingehalten werden.
- Standards, Kontrollen und Proben sollten mindestens in Doppelansätzen bestimmt werden.
- Die korrekte Durchführung der Waschstreps ist entscheidend. Ungenügend gewaschene Wells ergeben falsche Ergebnisse. Die Verwendung einer Multikanalpipette bzw. eines Multisteppers oder eines automatischen Waschgerätes für Mikrotiterplatten wird empfohlen. Zwischen den Inkubationen die Wells nicht austrocknen lassen. Beim Waschen und Ausklopfen dürfen die beschichteten Wells nicht beschädigt werden. Alle Reagenzien müssen daher mit Vorsicht pipettiert werden. Beim Waschvorgang ist es wichtig, dass alle Wells vollständig und gleichmäßig mit Waschlösung gefüllt werden und nach dem Ausklopfen kein Rückstand an Flüssigkeit zurückbleibt.
- Jeder Testlauf muss eine eigene Standardkurve beinhalten.

6.2 Testdurchführung

1. Die benötigte Anzahl an **Mikrotiterstreifen** zum Auftragen von Standards, Kontrollen und Proben in Doppelbestimmung in der Halterung befestigen.
2. Je **25 µl Standards, Kontrollen und Proben mit neuen Plastikspitzen** in die entsprechenden Wells geben.
3. **100 µl Enzymkonjugat** in jedes Well geben.
4. **60 Minuten** bei Raumtemperatur (18-25°C) auf einem Mikrotiterplattenschüttler (900rpm) inkubieren.
5. Den Inhalt der Vertiefungen kräftig ausschütten. Wells **4mal** mit verdünnter **Waschlösung** (300 µl pro Well) 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 Waschstreps beeinflusst.
6. **200 µl Substratlösung** in jedes Well geben.
7. **30 Minuten** bei Raumtemperatur (18-25°C) ohne Schütteln im Dunkeln inkubieren.
8. Die enzymatische Reaktion durch Zugabe von **50 µl Stopplösung** in jedes Well abstoppen.
9. Die Optische Dichte bei **450 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. Die erhaltenen OD-Werte der Standards (y-Achse, linear) werden gegen ihre Konzentration (x-Achse, logarithmisch) entweder auf semi-logarithmischem Papier oder mit einer automatisierten Methode aufgetragen.
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	Optische Dichte (450 nm)
Standard 0 0,0 ng/ml	2,820
Standard 1 0,1 ng/ml	2,239
Standard 2 0,4 ng/ml	1,416
Standard 3 1,6 ng/ml	0,663
Standard 4 6,5 ng/ml	0,259
Standard 5 25 ng/ml	0,127

7 ERWARTETE WERTE

Es wird empfohlen, dass jedes Labor seine eigenen normalen und pathologischen Werte ermittelt. Proben von gesunden Erwachsenen wurden morgens von 8 – 10 Uhr (mit Ausnahme der schwangeren Frauen) entnommen und untersucht. Dabei ergeben sich mit dem Demeditec 17-OH-Progesteron ELISA folgende Werte:

Population		n	ng/ml			
			Bereich	Median	2,5 Perzentile	97,5 Perzentile
Frauen <50 Jahre	Follikelphase	20	0,63 - 2,43	1,24	0,70	2,26
	Lutealphase	20	0,94 - 3,66	1,88	0,95	3,63
	Schwangere 3. Trimester	38	3,03 - 22,42	6,24	3,27	14,52
Frauen ≥50 Jahre		20	0,22 - 1,44	0,77	0,28	1,42
Männer <50 Jahre		20	0,95 - 2,98	1,89	1,00	2,71
Männer ≥50 Jahre		22	0,82 - 3,50	1,12	0,84	2,90

Diagnostische und therapeutische Konsequenzen sollten nicht allein auf Basis der mit diesem Test ermittelten Ergebnisse getroffen werden, sondern unter Berücksichtigung klinischer Beobachtungen und weiterer diagnostischer Tests.

8 QUALITÄTSKONTROLLE

Es wird empfohlen, 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 Kit-Kontrollen mit den entsprechenden Ergebnissen sind im QC-Zertifikat, das dem Kit beiliegt, aufgeführt. Die im QC-Zertifikat 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.

Geeignete statistische Methoden zur Analyse von Kontrollwerten und Trends sollten 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) abzüglich der zweifachen Standardabweichung des Nullstandards beträgt 0,022 ng/ml.

9.2 Spezifität der Antikörper (Kreuzreaktivität)

Die folgenden Materialien wurden auf Kreuzreaktivität untersucht. Der Prozentsatz gibt die Kreuzreaktivität bei 50% Verdrängung im Vergleich zu 17-OH-Progesteron an.

Steroid	% Kreuzreaktivität
Androstenedion	0,01
Testosteron	0,02
Cortisol	0,02
11-Desoxycortisol	0,42
Cortison	< 0,01
Corticosteron	< 0,01
11-Deoxycorticosteron	0,03
Progesteron	1,26
Estradiol	< 0,01
Estriol	< 0,01
Estron	< 0,01
Pregnenolon	0,21
Prednisolon	0,01
Prednison	< 0,01
DHEA	0,01
DHEA-S	< 0,01
Danazol	< 0,01
Dexamethason	< 0,01

9.3 Messbereich

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

9.4 Präzision**9.4.1 Intra-Assay**

Die Intra-Assay-Variation wurde durch die Bestimmung von 20 Wiederholungsmessungen von drei Serumproben in einem Testansatz mit dem Demeditec 17-OH-Progesteron ELISA bestimmt.

	Probe 1	Probe 2	Probe 3
Mittelwert (ng/ml)	1,11	8,29	12,18
SD	0,06	0,58	0,82
CV (%)	5,1	6,9	6,7
n =	20	20	20

9.4.2 Inter-Assay

Die Inter-Assay-Variation wurde durch Doppelbestimmungen von drei Serumproben in zehn verschiedenen Tests mit dem Demeditec 17-OH-Progesteron ELISA bestimmt.

	Probe 1	Probe 2	Probe 3
Mittelwert (ng/ml)	1,09	7,47	12,80
SD	0,07	0,39	1,18
CV (%)	6,6	5,2	9,2
n =	10	10	10

9.5 Wiederfindung

Die Wiederfindungsrate wurde durch Zugabe zunehmender Mengen des Analyten zu drei verschiedenen Serumproben, die unterschiedliche Mengen an endogenem Analyten enthielten, bestimmt. Jede Probe (nativ und nach Zugabe von definierten Mengen) wurde mit dem Demeditec 17-OH-Progesterone ELISA gemessen. Die prozentualen Wiederfindungen wurden durch Vergleich der erwarteten und gemessenen Ergebnisse der Proben ermittelt.

Probe	Zugefügtes 17-OHP (ng/ml)	Gemessener Wert (ng/ml)	Erwarteter Wert (ng/ml)	Wiederfindung (%)
1	nativ	0,51	-	-
	4	4,92	4,51	109
	8	8,25	8,51	97
	16	16,71	16,51	101
2	nativ	0,40	-	-
	4	4,76	4,40	108
	8	7,83	8,40	93
	16	14,27	16,40	87
3	nativ	0,36	-	-
	4	4,01	4,36	92
	8	8,57	8,36	103
	16	15,12	16,36	92

9.6 Linearität

Drei Serumproben wurden unverdünnt und mit dem Nullstandard verdünnt untersucht. Die prozentuale Linearität wurde durch Vergleich der erwarteten und gemessenen Werte berechnet.

Probe	Verdünnung	Gemessener Wert (ng/ml)	Erwarteter Wert (ng/ml)	Linearität (%)
1	nativ	17,04	-	-
	1 : 2	8,60	8,52	101
	1 : 4	4,48	4,26	105
	1 : 8	2,26	2,13	106
2	nativ	8,01	-	-
	1 : 2	3,71	4,01	93
	1 : 4	1,74	2,00	87
	1 : 8	0,84	1,00	84
3	nativ	9,38	-	-
	1 : 2	4,62	4,69	99
	1 : 4	2,45	2,35	104
	1 : 8	1,14	1,17	97

10 GRENZEN DES TESTS

Zuverlässige und reproduzierbare Ergebnisse werden erzielt, wenn das Testverfahren mit vollständigem Verständnis der Anweisungen in der Gebrauchsanleitung und unter Befolgung der GLP (Good Laboratory Practice)-Richtlinien durchgeführt wird. Jede unsachgemäße Behandlung von Proben oder Modifikationen dieses Tests können die Ergebnisse beeinflussen.

10.1 Interferenzen

- Hämoglobin (bis zu 250 mg/dl), Bilirubin (bis zu 40 mg/dl), und Lipide (bis zu 30 mg/ml) zeigen keinen signifikanten Einfluss auf die Ergebnisse des Tests. Wir empfehlen dennoch, keine hämolytischen, ikterischen oder lipämischen Proben zu verwenden, um Interferenzen auszuschließen.
- Proben, die Natriumazid enthalten, sollten nicht für den Assay verwendet werden.
- Das Ergebnis eines jeden immunologischen Testsystems kann durch heterophile Antikörper, Anti-Spezies-Antikörper oder Rheumafaktoren, die in menschlichen Proben vorhanden sind, beeinflusst werden (12-14). Das Auftreten von heterophilen Antikörpern bei Patienten, die regelmäßig mit Tieren oder tierischen Produkten in Berührung kommen, kann beispielsweise zu Störungen bei immunologischen Tests führen. Daher können Interferenzen mit diesem *In-vitro* Immunoassay nicht ausgeschlossen werden. Bei Verdacht auf falsche Ergebnisse sollten diese als nicht gültig betrachtet und durch weitere Untersuchungen überprüft werden.

Zu diagnostischen Zwecken sollten die Ergebnisse immer nur in Verbindung mit dem klinischen Bild des Patienten und weiterer diagnostischer Tests betrachtet werden

10.2 Beeinflussung durch Medikamente

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

Die klinische Bedeutung der Bestimmung von 17-OH-Progesteron kann durch Behandlung der Patienten mit natürlichen oder synthetischen Steroiden beeinflusst werden. Jede Medikation muss bei der Bewertung der Ergebnisse berücksichtigt werden.

10.3 High Dose Hook Effekt

Ein High Dose Hook Effekt wurde bis zu einer Konzentration von 500 ng/ml nicht detektiert.

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. Bestehen bezüglich eines Ergebnisses Zweifel oder Bedenken, muss die Firma Demeditec kontaktiert werden.

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 ÄNDERUNGSHISTORIE DER ARBEITSANLEITUNG

Änderungen gegenüber der Vorgängerversion 9-07/21 zur aktuellen Version 10-04/22.

Deckblatt	Layout aktualisiert
Allgemein	Komplette Überarbeitung; redaktionelle Änderungen
Kapitel 1	Anpassung der Probenarten im Verwendungszweck: Li-Heparin Plasma hinzugefügt, EDTA-Plasma entfernt.
Kapitel 2	aktualisiert; redaktionelle Änderungen
Kapitel 3	zusätzliche Informationen
Kapitel 4.2	aktualisiert
Kapitel 5	aktualisiert; Anpassung der Probenarten; Li-Heparin Plasma hinzugefügt, EDTA- und Zitrat-Plasma limitiert
Kapitel 6.1	zusätzliche Informationen
Kapitel 6.3	aktualisiert
Kapitel 7	aktualisierte Normbereiche
Kapitel 9	aktualisierte Testspezifikationen
Kapitel 10	zusätzliche Informationen, Aktualisierungen, High-Dose-Hook-Effekt hinzugefügt (10.3)
Kapitel 12	hinzugefügt
Kapitel 13	Literatur hinzugefügt

13 REFERENZEN

1. Lothar Thomas: Labor und Diagnose 2020 / Clinical Laboratory Diagnostics 2020
2. Abraham, G.E., R.S. Swerdloff, D. Tulchinsky et al: Radioimmunoassay of plasma 17-hydroxyprogesterone. *J. Clin. Endocrinol. Metab.* 33:42, 1971
3. 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.
4. 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.
5. New, M.I., B. Dupont, S. Pang, et al: An update on congenital adrenal hyperplasia. *Recent Progress in Hormone Research*, 37:105, 1981.
6. 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.
7. 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.
8. 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.
9. Meikle, A.W., R.J. Worley and C.D. West: Adrenal corticoid hyper-response in hirsute women. *Fertil. Steril.* 41:575, 1984
10. 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
11. 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
12. Marks V.: False-Positive Immunoassay Results: A Multicenter Survey of Erroneous Immunoassay Results from Assays of 74 Analytes in 10 Donors from 66 Laboratories in Seven Countries *Clinical Chemistry* 2002, 48:11: 2008-2016
13. Tate & Ward (2004) Interferences in Immunoassays, *Clin. Biochem Rev* Vol 25, May 2004
14. Selby (1999): Interference in immunoassays; *Ann. Clin. Biochem* 1999, 36: 704-721

1 INTRODUCCIÓN

1.1 Intención de Uso

Ensayo inmunoenzimático para la determinación cuantitativa de 17-OH-progesterona en suero y plasma (heparina de litio) humano.

El ensayo está diseñado para su uso en diagnóstico *in-vitro* y ha de realizarse solamente por profesionales. Todas las decisiones terapéuticas deberán tomarse teniendo en cuenta no solamente el resultado de esta prueba, sino todos los datos clínicos y de laboratorio. Los valores obtenidos en el laboratorio nunca deben ser la única razón de las consecuencias terapéuticas derivadas de ellos. Se recomienda el procesamiento manual. La utilización de sistemas automatizados de laboratorio será bajo la única responsabilidad del usuario. El kit está diseñado para un único uso.

1.2 Descripción del analito

La hormona esteroide 17-OH-progesterona (17-OHP) se produce en la corteza suprarrenal y en las gónadas. Los efectos gestágenicos ejercidos por 17-OHP son pequeños. Sin embargo, esta hormona es de importancia clínica, ya que representa el último precursor de 11 β -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 11-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, los niveles de 17-OHP 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 están influenciados por ritmos diurnos que se correlacionan con la secreción adrenal de cortisol. Los niveles máximos se detectan en muestras recogidas a primera hora de la mañana.

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. Los valores maternos de 17-OHP aumentan fuertemente después de la semana 32 de embarazo. Alcanza niveles 4 veces más altos que durante la fase lútea del ciclo menstrual.

2 PRINCIPIO

La prueba ELISA para 17-OH-Progesterona de Demeditec es un ensayo de inmunoabsorción enzimática en fase sólida basado en el principio de competición. La cantidad desconocida de antígeno presente en la muestra compite con el antígeno conjugado a la enzima por los sitios de unión de los anticuerpos que tapizan los pocillos. Tras la incubación, se lava el conjugado que no ha interactuado. La cantidad de conjugado a peroxidasa es inversamente proporcional a la concentración de 17-OHP en la muestra. Después de la adición de la solución sustrato, la intensidad del color desarrollada es inversamente proporcional a la concentración de 17-OHP en la muestra. La reacción enzimática se detiene mediante la adición de solución de parada y se mide la densidad óptica (DO). Se construye una curva estándar representando los valores de DO frente a las concentraciones de los estándares, y las concentraciones de las muestras desconocidas se determinan utilizando esta curva estándar.

3 ADVERTENCIAS Y PRECAUCIONES

1. Este kit es para uso de diagnóstico *in-vitro* únicamente. Solo para uso profesional.
2. Antes de comenzar el ensayo, lea las instrucciones por completo y cuidadosamente. Utilice la versión validada del prospecto que se proporciona con el kit. Asegúrese de que todo se entienda.
3. Todo el material de origen humano utilizado en la preparación de los reactivos se ha probado y ha resultado negativo en cuanto a anticuerpos contra VIH 1 y 2, HbsAg y VHC. Sin embargo, ningún método de prueba puede ofrecer una garantía completa de la ausencia del VIH, VHB, VHC u otros agentes infecciosos. Por lo tanto, los reactivos deben manipularse de la misma manera que el material potencialmente infeccioso.
4. La microplaca contiene tiras separables. Los pocillos no utilizados deben almacenarse de 2 a 8°C en la bolsa de aluminio sellada y usarse bajo las condiciones provistas.
5. El pipeteo de la muestra y reactivos debe realizarse lo más rápido posible y en la misma secuencia para cada paso.
6. Utilice los depósitos solo para reactivos individuales. Esto se aplica especialmente para los depósitos de sustrato. El uso de un depósito para dispensar la solución de sustrato que se haya usado previamente para la solución conjugada puede cambiar el color de la solución. No vuelva a verter los reactivos en los viales, ya que podrían contaminarse con los reactivos.
7. Mezcle bien el contenido de los pocillos de la microplaca para asegurar buenos resultados de la prueba. No reutilice los micropocillos.
8. No deje que los pocillos se sequen durante el ensayo; agregue los reactivos inmediatamente después de completar los pasos de lavado.
9. Deje que los reactivos alcancen la temperatura ambiente (18-25°C) antes de comenzar la prueba. La temperatura afectará las lecturas de absorbancia del ensayo.
10. Nunca pipetee con la boca, evite el contacto de la piel y membranas mucosas con los reactivos y las muestras.
11. No fume, coma, beba ni aplique cosméticos en las áreas donde se manipulan las muestras o los reactivos del kit.
12. Utilice guantes protectores desechables cuando manipule muestras y reactivos. La contaminación microbiana de reactivos o muestras puede dar resultados erróneos.
13. La manipulación debe realizarse de acuerdo con los procedimientos definidos por una directriz o reglamentación nacional apropiada de seguridad sobre peligros biológicos.
14. No utilice reactivos después de la fecha de caducidad que se muestra en las etiquetas del kit.
15. Todos los volúmenes indicados deben realizarse de acuerdo con el protocolo. Los resultados de prueba óptimos solo se obtienen cuando se utilizan pipetas calibradas y lectores de placas de microvaloración.
16. No mezcle ni utilice componentes de kits con diferentes números de lote. Se recomienda no intercambiar pocillos de placas diferentes ni siquiera del mismo lote. Los kits pueden haber sido enviados o almacenados en diferentes condiciones y las características de unión de las placas pueden resultar ligeramente diferentes.
17. Evite el contacto con la solución de paro. Puede causar irritación y quemaduras en la piel.
18. Algunos reactivos contienen ProClin 300, CMIT y/o MIT como conservantes. En caso de contacto con los ojos o la piel aclarar inmediatamente con agua.
19. Los productos químicos y los reactivos preparados o usados deben tratarse como residuos peligrosos de acuerdo con las directrices o reglamentaciones nacionales de seguridad sobre peligros biológicos.
20. Para obtener información consulte las fichas de datos de seguridad. Las fichas de datos de seguridad de este producto están disponibles bajo pedido directamente con Demeditec Diagnostics GmbH o en la página de inicio de Demeditec (www.demeditec.com).
21. Todos los incidentes graves que se produzcan en relación con productos comercializados en la UE de conformidad con el artículo 2, apartado 61, del Reglamento (UE) 2017/746 se notificarán al fabricante y a la autoridad competente del Estado miembro donde el usuario o paciente está establecido de conformidad con el artículo 82 del Reglamento (UE) 2017/746.
22. Si la información del producto, incluido el etiquetado, es incorrecta o inexacta, comuníquese con el fabricante o proveedor del kit.

4 REACTIVOS

4.1 Reactivos provistos

1. **SORB** **MT** **Microplaca**, 12 x 8 (desmontables) tiras de 96 pocillos; impregnadas con anticuerpos anti progesterona-OH-17 (policlonal)
2. **CAL** **0** **Calibrador 0** frasco, 1 ml, listo para su uso; contiene suero libre de esteroides.
3. **CAL** **1** – **5** **Calibrador** (Calibrador 1-5), 5 viales, 0,5 ml cada uno, listos para su uso; contienen 17-OH progesterona en suero. 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** **Conjugado Enzimático**, 1 vial, 11 ml, listo para su uso; 17-OH-progesterona conjugada con peroxidasa de rábano picante; contiene <0.01% CMIT/MIT y <0.02% MIT.
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

- Lector de microplacas que permita realizar medidas de punto final a 450 nm
- Micropipetas de precisión y pipetas multicanal calibradas y de volumen variable con puntas desechables
- Agitador de microplacas que opere a 900 rpm
- Equipamiento manual o automático para el lavado de microplacas
- Papel absorbente
- Agua desionizada
- Temporizador
- Papel gráfico semilogarítmico o software para la reducción de los datos
- Agitador vortex

4.3 Condiciones de Almacenamiento

Cuando se almacenan de 2-8°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 de 2-8°C. Una vez abiertos los reactivos son estables durante 30 días si se almacenan correctamente.

Proteger del calor y de la luz solar directa.

Los pocillos se deben almacenar de 2-8°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

Permita que los reactivos y el número de pocillos a utilizar alcancen temperatura ambiente (18-25°C) antes de comenzar el test.

Solución de Lavado

Diluir 50 ml del concentrado 10x de Solución de lavado con 450 ml de agua desionizada hasta un volumen final de 500 ml. La solución de lavado diluida es estable durante al menos 12 semanas a temperatura ambiente (de 18-25°C). Podrían formarse precipitados cuando se conserve a 2-8°C, que deberían disolverse de nuevo mediante agitación suave a temperatura ambiente (18-25°C). La solución de lavado solamente debe utilizarse cuando dichos precipitados se hayan disuelto por completo.

4.5 Eliminación de los Kits

La eliminación de los insumos utilizados debe realizarse de acuerdo a la normativa nacional de bioseguridad, información especial para este producto se da en la Hoja de Datos de Seguridad del Material.

4.6 Kits de prueba dañados

En caso de daños graves del equipo o componentes de la prueba Demeditec Diagnostics GmbH debe ser informado por escrito dentro de una semana después de recibir el kit. Los componentes individuales gravemente dañados no deben usarse para una prueba. Deben almacenarse hasta que se encuentre una solución final. Después de esto deben ser eliminados de acuerdo a las regulaciones oficiales.

5 TOMA Y PREPARACIÓN DE LAS MUESTRAS

Para la determinación de 17-OH-Progesterona pueden utilizarse muestras de **suero y plasma (heparina de litio)**.

Como media, los valores obtenidos con plasma (AEDT) y plasma (citrato) son aproximadamente un 10-15% inferiores a los obtenidos con muestras de suero.

Deben observarse las precauciones habituales para la venopunción. Es importante preservar la integridad química de una muestra de sangre desde el momento en que se recoge hasta que se analiza. No utilice muestras hemolíticas, ictericas o lipémicas. Además, se recomienda tener especial precaución al utilizar sistemas de recogida en gel, ya que no se puede excluir una influencia en los resultados de la medición en caso de manipulación inadecuada. No deben usarse muestras que contengan azida sódica.

El procedimiento requiere una muestra de 25 µl por pocillo. Las muestras deben ser procesadas inmediatamente o ser alicuotadas y almacenadas a $\leq -20^{\circ}\text{C}$ hasta 12 meses. Las muestras descongeladas deben invertirse varias veces antes del ensayo. Evitar ciclos repetidos de congelación y descongelación. Las muestras que se esperan que contengan concentraciones de 17-OH-progesterona más altas que el calibrador (mayores de 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.

6 PROCEDIMIENTO DEL ENSAYO

6.1 Observaciones Generales

- Se debe permitir que todos los reactivos y componentes lleguen a temperatura ambiente antes de utilizarlos. Todos los reactivos deben mezclarse sin generar espuma.
- Una vez comenzado el estudio todos los pasos deben completarse sin interrupción.
- Utilizar nuevas puntas de pipeta para cada calibrador, muestra o control para evitar contaminación.
- La Absorbancia es una función del tiempo y la temperatura de incubación. Antes de comenzar el ensayo, se recomienda que todos los reactivos estén listos, que se hayan retirado las tapas, que todos los pocillos necesarios estén asegurados en el soporte, etc. Esto garantizará el tiempo transcurrido en el pipeteo sin interrupción.
- Como regla general la reacción enzimática es linealmente proporcional al tiempo y a la temperatura.
- Respetar los tiempos de incubación como se indica en estas instrucciones de uso.
- Los calibradores, controles y muestras deben probarse en determinaciones dobles como mínimo.
- El lavado de la placa de microtitulación es un paso importante. Los pocillos insuficientemente lavados conllevan a resultados erróneos. Se recomienda emplear una pipeta multicanal o un sistema automático de lavado. No deje secar los pocillos entre incubaciones. Cuide de no dañar el recubrimiento de las placas durante el enjuague y/o la aspiración. Enjuague y agregue los reactivos cuidadosamente. Al enjuagar cerciórese que todos los pocillos estén completamente llenos con la Solución Buffer de Lavado y que no haya residuos en ellos.
- Cada serie de ensayos debe incluir una curva de calibración.

6.2 Procedimiento del Ensayo

1. Preparar un número suficiente de pocillos en el soporte para analizar calibradores, controles y muestras.
2. Dispensar **25 µl de cada calibrador, control y muestra** con puntas nuevas en los pocillos adecuados.
3. Dispensar **100 µl de conjugado** en cada pocillo.
4. Incubar durante **60 minutos** a temperatura ambiente (18-25°C) en un agitador de placas (900 rpm).
5. Vaciar el contenido de los pocillos enérgicamente mediante aspiración o por decantación. Lavar los pocillos **4 veces con solución de lavado diluida** (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 se ven marcadamente influenciadas por la realización correcta del proceso de lavado!

6. Añadir **200 µl de solución de sustrato** a cada pocillo.
7. Incubar sin agitación durante **30 minutos** en la oscuridad a temperatura ambiente (18-25°C).
8. Detenga la reacción enzimática mediante la adición de **50 µl de solución de parada** a cada pocillo.
9. Determinar la densidad óptica de cada pocillo a 450 nm. Se recomienda que los pozos sean leídos dentro de los 15 minutos.

6.3 Cálculo de los resultados

1. Calcular los valores medios de densidad óptica para cada conjunto de calibradores, controles y muestras de pacientes.
2. Usando papel semi-logarítmico construya una curva estándar trazando la absorbancia obtenida para cada estándar en función de su concentración con el valor de absorbancia en el eje vertical (Y) y la concentración en el eje horizontal (X).
3. Usando el valor de densidad óptica media para cada muestra determinar la concentración correspondiente de la curva estándar.
4. Método automatizado: Los resultados en el prospecto se han calculado de forma automática utilizando un ajuste 4 PL (Logística Parámetro 4) 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	Densidad óptica (450 nm)
Calibrador 0 0.0 ng/ml	2.820
Calibrador 1 0.1 ng/ml	2.239
Calibrador 2 0.4 ng/ml	1.416
Calibrador 3 1.6 ng/ml	0.663
Calibrador 4 6.5 ng/ml	0.259
Calibrador 5 25 ng/ml	0.127

7 VALORES ESPERADOS

Se recomienda que cada Laboratorio determine sus valores normales y anormales. Se analizaron muestras de adultos normales aparentemente sanos obtenidas por la mañana entre 8 y 10 a.m (con la excepción de mujeres gestantes) utilizando el kit de 17-OH-Progesterona de Demeditec. Se observaron los siguientes valores:

Población	n	ng/ml				
		Rango	Mediana	2.5 percentil	97.5 percentil	
Mujeres <50 años	Fase Follicular	20	0.63 – 2.43	1.24	0.70	2.26
	Fase Lutea	20	0.94 – 3.66	1.88	0.95	3.63
	Embarazada tercer Trimestre	38	3.03 – 22.42	6.24	3.27	14.52
Mujeres ≥50 años	20	0.22 – 1.44	0.77	0.28	1.42	
Hombres <50 años	20	0.95 – 2.98	1.89	1.00	2.71	
Hombres ≥50 años	22	0.82 – 3.50	1.12	0.84	2.90	

Estos resultados por sí solos no deberían ser la única razón de las consecuencias terapéuticas o diagnósticas. Deben estar correlacionados con otras observaciones clínicas y pruebas de diagnóstico.

8 CONTROL DE CALIDAD

Las buenas prácticas de laboratorio requieren 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 la validez de los resultados en el día a día. 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 calidad con el fin de asegurar la exactitud de los resultados. Emplear métodos estadísticos apropiados para analizar los valores de control y las tendencias. Si los resultados del ensayo no se ajustan a los rangos aceptables establecidos de materiales de control, los resultados del paciente deben considerarse inválidos. En este caso, consulte las siguientes áreas técnicas: Dispositivos de pipeteo y temporización, lector de placas de microtitulación, fechas de caducidad de los reactivos, condiciones de almacenamiento e incubación, métodos de aspiración y lavado. Después de comprobar los elementos mencionados anteriormente sin encontrar ningún error, póngase en contacto con su distribuidor o con 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 0,022 ng/ml.

9.2 Especificidad (Reacción Cruzada)

Los siguientes materiales han sido evaluados para la reactividad cruzada. El porcentaje indica la reactividad cruzada al 50% de desplazamiento en comparación con el 17-OH-progesterona.

Analito	% Reacción Cruzada
Androstendiona	0,01
Testosterona	0,02
Cortisol	0,02
11-Desoxicortisol	0,42
Cortisona	< 0,01
Corticosterona	< 0,01
11-Deoxycorticosterona	0,03
Progesterona	1,26
Estradiol	< 0,01
Estriol	< 0,01
Estrona	< 0,01
Pregnenolona	0,21
Prednisolona	0,01
Prednisona	< 0,01
DHEA	0,01
DHEA-S	< 0,01
Danazol	< 0,01
Dexametasona	< 0,01

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.

	Muestra 1	Muestra 2	Muestra 3
Media (ng/ml)	1,113	8,288	12,183
SD (ng/ml)	0,057	0,575	0,819
CV (%)	5,1	6,9	6,7
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 rondas diferentes con el Demeditec ELISA.

	Muestra 1	Muestra 2	Muestra 3
Media (ng/ml)	1,09	7,47	12,80
SD (ng/ml)	0,071	0,392	1,177
CV (%)	6,6	5,2	9,2
n =	10	10	10

9.5 Recuperación

La recuperación se determinó por la adición de cantidades crecientes del analito a tres muestras de suero 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.

Muestra	Enriquecimiento 17-OHP (ng/ml)	Medida de Concentración (ng/ml)	Concentración Esperada (ng/ml)	Recuperación (%)
1	nativo	0,51	-	-
	4	4,92	4,51	109
	8	8,25	8,51	97
	16	16,71	16,51	101
2	nativo	0,40	-	-
	4	4,76	4,40	108
	8	7,83	8,40	93
	16	14,27	16,40	87
3	nativo	0,36	-	-
	4	4,01	4,36	92
	8	8,57	8,36	103
	16	15,12	16,36	92

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 linealidad se calculó mediante la comparación de los valores esperados y medidos para 17-OH-progesterona.

Muestra	Dilución	Concentración Medida (ng/ml)	Concentración Esperada (ng/ml)	Linealidad (%)
1	nativo	17,04	-	-
	1 : 2	8,60	8,52	101
	1 : 4	4,48	4,26	105
	1 : 8	2,26	2,13	106
2	nativo	8,01	-	-
	1 : 2	3,71	4,01	93
	1 : 4	1,74	2,00	87
	1 : 8	0,84	1,00	84
3	nativo	9,38	-	-
	1 : 2	4,62	4,69	99
	1 : 4	2,45	2,35	104
	1 : 8	1,14	1,17	97

10 LIMITACIONES DEL PROCEDIMIENTO

Se obtendrán resultados fiables y reproducibles cuando el procedimiento de ensayo se realice 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 Sustancias que interfieren

- La hemoglobina (hasta 250 mg/dl), la bilirrubina (hasta 40 mg/dl) y los lípidos (hasta 30 mg/ml) no muestran una influencia significativa en los resultados de la prueba. Sin embargo, se recomienda no utilizar muestras hemolíticas, ictericas o lipémicas para evitar interferencias.
- Las muestras que contengan azida sódica no deben ser utilizadas en este ensayo.
- El resultado de cualquier test inmunológico puede resultar afectado por anticuerpos heterófilos, anticuerpos anti-especies o factores reumatoides presentes en las muestras humanas (12-14). Por ejemplo, la presencia de anticuerpos heterófilos en pacientes regularmente expuestos a animales o a productos animales pueden interferir con los test inmunológicos. Por tanto, no pueden descartarse las interferencias con este inmunoensayo *in-vitro*. Si se sospecha de la existencia de resultados falsos, deberían considerarse inválidos y ser verificados por pruebas adicionales. Para fines diagnósticos, los resultados siempre deben ser considerados solamente en conjunción con el cuadro clínico del paciente y pruebas diagnósticas adicionales.

10.2 Interferencias Medicamentosas

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

La importancia clínica de la determinación de 17-OH progesterona libre puede quedar invalidada si el paciente fue tratado con esteroides naturales o sintéticos. Cualquier medicación debe ser tenida en cuenta cuando se evalúen los resultados

10.3 Efecto Hook

No se detecta un "Efecto Hook" en el rango entre 0 – 500 ng/ml.

11 ASPECTOS LEGALES

11.1 Fiabilidad 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 válidos 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 HISTORIAL DE MODIFICACIONES DE LAS INSTRUCCIONES DE TRABAJO




Cambios desde la versión anterior 9-07/21 a la versión actual 10-04/22

Portada	Cambio de disposición
General	Revisión completa: cambios de redacción
Capítulo 1	Adaptación de tipos de muestra en uso indicado: se incluye plasma (heparina de litio), se elimina plasma (AEDT)
Capítulo 2	actualizado, cambios de redacción
Capítulo 3	información adicional
Capítulo 4.2	actualizado
Capítulo 5	actualizado; adaptación de tipos de muestra: heparina de litio añadida, plasma AEDT y citrato limitados
Capítulo 6.1	información adicional
Capítulo 6.3	actualizado
Capítulo 7	valores normales actualizados
Capítulo 9	características del ensayo actualizadas
Capítulo 10	información adicional, actualizaciones, efecto <i>Hook</i> por altas dosis añadido (10.3)
Capítulo 12	Añadido
Capítulo 13	Referencias añadidas

13 REFERENCIAS

1. Lothar Thomas: Labor und Diagnose 2020 / Clinical Laboratory Diagnostics 2020
2. Abraham, G.E., R.S. Swerdloff, D. Tulchinsky et al: Radioimmunoassay of plasma 17-hydroxyprogesterone. *J. Clin. Endocrinol.Metab.* 33:42, 1971
3. 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.
4. 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.
5. New, M.I., B. Dupont, S. Pang, et al: An update on congenital adrenal hyperplasia. *Recent Progress in Hormone Research*, 37:105, 1981.
6. 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.
7. 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.
8. 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.
9. Meikle, A.W., R.J. Worley and C.D. West: Adrenal corticoid hyper-response in hirsute women. *Fertil.Steril.* 41:575, 1984
10. 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
11. 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
12. Marks V.: False-Positive Immunoassay Results: A Multicenter Survey of Erroneous Immunoassay Results from Assays of 74 Analytes in 10 Donors from 66 Laboratories in Seven Countries *Clinical Chemistry* 2002, 48:11: 2008-2016
13. Tate & Ward (2004) Interferences in Immunoassays, *Clin. Biochem Rev* Vol 25, May 2004
14. Selby (1999): Interference in immunoassays; *Ann. Clin. Biochem* 1999, 36: 704-721

SYMBOLS USED WITH DEMEDITEC ASSAYS

Symbol	English	Deutsch	Française	Español	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	utilisation 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 catalogo
	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	Tenga en cuenta y advertencias y precauciones	Annoti avvisi e le precauzioni
	Storage Temperature	Lagerungstemperatur	Température de conservation	Temperatura de conservación	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>	Distributed by	Vertrieb durch	Distribution par	Distribución por	Distribuzione da parte di
	Version	Version	Version	Versión	Versione
	Single-use	Einmalverwendung	À usage unique	Uso único	Uso una volta