Instructions for Use

17-OH-Progesterone (CT) RIA

IVD

REF RIA-4372

Σ 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

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

(230911)

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 / Sommaire

1 INTENDED USE 3
2 CLINICAL BACKGROUND 3
3 PRINCIPLE OF THE METHOD 3
4 REAGENTS PROVIDED 3
5 SUPPLIES NOT PROVIDED 4
6 REAGENT PREPARATION 4
7 STORAGE AND EXPIRATION DATING OF REAGENTS 4
8 SPECIMEN COLLECTION AND PREPARATION 4
9 PROCEDURE 5
10 CALCULATION OF RESULTS 6
11 TYPICAL DATA 6
12 PERFORMANCE AND LIMITATIONS 6
13 INTERNAL QUALITY CONTROL 9
14 REFERENCE INTERVALS 9
15 PRECAUTIONS AND WARNINGS 9
16 BIBLIOGRAPHY 10
17 SUMMARY OF THE PROTOCOL 10

1 VERWENDUNGSZWECK 11
2 KLINISCHER HINTERGRUND 11
3 GRUNDSÄTZLICHES ZUR DURCHFÜHRUNG 11
4 MITGELIEFERTE REAGENZIEN 11
5 ZUSÄTZLICH BENÖTIGTES MATERIAL 12
6 VORBEREITUNG DER REAGENZIEN 12
7 AUFBEWAHRUNG UND LAGERUNG DER REAGENZIEN 12
8 PROBENSAMMLUNG UND -VORBEREITUNG 12
9 DURCHFÜHRUNG 13
10 BERECHNUNG DER ERGEBNISSE 14
11 TYPISCHE WERTE 14
12 LEISTUNGSMERKMALE UND GRENZEN DER METHODIK 14
13 INTERNE QUALITÄTSKONTROLLE 17
14 ZU ERWARTENDER BEREICH 17
15 VORSICHTSMASSNAHMEN UND WARNUNGEN 17
16 LITERATUR 18
17 ZUSAMMENFASSUNG DES PROTOKOLLS 18

1 USO DEL KIT 19
2 INFORMAZIONI CLINICHE 19
3 PRINCIPIO DEL METODO 19
4 REATTIVI FORNITI 19
5 REATTIVI NON FORNITI 20
6 PREPARAZIONE DEI REATTIVI 20
7 CONSERVAZIONE E SCADENZA DEI REATTIVI 20
8 RACCOLTA E PREPARAZIONE DEI CAMPIONI 20
9 METODO DEL DOSAGGIO 21
10 CALCOLO DEI RISULTATI 22
11 CARATTERISTICHE TIPICHE 22
12 CARATTERISTICHE E LIMITI DEL METODO 22
13 CONTROLLO DI QUALITÀ INTERNO 25
14 INTERVALLI DI RIFERIMENTO 25
15 PRECAUZIONI PER L'USO 25
16 RIFERIMENTI BIBLIOGRAFICI 26
17 SCHEMA DEL DOSAGGIO 26

1 INSTRUCCIONES DE USO 27
2 INFORMACIÓN CLÍNICA 27
3 PRINCIPIOS DEL MÉTODO 27
4 REACTIVOS SUMINISTRADOS 27
5 MATERIAL NO SUMINISTRADO 28
6 PREPARACIÓN DE REACTIVOS 28
7 ALMACENAJE Y CADUCIDADES DE LOS REACTIVOS 28
8 RECOGIDA Y PREPARACIÓN DE MUESTRAS 28
9 PROTOCOLO 29
10 CALCULO DE RESULTADOS 30
11 EJEMPLO DE RESULTADOS 30
12 REALIZACIÓN Y LIMITACIONES 30
13 CONTROL DE CALIDAD INTERNO 33
14 INTERVALOS DE REFERENCIA 33
15 PRECAUCIONES Y ADVERTENCIAS 33
16 BIBLIOGRAFIA 34
17 RESUMOEN DEL PROTOCOLO 34

1 BUT DU DOSAGE 35
2 CONTEXTE CLINIQUE 35
3 PRINCIPE DU DOSAGE 35
4 REACTIFS FOURNIS 35
5 MATERIEL NON FOURNI 36
6 PREPARATION DES REACTIFS 36
7 STOCKAGE ET DATE D'EXPIRATION DES REACTIFS 36
8 PREPARATION ET STABILITE DE L'ECHANTILLON 36
9 MODE OPERATOIRE 37
10 CALCUL DES RESULTATS 38
11 DONNEES TYPES 38
12 PERFORMANCE ET LIMITES DU DOSAGE 38
13 CÔNTROLE QUALITE INTERNE 41
14 VALEURS ATTENDUES 41
15 PRECAUTIONS ET AVERTISSEMENTS 41
16 BIBLIOGRAPHIE 42
17 RESUME DU PROTOCOLE 42

SYMBOLS USED 43

1 INTENDED USE

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

2 CLINICAL BACKGROUND

2.1 Biological activities of 17α-hydroxyprogesterone

17-α-hydroxyprogesterone (17-OHP) is a C 21 steroid hormone (molecular weight 330.3) which is produced from 17α-hydroxypregnenolone in the adrenals and also in the ovaries, testes and placenta. 17-OHP is hydroxylated at positions 11 and 21 to produce cortisol via 11-deoxycortisol.

2.2 Clinical applications of 17-α-hydroxyprogesterone determination

As a rule, serum or amniotic fluid 17-OHP dosages are relevant to diagnose congenital adrenal hyperplasia (CAH). This CAH is due to a specific enzyme defect (six distinct enzyme deficiencies have been described). As a result of these deficiencies, ACTH increases and produces adrenal hyperplasia and the raise of many steroid precursors. But it is also very interesting to know the value of 17-OHP in patients with varicocele. (17-OHP and testosterone represent markers of Leydig cell function) and in ageing male patients to detect Benign Prostatic Hypertrophy (BPH) and carcinoma of the prostate (PCA) (plasma 17-OHP is significantly lower in PCA and BPH groups than in normal men).

There are other domains for 17-OHP investigations as: male infertility, girls with peripubertal virilization, children with premature adrenache (in these cases, the values of 17-OHP are increased without or after ACTH stimulation)

3 PRINCIPLE OF THE METHOD

A fixed amount of ^{125}I labelled steroid competes with the steroid to be measured present in the sample or in the calibrator for a fixed amount of antibody sites immobilized on the wall of a polystyrene tube. Neither extraction nor chromatography is required because of the high specificity of the coated antibodies.

After 3 hours incubation at 37 °C, an aspiration step terminates the competition reaction. The tubes are then washed with 3 mL of washing solution and aspirated. A calibration curve is plotted and the 17-OHP concentrations of the samples are determined by dose interpolation from the calibration curve.

4 REAGENTS PROVIDED

	Reagents	96 Tests	Reconstitution
TUBES	Tubes coated with anti 17-OHP	2 x 48	**Ready** for use
Ag ^{125}I	Tracer: ^{125}Iodine labelled 17-OHP (HPLC grade) in phosphate/citric acid buffer with bovine casein and azide (<0.1%)	1 vial 55 mL 190 kBq	**Ready** for use
CAL 0	Zero calibrator in human serum and azide (0.5%)	1 vial 3 mL	**Ready** for use
CAL N	Calibrators 17-OHP, N = 1 to 5 (see exact values on vial labels) in human serum and azide (0.5%)	5 vials 0.5 mL	**Ready** for use
WASH SOLN CONC	Wash solution (TRIS-HCl)	1 vial 10 mL	**Dilute** 70 x with distilled water (use a magnetic stirrer).
CONTROL N	Controls, N = 1 or 2 in human plasma and thymol	2 vials lyophilized	**Add** 0.5 mL distilled water

Note : Use the zero calibrator for sample dilutions.

5 SUPPLIES NOT PROVIDED

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

1. Distilled water
2. Pipettes for delivery of: 25 µL, 500 µL and 3 mL (the use of accurate pipettes with disposable plastic tips is recommended)
3. Vortex mixer
4. Magnetic stirrer
5. Water bath at 37 °C
6. 5 mL automatic syringe (Cornwall type) for washing
7. Aspiration system (optional)
8. Any gamma counter capable of measuring ^{125}I may be used (minimal yield 70%).
9. Incubator at 37°C

Optional (for extraction):

10. **Diethyl ether (analytical grade; purity > 98%)**
11. **Disposable glass tubes (12 x 75 mm), with stoppers.**
12. **Reconstitution Solution for 17-OH-Progesterone (CT) RIA, REF: RIA-4372-RECSOL.**

6 REAGENT PREPARATION

A. **Controls :** Reconstitute the controls with 0.5 mL distilled water.

B. **Working Wash Solution :** Prepare an adequate volume of Working Wash solution by adding 69 volumes of distilled water to 1 volume of Wash Solution (70x). Use a magnetic stirrer to homogenize. Discard unused Working Wash solution at the end of the day.

7 STORAGE AND EXPIRATION DATING OF REAGENTS

- Before opening or reconstitution, all kit components are stable until the expiry date, indicated on the label, if kept at 2 °C to 8 °C.
- After reconstitution, controls are stable for one week at 2 °C to 8 °C. For longer storage periods, aliquots should be made and kept at -20 °C for 3 months.
- Freshly prepared Working Wash solution should be used on the same day.
- After its first use, tracer is stable until expiry date, if kept in the original well-closed vial at 2 °C to 8 °C.
- Alterations in physical appearance of kit reagents may indicate instability or deterioration.

8 SPECIMEN COLLECTION AND PREPARATION

Serum or plasma samples must be kept at 2 °C - 8 °C.
If the test is not run within 48 hours, storage at -20 °C is recommended.
Avoid successive freezing and thawing.

Heparinized plasma provide 10% lower results than serum:

Y (hep. plasma) = 0.9 x (Serum) + 0.20 r = 0.92 n = 20

EDTA plasma provides 10% lower results than serum:

Y (EDTA plasma) = 0.9 x (Serum) + 0.18 r = 0.87 n = 20

9 PROCEDURE

9.1 Handling notes

Do not use the kit or components beyond expiry date.

Do not mix materials from different kit lots.

Bring all the reagents to room temperature prior to use.

Thoroughly mix all reagents and samples by gentle agitation or swirling.

Use a clean disposable pipette tip for addition of each different reagent and sample in order to avoid cross-contamination. High precision pipettes or automated pipetting equipment will improve the precision.

Respect the incubation times.

Prepare a calibration curve for each run, do not use data from previous runs.

9.2 Extraction of newborn samples (optional) – FOR SERUM SAMPLE

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

9.3 Procedure

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

10 CALCULATION OF RESULTS

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

$$B/B0\ (\%) = \frac{\text{Counts (Calibrator or Sample)}}{\text{Counts (Zero Calibrator)}} \times 100$$

3. Using a 3 cycle semi-logarithmic or logit log graph paper, plot the (B/B0(%)) values for each calibrator point as a function of the 17-OHP concentration of each calibrator point, reject obvious outliers.
4. Computer assisted methods can also be used to construct the calibration curve. If automatic result processing is used, a 4 parameter logistic function curve fitting is recommended.
5. By interpolation of the sample (B/B0(%)) values, determine the 17-OHP concentrations of the samples from the reference curve.
6. *The obtained concentration for extracted newborn samples (see chapter 9.2) can be read directly on the curve (no correction factor needed)*
7. For each assay, the percentage of total tracer bound in the absence of unlabelled 17-OHP (B0/T) must be checked.

11 TYPICAL DATA

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

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

12 PERFORMANCE AND LIMITATIONS

12.1 Sensitivity

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

LoB was calculated at 0.03 ng/ml.

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

The LoD was calculated at 0.09 ng/ml. The LoQ (Limit of Quantification) was calculated by testing 4 low concentration samples, in 10 different assays.

The LoQ was calculated at 0.14 ng/ml.

12.2 Specificity

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

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

The effect of potential interfering substances on samples using the RIA-4372 was evaluated.

Different levels of Hemoglobin, Bilirubin, Triglyceride and Bilirubin Conjugate in serum samples were tested on samples with different 17α-hydroxyprogesterone concentrations. Our acceptance criterion was to have interference of less than 10%.

The tested substances did not affect the performance of the RIA-4372.

Substance	17OHP (ng/mL)	Concentration of interferent (mg/dL)	Mean % Variation
Hemoglobin	0.57	250	98.6%
		500	
	1.8	250	
		500	
Bilirubin Conjugated	0.57	50	95.1%
	1.8	50	
Bilirubin unconjugated	0.57	50	99.2%
		100	
	1.8	50	
		100	
Triglyceride	0.57	50	-3.0%
		100	
		250	
		500	
		1000	
	1.54	50	
		100	
		250	
		500	
		1000	

12.3 Precision

INTRA-ASSAY				INTRA-ASSAY AFTER EXTRACTION			
Serum	**N**	**<X> ± SD (ng/mL)**	**CV (%)**	**Serum**	**N**	**<X> ± SD (ng/mL)**	**CV (%)**
A	20	0.73 ± 0.05	6.8	C	24	0.56 ± 0.06	10.7
B	20	1.94 ± 0.09	4.6	D	24	1.81 ± 0.17	9.4

SD : Standard Deviation; CV: Coefficient of variation

INTER-ASSAY				INTER-ASSAY AFTER EXTRACTION			
Serum	**N**	**<X> ± SD (ng/mL)**	**CV (%)**	**Serum**	**N**	**<X> ± SD (ng/mL)**	**CV (%)**
A	12	0.69 ± 0.06	8.7	A	8	0.72 ± 0.13	18
B	12	2.08 ± 0.16	7.6	B	8	2.03 ± 0.39	19.2

SD : Standard Deviation; CV: Coefficient of variation

12.4 Accuracy

DILUTION TEST

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

Samples were diluted with the zero calibrator.

RECOVERY TEST

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

Conversion factor : From ng/mL to nmol/L : x 3.03
From nmol/L to ng/mL : x 0.33

To the best of our knowledge, no international reference material exists for this parameter.

12.5 Time delay between last calibrator and sample dispensing

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

TIME DELAY

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

12.6 Limitations for newborn samples

Very young children (< 3 months old) present high levels of 17α-hydroxypregnenolone sulphate. Despite the fact that there is almost no cross reaction with this molecule, we recommend to apply the extraction procedure (chapter 9.2.)

13 INTERNAL QUALITY CONTROL

- The percentage of total tracer bound in the absence of unlabelled 17-OHP (B0/T) must be > 25%.
- If the results obtained for Control 1 and/or Control 2 are not within the range specified on the vial label, the results cannot be used unless a satisfactory explanation for the discrepancy has been given.
- If desirable, each laboratory can make its own pools of control samples, which should be kept frozen in aliquots. Do not freeze-thaw more than twice.
- Acceptance criteria for the difference between the duplicate results of the samples should rely on Good Laboratory Practises.

REFERENCE INTERVALS

These values are given only for guidance; each laboratory should establish its own normal range of values.

	Concentration range (2.5 to 97.5% percentiles) (ng/mL)	**Number of subjects**
Normal males	0.67 - 3.32	79
Normal Females		
. Follicular phase	0.41 - 2.27	50
. Luteal phase	0.23 - 3.87	28
Pregnancy		
First trimester	2.60 - 7.95	30
Second trimester	1.83 - 9.74	30
Third trimester	3.54 - 18.97	15
Newborns (after extraction)	0.34 – 1.96	23 (0 to 3 months)

14 PRECAUTIONS AND WARNINGS

Safety

For in vitro diagnostic use only.
This kit contains ^{125}I (half-life: 60 days), emitting ionizing X (28 keV) and γ (35.5 keV) radiations.
This radioactive product can be transferred to and used only by authorized persons. Purchase, storage, use and exchange of radioactive products are subject to the legislation of the end user's country. In no case the product must be administered to humans or animals.
All radioactive handling should be executed in a designated area, away from regular passage. A logbook for receipt and storage of radioactive materials must be kept in the lab. Laboratory equipment and glassware, which could be contaminated with radioactive substances, should be segregated to prevent cross contamination of different radioisotopes.
Any radioactive spills must be cleaned immediately in accordance with the radio safety procedures. The radioactive waste must be disposed of following the local regulations and guidelines of the authorities holding jurisdiction over the laboratory. Adherence to the basic rules of radiation safety provides adequate protection.
The human blood components included in this kit have been tested by European approved and/or FDA approved methods and found negative for HBsAg, anti-HCV, anti-HIV-1 and 2. No known method can offer complete assurance that human blood derivatives will not transmit hepatitis, AIDS or other infections. Therefore, handling of reagents, serum or plasma specimens should be in accordance with local safety procedures.
All animal products and derivatives have been collected from healthy animals. Bovine components originate from countries where BSE has not been reported. Nevertheless, components containing animal substances should be treated as potentially infectious.
Avoid any skin contact with reagents (sodium azide as preservative). Azide in this kit may react with lead and copper in the plumbing and in this way form highly explosive metal azides. During the washing step, flush the drain with a large amount of water to prevent azide build-up.
Do not smoke, drink, eat or apply cosmetics in the working area. Do not pipette by mouth. Use protective clothing and disposable gloves.

15 BIBLIOGRAPHY

1. ANDO S. et al (1983) Plasma levels of 17 OH progesterone and testosterone in patients with varicoceles. Acta Endocrinologica, 102,463 469.
2. BONACCORSI A. et al (1987) Male infertility due to congenital adrenal hyperplasia: testicular biopsy findings, hormonal evaluation, and therapeutic results in three patients. Fertility and Sterility, 47, 4, 664 670.
3. CACCIARE et al (1987) Neonatal screening program for congenital adrenal hyperplasia in a homogeneous Caucasian population. Annals New York Academy of sciences 85 88.
4. DRAFTA D. et al (1982) Plasma steroids in benign prostatic hypertrophy and carcinoma of the prostate. J. Steroid Biochem. 17, 689 693.
5. GRANOFF A. et al (1985) 17 hydroxyprogesterone responses to adrenocorticotropin in children with premature adrenance. Journal of Clinical Endrocrinology and Metabolism, 3, 409 415.
6. NEW M. et al (1983) Genotyping steroid 21 hydroxylase deficiency hormonal reference data. Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism 57, 320 326.
7. SOLYOM J. et al (1987) Detection of late onset adrenal hyperplasia in girls with peripubertal virilization. Acta Endocrinologica (Copenh.) 115, 413 418.

16 SUMMARY OF THE PROTOCOL

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

1 VERWENDUNGSZWECK

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

2 KLINISCHER HINTERGRUND

2.1 Biologische Aktivität von 17α-Hydroxyprogesteron

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

2.2 Klinische Anwendungen der 17α-Hydroxyprogesteron-Bestimmung

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

3 GRUNDSÄTZLICHES ZUR DURCHFÜHRUNG

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

4 MITGELIEFERTE REAGENZIEN

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

Bemerkung: Benutzen Sie den Null-Kalibrator für Probenverdünnungen.

5 ZUSÄTZLICH BENÖTIGTES MATERIAL

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

1. Destilliertes Wasser
2. Pipetten: 25 µL, 500 µL und 3 mL (Verwendung von Präzisionspipetten mit Einwegpipettenspitzen wird empfohlen)
3. Vortex-Mixer
4. Magnetrührer
5. Wasserbad (37 °C)
6. 5 mL automatische Spritze (Cornwall-Typ) zum Waschen
7. Absaugsystem (optional)
8. Jeder Gamma-Counter, der ^{125}I messen kann, kann verwendet werden. Maximale Messeffizienz sollte gewährleistet sein.
9. Inkubator für 37 °C

Optional (für Extraktion)

10. Diethylether (Analysequalität; Reinheit > 98 %)

11. Einweg-Gasröhrchen (12 x 75 mm), mit Stoppern.

12. Rekonstitutionslösung für 17-OH-Progesterone (CT) RIA, REF: RIA-4372-RECSOL

6 VORBEREITUNG DER REAGENZIEN

A. **Kontrollen :** Rekonstituieren Sie die Kontrollen mit 0,5 mL destilliertem Wasser.

B. **Waschlösung:** Zur Vorbereitung eines angemessenen Volumens Waschlösung, mischen Sie zu einem Volumen Waschlösung (70x) 69 Volumen destilliertes Wasser. Benutzen Sie einen Magnetrührer. Entsorgen Sie nach jedem Arbeitstag die überflüssige Waschlösung.

7 AUFBEWAHRUNG UND LAGERUNG DER REAGENZIEN

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

8 PROBENSAMMLUNG UND -VORBEREITUNG

Serum- oder Plasmaproben müssen bei 2 °C - 8 °C aufbewahrt werden.

Falls der Test nicht innerhalb von 48 Stunden durchgeführt wird, müssen die Proben bei -20 °C aufgehoben werden.

Vermeiden Sie wiederholtes Einfrieren und Auftauen.

Heparinisiertes Plasma liefert um 10 % niedrigere Ergebnisse als Serum:

Y (hep. Plasma) = 0,9 x (Serum) + 0,20 r = 0,92 n = 20

EDTA-Plasma liefert um 10 % niedrigere Ergebnisse als Serum:

Y (EDTA Plasma) = 0,9 x (Serum) + 0,18 r = 0,87 n = 20

9 DURCHFÜHRUNG

9.1 Bemerkungen zur Durchführung

Verwenden Sie den Kit oder dessen Komponenten nicht nach dem Ablaufdatum. Vermischen Sie nie Materialien von unterschiedlichen Kit-Chargen. Bringen Sie alle Reagenzien vor der Verwendung auf Raumtemperatur.

Mischen Sie alle Reagenzien und Proben gründlich durch sanftes Schütteln oder Rühren. Verwenden Sie saubere Einwegpipettenspitzen, um Kreuzkontamination zu vermeiden.

Präzisionspipetten oder ein automatisches Pipettiersystem erhöhen die Präzision. Achten Sie auf die Einhaltung der Inkubationszeiten.

Erstellen Sie für jeden Durchlauf eine Kalibrationskurve, verwenden Sie nicht die Daten von früheren Durchläufen.

9.2 Extraktion von Neugeborenenproben (optional) – FÜR SERUMPROBE

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

9.3 Durchführung

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

10 BERECHNUNG DER ERGEBNISSE

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

$$B/B0\ (\%) = \frac{\text{Aktivität (Kalibrator oder Probe)}}{\text{Aktivität (Null-Kalibrator)}} \times 100$$

3. Verwenden Sie semi-logarithmisches oder doppelt-logarithmisches Millimeterpapier (über 3 Größenordnungen), tragen Sie die (B/B0(%))-Werte für jeden Kalibratorpunkt ein als Funktion der 17-OHP-Konzentration für jeden Kalibratorpunkt, schließen Sie offensichtliche „Ausreißer“ aus.
4. Computergestützte Methoden können ebenfalls zur Erstellung der Kalibrationskurve verwendet werden. Wir empfehlen die Berechnung mit einer „4 Parameter“-Kurvenfunktion.
5. Bestimmen Sie die 17-OHP-Konzentrationen der Proben über Interpolation der Probenwerte B/B0(%)) aus der Referenzkurve.
6. *Die erzielte Konzentration für extrahierte Neugeborenenproben (siehe Kap. 9.2) kann direkt aus der Kurve abgelesen werden (kein Korrekturfaktor erforderlich).*
7. Bei jedem Assay muss der Prozentsatz des gesamten gebundenen Tracers ohne unmarkiertes 17-OHP (B0/T) geprüft werden.

11 TYPISCHE WERTE

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

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

12 LEISTUNGSMERKMALE UND GRENZEN DER METHODIK

12.1 Empfindlichkeit

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

LoB wurde mit 0,03 ng/ml berechnet.

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

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

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

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

12.2 Spezifität

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

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

Die Wirkung potenzieller Interferenten auf Proben wurde mit dem RIA-4372 ausgewertet.

Verschiedene Konzentrationen von Hämoglobin, Bilirubin, Triglyzerid und Serum-Bilirubinkonjugatproben wurden an Proben mit unterschiedlichen 17α-Hydroxyprogesteron-Konzentrationen getestet. Unser Akzeptanzkriterium war eine Interferenz von weniger als 10 %.

Die getesteten Substanzen beeinträchtigten nicht die Performance des RIA-4372.

Substanz	17OHP (ng/mL)	Konzentration des Interferenten (mg/dL)	Mittelwert % Streuung
Hämoglobin	0,57	250	98,6%
		500	
	1,8	250	
		500	
Konjugiertes Bilirubin	0,57	50	95,1%
	1,8	50	
Nicht konjugiertes Bilirubin	0,57	50	99,2%
		100	
	1,8	50	
		100	
Triglyzerid	0.57	50	97,0%
		100	
		250	
		500	
		1000	
	1.54	50	
		100	
		250	
		500	
		1000	

12.3 Präzision

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

SD : Standardabweichung; CV: Variationskoeffizient

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

SD : Standardabweichung; CV: Variationskoeffizient

12.4 Genauigkeit

VERDÜNNUNGSTEST

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

Die Proben wurden mit Null-Kalibrator verdünnt.

WIEDERFINDUNGSTEST

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

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

Es sind uns keine internationalen Referenzen zu diesen Parametern bekannt.

12.5 Zeitverzögerung zwischen letzter Kalibrator- und Probenzugabe

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

ZEITABSTAND

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

12.6 Einschränkungen für Neugeborenen-Proben

Sehr kleine Kinder (< 3 Monate alt) verfügen über hohe Werte für 17α-Hydroxypregnenolonsulfat. Trotz der Tatsache, dass es so gut wie keine Kreuzreaktion mit diesem Molekül gibt, empfehlen wir die Durchführung des Extraktionsverfahrens (Kap. 9.2.)

13 INTERNE QUALITÄTSKONTROLLE

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

14 ZU ERWARTENDER BEREICH

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

	Konzentrationsbereich (2,5 bis 97,5 % Perzentile) (ng/mL)	**Anzahl der Personen**
Gesunde Männer	0,67 – 3,32	79
Gesunde Frauen		
Follikelphase	0,41 – 2,27	50
Lutealphase	0,23 – 3,87	28
Schwangerschaft		
1. Trimester	2,60 – 7,95	30
2. Trimester	1,83 – 9,74	30
3. Trimester	3,54 – 18,97	15
Neugeborene (nach Extraktion)	0,34 – 1,96	23 (0 bis 3 Monate)

15 VORSICHTSMASSNAHMEN UND WARNUNGEN

Sicherheit

Nur für diagnostische Zwecke.

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

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

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

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

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

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

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

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

16 LITERATUR

1. ANDO S. et al (1983) Plasma levels of 17 OH progesterone and testosterone in patients with varicoceles. Acta Endocrinologica, 102,463 469.
2. BONACCORSI A. et al (1987) Male infertility due to congenital adrenal hyperplasia: testicular biopsy findings, hormonal evaluation, and therapeutic results in three patients. Fertility and Sterility, 47, 4, 664 670.
3. CACCIARE et al (1987) Neonatal screening program for congenital adrenal hyperplasia in a homogeneous Caucasian population. Annals New York Academy of sciences 85 88.
4. DRAFTA D. et al (1982) Plasma steroids in benign prostatic hypertrophy and carcinoma of the prostate. J. Steroid Biochem. 17, 689 693.
5. GRANOFF A. et al (1985) 17 hydroxyprogesterone responses to adrenocorticotropin in children with premature adrenance. Journal of Clinical Endrocrinology and Metabolism, 3, 409 415.
6. NEW M. et al (1983) Genotyping steroid 21 hydroxylase deficiency hormonal reference data. Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism 57, 320 326.
7. SOLYOM J. et al (1987) Detection of late onset adrenal hyperplasia in girls with peripubertal virilization. Acta Endocrinologica (Copenh.) 115, 413 418.

17 ZUSAMMENFASSUNG DES PROTOKOLLS

	GESAMT-AKTIVITÄT (µL)	**KALIBRATOREN (µL)**	**PROBE(N)-KONTROLLEN (µL)**	**EXTRAHIERTE PROBEN (µL)**
Kalibratoren (0 to 5)	-	25	-	-
Proben, Kontrollen	-	-	25	-
Extrahierte Proben	-	-	-	*50*
Tracer	500	500	500	500
Inkubation	3 Stunden bei 37 °C			
Separation	-	Absaugen		
Waschlösung	-	3,0 mL		
Separation	-	Absaugen		
Auswertung	Messen der Röhrchen 60 Sekunden			

1 USO DEL KIT

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

2 INFORMAZIONI CLINICHE

2.1 Attività biologiche del 17α-idrossiprogesterone

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

2.2 Applicazioni cliniche del dosaggio del 17 α idrossiprogesterone

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

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

3 PRINCIPIO DEL METODO

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

4 REATTIVI FORNITI

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

Note : Usare lo calibratore zero per diluire i campioni.

5 REATTIVI NON FORNITI

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

1. Acqua distillata.
2. Pipette per dispensare 25 µL, 500 µL e 3 mL (Si raccomanda di utilizzare pipette accurate con puntale in plastica monouso).
3. Agitatore tipo vortex.
4. Agitatore magnetico.
5. Bagno d'acqua a 37 °C.
6. Pipetta a ripetizione automatica 5 mL per i lavaggi.
7. Sistema di aspirazione dei campioni (facoltativo).
8. Contatore gamma con finestra per ^{125}I (efficienza minima 70%)
9. Incubatore a 37 °C

Opzionali (per l'estrazione)

10. Dietil-etere (per analisi chimiche, purezza > 98%)
11. Provette di vetro monouso (12 x 75 mm) e relativi tappi.
12. Soluzione di ricostituzione per 17-OH-Progesterone (CT) RIA, REF: RIA-4372-RECSOL.

6 PREPARAZIONE DEI REATTIVI

Controlli: Ricostituire i controlli con 0,5 mL di acqua distillata.

Soluzione di lavoro del tampone di lavaggio: Preparare la quantità necessaria di soluzione di lavoro del tampone di lavaggio aggiungendo 69 parti di acqua distillata ad una parte di tampone di lavaggio concentrato (70 x). Usare un agitatore magnetico per rendere la soluzione omogenea. La soluzione di lavoro va scartata al termine della giornata.

7 CONSERVAZIONE E SCADENZA DEI REATTIVI

I reattivi non utilizzati sono stabili a 2 °C - 8 °C fino alla data riportata su ciascuna etichetta.

Dopo ricostituzione, i controlli sono stabili per 1 settimana a 2 °C - 8 °C e, suddivisi in aliquote a -20 °C per 3 mesi.

La soluzione di lavoro del tampone di lavaggio deve essere preparata fresca ogni volta e usata nello stesso giorno della preparazione.

Dopo apertura del flacone, il marcato è stabile fino alla data di scadenza riportata sull'etichetta, se conservato a 2 °C - 8 °C nel flacone originale ben tappato.

Alterazioni dell'aspetto fisico dei reattivi possono indicare una loro instabilità o deterioramento.

8 RACCOLTA E PREPARAZIONE DEI CAMPIONI

Conservare i campioni di siero o plasma a 2 °C - 8 °C.

Se il dosaggio non viene eseguito entro 48 ore dal prelievo, i campioni vanno conservati a -20 °C.

Evitare ripetuti cicli di congelamento-scongelamento dei campioni.

Il plasma eparinizzato fornisce risultati inferiori del 10% rispetto al siero:

Y (Plasma epar.) = 0,9 x (Siero) + 0,20 r = 0,92 n = 20

Il plasma in EDTA fornisce risultati inferiori del 10% rispetto al siero:

Y (Plasma in EDTA) = 0,9 x (Siero) + 0,18 r = 0,87 n = 20

9 METODO DEL DOSAGGIO

9.1 Avvertenze generali

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

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

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

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

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

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

9.3 Metodo del dosaggio

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

10 CALCOLO DEI RISULTATI

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

$$B/B0\ (\%) = \frac{\text{cpm (Calibratore, campioni o controlli)}}{\text{cpm (Zero Calibratore)}} \times 100$$

3. Usando carta semilogaritmica a 3 cicli o logit-log e ponendo in ordinata i rapporti di competizione. B/B0 (%) per ogni calibratore e in ascissa le rispettive concentrazioni di 17OH, tracciare la curva di taratura, scartare i valori palesemente discordanti.
4. È possibile utilizzare un sistema di interpolazione dati automatizzato. Con un sistema automatico di interpolazione dati utilizzare la curva a 4 parametri.
5. Per interpolazione sulla curva di taratura dei rapporti di competizione di campioni e controlli, determinare le rispettive concentrazioni di 17OH.
6. *La concentrazione ottenuta per i campioni di neonato estratti (si veda 9.2) può essere letta direttamente sulla curva (non è necessario alcun fattore di correzione).*
7. Per ogni dosaggio determinare la capacità legante B0/T.

11 CARATTERISTICHE TIPICHE

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

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

12 CARATTERISTICHE E LIMITI DEL METODO

12.1 Sensibilità

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

LoB è stato calcolato a 0,03 ng/ml.

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

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

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

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

12.2 Specificità

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

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

È stato valutato l'effetto delle potenziali sostanze interferenti sui campioni utilizzando il test RIA 4372.

Sono stati analizzati diversi livelli di emoglobina, bilirubina, trigliceridi e bilirubina coniugata in campioni di siero a diversa concentrazione di 17α-idrossiprogesterone. In base ai criteri di accettazione, l'interferenza doveva essere minore del 10%.

Le sostante analizzate non influivano sulle prestazioni del test RIA 4372.

Sostanza	17OHP (ng/mL)	Concentrazione dell'interferente (mg/dL)	Variazione % media
Emoglobina	0,57	250	98,6%
		500	
	1,8	250	
		500	
Bilirubina coniugata	0,57	50	95,1%
	1,8	50	
Bilirubina non coniugata	0,57	50	99,2%
		100	
	1,8	50	
		100	
Trigliceridi	0,57	50	97,0%
		100	
		250	
		500	
		1000	
	1,54	50	
		100	
		250	
		500	
		1000	

12.3 Precisione

INTRA SAGGIO				INTER SAGGIO DOPO L'ESTRAZIONE			
Siero	N	<X> ± SD (ng/mL)	CV (%)	Siero	N	<X> ± SD (ng/mL)	CV (%)
A	20	0,73 ± 0,05	6,8	C	24	0,56 ± 0,06	10,7
B	20	1,94 ± 0,09	4,6	D	24	1,81 ± 0,17	9,4

SD : Deviazione Standard; CV: Coefficiente di Variazione

INTER-SAGGIO				INTER-SAGGIO DOPO L'ESTRAZIONE			
Siero	**N**	**<X> ± SD (ng/mL)**	**CV (%)**	**Siero**	**N**	**<X> ± SD (ng/mL)**	**CV (%)**
A	12	0,69 ± 0,06	8,7	A	8	0,72 ± 0,13	18
B	12	2,08 ± 0,16	7,6	B	8	2,03 ± 0,39	19,2

SD : Deviazione Standard; CV: Coefficiente di Variazione

12.4 Accuratezza

TEST DI DILUIZIONE

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

I campioni sono stati diluiti con calibratore zero.

TEST DI RECUPERO

Campione	17-OHP aggiunto (ng/mL)	17-OHP recuperato (ng/mL)	Recupero (%)
1	6	5,7	95
	3	2,99	99
	1,5	1,64	109
	0,75	0,81	108
2	6	5,27	87
	3	2,86	95
	1,5	1,49	99
	0,75	0,74	98

Fattore di conversione:

ng/mL in nmol/l : x 3,03

nmol/l in ng/mL : x 0,33

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

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

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

TEMPO TRASCORSO

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

12.6 Limitazioni per i campioni di neonato

I neonati (età < 3 mesi) presentano livelli elevati di 17α-idrossipregnenolone solfato. Nonostante l'assenza quasi totale di formazione di reazioni incrociate con questa molecola, si raccomanda di eseguire la procedura di estrazione (cap. 9.2.)

13 CONTROLLO DI QUALITÀ INTERNO

La percentuale della capacità legante B0/T deve risultare > 25%.

Se i risultati ottenuti dosando il Controllo 1 e il Controllo 2 non sono all'interno dei limiti riportati sull'etichetta dei flaconi, non è opportuno utilizzare i risultati ottenuti per i campioni, a meno che non si trovi una giustificazione soddisfacente.

Ogni laboratorio può preparare un proprio pool di sieri da utilizzare come controllo, da conservare congelato in aliquote. Non congelare e scongelare un'aliquota più di due volte.

I criteri di accettazione delle differenze tra i risultati in duplicato dei campioni devono basarsi sulla buona prassi di laboratorio.

INTERVALLI DI RIFERIMENTO

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

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

14 PRECAUZIONI PER L'USO

Sicurezza

Il kit è solo per uso diagnostico in vitro.

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

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

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

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

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

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

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

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

15 RIFERIMENTI BIBLIOGRAFICI

1. ANDO S. et al (1983) Plasma levels of 17-OH-progesterone and testosterone in patients with varicoceles. Acta Endocrinologica, 102,463-469.
2. BONACCORSI A. et al (1987) Male infertility due to congenital adrenal hyperplasia: testicular biopsy findings, hormonal evaluation, and therapeutic results in three patients. Fertility and Sterility, 47, 4, 664-670.
3. CACCIARE et al (1987) Neonatal screening program for congenital adrenal hyperplasia in a homogeneous Caucasian population. Annals New York Academy of sciences 85-88.
4. DRAFTA D. et al (1982) Plasma steroids in benign prostatic hypertrophy and carcinoma of the prostate. J. Steroid Biochem. 17, 689-693.
5. GRANOFF A. et al (1985) 17-hydroxyprogesterone responses to adrenocorticotropin in children with premature adrenance. Journal of Clinical Endrocrinology and Metabolism, 3, 409-415.
6. NEW M. et al (1983) Genotyping steroid 21-hydroxylase deficiency hormonal reference data. Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism 57, 320-326.
7. SOLYOM J. et al (1987) Detection of late-onset adrenal hyperplasia in girls with peripubertal virilization. Acta Endocrinologica (Copenh.) 115, 413-418.

16 SCHEMA DEL DOSAGGIO

	Attività totale (µL)	**Calibratore (µL)**	**Campioni Controlli (µL)**	**Campioni estratti (µL)**
Calibratore (0 - 5)	-	25	-	-
Campioni, controlli	-	-	25	-
Campioni estratti	-	-	-	*50*
Marcato	500	500	500	500
Incubazione	3 ore a 37 °C			
Separazione		Aspirare		
Soluzione di lavoro del tampone di lavaggio		3 mL		
Separazione		Aspirare		
Conteggio	Contare le provette per 1 minuto			

1 INSTRUCCIONES DE USO

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

2 INFORMACIÓN CLÍNICA

2.1 Actividades biológicas de 17α-hidroxiprogesterona

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

2.2 Aplicaciones clínicas de la determinación de 17 α hidroxiprogesterona

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

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

3 PRINCIPIOS DEL MÉTODO

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

4 REACTIVOS SUMINISTRADOS

	Reactivos	Kit 96 test	Reconstitución
TUBES	Tubos recubiertos con anti 17-OHP	2 x 48	Listo para uso
Ag ^{125}I	Trazador, 17-OHP marcado con I^{125} (grado HPLC) en tampón fosfato / ácido cítrico con caseína bovina y azida (<0,1%)	1 vial 55 mL 190 kBq	Listo para uso
CAL 0	Calibrador cero en suero humano y azida (0,5%)	1 vial 3 mL	Listo para uso
CAL N	Calibradores 17-OHP - N = 1 al 5 (mirar los valores exactos en las etiquetas) en suero humano y azida (0,5%)	5 viales 0,5 mL	Listo para uso
WASH SOLN CONC	Solución de lavado (TRIS-HCl)	1 vial 10 mL	Diluir 70 x con agua destilada (utilizar agitador magnético)
CONTROL N	Controles - N = 1 o 2 en plasma humano y timol	2 viales liofilizados	Añadir 0,5 mL de agua destilada

Nota: Para diluciones de muestras utilizar estándar cero

5 MATERIAL NO SUMINISTRADO

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

1. Agua destilada
2. Pipetas de 25 µL, 500 µL y 3 mL (Se recomienda el uso de pipetas precisas con puntas desechables de plástico)
3. Vortex
4. Agitador magnético
5. Baño con agua a 37 °C
6. Jeringa automática 5 mL (tipo Cornwall) para el lavado
7. Sistema de aspiración (opcional)
8. Contador de radiaciones gamma para medir I^{125} (mínima eficiencia 70%)
9. Incubadora a 37 °C

Opcional (para extracción)

10. Dietiléter (grado analítico; pureza > 98%)

11. Tubos de vidrio desechables (12 x 75 mm), con tapones.

12. Solución de reconstitución para 17-OH-Progesterone (CT) RIA, REF: RIA-4372-RECSOL.

6 PREPARACIÓN DE REACTIVOS

A. **Controles**:

Reconstituir los controles con 0,5 mL de agua destilada.

B. **Solución de lavado de trabajo**:

Preparar el volumen necesario de Solución de lavado de trabajo mezclando 69 partes de agua destilada por 1 parte de Solución de lavado (70x). Utilizar un agitador magnético para homogeneizar. Desechar la solución de lavado de trabajo no utilizada al final del día.

7 ALMACENAJE Y CADUCIDADES DE LOS REACTIVOS

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

8 RECOGIDA Y PREPARACIÓN DE MUESTRAS

Las muestras de suero ó plasma deben ser guardadas a 2 °C - 8 °C.

Si el ensayo no se realiza en 48 horas, almacenar las muestras a -20 °C.

Evitar congelar y descongelar sucesivamente.

El plasma heparinizado da resultados 10% más bajos que el suero:

Y (hep. plasma) = 0,9 x (Suero) + 0,20 r = 0,92 n = 20

El plasma con EDTA da resultados 10% más bajos que el suero:

Y (plasma EDTA) = 0,9 x (Suero) + 0,18 r = 0,87 n = 20

9 PROTOCOLO

9.1 Notas de manejo

No utilizar el kit ó componentes después de la fecha de caducidad. No mezclar reactivos de diferente numero de lote. Llevar todos los reactivos a temperatura ambiente antes de su uso.

Agitar minuciosamente todos los reactivos y muestras, agitándolos o girándolos suavemente. Con el fin de evitar ninguna contaminación utilizar puntas de pipetas desechables y limpias para la adición de cada reactivo y muestra.

El uso de pipetas de precisión ó equipamiento de dispensación automática mejorara la precisión. Respetar los tiempos de incubación.

Preparar la curva de calibración en cada ensayo, no utilizar los datos de un ensayo previo.

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

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

9.3 Protocolo

1. Marcar los tubos recubiertos por duplicado para cada unos de los estándares, muestras y controles.
   Para la determinación de las Cuentas Totales, marcar 2 tubos normales.
2. Agitar brevemente los calibradores, muestras y controles y dispensar 25 µL de cada uno en sus respectivos tubos.
   Para muestras extraídas de recién nacidos, pipetear 50 µL en vez de 25 µL.
3. Dispensar 0,5 mL de 17-OHP marcado con I^{125} en cada tubo, incluyendo los tubos destinados a las Cuentas Totales.
4. Agitar suavemente la gradilla de tubos para soltar cualquier burbuja adherida a las paredes de los tubos.
5. Incubar durante 3 horas a 37 °C.
6. Aspirar el contenido de cada tubo (excepto los de Cuentas Totales). Asegurarse que la punta de la pipeta de aspiración toca el fondo del tubo con el fin de aspirar todo el líquido.
7. Lavar los tubos con 3 mL de Solución de lavado de trabajo (excepto los de Cuentas Totales) y aspirar. Evitar la formación de espuma durante la adición de la Solución de lavado
8. Dejar los tubos en posición inversa durante 2 minutos y aspirar él liquido restante.
9. Medir la actividad de cada tubo durante 60 segundos en un Contador Gamma.

10 CALCULO DE RESULTADOS

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

$$B/B0\ (\%) = \frac{\text{Cuentas (Calibrador ó muestra)}}{\text{Cuentas (Calibrador Cero)}} \text{x}100$$

3. Utilizando papel 3 ciclo semilogarítmico ó logit-log, representar los valores de (B/B0%) de cada calibrador frente a las concentraciones del 17-OHP de cada calibrador, rechazando los puntos exteriores.
4. Métodos computarizados de computación de resultados pueden ser utilizados para la construcción de la curva de calibración. Si se utiliza un sistema automático de calculo de resultados, se recomienda usar la representación gráfica “ 4 parámetros”.
5. Por interpolación de los valores (B/B%) de las muestras, se determinan los valores de las concentraciones de las mismas desde la curva de calibración.
6. La concentración obtenida para las muestras extraídas de recién nacidos (ver cap. 9.2.) puede leerse directamente en la curva (no se necesita factor de corrección).
7. El porcentaje total de enlace del trazador en ausencia de 17-OHP no marcado (B0/T) debe ser calculado en cada ensayo.

11 EJEMPLO DE RESULTADOS

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

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

12 REALIZACIÓN Y LIMITACIONES

12.1 Sensibilidad

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

LoB se calculó a 0,03 ng/ml.

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

El LoD se calculó en 0,09 ng/ml.

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

El LoQ se calculó en 0,14 ng/ml.

12.2 Especificidad

La especificidad fue estimada por la adición de esteroides que pueden ser presentes en las muestras de los pacientes a un pool de muestras de 17-OHP (± 0.5 ng/mL).

Componente	Cantidad añadida (ng/mL)	Reacción-cruzada (%)
17α-hidroxiprogesterona	-	100
Progesterona	500	0,7
17α-hidroxipregnenolona	1000	0,3
21-deoxicortisol	1000	1,07
Pregnenolona	500	0,02
11-deoxicortisol	500	0,21
Corticosterona	1000	0,008
11-deoxicorticosterona	500	0,24
Cortisol	5000	0,005
Testosterona	5000	0,004
Androstenediona	5000	0,01
Estradiol	1000	0,008
Sulfato de17α hidroxipregnenolona	5000	0,34

Se evaluó el efecto de sustancias potencialmente interferentes en las muestras utilizando el RIA-4372.

Se probaron muestras de suero con diferentes niveles de Hemoglobina, Bilirrubina, Triglicéridos y Bilirrubina Conjugada en muestras con diferentes concentraciones de 17α-hidroxiprogesterona. Nuestro criterio de aceptación fue tener una interferencia de menos de 10%.

Las sustancias analizadas no afectaron el desempeño de la prueba RIA-4372.

Sustancia	17OHP (ng/mL)	Concentración del interferente (mg/dL)	Variación media %
Hemoglobina	0,57	250	98.6%
		500	
	1,8	250	
		500	
Bilirrubina Conjugada	0,57	50	95.1%
	1,8	50	
Bilirrubina no conjugada	0,57	50	99.2%
		100	
	1,8	50	
		100	
Triglicéridos	0.57	50	97.0%
		100	
		250	
		500	
		1000	
	1.54	50	
		100	
		250	
		500	
		1000	

12.3 Precisión

INTRA-ENSAYO **INTRA-ENSAYO DESPUÉS DE LA EXTRACCIÓN**

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

DE: Desviación Estándar; CV: Coeficiente de variación

ENTRE-ENSAYO				ENTRE-ENSAYO DESPUÉS DE LA EXTRACCIÓN			
Suero	**N**	**<X> ± DE (ng/mL)**	**CV (%)**	**Suero**	**N**	**<X> ± DE (ng/mL)**	**CV (%)**
A	12	0,69 ± 0,06	8.7	A	8	0,72 ± 0,13	18
B	12	2,08 ± 0,16	7.6	B	8	2,03 ± 0,39	19,2

DE: Desviación Estándar; CV: Coeficiente de variación

12.4 Exactitud

TEST DILUCIÓN

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

Las muestras fueron diluidas con el calibrador cero.

TEST DE RECUPERACIÓN

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

Factor de conversión:
De ng/mL a nmol/L : x 3,03
De nmol/L a ng/mL : x 0,33

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

12.5 Tiempo de espera entre la dispensación del último calibrador y la de la muestra

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

TIEMPO DE ESPERA

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

12.6 Limitaciones de las muestras de recién nacidos

Los niños muy pequeños (< 3 meses) presentan niveles elevados de sulfato de 17α-hidroxipregnenolona. A pesar de que prácticamente no existe reacción cruzada con esta molécula, se recomienda aplicar el protocolo de extracción (cap. 9.2).

13 CONTROL DE CALIDAD INTERNO

El porcentaje de trazador total ligado en la ausencia de 17-OHP no-marcada (B0/T) tiene que ser > 25%.

Si los resultados obtenidos para el Control I y/ó Control 2 no están dentro del rango especificado en la etiqueta del vial, los resultados obtenidos no podrán ser utilizados a no ser que se pueda dar una explicación convincente de dicha discrepancia

Si es conveniente, - cada laboratorio puede utilizar sus propios pools de controles, los cuales se guardan en alícuotas congeladas. No congelar y descongelar más de dos veces.

Los criterios de aceptación de la diferencia entre los duplicados de las muestras se apoyan en las prácticas de laboratorio corrientes.

14 INTERVALOS DE REFERENCIA

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

	Alcance de concentración (2.5 a 97.5% percentiles) (ng/mL)	**Número de sujetos**
Hombres normales	0.67 – 3.32	79
Mujeres normales		
. Fase folicular	0.41 – 2.27	50
. Fase lútea	0.23 – 3.87	28
Embarazo		
. Primer trimestre	2.60 – 7.95	30
. Segundo trimestre	1.83 – 9.74	30
. Tercer trimestre	3.54 – 18.97	15
Recién nacidos (después de la extracción)	0.34 – 1.96	23 (0 a 3 meses)

15 PRECAUCIONES Y ADVERTENCIAS

Seguridad

Para uso solo en diagnóstico in vitro.

Este kit contiene I^{125} (vida media : 60 días) emisor de rayos X (28 keV) y de rayos γ (35.5 keV) ionizantes.

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

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

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

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

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

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

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

16 BIBLIOGRAFIA

1. ANDO S. et al (1983) Plasma levels of 17 OH progesterone and testosterone in patients with varicoceles. Acta Endocrinologica, 102,463 469.
2. BONACCORSI A. et al (1987) Male infertility due to congenital adrenal hyperplasia: testicular biopsy findings, hormonal evaluation, and therapeutic results in three patients. Fertility and Sterility, 47, 4, 664 670.
3. CACCIARE et al (1987) Neonatal screening program for congenital adrenal hyperplasia in a homogeneous Caucasian population. Annals New York Academy of sciences 85 88.
4. DRAFTA D. et al (1982) Plasma steroids in benign prostatic hypertrophy and carcinoma of the prostate. J. Steroid Biochem. 17, 689 693.
5. GRANOFF A. et al (1985) 17 hydroxyprogesterone responses to adrenocorticotropin in children with premature adrenance. Journal of Clinical Endrocrinology and Metabolism, 3, 409 415.
6. NEW M. et al (1983) Genotyping steroid 21 hydroxylase deficiency hormonal reference data. Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism 57, 320 326.
7. SOLYOM J. et al (1987) Detection of late onset adrenal hyperplasia in girls with peripubertal virilization. Acta Endocrinologica (Copenh.) 115, 413 418.

17 RESUMOEN DEL PROTOCOLO

	CUENTAS TOTALES (µL)	**CALIBRADORES (µL)**	**MUESTRA(S) CONTROL(S) (µL)**	**MUESTRAS EXTRAÍDAS (µL)**
Calibradores (0 al 5) Muestras, controles *Muestras extraídas* Trazador	- - - 500	25 - - 500	- 25 - 500	- - *50* 500
Incubación	3 horas a 37 °C			
Separación Solución de lavado de trabajo Separación	- - -	aspirar 3,0 mL aspirar		
Contaje	Contar los tubos durante 60 segundos			

1 BUT DU DOSAGE

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

2 CONTEXTE CLINIQUE

2.1 Activités biologiques de la 17α-hydroxyprogestérone

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

2.2 Applications cliniques de la détermination de la 17α-hydroxyprogestérone

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

Il y a d'autres domaines pour l'investigation de la 17-OHP comme: l'infertilité masculine, des filles avec une virilisation péripubérale, des enfants avec l'adrénarche prématurée (dans ces cas les valeurs de 17-OHP ont augmenté sans ou après la stimulation ACTH).

3 PRINCIPE DU DOSAGE

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

4 REACTIFS FOURNIS

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

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

5 MATERIEL NON FOURNI

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

1. Eau distillée
2. Pipettes pour distribuer: 25 µL, 500 µL et 3 mL (l'utilisation de pipettes précises et de pointes jetables en plastique est recommandée)
3. Agitateur vortex
4. Agitateur magnétique
5. Bain d'eau à 37 °C
6. Seringue automatique de 5 mL (type Cornwall) pour les lavages
7. Système d'aspiration
8. Tout compteur gamma capable de mesurer l'^{125}I peut être utilisé (rendement minimum 70%).
9. Incubateur à 37 °C

Optionnel (pour l'extraction)

10. Diethyl ether (p.a., pureté >98%

11. Tubes en verres (12 x 75 mm) avec bouchons

12. Solution de Reconstitution pour la 17-OH-Progesterone (CT) RIA, REF: RIA-4372-RECSOL

6 PREPARATION DES REACTIFS

A. **Contrôles** :
Reconstituer les contrôles avec 0,5 mL d'eau distillée.

B. **Solution de Lavage** :
Préparer un volume adéquat de Solution de Lavage en ajoutant 69 volumes d'eau distillée à 1 volume de Solution de Lavage (70x). Utiliser un agitateur magnétique pour homogénéiser. Eliminer la Solution de Lavage non utilisée à la fin de la journée.

7 STOCKAGE ET DATE D'EXPIRATION DES REACTIFS

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

8 PREPARATION ET STABILITE DE L'ECHANTILLON

Les échantillons de sérum ou de plasma doivent être gardés entre 2 °C à 8 °C.

Si le test n'est pas réalisé dans les 48 heures, un stockage à -20°C est recommandé.

Eviter des cycles de congélation et décongélation successifs.

Le plasma hépariné donne des résultats de 10% inférieurs à ceux du sérum

Y (plasma hép) = 0,9 x (Sérum) + 0,20 r = 0,92 n = 20

Le plasma EDTA donne des résultats de 10% inférieurs à ceux du sérum :

Y (plasma EDTA) = 0,9 x (Sérum) + 0,18 r = 0,87 n = 20

9 MODE OPERATOIRE

9.1 Notes de manipulation

Ne pas utiliser la trousse ou ses composants après avoir dépassé la date d'expiration.

Ne pas mélanger de matériel provenant de trousses de lots différents.

Mettre tous les réactifs à température ambiante avant utilisation.

Mélanger à fond tous les réactifs et les échantillons sous agitation douce.

Pour éviter toute contamination croisée, utiliser une nouvelle pointe de pipette pour l'addition de chaque réactif et échantillon. Des pipettes de haute précision ou un équipement de pipetage automatique permettent d'augmenter la précision.

Respecter les temps d'incubation.

Préparer une courbe de calibration pour chaque nouvelle série d'expériences, ne pas utiliser les données d'expériences précédentes.

9.2 Extraction des échantillons des nouveau-nés (optionnelle) – POUR ECHANTILLON SERIQUE

1. Identifier un tube en verre pour chaque échantillon **(ne pas extraire les calibrateurs / contrôles)**
2. Distribuer 75 µL de serum, suivi de 2.25 mL de diethyl ether.
3. Vortexer tous les tubes vigoureusement (2 x 1 minute).
4. Laisser reposer les tubes droits durant 5 minutes.
5. Placer les tubes à -20 °C afin de congeler la phase aqueuse.
6. Préparer une seconde série de tubes en verre et, pour chaque échantillon, tranférer la phase organique dans ces nouveaux tubes. Eviter la contamination par la phase aqueuse.
7. Evaporer complètement la phase organique (ether) sous flux d'air continu ou en plaçant les tubes à 37 °C (bain-marie). Effectuer la manipulation sous une hotte.
8. Dissoudre l'extrait sec avec 150 µL de solution de reconstitution **(non fourni, voir chapitre 5**).
   Vortexer vigoureusement durant 1 minute.
9. Laisser reposer les tubes droit 10 - 15 minutes et vortexer à nouveau durant 1 minute. Ces volumes permettent d'effectuer les déterminations en duplicat.

9.3 Mode opératoire

1. Identifier les tubes recouverts fournis dans la trousse en double pour chaque calibrateur, échantillon, contrôle. Pour la détermination de l'activité totale, identifier 2 tubes non recouverts.
2. Agiter au vortex brièvement les calibrateurs, les échantillons et les contrôles. Puis distribuer 25 µL de chacun d'eux dans leurs tubes respectifs.
   Pour les échantillons extraits des nouveau-nés, distribuer 50 µL au lieu de 25 µL.
3. Distribuer 0,5 mL de 17-OHP marquée à l' ^{125}Iodine dans chaque tube, y compris les tubes sans anticorps pour la détermination de l'activité totale.
4. Agiter gentiment le portoir de tube pour libérer toute bulle d'air emprisonnée.
5. Incuber pendant 3 heures à 37 °C.
6. Aspirer le contenu de chaque tube (à l'exception des tubes utilisés pour la détermination de l'activité totale). Assurez-vous que la pointe utilisée pour aspirer le liquide des tubes atteint le fond de chacun d'eux pour éliminer toute trace de liquide.
7. Laver les tubes avec 3 mL de Solution de Lavage (à l'exception des tubes utilisés pour la détermination de l'activité totale) et aspirer. Eviter la formation de mousse pendant l'addition de la Solution de Lavage.
8. Laisser les tubes droits pendant 2 minutes et aspirer le reste de liquide.
9. Placer les tubes dans un compteur gamma pendant 60 secondes pour quantifier la radioactivité.

10 CALCUL DES RESULTATS

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

$$B/B0\ (\%) = \frac{\text{moyenne de cpm (CAL ou échantillon)}}{\text{moyenne de cpm (CAL 0)}} \times 100$$

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

11 DONNEES TYPES

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

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

12 PERFORMANCE ET LIMITES DU DOSAGE

12.1 Sensibilité

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

La LoB a été calculée à 0,03 ng/ml.

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

La LoD a été calculée à 0.09 ng/ml.

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

La LoQ a été calculée à 0,14 ng/ml.

12.2 Spécificité

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

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

L'effet de substances susceptibles d'interférer avec les échantillons soumis au test RIA-4372 a été évalué.

Différentes concentrations d'hémoglobine, de bilirubine, de triglycérides et de conjugué de bilirubine dans les échantillons sériques ont été testées sur des échantillons contenant de la 17α-hydroxyprogestérone à des concentrations différentes. Nos critères d'acceptation étaient d'avoir une interférence inférieure à 10%.

Les substances testées n'ont pas affecté les performances du test RIA-4372.

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

12.3 Précision

INTRA-ESSAI

Sérum	N	<X> ± SD (ng/mL)	CV (%)
A	20	0,73 ± 0,05	6,8
B	20	1,94 ± 0,09	4,6

INTRA-ESSAI APRÈS EXTRACTION

Sérum	N	<X> ± SD (ng/mL)	CV (%)
A	24	0,56 ± 0,06	10,7
B	24	1,81 ± 0,17	9,4

SD : Déviation Standard ; CV : Coefficient de variation

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

SD : Déviation Standard ; CV : Coefficient de variation

Exactitude

TEST DE DILUTION

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

L'échantillon a été dilué avec le calibrateur zéro.

TEST DE RECUPERATION

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

Facteur de conversion: De ng/mL à nmol/L : x 3,03
De nmol/L à ng/mL : x 0,33

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

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

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

DELAI

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

12.5 Restriction pour les échantillons de nouveau-nés

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

13 CÔNTROLE QUALITE INTERNE

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

14 VALEURS ATTENDUES

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

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

15 PRECAUTIONS ET AVERTISSEMENTS

Sécurité

Pour utilisation en diagnostic *in vitro* uniquement.

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

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

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

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

Les composants de sang humain inclus dans ce kit ont été évalués par des méthodes approuvées par l'Europe et/ou la FDA et trouvés négatifs pour HBsAg, l'anti-HCV, l'anti-HIV-1 et 2. Aucune méthode connue ne peut offrir l'assurance complète que des dérivés de sang humain ne transmettront pas d'hépatite, le sida ou toute autre infection. Donc, le traitement des réactifs, du sérum ou des échantillons de plasma devront être conformes aux procédures locales de sécurité.

Tous les produits animaux et leurs dérivés ont été collectés d'animaux sains. Les composants bovins proviennent de pays où l'ESB n'a pas été détectée. Néanmoins, les composants contenant des substances animales devront être traités comme potentiellement infectieux.

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

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

16 BIBLIOGRAPHIE

1. ANDO S. et al (1983) Plasma levels of 17 OH progesterone and testosterone in patients with varicoceles. Acta Endocrinologica, 102,463 469.
2. BONACCORSI A. et al (1987) Male infertility due to congenital adrenal hyperplasia: testicular biopsy findings, hormonal evaluation, and therapeutic results in three patients. Fertility and Sterility, 47, 4, 664 670.
3. CACCIARE et al (1987) Neonatal screening program for congenital adrenal hyperplasia in a homogeneous Caucasian population. Annals New York Academy of sciences 85 88.
4. DRAFTA D. et al (1982) Plasma steroids in benign prostatic hypertrophy and carcinoma of the prostate. J. Steroid Biochem. 17, 689 693.
5. GRANOFF A. et al (1985) 17 hydroxyprogesterone responses to adrenocorticotropin in children with premature adrenance. Journal of Clinical Endrocrinology and Metabolism, 3, 409 415.
6. NEW M. et al (1983) Genotyping steroid 21 hydroxylase deficiency hormonal reference data. Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism 57, 320 326.
7. SOLYOM J. et al (1987) Detection of late onset adrenal hyperplasia in girls with peripubertal virilization. Acta Endocrinologica (Copenh.) 115, 413 418.

17 RESUME DU PROTOCOLE

	ACTIVITE TOTALE (µL)	**CALIBRATEURS (µL)**	**ECHANTILLON(S), CONTROLE(S) (µL)**	**ECHANTILLONS EXTRAITS (µL)**
Calibrateurs (0 à 5) Echantillons, contrôles *Echantillons extraits* Traceur	- - - 500	25 - - 500	- 25 - 500	- - *50* 500
Incubation	3 heures à 37°C			
Séparation Solution de Lavage Séparation	-	aspiration 3,0 mL aspiration		
Comptage (radioactivité)	Temps de comptage des tubes : 60 secondes			

SYMBOLS USED

Symbol	English	Deutsch	Italiano	Español	Français	Português
CE	European Conformity	CE-Konformitäts-kennzeichnung	Conformità europea	Conformidad europea	Conformité normes européennes	Conformidade Europeia
	Consult instructions for use *	Gebrauchsanweisung beachten *	Consultare le istruzioni per l'uso	Consulte las instrucciones de uso	Consulter les instructions d'utilisation	Consultar as instruções de uso
IVD	*In vitro* diagnostic medical device *	*In-vitro*-Diagnostikum *	Diagnostica in vitro	Diagnóstico in vitro	Diagnostic in vitro	Dispositivo médico para diagnóstico in vitro
REF	Catalogue number *	Katalognummer *	No. di Cat.	No de catálogo	Référence	Número de catálogo
LOT	Batch code *	Chargen-bezeichnung *	Lotto no	Número de lote	No. de lot	Código do lote
Σ	Contains sufficient for <n> tests *	Ausreichend für <n> Prüfungen *	Contenuto sufficiente per "n" saggi	Contenido suficiente para <n> ensayos	Contenu suffisant pour "n" tests	Suficiente para <n> determinações
	Temperature limit *	Temperaturgrenzwerte *	Temperatura di conservazione	Temperatura de conservacion	Temperature de conservation	Limites de temperatura
	Use-by date *	Verwendbar bis *	Data di scadenza	Fecha de caducidad	Date limite d'utilisation	Prazo de validade
	Manufacturer *	Hersteller *	Fabbricante	Fabricante	Fabricant	Fabricante
	Distributor *	Vertriebspartner *	Distributore	Distribuidor	Distributeur	Distribuidor
	Date of manufacture *	Herstellungsdatum *	Data di produzione	Fecha de fabricación	Date de production	Data de fabricação
	Biological risks *	Biologische Risiken *	Rischi biologici	Riesgos biológicos	Risques biologiques	Riscos biológicos
	Caution *	Achtung *	Attenzione	Precaución	Attention	Cuidado
UDI	Unique device Identifier *	eindeutige Produktidentifizierung *	Identificativo unico del dispositivo*	Identificación exclusiva del dispositivo *	Identifiant de dispositif unique*	Identificador único do dispositivo *
RUO	For research use only	Nur für Forschungszwecke	Solo a scopo di ricerca	Sólo para uso en investigación	Seulement dans le cadre de recherches	
Content	Content	Inhalt	Contenuto	Contenido	Conditionnement	Conteúdo
Volume/No.	Volume / No.	Volumen/Anzahl	Volume/Quantità	Volumen/Número	Volume/Quantité	Volume / Quantidade