



DCM004-10  
Ed. 01/2015

# 17OH PROGESTERONE ELISA

per analisi di routine

Determinazione immunoenzimatica diretta del 17OH Progesterone nel siero o plasma umano.

IVD



LOT  
See external label

2°C - 8°C



Σ = 96 tests

REF DKO004

## DESTINAZIONE D'USO

Metodo competitivo immunoenzimatico colorimetrico per la determinazione quantitativa della concentrazione del 17OH Progesterone nel siero o plasma umano.

Il kit 17OH Progesterone ELISA è destinato al solo uso di laboratorio.

## 1. SIGNIFICATO CLINICO

17-Hydroxyprogesterone (17OH Progesterone o 17α-OHP o 17-OHP) è un ormone steroideo C-21, prodotto nella ghiandola adrenale e nelle gonadi, durante la sintesi dei glucocorticoidi e degli ormoni steroidei. È derivato dal progesterone via 17-idrossilasi, un enzima P450c17, o dal 17-idrossipregnenolone via 3β-idrossisteroidi deidrogenasi/Δ<sup>5-4</sup> isomerasi. Il 17OH Progesterone è un precursore del cortisolo che si accumula in caso di deficit di 21-idrossilasi surrenale e si riduce dopo terapia sostitutiva con cortisolo. Valori elevati si riscontrano nell'iperplasia surrenale congenita.

Il 17-OHP non ha un ruolo fisiologico definito tranne come molecola del precursore.

I livelli di 17-OHP sierico sono età-dipendenti, con picchi osservati durante la vita fetale ed il periodo postnatale. Durante la prima settimana di vita, i livelli sierici di 17-OHP diminuiscono di ~50-volte rispetto ai valori sanguigni del cordone. Un piccolo aumento transitorio si manifesta dopo la nascita nei maschi di 30-60 giorni. I livelli per entrambi i sessi rimangono bassi e costanti durante l'infanzia ed aumentano progressivamente durante la pubertà, dove raggiungono i livelli dell'adulto di ~100 ng/dL (~3.03 nmol/L). I livelli di 17-OHP hanno normalmente una variazione giornaliera ACTH - dipendente, si individuano picchi mattutini e crolli notturni. In più, produzione ovarica di 17-OHP aumenta durante la fase luteale del ciclo mestruale.

Il 17-OHP è un progestinico naturale e durante il terzo mese di gravidanza vi è un aumento dovuto alla produzione adrenale fetale.

I livelli normali sono 3-90 ng/dl in bambini, nelle donne 15-70 ng/dl prima dell'ovulazione e 35-290 ng/dl durante la fase luteale.

Le misure dei livelli del 17-OHP sono utili nella valutazione dell'iperplasia adrenale congenita dovuta alla carenza degli enzimi tipici quali la 21-idrossilasi e

11β-idrossilasi, conducono all'accumulazione del 17-OHP.

In opposizione, raramente, il paziente con la mancanza di 17α-idrossilasi avrà livelli molto bassi o inosservabili di 17-OHP.

Elevati livelli sierici basali di 17-OHP e/o dopo lo stimolo dell'ACTH sono presenti in caso di iperplasia adrenale.

## 2. PRINCIPIO DEL METODO

Il 17OH Progesterone (antigene) presente nel campione, compete con l'antigene 17OH Progesterone marcato con perossidasi di rafano (HRP) nei confronti dell'anticorpo anti 17OH Progesterone adsorbito su micropiastra (fase solida). Dopo l'incubazione, la separazione libero-legato si ottiene mediante semplice lavaggio della fase solida. L'enzima HRP presente nella frazione legata, catalizza la reazione tra il Substrato (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>) ed il TMB Substrate, sviluppando una colorazione blu che vira al giallo dopo aggiunta della Stop Solution (H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>).

L'intensità del colore sviluppato è inversamente proporzionale alla concentrazione del 17OH Progesterone presente nel campione.

La concentrazione di 17OH Progesterone nel campione è calcolata sulla base di una curva di calibrazione.

### 3. REATTIVI, MATERIALI E STRUMENTAZIONI

#### 3.1. Reattivi e materiali forniti nel kit

- Calibrators** (6 flaconi, 1 mL ciascuno)  
CAL0 **REF** DCE002/0406-0  
CAL1 **REF** DCE002/0407-0  
CAL2 **REF** DCE002/0408-0  
CAL3 **REF** DCE002/0409-0  
CAL4 **REF** DCE002/0410-0  
CAL5 **REF** DCE002/0411-0
- Control** (1 flacone, 1 mL, pronto all'uso)  
La concentrazione del controllo è indicata sul Certificato di Analisi **REF** DCE045/0403-0
- Conjugate** (1 flacone, 22 mL)  
17OH Progesterone coniugato con perossidasi di rafano (HRP) **REF** DCE002/0402-0
- Coated Microplate** (1 micropiastra breakable)  
Anticorpo anti 17OH Progesterone adsorbito su micropiastra **REF** DCE002/0403-0
- TMB Substrate** (1 flacone, 15 mL)  
H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>-TMB 0,26 g/L (*evitare il contatto con la pelle*) **REF** DCE004-0
- Stop Solution** (1 flacone, 15 mL)  
Acido Solforico 0,15 mol/L (*evitare il contatto con la pelle*) **REF** DCE005-0
- 10X Conc. Wash Solution** (1 flacone, 50 mL)  
Tampone fosfato 0,2M pH 7.4 **REF** DCE054-0

#### 3.2. Reattivi necessari non forniti nel kit

Acqua distillata

#### 3.3. Materiale e strumentazione ausiliari

Dispensatori automatici.

Letto per micropiastre (450 nm, 620-630 nm).

#### Note

Conservare tutti i reattivi a 2-8°C, al riparo dalla luce. Aprire la busta del Reattivo 4 (Coated Microplate) solo dopo averla riportata a temperatura ambiente e chiuderla subito dopo il prelievo delle strip da utilizzare; una volta aperta è stabile fino alla data di scadenza del kit.

Evitare di staccare la sheet adesiva dalle strip che non vengono utilizzate nella seduta analitica.

#### 4. AVVERTENZE

- Questo test kit è per uso in vitro, da eseguire da parte di personale esperto. Non per uso interno o esterno su esseri Umani o Animali.
- Usare i previsti dispositivi di protezione individuale mentre si lavora con i reagenti forniti.
- Seguire le Buone Pratiche di Laboratorio (GLP) per la manipolazione di prodotti derivati da sangue.
- Tutti i reattivi di origine umana usati nella preparazione dei reagenti sono stati testati e sono risultati negativi per la presenza di anticorpi anti-HIV 1&2, per HbsAg e per anticorpi anti-HCV. Tuttavia nessun test offre la certezza completa dell'assenza di HIV, HBV, HCV o di altri agenti

infettivi. Pertanto, i reagenti devono essere maneggiati come materiali potenzialmente infettivi.

- Alcuni reagenti contengono piccole quantità di Sodio Azide (NaN<sub>3</sub>) o di Proclin 300<sup>R</sup> come conservante. Evitare il contatto con la pelle e le mucose.
- La Sodio Azide può essere tossica se ingerita o assorbita attraverso la cute o gli occhi; inoltre, può reagire con le tubature di piombo o rame formando azidi metalliche potenzialmente esplosive. Se si usa un lavandino per eliminare i reagenti, lasciar scorrere grandi quantità di acqua per prevenire la formazione di azidi.
- Il TMB Substrato contiene un irritante, che può essere dannoso se inalato, ingerito o assorbito attraverso la cute. Per prevenire lesioni, evitare l'inalazione, l'ingestione o il contatto con la cute e con gli occhi.
- La Stop Solution è costituita da una soluzione di acido solforico diluito. L'acido solforico è velenoso e corrosivo e può essere tossico se ingerito. Per prevenire possibili ustioni chimiche, evitare il contatto con la cute e con gli occhi.
- Evitare l'esposizione del reagente TMB/H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> a luce solare diretta, metalli o ossidanti. Non congelare la soluzione.
- Questo metodo consente di determinare concentrazioni di 17OH Progesterone da 0,2 ng/mL a 20 ng/mL.
- La somministrazione di steroidi naturali o sintetici può alterare i livelli ematici di 17OH Progesterone.

#### 5. PRECAUZIONI

- Si prega di attenersi rigorosamente alla sequenza dei passaggi indicata in questo protocollo. I risultati presentati qui sono stati ottenuti usando specifici reagenti elencati in queste Istruzioni per l'Uso.
- Tutti i reattivi devono essere conservati a temperatura controllata di 2-8°C nei loro contenitori originali. Eventuali eccezioni sono chiaramente indicate. I reagenti sono stabili fino alla data di scadenza se conservati e trattati seguendo le istruzioni fornite.
- Prima dell'uso lasciare tutti i componenti dei kit e i campioni a temperatura ambiente (22-28°C) e mescolare accuratamente.
- Non scambiare componenti dei kit di lotti diversi. Devono essere osservate le date di scadenza riportate sulle etichette della scatola e di tutte le fiale. Non utilizzare componenti oltre la data di scadenza.
- Qualora si utilizzi strumentazione automatica, è responsabilità dell'utilizzatore assicurarsi che il kit sia stato opportunamente validato.
- Un lavaggio incompleto o non accurato dei pozzetti può causare una scarsa precisione e/o un'elevato background. Per migliorare le prestazioni del kit su strumentazione automatica, si consiglia di aumentare il numero di lavaggi.
- Per la riproducibilità dei risultati, è importante che il tempo di reazione di ogni pozzetto sia lo stesso. Per evitare il time shifting durante la dispensazione degli reagenti, il tempo di dispensazione dei pozzetti non dovrebbe

estendersi oltre i 10 minuti. Se si protrae oltre, si raccomanda di seguire lo stesso ordine di dispensazione. Se si utilizza più di una piastra, si raccomanda di ripetere la curva di calibrazione in ogni piastra.

- L'aggiunta del TMB Substrato dà inizio ad una reazione cinetica, la quale termina con l'aggiunta della Stop Solution. L'aggiunta del TMB Substrato e della Stop Solution deve avvenire nella stessa sequenza per evitare tempi di reazione differenti.
- Osservare le linee guida per l'esecuzione del controllo di qualità nei laboratori clinici testando controlli e/o pool di sieri.
- Osservare la massima precisione nella ricostituzione e dispensazione dei reagenti.
- Non usare campioni microbiologicamente contaminati, altamente lipemici o emolizzati.
- I lettori di micropiastre leggono l'assorbanza verticalmente. Non toccare il fondo dei pozzetti.

## 6. PROCEDURA

### 6.1. Preparazione dei Calibratori (C<sub>0</sub>...C<sub>5</sub>)

I Calibratori sono pronti all'uso ed hanno le seguenti concentrazioni di 17OH Progesterone:

	C <sub>0</sub>	C <sub>1</sub>	C <sub>2</sub>	C <sub>3</sub>	C <sub>4</sub>	C <sub>5</sub>
ng/mL	0	0,2	0,6	2	6	20

I Calibratori sono stabili fino alla data di scadenza riportata in etichetta. Una volta aperti sono stabili per 6 mesi a 2÷8°C.

### 6.2. Preparazione del Campione

La determinazione del 17OH Progesterone può essere effettuata su plasma o su siero umano.

Se il dosaggio non viene effettuato lo stesso giorno del prelievo conservare il campione a -20°C. Evitare cicli di congelamento e scongelamento del campione. Il Controllo è pronto all'uso.

### 6.3. Preparazione della Wash Solution

Prima dell'uso, diluire il contenuto di ogni fiala di "10X Conc. Wash Solution" con acqua distillata fino al volume di 500 mL. Per preparare volumi minori rispettare il rapporto di diluizione di 1:10. La soluzione di lavaggio diluita è stabile a 2-8°C per almeno 30 giorni.

Nella wash solution concentrata è possibile osservare la presenza di cristalli; in tal caso agitare a temperatura ambiente fino a completa dissoluzione dei cristalli; per una maggiore precisione diluire tutto il flacone della soluzione di lavaggio concentrata a 500 mL, avendo cura di trasferire anche i cristalli, poi agitare fino a completa dissoluzione dei cristalli.

### 6.4. Procedura

- **Portare tutti i reagenti a temperatura ambiente (22-28°C) per almeno 30 minuti.** Al termine del dosaggio riporre immediatamente tutti i reagenti a 2-8°C: evitare lunghi periodi a temperatura ambiente.
- Le strisce di pozzetti non utilizzate devono essere rimesse immediatamente nella busta richiudibile contenente il materiale essiccante e conservate a 2-8°C.

- Per evitare potenziali contaminazioni microbiche e/o chimiche non rimettere i reagenti inutilizzati nei flaconi originali.
- Al fine di aumentare l'accuratezza dei risultati del test è necessario operare in doppio, allestendo due pozzetti per ogni punto della curva di calibrazione (C<sub>0</sub>-C<sub>5</sub>), due per ogni Controllo, due per ogni Campione ed uno per il Bianco.

Reagente	Calibratore	Campione/ Controllo	Bianco
Calibratore C <sub>0</sub> -C <sub>5</sub>	<b>25 µL</b>		
Campione/ Controllo		<b>25 µL</b>	
Conjugate	<b>200 µL</b>	<b>200 µL</b>	
Incubare 1 h a +37°C. Allontanare la miscela di reazione. Lavare i pozzetti 3 volte con 300 µL di wash solution diluita <b>Nota importante:</b> ad ogni step di lavaggio, agitare delicatamente la piastra per 5 secondi e successivamente rimuovere l'eccesso di soluzione di lavaggio sbattendo delicatamente la micropiastra capovolta su fogli di carta assorbente. <b>Lavaggi automatici:</b> se si utilizza strumentazione automatica effettuare 6 lavaggi.			
TMB Substrate	<b>100 µL</b>	<b>100 µL</b>	<b>100 µL</b>
Incubare 15 minuti a temperatura ambiente (22÷28°C), al riparo dalla luce.			
Stop Solution	<b>100 µL</b>	<b>100 µL</b>	<b>100 µL</b>
Agitare delicatamente la micropiastra. Leggere l'assorbanza (E) a 450 nm contro una lunghezza d'onda di riferimento di 620-630 nm oppure contro il Bianco entro 5 minuti.			

## 7. CONTROLLO QUALITA'

Ogni laboratorio dovrebbe analizzare i campioni nella gamma dei livelli elevati, normali e bassi di 17OH Progesterone per il controllo delle prestazioni dell'analisi. Questi campioni dovrebbero essere trattati come ignoti ed i valori determinati in ogni test effettuato. Le tabelle di controllo qualità dovrebbero essere effettuate per seguire le prestazioni dei reagenti forniti. Metodi statistici adeguati dovrebbero essere impiegati per accertare il trend. Il laboratorio dovrebbe fissare i limiti di accettabilità di prestazioni dell'analisi. Altri parametri che dovrebbero essere controllati includono le intercette di 80, 50 e 20% della curva di calibrazione per valutare la riproducibilità. In più, la capacità di assorbimento massima dovrebbe essere costante con l'esperienza precedente. La deviazione significativa dalle prestazioni stabilite può indicare il cambiamento non osservato delle condizioni sperimentali o la degradazione dei reagenti

del kit. In questo caso si consiglia di utilizzare reagenti freschi per determinare il motivo delle variazioni.

## 8. RISULTATI

### 8.1. Estinzione Media

Calcolare l'estinzione media (Em) di ciascun punto della curva di calibrazione (C<sub>0</sub>-C<sub>5</sub>) e di ogni campione.

### 8.2. Curva di calibrazione

Tracciare sul grafico delle assorbanze i valori calcolati delle estinzioni medie (Em) di ciascun calibratore (C<sub>0</sub>-C<sub>5</sub>) in funzione delle concentrazioni. Tracciare la miglior curva passante per i punti di calibrazione (es: Four Parameter Logistic).

### 8.3. Calcolo dei risultati

Interpolare, dal grafico, i valori di assorbanza relativi a ciascun campione e leggerne la corrispondente concentrazione in ng/mL.

## 9. VALORI DI RIFERIMENTO

Le concentrazioni sieriche o plasmatiche di 17OH Progesterone sono comprese nei seguenti intervalli:

		ng/mL
<b>DONNE</b>	fase follicolare	0,2 - 1,3
	fase luteinica	1,0 - 4,5
	menopausa	0,2 - 0,9
<b>UOMINI</b>		0,2 - 2,3
<b>BAMBINI</b>		0,2 - 0,9

È importante tenere presente che la determinazione di un range di valori attesi in un dato metodo per una popolazione "normale" è dipendente da molteplici fattori, quali la specificità e sensibilità del metodo in uso, e la popolazione in esame. Perciò ogni laboratorio dovrebbe considerare i range indicati dal Fabbricante come un'indicazione generale e produrre range di valori attesi propri basati sulla popolazione indigena dove il laboratorio risiede.

## 10. PARAMETRI CARATTERISTICI

### 10.1. Precisione

#### 10.1.1. Intra - Assay

La variabilità all'interno dello stesso kit è stata determinata replicando (20x) la misura di tre differenti sieri. La variabilità intra-assay è ≤ 8,2%.

#### 10.1.2. Inter - Assay

La variabilità tra kit differenti è stata determinata replicando (10x) la misura di tre differenti sieri con kit appartenenti a lotti diversi. La variabilità inter-assay è ≤ 13,8%.

### 10.2. Accuratezza

La prova di recupero condotta su tre differenti campioni arricchiti con 6,6 - 3,3 - 1,65 - 0,83 - 0,41 ng/mL di 17OH Progesterone ha dato un valore medio (±SD) di 98,66% ± 5,99%.

Per la prova di diluizione sono stati diluiti 3 diversi campioni 2, 4 e 8 volte con il Calibratore 0; il valore medio (±SD) ottenuto è 95,31% ± 4,88%.

### 10.3. Sensibilità

La concentrazione minima di 17OH Progesterone misurabile che può essere distinta dal Calibratore 0 è 0,05 ng/mL con un limite di confidenza del 95%.

### 10.4. Specificità

L'anticorpo impiegato presenta le seguenti reazioni crociate, calcolate al 50% secondo Abraham:

17αOH Progesterone	100 %
11-Deossicortisolo	0,846 %
Progesterone	0,590 %
Pregnenolone	0,250 %
Testosterone	0,017 %
17β Estradiolo	< 0,001 %
Aldosterone	< 0,001 %
Estriolo	< 0,001 %
Estrone 3-solfato	< 0,001 %
Spironolactone	< 0,001 %
Androstenedione	< 0,01 %
Androsterone	< 0,01 %
Corticosterone	< 0,01 %
Cortisolo	< 0,01 %
Cortisone	< 0,01 %
DHEA	< 0,01 %
DHEA-S	< 0,01 %
DHT	< 0,01 %
Prednisolone	< 0,01 %
Prednisone	< 0,01 %
Colesterolo	< 0,01 %

### 10.5. Correlazione

Il kit Diametra 17OH Progesterone ELISA è stato comparato con un kit disponibile in commercio. Sono stati testati 65 campioni di siero.

La curva di regressione è:

$$Y = 1,11 \cdot X - 0,04$$

$$R^2 = 0,935$$

Il nuovo kit Diametra 17OH Progesterone ELISA è stato comparato con il precedente kit Diametra 17OH Progesterone ELISA. Sono stati testati 65 campioni di siero.

La curva di regressione è:

$$Y = 1,31 \cdot X - 0,49$$

$$R^2 = 0,90$$

## 11. DISPOSIZIONI PER LO SMALTIMENTO

I reagenti devono essere smaltiti in accordo con le leggi locali.

---

## **BIBLIOGRAFIA**

1. Wisdom, G.B. Clin. Chem. 22/8 1243 - 1255 (1976)
2. De Villa, G.O. et al. J.Clin. Endoc. Metob. 35,458 (1972).
3. Hubl, W., et al Endokrinologie, 1982, 79 (2), 165
4. Arakawa, H., et al Chem. Pharm. Bull. Tokyo 30 (8) 3036 (1982)
5. D. Riad - Fanny, et al Endocr. Reviews, 3 (4) 304-367 (1982)

**Ed. 01/2015**

**DCM004-10**

**DiaMetra S.r.l. Headquater:** Via Calabria 15,  
20090 SEGRATE (MI) Italy  
Tel. +39-02-2139184  
Fax +39-02-2133354

**Manufactory:** Via Pozzuolo 14,  
06038 SPELLO (PG) Italy  
Tel. +39-0742-24851  
Fax +39-0742-316197  
E-mail: [info@diametra.com](mailto:info@diametra.com)



DCM004-10  
Ed. 01/2015

# 17OH PROGESTERONE ELISA

for routine analysis

Direct immunoenzymatic determination of 17OH Progesterone in human serum or plasma.

IVD



LOT

See external label

2°C 8°C



Σ = 96 tests

REF DKO004

## INTENDED USE

Competitive immunoenzymatic colorimetric method for quantitative determination of 17OH Progesterone concentration in human serum or plasma.

17OH Progesterone ELISA kit is intended for laboratory use only.

### 1. CLINICAL SIGNIFICANCE

17-Hydroxyprogesterone (17OH Progesterone or 17 $\alpha$ -OHP or 17-OHP) is a C-21 steroid hormone produced in the adrenal gland and gonads, during the synthesis of glucocorticoids and sex steroids. It is derived from progesterone via 17-hydroxylase, a P450c17 enzyme, or from 17-hydroxypregnenolone via 3 $\beta$ -hydroxysteroid dehydrogenase/ $\Delta^{5-4}$  isomerase. 17OH progesterone is a precursor of cortisol that accumulates in the case of adrenal 21-hydroxylase deficiency and decreased after replacement therapy with cortisol. High values are found in congenital adrenal hyperplasia.

17-OHP has no defined physiologic role except as a precursor molecule.

Serum 17-OHP levels are age-dependent, with peak levels observed during fetal life and the immediate postnatal period. During the first week of life, serum 17-OHP levels fall ~50-fold as compared to cord blood values. A small transient increase occurs in male infants 30-60 days postnatally. Levels for both sexes remain at constant low levels during childhood, and then progressively increase during puberty reaching adult levels of ~100 ng/dL (~3.03 nmol/L). As with cortisol, serum 17-OHP levels normally have an ACTH-dependent diurnal variation, with peak levels in the morning and a nadir at night. In addition, ovarian production of 17-OHP increases during the luteal phase of the menstrual cycle.

17-hydroxyprogesterone is a natural progestin and in pregnancy increases in the third trimester primarily due to fetal adrenal production.

Normal levels are 3-90 ng/dl in children, and in women, 15-70 ng/dl prior to ovulation, and 35-290 ng/dl during the luteal phase.

Measurements of levels of 17-hydroxyprogesterone are useful in the evaluation of patients with suspected congenital adrenal hyperplasia as the typical enzymes that are defective, namely 21-hydroxylase and 11 $\beta$ -hydroxylase, lead to a build-up of 17-OHP. In contrast, the rare patient with 17 $\alpha$ -hydroxylase deficiency will have very low or undetectable levels of 17-OHP.

Elevated serum 17-OHP levels at baseline and/or after ACTH stimulation have also been reported in other forms of adrenal hyperplasia.

### 2. PRINCIPLE

17OH Progesterone (antigen) in the sample competes with the antigenic 17OH Progesterone conjugated with horseradish peroxidase (HRP) for binding to the limited number of antibodies anti 17OH Progesterone coated on the microplate (solid phase).

After incubation, the bound/free separation is performed by a simple solid-phase washing. Then the enzyme HRP in the bound-fraction reacts with the Substrate (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>) and the TMB Substrate and develops a blue color that changes into yellow when the Stop Solution (H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>) is added. The colour intensity is inversely proportional to the 17OH Progesterone concentration in the sample.

17OH Progesterone concentration in the sample is calculated through a calibration curve.

### 3. REAGENTS, MATERIALS AND INSTRUMENTATION

#### 3.1. Reagents and materials supplied in the kit

##### 1. Calibrators (6 vials, 1 mL each)

CAL0	REF DCE002/0406-0
CAL1	REF DCE002/0407-0
CAL2	REF DCE002/0408-0
CAL3	REF DCE002/0409-0
CAL4	REF DCE002/0410-0
CAL5	REF DCE002/0411-0

##### 2. Control (1 vial, 1 mL, ready to use)

Control concentration is stated on the Certificate of Analysis

REF DCE045/0403-0

##### 3. Conjugate (1 vial, 22 mL)

17OH Progesterone conjugated with Horseradish peroxidase (HRP)

REF DCE002/0402-0

##### 4. Coated Microplate (1 breakable microplate)

Microplate coated with anti 17OH Progesterone antibody

REF DCE002/0403-0

##### 5. TMB Substrate (1 vial, 15 mL)

H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>-TMB 0.26 g/L (avoid any skin contact)

REF DCE004-0

6. Stop Solution (1 vial, 15 mL)  
Sulphuric acid 0.15 mol/L (*avoid any skin contact*)  
REF DCE005-0
7. 10X Conc. Wash Solution (1 flacone, 50 mL)  
0.2M phosphate buffer pH 7.4 REF DCE054-0

### 3.2. Reagents necessary not supplied in the kit

Distilled water

### 3.3. Auxiliary materials and instrumentation

Automatic dispenser.

Microplates reader (450 nm, 620-630 nm)

### Notes

*Store all reagents at 2÷8°C in the dark.*

*Open the bag of reagent 4 (Coated Microplate) only when it is at room temperature and close it immediately after use; once opened, it is stable until the expiry date of the kit.*

*Do not remove the adhesive sheet on the unutilised strips.*

### 4. WARNINGS

- This kit is intended for in vitro use by professional persons only. Not for internal or external use in Humans or Animals.
- Use appropriate personal protective equipment while working with the reagents provided.
- Follow Good Laboratory Practice (GLP) for handling blood products.
- All human source material used in the preparation of the reagents has been tested and found negative for antibody to HIV 1&2, HbsAg, and HCV. No test method however can offer complete assurance that HIV, HBV, HCV or other infectious agents are absent. Therefore, the reagents should be handled in the same manner as potentially infectious material.
- Some reagents contain small amounts of Sodium Azide or Proclin 300<sup>R</sup> as preservative. Avoid the contact with skin or mucosa.
- Sodium Azide may be toxic if ingested or absorbed through the skin or eyes; moreover it may react with lead or copper plumbing to form potentially explosive metal azides. If you use a sink to remove the reagents, allow scroll through large amounts of water to prevent azide build-up.
- The TMB Substrate contains an irritant, which may be harmful if inhaled, ingested or absorbed through the skin. To prevent injury, avoid inhalation, ingestion or contact with skin and eyes.
- The Stop Solution consists of a diluted sulphuric acid solution. Sulphuric acid is poisonous and corrosive and can be toxic if ingested. To prevent chemical burns, avoid contact with skin and eyes.
- Avoid the exposure of reagent TMB/H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> to directed sunlight, metals or oxidants. Do not freeze the solution.
- This method allows the determination of 17OH Progesterone from 0.2 ng/mL to 20 ng/mL.
- The clinical significance of the determination of 17OH Progesterone can be invalidated if the patient was treated with cortisone or natural or syntetic steroids.

### 5. PRECAUTIONS

- Please adhere strictly to the sequence of pipetting steps provided in this protocol. The performance data represented here were obtained using specific reagents listed in this Instruction For Use.
- All reagents should be stored refrigerated at 2-8°C in their original container. Any exceptions are clearly indicated. The reagents are stable until the expiry date when stored and handled as indicated.
- Allow all kit components and specimens to reach room temperature (22-28°C) and mix well prior to use.
- Do not interchange kit components from different lots. The expiry date printed on box and vials labels must be observed. Do not use any kit component beyond their expiry date.
- If you use automated equipment, the user has the responsibility to make sure that the kit has been appropriately tested.
- The incomplete or inaccurate liquid removal from the wells could influence the assay precision and/or increase the background. To improve the performance of the kit on automatic systems, it is recommended to increase the number of washes.
- It is important that the time of reaction in each well is held constant for reproducible results. Pipetting of samples should not extend beyond ten minutes to avoid assay drift. If more than 10 minutes are needed, follow the same order of dispensation. If more than one plate is used, it is recommended to repeat the dose response curve in each plate
- Addition of the TMB Substrate solution initiates a kinetic reaction, which is terminated by the addition of the Stop Solution. Therefore, the TMB Substrate and the Stop Solution should be added in the same sequence to eliminate any time deviation during the reaction.
- Observe the guidelines for performing quality control in medical laboratories by assaying controls and/or pooled sera.
- Maximum precision is required for reconstitution and dispensation of reagents.
- Samples microbiologically contaminated, highly lipemeic or haemolysed should not be used in the assay.
- Plate readers measure vertically. Do not touch the bottom of the wells.

### 6. PROCEDURE

#### 6.1. Preparation of the Calibrators (C<sub>0</sub>...C<sub>5</sub>)

The Calibrators are ready to use and have the following concentration of 17OH Progesterone:

	C <sub>0</sub>	C <sub>1</sub>	C <sub>2</sub>	C <sub>3</sub>	C <sub>4</sub>	C <sub>5</sub>
ng/mL	0	0,2	0,6	2	6	20

The Calibrators are stable until the expiry date printed on the label. Once opened, the Calibrators are stable six months at 2÷8°C.

#### 6.2. Preparation of the Sample

The determination of 17OH Progesterone can be performed in human plasma as well as in serum.

Store the sample at -20°C if the determination is not performed on the same day of the sample connection. Avoid repetitive freezing and thawing of samples. The Control is ready to use.

### 6.3. Preparation of Wash Solution

Dilute the content of each vial of the "10X Conc. Wash Solution" with distilled water to a final volume of 500 mL prior to use. For smaller volumes respect the 1:10 dilution ratio. The diluted wash solution is stable for 30 days at 2-8°C.

In concentrated wash solution is possible to observe the presence of crystals; in this case mix at room temperature until the complete dissolution of crystals; for greater accuracy, dilute the whole bottle of concentrated wash solution to 500 mL, taking care to transfer completely the crystals, then mix until crystals are completely dissolved.

### 6.4. Procedure

- **Allow all reagents to reach room temperature (22-28°C) for at least 30 minutes.** At the end of the assay, store immediately the reagents at 2-8°C: avoid long exposure to room temperature.
- Unused coated microwell strips should be released securely in the foil pouch containing desiccant and stored at 2-8°C.
- To avoid potential microbial and/or chemical contamination, unused reagents should never be transferred into the original vials.
- As it is necessary to perform the determination in duplicate in order to improve accuracy of the test results, prepare two wells for each point of the calibration curve (C<sub>0</sub>-C<sub>5</sub>), two for each Control, two for each sample, one for Blank.

Reagent	Calibrator	Sample/ Control	Blank
Calibrator C <sub>0</sub> -C <sub>5</sub>	25 µL		
Sample/ Control		25 µL	
Conjugate	200 µL	200 µL	
Incubate at 37°C for 1 hour. Remove the contents from each well; wash the wells 3 times with 300 µL of diluted Wash Solution. <b>Important note:</b> during each washing step, gently shake the plate for 5 seconds and remove excess solution by tapping the inverted plate on an absorbent paper towel. <b>Automatic washer:</b> if you use automated equipment, wash the wells at least 5 times.			
TMB Substrate	100 µL	100 µL	100 µL
Incubate at room temperature (22÷28°C) for 15 minutes in the dark.			

Stop Solution	100 µL	100 µL	100 µL
Shake the microplate gently. Read the absorbance (E) at 450 nm against a reference wavelength of 620-630 nm or against Blank within 5 minutes.			

## 7. QUALITY CONTROL

Each laboratory should assay controls at normal, high and low levels range of 17OH Progesterone for monitoring assay performance. These controls should be treated as unknowns and values determined in every test procedure performed. Quality control charts should be maintained to follow the performance of the supplied reagents. Pertinent statistical methods should be employed to ascertain trends. The individual laboratory should set acceptable assay performance limits. Other parameters that should be monitored include the 80, 50 and 20% intercepts of the calibration curve for run-to-run reproducibility. In addition, maximum absorbance should be consistent with past experience. Significant deviation from established performance can indicate unnoticed change in experimental conditions or degradation of kit reagents. Fresh reagents should be used to determine the reason for the variations.

## 8. RESULTS

### 8.1. Mean Absorbance

Calculate the mean of the absorbance (Em) for each point of the calibration curve (C<sub>0</sub>-C<sub>5</sub>) and of each sample.

### 8.2. Calibration Curve

Plot the mean value of absorbance (Em) of the calibrators (C<sub>0</sub>-C<sub>5</sub>) against concentration. Draw the best-fit curve through the plotted points. (es: Four Parameter Logistic).

### 8.3. Calculation of Results

Interpolate the values of the samples on the calibration curve to obtain the corresponding values of the concentrations expressed in ng/mL.

## 9. REFERENCE VALUES

The serum or plasma 17OH Progesterone reference values are:

		ng/mL
<b>WOMEN</b>	follicular phase	0,2 - 1,3
	luteinic phase	1,0 - 4,5
	menopause	0,2 - 0,9
<b>MEN</b>		0,2 - 2,3
<b>CHILDREN</b>		0,2 - 0,9

Please pay attention to the fact that the determination of a range of expected values for a "normal" population in a given method is dependent on many factors, such as specificity and sensitivity of the method used and type of population under investigation. Therefore each laboratory should consider the range given by the Manufacturer as a



general indication and produce their own range of expected values based on the indigenous population where the laboratory works.

## 10. PERFORMANCE AND CHARACTERISTICS

### 10.1. Precision

#### 10.1.1. Intra Assay Variation

Within run variation was determined by replicate (20x) the measurement of three different sera in one assay. The within assay variability is  $\leq 8.2\%$ .

#### 10.1.2. Inter Assay Variation

Between run variation was determined by replicate (10x) the measurement of three different sera in different lots. The between assay variability is  $\leq 13.8\%$ .

### 10.2. Accuracy

The recovery test performed on three different samples, enriched with 6.6 - 3.3 - 1.65 - 0.83 - 0.41 ng/mL of 17OH Progesterone gave a average value ( $\pm$ SD) of  $98.66\% \pm 5.99\%$ .

In the dilution test three different samples were diluted 2, 4 and 8 times with Calibrator 0; the average value ( $\pm$ SD) obtained is  $95.31\% \pm 4.88\%$ .

### 10.3. Sensitivity

The lowest detectable concentration of 17OH Progesterone that can be distinguished from the Calibrator zero is 0.05 ng/mL at the 95% confidence limit.

### 10.4. Specificity

The cross reaction of the antibody calculated at 50% according to Abraham are shown in the table:

17 $\alpha$ OH Progesterone	100 %
11-Deoxycortisol	0,846 %
Progesterone	0,590 %
Pregnenolone	0,250 %
Testosterone	0,017 %
17 $\beta$ Estradiol	< 0,001 %
Aldosterone	< 0,001 %
Estriol	< 0,001 %
Estrone 3-sulfate	< 0,001 %
Spironolactone	< 0,001 %
Androstenedione	< 0,01 %
Androsterone	< 0,01 %
Corticosterone	< 0,01 %
Cortisol	< 0,01 %
Cortisone	< 0,01 %
DHEA	< 0,01 %
DHEA-S	< 0,01 %
DHT	< 0,01 %
Prednisolone	< 0,01 %
Prednisone	< 0,01 %
Cholesterol	< 0,01 %

### 10.5. Correlation

Diametra 17OH Progesterone ELISA kit was compared to a commercially available 17OH Progesterone ELISA kit. 65 serum samples were tested.

The regression curve is:

$$Y = 1,11 * X - 0,04$$

$$R^2 = 0,935$$

The new Diametra 17OH Progesterone ELISA kit was compared to the previous Diametra 17OH Progesterone ELISA kit. 65 serum samples were tested.

The regression curve is:

$$Y = 1,31 * X - 0,49$$

$$R^2 = 0,90$$

## 11. WASTE MANAGEMENT

Reagents must be disposed off in accordance with local regulations.

## BIBLIOGRAPHY

1. Wisdom, G.B. Clin. Chem. 22/8 1243 - 1255 (1976)
2. De Villa, G.O. et al. J.Clin. Endoc. Metob. 35,458 (1972).
3. Hubl, W., et al Endokrinologie, 1982, 79 (2), 165
4. Arakawa, H., et al Chem. Pharm. Bull. Tokyo 30 (8) 3036 (1982)
5. D. Riad - Fanny, et al Endocr. Reviews, 3 (4) 304-367 (1982)

Ed. 01/2015

DCM004-10

**DiaMetra S.r.l. Headquarter:** Via Calabria 15,

20090 SEGRATE (MI) Italy

Tel. +39-02-2139184

Fax +39-02-2133354

**Manufactory:** Via Pozzuolo 14,

06038 SPELLO (PG) Italy

Tel. +39-0742-24851

Fax +39-0742-316197

E-mail: [info@diametra.com](mailto:info@diametra.com)



DCM004-10  
Ed. 01/2015

# 17OH PROGESTERONE ELISA

para análisis de rutina

Determinación inmunoenzimática directa de la 17OH Progesterona en suero o plasma humanos.

IVD



LOT

Ver etiqueta externa



$\Sigma = 96$  ensayos

REF DKO004

## USO PREVISTO

Método competitivo inmunoenzimático colorimétrico para la determinación cuantitativa de la concentración de 17OH Progesterona en suero o plasma humanos. El kit 17OH Progesterone ELISA está destinado al uso en laboratorio exclusivamente.

## 1. SIGNIFICADO CLÍNICO

La 17-hidroxiprogesterona (17OH Progesterona o 17-OHP o 17OHP) es una hormona esteroidea C-21, producida en la glándula suprarrenal y en las gónadas durante la síntesis de glucocorticoides y hormonas esteroideas. Se deriva de la progesterona a través de la 17-hidroxilasa, una enzima P450c17, o de la 17-hidroxipregnenolona a través de la 3-hidroxiesteroide dehidrogenasa/ 5-4 isomerasa. El 17OH Progesterona es un precursor de cortisol que se acumula en caso de deficiencia de 21-hidroxilasa suprarrenal y disminuye después de la terapia de reemplazo con el cortisol. Los valores altos se encuentran en la hiperplasia suprarrenal congénita. La 17OHP no tiene ninguna función fisiológica definida, excepto como molécula precursora.

Los niveles de 17OHP en suero dependen de la edad, con picos observados durante la vida fetal y el período postnatal. Durante la primera semana de vida, los niveles séricos de 17OHP disminuyen ~50 veces con respecto a los valores sanguíneos del cordón. Se manifiesta un pequeño aumento transitorio tras el nacimiento en los varones de 30-60 días. Los niveles para ambos sexos permanecen bajos y constantes durante la infancia y aumentan progresivamente durante la pubertad, donde se alcanzan los niveles de adulto de ~100 ng/dl (~3,03 nmol/l). Los niveles de 17OHP tienen normalmente una variación diaria que depende de la ACTH. Se observan picos matutinos y caídas nocturnas. Además, la producción ovárica de 17OHP aumenta durante la fase lútea del ciclo menstrual.

La 17OHP es un progestínico natural y durante el tercer mes de embarazo hay un aumento de esta debido a la producción suprarrenal fetal.

Los niveles normales son 3-90 ng/dl en niños, 15-70 ng/dl en mujeres antes de la ovulación y 35-290 ng/dl durante la fase lútea.

Las mediciones de los niveles de 17OHP resultan útiles en la evaluación de la hiperplasia suprarrenal congénita debida a la carencia de enzimas típicas,

como la 21-hidroxilasa y 11 $\beta$ -hidroxilasa, que llevan a la acumulación de 17OHP.

Por el contrario, raramente, el paciente con falta de 17-hidroxilasa presenta niveles muy bajos o inobservables de 17OHP.

En caso de hiperplasia suprarrenal, se observan elevados niveles séricos basales de 17OHP y/o tras el estímulo de la ACTH.

## 2. PRINCIPIO DEL MÉTODO

La 17OH Progesterona (antígeno) presente en la muestra compete con la 17OH Progesterona antigénica marcada con peroxidasa de rabano (HRP, Conjugado) por la unión al anticuerpo anti 17OH Progesterona absorbido en la microplaca (fase sólida).

Después de la incubación, la separación de las fracciones libre y unida se obtiene mediante un simple lavado de la fase sólida.

Por último, al reaccionar con el sustrato (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>) y el sustrato TMB (TMB), la enzima HRP presente en la fracción unida desarrolla una coloración azul que se torna amarilla tras añadir la solución de interrupción (H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>).

La intensidad del color desarrollado es proporcional a la concentración de antígeno marcado y, por lo tanto, inversamente proporcional a la concentración de 17OH Progesterona presente en la muestra.

La concentración de 17OH Progesterona en la muestra se calcula tomando como base una curva estándar.

### 3. REACTIVOS, MATERIALES E INSTRUMENTACIÓN

#### 3.1. Reactivos y materiales suministrados en el kit

##### 1. Calibradores (6 frascos, 1 mL cada uno)

CAL0	REF	DCE002/0406-0
CAL1	REF	DCE002/0407-0
CAL2	REF	DCE002/0408-0
CAL3	REF	DCE002/0409-0
CAL4	REF	DCE002/0410-0
CAL5	REF	DCE002/0411-0

##### 2. Control (1 frasco, 1 mL, listo para usar)

La concentración del Control se indica en el certificado de calidad (Certificate of Analysis)

REF DCE045/0403-0

##### 3. Conjugado (1 frasco, 22 mL)

17OH Progesterona conjugado con peroxidasa de rabano (HRP)

REF DCE002/0402-0

##### 4. Microplaca recubierta (1 microplaca rompible)

Anticuerpo anti 17OH Progesterona absorbido en la microplaca

REF DCE002/0403-0

##### 5. Substrato TMB (1 frasco, 15 mL)

H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>-TMB (0,26 g/L) (evitar el contacto con la piel)

REF DCE004-0

##### 6. Solución de parada (1 frasco, 15 mL)

Ácido sulfúrico 0,15 mol/L (evitar el contacto con la piel)

REF DCE005-0

##### 7. Solución de lavado conc.10X (1 frasco, 50 mL)

Tampón fosfato 0,2M pH 7.4

REF DCE054-0

#### 3.2. Reactivos necesarios no suministrados en el kit

Agua destilada

#### 3.3. Material e instrumentación auxiliares

Dispensadores automáticos.

Lector de microplacas (450 nm, 620-630 nm).

#### Nota

Conservar todos los reactivos a 2±8 °C, protegidos de la luz.

Abrir la bolsa del reactivo 4 (microplaca recubierta) solo cuando se encuentre a temperatura ambiente y cerrarla inmediatamente después de extraer las tiras que se vayan a utilizar; una vez abierta, permanece estable hasta la fecha de caducidad del kit.

No retirar las hojas adhesivas de las tiras que no se vayan a usar en la sesión de análisis.

#### 4. ADVERTENCIAS

- Este kit de ensayo está previsto para usarse in vitro y por personal experto. No es para uso interno o externo en humanos o animales.
- Usar los equipos de protección individual previstos al trabajar con los reactivos suministrados.
- Siga las Buenas Prácticas de Laboratorio (GLP) en el manejo de las muestras sanguíneas y sus derivados.
- Todos los reactivos de origen humano usados en la preparación de los Calibradores y de los controles se han comprobado y han resultado negativos para la presencia de anticuerpos anti-

VIH, para HbsAg y para anticuerpos anti-VHC. Sin embargo, ningún ensayo ofrece seguridad absoluta de la ausencia de VIH, VHB, VHC o de otros agentes infecciosos. Por lo tanto, los Calibradores y los controles positivo y negativo deben manipularse como material potencialmente infeccioso.

- Algunos reactivos contienen pequeñas cantidades de Azida de Sodio (NaN<sub>3</sub>) o Proclin 300<sup>R</sup> como conservante. Evite el contacto con la piel y las mucosas.
- La Azida de Sodio, usada como conservante, puede ser tóxica si se ingiere o se absorbe a través de la piel o de los ojos; además, puede reaccionar con las tuberías de plomo o cobre formando azidas metálicas potencialmente explosivas. Dejar que corra gran cantidad de agua, si se usa un lavabo para eliminar los reactivos, para prevenir la formación de azidas.
- El cromógeno TMB contiene un irritante que puede ser dañino si se inhala, se ingiere o se absorbe a través de la piel. Para prevenir lesiones, evitar la inhalación, la ingestión o el contacto con la piel y con los ojos.
- La Solución de Parada está formada por una solución de ácido sulfúrico diluido. El ácido sulfúrico es venenoso y corrosivo, y puede ser tóxico si se ingiere. Para prevenir posibles quemaduras químicas, evitar el contacto con la piel y con los ojos.
- Evite la exposición de los reactivos TMB/H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> a la luz solar directa, metales u oxidantes. No congelar la solución.
- Este método permite determinar concentraciones de 17OH Progesterona de 0,2 ng/mL a 20 ng/mL.
- El suministro de esteroides naturales o sintéticos puede alterar los niveles hemáticos de 17OH Progesterona.

#### 5. PRECAUCIONES

- Respetar rigurosamente la secuencia de los pasos indicados en este protocolo. Los resultados aquí presentados se han obtenido utilizando los reactivos específicos que figuran en estas instrucciones de uso.
- Todos los reactivos deben conservarse a una temperatura controlada de 2-8°C en sus recipientes originales. Todas las excepciones están claramente marcadas. Los reactivos son estables hasta la fecha de caducidad cuando se almacenan y manipulan de acuerdo con las instrucciones proporcionadas.
- Antes del uso, esperar hasta que todos los componentes del kit y las muestras se encuentren a temperatura ambiente (22-28°C) y mezclar cuidadosamente.
- No mezclar componentes de kits de lotes distintos. Se debe observar la fecha de caducidad indicada en la etiqueta de la caja y de todas las ampollas. No usar componentes después de la fecha de caducidad.
- Si utiliza un equipo automático, es responsabilidad del usuario asegurar que la metodología aplicada haya sido debidamente validada.

- Un lavado incompleto o impreciso y la aspiración insuficiente del líquido de los micropozos ELISA pueden causar una precisión pobre y/o un elevado fondo. Para mejorar el rendimiento del kit en los sistemas automatizados, se recomienda aumentar el número de lavados.
- Para la reproducibilidad de los resultados, es importante que el tiempo de reacción sea igual para cada pocillo. El tiempo de dispensación de los pocillos no debe superar los 10 minutos; si se prolongara más allá de los 10 minutos, respétese el orden de dispensación. Si utiliza más de una placa, se recomienda repetir la curva de calibración en cada placa.
- Al añadir el Sustrato TMB se inicia una reacción cinética que termina al agregar la Solución de Parada. Tanto el Sustrato TMB como la Solución de Parada deben agregarse en la misma secuencia para evitar diferentes tiempos de reacción.
- Observar las directrices para la ejecución del control de calidad en los laboratorios clínicos al comprobar controles y/o pool de sueros.
- Observar la máxima precisión en la reconstitución y dispensación de los reactivos.
- No use muestras con contaminación microbiana, altamente lipémicas o hemolizadas.
- Los lectores de microplacas leen las DO verticalmente, por tanto no debe tocarse el fondo de los pocillos.

## 6. PROCEDIMIENTO

### 6.1. Preparación de los Calibradores (C<sub>0</sub>...C<sub>5</sub>)

Los Calibradores son listo para usar y tienen las siguientes concentraciones de 17OH Progesterona:

	C <sub>0</sub>	C <sub>1</sub>	C <sub>2</sub>	C <sub>3</sub>	C <sub>4</sub>	C <sub>5</sub>
ng/mL	0	0,2	0,6	2	6	20

Los Calibradores son estables hasta la fecha de caducidad impresa en la etiqueta. Una vez abiertos se mantienen estables durante 6 meses a 2-8°C.

### 6.2. Preparación de la muestra

La determinación de la 17OH Progesterona puede realizarse en plasma o suero humano.

Si la dosificación no se realiza el mismo día de la extracción, conservar la muestra a -20°C. Se recomienda no congelar y descongelar repetidamente las muestras.

El control está listo para usar.

### 6.3. Preparación de la solución de lavado

Antes del uso, diluir el contenido del frasco de la solución de lavado conc. 10X con agua destilada hasta un volumen de 500 mL. Para preparar volúmenes menores, respetar la relación de dilución de 1:10. La solución de lavado diluida se mantiene estable a 2-8°C durante al menos 30 días.

En la solución de lavado concentrada es posible observar la presencia de cristales. En ese caso, agitar a temperatura ambiente hasta que los cristales se disuelvan por completo. Para una mayor precisión, diluir todo el frasco de la solución de lavado

concentrada en 500 mL teniendo cuidado para transferir también los cristales con el lavado del frasco y, a continuación, agitar hasta que se disuelvan por completo.

### 6.4. Procedimiento

- **Esperar hasta que todos los reactivos se encuentren a temperatura ambiente (22-28°C) durante al menos 30 minutos.** Al final del ensayo inmediatamente poner todos los reactivos a 2-8°C para evitar largos periodos a temperatura ambiente.
- Las tiras de pocillos no utilizados se deben guardar de inmediato en la bolsa desechable que contiene desecantes y almacenarse a 2-8°C.
- Para evitar la contaminación microbiana y/o química no regrese porciones de reactivos no usados en los viales originales.
- Para aumentar la precisión de los resultados de la prueba es necesario trabajar en duplicado: preparar dos pocillos para cada punto de la curva de calibración (C<sub>0</sub>-C<sub>5</sub>), dos para cada control, dos para cada muestra, uno para el blanco.

Reactivo	Calibrador	Muestra/ Control	Blanco
Calibradores C <sub>0</sub> -C <sub>5</sub>	25 µL		
Muestra/ Control		25 µL	
Conjugado	200 µL	200 µL	
Incubar 1 h a +37°C. Retirar el contenido de cada pocillo y lavar los pocillos 3 veces con 300 µL de solución de lavado diluida.			
<b>Nota importante:</b> agite suavemente la placa durante 5 segundos en cada paso del lavado. Después del último lavado asegúrese haber eliminado completamente la solución de lavado de los pozos, invierta la placa y golpéela repetidas veces contra una servilleta de papel absorbente.			
<b>Lavados automático:</b> si está utilizando una lavadora automática, lavar los pocillos 6 veces.			
Substrato TMB	100 µL	100 µL	100 µL
Incubar 15 minutos a temperatura ambiente 22÷28 °C, protegida de la luz.			
Solución de parada	100 µL	100 µL	100 µL
Agitar la microplaca con cuidado. Leer la absorbancia (E) a 450 nm frente una segunda lectura de referencia a 620-630 nm o frente al blanco entre 5 minutos.			

## 7. CONTROL DE CALIDAD

Cada laboratorio debe analizar sueros control para los rangos bajo, medio y alto de 17OH Progesterona para supervisar el rendimiento del análisis. Estas muestras deben tratarse como desconocidas y los valores deben determinarse en cada ensayo realizado. Se deben mantener los gráficos de control de calidad para seguir el rendimiento de los reactivos suministrados. Se deben emplear métodos estadísticos adecuados para determinar las tendencias. El laboratorio debe establecer los límites de aceptabilidad del rendimiento del análisis. Entre otros parámetros que se deben controlar, se incluyen las intersecciones de 80, 50 y 20% de la curva de calibración para evaluar la reproducibilidad. Además, la capacidad de absorción máxima debe ser constante con la experiencia anterior. Una desviación significativa del rendimiento establecido puede indicar un cambio inadvertido en las condiciones experimentales o la degradación de los reactivos del kit. En este caso, se recomienda usar reactivos frescos para determinar la causa de las variaciones.

## 8. RESULTADOS

### 8.1. Absorbancia media

Calcular la absorbancia media ( $E_m$ ) de cada punto de la curva de calibración ( $C_0$ - $C_5$ ) y de cada muestra.

### 8.2. Curva de calibración

Trazar en el gráfico de las absorbancias los valores calculados de las absorbancias medias ( $E_m$ ) de cada calibrador ( $C_0$ - $C_5$ ) en función de las concentraciones. Trazar la curva de ajuste óptimo para los calibradores (p. ej.: Logística de cuatro parámetros).

### 8.3. Cálculo de los resultados

Interpolar del gráfico los valores de absorbancia relativos a cada muestra y leer la concentración correspondiente en ng/mL.

## 9. VALORES DE REFERENCIA

Las concentraciones séricas o plasmáticas de 17OH Progesterona se incluyen en los siguientes intervalos:

		ng/mL
<b>MUJERES</b>	fase folicular	0,2 - 1,3
	fase lútea	1,0 - 4,5
	menopausia	0,2 - 0,9
<b>HOMBRES</b>		0,2 - 2,3
<b>NIÑOS</b>		0,2 - 0,9

Es importante señalar que la determinación de un rango de valores esperados en un método dado para una población "normal" depende de muchos factores, tales como la especificidad y sensibilidad del método en uso, y la población en estudio. Por lo tanto, cada laboratorio debe considerar el intervalo especificado por el fabricante como una guía general y producir su propio rango de valores calculados en base al estadístico obtenido por el laboratorio, donde reside la población local.

## 10. PARÁMETROS CARACTERÍSTICOS

### 10.1. Precisión

#### 10.1.1. Intraensayo

La variabilidad dentro del mismo kit se ha determinado replicando (20x) la medición de tres sueros distintos. La variabilidad intraensayo es 8,2%.

#### 10.1.2. Interensayo

La variabilidad entre distintos kits se ha determinado replicando (10x) la medición de tres sueros distintos con kits pertenecientes a lotes distintos. La variabilidad interensayo es 13,8%.

### 10.2. Exactitud

La prueba de recuperación realizada en una muestra enriquecida con 6,6 - 3,3 - 1,65 - 0,83 - 0,41 ng/mL de 17OH Progesterona ha dado un valor medio ( $\pm$ SD) de 98,66%  $\pm$  5,99%.

Para la dilución de ensayo se diluyeron 3 muestras diferentes 2, 4 y 8 veces con calibrador 0; el valor medio ( $\pm$  SD) obtenido es 95,31%  $\pm$  4,88%.

### 10.3. Sensibilidad

La concentración mínima de 17OH Progesterona que puede distinguirse del Calibrador 0 es de 0,05 ng/mL con un límite de confianza del 95%.

### 10.4. Especificidad

El anticuerpo empleado presenta las siguientes reacciones cruzadas, calculadas al 50% según Abraham:

17 OH Progesterona	100 %
11-Deossicortisol	0,846 %
Progesterona	0,590 %
Pregnenolona	0,250 %
Testosterona	0,017 %
17b Estradiolo	< 0,001 %
Aldosterona	< 0,001 %
Estriolo	< 0,001 %
Estrone 3-sulfato	< 0,001 %
Spironolactona	< 0,001 %
Androstenediona	< 0,01 %
Androsterona	< 0,01 %
Corticosterona	< 0,01 %
Cortisol	< 0,01 %
Cortisona	< 0,01 %
DHEA	< 0,01 %
DHEA-S	< 0,01 %
DHT	< 0,01 %
Prednisolona	< 0,01 %
Prednisona	< 0,01 %
Colesterolo	< 0,01 %

### 10.5. Correlación con la dosis RIA

El kit Diametra 17OH Progesterona ELISA se ha comparado con un kit disponible en el mercado. Se han comprobado 65 muestras de suero.

La curva de regresión es:

$$Y = 1,11 * X - 0,04$$

$$r^2 = 0,935$$

El kit Diametra 17OH Progesterona ELISA se ha comparado con el kit 17OH Progesterona ELISA del método anterior. Se probaron 65 muestras de suero.

La curva de regresión es la siguiente:

$$Y = 1,31 * X - 0,49$$

$$r^2 = 0,90$$

### 11. DISPOSICIONES PARA LA ELIMINACIÓN

Los reactivos deben eliminarse de acuerdo con las leyes locales.

---

### BIBLIOGRAFÍA

1. Wisdom, G.B. Clin. Chem. 22/8 1243 - 1255 (1976)
2. De Villa, G.O. et al. J.Clin. Endoc. Metob. 35,458 (1972).
3. Hubl, W., et al Endokrinologie, 1982, 79 (2), 165
4. Arakawa, H., et al Chem. Pharm. Bull. Tokyo 30 (8) 3036 (1982)
5. D. Riad - Fanny, et al Endocr. Reviews, 3 (4) 304-367 (1982)

Ed. 01/2015

DCM004-10

**DiaMetra S.r.l. Headquater:** Via Calabria 15,  
20090 SEGRATE (MI) Italy  
Tel. +39-02-2139184  
Fax +39-02-2133354

**Manufactory:** Via Pozzuolo 14,  
06038 SPELLO (PG) Italy  
Tel. +39-0742-24851  
Fax +39-0742-316197  
E-mail: [info@diametra.com](mailto:info@diametra.com)

	DE ES FR GB IT PT	In vitro Diagnostikum Producto sanitario para diagnóstico In vitro Dispositif medical de diagnostic in vitro In vitro Diagnostic Medical Device Dispositivo medico-diagnostico in vitro Dispositivos medicos de diagnostico in vitro		DE ES FR GB IT PT	Hergestellt von Elaborado por Fabriqué par Manufacturer Produttore Produzido por
	DE ES FR GB IT PT	Achtung, Begleitdokumente Precaución, consulte los documentos adjuntos Attention, veuillez consulter les documents d'accompagnement Caution, consult accompanying documents Attenzione, consultare la documentazione allegata Atenção, consultar os documentos de acompanhamento	 yyyy-mm	DE ES FR GB IT PT	Herstellungs datum Fecha de fabricacion Date de fabrication Date of manufacture Data di produzione Data de produção
 yyyy-mm-dd	DE ES FR GB IT PT	Verwendbar bis Establa hasta (usar antes de último día del mes) Utiliser avant (dernier jour du mois indiqué) Use by (last day of the month) Utilizzare prima del (ultimo giorno del mese) Utilizar (antes ultimo dia do mês)		DE ES FR GB IT PT	Biogefährdung Riesco biológico Risque biologique Biological risk Rischio biologico Risco biológico
	DE ES FR GB IT PT	Gebrauchsanweisung beachten Consultar las instrucciones Consulter le mode d'emploi Consult instructions for use Consultare le istruzioni per l'uso Consultar instruções para uso	<b>LOT</b>	DE ES FR GB IT PT	Chargenbezeichnung Codigo de lote Numero de lot Batch code Codice del lotto Codigo do lote
 $\Sigma = xx$	DE ES FR GB IT PT	Ausreichend für "n" Tests Contenido suficiente para "n" tests Contenu suffisant pour "n" tests Contains sufficient for "n" tests Contenuto sufficiente per "n" saggi Contém o suficiente para "n" testes	<b>CONT</b>	DE ES FR GB IT PT	Inhalt Contenido del estuche Contenu du coffret Contents of kit Contenuto del kit Conteúdo do kit
 Max Min	DE ES FR GB IT PT	Temperaturbereich Límitación de temperatura Limites de température de conservation Temperature limitation Limiti di temperatura Temperaturas limites de conservação	<b>REF</b>	DE ES FR GB IT PT	Bestellnummer Número de catálogo Références du catalogue Catalogue number Numero di Catalogo Número do catálogo
	DE ES FR GB IT PT	Vor direkter Sonneneinstrahlung schützen Mantener alejado de la luz solar Tenir à l'écart de la lumière du soleil Keep away from sunlight Tenere lontano dalla luce solare Mantenha longe da luz solar			

**SUGGERIMENTI PER LA RISOLUZIONE DEI PROBLEMI/TROUBLESHOOTING****ERRORE CAUSE POSSIBILI/ SUGGERIMENTI****Nessuna reazione colorimetrica del saggio**

- mancata dispensazione del coniugato
- contaminazione del coniugato e/o del Substrato
- errori nell'esecuzione del saggio (es. Dispensazione accidentale dei reagenti in sequenza errata o provenienti da flaconi sbagliati, etc.)

**Reazione troppo blanda (OD troppo basse)**

- coniugato non idoneo (es. non proveniente dal kit originale)
- tempo di incubazione troppo breve, temperatura di incubazione troppa bassa

**Reazione troppo intensa (OD troppo alte)**

- coniugato non idoneo (es. non proveniente dal kit originale)
- tempo di incubazione troppo lungo, temperatura di incubazione troppa alta
- qualità scadente dell'acqua usata per la soluzione di lavaggio (basso grado di deionizzazione,)
- lavaggi insufficienti (coniugato non completamente rimosso)

**Valori inspiegabilmente fuori scala**

- contaminazione di pipette, puntali o contenitori- lavaggi insufficienti (coniugato non completamente rimosso)

**CV% intrasaggio elevato**

- reagenti e/o strip non portate a temperatura ambiente prima dell'uso
- il lavatore per micropiastre non lava correttamente (suggerimento: pulire la testa del lavatore)

**CV% intersaggio elevato**

- condizioni di incubazione non costanti (tempo o temperatura)
- controlli e campioni non dispensati allo stesso tempo (con gli stessi intervalli) (controllare la sequenza di dispensazione)
- variabilità intrinseca degli operatori

**ERROR POSSIBLE CAUSES / SUGGESTIONS****No colorimetric reaction**

- no conjugate pipetted reaction after addition
- contamination of conjugates and/or of substrate
- errors in performing the assay procedure (e.g. accidental pipetting of reagents in a wrong sequence or from the wrong vial, etc.)

**Too low reaction (too low ODs)**

- incorrect conjugate (e.g. not from original kit)
- incubation time too short, incubation temperature too low

**Too high reaction (too high ODs)**

- incorrect conjugate (e.g. not from original kit)
- incubation time too long, incubation temperature too high
- water quality for wash buffer insufficient (low grade of deionization)
- insufficient washing (conjugates not properly removed)

**Unexplainable outliers**

- contamination of pipettes, tips or containers
- insufficient washing (conjugates not properly removed) too high within-run
- reagents and/or strips not pre-warmed to CV% Room Temperature prior to use
- plate washer is not washing correctly (suggestion: clean washer head)
- too high between-run - incubation conditions not constant (time, CV % temperature)
- controls and samples not dispensed at the same time (with the same intervals) (check pipetting order)
- person-related variation



**ERROR / POSIBLES CAUSAS / SUGERENCIAS****No se produce ninguna reacción colorimétrica del ensayo**

- no se ha dispensado el conjugado
- contaminación del conjugado y/o del sustrato
- errores en la ejecución del ensayo (p. ej., dispensación accidental de los reactivos en orden incorrecto o procedentes de frascos equivocados, etc.)

**Reacción escasa (DO demasiado bajas)**

- conjugado no idóneo (p. ej., no procedente del kit original)
- tiempo de incubación demasiado corto, temperatura de incubación demasiado baja

**Reacción demasiado intensa (DO demasiado altas)**

- conjugado no idóneo (p. ej., no procedente del kit original)
- tiempo de incubación demasiado largo, temperatura de incubación demasiado alta
- calidad escasa del agua usada para la solución de lavado (bajo grado de desionización)
- lavados insuficientes (el conjugado no se ha retirado completamente)

**Valores inexplicablemente fuera de escala**

- contaminación de pipetas, puntas o contenedores- lavados insuficientes (el conjugado no se ha retirado completamente)

**CV% intraensayo elevado**

- los reactivos y/o tiras no se encontraban a temperatura ambiente antes del uso
- el lavador de microplacas no funciona correctamente (sugerencia: limpiar el cabezal del lavador)

**CV% interensayo elevado**

- condiciones de incubación no constantes (tiempo o temperatura)
- controles y muestras no dispensados al mismo tiempo (con los mismos intervalos) (controlar la secuencia de dispensación)
- variación en función de los operadores

**ERREUR CAUSES POSSIBLES / SUGGESTIONS****Aucune réaction colorimétrique de l'essai**

- non distribution du conjugué
- contamination du conjugué et/ou du substrat
- erreurs dans l'exécution du dosage (par ex., distribution accidentelle des réactifs dans le mauvais ordre ou en provenance des mauvais flacons, etc.)

**Réaction trop faible (DO trop basse)**

- conjugué non approprié (par ex., ne provenant pas du coffret original)
- temps d'incubation trop court, température d'incubation trop basse

**Réaction trop intense (DO trop élevée)**

- conjugué non approprié (par ex., ne provenant pas du coffret original)
- temps d'incubation trop long, température d'incubation trop élevée
- mauvaise qualité de l'eau utilisée pour la solution de lavage (bas degré de déionisation)
- lavages insuffisants (conjugué non entièrement éliminé)

**Valeurs inexplicablement hors plage**

- contamination des pipettes, embouts ou récipients - lavages insuffisants (conjugué non entièrement éliminé)

**CV% intra-essai élevé**

- les réactifs et/ou les bandes n'ont pas atteint la température ambiante avant usage
- le laveur de microplaques ne lave pas correctement (suggestion : nettoyer la tête du laveur)

**CV% inter-essai élevé**

- conditions d'incubation non constantes (temps ou température)
- contrôles et échantillons non distribués en même temps (avec les mêmes intervalles) (contrôler l'ordre de distribution)
- variabilité intrinsèque des opérateurs