

Instructions for Use

17-OH Progesterone ELISA

IVD



REF EIA-1292



96



DRG Instruments GmbH, Germany
Frauenbergstraße 18, D-35039 Marburg
Phone: +49 (0)6421-1700 0, Fax: +49 (0)6421-1700 50
Website: www.drg-diagnostics.de
E-mail: drg@drg-diagnostics.de

Distributed by:



DRG International, Inc., USA
841 Mountain Ave., Springfield, NJ 07081
Phone: (973) 564-7555, Fax: (973) 564-7556
Website: www.drg-international.com
E-mail: corp@drg-international.com

**Please use only the valid version of the Instructions for Use provided with the kit.
 Verwenden Sie nur die jeweils gültige, im Testkit enthaltene, Gebrauchsanweisung.
 Si prega di usare la versione valida delle istruzioni per l'uso a disposizione con il kit.
 Por favor, use sólo la versión válida de las instrucciones de uso que se suministran con el kit.
 Utilisez seulement la version valide des Instructions d'utilisation fournies avec le kit.**

Table of Contents / Inhaltsverzeichnis / Tabella die Contenuti / Tabla de Contenidos / Table des matières

1	INTENDED USE.....	2	1	FINALIDAD PREVISTA.....	26
2	PRINCIPLE OF THE TEST	2	2	FUNDAMENTO DEL ENSAYO	26
3	WARNINGS AND PRECAUTIONS	3	3	PRECAUCIONES	26
4	REAGENTS.....	4	4	COMPONENTES DEL KIT.....	27
5	SPECIMEN COLLECTION AND PREPARATION.....	5	5	MUESTRAS	28
6	ASSAY PROCEDURE.....	5	6	PROCEDIMIENTO DE ENSAYO	28
7	EXPECTED NORMAL VALUES.....	7	7	VALORES ESPERADOS.....	30
8	QUALITY CONTROL.....	7	8	CONTROL DE CALIDAD	30
9	PERFORMANCE CHARACTERISTICS.....	8	9	CARACTERÍSTICAS DEL ENSAYO.....	31
10	LIMITATIONS OF USE.....	9	10	LIMITACIONES DE USO	31
11	LEGAL ASPECTS	10	11	ASPECTOS LEGALES	32
1	ZWECKBESTIMMUNG	11	1	UTILISATION PRÉVUE	33
2	TESTPRINZIP	11	2	PRINCIPE DU TEST	33
3	VORSICHTSMAßNAHMEN.....	12	3	PRECAUTIONS D'UTILISATION.....	33
4	BESTANDTEILE DES KITS	13	4	COMPOSITION DU KIT	34
5	PROBENVORBEREITUNG.....	14	5	ECHANTILLON	35
6	TESTDURCHFÜHRUNG	14	6	RÉALISATION DU TEST	35
7	ERWARTETE WERTE	16	7	VALEURS ATTENDUES.....	37
8	QUALITÄTSKONTROLLE	16	8	CONTROLE DE QUALITE	37
9	ASSAY-CHARAKTERISTIKA.....	17	9	CARACTERISTIQUES DU TEST	38
10	GRENZEN DES TESTS	17	10	LIMITES D'UTILISATION.....	38
11	RECHTLICHE GRUNDLAGEN	18	11	ASPECTS LEGAUX.....	39
1	DESTINAZIONE D'USO	19	12	REFERENCES / LITERATURE	40
2	PRINCIPIO DEL TEST	19			
3	PRECAUZIONI.....	19			
4	COMPONENTI DEL KIT.....	20			
5	CAMPIONI.....	21			
6	ATTUAZIONE DEL TEST.....	21			
7	VALORI NORMALI.....	23			
8	CONTROLLO QUALITÀ.....	23			
9	CARATTERISTICHE DEL TEST	24			
10	LIMITAZIONE DEL TEST	24			
11	ASPETTI LEGALI	25			
				SYMBOLS USED.....	41

1 INTENDED USE

The **DRG 17-OH Progesterone ELISA** is an enzyme immunoassay for the quantitative *in vitro diagnostic* measurement of 17- α -OH Progesterone (17- α -OHP) in serum or plasma (EDTA, lithium heparin or citrate plasma).

1.1 Summary and Explanation

The steroid 17- α -Hydroxyprogesterone (17- α -OHP) is produced by both the adrenal cortex and gonads. Even though 17- α -OHP has relatively low progestational activity, it is of intense clinical interest because it is the immediate precursor to 11-desoxycortisol (Cpd-S). Because Cpd-S is produced by 21-hydroxylation of 17- α -OHP, measurement of 17- α -OHP is a useful indirect indicator of 21-hydroxylase activity. In congenital 21-hydroxylase deficiency, the most common variety of congenital adrenal hyperplasia (CAH), 17- α -OHP is secreted in abundant excess. It is moderately elevated in the 11- β -hydroxylase deficiency as well. Measurement of 17- α -OHP is therefore valuable in the initial diagnosis of CAH.

1.2 Clinical Physiology

Adult non-pregnant women:

In adult non-pregnant women in the childbearing age group, 17- α -OHP concentrations vary over the menstrual cycle with luteal phase concentrations being higher than follicular phase concentrations. This is because 17- α -OHP is secreted parallel with progesterone from maturing follicles or from the corpus luteum. There is also a diurnal variation of 17- α -OHP concentrations.

This rhythm is parallel with adrenal cortisol secretion such that maximum 17- α -OHP concentrations are measured in samples obtained between midnight and 8:00 am.

Adult males:

There is little information available on the systematic variability of 17- α -OHP concentration in adult males.

Pregnant women and newborn children:

The steroid 17- α -OHP is produced in large amounts by the fetus and the adrenals. It is secreted in abundance into both the fetal and maternal circulation. The maternal concentrations of 17- α -OHP increase very sharply after 32 weeks gestational age to about 4-fold above basal concentrations at term.

1.3 Clinical Applications

Congenital adrenal hyperplasia:

The principal application of the 17- α -OHP ELISA is in the diagnosis of CAH in newborns with ambiguous genitalia and in virilized adolescent girls. Since 17- α -OHP is the immediate precursor to 11-desoxycortisol, basal 17- α -OHP concentrations are sharply elevated in patients with 21-hydroxylase deficiency and to a lesser degree in patients with 11-hydroxylase deficiency.

Because 17- α -OHP concentrations are so markedly elevated in newborns and adolescent girls afflicted with CAH, a single basal measurement is all that is normally required to make the diagnosis.

Late onset adrenal hyperplasia:

More recently, 17- α -OHP concentrations have been utilized in the evaluation of androgenized women where late onset of 21-hydroxylase deficiency is suspected. This condition is clinically very subtle and since the presentation is the same as classical polycystic ovarian disease, basal plasma 17- α -OHP concentrations, unlike classical congenital adrenal hyperplasia, are normal. The diagnosis is made by administration of an ACTH stimulation test.

Other applications:

Measurement of 17- α -OHP concentrations is also utilized in evaluation of both men and women with acne vulgaris, male pattern baldness and in some subtle forms of infertility. Experiences with these applications are very limited.

2 PRINCIPLE OF THE TEST

The DRG 17-OH Progesterone ELISA is a solid phase enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA), based on the **principle of competitive binding**.

The microtiter wells are coated with a polyclonal [rabbit] antibody directed towards antigenic sites of the 17- α -OHP molecule.

Samples are pre-incubated in the coated wells.

During the second incubation, 17- α -OHP in the added sample competes with the added enzyme conjugate, which is 17- α -OHP conjugated to horseradish peroxidase, for binding to the coated antibody.

After a washing step to remove all unbound substances, the solid phase is incubated with the substrate solution. The colorimetric reaction is stopped by addition of stop solution, and optical density (OD) of the resulting yellow product is measured. The intensity of colour is inversely proportional to the concentration of the analyte in the sample.

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. All reagents of this test kit which contain human serum or plasma have been tested and confirmed negative for HIV I/II, HBsAg and HCV by FDA approved procedures. All reagents, however, should be treated as potential biohazards in use and for disposal.
3. 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.
4. The microplate contains snap-off 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 (21 °C to 26 °C) before starting the test. Temperature will affect the absorbance readings 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 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 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 result slightly different.
17. Avoid contact with *Stop Solution* containing 0.5 M H₂SO₄. It may cause skin irritation and burns.
18. Some reagents contain Proclin 300, BND and/or MIT as preservatives. In case of contact with eyes or skin, flush immediately with water.
19. TMB substrate has an irritant effect on skin and mucosa. In case of possible contact, wash eyes with an abundant volume of water and skin with soap and abundant water. Wash contaminated objects before reusing them. If inhaled, take the person to open air.
20. Chemicals and prepared or used reagents have to be treated as hazardous waste according to the national biohazard safety guideline or regulation.
21. 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 DRG.

4 REAGENTS

4.1 Reagents provided

1. **Microtiterwells**, 12 x 8 (break apart) strips, 96 wells;
Wells coated with anti-17- α -OHP antibody (polyclonal).
2. **Standard (Standard 0 - 6)**, 7 vials, 1 mL each, ready to use;
Concentrations: 0; 0.15; 0.5; 1.5; 3; 7.5; 20 ng/mL
0; 0.45; 1.5; 4.5; 9.1; 22.7; 60.6 nmol/L
Conversion: ng/mL \times 3.03 = nmol/L.
The standards are calibrated against the following reference material: *Certified Reference Material Cerilliant H-085*
Contain non-mercury preservative.
3. **Control Low & High**, 2 vials, 1 mL each, ready to use;
For control values and ranges please refer to vial label or Certificate of Analysis.
Contain non-mercury preservative.
4. **Enzyme Conjugate**, 1 vial, 25 mL, ready to use,
17- α -OHP conjugated to horseradish peroxidase;
Contains non-mercury preservative.
5. **Substrate Solution**, 1 vial, 25 mL, ready to use,
Tetramethylbenzidine (TMB).
6. **Stop Solution**, 1 vial, 14 mL, ready to use,
contains 0.5 M H₂SO₄,
Avoid contact with the stop solution. It may cause skin irritations and burns.
7. **Wash Solution**, 1 vial, 30 mL (40X concentrated);
See "Reagent Preparation".

Note: Additional *Standard 0* for sample dilution is available upon request.

4.2 Materials required but not provided

- A calibrated microtiter plate reader (450 nm, with reference wavelength at 620 nm to 630 nm)
- Calibrated variable precision micropipettes
- Manual or automatic equipment for rinsing microtiter plates
- Absorbent paper
- Distilled water
- Timer
- Semi logarithmic graph paper or software for data reduction

4.3 Storage Conditions

When stored at 2 °C to 8 °C unopened reagents will retain reactivity until expiration date. Do not use reagents beyond this date.

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

Opened kits retain activity for 8 weeks if stored as described above.

4.4 Reagent Preparation

Bring all reagents and required number of strips to room temperature (20 °C to 26 °C) prior to use.

Wash Solution

Add distilled water to the 40X concentrated Wash Solution.

Dilute 30 mL of concentrated *Wash Solution* with 1170 mL distilled water to a final volume of 1200 mL.

The diluted Wash Solution is stable for 1 week at room temperature.

4.5 Disposal of the Kit

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 to the test kit or components, DRG has to be informed in writing, at the latest, 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

Serum or plasma (EDTA, lithium heparin or citrate plasma) can be used in this assay.

Please note: Samples containing sodium azide should not be used in the assay.

In general, it should be avoided to use haemolytic, icteric, or lipaemic specimens. For further information refer to chapter "Interfering Substances".

5.1 Specimen Collection

Serum:

Collect blood by venipuncture (e.g. Sarstedt Monovette for serum), allow to clot, and separate serum by centrifugation at room temperature. Do not centrifuge before complete clotting has occurred. Patients receiving anticoagulant therapy may require increased clotting time.

Plasma:

Whole blood should be collected into centrifuge tubes containing anti-coagulant (e.g. Sarstedt Monovette with the appropriate plasma preparation) and centrifuged immediately after collection.

5.2 Specimen Storage and Preparation

Specimens should be capped and may be stored for up to 7 days at 2 °C to 8 °C prior to assaying.

Specimens stored for a longer time (up to 12 months) should be frozen only once at -20 °C prior to assay. Thawed samples should be inverted several times prior to testing.

5.3 Specimen Dilution

If in an initial assay, a specimen is found to contain more than the highest standard, the specimens can be diluted with *Standard 0* and re-assayed as described in Assay Procedure.

For the calculation of the concentrations this dilution factor has to be taken into account.

Example:

- a) dilution 1:10: 10 µL sample + 90 µL *Standard 0* (mix thoroughly)
b) dilution 1:100: 10 µL dilution a) 1:10 + 90 µL *Standard 0* (mix thoroughly).

6 ASSAY PROCEDURE

6.1 General Remarks

- All reagents and specimens must be allowed to come to room temperature 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.
- 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.

6.2 Test Procedure

Each run must include a standard curve.

1. Secure the desired number of Microtiter wells in the frame holder.
2. Dispense **25 µL** of each **Standard, Control** and **sample** with new disposable tips into appropriate wells.
3. Incubate for **5 minutes** at room temperature
4. Dispense **200 µL Enzyme Conjugate** into each well.
Thoroughly mix for 10 seconds. It is important to have a complete mixing in this step.
5. Incubate for **60 minutes** at room temperature.
6. Briskly shake out the contents of the wells.
Rinse the wells **3 times** with diluted Wash Solution (400 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!
7. Add **200 µL of Substrate Solution** to each well.
8. Incubate for **30 minutes** at room temperature.
9. Stop the enzymatic reaction by adding **100 µL of Stop Solution** to each well.
10. Measure the optical density of the solution in each well at **450 nm (reading) and at 620 nm to 630 nm (background subtraction, recommended)** with a microtiter plate reader.
It is recommended that the wells be read **within 10 minutes** after adding the *Stop Solution*.

6.3 Calculation of Results

1. Calculate the average optical density (OD) values for each set of standards, controls and patient samples.
2. Using semi-logarithmic graph paper, construct a standard curve by plotting the mean OD obtained from each standard against its concentration with OD value on the vertical (Y) axis and concentration on the horizontal (X) axis.
3. Using the mean OD value for each sample determine the corresponding concentration from the standard curve.
4. Automated method: The results in the Instructions for Use have been calculated automatically using a 4-Parameter curve fit. (4 Parameter Rodbard or 4 Parameter Marquardt are the preferred methods.) 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 or reported as > 20 ng/mL. For the calculation of the concentrations this dilution factor has to be taken into account.

6.3.1 Example of Typical Standard Curve

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

Standard	Optical Density (450 nm)
Standard 0 (0 ng/mL)	2.15
Standard 1 (0.15 ng/mL)	1.77
Standard 2 (0.5 ng/mL)	1.28
Standard 3 (1.5 ng/mL)	0.77
Standard 4 (3.0 ng/mL)	0.49
Standard 5 (7.5 ng/mL)	0.25
Standard 6 (20 ng/mL)	0.12

7 EXPECTED NORMAL VALUES

It is strongly recommended that each laboratory should determine its own normal and abnormal values.

In a study conducted with newborns and children, using the DRG 17-OH Progesterone ELISA, the following values are observed:

Newborns (boys and girls)	n		Range (min - max) (ng/mL)	Mean (ng/mL)	Median (ng/mL)	2.5 th - 97.5 th Percentile (ng/mL)
	26	1 st month after birth	0 - 17.3	7.2	6.7	1.0 - 17.0
	43	2 nd month after birth	0.32 - 13.7	4.9	4.6	1.6 - 9.8
	21	3 rd month after birth	0.06 - 4.2	2.3	2.3	0.5 - 4.1
	12	4 th month after birth	0.2 - 4.6	2.1	2.3	0.2 - 4.3

	n	Age (years)	Range (min - max) (ng/mL)	Mean (ng/mL)	Median (ng/mL)	2.5 th - 97.5 th Percentile (ng/mL)
Children	75	1 - 10	0.03 - 2.85	1.04	0.88	0.08 - 2.58
Adolescent	3	11 - 14	0.06 - 1.38	0.65	0.50	0.07 - 1.34
	10	15 - 18	0.41 - 2.35	1.24	1.26	0.42 - 2.26

In a study conducted with apparently normal healthy donors, using the DRG 17-OH Progesterone ELISA, the following values are observed:

Adult females	Follicular phase	0.1 - 0.8 ng/mL
	Luteal phase	0.6 - 2.3 ng/mL
	Ovulation	0.3 - 1.4 ng/mL
	Post ACTH	< 3.2 ng/mL
	Third trimester	2.0 - 12 ng/mL
	Postmenopausal	0.13 - 0.51 ng/mL
Adult males		0.5 - 2.1 ng/mL

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

8 QUALITY CONTROL

Good laboratory practice requires that controls be run 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 DRG directly.

9 PERFORMANCE CHARACTERISTICS

9.1 Assay Dynamic Range

The range of the assay is between 0.042 – 20 ng/mL.

9.2 Specificity of Antibodies (Cross Reactivity)

The following substances were tested for cross-reactivity of the assay:

Substance	Conc. Range (ng/mL)	Mean Bias (ng/mL)	Mean Bias %
17-Benzoate Estradiol	2 - 2000	0.05	< 0.01
17-Cypionate Estradiol	2 - 2000	< 0.01	< 0.01
17-Valerate Estradiol	2 - 2000	< 0.01	< 0.01
Aldosterone	2 - 2000	0.06	< 0.01
Androstenedione	2 - 2000	< 0.01	< 0.01
Corticosterone	2 - 200	< 0.01	< 0.01
Cortisol	2 - 200	< 0.01	< 0.01
Cortisone	2 - 200	< 0.01	< 0.01
DHEA	2 - 2000	< 0.01	< 0.01
DHEA-S(a)	2 - 2000	< 0.01	< 0.01
Estradiol	2 - 2000	< 0.01	< 0.01
Estriol	2 - 2000	< 0.01	< 0.01
Estrone	2 - 2000	< 0.01	< 0.01
Progesterone	2 - 20	0.05	1.31
Testosterone	2 - 2000	< 0.01	< 0.01

9.3 Sensitivity

The analytical sensitivity of the DRG ELISA was calculated by subtracting 2 standard deviations from the mean OD of 20 replicate analyses of *Standard 0* and was found to be 0.013 ng/mL.

The Limit of Blank (LoB) is 0.006 ng/mL.

The Limit of Detection (LoD) is 0.042 ng/mL.

The Limit of Quantification (LoQ) is 0.156 ng/mL.

9.4 Reproducibility

9.4.1 Intra Assay

The within assay variability is shown below:

Sample	n	Mean (ng/mL)	CV (%)
1 (Li-Heparin plasma)	10	0.23	4.6
2 (Serum)	10	2.10	4.0
3 (Serum)	10	7.74	3.0
4 (Citrate plasma)	10	12.11	4.2

9.4.2 Inter Assay

The between assay variability is shown below:

Sample	n	Mean (ng/mL)	CV (%)
1 (Li-Heparin plasma)	30	0.21	8.7
2 (Serum)	30	1.99	6.3
3 (Serum)	30	7.41	6.3
4 (Citrate plasma)	30	11.53	6.2

9.4.3 Inter-Lot

The inter-assay (between-lots) variation was determined by measuring each sample 6 times with 3 different kit lots:

Sample	n	Mean (ng/mL)	CV (%)
1	18	0.303	9.4
2	18	0.864	2.5
3	18	1.883	5.7
4	18	7.221	6.7

9.5 Recovery

Samples have been spiked by adding 17- α -OHP solutions with known concentrations.

The recovery (%) was calculated by multiplying the ratio of measured and expected values with 100.

	Li-Heparin plasma	Citrate plasma	EDTA plasma	Serum
Concentration (ng/mL)	0.17	0.46	0.72	1.92
Average Recovery (%)	97.9	96.0	95.7	93.8
Range of Recovery (%)	from	92.6	89.2	93.3
	to	103.8	103.2	98.6

9.6 Linearity

Samples were measured undiluted and in serial dilutions with standard 0. The recovery (%) was calculated by multiplying the ratio of expected and measured values with 100.

	Citrate plasma	Serum	EDTA plasma	Li-Heparin plasma
Concentration (ng/mL)	1.31	6.99	10.90	15.20
Average Recovery (%)	104.1	104.0	108.0	105.7
Range of Recovery (%)	from	93.9	92.2	102.4
	to	111.4	108.8	113.8

10 LIMITATIONS OF USE

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

Haemoglobin (up to 4 mg/mL), Bilirubin (up to 0.5 mg/mL) and Triglyceride (up to 7.5 mg/mL) have no influence on the assay results.

10.2 Drug Interferences

Substance	Concentration	Mean Bias
	ng/mL	ng/mL
Coumestrol	5 – 500	-0.34
Daidzein	5 – 500	0.59
Ethisterone	23.4 – 2340	-0.48
Fulvestrant	5 – 500	-0.11
Genistein	5 – 500	0.28
Levonorgestrel	0.2 – 20	0.27
Mifepristone	23.4 – 2340	-0.53
Prednisolone	0.2 – 20	-0.12
Prednisone	0.2 – 20	-0.59
Secoisolariciresinol	5 – 500	0.23

Daidzein will increase the measured 17-OH Progesterone concentration in a sample on average by more than 0.5 ng/mL. Mifepristone and Prednisolone will decrease the measured 17-OH Progesterone concentration in a sample on average by more than 0.5 ng/mL.

All other tested substances will not change the 17-OH Progesterone concentration by more than ± 0.5 ng/mL.

10.3 High-Dose-Hook Effect

"High Dose Hook Effect" is not detected in the range between 0 - 640 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, within the test procedure, 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 DRG.

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.

1 ZWECKBESTIMMUNG

Der **DRG 17-OH Progesterone ELISA** wird zur quantitativen Bestimmung von 17- α -Hydroxyprogesteron (17- α -OHP) in Serum oder Plasma (EDTA-, Lithium-Heparin- oder Zitratplasma) eingesetzt.

Nur für In-vitro Diagnostik.

2 TESTPRINZIP

Der DRG 17-OH Progesterone ELISA ist ein Festphasen-Enzymimmunoassay, der auf dem **Prinzip der kompetitiven Bindung** basiert.

Die Wells der Mikrotiterplatten sind mit einem polyklonalen Antikörper beschichtet, der gegen Antikörper-Bindungsstellen des 17- α -OHP-Moleküls gerichtet ist.

Die Proben werden in der beschichteten Platte vorinkubiert.

Während der zweiten Inkubation konkurriert das 17- α -OHP in der zugegebenen Probe mit dem Enzymkonjugat (17- α -OHP, konjugiert an Meerrettichperoxidase) um die freien Bindungsstellen auf den beschichteten Wells.

Nach einem Waschschrift, um alle ungebundenen Substanzen zu entfernen, wird die feste Phase mit der Substratlösung inkubiert. Die Farbreaktion wird durch die Zugabe der Stopplösung beendet und die optische Dichte (OD) des resultierenden gelben Produktes gemessen. Die Intensität der Farbe ist umgekehrt proportional zur Konzentration des Analyten in der Probe.

Durch Auftragen der OD-Werte gegen die Konzentrationen der Standards wird eine Standardkurve erstellt, und die Konzentrationen der unbekanntenen Proben werden anhand dieser Standardkurve bestimmt.

3 VORSICHTSMAßNAHMEN

1. Dieser Kit ist nur zum *in vitro* diagnostischen Gebrauch geeignet. Nur für den professionellen Gebrauch.
2. Alle Reagenzien dieses Testkits, die humanes Serum oder Plasma enthalten, wurden durch von der FDA zugelassene Verfahren auf HIV I/II, HBsAg und HCV getestet und als negativ bestätigt. Alle Reagenzien sollten jedoch im Gebrauch und bei der Entsorgung als potentielle biologische Gefahrenstoffe behandelt werden.
3. Vor Beginn des Tests ist die Gebrauchsanweisung vollständig und sorgfältig zu lesen. Verwenden Sie nur die gültige, im Testkit enthaltene, Gebrauchsanweisung. Stellen Sie sicher, dass alles verstanden wurde.
4. Die Mikrotiterplatte besteht aus einzeln herausnehmbaren und abbrechbaren Streifen. Ungenutzte Vertiefungen müssen bei 2 °C bis 8 °C im verschlossenen Folienbeutel gelagert und im mitgelieferten Rahmen verwendet werden.
5. Das Pipettieren der Proben und Reagenzien muss so schnell wie möglich und für jeden Schritt in der gleichen Reihenfolge erfolgen.
6. Behältnisse jeweils nur für ein einziges Reagenz verwenden. Dies gilt insbesondere für die Substrat-Behälter. Die Verwendung eines Behälters zum Pipettieren der Substratlösung, der zuvor für die Konjugatlösung verwendet wurde, kann zu einer Verfärbung der Lösung führen. Gießen Sie keine Reagenzien zurück in die originalen Fläschchen, da es zu einer Kontamination der Reagenzien kommen kann.
7. Mischen Sie den Inhalt der Mikrotiterplatten-Vertiefungen gründlich, um gute Testergebnisse zu gewährleisten. Mikrotiterplatten-Vertiefungen nicht wiederverwenden.
8. Kavitäten während des Assays nicht trocknen lassen; Reagenzien unmittelbar nach Ende des Waschschritts hinzufügen.
9. Lassen Sie die Reagenzien vor Testbeginn Raumtemperatur (20 °C bis 26 °C) erreichen. Die Temperatur wirkt sich auf die Messungen der optischen Dichte des Assays aus.
10. Niemals mit dem Mund pipettieren und den Kontakt von Reagenzien und Proben mit Haut und Schleimhäuten vermeiden.
11. In Bereichen, in denen Proben oder Kit-Reagenzien verwendet werden, darf nicht geraucht, gegessen, getrunken oder Kosmetika aufgetragen werden.
12. Beim Umgang mit Proben und Reagenzien Einweg-Latexhandschuhe tragen. Eine mikrobielle Kontamination von Reagenzien oder Proben kann zu falschen Ergebnissen führen.
13. Die Handhabung sollte in Übereinstimmung mit den Verfahren erfolgen, die in einer entsprechenden nationalen Richtlinie oder Vorschrift zur Biogefährdung definiert sind.
14. Reagenzien nicht über das auf den Kit-Etiketten angegebene Verfallsdatum hinaus verwenden.
15. Alle im Kit-Protokoll angegebenen Volumina müssen genau eingehalten werden. Optimale Ergebnisse können nur durch Verwendung kalibrierter Pipetten und Mikrotiterplatten-Lesegeräte erreicht werden.
16. Komponenten aus Kits mit unterschiedlichen Chargennummern dürfen nicht gemischt oder zusammen verwendet werden. Es wird empfohlen, keine Wells von verschiedenen Platten zusammen zu verwenden, auch nicht, wenn es sich um die gleiche Charge handelt. Die Kits können unter unterschiedlichen Bedingungen versandt oder gelagert worden sein, so dass die Bindungscharakteristik der Platten leicht unterschiedlich ausfällt.
17. Kontakt mit der Stopplösung (*Stop Solution*) sollte vermieden werden, da sie 0,5 M H₂SO₄ enthält. Schwefelsäure kann Hautreizungen und Verbrennungen verursachen.
18. Einige Reagenzien enthalten ProClin 300, BND und/oder MIT als Konservierungsmittel. Bei Kontakt mit Augen oder Haut sofort mit Wasser spülen.
19. TMB-Substrat hat eine reizende Wirkung auf Haut und Schleimhäute. Bei möglichem Kontakt Augen mit reichlich Wasser und Haut mit Seife und reichlich Wasser spülen. Kontaminierte Gegenstände vor der Wiederverwendung waschen. Falls eingeatmet, die Person an die frische Luft bringen.
20. Die Reagenzien des Kits sind als gesundheitsgefährdende Abfälle zu betrachten und gemäß den nationalen Vorschriften zu entsorgen
21. Informationen zu den im Kit enthaltenen gefährlichen Substanzen entnehmen Sie bitte dem Sicherheitsdatenblatt. Sicherheitsdatenblätter für dieses Produkt sind auf Anfrage direkt von der Firma DRG Instruments GmbH erhältlich.

4 BESTANDTEILE DES KITS

4.1 Kitinhalt

- Microtiterwells**, 96 Wells, 12 x 8 Wells (einzeln brechbar);
Mit anti-17- α -OHP -Antikörper (polyklonal) beschichtet.
- Standard (Standard 0 - 6)**, 7 Fläschchen, je 1 mL, gebrauchsfertig;
Konzentrationen: 0; 0,15; 0,5; 1,5; 3; 7,5; 20 ng/mL
0; 0,45; 1,5; 4,5; 9,1; 22,7; 60,6 nmol/L
Umrechnungsfaktor: ng/mL \times 3.03 = nmol/L
Die Standards sind gegen das folgende Referenzmaterial kalibriert: *Certified Reference Material Cerilliant H-085*
Enthält quecksilberfreies Konservierungsmittel.
- Control Low & High** (Kontrolle), 2 Fläschchen, 1 mL; gebrauchsfertig
Kontrollwerte und -bereiche entnehmen Sie bitte dem Fläschchenetikett oder dem „Certificate of Analysis“.
Enthält quecksilberfreies Konservierungsmittel.
- Enzyme Conjugate** (Enzymkonjugat), 1 Fläschchen, 25 mL, gebrauchsfertig;
17- α -OHP mit Meerrettichperoxidase konjugiert.
Enthält quecksilberfreies Konservierungsmittel.
- Substrate Solution** (Substratlösung), 1 Fläschchen, 25 mL, gebrauchsfertig;
Substratlösung TMB.
- Stop Solution** (Stopplösung), 1 Fläschchen, 14 mL, gebrauchsfertig;
enthält 0,5 M H₂SO₄,
Kontakt mit der Stopplösung vermeiden! Kann Hautreizungen und Verbrennungen verursachen.
- Wash Solution** (Waschlösung), 1 Fläschchen, 30 mL, **40X** konzentriert;
Siehe „Vorbereitung der Reagenzien“.

Anmerkung: Zusätzlicher *Standard 0* zur Probenverdünnung ist auf Anfrage erhältlich.

4.2 Erforderliche aber nicht enthaltene Geräte und Materialien

- Kalibriertes Mikrotiterplattenlesegerät (450 nm, mit Referenzwellenlänge bei 620 nm bis 630 nm)
- Kalibrierte variable Präzisions-Mikropipetten
- Manuelle oder automatische Waschorrichtung für Mikrotiterplatten
- Saugfähiges Papier
- Destilliertes Wasser
- Laborwecker
- Millimeterpapier oder Software zur Datenauswertung

4.3 Lagerung und Haltbarkeit des Kits

Die ungeöffneten Reagenzien behalten bei Lagerung um 2 °C bis 8 °C ihre Reaktivität bis zum Verfallsdatum. Nach dem Verfallsdatum die Reagenzien nicht mehr verwenden. Nach dem Öffnen sollten alle Reagenzien bei 2 °C bis 8 °C gelagert werden. Die Mikrotiterwells sollten bei 2 °C bis 8 °C gelagert werden. Der einmal geöffnete Folienbeutel sollte stets sehr sorgfältig wieder verschlossen werden.

Unter den beschriebenen Lagerbedingungen behalten geöffnete Kits 8 Wochen ihre Reaktivität.

4.4 Vorbereitung der Reagenzien

Alle Reagenzien sowie die benötigte Anzahl von Wells sollen vor dem Gebrauch auf Raumtemperatur (20 °C bis 26 °C) gebracht werden.

Wash Solution

Die 40-fach konzentrierte *Wash Solution* (30 mL) mit 1170 mL destilliertem Wasser auf ein Gesamtvolumen von 1200 mL verdünnen. *Die verdünnte Waschlösung ist bei Raumtemperatur für 1 Woche 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 Sicherheitsdatenblatt, Abschnitt 13.

4.6 Beschädigte Testkits

Im Falle einer starken Beschädigung des Testkits oder der Komponenten muss die Firma DRG 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 PROBENVORBEREITUNG

Serum oder Plasma (EDTA-, Lithium-Heparin- oder Zitratplasma) kann in diesem Test als Probenmaterial eingesetzt werden.

Achtung: Proben, die Natriumazid enthalten, sollten nicht verwendet werden.

Generell sollte die Verwendung von hämolytischen, ikterischen oder lipämischen Proben vermieden werden. Weitere Informationen finden Sie im Kapitel „*Interferenzen*“.

5.1 Probenentnahme

Serum:

Blut durch Venenpunktion entnehmen (z.B. mit Sarstedt Monovette für Serum), gerinnen lassen und das Serum durch Zentrifugation bei Raumtemperatur abtrennen. Vor der Zentrifugation muss die Gerinnung vollständig abgeschlossen sein. Bei Patienten, die Antikoagulantien erhalten, kann die Gerinnungszeit länger dauern.

Plasma:

Die Blutentnahme erfolgt mit Röhrchen, die ein Antikoagulant enthalten (z.B.: Sarstedt Monovette – mit entsprechender Plasma-Präparierung). Das Plasma wird als Überstand nach einer Zentrifugation gewonnen.

5.2 Probenaufbewahrung

Proben sollten stets gut verschlossen sein und können vor Testbeginn bis zu 7 Tage bei 2 °C bis 8 °C gelagert werden. Für eine längere Aufbewahrung (bis zu 12 Monate) sollten die Proben eingefroren bei -20 °C bis zum Testbeginn gelagert werden. Nur einmal einfrieren. Aufgetaute Proben sollten vor Testbeginn vorsichtig durchmischt werden, ohne Schaumbildung.

5.3 Probenverdünnung

Wenn in einem ersten Testdurchlauf bei einer Probe eine Konzentration höher als der höchste Standard gefunden wird, kann diese Probe mit *Standard 0* weiter verdünnt und nochmals bestimmt werden. Die Verdünnung muss jedoch bei der Berechnung der Konzentration beachtet werden.

Beispiel:

a) Verdünnung 1:10: 10 µL Probe + 90 µL *Standard 0* gründlich mischen)

b) Verdünnung 1:100: 10 µL Verdünnung a) 1:10 + 90 µL *Standard 0* (gründlich mischen).

6 TESTDURCHFÜHRUNG

6.1 Allgemeine Hinweise

- Alle Reagenzien und Proben müssen vor Gebrauch auf Raumtemperatur gebracht und gut durchmischt 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 eine neue Plastikspitze verwenden, 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 Wells 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.

6.2 Testdurchführung

Jeder Lauf muss eine Standardkurve beinhalten.

1. Die benötigte Anzahl Wells in der Halterung befestigen.
2. **Je 25 µL Standards, Control und Probe** mit neuen Plastikspitzen in die entsprechenden Wells geben.
3. **5 Minuten** bei Raumtemperatur inkubieren.
4. **200 µL Enzyme Conjugate** in jedes Well geben.
Für 10 Sekunden gut schütteln. Es ist sehr wichtig, in diesem Schritt eine komplette Durchmischung zu erreichen.
5. **60 Minuten** bei Raumtemperatur inkubieren.
6. Den Inhalt der Wells kräftig ausschütteln. Wells **3-mal** mit 400 µL verdünnter Waschlösung waschen. Verbleibende Flüssigkeit durch Ausklopfen der Wells auf saugfähigem Papier entfernen.
Achtung: Die Sensitivität und Präzision dieses Assays wird erheblich beeinflusst von der korrekten Durchführung des Waschschrilles!
7. **200 µL Substrate Solution** in jedes Well geben.
8. **30 Minuten** bei Raumtemperatur inkubieren.
9. Die enzymatische Reaktion durch Zugabe von **100 µL Stop Solution** in jedes Well abstoppen.
10. Die Optische Dichte (OD) bei **450 nm (Messung) und 620 nm bis 630 nm (Abzug des Hintergrundes, empfohlen)** mit einem Mikrotiterplattenleser innerhalb von **10 Minuten** nach Zugabe der *Stop Solution* bestimmen.

6.3 Ergebnisermittlung

1. Die durchschnittlichen Werte der Optischen Dichte (OD) für jedes Set von Standards, Controls 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 Gebrauchsanweisung angegebenen Werte wurden automatisch mit Hilfe der 4 Parameter-Gleichung bestimmt. (4 Parameter Rodbard oder 4 Parameter Marquardt sind die bevorzugten Methoden.) 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 verdünnt werden. Dieser Verdünnungsfaktor muss bei der Berechnung der Konzentration beachtet werden.

6.3.1 Beispiel für eine Standardkurve

Nachfolgend wird ein typisches Beispiel für eine Standardkurve mit dem DRG ELISA gezeigt. Diese Werte sollten **nicht** zur Berechnung von Patientendaten verwendet werden.

Standard	Optische Dichte (450 nm)
Standard 0 (0 ng/mL)	2,15
Standard 1 (0,15 ng/mL)	1,77
Standard 2 (0,5 ng/mL)	1,28
Standard 3 (1,5 ng/mL)	0,77
Standard 4 (3,0 ng/mL)	0,49
Standard 5 (7,5 ng/mL)	0,25
Standard 6 (20 ng/mL)	0,12

7 ERWARTETE WERTE

Es wird empfohlen, dass jedes Labor seine eigenen normalen und abnormalen Werte ermittelt.

In einer Studie wurden die Proben von Neugeborenen und Kindern untersucht. Dabei ergaben sich mit dem DRG 17-OH Progesterone ELISA folgende Werte:

Neugeborene (Jungen und Mädchen)	n		Bereich (min. - max.) (ng/mL)	Mittelwert (ng/mL)	Median (ng/mL)	2,5. - 97,5. Perzentile (ng/mL)
	26	1. Monat nach der Geburt	0 - 17,3	7,2	6,7	1,0 - 17,0
	43	2. Monat nach der Geburt	0,32 - 13,7	4,9	4,6	1,6 - 9,8
	21	3. Monat nach der Geburt	0,06 - 4,2	2,3	2,3	0,5 - 4,1
	12	4. Monat nach der Geburt	0,2 - 4,6	2,1	2,3	0,2 - 4,3

	n	Alter (Jahre)	Bereich (min. - max.) (ng/mL)	Mittelwert (ng/mL)	Median (ng/mL)	2,5. - 97,5. Perzentile (ng/mL)
Kinder	75	1 - 10	0,03 - 2,85	1,04	0,88	0,08 - 2,58
Jugendliche	3	11 - 14	0,06 - 1,38	0,65	0,50	0,07 - 1,34
	10	15 - 18	0,41 - 2,35	1,24	1,26	0,42 - 2,26

In einer Studie wurden die Proben von offensichtlich gesunden Personen untersucht. Dabei ergaben sich mit dem DRG 17-OH Progesterone ELISA folgende Werte:

Frauen	Follikelphase	0,1 - 0,8 ng/mL
	Lutealphase	0,6 - 2,3 ng/mL
	Ovulation	0,3 - 1,4 ng/mL
	Nach ACTH-Stimulierung	< 3,2 ng/mL
	Drittes Trimester	2,0 - 12 ng/mL
	Postmenopausal	0,13 - 0,51 ng/mL
Männer		0,5 - 2,1 ng/mL

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 normalem als auch pathologischem Level 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 ebenfalls empfohlen, an nationalen oder internationalen Qualitätssicherungs-Programmen teilzunehmen, um die Genauigkeit der Ergebnisse zu sichern.

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 DRG in Verbindung.

9 ASSAY-CHARAKTERISTIKA

9.1 Messbereich

Der Messbereich des Testes liegt zwischen 0,042 – 20 ng/mL.

9.2 Spezifität der Antikörper (Kreuzreaktivität)

Die Daten entnehmen Sie bitte der ausführlichen englischen Version der Gebrauchsanweisung.

9.3 Sensitivität

Die analytische Sensitivität, definiert als OD-Mittelwert, abzüglich der zweifachen Standardabweichung, des *Standard 0* (n = 20), beträgt 0,013 ng/mL.

Der „Limit of Blank“ (LoB) ist 0,006 ng/mL.

Die Nachweisgrenze (LoD) ist 0,042 ng/mL.

Die Quantifizierungsgrenze (LoQ) ist 0,156 ng/mL.

Die Daten zu:

9.4 Reproduzierbarkeit (Präzision)

9.5 Wiederfindung

9.6 Linearität

entnehmen Sie bitte der ausführlichen englischen Version der Gebrauchsanweisung.

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 4 mg/mL), Bilirubin (bis zu 0,5 mg/mL) und Triglyceride (bis zu 7,5 mg/mL) haben keinen Einfluss auf das Testergebnis.

10.2 Beeinflussung durch Medikamente

Substanz	Konzentration	Bias-Mittelwert
	ng/mL	ng/mL
Coumestrol	5 – 500	-0,34
Daidzein	5 – 500	0,59
Ethisteron	23,4 – 2340	-0,48
Fulvestrant	5 – 500	-0,11
Genistein	5 – 500	0,28
Levonorgestrel	0,2 – 20	0,27
Mifepriston	23,4 – 2340	-0,53
Prednisolon	0,2 – 20	-0,12
Prednison	0,2 – 20	-0,59
Secoisolariciresinol	5 – 500	0,23

Daidzein erhöht die gemessene 17-OH-Progesteron-Konzentration in einer Probe im Durchschnitt um mehr als 0,5 ng/mL.

Mifepriston und Prednisolon verringern die gemessene 17-OH-Progesteron-Konzentration in einer Probe im Durchschnitt um mehr als 0,5 ng/mL.

Alle anderen getesteten Substanzen verändern die 17-OH-Progesteron-Konzentration nicht um mehr als $\pm 0,5$ ng/mL.

10.3 High-Dose-Hook Effekt

Ein Hook-Effekt ist im Bereich von 0 bis 640 ng/mL nicht nachweisbar.

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 DRG 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.

1 DESTINAZIONE D'USO

Il test immuno-enzimatico **DRG 17-OH Progesterone ELISA** contiene materiale per la determinazione quantitativa di 17- α -idrossi progesterone (17- α -OHP) nel siero o plasma (EDTA, eparina di litio o plasma di citrato).

Questo test kit è adatto soltanto per l'uso diagnostico.

2 PRINCIPIO DEL TEST

Il test DRG 17-OH Progesterone ELISA è un test immunologico in fase solida con enzimi ancorati su un substrato (ELISA), basato sul **principio del legame competitivo**.

I micropozzetti sono ricoperti con un anticorpo policlonale diretto contro siti antigenici della molecola 17- α -OHP.

I campioni vengono pre-incubati nei pozzetti rivestiti.

Durante l'incubazione, 17 α OHP nel campione aggiunto compete con il coniugato enzimatico aggiunto, che è 17- α -OHP coniugato con perossidasi di rafano, per il legame con l'anticorpo rivestito.

Dopo una fase di lavaggio per rimuovere tutte le sostanze non legate, la fase solida viene incubata con la soluzione di substrato. La reazione colorimetrica viene bruscamente interrotta con l'aggiunta di soluzione di arresto e viene misurata la densità ottica (DO) del prodotto giallo risultante.

L'intensità del colore è inversamente proporzionale alla concentrazione dell'analita nel campione.

Una curva standard viene costruita tracciando i valori di DO rispetto alle concentrazioni di standard, e le concentrazioni di campioni sconosciuti vengono determinate usando questa curva standard.

3 PRECAUZIONI

- Questo kit è adatto soltanto per l'uso diagnostico in vitro. Solo per l'uso professionale.
- Si prega di usare la versione valida dell'inserito del pacco a disposizione con il kit.
- Informazioni su sostanze pericolose contenute nel kit sono riportate nel regolamento di sicurezza.
- Tutti i componenti del kit che contengono siero o plasma umano sono controllati e confermati negativi per la presenza di HIV I/II, HbsAg e HCV con metodi conformi alle norme FDA. Ciononostante tutti i componenti dovrebbero essere trattati come potenziali sostanze nocive nella manutenzione e nello smaltimento.
- Il contatto con la *Stop Solution* dovrebbe essere evitato perché contiene 0.5 M H₂SO₄. L'acido solforico può provocare irritazioni cutanee e ustioni.
- Non pipettare con la bocca ed evitare il contatto con componenti del kit con la pelle o con le mucose.
- Nelle aree in cui il test viene utilizzato non fumare, mangiare, bere o fare uso di prodotti cosmetici.
- Nella manutenzione dei campioni o reagenti del kit portare guanti di latex monouso. La contaminazione dei reagenti o dei campioni con microbi può dare risultati falsi.
- L'utilizzo dovrebbe avvenire secondo regole che seguono le rispettive norme di sicurezza nazionali sulle sostanze nocive.
- Non utilizzare i reagenti dopo la scadenza indicata sul kit.
- Ogni indicazione sulla quantità indicata del protocollo del kit deve essere accuratamente seguito. Risultati ottimali possono essere ottenuti soltanto con l'uso di pipette calibrate e spettrofotometro calibrato.
- Componenti del kit con numeri di lotto diversi non devono essere combinati. È consigliabile di non utilizzare pozzetti di piastre diversi, anche se si tratta dello stesso lotto. I kit potrebbero essere stati magazzinati o spediti a condizioni diverse, cosicché le caratteristiche di legame potrebbero divergere leggermente.
- I componenti chimici e reagenti preparati o già utilizzati devono essere trattati e smaltiti secondo le norme di sicurezza nazionali sulle sostanze nocive.
- I regolamenti di sicurezza di questo prodotto possono essere richiesti direttamente dalla ditta DRG Instruments GmbH.

4 COMPONENTI DEL KIT

4.1 Contenuto del kit

- Microtiterwells** (Micropozetti), 12 x 8 file (separatamente staccabili), 96 pozzetti; Pozzetti ricoperti con l'anti-17- α -OHP anticorpo (policlonale)
- Standard (Standard 0 - 6)**, 7 flaconi, 1 mL, pronto all'uso

Concentrazioni	0;	0,15;	0,5;	1,5;	3;	7,5;	20	ng/mL
	0;	0,45;	1,5;	4,5;	9,1;	22,7;	60,6	nmol/L

 Conversione: $\text{ng/mL} \times 3,03 = \text{nmol/L}$
 Gli standard sono standardizzati contro il seguente materiale di riferimento: *Certified Reference Material Cerilliant H-085*.
 Contiene conservante senza mercurio.
- Control Low & High** (Controllo), 2 flaconi, 1 mL, pronto all'uso
 Per i valori e gli intervalli di controllo si prega di fare riferimento all'etichetta della fiala o al certificato di analisi.
 Contiene conservante senza mercurio.
- Enzyme Conjugate** (Tracciante enzimatico), 1 flacone, 25 mL, pronto all'uso
 17- α -OHP coniugato alla perossidasi di rafano
 Contiene conservante senza mercurio
- Substrate Solution** (Soluzione di substrato), 1 flacone, 25 mL, pronto all'uso;
 TMB (benzidine tetrametilico).
- Stop Solution** (Soluzione d'arresto), 1 flacone, 14 mL, pronto all'uso;
 contiene 0.5 M H_2SO_4 .
 Evitare il contatto con la soluzione d'arresto. Può causare irritazioni cutanee e ustioni.
- Wash Solution** (Soluzione di lavaggio), 1 flacone, 30 mL (concentrata 40X);
 vedi „preparazione dei reagenti“.

Nota: Ulteriore *Standard 0* per la diluizione dei campioni può essere richiesto alla ditta.

4.2 Materiali richiesti ma non contenuti nel kit

- Lettore di piastre di microtitolazione calibrato (450 nm, con lunghezza d'onda di riferimento a 620 nm a 630 nm)
- Micropipette calibrate di precisione a volume variabile
- Lavatore, manuale o automatico, di piastre di microtitolazione
- Carta assorbente
- Acqua distillata
- Timer
- Carta millimetrata o software per il calcolo dei dati

4.3 Magazzinaggio e stabilità del kit

A 2 °C a 8 °C i reagenti non aperti rimangono reattivi fino alla data di scadenza indicata. Non usare reagenti oltre questa data.

Tutti i reagenti aperti devono essere magazzinati a 2 °C a 8 °C. I micropozzetti devono essere magazzinati a 2 °C a 8 °C. Una volta aperti i pacchi, questi devono essere richiusi accuratamente.

Test kits aperti rimangono attivi per 8 settimane se magazzinati alle condizioni sopra descritte.

4.4 Preparazione dei reagenti

Prima dell'uso portare tutti i reagenti e il numero necessario di pozzetti a temperatura ambiente (20 °C a 26 °C).

Wash Solution

Diluire 30 mL *Wash Solution* concentrata con 1170 mL di acqua distillata fino ad un volume finale di 1200 mL.

La soluzione di lavaggio diluita è stabile per 1 settimana a temperatura ambiente.

4.5 Smaltimento del kit

Lo smaltimento del kit deve avvenire secondo le regole a norma di legge. Informazioni particolareggiate per questo prodotto si trovano nel regolamento di sicurezza, capitolo 13.

4.6 Test kits danneggiati

Nel caso di gravi danneggiamenti del kit o dei suoi componenti deve avvenire una dichiarazione scritta alla ditta DRG, al più tardi una settimana dopo il ricevimento del kit. Componenti danneggiati non dovrebbero essere utilizzati per il test. Questi componenti devono essere magazzinati fino alla soluzione del problema. Dopo di che essi devono essere smaltiti secondo le norme ufficiali.

5 CAMPIONI

Siero o plasma (EDTA, eparina di litio o plasma citrato) può essere usato per questo test.

Attenzione: Se i campioni contengono sodio azide non devono essere utilizzati per questo test.

In generale si dovrebbe evitare l'uso di campioni emolitici, itterici o lipemici. Per ulteriori informazioni consultare il capitolo "Sostanze interferenti".

5.1 Collezione dei campioni

Siero:

Collezionare sangue tramite puntura venale (p.es. Sarstedt Monovette per siero), far coagulare e separare il siero centrifugando a temperatura ambiente.

Non centrifugare prima che la coagulazione sia completata. Campioni di pazienti con una terapia anticoagulante possono richiedere più tempo per la coagulazione.

Plasma:

Il sangue dovrebbe essere collezionato in tubetti da centrifuga contenenti un anticoagulante (p. es. Sarstedt Monovette con un'adeguata preparazione per il plasma) e centrifugando immediatamente dopo la puntura.

5.2 Magazzinaggio dei campioni

I campioni dovrebbero essere magazzinati ben chiusi fino a 7 giorni a 2 °C a 8 °C.

Campioni magazzinati per un periodo più lungo (fino a 12 mesi) dovrebbero essere congelati solo una volta a -20 °C prima dell'analisi. Congelare soltanto una volta. Invertire campioni scongelati alcune volte prima dell'uso.

5.3 Diluizione dei campioni

Se in un campione di siero viene trovata una concentrazione oltre lo standard più alto, questo campione può essere diluito con lo *Standard 0* e nuovamente determinato.

Della diluizione deve essere però tenuto conto.

Esempio:

- a) diluizione 1:10: 10 µL campione + 90 µL *Standard 0* (agitare bene)
- b) diluizione 1:100: 10 µL della diluizione a) + 90 µL *Standard 0* (agitare bene).

6 ATTUAZIONE DEL TEST

6.1 Indicazioni generali

- Tutti i reagenti e i campioni devono essere portati a temperatura ambiente e ben mescolati prima dell'uso. Evitare la formazione di schiume.
- Una volta iniziato il procedimento del test, questo deve essere portato alla fine senza interruzione.
- Per ogni componente, standard, controllo o campione è necessario utilizzare una nuova punta monouso per evitare reazioni incrociate.
- La densità ottica dipende dal tempo d'incubazione e dalla temperatura. Perciò si rende necessario di preparare tutti i reagenti, di aprire i tappi dei flaconi e di appostare tutti i pozzetti nelle appropriate posizioni. Soltanto una tale preparazione garantisce gli stessi tempi per ogni processo di pipettamento.
- Come regola generale vale che la reazione enzimatica si svolge linearmente proporzionale con il tempo e con la temperatura.

6.2 Esecuzione del test

Ogni analisi deve includere una curva standard.

1. Fissare i pozzetti necessari sul supporto.
2. Pipettare **25 µL** di ogni **Standard, Control** e **campione** nei pozzetti, cambiando ogni volta la punta monouso.
3. Incubare per **5 minuti** a temperatura ambiente
4. Pipettare **200 µL Enzyme Conjugate** in ogni pozzetto.
Agitare bene per 10 secondi. È molto importante raggiungere un completo mescolamento.
5. Incubare per **60 minuti** a temperatura ambiente.
6. Rovesciare la piastra per vuotare i pozzetti.
Lavare i pozzetti **3 volte** con soluzione di lavaggio diluita (400 µL in ogni pozzetto). Rimuovere le gocce d'acqua rimanenti rivoltando la piastra su carta assorbente.
Importante:
La sensibilità e la precisazione di questo kit sono fortemente influenzate dal corretto esecuzione del lavaggio!
7. Aggiungere **200 µL** della **Substrate Solution** ad ogni pozzetto.
8. Incubare per **30 minuti** a temperatura ambiente.
9. Fermare la reazione enzimatica aggiungendo **100 µL** della **Stop Solution** ad ogni pozzetto.
10. Determinare la densità ottica (DO) della soluzione in ogni pozzetto **a 450 nm (lettura) e a 620 nm a 630 nm (sottrazione dello sfondo, raccomandata)** con un lettore di piastre di microtitolazione.
Si raccomanda di leggere i pozzetti entro **10 minuti** dall'aggiunta della *Stop Solution*.

6.3 Rilevamento dei risultati

1. Determinare i valori medi della densità ottica (DO) per ogni set di standard, controlli e campioni.
2. Costruire una curva standard: riportare i valori medi della densità ottica (DO) di ogni standard contro la rispettiva concentrazione dove i valori delle DO si devono trovare sull'asse verticale (Y) e le concentrazioni sull'asse orizzontale (X).
3. Utilizzando il valore medio delle DO per ogni campione si determina la rispettiva concentrazione dalla curva standard.
4. Metodo automatico: I valori riportati in queste istruzioni per l'uso sono stati determinati tramite l'equazione a 4 parametri. (I metodi preferiti sono 4 Parameter Rodbard oppure 4 Parameter Marquardt.) Altri funzioni usati per l'elaborazione dei dati possono dare risultati leggermente differenti.
5. La concentrazione dei campioni può essere determinata direttamente dalla curva standard. Campioni con una concentrazione più elevata dello standard più concentrato devono essere diluiti. Di questo fattore di diluizione deve essere tenuto conto per il calcolo della concentrazione.

6.3.1 Esempio di una curva standard tipica

I seguenti dati sono a scopo dimostrativo soltanto e **non possono** sostituire i dati generati dall'esecuzione del test.

Standard	Densità ottiche (450 nm)
Standard 0 (0 ng/mL)	2,15
Standard 1 (0,15 ng/mL)	1,77
Standard 2 (0,5 ng/mL)	1,28
Standard 3 (1,5 ng/mL)	0,77
Standard 4 (3,0 ng/mL)	0,49
Standard 5 (7,5 ng/mL)	0,25
Standard 6 (20 ng/mL)	0,12

7 VALORI NORMALI

È consigliabile che ogni laboratorio determini i propri valori normali e anormali.

In uno studio condotto su neonati e bambini usando il test DRG 17-OH Progesterone ELISA i seguenti valori sono stati ottenuti:

Neonati (maschi e femmine)	n		Intervallo (min. - max.) (ng/mL)	Media (ng/mL)	Mediano (ng/mL)	2,5. - 97,5. percentile (ng/mL)
	26	1. mese dopo la nascita	0 - 17,3	7,2	6,7	1,0 - 17,0
	43	2. mese dopo la nascita	0,32 - 13,7	4,9	4,6	1,6 - 9,8
	21	3. mese dopo la nascita	0,06 - 4,2	2,3	2,3	0,5 - 4,1
	12	4. mese dopo la nascita	0,2 - 4,6	2,1	2,3	0,2 - 4,3

	n	Età (anni)	Intervallo (min. - max.) (ng/mL)	Media (ng/mL)	Mediano (ng/mL)	2,5. - 97,5. percentile (ng/mL)
Bambini	75	1 - 10	0,03 - 2,85	1,04	0,88	0,08 - 2,58
Adolescente	3	11 - 14	0,06 - 1,38	0,65	0,50	0,07 - 1,34
	10	15 - 18	0,41 - 2,35	1,24	1,26	0,42 - 2,26

In uno studio condotto su persone apparentemente sane usando il test DRG 17-OH Progesterone ELISA i seguenti valori sono stati ottenuti:

Donne	Fase follicolare:	0,1 - 0,8 ng/mL
	Fase luteale:	0,6 - 2,3 ng/mL
	Ovulazione:	0,3 - 1,4 ng/mL
	Post ACTH:	< 3,2 ng/mL
	Third trimester:	2,0 - 12 ng/mL
	Fase post menopausale:	0,13 - 0,51 ng/mL
Uomini		0,5 - 2,1 ng/mL

8 CONTROLLO QUALITÀ

È consigliabile utilizzare i campioni controllo secondo le norme di legge. Attraverso l'utilizzo dei campioni controllo si può raggiungere una verifica dei risultati giorno per giorno. Dovrebbero essere adoperati campioni controllo sia con un livello normale sia con uno patologico.

Le referenze con i rispettivi risultati del laboratorio QC sono elencati nel QC certificato, che è allegato al kit. I valori riportati nel QC certificato si riferiscono al lotto del kit attuale e dovrebbero essere utilizzati per un raffronto dei risultati.

È altresì consigliabile di partecipare a programmi di sicurezza sulla qualità nazionali o internazionali, per assicurarsi dell'esattezza dei risultati.

Appropriati metodi statistici per l'analisi dei valori controllo e delle rappresentazioni grafici dovrebbero essere adoperati. Nel caso che i risultati del test non combaciano con il campo di accettazione indicato dal materiale di controllo, i risultati dei pazienti devono essere considerati invalidi. In questo caso si prega di controllare i seguenti fattori d'errore: pipette, cronometri, fotometro, data di scadenza dei reagenti, condizione di magazzinaggio e d'incubazione, metodi di aspirazione e di lavaggio.

Se dopo il controllo dei suddetti fattori non è rilevabile alcun errore, si prega di contattare il fornitore o direttamente la ditta DRG.

9 CARATTERISTICHE DEL TEST

9.1 Assay Dynamic Range

Le concentrazioni determinabili con questo test stanno tra 0,042 – 20 ng/mL.

9.2 Specificità degli anticorpi (reazioni ad incrocio)

Per i dati dettagliati consultare le istruzioni per l'uso in inglese.

9.3 Sensitività

La sensibilità analitica dell'ELISA DRG è stata calcolata sottraendo 2 deviazioni standard dalla DO media di 20 analisi replicate dello Standard 0 ed è risultata pari a 0,013 ng/mL.

Il limite del bianco (LoB) è 0,006 ng/mL.

Il limite di rilevabilità (LoD) è 0,042 ng/mL.

Il limite di quantificazione (LoQ) è 0,156 ng/mL.

Per i dati dettagliati su

9.4 Precisione

9.5 Ritrovato

9.6 Linearità

si prega di consultare le dettagliate istruzioni per l'uso in inglese.

10 LIMITAZIONE DEL TEST

Risultati affidabili e riproducibili saranno ottenuti quando il procedimento del test è seguito con una comprensione completa delle istruzioni all'uso e seguendo una buona pratica di laboratorio (GLP).

Ogni manutenzione impropria dei campioni o modificazione del protocollo può influenzare i risultati.

10.1 Sostanze interferenti

Emoglobina (fino a 4 mg/mL), bilirubina (fino a 0,5 mg/mL) e trigliceridi (fino a 7,5 mg/mL) non influenzano i risultati di questo test.

10.2 Droghe interferenti

Sostanza	Concentrazione	Bias medio
	ng/mL	ng/mL
Coumestrol	5 – 500	-0,34
Daidzein	5 – 500	0,59
Ethisterone	23,4 – 2340	-0,48
Fulvestrant	5 – 500	-0,11
Genistein	5 – 500	0,28
Levonorgestrel	0,2 – 20	0,27
Mifepristone	23,4 – 2340	-0,53
Prednisolone	0,2 – 20	-0,12
Prednisone	0,2 – 20	-0,59
Secoisolariciresinol	5 – 500	0,23

Daidzein aumenterà la concentrazione misurata di 17-OH Progesterone in un campione in media di oltre 0,5 ng/mL.

Mifepristone e prednisolone ridurranno la concentrazione di 17-OH Progesterone misurata in un campione in media di oltre 0,5 ng/mL.

Tutte le altre sostanze testate non modificheranno la concentrazione di 17-OH Progesterone di oltre $\pm 0,5$ ng/mL.

10.3 L'effetto Hook

Un "effetto Hook" non viene rilevato nell'intervallo tra 0 e 640 ng/mL.

11 ASPETTI LEGALI

11.1 Affidabilità dei risultati

Il test deve essere eseguito esattamente secondo il protocollo dato dal produttore. Inoltre l'utente deve seguire le regole del GLP (Good Laboratory Practice) o eventualmente altre regole comportamentali o disposizioni legali. Questo vale soprattutto per l'uso delle referenze. È molto importante utilizzare un numero appropriato di referenze in parallelo ai campioni test per poter controllare l'esattezza e la precisione del test.

I risultati del test sono validi soltanto se tutte le referenze cadono nei margini prestabiliti e se tutti gli altri parametri del test soddisfano la specificazione per questo test. Se esistono dubbi o domande su questi risultati, si prega di contattare la ditta DRG.

11.2 Conseguenze terapeutiche

Soltanto sulla base dei risultati dei laboratori non dovrebbero essere intraprese delle conseguenze terapeutiche di alcun tipo, anche se i risultati del test sono d'accordo con gli aspetti articolati nel punto 11.1. Ogni risultato di laboratorio è soltanto una parte di un quadro clinico completo di un paziente.

Soltanto in casi in cui i risultati di un test del laboratorio si accordano con il quadro clinico dell'ammalato, si possono intraprendere delle conseguenze terapeutiche.

Il risultato del test da solo non è base sufficiente per lo stabilimento di una terapia.

11.3 Responsabilità legali

Ogni cambiamento del protocollo del test e/o lo scambio o il mescolamento di componenti provenienti da cariche diverse possono influenzare negativamente i risultati e compromettere la validità del test. Questi cambiamenti e/o scambi annullano ogni diritto al risarcimento.

Si respingano inoltre tutti i richiami risultanti da interpretazioni sbagliate da parte dell'utente secondo il paragrafo 11.2. Nel caso di reclamazione, la garanzia del produttore è limitato al valore massimo del test kit. Ogni danno provocato durante il trasporto del kit non sottostà alla responsabilità del produttore.

1 FINALIDAD PREVISTA

El kit de DRG **17-OH Progesterone ELISA** proporciona los materiales necesarios para la determinación cuantitativa del 17- α -Hidroxiprogesterona (17- α -OHP) en o plasma (EDTA, heparina de litio o plasma citrado).

Este ensayo está diseñado solo para diagnóstico *in vitro*.

2 FUNDAMENTO DEL ENSAYO

El kit de DRG 17-OH Progesterone ELISA es un ensayo en fase sólida de inmunoadsorción unido a enzimas (ELISA), basado en el **principio de unión competitiva**.

Las muestras se preincuban en los pocillos recubiertos.

Los pocillos de las placas están recubiertos con un anticuerpo policlonal [conejo] dirigido contra los sitios antigénicos de la molécula de 17- α -OHP.

Durante la incubación, el 17- α -OHP en la muestra agregada compite con el conjugado enzimático agregado, que es 17- α -OHP conjugado con peroxidasa de rábano, por unirse al anticuerpo recubierto.

Después de un paso de lavado para eliminar todas las sustancias no ligadas, la fase sólida se incuba con la solución de sustrato. La reacción colorimétrica se detiene mediante la adición de la solución de parada, y se mide la densidad óptica (OD) del producto amarillo resultante.

La intensidad del color es inversamente proporcional a la concentración del analito en la muestra.

Se construye una curva estándar trazando 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 PRECAUCIONES

- Este kit es solamente para diagnóstico *in vitro*. Solo para uso profesional.
- Por favor, se usa solo la versión válida de la metodología técnica incluido aquí en el kit.
- Para obtener información de las sustancias peligrosas incluidas en el kit por favor mirar las hojas de los datos de seguridad del material.
- Todos los reactivos en este kit de ensayo que contienen suero o plasma humano se han ensayado y confirmado ser negativos para HIV I/II, HBsAg y HCV mediante procedimientos aprobados por la FDA. Sin embargo, todos los reactivos deben ser tratados tanto en su uso como dispensación como potencialmente biopeligrosos.
- Evitar contacto con *Stop Solution* que contiene H₂SO₄ 0,5 M. Puede provocar irritación y quemaduras en la piel.
- Nunca pipetear con la boca y evitar el contacto de los reactivos y las muestras con la piel y con membranas mucosas.
- No fumar, comer, beber o usar cosméticos en áreas donde las muestras o los reactivos del kit están siendo usados.
- Usar guantes de látex cuando se utilicen las muestras y los reactivos. La contaminación microbiana de los reactivos o las muestras puede dar resultados erróneos.
- El manejo debe realizarse de acuerdo a los procedimientos definidos por las guías o regulación nacionales de seguridad de sustancias biopeligrosas.
- No utilizar los reactivos después de su fecha de caducidad que aparece en las etiquetas del kit.
- Todos los volúmenes indicados han de ser realizados de acuerdo con el protocolo. Los resultados óptimos del ensayo se obtienen solo cuando se utilizan pipetas y lectores de microplacas calibrados.
- No mezclar o usar componentes de kits con distinto número de lote. Se recomienda no intercambiar pocillos de distintas placas incluso si son del mismo lote. Los kits pueden haber sido enviados o almacenados bajo diferentes condiciones y las características de unión de las placas pueden resultar diferentes.
- Los compuestos químicos y los reactivos preparados o utilizados han de tratarse como residuos peligrosos de acuerdo con las guías o regulación nacionales de seguridad de sustancias biopeligrosas.
- Las hojas de los datos de seguridad de este producto están disponibles bajo pedido directamente a DRG Instruments GmbH.

4 COMPONENTES DEL KIT

4.1 Componentes del Kit

1. **Microtiterwells** (Placas multipocillo), 12 x 8 tiras separables, 96 pocillos; Pocillos recubiertos con anticuerpo anti-17- α -OHP (policlonal)
2. **Standard (Standard 0 - 6)**, (Estándar), 7 viales, 1 mL, listo para usar;
 Concentraciones: 0; 0,15; 0,5; 1,5; 3; 7,5; 20 ng/mL
 0; 0,45; 1,5; 4,5; 9,1; 22,7; 60,6 nmol/L
 Conversión: ng/mL \times 3,03 = nmol/L
 Los estándares están calibrado contra el siguiente material de referencia: *Certified Reference Material Cerilliant H-085*
 Contiene conservante sin mercurio.
3. **Control Low & High**, 2 viales, 1 mL, listo para usar; Para los valores y rangos de control, por favor consulte la etiqueta del frasco o el Certificado de Análisis.
 Contiene conservante.
4. **Enzyme Conjugate** (Conjugado enzimático), 1 vial, 25 mL, listo para usar, 17- α -OHP conjugado con la Peroxidasa de rábano;
 Contiene conservante sin mercurio.
5. **Substrate Solution** (Solución de sustrato), 1 vial, 25 mL, listo para usar, Tetrametilbencidina (TMB).
6. **Stop Solution** (Solución de parada), 1 vial, 14 mL, listo para usar, contiene 0.5 M H₂SO₄,
 Evitar el contacto con la Solución de parada. Puede causar irritación y quemaduras en al piel.
7. **Wash Solution** (Solución de lavado), 1 vial, 30 mL (concentrado 40X), ver "Preparación de los Reactivos".

Nota: Se puede solicitar el *Standard 0* para la dilución de la muestra..

4.2 Equipamiento y material requerido pero no provisto

- Lector de microplacas calibrado (450 nm, con longitud de onda de referencia a 620 nm a 630 nm)
- Micropipetas de precisión variable calibradas
- Equipo manual o automático para el lavado de placas de microtitulación
- Papel absorbente
- Agua destilada
- Temporizador
- Papel cuadriculado o software para el cálculo de datos

4.3 Almacenamiento y estabilidad del kit

Cuando se almacena a 2 °C - 8 °C, los reactivos sin abrir mantienen su reactividad hasta la fecha de caducidad. No utilizar los reactivos más allá de esta fecha. Los reactivos abiertos han de almacenarse a 2 °C - 8 °C. Las placas multipocillo han de almacenarse a 2 °C - 8 °C. Una vez se ha abierto la bolsa hay que tener cuidado y cerrarla de nuevo. Los kits abiertos conservan su actividad durante 8 semanas si se almacenan como se ha descrito arriba.

4.4 Preparación de los Reactivos

Dejar que todos los reactivos y el número requerido de tiras alcancen la temperatura ambiente (20 °C a 26 °C) antes de usarse.

Wash Solution

Mezclar 30 mL de *Wash Solution* concentrada con 1170 mL de agua destilada hasta un volumen final de 1200 mL.
La solución del lavado diluida es estable durante 1 semana a temperatura ambiente.

4.5 Eliminación del Kit

La eliminación del kit debe realizarse de acuerdo con las leyes nacionales. En las hojas de datos de seguridad se proporciona información especial de este producto (ver capítulo 13).

4.6 Kits de ensayo dañados

En caso de que exista cualquier daño severo del kit de ensayo o de sus componentes, ha de informarse por escrito a DRG, no mas tarde de una semana después de recibir el kit. No deben utilizarse componentes dañados para llevar a cabo un ensayo. Han de almacenarse hasta que se encuentre una solución. Después de esto, deben ser eliminados de acuerdo con las leyes oficiales.

5 MUESTRAS

En este ensayo pueden usarse suero o plasma (EDTA, heparina de litio o plasma de citrato).

Tener en cuenta: No deben usarse muestras que contengan acida sódica.

En general, se debe evitar el uso de muestras hemolíticas, ictericas o lipémicas. Para más información consulte el capítulo "*Sustancias que pueden interferir*".

5.1 Toma de muestras

Suero:

Recoger la sangre por punción en la vena (ej. Sarstedt Monovette para el suero), permitir coagulación, y separar el suero por centrifugación a temperatura ambiente. No centrifugar antes de la coagulación completa. Las muestras de pacientes que reciben terapia anticoagulante requieren más tiempo para coagular.

Plasma:

Toda la sangre ha de recogerse en tubos de centrifuga que contengan anticoagulante (Ej. Sarstedt Monovette con una preparación adecuada para el plasma) y centrifugar inmediatamente tras la recogida.

5.2 Almacenamiento de las muestras

Las muestras deben ser tapadas y pueden ser almacenadas hasta 7 días a 2 °C a 8 °C antes del ensayo.

Las muestras almacenadas por un período de tiempo mas largo (hasta 12 meses) han de congelarse sólo una vez a -20 °C antes del ensayo. Las muestras descongeladas deben invertirse varias veces antes del ensayo.

5.3 Dilución de las muestras

Si en un ensayo inicial, se encuentra una muestra que presenta valores mayores que el estándar mas concentrado, ha de diluirse con *Standard 0* y volver a ensayarse como se describe en el Procedimiento de Ensayo.

Para el cálculo de las concentraciones habrá que tener en cuenta el factor de dilución.

Ejemplo:

a) dilución 1:10: 10 µL de muestra + 90 µL *Standard 0* (mezclar totalmente)

b) dilución 1:100: 10 µL dilución a) 1:10 + 90 µL *Standard 0* (mezclar totalmente).

6 PROCEDIMIENTO DE ENSAYO

6.1 Consideraciones generales

- Todos los reactivos y muestras han de estar a temperatura ambiente antes de su uso. Todos los reactivos deben mezclarse sin formar espuma.
- Una vez se ha comenzado el ensayo deben completarse todos los pasos sin interrupción.
- Utilizar puntas de pipeta de plástico nuevas para cada estándar, control o muestra para evitar combinaciones cruzadas.
- La densidad óptica es función del tiempo de incubación y la temperatura. Antes de comenzar el ensayo, se recomienda que todos los reactivos estén preparados, tapas removidas, todos los pocillos que se necesiten asegurados en recipiente, etc. Esto asegurará un tiempo similar para cada paso de pipeteo sin que haya interrupciones.
- Como regla general, la reacción enzimática es linealmente proporcional al tiempo y a la temperatura.

6.2 Procedimiento de ensayo

Cada uno debe incluir una curva de estándares.

1. Asegurar el número deseado de pocillos en el recipiente.
2. Dispensar **25 µL** de cada **Standard, Control** y **muestra** con puntas nuevas en los pocillos adecuados.
3. Incubar durante **5 minutos** a temperatura ambiente
4. Dispensar **200 µL** de **Enzyme Conjugate** a cada pocillo.
Mezclar totalmente durante 10 segundos. Es importante mezclar completamente en este paso.
5. Incubar durante **60 minutos** a temperatura ambiente.
6. Sacudir enérgicamente el contenido de los pocillos.
Lavar los pocillos **3 veces** con solución de lavado diluida (400 µL por pocillo). Realizar un golpe seco de los pocillos contra el papel absorbente para eliminar las gotas residuales.
Nota importante:
La sensibilidad y la precisión de este ensayo se ve marcadamente influenciada por la realización correcta del proceso de lavado!
7. Adicionar **200 µL** de **Substrate Solution** a cada pocillo.
8. Incubar durante **30 minutos** a temperatura ambiente.
9. Parar la reacción enzimática mediante la adición de **100 µL** de **Stop Solution** a cada pocillo.
10. Determinar la densidad óptica (DO) de la solución en cada pocillo a **450 nm (lectura) y a 620 nm a 630 nm (se recomienda la sustracción de fondo)** con un lector de microplacas. Se recomienda que los pocillos se lean dentro de los **10 minutos** siguientes a la adición de la solución de parada (*Stop Solution*).

6.3 Cálculo de los Resultados

1. Calcular los valores de densidad óptica (DO) promedio para cada conjunto de estándares, controles y muestras de pacientes.
2. Construir una curva estándar mediante la representación de la densidad óptica media obtenida para cada estándar frente a su concentración con el valor de DO en el eje vertical (Y) y la concentración en el eje horizontal (X).
3. Usando el valor de la DO media de cada muestra determinar la concentración correspondiente a partir de la curva estándar.
4. Método automatizado: Los resultados en las instrucciones de uso se han calculado automáticamente usando una curva de regresión 4 Parámetros. (4 Parámetros Rodbard o 4 Parámetros Marquardt son los métodos preferidos.) Otras funciones de regresión darán lugar a resultados sensiblemente diferentes.
5. La concentración de la muestra puede leerse directamente de la curva de estándares. Las muestras con concentraciones superiores al mayor estándar han de diluirse. Para el cálculo de las concentraciones hay que tener en cuenta el factor de dilución.

6.3.1 Ejemplo de una Curva Estándar Típica

Los siguientes datos son solamente para la explicación y **no** pueden ser utilizados en lugar de los datos generados en el momento del ensayo.

Estándar	Densidad óptica (450 nm)
Standard 0 (0 ng/mL)	2,15
Standard 1 (0,15 ng/mL)	1,77
Standard 2 (0,5 ng/mL)	1,28
Standard 3 (1,5 ng/mL)	0,77
Standard 4 (3,0 ng/mL)	0,49
Standard 5 (7,5 ng/mL)	0,25
Standard 6 (20 ng/mL)	0,12

7 VALORES ESPERADOS

Se recomienda encarecidamente que cada laboratorio determine sus valores normales e inusuales.

En un estudio llevado a cabo con recién nacidos y niños, utilizando el DRG 17-OH Progesterone ELISA se observaron los siguientes valores:

Recién nacidos (Femenino y masculino)	n		Rango (min. - max.) (ng/mL)	Media (ng/mL)	Mediana (ng/mL)	Percentil 2,5 - 97,5 (ng/mL)
	26	1. mes después la natividad	0 - 17,3	7,2	6,7	1,0 - 17,0
	43	2. mes después la natividad	0,32 - 13,7	4,9	4,6	1,6 - 9,8
	21	3. mes después la natividad	0,06 - 4,2	2,3	2,3	0,5 - 4,1
	12	4. mes después la natividad	0,2 - 4,6	2,1	2,3	0,2 - 4,3

	n	Edad (años)	Rango (min. - max.) (ng/mL)	Media (ng/mL)	Mediana (ng/mL)	Percentil 2,5 - 97,5 (ng/mL)
Niños	75	1 - 10	0,03 - 2,85	1,04	0,88	0,08 - 2,58
Adolescente	3	11 - 14	0,06 - 1,38	0,65	0,50	0,07 - 1,34
	10	15 - 18	0,41 - 2,35	1,24	1,26	0,42 - 2,26

En un estudio llevado a cabo con individuos aparentemente sanos, utilizando el DRG 17-OH Progesterone ELISA se observaron los siguientes valores:

Mujeres	Phase folliculaire	0,1 - 0,8 ng/mL
	Phase lutéale	0,6 - 2,3 ng/mL
	Ovulation	0,3 - 1,4 ng/mL
	Post ACTH	< 3,2 ng/mL
	Third trimester	2,0 - 12 ng/mL
	Post-ménopausée	0,13 - 0,51 ng/mL
Hombres		0,5 - 2,1 ng/mL

8 CONTROL DE CALIDAD

Se recomienda usar muestras control de acuerdo con las leyes estatales y federales. El uso de muestras control se recomienda para asegurar la validez diaria de los resultados. Usar controles tanto a niveles normal como patológico. Los controles y los correspondientes resultados del Laboratorio de control de calidad están fijados en el certificado de control de calidad que acompañan al kit. Los valores y los rangos fijados en la hoja del control de calidad se refieren siempre al kit actual y deben usarse para la comparación directa de los resultados.

Es recomendable también hacer uso de programas de Aseguramiento de la Calidad nacionales o internacionales para asegurar la exactitud de los resultados.

Utilizar métodos estadísticos apropiados para el análisis de los valores y tendencia de los controles. Si los resultados del ensayo no se ajustan a los rangos aceptables establecidos en los controles, los resultados obtenidos de los pacientes han de considerarse inválidos.

En este caso, por favor comprobar las siguientes áreas técnicas: Pipeteo y tiempo empleado, fotómetro, fecha de caducidad de los reactivos, condiciones de almacenamiento e incubación, métodos de aspiración y lavado.

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

9 CARACTERÍSTICAS DEL ENSAYO

9.1 Rango dinámico del ensayo

El rango del ensayo se encuentra entre 0,042 – 20 ng/mL.

9.2 Especificidad de los Anticuerpos (Reactividad Cruzada)

Consultar el manual de usuario en inglés.

9.3 Sensibilidad

La sensibilidad analítica se calculó restando 2 desviaciones estándar de la DO media de 20 análisis replicados del Estándar 0 y resultó ser 0,013 ng/mL.

El límite del blanco (LoB) es 0,006 ng/mL.

El Límite de Detección (LoD) es 0,042 ng/mL.

El Límite de Cuantificación (LoQ) es 0,156 ng/mL.

Para información sobre

9.4 Precisión

9.5 Recuperación

9.6 Linealidad

por favor consulte la versión detallada en inglés de las Instrucciones de Uso.

10 LIMITACIONES DE USO

Cualquier manipulación inadecuada de las muestras o modificaciones del ensayo pueden influenciar los resultados.

10.1 Sustancias que pueden interferir

Hemoglobina (hasta 4 mg/mL), Bilirrubina (hasta 0,5 mg/mL) y Triglicéridos (hasta 7,5 mg/mL) no influyen los resultados del ensayo.

10.2 Interferencias con drogas

Sustancia	Concentración	Sesgo medio (bias)
	ng/mL	ng/mL
Coumestrol	5 – 500	-0,34
Daidzein	5 – 500	0,59
Ethisterone	23,4 – 2340	-0,48
Fulvestrant	5 – 500	-0,11
Genistein	5 – 500	0,28
Levonogestrel	0,2 – 20	0,27
Mifepristona	23,4 – 2340	-0,53
Prednisolona	0,2 – 20	-0,12
Prednisona	0,2 – 20	-0,59
Secoisolariciresinol	5 – 500	0,23

Daidzein aumentará la concentración de 17-OH progesterona medida en una muestra en promedio más de 0.5 ng/mL.

La mifepristona y la prednisolona disminuirán la concentración de 17-OH progesterona medida en una muestra en promedio más de 0.5 ng/mL.

Todas las demás sustancias analizadas no cambiarán la concentración de 17-OH progesterona en más de $\pm 0,5$ ng/mL.

10.3 Efecto Hook

No se detecta un "Efecto Hook" en el rango entre 0 - 640 ng/mL.

11 ASPECTOS LEGALES

11.1 Fiabilidad de los Resultados

El ensayo debe realizarse exactamente de acuerdo a las instrucciones del fabricante. Mas aún, el usuario debe ajustarse estrictamente a las reglas BPL (Buenas Prácticas de Laboratorio) o a otros estándares y/o leyes nacionales aplicables. Esto es especialmente relevante para el uso de reactivos control. Es importante incluir siempre, dentro del procedimiento de ensayo, un número suficiente de controles para validar la exactitud y la precisión del ensayo.

Los resultados del ensayo son válidos sólo si todos los controles se encuentran dentro de los rangos especificados y si todos los otros parámetros del ensayo se encuentran dentro de las especificaciones dadas para el ensayo. En caso de alguna duda o inquietud, por favor, contactar con DRG.

11.2 Consecuencias Terapéuticas

Las consecuencias terapéuticas nunca deben basarse sólo en los resultados de laboratorio incluso si todos los resultados del ensayo están de acuerdo con los asuntos fijados en el punto 11.1. Cualquier resultado de laboratorio es solamente una parte del cuadro clínico de un paciente.

Solamente en los casos donde los resultados de laboratorio están en acuerdo con todo el cuadro clínico de un paciente, se pueden derivar consecuencias terapéuticas.

Nunca deben derivarse consecuencias terapéuticas a partir de solamente el resultado obtenido en el ensayo

11.3 Responsabilidad

Cualquier modificación del kit y/o cambio o mezcla de cualquier componente procedentes de kits de lotes diferentes puede afectar negativamente a los resultados esperados y en la validez de todo el test. Esas modificaciones y/o cambios invalidan cualquier reclamación de reposición.

Las reclamaciones emitidas debidas a una mala interpretación de los resultados de laboratorio por parte del comprador referidos al punto 11.2 son también inválidas. A pesar de todo, en el caso de cualquier reclamación, la responsabilidad del fabricante no excede el valor del kit. Cualquier daño provocado al kit durante su transporte no está sujeto a la responsabilidad del fabricante.

1 UTILISATION PRÉVUE

Le kit de dosage immuno-enzymatique **DRG 17-OH Progesterone ELISA** propose le matériel requis pour la mesure quantitative de 17- α -hydroxyprogesterone (17- α -OHP) dans le sérum ou plasma (plasma EDTA, héparine de lithium ou citrate).

Ce kit est à utiliser uniquement dans le cadre de tests diagnostiques in vitro.

2 PRINCIPE DU TEST

Le kit DRG 17-OH Progesterone ELISA est un test immuno-enzymatique en phase solide (ELISA basé sur le **principe de liaison compétitive**).

Les puits de microtitration sont recouverts d'un anticorps polyclonal [lapin] dirigé contre les sites antigéniques de la molécule de 17- α -OHP.

Les échantillons sont pré-incubés dans les puits revêtus.

Au cours de la seconde incubation, la 17- α -OHP présente dans l'échantillon ajouté entre en compétition avec le conjugué enzymatique ajouté, qui est la 17- α -OHP conjugué à la peroxydase de raifort (HRP), pour se fixer à l'anticorps enrobé.

Après une étape de lavage pour éliminer toutes les substances non liées, la phase solide est incubée avec la solution de substrat. La réaction colorimétrique est arrêtée par l'ajout d'une solution d'arrêt, et la densité optique (DO) du produit jaune résultant est mesurée. L'intensité de la couleur est inversement proportionnelle à la concentration de l'analyte dans l'échantillon.

Une courbe standard est construite en traçant les valeurs de DO par rapport aux concentrations des étalons, et les concentrations des échantillons inconnus sont déterminées à l'aide de cette courbe standard.

3 PRECAUTIONS D'UTILISATION

- Ce kit est uniquement destiné aux tests diagnostiques in vitro. Pour un usage professionnel seulement.
- Utilisez uniquement la version valide d'instructions d'utilisation qui est incluse dans le kit.
- Les informations concernant la toxicité des réactifs contenus dans ce kit sont présentées dans la fiche de sécurité (« Safety Data Sheets »).
- Tous les réactifs de ce kit contenant du sérum ou du plasma humain ont été testés avec des résultats négatifs pour le VIH I/II, le HBsAg et le HCV selon les normes FDA en vigueur. Néanmoins, lors de leur utilisation, tous les réactifs de ce kit doivent être manipulés avec précaution.
- Éviter les contacts avec la *Stop Solution*, celle-ci contient 0.5 M de H₂SO₄. Cela pourrait engendrer irritations ou brûlures de la peau.
- Ne jamais pipeter avec la bouche, et éviter tout contact de la peau ou des muqueuses avec les réactifs ou les échantillons.
- Ne pas fumer, manger, boire ou utiliser des produits cosmétiques dans les zones où les échantillons ou le kit ont été maniés.
- Porter des gants d'examen lors de l'utilisation des échantillons ou des réactifs. Une contamination microbienne des échantillons ou des réactifs pourrait fausser les résultats.
- L'utilisation de ce kit devra être en accord avec les normes ou recommandations nationales de sécurité en vigueur concernant les produits à risque biologique.
- Ne pas utiliser les réactifs au-delà de la date d'expiration inscrite sur l'emballage.
- Tous les volumes indiqués doivent être scrupuleusement respectés, comme indiqué dans le protocole expérimental. Seule l'utilisation de pipettes calibrées ou d'un spectrophotomètre lecteur de micro-plaques calibré garantit l'obtention de résultats optimaux à ce test.
- Ne pas mélanger ou utiliser des réactifs contenus dans des kits de lots différents. Il est conseillé de ne pas échanger les puits de différentes plaques, même si celles-ci proviennent du même lot. Les kits peuvent avoir été transportés ou stockés différemment, et les caractéristiques de liaison de chaque plaque pourraient ainsi être modifiées.
- L'élimination des solutions chimiques et des réactifs contenus dans ce kit, utilisés ou non, doit être en accord avec la réglementation nationale en vigueur concernant l'élimination des déchets à risque biologique.
- La fiche de sécurité concernant ce produit peut être obtenue en contactant directement DRG Instruments GmbH.

4 COMPOSITION DU KIT

4.1 Contenu du kit

- Microtiterwells** (*Microplaques*), 12 x 8 (à détacher) barrettes, plaques de 96 puits; Les puits sont recouverts avec un anticorps anti-17- α -OHP (polyclonal).
- Standard (Standard 0 - 6)**, 7 flacons, 1 mL chacun, prêt à l'emploi ;
Concentrations: 0; 0,15; 0,5; 1,5; 3; 7,5; 20 ng/mL
0; 0,45; 1,5; 4,5; 9,1; 22,7; 60,6 nmol/L
Conversion: ng/mL \times 3,03 = nmol/L
Les standards sont étalonnés par rapport au matériel de référence suivante: *Certified Reference Material Cerilliant H-085*
Contient agent de conservation sans mercure.
- Control Low & High** (*Contrôle*), 2 flacons, 1,0 mL, prêt à l'emploi ;
Pour les valeurs de contrôle et les limites, se référer à l'étiquette du flacon ou au certificat d'analyse.
Contient agent de conservation sans mercure.
- Enzyme Conjugate** (*Conjugué enzymatique*), 1 flacon, 25 mL, prêt à l'emploi,
17- α -OHP conjugué à la HRP;
Contient agent de conservation sans mercure.
- Substrate Solution** (*Solution substrat*), 1 flacon, 25 mL, prêt à l'emploi,
Tétraméthylbenzidine (TMB).
- Stop Solution** (*Solution d'arrêt*), 1 flacon, 14 mL, prêt à l'emploi,
contient 0.5M de H₂SO₄,
Eviter les contacts avec la solution stop. Cela pourrait engendrer irritations ou brûlures de la peau.
- Wash Solution** (*Solution de lavage*), 1 flacon, 30 mL (concentré 40X),
voir « Préparation des réactifs ».

Remarque : Un *Standard 0* supplémentaire peut être fourni sur demande.

4.2 Equipement et matériel requis, mais non fournis

- Un spectrophotomètre lecteur de microplaques calibré (450 nm, avec longueur d'onde de référence à 620 nm à 630 nm)
- Des micro-pipettes de précision variables et calibrées
- Laveur manuel ou automatique pour le lavage des microplaques
- Du papier absorbant
- De l'eau distillée
- Un minuteur
- Papier graphique ou logiciel pour la réduction des données

4.3 Stockage et stabilité du kit

Les réactifs contenus dans des flacons non-ouverts, stockés à 2 °C à 8 °C, seront stables jusqu'à la date d'expiration inscrite sur l'étiquette. Ne pas utiliser les réactifs au-delà de cette date.

Les réactifs contenus dans des flacons ouverts doivent être stockés à 2 °C à 8 °C. Les microplaques doivent être stockées à 2 °C à 8 °C. Une fois le sachet en aluminium ouvert, attention à bien refermer le flacon.

Les kits ouverts conservent leur activité durant 8 semaines s'ils sont stockés comme précédemment mentionné.

4.4 Préparation des réactifs

Amener tous les réactifs et le nombre de barrettes nécessaires au test à température ambiante (20 °C à 26 °C avant utilisation.

Wash Solution

Diluer 30 mL de *Wash Solution* concentrée avec 1170 mL d'eau distillée, pour un volume final de 1200 mL. **Remarque :** La solution de lavage diluée est stable 1 semaine à température ambiante.

4.5 Elimination des déchets relatifs au kit

L'élimination des déchets relatifs au kit doit être réalisée selon les règles nationales en vigueur. Les informations spécifiques au kit sont présentées dans la fiche de sécurité (voir chapitre 13).

4.6 Kits endommagés

Dans le cas de dommages importants survenus au kit ou ses composants, informer la DRG, au plus tard une semaine après réception du kit. Les composants endommagés ne doivent pas être utilisés pour le test. Ils doivent être stockés jusqu'à ce qu'une solution adaptée ait été trouvée. Après cela, ils doivent être éliminés selon les directives officielles en vigueur.

5 ECHANTILLON

Il est possible d'utiliser du sérum ou du plasma (plasma EDTA, héparine de lithium ou citrate) pour ce dosage.

Remarque : Les échantillons contenant de l'azide de sodium ne doivent pas être utilisés pour ce test. En général, il faut éviter d'utiliser des échantillons hémolytiques, ictériques ou lipémiques. Pour plus d'informations, se reporter au chapitre "*Substances interférentes*".

5.1 Prélèvement et préparation des échantillons

Sérum:

Prélever le sang par ponction veineuse (ex. Sarstedt Monovette pour sérum), laisser coaguler, puis séparer le sérum par centrifugation à température ambiante. Ne pas centrifuger avant que la coagulation ne soit terminée. Les patients sous traitement anti-coagulant peuvent demander un temps de coagulation plus important.

Plasma:

Le sang total doit être prélevé dans des tubes de centrifugation contenant un anti-coagulant (Sarstedt Monovette avec une préparation appropriée de plasma) et centrifugé immédiatement après le prélèvement.

5.2 Conservation des échantillons

Les tubes contenant les échantillons doivent être fermés et peuvent être stockés jusqu'à 7 jours à 2 °C à 8 °C avant d'être testés.

Les échantillons stockés pour un temps prolongé (jusqu'à 12 mois) doivent être congelés à -20 °C avant d'être testés. Les échantillons décongelés doivent être retournés plusieurs fois avant le test.

5.3 Dilution de l'échantillon

Si, lors d'un test préliminaire, la concentration de l'échantillon se révèle être supérieure à celle du standard le plus concentré, alors l'échantillon doit être dilué avec le *Standard 0* et testé de nouveau, comme décrit dans Réalisation du test.

Pour le calcul des concentrations, ce facteur de dilution doit être pris en considération.

Exemple:

- a) dilution 1:10: 10 µL de l'échantillon + 90 µL *Standard 0* (bien mélanger).
b) dilution 1:100: 10 µL dilution a) 1:10 + 90 µL *Standard 0* (bien mélanger).

6 RÉALISATION DU TEST

6.1 Remarques générales

- Tous les réactifs et échantillons doivent être amenés à température ambiante avant utilisation. Tous les réactifs doivent être mélangés, sans formation de mousse.
- Une fois la procédure engagée, toutes les étapes doivent être réalisées sans interruption.
- Utiliser un nouveau cône de pipette pour chaque standard, contrôle ou échantillon, ceci afin d'éviter toute contamination.
- La densité optique est fonction du temps d'incubation et de la température. Avant de commencer le test, il est recommandé de préparer tous les réactifs, bouchons ouverts, de préparer les puits des microplaques, etc. Cela garantira un intervalle de temps équivalent entre chaque étape, sans interruption.
- En règle générale, la réaction enzymatique est linéairement proportionnelle au temps et à la température.

6.2 Réalisation du dosage

Chaque test doit inclure une courbe étalon.

1. Disposer le nombre de puits de microtitration désiré dans le support.
2. Déposer **25 µL** de chaque **Standard, Control** et du **échantillon**, avec de nouveaux cônes de pipette, dans les puits appropriés.
3. Incuber pendant **5 minutes** à température ambiante.
4. Déposer **200 µL d'Enzyme Conjugate** dans chaque puits.
Bien mélanger pendant 10 secondes. Il est important d'obtenir un mélange parfait lors de cette étape.
5. Incuber pendant **60 minutes** à température ambiante.
6. Décanter le contenu des puits et rincer les puits **3 fois** avec de la solution de lavage diluée (400 µL par puits). Tapoter les puits sur du papier absorbant afin d'éliminer les gouttelettes résiduelles.
Remarque importante:
La sensibilité et la précision de ce test sont fortement dépendantes de la bonne réalisation des étapes de lavage !
7. Ajouter **200 µL** de **Substrate Solution** à chaque puits.
8. Incuber pendant **30 minutes** à température ambiante.
9. Stopper la réaction enzymatique en ajoutant **100 µL** de **Stop Solution** à chaque puits.
10. Déterminer la densité optique (DO) de la solution dans chaque puits à **450 nm (lecture) et à 620 nm à 630 nm (soustraction de fond, recommandée)** à l'aide d'un spectrophotomètre lecteur de microplaques.
Il est recommandé de lire les puits dans les **10 minutes** qui suivent l'ajout de la solution d'arrêt (*Stop Solution*).

6.3 Calcul des résultats

1. Calculer les valeurs moyennes des densités optiques (DO) pour chaque série de standards, contrôles et échantillons.
2. Etablir la courbe étalon en reportant la densité optique moyenne de chaque valeur standard en fonction de sa concentration, en posant la densité optique en axe des ordonnées et la concentration en axe des abscisses.
3. L'utilisation de la densité optique moyenne pour chaque échantillon détermine la concentration correspondante à partir de la courbe étalon.
4. Méthode automatique. Les résultats dans les instructions d'utilisation ont été calculés de façon automatique en utilisant une courbe de régression 4 Paramètres. (4 paramètres Rodbard ou 4 paramètres Marquardt sont les méthodes favorites.) D'autres fonctions logistiques peuvent donner des résultats légèrement différents.
5. La concentration des échantillons peut être lue directement à partir de cette courbe étalon. Les échantillons avec une concentration supérieure à celle du plus haut standard doivent être dilués de nouveau. Pour le calcul des concentrations, ce facteur de dilution doit être pris en considération.

6.3.1 Exemple d'une courbe standard typique

Les résultats suivants sont ici présentés à titre d'exemple et **ne peuvent** être utilisés au moment de l'essai.

Standard	Densité optique (450 nm)
Standard 0 (0 ng/mL)	2,15
Standard 1 (0,15 ng/mL)	1,77
Standard 2 (0,5 ng/mL)	1,28
Standard 3 (1,5 ng/mL)	0,77
Standard 4 (3,0 ng/mL)	0,49
Standard 5 (7,5 ng/mL)	0,25
Standard 6 (20 ng/mL)	0,12

7 VALEURS ATTENDUES

Il est fortement recommandé à chaque laboratoire de déterminer ses propres valeurs normales ou anormales.

Dans une étude menée sur des nouveau-nés et des enfants, à l'aide du kit DRG 17-OH Progesterone ELISA, les valeurs suivantes sont observées:

Nouveau-nés (féminine et masculin)	n		Portée (min. - max.) (ng/mL)	Valeur moyenne (ng/mL)	Médiane (ng/mL)	2,5. - 97,5. Percentile (ng/mL)
	26	1. mois après naissance	0 - 17,3	7,2	6,7	1,0 - 17,0
	43	2. mois après naissance	0,32 - 13,7	4,9	4,6	1,6 - 9,8
	21	3. mois après naissance	0,06 - 4,2	2,3	2,3	0,5 - 4,1
	12	4. mois après naissance	0,2 - 4,6	2,1	2,3	0,2 - 4,3

	n	Age (ans)	Portée (min. - max.) (ng/mL)	Valeur moyenne (ng/mL)	Médiane (ng/mL)	2,5. - 97,5. Percentile (ng/mL)
Enfants	75	1 - 10	0,03 - 2,85	1,04	0,88	0,08 - 2,58
Adolescents	3	11 - 14	0,06 - 1,38	0,65	0,50	0,07 - 1,34
	10	15 - 18	0,41 - 2,35	1,24	1,26	0,42 - 2,26

Dans une étude menée sur des sujets apparemment sains, à l'aide du kit DRG 17-OH Progesterone ELISA, les valeurs suivantes sont observées:

Femmes en âge de reproduire	Phase folliculaire	0,1 - 0,8 ng/mL
	Phase lutéale	0,6 - 2,3 ng/mL
	Ovulation	0,3 - 1,4 ng/mL
	Post ACTH	< 3,2 ng/mL
	Troisième semestre	2,0 - 12 ng/mL
	Femme post-ménopausée	0,13 - 0,51 ng/mL
Hommes normaux		0,5 - 2,1 ng/mL

8 CONTROLE DE QUALITE

Il est recommandé d'utiliser les échantillons contrôles selon les réglementations nationales en vigueur. L'utilisation des échantillons contrôles est recommandé afin de s'assurer jour après jour de la validité des résultats. Utiliser les contrôles de valeurs normales et pathologiques.

Les contrôles et les résultats correspondants issus du laboratoire QC sont mentionnés dans le certificat QC fourni avec le kit. Les valeurs et les limites mentionnées sur la fiche QC font toujours référence au lot de kit courant et doivent être utilisées pour une comparaison directe avec les résultats.

Il est également recommandé d'utiliser les programmes d'évaluation de qualité nationaux ou internationaux, afin de s'assurer de l'exactitude des résultats.

Utiliser les méthodes d'analyses statistiques appropriées pour l'analyse des valeurs contrôles et des tendances. Si les résultats ne correspondent pas aux limites établies des contrôles, les résultats concernant ces patients doivent être considérées comme non valides.

Dans ce cas, tester les zones techniques suivantes : mécanisme de pipettage et temps; spectrophotomètre, dates d'expiration des réactifs, conditions de stockage et d'incubation, méthodes d'aspiration et de lavage.

Après avoir tester les points mentionnés, si aucune erreur n'est détectée, contacter votre distributeur ou directement la DRG.

9 CARACTERISTIQUES DU TEST

9.1 Zone de mesure

Les limites du dosage sont comprises entre 0,042 – 20 ng/mL.

9.2 Spécificité des anticorps (Réaction croisée)

Consulter la version anglaise détaillée du mode d'emploi.

9.3 Sensibilité

La sensibilité analytique du DRG ELISA a été calculée en soustrayant 2 écarts types de la DO moyenne de 20 analyses répétées de la Standard 0 et s'est avérée être de 0,013 ng/mL.

La limite du blanc (LoB) est de 0,006 ng/mL.

La limite de détection (LoD) est de 0,042 ng/mL.

La limite de quantification (LoQ) est de 0,156 ng/mL.

Pour obtenir des données concernant

9.4 Précision

9.5 Récupération

9.6 Linéarité

consulter la version anglaise détaillée du mode d'emploi.

10 LIMITES D'UTILISATION

Des résultats fiables et reproductibles seront obtenus lorsque la procédure de test est effectuée avec une compréhension complète de la notice et en respectant les bonnes pratiques de laboratoire.

Toute utilisation impropre des échantillons ou toute modification du test peut influencer les résultats.

10.1 Substances parasites

L'hémoglobine (jusqu'à 4 mg/mL), la bilirubine (jusqu'à 0.5 mg/mL) et les triglycérides (jusqu'à 7,5 mg/mL) n'ont aucune influence sur les résultats du dosage.

10.2 Drogues parasites

Substance	Concentration	Biais moyen
	ng/mL	ng/mL
Coumestrol	5 – 500	-0,34
Daidzein	5 – 500	0,59
Ethisterone	23,4 – 2340	-0,48
Fulvestrant	5 – 500	-0,11
Genistein	5 – 500	0,28
Levonorgestrel	0,2 – 20	0,27
Mifépristone	23,4 – 2340	-0,53
Prednisolone	0,2 – 20	-0,12
Prednisone	0,2 – 20	-0,59
Secoisolariciresinol	5 – 500	0,23

Daidzein augmentera la concentration mesurée de 17-OH Progesterone dans un échantillon en moyenne de plus de 0,5 ng/mL.

La mifépristone et la prednisolone réduiront la concentration de 17-OH progesterone mesurée dans un échantillon en moyenne de plus de 0,5 ng/mL.

Toutes les autres substances testées ne modifieront pas la concentration de 17-OH Progesterone de plus de $\pm 0,5$ ng/mL.

10.3 Effet de Hook

Un «effet de Hook» n'est pas détecté dans la plage comprise entre 0 et 640 ng/mL.

11 ASPECTS LEGAUX

11.1 Fiabilité des résultats

Ce test doit être exactement utilisé selon les instructions d'utilisation du fabricant. De plus, les utilisateurs doivent strictement respecter les règles de la bonne pratique de laboratoire, ou autres lois nationales. Cela est spécialement le cas pour l'utilisation des réactifs contrôles. Pour chaque test, il est important d'inclure un nombre suffisant de contrôles, afin de pouvoir valider l'exactitude et la précision du test.

Les résultats du test sont valides si et seulement si tous les contrôles sont compris dans les gammes de mesure mentionnées et si tous les autres paramètres du test sont également compris dans les instructions de ce test. En cas de doute ou d'inquiétude, contacter la DRG.

11.2 Conséquences thérapeutiques

Les suites thérapeutiques ne devront jamais être basées sur les résultats de laboratoire seuls, même si les tous les résultats du test sont en accord avec les points mentionnés dans le paragraphe 11.1. Tout résultat n'est qu'une partie du tableau clinique complet d'un patient.

Les suites thérapeutiques peuvent découler des résultats de laboratoire si et seulement si ceux-ci sont en accord avec l'ensemble du tableau clinique du patient.

Le résultat du test en lui-même ne doit en aucun cas être le seul déterminant des suites thérapeutiques à suivre.

11.3 Responsabilité













Toute modification du kit et / ou échange ou mélange d'un des composants de différents lots, d'un kit à un autre, pourrait affecter de façon négative les résultats attendus et la validité du test dans son ensemble. De telles modifications ou échanges invalident toute réclamation pour remplacement.

Toutes les réclamations soumises, relatives au paragraphe 11.2, et dues à une mauvaise interprétation des résultats de laboratoire de la part du client sont également invalides. Néanmoins, en cas de réclamation, la responsabilité du fabricant n'est pas de dépasser les limites de la valeur du kit. Tout dommage causé au kit lors de son transport n'est pas du ressort de la responsabilité du fabricant.

12 REFERENCES / LITERATURE

1. Chrousos GP et al. Late onset 21-hydroxylase deficiency mimicking idiopathic hirsutism or polycystic ovarian disease. *Annals Intern Med.* 1982; 96,143-148.
2. Choi J-H, and Yoo H-W. Management issues of congenital adrenal hyperplasia during transition from pediatric to adult care. *Korean J. Pediatr.* 2017; 60(2), 31-37.
3. Eisenhoefer G et al. Reference intervals for plasma concentrations of adrenal steroids measured by LC-MS/MS: Impact of gender, age, oral contraceptives, body mass index and blood pressure status. *Clin. Chim Acta.* 2017; 470, 115-124.
4. Honour JW. 17-Hydroxyprogesterone in children, adolescents and adults. *Annals of Clinical Biochemistry,* 2014; 51(4), 424-440.
5. Hughes IA, Riad-Fahmy D, and Griffith K. Plasma 17OH-progesterone concentrations in newborn infants. *Archives of Disease in Childhood.* 1979; 54, 347-349.
6. Ishii T et al. Guidelines for diagnosis and treatment of 21-hydroxylase deficiency (2014 revision). *Clin. Pediatr. Endocrinol.* 2015; 24(3), 77-105.
7. Kang MJ et al. Relationships of basal level of serum 17-hydroxyprogesterone with that of serum androstenedione and their stimulated responses to a low dose of ACTH in young adult patients with congenital adrenal hyperplasia due to 21-hydroxylase deficiency. *J. Korean Med. Sci.* 2011; 26(11), 1454-60.
8. Maas KH et al. Relationship between 17-Hydroxyprogesterone responses to human chorionic gonadotropin and markers of ovarian follicle morphology in women with polycystic ovary syndrome. *J. Clin. Endocrinol. Metab.* 2015; 100(1), 293-300.

SYMBOLS USED

Symbol	English	Deutsch	Italiano	Español	Français
	European Conformity	CE-Konformitätskennzeichnung	Conformità europea	Conformidad europea	Conformité normes européennes
	Consult instructions for use *	Gebrauchsanweisung beachten *	Consultare le istruzioni per l'uso	Consulte las instrucciones de uso	Consulter les instructions d'utilisation
	<i>In vitro</i> diagnostic medical device *	<i>In-vitro</i> -Diagnostikum *	Dispositivo medico-diagnostico in vitro	Producto sanitario para diagnóstico in vitro	Dispositif médical de diagnostic in vitro
	Catalogue number *	Artikelnummer *	No. di Cat.	No de catálogo	Référence
	Batch code *	Fertigungslosnummer, Charge *	Lotto no	Número de lote	No. de lot
	Contains sufficient for <n> tests *	Ausreichend für <n> Prüfungen *	Contenuto sufficiente per "n" saggi	Contenido suficiente para <n> ensayos	Contenu suffisant pour "n" tests
	Temperature limit *	Temperaturbegrenzung *	Temperatura di conservazione	Temperatura de conservación	Température de conservation
	Use-by date *	Verwendbar bis *	Data di scadenza	Fecha de caducidad	Date limite d'utilisation
	Manufacturer *	Hersteller *	Fabbricante	Fabricante	Fabricant
	Biological risks *	Biologische Risiken *	Rischi biologici	Riesgos biológicos	Risques biologiques
	Caution *	Achtung *	Attenzione	Precaución	Attention
	For research use only	Nur für Forschungszwecke	Solo a scopo di ricerca	Sólo para uso en investigación	Seulement dans le cadre de recherches
<i>Distributed by</i>	Distributed by	Vertreiber	Distributore	Distribuidor	Distributeur
<i>Content</i>	Content	Inhalt	Contenuto	Contenido	Conditionnement
<i>Volume/No.</i>	Volume / No.	Volumen / Anzahl	Volume / Quantità	Volumen / Número	Volume / Quantité
<i>Microtiterwells</i>	Microtiterwells	Mikrotiterwells	Micropozzetti	Placas multipocillo	Microplaques
<i>Antiserum</i>	Antiserum	Antiserum	Antisiero	Antisuero	Antisérum
<i>Enzyme Conjugate</i>	Enzyme Conjugate	Enzymkonjugat	Tracciante enzimatico	Conjugado enzimático	Conjugué enzymatique
<i>Enzyme Complex</i>	Enzyme Complex	Enzymkomplex	Complesso enzimatico	Complejo enzimático	Complexe enzymatique
<i>Substrate Solution</i>	Substrate Solution	Substratlösung	Soluzione di substrato	Solución de sustrato	Solution substrat
<i>Stop Solution</i>	Stop Solution	Stopplösung	Soluzione d'arresto	Solución de parada	Solution d'arrêt
<i>Zero Standard</i>	Zero Standard	Nullstandard	Standard zero	Estándar cero	Zero Standard
<i>Standard</i>	Standard	Standard	Standard	Estándar	Standard
<i>Control</i>	Control	Kontrolle	Controllo	Control	Contrôle
<i>Assay Buffer</i>	Assay Buffer	Assaypuffer	Tampone del test	Tampón de ensayo	Tampon d'essai
<i>Wash Solution</i>	Wash Solution	Waschlösung	Soluzione di lavaggio	Solución de lavado	Solution de lavage
<i>1N NaOH</i>	1N NaOH	1N NaOH	1N NaOH (idrossido di sodio 1N)	1N NaOH	1N NaOH
<i>1 N HCl</i>	1 N HCl	1 N HCl		1 N HCl	1N HCl
<i>Sample Diluent</i>	Sample Diluent	Probenverdünnungsmedium	Diluyente dei campioni	Solución para dilución de la muestra	Solution pour dilution de l'échantillon
<i>Conjugate Diluent</i>	Conjugate Diluent	Konjugatverdünnungsmedium	Diluyente del tracciante	Solución para dilución del conjugado	Solution pour dilution du conjugué