



17OH-RIA-CT

KIP1409

LOT : 110217/1

Read entire protocol before use.

17OH-RIA-CT

I. INTENDED USE

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

II. GENERAL INFORMATION

- A. **Proprietary name :** DIAsource 17OH-RIA-CT Kit
- B. **Catalog number :** KIP1409 : 96 tests
- C. **Manufactured by :** DIAsource ImmunoAssays S.A.
Rue du Bosquet, 2, B-1348 Louvain-la-Neuve, Belgium.

For technical assistance or ordering information contact :
Tel: +32 (0) 10 84.99.11 Fax: +32 (0) 10 84.99.90

III. CLINICAL BACKGROUND

A. *Biological activities of 17- α -hydroxyprogesterone*

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

B. *Clinical applications of 17- α -hydroxyprogesterone determination*


As a rule, serum or amniotic fluid 17OH 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 17OH in patients with varicocele. (17OH 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 17OH is significantly lower in PCA and BPH groups than in normal men).

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

IV. PRINCIPLES OF THE METHOD

A fixed amount of ¹²⁵I 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 17OH concentrations of the samples are determined by dose interpolation from the calibration curve.

V. REAGENTS PROVIDED

Reagents	96 Test Kit	Colour Code	Reconstitution			
 Tubes coated with anti 17- α -OH-progesterone	2 x 48	purple	Ready for use			
<table border="1" data-bbox="119 593 255 638"> <tr> <td>Ag</td> <td>¹²⁵I</td> </tr> </table> TRACER: ¹²⁵ Iodine labelled 17- α -OH-progesterone (HPLC grade) in phosphate/citric acid buffer with bovine serum albumin and azide (<0.1%)	Ag	¹²⁵ I	1 vial 55 ml 190 kBq	Red	Ready for use	
Ag	¹²⁵ I					
<table border="1" data-bbox="119 795 255 840"> <tr> <td>CAL</td> <td>0</td> </tr> </table> Zero calibrator in human serum and azide (0.5%)	CAL	0	1 vial 3 ml	yellow	Ready for use	
CAL	0					
<table border="1" data-bbox="119 896 255 940"> <tr> <td>CAL</td> <td>N</td> </tr> </table> Calibrators 17- α -OH-progesterone N = 1 to 5 (see exact values on vial labels) in human serum and azide (0.5%)	CAL	N	5 vials 0.5 ml	yellow	Ready for use	
CAL	N					
<table border="1" data-bbox="71 1064 327 1108"> <tr> <td>WASH</td> <td>SOLN</td> <td>CONC</td> </tr> </table> Wash solution (TRIS-HCl)	WASH	SOLN	CONC	1 vial 10 ml	brown	Dilute 70 x with distilled water (use a magnetic stirrer).
WASH	SOLN	CONC				
<table border="1" data-bbox="87 1176 279 1220"> <tr> <td>CONTROL</td> <td>N</td> </tr> </table> Controls - N = 1 or 2 in human serum and thymol	CONTROL	N	2 vials lyophilized	silver	Add 0.5 ml distilled water	
CONTROL	N					

Note : Use the zero calibrator for sample dilutions.

VI. SUPPLIES NOT PROVIDED

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

- Distilled water
- Pipettes for delivery of: 25 μ l, 500 μ l and 3 ml (the use of accurate pipettes with disposable plastic tips is recommended)
- Vortex mixer
- Magnetic stirrer
- Water bath at 37°C
- 5 ml automatic syringe (Cornwall type) for washing
- Aspiration system (optional)
- Any gamma counter capable of measuring ¹²⁵I may be used (minimal yield 70%).

VII. REAGENT PREPARATION

- Controls :** Reconstitute the controls with 0.5 ml distilled water.
- 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.

VIII. 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 to 8°C.
- After reconstitution, controls are stable for one week at 2 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 to 8°C.

- Alterations in physical appearance of kit reagents may indicate instability or deterioration.

IX. SPECIMEN COLLECTION AND PREPARATION

- Serum or plasma samples must be kept at 2-8°C.
- If the test is not run within 48 hrs., storage at -20°C is recommended.
- Avoid successive freezing and thawing.
- Serum and heparinized plasma provide similar results (avoid citrate samples) : Y (Serum) = 0.92 x (hep. plasma) + 0.10 r = 1.0 n = 18
- EDTA plasma provides 15% lower results than serum and heparinized plasma : Y (Serum) = 1.16 x (EDTA plasma) - 0.10 r = 0.99 n = 18

X. PROCEDURE

A. 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.

B. Procedure

- Label coated tubes in duplicate for each calibrator, sample and control. For the determination of total counts, label 2 normal tubes
- Briefly vortex calibrators, samples and controls and dispense 25 μ l of each into respective tubes.
- Dispense 0.5 ml of ¹²⁵Iodine labelled 17- α -OH-progesterone into each tube, including the uncoated tubes for total counts.
- Shake the tube rack gently by hand, to liberate any trapped bubbles.
- Incubate for 3 hours at 37°C.
- 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.
- 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.
- Let the tubes stand upright for two minutes and aspirate the remaining drop of liquid.
- Count tubes in a gamma counter for 60 seconds.

XI. CALCULATION OF RESULTS

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

$$B/B_0(\%) = \frac{\text{Counts (Calibrator or sample)}}{\text{Counts (Zero Calibrator)}} \times 100$$

- 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- α -OH-progesterone concentration of each calibrator point, reject obvious outliers.
- 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.
- By interpolation of the sample (B/B₀(%)) values, determine the 17- α -OH-progesterone concentrations of the samples from the reference curve.
- For each assay, the percentage of total tracer bound in the absence of unlabelled 17- α -OH-progesterone (B₀/T) must be checked.

XII. TYPICAL DATA

The following data are for illustration only and should never be used instead of the real time calibration curve.

17OH-RIA-CT	cpm	B/Bo (%)
Total count	48579	
Calibrator		
0.00 ng/ml	19831	100.0
0.15 ng/ml	15587	78.6
0.53 ng/ml	10398	52.4
1.02 ng/ml	7074	35.7
3.10 ng/ml	2930	14.8
11.10 ng/ml	1028	5.2

XIII. PERFORMANCE AND LIMITATIONS

A. Detection limit

Twenty zero calibrators were assayed along with a set of other calibrators. The detection limit, defined as the apparent concentration two standard deviations below the average counts at zero binding, was 0.02 ng/ml.

B. Specificity

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

Compound	Added amount (ng/ml)	Cross-Reactivity (%)
17OH-Progesterone	-	100
Progesterone	500	0.7
17- α -hydroxypregnenolone	1000	0.3
21-deoxycortisol	1000	0.5
Pregnenolone	500	0.022
11-deoxycortisol	500	0.5
Corticosterone	500	ND
11-deoxycorticosterone	500	0.035
Cortisol	2500	0.008
Testosterone	5000	ND
Androstenedione	5000	0.001
Estradiol	5000	0.001

C. Precision

INTRA-ASSAY

INTER-ASSAY

Serum	N	<X> \pm SD (ng/ml)	CV (%)	Serum	N	<X> \pm SD (ng/ml)	CV (%)
A	10	0.43 \pm 0.03	6.2	A	20	0.77 \pm 0.07	9.2
B	10	2.35 \pm 0.13	5.6	B	20	1.97 \pm 0.10	5.2
C	10	7.55 \pm 0.38	5.1				

SD : Standard Deviation; CV: Coefficient of variation

D. Accuracy

DILUTION TEST

Serum	Dilution	Theoretical Concent. (ng/ml)	Measured Concent. (ng/ml)
1	1/1	-	3.83
	1/2	1.92	2.16
	1/4	0.96	1.13
	1/8	0.48	0.53
	1/16	0.24	0.25
2	1/1	-	6.65
	1/2	3.33	3.32
	1/4	1.66	2.12
	1/8	0.83	0.88
	1/16	0.42	0.39

Samples were diluted with the zero calibrator.

RECOVERY TEST

Sample	added 17OH (ng/ml)	Recovered 17OH (ng/ml)	Recovered (%)
1	6.65	6.10	92
	5.17	4.32	84
	2.93	2.69	92
	1.25	1.22	98
	0.92	0.87	95
2	7.37	7.23	98
	5.90	5.78	98
	3.60	3.57	99
	2.01	2.14	107
	1.69	1.65	98

Conversion factor :

From ng/ml to nmol/L : $\times 3.03$

From nmol/L to ng/ml : $\times 0.33$

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

Reference method: 50 patient serum samples (values from 0.3 ng/ml to 10.0 ng/ml) were assayed along with the tritiated reference method. The linear regression analysis is quite good.

17OH-RIA-CT = 0.99 (^3H reference) + 0.06 ng/ml $r = 0.96$

E. Time delay between last calibrator and sample dispensing

As shown hereafter, assay results remain accurate even when a sample is dispensed 36 minutes after the calibrator has been added to coated tubes.

TIME DELAY

Serum (ng/ml)	0'	12'	24'	36'
Serum 1	0.50	0.58	0.56	0.56
Serum 2	0.86	0.86	0.93	0.83
Serum 3	1.22	1.25	1.24	1.26
Serum 4	1.86	1.90	1.93	1.93
Serum 5	3.29	3.70	3.46	3.48
Serum 6	4.52	4.76	5.18	4.65

XIV. INTERNAL QUALITY CONTROL

- The percentage of total tracer bound in the absence of unlabelled 17- α -OH-progesterone (BO/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.

XV. 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	0.59 – 3.44	72
Normal Females		
. Follicular phase	0.11 - 1.08	48
. Luteal phase	0.95 - 5.00	49
Pregnancy		
. First trimester	2.50 – 9.78	43
. Second trimester	3.40 – 8.50	31
. Third trimester	4.53 – 18.86	35

XVI. PRECAUTIONS AND WARNINGS

Safety

For in vitro diagnostic use only.

This kit contains ¹²⁵I (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 radiosafety 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.

XVII. 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 Endocrinology 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.

XVIII. SUMMARY OF THE PROTOCOL

	TOTAL COUNTS µl	CALIBRATORS µl	SAMPLE(S) CONTROLS µl
Calibrators (0-5)	-	25	-
Samples, controls	-	-	25
Tracer	500	500	500
Incubation	3 hours at 37°C		
Separation	-	aspirate	
Working Wash solution		3.0 ml	
Separation		aspirate carefully	
Counting	Count tubes for 60 seconds		

DIAsource Catalogue Nr : KIP1409	P.I. Number : 1700475/en	Revision nr : 110217/1
-------------------------------------	-----------------------------	---------------------------

Revision date : 2011-02-17

Lire entièrement le protocole avant utilisation.

17OH-RIA-CT

I. BUT DU DOSAGE

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

II. INFORMATIONS GENERALES

- A. **Nom du produit :** DIAsource 17OH-RIA-CT kit
- B. **Numéro de catalogue:** KIP1409 : 96 tests
- C. **Fabriqué par :** DIAsource ImmunoAssays S.A.
Rue du Bosquet, 2, B-1348 Louvain-la-Neuve, Belgique.

Pour une assistance technique ou une information sur une commande :
Tel: +32 (0) 10 84.99.11 Fax: +32 (0) 10 84.99.90

III. CONTEXTE CLINIQUE

A *Activités biologiques de la 17- α -hydroxyprogestérone*

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

B. *Applications cliniques de la détermination de la 17- α -hydroxyprogestérone*







En général, le sérum ou les doses de liquide amniotique 17OH 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 17OH présente chez les patients atteints de varicèle (la 17OH 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 17OH 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 17OH comme: l'infertilité masculine, des filles avec une virilisation péripubérale, des enfants avec l'adrénarcho précoce (dans ces cas les valeurs de 17OH ont augmenté sans ou après la stimulation ACTH).

IV. PRINCIPE DU DOSAGE

Une quantité fixe de 17OH marquée à l'¹²⁵I est en compétition avec la 17OH 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 17OH des échantillons est déterminée par interpolation de la dose sur la courbe de calibration.

V. REACTIFS FOURNIS

Réactifs	96 Tests	Code couleur	Reconstitution
 Tubes recouverts avec l'anti 17OH	2 x 48	Pourpre	Prêt à l'emploi
 TRACEUR: 17OH marquée à l' ¹²⁵ Iodine (grade HPLC) dans un tampon phosphate / acide citrique avec de l'albumine bovine et de l'azide de sodium (<0,1%)	1 flacon 55 ml 190 kBq	Rouge	Prêt à l'emploi
 Calibrateur zéro dans du sérum humain et de l'azide de sodium (0,5%)	1 flacon 3 ml	Jaune	Prêt à l'emploi
 Calibrateurs 17OH - 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	Jaune	Prêt à l'emploi
 Solution de lavage (TRIS-HCl)	1 flacon 10 ml	Brun	Diluer 70x avec de l'eau distillée (utiliser un agitateur magnétique).
 Contrôles - N = 1 ou 2 dans du sérum humain et thymol	2 flacons lyophilisés	Gris	Ajouter 0,5 ml d'eau distillée

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

VI. MATERIEL NON FOURNI

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

- Eau distillée
- Pipettes pour distribuer: 25 µl, 500 µl et 3 ml (l'utilisation de pipettes précises et de pointes jetables en plastique est recommandée)
- Agitateur vortex
- Agitateur magnétique
- Bain d'eau à 37°C
- Seringue automatique de 5 ml (type Cornwall) pour les lavages
- Système d'aspiration
- Tout compteur gamma capable de mesurer l'¹²⁵I peut être utilisé (rendement minimum 70%).

VII. PREPARATION DES REACTIFS

- Contrôles :** Reconstituer les contrôles avec 0,5 ml d'eau distillée.
- 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.

VIII. 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 et 8°C.

- Après reconstitution, les contrôles sont stables pendant une semaine entre 2 et 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 et 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.

IX. PREPARATION ET STABILITE DE L'ECHANTILLON

- Les échantillons de sérum ou de plasma doivent être gardés entre 2 et 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 ou le sérum donne des résultats similaires (éviter les échantillons contenant du citrate)

$$Y (\text{Sérum}) = 0,92 \times (\text{hép. plasma}) + 0,10 \quad r = 1,0 \quad n = 18$$
- Les plasmas EDTA donnent un rendement de 15 % inférieurs aux résultats obtenus avec le sérum :

$$Y (\text{Sérum}) = 1,16 \times (\text{plasma EDTA}) - 0,10 \quad r = 0,99 \quad n = 18$$

X. MODE OPERATOIRE

A. 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 trousse 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.

B. Mode opératoire

- 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.
- Agiter au vortex brièvement les calibrateurs, les échantillons et les contrôles. Puis distribuer 25 µl de chacun d'eux dans leurs tubes respectifs.
- Distribuer 0,5 ml de 17OH marquée à l'¹²⁵Iodine dans chaque tube, y compris les tubes sans anticorps pour la détermination de l'activité totale.
- Agiter gentiment le portoir de tube pour libérer toute bulle d'air emprisonnée.
- Incuber pendant 3 heures à 37°C.
- 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.
- 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.
- Laisser les tubes droits pendant 2 minutes et aspirer le reste de liquide.
- Placer les tubes dans un compteur gamma pendant 60 secondes pour quantifier la radioactivité.

XI. CALCUL DES RESULTATS

- Calculer la moyenne de chaque détermination réalisée en double.
- 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 :

$$B/B_0(\%) = \frac{\text{moyenne des cpm (CAL ou échantillon)}}{\text{moyenne des cpm (CAL 0)}} \times 100$$

- 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 17OH, écarter les valeurs aberrantes.
- 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.
- L'interpolation des valeurs de chaque échantillon (B/B₀(%)) détermine les concentrations en 17OH à partir de la courbe de calibration.
- Pour chaque essai, le pourcentage total de traceur lié en absence de 17OH non marquée (B₀/T) doit être vérifié.

XII. DONNEES TYPES

Les données représentées ci-dessous sont données pour information et ne peuvent jamais être utilisées à la place d'une courbe de calibration.

17OH-RIA-CT		cpm	B/Bo (%)
Activité totale		48579	
Calibrateur	0,00 ng/ml	19831	100,0
	0,15 ng/ml	15587	78,6
	0,53 ng/ml	10398	52,4
	1,02 ng/ml	7074	35,7
	3,10 ng/ml	2930	14,8
	11,10 ng/ml	1028	5,2

XIII. PERFORMANCE ET LIMITES DU DOSAGE

A. Limite de détection

Vingt calibrateurs zéro ont été testés en parallèle avec un assortiment d'autres calibrateurs.

La limite de détection, définie comme la concentration apparente située 2 déviations standards en-dessous de la moyenne déterminée à la fixation zéro, était de 0,02 ng/ml.

B. 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 17OH (± 0.5 ng/ml).

Composé	Quantité ajoutée (ng/ml)	Réactivité Croisée (%)
17OH-Progestérone	-	100
Progestérone	500	0,7
17- α -hydroxypregnénolone	1000	0,3
21-deoxycortisol	1000	0,5
Pregnénolone	500	0,022
11-deoxycortisol	500	0,5
Corticostérone	500	ND
11-deoxycorticostérone	500	0,035
Cortisol	2500	0,008
Testostérone	5000	ND
Androsténédione	5000	0,001
Estradiol	5000	0,001

C. Précision

INTRA-ESSAI

INTER-ESSAI

Sérum	N	<X> \pm SD (ng/ml)	CV (%)	Sérum	N	<X> \pm SD (ng/ml)	CV (%)
A	10	0,43 \pm 0,03	6,2	A	20	0,77 \pm 0,07	9,2
B	10	2,35 \pm 0,13	5,6	B	20	1,97 \pm 0,10	5,2
C	10	7,55 \pm 0,38	5,1				

SD : Déviation Standard; CV: Coefficient de variation

D. Exactitude

TEST DE DILUTION

Echantillon	Dilution	Concent. Théorique (ng/ml)	Concent. Mesurée (ng/ml)
1	1/1	-	3,83
	1/2	1,92	2,16
	1/4	0,96	1,13
	1/8	0,48	0,53
	1/16	0,24	0,25
2	1/1	-	6,65
	1/2	3,33	3,32
	1/4	1,66	2,12
	1/8	0,83	0,88
	1/16	0,42	0,39

L'échantillon a été dilué avec le calibrateur zéro.

TEST DE RECUPERATION

Echantillon	17OH ajouté (ng/ml)	17OH récupéré (ng/ml)	Recupération (%)
1	6,65	6,10	92
	5,17	4,32	84
	2,93	2,69	92
	1,25	1,22	98
	0,92	0,87	95
2	7,37	7,23	98
	5,90	5,78	98
	3,60	3,57	99
	2,01	2,14	107
	1,69	1,65	98

Facteur de conversion:

De ng/ml à nmol/L : $\times 3,03$

De nmol/L à ng/ml : $\times 0,33$

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

Méthode de référence: 50 échantillons de sérum des patients (valeurs de 0,3 ng/ml à 10,0 ng/ml) ont été testés avec la méthode de référence tritiée. L'analyse de régression linéaire est assez satisfaisante.

17OH-RIA-CT = 0,99 (3 H référence) + 0,06 ng/ml $r = 0,96$

E. 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 36 minutes après que le calibrateur a été ajouté aux tubes avec l'anticorps.

DELAI

Sérum (ng/ml)	0'	12'	24'	36'
Sérum 1	0,50	0,58	0,56	0,56
Sérum 2	0,86	0,86	0,93	0,83
Sérum 3	1,22	1,25	1,24	1,26
Sérum 4	1,86	1,90	1,93	1,93
Sérum 5	3,29	3,70	3,46	3,48
Sérum 6	4,52	4,76	5,18	4,65

XIV. CÔNTROLE QUALITE INTERNE

- Le pourcentage de traceur total lié en l'absence de 17OH non-marquée (BO/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.

XIV. VALEURS ATTENDUES

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

	Portée de concentration (2,5 à 97,5% percentiles) (ng/ml)	Nombre de sujets
Hommes normaux	0,59 – 3,44	72
Femmes normales		
. Phase folliculaire	0,11 - 1,08	48
. Phase lutéale	0,95 - 5,00	49
Grossesse		
. Premier trimestre	2,50 – 9,78	43
. Second trimestre	3,40 – 8,50	31
. Troisième trimestre	4,53 – 18,86	35

XV. PRECAUTIONS ET AVERTISSEMENTS

Sécurité

Pour utilisation en diagnostic *in vitro* uniquement.

Cette trousse contient de ^{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.

XVII. 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 Endocrinology 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.

XVIII. RESUME DU PROTOCOLE

	ACTIVITE TOTALE (μl)	CALIBRATEURS (μl)	ECHANTILLON(S) (μl)
Calibrateurs (0 à 5)	-	25	-
Echantillons, contrôles	-	-	25
Traceur	500	500	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		

Numéro de catalogue DIAsource : KIP1409	Numéro de P.I.: 1700475/fr	Numéro de révision : 110217/1
--	-------------------------------	----------------------------------

Date de révision : 2011-02-17

Vor Gebrauch des Kits lesen Sie bitte diese Packungsbeilage.

17OH-RIA-CT

I. VERWENDUNGSZWECK

Ein Radio-Immunoassay für die quantitative *in vitro* Bestimmung von humanem 17- α -Hydroxyprogesteron (17OH) in Serum und Plasma.

II. ALLGEMEINE INFORMATION

- A. **Handelsbezeichnung :** DIAsource 17OH-RIA-CT Kit
- B. **Katalognummer :** KIP1409 : 96 Tests
- C. **Hergestellt von:** DIAsource ImmunoAssays S.A.
Rue du Bosquet, 2, B-1348 Louvain-la-Neuve, Belgien.

Für technische Unterstützung oder Bestellungen wenden Sie sich bitte an:

Tel : +32 (0)10 84.99.11 Fax : +32 (0)10 84.99.90

Für Deutschland : Kostenfreie Rufnummer : 0800 1 00 85 74 - Kostenfreie Faxnummer : 0800 1 00 85 75

E-mail Ordering : ordering@diasource.be

III. KLINISCHER HINTERGRUND

A. *Biologische Aktivität von 17- α -Hydroxyprogesteron*

17- α -Hydroxyprogesteron (17OH) 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. 17OH wird an den Positionen 11 und 21 hydroxyliert, um über 11-Deoxycortisol Cortisol zu produzieren.

B. *Klinische Anwendungen der 17- α -Hydroxyprogesteron-Bestimmung*


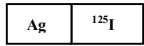
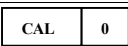
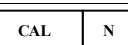

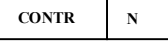
17OH-Dosierungen in Serum oder Fruchtwasser sind in der Regel für die Diagnostizierung einer kongenitalen Nebennierenhyperplasie (KNH) relevant. Diese KNH wird durch einen spezifischen Enzymdefekt verursacht (in der Literatur sind sechs verschiedene Enzymmängel bekannt). Infolge dieser Mängel steigt das ACTH und führt zu einer Nebennierenhyperplasie sowie zum Anstieg vieler Steroidvorläufer. Es ist aber auch sehr interessant, den 17OH-Wert von Patienten zu ermitteln, bei denen eine Varikozele festgestellt wurde (17OH 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 17OH im Plasma ist in den PKA- und BPH-Gruppen signifikant niedriger als bei gesunden Männern).

Weitere Bereiche für 17OH-Untersuchungen sind männliche Sterilität, Mädchen mit peripubertärer Virilisierung, Kinder mit prämaturner Adrenarche (in diesen Fällen sind die 17OH-Werte ohne oder nach der ACTH-Stimulation erhöht).

IV. GRUNDSÄTZLICHES ZUR DURCHFÜHRUNG

Eine festgesetzte Menge an ¹²⁵I-markiertem 17OH konkurriert mit dem zu messenden, in der Probe oder in dem Kalibrator vorhandenen, 17OH 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 17OH-Konzentrationen der Proben werden über Dosis-Interpolation der Kalibrationskurve bestimmt.

V. MITGELIEFERTE REAGENZIEN

Reagenz	96 Test Kit	Farbcode	Rekonstitution
 Mit anti 17OH-beschichtete Röhrchen	2 x 48	violett	gebrauchsfertig
 Tracer: ¹²⁵ Iod markiertes 17OH (HPLC grade) in Phosphat/ Zitronensäurepuffer mit Rinderserumalbumin und Azid (<0,1%)	1 Gefäß 55 ml 190 kBq	rot	gebrauchsfertig
 Null-Kalibrator: Humanserum und Azid (0,5%)	1 Gefäß 3 ml	gelb	gebrauchsfertig
 Kalibratoren 17OH: N = 1 bis 5 (genaue Werte auf Gefäß-Etiketten) in Humanserum und Azid (0,5%)	5 Gefäße 0.5 ml	gelb	gebrauchsfertig
 Waschlösung (TRIS-HCl)	1 Gefäß 10 ml	braun	70x mit dest. Wasser (Magnetrührer verwenden) verdünnen .
 Kontrollen: N = 1 oder 2 in Humanserum und Thymol	2 Gefäße lyophilisiert	silber	0,5 ml dest. Wasser zugeben

Bemerkung: Benutzen Sie den Null-Kalibrator für Probenverdünnungen.

VI. ZUSÄTZLICH BENÖTIGTES MATERIAL

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

1. Dest. Wasser
2. Pipetten: 25 µl, 500 µl und 3 ml (Verwendung von Präzisionspipetten mit Einwegpipettenspitzen wird empfohlen)
3. Vortexmischer
4. Magnetrührer
5. Wasserbad (37 °C)
6. 5 ml automatische Spritze (Cornwall-Typ) zum Waschen
7. Absaugsystem (optional)
8. Jeder Gamma-Counter, der ¹²⁵I messen kann, kann verwendet werden. Maximale Messeffizienz sollte gewährleistet sein.

VII. VORBEREITUNG DER REAGENZIEN

- A. **Kontrollen**: Rekonstituieren Sie die Kontrollen mit 0,5 ml dest. 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.

VIII. AUFBEWAHRUNG UND LAGERUNG DER REAGENZIEN

- Vor dem Öffnen und Rekonstituieren sind alle Kitkomponenten bei 2 bis 8 °C bis zu dem auf dem Etikett angegebenen Verfallsdatum haltbar.
- Nach der Rekonstitution sind Kontrollen eine Woche bei 2 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 gutverschlossenen Originalgefäß bei 2 bis 8 °C aufbewahrt wird, ist er bis zum angegebenen Verfallsdatum haltbar.
- Veränderungen im Aussehen der Kitkomponenten können auf Instabilität bzw. Zerfall hindeuten.

IX. PROBENSAMMLUNG UND -VORBEREITUNG

- Serum- oder Plasmaproben müssen bei 2-8 °C aufbewahrt werden.
- Falls der Test nicht innerhalb von 48 Std. durchgeführt wird, müssen die Proben bei -20 °C aufgehoben werden.
- Vermeiden Sie wiederholtes Einfrieren und Auftauen.
- Serum oder heparinisiertes Plasma liefern ähnliche Ergebnisse (vermeiden Sie Zitratproben)

$$Y(\text{Serum}) = 0,92 \times (\text{hep. Plasma}) + 0,10 \quad r = 1,0 \quad n = 18$$
- EDTA-Plasma liefert um 15 % niedrigere Ergebnisse als Serum :

$$Y(\text{Serum}) = 1,16 \times (\text{EDTA plasma}) - 0,10 \quad r = 0,99 \quad n = 18$$

X. DURCHFÜHRUNG

A. 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.

B. 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.
3. Geben Sie 0,5 ml des ¹²⁵I-markierten 17OH 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.

XI. 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:

$$B/B_0(\%) = \frac{\text{Aktivität (Kalibrator oder Probe)}}{\text{Aktivität (Null-Kalibrator)}} \times 100$$

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 17OH-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 17OH-Konzentrationen der Proben über Interpolation der Probenwerte B/B₀(%) der Referenzkurve. That's not clear to me!
6. Bei jedem Assay muss der Prozentsatz des gesamten gebundenen Tracers ohne unmarkiertes 17OH (B₀/T) geprüft werden.

XII. TYPISCHE WERTE

Die folgenden Daten dienen nur zu Demonstrationszwecken und können nicht als Ersatz für die Echtzeitkalibrationskurve verwendet werden.

17OH-RIA-CT		cpm	B/Bo (%)
Gesamtaktivität		48579	
Kalibrator	0,00 ng/ml	19831	100,0
	0,15 ng/ml	15587	78,6
	0,53 ng/ml	10398	52,4
	1,02 ng/ml	7074	35,7
	3,10 ng/ml	2930	14,8
	11,10 ng/ml	1028	5,2

XIII. LEISTUNGSMERKMALE UND GRENZEN DER METHODIK

A. Nachweisgrenze

Zwanzig Null-Kalibratoren wurden zusammen mit einem Satz anderer Kalibratoren gemessen.

Die Nachweisgrenze, definiert als die scheinbare Konzentration bei zwei Standardabweichungen unterhalb des gemessenen Durchschnittswerts bei Nullbindung, entsprach 0,02 ng/ml.

B. Spezifität

Die Spezifität wurde bestimmt, indem Steroide, die in Patientenproben vorkommen könnten, zu einem Pool von 17OH-Proben ($\pm 0,5$ ng/ml) hinzugefügt wurden.

Substanz	Zugeg. Menge (ng/ml)	Kreuzreaktivität (%)
17OH-Progesteron	-	100
Progesteron	500	0,7
17- α -Hydroxypregnenolon	1000	0,3
21-Deoxycortisol	1000	0,5
Pregnenolon	500	0,022
11-Deoxycortisol	500	0,5
Corticosteron	500	ND
11-Deoxycorticosteron	500	0,035
Cortisol	2500	0,008
Testosteron	5000	ND
Androstendion	5000	0,001
Östradiol	5000	0,001

C. Präzision

INTRA-ASSAY PRÄZISION

INTER-ASSAY PRÄZISION

Serum	N	<X> \pm SD (ng/ml)	CV (%)	Serum	N	<X> \pm SD (ng/ml)	CV (%)
A	10	0,43 \pm 0,03	6,2	A	20	0,77 \pm 0,07	9,2
B	10	2,35 \pm 0,13	5,6	B	20	1,97 \pm 0,10	5,2
C	10	7,55 \pm 0,38	5,1				

SD : Standardabweichung; CV: Variationskoeffizient

D. Genauigkeit

VERDÜNNUNGSTEST

Probe	Verdünnung	Theoretische Konz. (ng/ml)	Gemessene Konz. (ng/ml)
1	1/1	-	3,83
	1/2	1,92	2,16
	1/4	0,96	1,13
	1/8	0,48	0,53
	1/16	0,24	0,25
2	1/1	-	6,65
	1/2	3,33	3,32
	1/4	1,66	2,12
	1/8	0,83	0,88
	1/16	0,42	0,39

Die Proben wurden mit Null-Kalibrator verdünnt.

WIEDERFINDUNGSTEST

Probe	Zugeg. 17OH (ng/ml)	Wiedergef. 17OH (ng/ml)	Wiedergefunden (%)
1	6,65	6,10	92
	5,17	4,32	84
	2,93	2,69	92
	1,25	1,22	98
	0,92	0,87	95
2	7,37	7,23	98
	5,90	5,78	98
	3,60	3,57	99
	2,01	2,14	107
	1,69	1,65	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.

Referenzmethode: Der Assay an 50 Patientenserumproben (Werte von 0,3 ng/ml bis 10,0 ng/ml) wurde mit der tritiierten Referenzmethode durchgeführt. Die lineare Regressionsanalyse ist recht gut.

17OH-RIA-CT = 0,99 (3 H Referenz) + 0,06 ng/ml $r = 0,96$

E. Zeitverzögerung zwischen letzter Kalibrator- und Probenzugabe

Es wird im folgenden gezeigt, dass die Genauigkeit der Tests selbst dann gewährleistet ist, wenn die Probe 36 Minuten nach Zugabe des Kalibrators in die beschichteten Röhrchen zugegeben wird.

ZEITABSTAND

Serum (ng/ml)	0'	12'	24'	36'
Serum 1	0,50	0,58	0,56	0,56
Serum 2	0,86	0,86	0,93	0,83
Serum 3	1,22	1,25	1,24	1,26
Serum 4	1,86	1,90	1,93	1,93
Serum 5	3,29	3,70	3,46	3,48
Serum 6	4,52	4,76	5,18	4,65

XIV. INTERNE QUALITÄTSKONTROLLE

- Der Prozentsatz von insgesamt gebundenem Tracer in Abwesenheit von nicht markiertem 17OH (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.

XV. 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 von Personen
Gesunde Männer	0,59 - 3,44	72
Gesunde Frauen		
. Follikelsphase	0,11 - 1,08	48
. Lutealphase	0,95 - 5,00	49
Schwangerschaft		
. 1. Trimester	2,50 - 9,78	43
. 2. Trimester	3,40 - 8,50	31
. 3. Trimester	4,53 - 18,86	35

XV. VORSICHTSMASSNAHMEN UND WARNUNGEN

Sicherheit

Nur für diagnostische Zwecke.

Dieser Kit enthält ¹²⁵I (Halbwertszeit: 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 Laborausstattung 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 Abflurohren reagieren und so hochexplosive Metallazide bilden. Spülen Sie während der Waschschrte 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.

XVII. 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 Endocrinology 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.

XVIII. ZUSAMMENFASSUNG DES PROTOKOLLS

	GESAMT-AKTIVITÄT (µl)	KALIBRATOREN (µl)	PROBE(N)-KONTROLLEN (µl)
Kalibratoren (0 to 5)	-	25	-
Proben, Kontrollen	-	-	25
Tracer	500	500	500
Inkubation	3 Std. bei 37°C		
Separation	-	absaugen	
Waschlösung	-	3,0 ml	
Separation	-	absaugen	
Auswertung	Messen der Röhren 60 Sekunden		

DIAsource Katalognummer : KIP1409	Beipackzettelnnummer : 1700475/de	Nummer der Originalausgabe : 110217/1
--------------------------------------	--------------------------------------	--

Revisionsdatum : 2011-02-17

Lees het hele protocol vóór gebruik.

17OH-RIA-CT

I. *BEOOGD GEBRUIK*

Radioimmunoassay voor de kwantitatieve bepaling *in vitro* van menselijk 17- α -hydroxyprogesteron (17OH) in serum en plasma.

II. *ALGEMENE INFORMATIE*

- A. **Gedeponeerd handelsmerk:** DIAsource 17OH-RIA-CT kit
- B. **Catalogusnummer:** KIP1409: 96 testen.
- C. **Geproduceerd door:** DIAsource ImmunoAssays S.A.
Rue du Bosquet, 2, B-1348 Louvain-la-Neuve, België.

Voor technische assistentie of voor bestelinformatie
kunt u contact opnemen met :

Tel: +32 (0)10 84.99.11

Fax: +32 (0)10 84.99.90

III. *KLINISCHE ACHTERGROND*

A. *Biologische activiteiten van 17- α -hydroxyprogesteron*

17- α -hydroxyprogesteron (17OH) is een C-21 steroïde hormoon (moleculair gewicht 330.3 Da) dat wordt geproduceerd van 17- α -hydroxypregnenolone in de bijnieren en ook in de eierstokken, testes en placenta. 17OH wordt gehydroxyleerd bij 11 en 21 posities om cortisol te produceren via 11-deoxycortisol.

B. *Klinische toepassingen van 17- α -hydroxyprogesteron-determinatie*


In de regel zijn 17 OH bepalingen in serum of amniotisch vocht, relevant voor de diagnose van congenitale adrenale hyperplasie (CAH). Deze CAH is te wijten aan een specifiek enzymdefect (zes verschillende enzymdeficiënties zijn beschreven). Ten gevolge deze deficiënties verhoogt ACTH en veroorzaakt adrenale hyperplasie en de bevordering van vele steroïdeprecursoren. Maar het is ook interessant de waarde van 17OH te kennen in patiënten met varicocele (17OH en testosteron stellen merkers van de Leydig-celfunctie voor) en in ouder wordende mannelijke patiënten om goedaardige prostaathypertrofie (BPH) en prostaatcarcinoom (PCA) te detecteren (plasma 17OH is beduidend lager in PCA and BPH-groepen dan bij normale mannen).

Er zijn andere domeinen voor 17OH-onderzoeken zoals: mannelijke onvruchtbaarheid, meisjes met peripubere virilizatie, kinderen met premature adrenarche (in deze gevallen zijn de waarden van 17OH verhoogd zonder of na ACTH-stimulatie).

IV. BESCHRIJVING VAN DE METHODE

Een vaste hoeveelheid ^{125}I gelabeld 17OH concurreert met 170H dat bepaald moet worden en aanwezig is in het monster of in de kalibrator voor een vast aantal plaatsen met antilichamen die geïmmobiliseerd zijn aan de wand van een buisje van polystyreen. Vanwege de hoge specificiteit van de gecoate antilichamen is er geen extractie of chromatografie vereist. Na een incubatieperiode van 3 uur bij 37°C wordt de concurrentiereactie beëindigd door een aspiratiefase. Daarna worden de buisjes gewassen met 3 ml werk-wasoplossing en opnieuw afgezogen. Een kalibratiecurve wordt uitgezet en de concentraties van 17OH van de monsters worden bepaald door dosisinterpolatie van de kalibratiecurve.

V. GELEVERDE REAGENTIA

Reagens	Kit voor 96 testen	Kleur-code	Reconstitutie			
 Buisjes gecoate met anti 17OH	2 x 48	paars	Klaar voor gebruik			
<table border="1"><tr><td>Ag</td><td>^{125}I</td></tr></table> Tracer: 17OH gelabeld met ^{125}I -jood (HPLC-kwaliteit) in fosfaat / citroenzuur buffer met bovendien serum albumine en azide (< 0,1%)	Ag	^{125}I	1 flacon 55 ml 190 kBq	rood	Klaar voor gebruik	
Ag	^{125}I					
<table border="1"><tr><td>CAL</td><td>0</td></tr></table> Nulkalibrator: Humaan serum met azide (0,5%)	CAL	0	1 flacon, 3 ml	geel	Klaar voor gebruik	
CAL	0					
<table border="1"><tr><td>CAL</td><td>N</td></tr></table> Kalibrators 17OH: N = 1 tot 5 (zie de exacte waarden op de flaconetiketten) in humaan serum met azide (0,5%)	CAL	N	5 flacons, 0,5 ml	geel	Klaar voor gebruik	
CAL	N					
<table border="1"><tr><td>WASH</td><td>SOLN</td><td>CONC</td></tr></table> Wasoplossing 70x: TRIS-HCl	WASH	SOLN	CONC	1 flacon 10 ml	bruin	70x met gedistilleerd water verdunnen (gebruik een magnetische roerder)
WASH	SOLN	CONC				
<table border="1"><tr><td>CONTR</td><td>N</td></tr></table> Controles: N = 1 of 2 in humaan serum met thymol	CONTR	N	2 flacons, gevries-droogd	zilver	0,5 ml gedistilleerd water toevoegen	
CONTR	N					

Opmerking: Gebruik Nulkalibrator voor monsterverdunningen.

VI. NIET MEEGELEVERDE MATERIALEN

De volgende materialen zijn noodzakelijk maar worden niet meegeleverd met de kit:

1. Gedistilleerd water.
2. Pipetten voor een volume van 25 μl , 500 μl en 3 ml (het gebruik van nauwkeurige pipetten met plastic wegwerptips wordt aanbevolen).
3. Vortexmenger.
4. Magnetische roerder.
5. Waterbad op 37°C
6. Automatische spuit van 5 ml (type Cornwall) voor de wasfase.
7. Afzuigsysteem (facultatief).
8. Een gammateller die geschikt is voor de bepaling van ^{125}I . Een maximale tel-efficiëntie moet worden gegarandeerd.

VII. BEREIDING VAN HET REAGENS

- A. **Controles:** Reconstitueer de controles met 0,5 ml gedistilleerd water.
- B. **Werk-wasoplossing:** Bereid een voldoende hoeveelheid werk-wasoplossing door 69 eenheden gedistilleerd water toe te voegen aan 1 eenheid wasoplossing. Gebruik een magnetische roerder voor de homogenisering. Op het eind van de dag moet de ongebruikte werk-wasoplossing afgevoerd worden.

VIII. OPSLAG EN VERVALDATUM VAN REAGENTIA

- Vóór opening of reconstitutie zijn alle kitcomponenten houdbaar tot de vervaldatum, zoals vermeld op het etiket, indien zij bewaard werden bij 2 tot 8°C .
- Na reconstitutie zijn de controles gedurende één week houdbaar bij 2 tot 8°C . Voor een langere bewaartermijn moeten aliquots gemaakt worden, die bij -20°C bewaard moeten worden gedurende maximaal 3 maanden.

- Een vers bereide werk-wasoplossing moet op dezelfde dag nog gebruikt worden.
- **Na het eerste gebruik is de tracer houdbaar tot de vervaldatum, indien bewaard bij 2 tot 8°C in de oorspronkelijke, goed afgesloten flacon.**
- Wijzigingen in het fysieke aspect van kitreagentia kunnen wijzen op instabiliteit of op een kwaliteitsvermindering.

IX. MONSTERAFFNAME EN MONSTERBEREIDING

- Serum- of plasmamonsters moeten bij $2-8^\circ\text{C}$ bewaard worden.
- Indien de bepaling niet binnen 48 uur uitgevoerd wordt, dan wordt aanbevolen om ze bij -20°C te bewaren.
- Vermijd herhaalde invriezing en ontdooiing.
- Gehepariniseerd plasma en serum leveren vergelijkbare resultaten op (vermijd citraatstalen)
 $Y(\text{Serum}) = 0,92 \times (\text{hep. plasma}) + 0,10 \quad r = 1,0 \quad n = 18$
- EDTA-plasma geeft resultaten die 15% lager liggen dan die van serum:
 $Y(\text{Serum}) = 1,16 \times (\text{EDTA plasma}) - 0,10 \quad r = 0,99 \quad n = 18$

X. PROCEDURE

A. Opmerkingen bij de procedure

Gebruik de kit of de componenten niet langer dan de aangegeven vervaldatum. Materialen van kits van verschillende loten mogen niet gemengd worden. Laat alle reagentia op kamertemperatuur komen vóór gebruik.

Meng alle reagentia en monsters goed door ze voorzichtig te bewegen of door er voorzichtig mee te draaien. Om kruisbesmetting te vermijden, moet een propere wegwerpbare pipettip gebruikt worden voor toevoeging van elk reagens en monster.

Pipetten met een grote precisie of geautomatiseerde pipetteerapparatuur zullen de precisie verhogen. Respecteer de incubatietijden.

Bereid een kalibratiecurve voor elke run; men mag geen gegevens gebruiken van voorafgaande runs.

B. Procedure

1. Etiketteer de gecoate buisjes in duplo voor elke kalibrator, voor elk monster, voor elke controle. Etiketteer 2 normale buisjes voor de bepaling van de totaal tellingen.
2. Vortex de kalibrators, monsters en controles gedurende korte tijd en pipetteer 25 μl van elk in het desbetreffende buisje.
3. Pipetteer 0,5 ml 170H dat met ^{125}I gelabeld werd in elk buisje, inclusief de niet gecoate buisjes voor de totaal tellingen.
4. Schud het rek met de buisjes voorzichtig zodat eventuele ingesloten luchtballen vrijkomen.
5. Incubeer gedurende 3 uur bij 37°C .
6. Zuig de inhoud van elk buisje (met uitzondering van de totaal tellingen) op. Zorg ervoor dat de plastic tip van de aspirator tot aan de bodem van het gecoate buisje komt zodat alle vloeistof verwijderd wordt.
7. Was de buisjes met 3 ml werk-wasvloeistof (met uitzondering van de totaal tellingen) en zuig op. Vermijd schuimvorming tijdens toevoeging van de werk-wasvloeistof.
8. Na de wasfase moeten de buisjes gedurende twee minuten rechtop blijven staan en zuig daarna de overblijvende vloeistof op.
9. Tel de buisjes in een gammateller gedurende 60 seconden.

XI. BEREKENING VAN DE RESULTATEN

1. Bereken het gemiddelde voor de bepalingen in duplo.
2. Bereken het percentage binding van de gebonden radioactiviteit, bepaald op het punt van de nulkalibrator (0), aan de hand van de volgende formule:

$$B/B_0 (\%) = \frac{\text{cpm (Kalibrator of monster)}}{\text{cpm (Nulkalibrator)}} \times 100$$

3. Zet de (B/B₀(%)) waarden uit voor elk kalibratorpunt, als een functie van de 170H concentratie van elk kalibratorpunt, op 3-cyclisch semi-logaritmisch of dubbellogaritmisch papier, verwerp hierbij de duidelijke uitschieters.
4. Ook computergestuurde methoden kunnen worden gebruikt om de kalibratiecurve te vormen. Indien de resultaten automatisch verwerkt worden, wordt de 4 parameter logistische functie aanbevolen voor de gepaste curve.
5. Bepaal de 170H concentraties van de monsters uit de referentiecurve door de monsterwaarden (B/B₀(%)) te interpoleren.
6. Voor elke bepaling moet het totaalpercentage van de tracer, gebonden in afwezigheid van ongelabeld 170H (B₀/T), gecontroleerd worden.

XII. KENMERKENDE GEGEVENS

De volgende gegevens dienen enkel ter illustratie en mogen in geen geval gebruikt worden ter vervanging van de real time kalibratiecurve.

17OH-RIA-CT		cpm	B/Bo (%)
Totaaltelling		48579	
Kalibrator	0,00 ng/ml	19831	100,0
	0,15 ng/ml	15587	78,6
	0,53 ng/ml	10398	52,4
	1,02 ng/ml	7074	35,7
	3,10 ng/ml	2930	14,8
	11,10 ng/ml	1028	5,2

XIII. EIGENSCHAPPEN EN GRENZEN

A. Detectielimiet

Twintig nulkalibrators werden bepaald, samen met de serie andere kalibrators. De detectielimiet, omschreven als de schijnbare concentratie van twee standaarddeviaties onder de gemiddelde tellingen bij nulbinding, bedroeg 0,02 ng/ml.

B. Specificiteit

De specificiteit werd geschat door steroïden die aanwezig kunnen zijn in monsters van patiënten toe te voegen aan een pool van 17OH-stalen (± 0.5 ng/ml).

Bestanddeel	Toegevoegde hoeveelheid (ng/ml)	Kruisreactiviteit (%)
17OH-Progesteron	-	100
Progesteron	500	0,7
17- α -hydroxypregnenolone	1000	0,3
21-deoxycortisol	1000	0,5
Pregnenolone	500	0,022
11-deoxycortisol	500	0,5
Corticosteron	500	ND
11-deoxycorticosterone	500	0,035
Cortisol	2500	0,008
Testosteron	5000	ND
Androstenedione	5000	0,001
Estradiol	5000	0,001

C. Precisie

PRECISIE BINNEN EEN TEST

PRECISIE TUSSEN TESTEN

Serum	N	<X> \pm SD (ng/ml)	VC (%)	Serum	N	<X> \pm SD (ng/ml)	VC (%)
A	10	0,43 \pm 0,03	6,2	A	20	0,77 \pm 0,07	9,2
B	10	2,35 \pm 0,13	5,6	B	20	1,97 \pm 0,10	5,2
C	10	7,55 \pm 0,38	5,1				

SD: standaarddeviatie; VC: variatiecoëfficiënt

D. Nauwkeurigheid

VERDUNNINGSTEST

Monster	Verdunning	Theoretische concentratie (ng/ml)	Concentratie die bepaald werd (ng/ml)
1	1/1	-	3,83
	1/2	1,92	2,16
	1/4	0,96	1,13
	1/8	0,48	0,53
	1/16	0,24	0,25
2	1/1	-	6,65
	1/2	3,33	3,32
	1/4	1,66	2,12
	1/8	0,83	0,88
	1/16	0,42	0,39

Monsters werden verdund met de nulkalibrator.

RECOVERY-TEST

Monster	17OH toegevoegd (ng/ml)	Recovery van 17OH (ng/ml)	Recovery (%)
1	6,65	6,10	92
	5,17	4,32	84
	2,93	2,69	92
	1,25	1,22	98
	0,92	0,87	95
2	7,37	7,23	98
	5,90	5,78	98
	3,60	3,57	99
	2,01	2,14	107
	1,69	1,65	98

Conversiefactor :

Van ng/ml naar nmol/L : x 3,03

Van nmol/L naar ng/ml : x 0,33

Naar ons beste weten bestaat er geen internationaal referentiemateriaal voor deze parameter.

Referentiemethode: 50 serummonsters van patiënten (waarden van 0,3 ng/ml tot 10,0 ng/ml) werden getest met de getritieerde referentiemethode. De lineaire regressie analyse is behoorlijk goed.

17OH-RIA-CT = 0,99 (3 H referentie) + 0,06 ng/ml $r = 0,96$

E. Tijd tussen de laatste kalibrator en distributie van het monster

Zoals hieronder weergegeven wordt, blijven de resultaten van de bepaling nauwkeurig, zelfs wanneer een monster 36 minuten na toevoeging van de kalibrator in de gecoate buisjes gepipetteerd wordt.

TIJDSPANNE

Serum (ng/ml)	0'	12'	24'	36'
Serum 1	0,50	0,58	0,56	0,56
Serum 2	0,86	0,86	0,93	0,83
Serum 3	1,22	1,25	1,24	1,26
Serum 4	1,86	1,90	1,93	1,93
Serum 5	3,29	3,70	3,46	3,48
Serum 6	4,52	4,76	5,18	4,65

XIV. INTERNE KWALITEITSCONTROLE

- Het percentage totale tracer gebonden in de afwezigheid van ongelabelde 17OH (B0/T) moet $> 25\%$ zijn.
- Indien de resultaten, die verkregen werden voor controle 1 en/of controle 2, niet binnen het bereik vallen zoals vermeld op het flaconetiket, dan mogen de resultaten niet gebruikt worden tenzij een bevredigende uitleg gegeven wordt voor de discrepantie.
- Indien gewenst, kan elk laboratorium zijn eigen pools voor controlemonsters maken, die dan in aliquots bewaard moeten worden in de diepvriezer. Gelieve niet meer dan twee keer in te vriezen en te ontdooien.
- Aanvaardingscriteria voor het verschil tussen de resultaten in duplo van monsters moeten steunen op gangbare laboratoriumpraktijken.

XV. REFERENTIE-INTERVALS

Deze waarden worden slechts als leidraad gegeven; elk laboratorium moet zijn eigen normaal bereik van waarden uitmaken.

	Concentratiebereik (2.5 tot 97.5% percentielen) (ng/ml)	Aantal subjecten
Normale mannen	0,59 – 3,44	72
Normale vrouwen		
· Folliculaire fase	0,11 – 1,08	48
· Luteale fase	0,95 – 5,00	49
Zwangerschap		
· Eerste trimester	2,50 – 9,78	43
· Tweede trimester	3,40 – 8,50	31
· Derde trimester	4,53 – 18,86	35

XVI. VOORZORGSMAATREGELEN EN WAARSCHUWINGEN

Veiligheid

Uitsluitend voor in vitro diagnostisch gebruik.

Deze kit bevat ¹²⁵I (halfwaardetijd: 60 dagen), dat ioniserende X- (28 keV) en γ -stralen (35.5 keV) uitzendt.

Dit radioactieve product mag enkel overhandigd worden aan en gebruikt worden door bevoegd personeel; ontvangst, opslag, gebruik en overdracht van radioactieve producten zijn onderworpen aan de wetgeving van het land van de eindgebruiker. In geen geval mag het product toegediend worden aan mensen of dieren.

Alle handelingen met radioactief materiaal moeten plaatsvinden in een daartoe bestemde ruimte, waar uitsluitend bevoegd personeel toegelaten wordt. Een logboek met ontvangst en opslag van radioactieve materialen moet worden bijgehouden in het laboratorium. Laboratoriumapparatuur en glaswerk, dat eventueel gecontamineerd werd met radioactieve bestanddelen, moeten worden gesegregeerd om kruisbesmetting van verschillende radioisotopen te vermijden.

Als radioactief materiaal gemorst werd, dan moet dat onmiddellijk gereinigd worden in overeenstemming met de procedure voor stralingsveiligheid. Het radioactieve afval moet worden weggegooid in overeenstemming met de plaatselijke voorschriften en richtlijnen van de autoriteiten waaronder het laboratorium valt. Naleving van de basisregels van stralingsveiligheid zorgt voor een juiste bescherming.

De componenten, afkomstig van menselijk bloed, in deze kit werden getest door in Europa goedgekeurde en/of door de Amerikaanse FDA goedgekeurde methoden op aanwezigheid van HBsAg, anti-HCV, anti-HIV-1 en 2 en gaven een negatief resultaat. Geen enkele bekende methode kan echter volledige garantie bieden dat derivaten van menselijk bloed geen hepatitis, aids of andere infecties overdragen. Daarom moet men reagentia, serum- of plasmamonsers behandelen in overeenstemming met de plaatselijke veiligheidsprocedures.

Alle producten en derivaten van dierlijke oorsprong zijn afkomstig van gezonde dieren. Boviene componenten komen uit landen waar BSE niet gerapporteerd werd. Toch moeten componenten die bestanddelen van dierlijke oorsprong bevatten, behandeld worden als potentieel besmettelijk.

Vermijd dat de reagentia (natriumazide als conserveermiddel) in contact komen met de huid. Azide in deze kit kan reageren met lood en koper in de afvoerleidingen en op die manier zeer explosieve metaalaziden vormen. Tijdens de wasfase moeten de afvoerleidingen ruimschoots met water nagespoeld worden om ophoping van azide te vermijden.

Niet roken, drinken, eten of cosmetica aanbrengen in de werkruimte. Niet met de mond pipetteren. Draag beschermende kleding en gebruik wegwerphandschoenen.

XVII. BIBLIOGRAFIE

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 Endocrinology 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.

XVIII. SAMENVATTING VAN HET PROTOCOL

	TOTAAL-TELLINGEN (μ l)	KALIBRATORS (μ l)	MONSTER(S) CONTROLES (μ l)
Kalibrators (0 tot 5)	-	25	-
Monsters, controles	-	-	25
Tracer	500	500	500
Incubatie	3 uur bij 37°C		
Scheiding Werk-wasoplossing Scheiding	-	opzuigen 3,0 ml opzuigen	
Telling	Tel buisjes gedurende 60 seconden		

DIAsource catalogusnummer: KIP1409	Bijsluiternummer : 1700475/nl	Revisienummer : 110217/1
---------------------------------------	----------------------------------	-----------------------------

Revisiedatum : 2011-02-17



Leer el protocolo completo antes de usar.

17OH-RIA-CT

I. INSTRUCCIONES DE USO

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

II. INFORMACIÓN GENERAL

- A. **Nombre:** DIAsource 17OH-RIA-CT Kit
- B. **Número de Catálogo:** KIP1409 : 96 test
- C. **Fabricado por:** DIAsource ImmunoAssays S.A.
Rue du Bosquet, 2, B-1348 Louvain-la-Neuve, Belgium.

Para cuestiones técnicas y información sobre pedidos contactar:
Tel: +32 (0) 10 84.99.11 Fax: +32 (0) 10 84.99.90

III. INFORMACIÓN CLÍNICA

A. *Actividades biológicas de 17- α -hidroxiprogesterona*

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

B. *Aplicaciones clínicas de la determinación de 17- α -hidroxiprogesterona*


Por lo general las dosis de líquido amniótico 17OH 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 17OH en pacientes con varicocele (17OH 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 17OH es considerablemente más bajo en grupos con PCA y BPH que en hombres normales).

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

IV. PRINCIPIOS DEL MÉTODO

Una cantidad fija de 17OH marcada con I^{125} compete con el 17OH 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 17OH de las muestras se determinan por interpolación de la dosis en la curva de calibración.

V. REACTIVOS SUMINISTRADOS

Reactivos	Kit 96 test	Código de Color	Reconstitución			
 Tubos recubiertos con anti 17OH	2 x 48	púrpura	Listo para uso			
<table border="1" data-bbox="119 616 255 660"> <tr> <td>Ag</td> <td>I^{125}</td> </tr> </table> TRAZADOR: 17OH marcado con I^{125} (grado HPLC) en tampón fosfato / ácido cítrico con albúmina bovina y azida (<0,1%)	Ag	I^{125}	1 vial 55 ml 190 kBq	rojo	Listo para uso	
Ag	I^{125}					
<table border="1" data-bbox="119 795 255 840"> <tr> <td>CAL</td> <td>0</td> </tr> </table> Calibrador cero en suero humano y azida (0,5%)	CAL	0	1 vial 3 ml	amarillo	Listo para uso	
CAL	0					
<table border="1" data-bbox="119 918 255 963"> <tr> <td>CAL</td> <td>N</td> </tr> </table> Calibradores 17OH - N = 1 al 5 (mirar los valores exactos en las etiquetas) en suero humano y azida (0,5%)	CAL	N	5 viales 0,5 ml	amarillo	Listo para uso	
CAL	N					
<table border="1" data-bbox="71 1086 343 1131"> <tr> <td>WASH</td> <td>SOLN</td> <td>CONC</td> </tr> </table> Solución de lavado (TRIS-HCl)	WASH	SOLN	CONC	1 vial 10 ml	marrón	Diluir 70 x con agua destilada (utilizar agitador magnético)
WASH	SOLN	CONC				
<table border="1" data-bbox="87 1220 263 1265"> <tr> <td>CONTROL</td> <td>N</td> </tr> </table> Controles - N = 1 o 2 en suero humano y timol	CONTROL	N	2 viales liofilizados	plateado	Añadir 0,5 ml de agua destilada	
CONTROL	N					

Nota: Para diluciones de muestras utilizar estándar cero

VI. MATERIAL NO SUMINISTRADO

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

1. Agua destilada
2. Pipetas de 25µl, 500µl 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%)

VII. 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.

VIII. 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 2-8°C.
- Después de su reconstitución los controles son estables durante una semana a 2-8°C. Para periodos más largos, alcuotar 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 2-8°C.
- Las alteraciones de los reactivos en el aspecto físico pueden indicar inestabilidad ó deterioro.

IX. RECOGIDA Y PREPARACIÓN DE MUESTRAS

- Las muestras de suero ó plasma deben ser guardadas a 2-8°C.
- Si el ensayo no se realiza en 48 hrs., almacenar las muestras a -20°.
- Evitar congelar y descongelar sucesivamente.
- Suero y muestras heparinizadas dan resultados similares (evitar muestras de citrato)

$$Y (\text{Suero}) = 0,92 \times (\text{hep. plasma}) + 0,10 \quad r = 1,0 \quad n = 18$$
- El uso de plasma en EDTA produce resultados un 15% más bajos que en suero:

$$Y (\text{Suero}) = 1,16 \times (\text{EDTA plasma}) - 0,10 \quad r = 0,99 \quad n = 18$$

X. PROTOCOLO

A. 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.

B. Protocolo

1. Marcar los tubos recubiertos por duplicado para cada uno 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.
3. Dispensar 0,5 ml de 17OH 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 el líquido restante.
9. Medir la actividad de cada tubo durante 60 segundos en un Contador Gamma.

XI. 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:

$$B/B_0(\%) = \frac{\text{Cuentas (Calibrador ó muestra)}}{\text{Cuentas (Calibrador Cero)}} \times 100$$

3. Utilizando papel 3 ciclo semilogarítmico ó logit-log, representar los valores de (B/B₀%) de cada calibrador frente a las concentraciones del 17OH 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. El porcentaje total de enlace del trazador en ausencia de 17OH no marcado (B₀/T) debe ser calculado en cada ensayo.

XII. EJEMPLO DE RESULTADOS

Los datos mostrados a continuación sirven como ejemplo y nunca deberán ser usados como una calibración real.

17OH-RIA-CT	cpm	B/Bo (%)
Cuentas Totales	48579	
Calibrador	0,00 ng/ml	19831
	0,15 ng/ml	15587
	0,53 ng/ml	10398
	1,02 ng/ml	7074
	3,10 ng/ml	2930
	11,10 ng/ml	1028
		100,0
		78,6
		52,4
		35,7
		14,8
		5,2

XIII. REALIZACIÓN Y LIMITACIONES

A. Limite de detección

Veinte calibradores cero fueron medidos en una curva con otros calibradores.

El limite de detección, definido como la concentración aparente resultante de dos desviaciones estándares debajo de la media de enlace del calibrador cero, fue de 0,02 ng/ml.

B. 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 17OH (± 0.5 ng/ml).

Componente	Cantidad añadida (ng/ml)	Reacción-cruzada (%)
17OH-Progesterona	-	100
Progesterona	500	0,7
17- α -hidroxipregnenolona	1000	0,3
21-deoxicortisol	1000	0,5
Pregnenolona	500	0,022
11-deoxicortisol	500	0,5
Corticosterona	500	ND
11-deoxicorticosterona	500	0,035
Cortisol	2500	0,008
Testosterona	5000	ND
Androstenediona	5000	0,001
Estradiol	5000	0,001

C. Precisión

PRECISION INTRA-ENSAYO

PRECISION INTER-ENSAYO

Suero	N	<X> \pm SD (ng/ml)	CV (%)	Suero	N	<X> \pm SD (ng/ml)	CV (%)
A	10	0,43 \pm 0,03	6,2	A	20	0,77 \pm 0,07	9,2
B	10	2,35 \pm 0,13	5,6	B	20	1,97 \pm 0,10	5,2
C	10	7,55 \pm 0,38	5,1				

SD : Desviación Estándar; CV: Coeficiente de Variación

D. Exactitud

TEST DILUCIÓN

Muestra	Dilución	Concent. Teórica (ng/ml)	Concent. Medida (ng/ml)
1	1/1	-	3,83
	1/2	1,92	2,16
	1/4	0,96	1,13
	1/8	0,48	0,53
	1/16	0,24	0,25
2	1/1	-	6,65
	1/2	3,33	3,32
	1/4	1,66	2,12
	1/8	0,83	0,88
	1/16	0,42	0,39

Las muestras fueron diluidas con el calibrador cero.

TEST DE RECUPERACIÓN

Muestra	17OH añadido (ng/ml)	17OH Recuperado (ng/ml)	Recuperado (%)
1	6,65	6,10	92
	5,17	4,32	84
	2,93	2,69	92
	1,25	1,22	98
	0,92	0,87	95
2	7,37	7,23	98
	5,90	5,78	98
	3,60	3,57	99
	2,01	2,14	107
	1,69	1,65	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.

Método de referencia: 50 muestras de suero de pacientes (valores de 0,3 ng/ml hasta 10,0 ng/ml) fueron testadas con el método de referencia trituido. El análisis de regresión lineal es bastante satisfactorio.

17OH-RIA-CT = 0,99 (3 H reference) + 0,06 ng/ml $r = 0,96$

E. 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 36 minutos después de haberse adicionado el calibrador a los tubos cubiertos.

TIEMPO DE ESPERA

Suero (ng/ml)	0'	12'	24'	36'
Suero 1	0,50	0,58	0,56	0,56
Suero 2	0,86	0,86	0,93	0,83
Suero 3	1,22	1,25	1,24	1,26
Suero 4	1,86	1,90	1,93	1,93
Suero 5	3,29	3,70	3,46	3,48
Suero 6	4,52	4,76	5,18	4,65

XIV. CONTROL DE CALIDAD INTERNO

- El porcentaje de trazador total ligado en la ausencia de 17OH no-marcada (BO/T) tiene que ser > 25%.
- Si los resultados obtenidos para el Control 1 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 alcuotas 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.

XV. 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	0,59 – 3,44	72
Mujeres normales		
· Fase folicular	0,11 - 1,08	48
· Fase lútea	0,95 - 5,00	49
Embarazo		
· Primer trimestre	2,50 – 9,78	43
· Segundo trimestre	3,40 – 8,50	31
· Tercer trimestre	4,53 – 18,86	35

XVI. 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/o 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.

XVII. 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 Endocrinology 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.

XVIII. RESUMEN DEL PROTOCOLO

	CUENTAS TOTALES (µl)	CALIBRADO RES (µl)	MUESTRA(S) CONTROL(S) (µl)
Calibradores (0 al 5)	-	25	-
Muestras, controles	-	-	25
Trazador	500	500	500
Incubación	3 horas a 37°C		
Separación	-	aspirar	
Solución de lavado de trabajo	-	3,0 ml	
Separación	-	aspirar	
Contaje	Contar los tubos durante 60 segundos		

DIAsource Catalogo Nr : KIP1409	P.I. Numero : 1700475/es	Revisión nr : 110217/1
------------------------------------	-----------------------------	---------------------------

Fecha de la revisión : 2011-02-17

Prima di utilizzare il kit leggere attentamente le istruzioni per l'uso

17OH-RIA-CT

I. USO DEL KIT

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

II. INFORMAZIONI DI CARATTERE GENERALE

- A. Nome commerciale:** DIASource 17OH-RIA-CT Kit
- B. Numero di catalogo:** KIP1409: 96 test
- C. Prodotto da:** DIASource ImmunoAssays S.A.
Rue du Bosquet, 2, B-1348 Louvain-la-Neuve, Belgio.

Per informazioni tecniche o su come ordinare il prodotto contattare:

Tel: +32 (0) 10 84.99.11

Fax: +32 (0) 10 84.99.90

III. INFORMAZIONI CLINICHE

A Attività biologiche del 17- α -idrossiprogesterone

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

B. Applicazioni cliniche del dosaggio del 17- α -idrossiprogesterone


Di norma, i dosaggi di 17OH 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 17OH nei pazienti affetti da varicocele, (Il 17OH 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 17OH 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 17OH risultano aumentati in assenza o a seguito di una stimolazione con ACTH).

IV. PRINCIPIO DEL METODO

Una quantità definita di 17OH marcata con ¹²⁵I compete con il 17OH 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 17OH nei campioni viene calcolata per interpolazione sulla curva calibratore.

V. REATTIVI FORNITI

Reattivi	Kit da 96 test	Codice colore	Volume di ricostituzione			
 Provette sensibilizzate con anticorpo anti 17OH	2 x 48	viola	Pronte per l'uso			
<table border="1" data-bbox="119 622 252 660"> <tr> <td>Ag</td> <td>¹²⁵I</td> </tr> </table> Marcato: 17OH marcato con ¹²⁵ I (grado HPLC), in tampone di fosfato/acido citrico con BSA e sodio azide (<0,1%)	Ag	¹²⁵ I	1 flacone 55 ml 190 kBq	rosso	Pronte per l'uso	
Ag	¹²⁵ I					
<table border="1" data-bbox="119 772 252 810"> <tr> <td>CAL</td> <td>0</td> </tr> </table> Calibratore zero in siero umano e sodio azide (0,5%)	CAL	0	1 flacone 3 ml	giallo	Pronte per l'uso	
CAL	0					
<table border="1" data-bbox="119 873 252 911"> <tr> <td>CAL</td> <td>N</td> </tr> </table> Calibratore 1-5 di 17OH, (le concentrazioni esatte degli calibratore sono riportate sulle etichette dei flaconi), in siero umano e sodio azide (0,5%)	CAL	N	5 flaconi 0,5 ml	giallo	Pronte per l'uso	
CAL	N					
<table border="1" data-bbox="76 1041 319 1079"> <tr> <td>WASH</td> <td>SOLN</td> <td>CONC</td> </tr> </table> Tampone di lavaggio (TRIS-HCl)	WASH	SOLN	CONC	1 flacone 10 ml	bruno	Diluire 70 x con acqua distillata usando un agitatore magnetico
WASH	SOLN	CONC				
<table border="1" data-bbox="92 1153 303 1191"> <tr> <td>CONTROL</td> <td>N</td> </tr> </table> Controlli: N = 1 o 2, in siero umano e timolo	CONTROL	N	2 flaconi liofilizzati	argento	Aggiungere 0,5 ml di acqua distillata	
CONTROL	N					

Note : Usare lo calibratore zero per diluire i campioni.

VI. 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 ¹²⁵I (efficienza minima 70%)

VII. PREPARAZIONE DEI REATTIVI

- A. **Controlli:** Ricostituire i controlli con 0,5 ml di acqua distillata.
- B. **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.

VIII. CONSERVAZIONE E SCADENZA DEI REATTIVI

- I reattivi non utilizzati sono stabili a 2-8°C fino alla data riportata su ciascuna etichetta.
- Dopo ricostituzione, i controlli sono stabili per 1 settimana a 2-8°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 2-8°C nel flacone originale ben tappato.

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

IX. RACCOLTA E PREPARAZIONE DEI CAMPIONI

- Conservare i campioni di siero o plasma a 2-8°C.
- Se non si desidera eseguire il dosaggio entro 48 ore dal prelievo, si raccomanda di conservare i campioni a -20°C.
- Evitare ripetuti cicli di congelamento-scongelo dei campioni.
- Il siero e il plasma da eparina forniscono gli stessi valori (evitare campioni di citrato)

$$Y(\text{siero}) = 0,92 \times (\text{plasma da eparina}) + 0,10 \quad r = 1,0 \quad n = 18$$
- Il plasma da EDTA fornisce valori mediamente più bassi del 15% rispetto al siero

$$Y(\text{siero}) = 1,16 \times (\text{plasma da EDTA}) - 0,10 \quad r = 0,99 \quad n = 18$$

X. METODO DEL DOSAGGIO

A. 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 cross-contaminazioni, cambiare il puntale della pipetta ogni volta che si usi 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.

B. 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.
3. Dispensare 500 µl di 17OH marcato con ¹²⁵I 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.

XI. 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).

$$B/B_0 (\%) = \frac{\text{cpm}(\text{Calibratore, campioni o controlli})}{\text{cpm}(\text{Zero Calibratore})} \times 100$$

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. Per ogni dosaggio determinare la capacità legante B0/T.

XII. CARATTERISTICHE TIPICHE

I sotto riportati sono forniti a titolo di esempio e non devono essere utilizzati per calcolare le concentrazioni di 17OH in campioni e controlli al posto della curva calibratore eseguita contemporaneamente.

17OH-RIA-CT		cpm	B/Bo (%)
Attività totale		48579	
Calibratore	0,00 ng/ml	19831	100,0
	0,15 ng/ml	15587	78,6
	0,53 ng/ml	10398	52,4
	1,02 ng/ml	7074	35,7
	3,10 ng/ml	2930	14,8
	11,10 ng/ml	1028	5,2

XIII. CARATTERISTICHE E LIMITI DEL METODO

A. Sensibilità

La sensibilità, calcolata come concentrazione apparente di un campione con cpm pari alla media meno 2 deviazioni calibratore di 20 replicati dello calibratore zero, è risultata essere 0,02 ng/ml.

B. Specificità

La specificità è stata calcolata aggiungendo a un pool di campioni di 17OH ($\pm 0,5$ ng/ml) gli steroidi che potrebbero essere presenti nei campioni del paziente.

Composto	Quantitativo aggiunto (ng/ml)	Cross-Reattività (%)
17OH-progesterone	-	100
Progesterone	500	0,7
17- α -idrossipregnenolone	1000	0,3
21-deossicortisolo	1000	0,5
Pregnenolone	500	0,022
11-deossicortisolo	500	0,5
Corticosterone	500	ND
11-deossicorticosterone	500	0,035
Cortisolo	2500	0,008
Testosterone	5000	ND
Androstenedione	5000	0,001
Estradiolo	5000	0,001

C. Precisione

INTRA SAGGIO

INTER SAGGIO

Siero	N	<X> \pm SD (ng/ml)	CV (%)	Siero	N	<X> \pm SD (ng/ml)	CV (%)
A	10	0,43 \pm 0,03	6,2	A	20	0,77 \pm 0,07	9,2
B	10	2,35 \pm 0,13	5,6	B	20	1,97 \pm 0,10	5,2
C	10	7,55 \pm 0,38	5,1				

SD : Deviazione Standard; CV: Coefficiente di Variazione

D. Accuratezza

TEST DI DILUIZIONE

Campione	Diluizione	Concentrazione teorica (ng/ml)	Concentrazione misurata (ng/ml)
1	1/1	-	3,83
	1/2	1,92	2,16
	1/4	0,96	1,13
	1/8	0,48	0,53
	1/16	0,24	0,25
2	1/1	-	6,65
	1/2	3,33	3,32
	1/4	1,66	2,12
	1/8	0,83	0,88
	1/16	0,42	0,39

I campioni sono stati diluiti con calibratore zero.

TEST DI RECUPERO

Campione	17OH aggiunto (ng/ml)	17OH recuperato (ng/ml)	Recupero (%)
1	6,65	6,10	92
	5,17	4,32	84
	2,93	2,69	92
	1,25	1,22	98
	0,92	0,87	95
2	7,37	7,23	98
	5,90	5,78	98
	3,60	3,57	99
	2,01	2,14	107
	1,69	1,65	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.

Metodo di riferimento: 50 campioni di siero del paziente (valori compresi tra 0,3 ng/ml e 10,0 ng/ml) sono stati dosati insieme al metodo di riferimento con trizio. L'analisi della regressione lineare risulta piuttosto soddisfacente.

17OH-RIA-CT = 0,99 (3 H riferimento) + 0,06 ng/ml $r = 0,96$

E. 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 36 minuti dopo l'aggiunta del calibratore.

TEMPO TRASCORSO

Siero (ng/ml)	0'	12'	24'	36'
Siero 1	0,50	0,58	0,56	0,56
Siero 2	0,86	0,86	0,93	0,83
Siero 3	1,22	1,25	1,24	1,26
Siero 4	1,86	1,90	1,93	1,93
Siero 5	3,29	3,70	3,46	3,48
Siero 6	4,52	4,76	5,18	4,65

XIV. 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.

XV. 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	0,59 – 3,44	72
Femmine normali		
· Fase follicolare	0,11 - 1,08	48
· Fase luteinica	0,95 - 5,00	49
Gravidanza		
· Primo trimestre	2,50 – 9,78	43
· Secondo trimestre	3,40 – 8,50	31
· Terzo trimestre	4,53 – 18,86	35

XVI. PRECAUZIONI PER L'USO

Sicurezza

Il kit è solo per uso diagnostico in vitro.

Il kit contiene ¹²⁵I (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 azide come conservante. La sodio azide può reagire con piombo rame o ottone presenti nelle tubature di scarico per formare metallo-azidi esplosive. 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.

XVII. 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 Endocrinology 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.

XVIII. SCHEMA DEL DOSAGGIO

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

Numero di catalogo di DIAsource : KIP1409	P.I. numero : 1700475/it	Revisione numero : 110217/1
--	-----------------------------	--------------------------------

Data di revisione : 2011-02-17



el

Διαβάστε ολόκληρο το πρωτόκολλο πριν από τη χρήση.

17OH-RIA-CT

I. ΧΡΗΣΗ ΓΙΑ ΤΗΝ ΟΠΟΙΑ ΠΡΟΟΡΙΖΕΤΑΙ

Ραδιοανοσοπροσδιορισμός για την *in vitro* ποσοτική μέτρηση της ανθρώπινης 17-α-υδροξυπρογεστερόνης (17OH) στον ορό και το πλάσμα.

II. ΓΕΝΙΚΕΣ ΠΛΗΡΟΦΟΡΙΕΣ

- A. **Εμπορική ονομασία:** Κιτ 17OH-RIA-CT της DIAsource
- B. **Αριθμός καταλόγου:** KIP1409: 96 προσδιορισμοί
- Γ. **Κατασκευάζεται από την:** DIAsource ImmunoAssays S.A.
Rue du Bosquet, 2, B-1348 Louvain-la-Neuve, Belgium.

Για τεχνική βοήθεια ή πληροφορίες σχετικά με παραγγελίες επικοινωνήστε στα:
Τηλ.: +32 (0)10 84.99.11 Φαξ: +32 (0)10 84.99.90

III. ΚΛΙΝΙΚΟ ΥΠΟΒΑΘΡΟ

A. Βιολογική έξ δράση της 17-α-υδροξυπρογεστερόνης

Η 17-α-υδροξυπρογεστερόνη (17OH) είναι μια C-21 στεροειδής ορμόνη (μοριακό βάρος 330,3), η οποία παράγεται από την 17-α-υδροξυ πρεγνενολόνη στα επινεφρίδια και επίσης στις ωθήκες, τους όρχεις και τον πλακούντα. Η 17OH υδροξυλιώνεται στις θέσεις 11 και 21 για την παραγωγή κορτιζόλης μέσω της 11-δεοξυκορτιζόλης.

B. Κλινικές εφαρμογές του προσδιορισμού της 17-α-υδροξυπρογεστερόνης


Κατά κανόνα, ο προσδιορισμός της 17OH στον ορό ή το αμνιακό υγρό είναι σχετικός με τη διάγνωση της συγγενούς υπερπλασίας των επινεφριδίων (CAH). Η CAH οφείλεται στην έλλειψη ενός ειδικού ενζύμου (έχουν περιγραφεί έξι διακριτές ενζυμικές ανεπάρκειες). Ως αποτέλεσμα των ανεπαρκειών αυτών, η ACTH αυξάνεται και προκαλεί υπερπλασία των επινεφριδίων, καθώς και αύξηση πολλών στεροειδών προδρόμων. Αλλά είναι επίσης πολύ ενδιαφέρον να γνωρίζουμε την τιμή της 17OH σε ασθενείς με κισσοκήλη (η 17OH και η τεστοστερόνη αποτελούν δείκτες της λειτουργίας των κυττάρων Leydig) και σε ηλικιωμένους άνδρες ασθενείς για την ανίχνευση της καλοήθους υπερτροφίας του προστάτη (BPH) και του καρκινώματος του προστάτη (PCA) (η 17OH στο πλάσμα είναι κατά πολύ χαμηλότερη στις ομάδες με PCA και BPH από ότι σε φυσιολογικούς άνδρες).

Υπάρχουν και άλλοι τομείς για έρευνες σχετικά με την 17OH, όπως: ανδρική στειρότητα, κορίτσια με περιφερική αρρενοποίηση, παιδιά με πρόιμη αύξηση της λειτουργίας του φλοιού των επινεφριδίων στην αρχή της εφηβείας (στις περιπτώσεις αυτές, οι τιμές της 17OH αυξάνονται χωρίς διέγερση της ACTH ή μετά από αυτήν).

IV. ΒΑΣΙΚΕΣ ΑΡΧΕΣ ΤΗΣ ΜΕΘΟΔΟΥ

Μια σταθερή ποσότητα στεροειδούς σημασμένου με ^{125}I ανταγωνίζεται με το στεροειδές που θα μετρηθεί, το οποίο υπάρχει στο δείγμα ή στο βαθμονομητή, για σταθερή ποσότητα θέσεων αντισωμάτων που είναι ακινητοποιημένα στο τοίχωμα ενός σωληναρίου πολυστυρενίου. Δεν απαιτείται εκχύλιση ή χρωματογραφία λόγω της υψηλής ειδικότητας των επιστρωμένων αντισωμάτων. Μετά από επώαση διάρκειας 3 ωρών στους 37°C , η αντίδραση ανταγωνισμού τερματίζεται με ένα βήμα αναρρόφησης. Τα σωληνάρια κατόπιν πλένονται με 3 ml διαλύματος πλύσης και αναρροφούνται. Παριστάνεται γραφικά μια καμπύλη βαθμονόμησης και προσδιορίζονται οι συγκεντρώσεις 17OH των δειγμάτων με αναγωγή συγκεντρώσεων από την καμπύλη βαθμονόμησης.

V. ΠΑΡΕΧΟΜΕΝΑ ΑΝΤΙΔΡΑΣΤΗΡΙΑ

Αντιδραστήρια	Κιτ 96 εξετάσεων	Χρωματικός κωδικός	Ανασύσταση			
 Σωληνάρια επιστρωμένα με αντι-17-α-OH-προγεστερόνη	2 x 48	πορφυρό	Έτοιμο για χρήση			
<table border="1" data-bbox="118 696 256 748"> <tr> <td>Ag</td> <td>^{125}I</td> </tr> </table> ΙΧΝΗΘΕΤΗΣ: 17-α-OH-προγεστερόνη σημασμένη με ^{125}I (κατηγορίας HPLC) σε ρυθμιστικό διάλυμα φωσφορικών/κιτρικού οξέος με βόεια ορολευκοματίνη και αζίδιο (<0,1%)	Ag	^{125}I	1 φιαλίδιο 55 ml 190 kBq	κόκκινο	Έτοιμο για χρήση	
Ag	^{125}I					
<table border="1" data-bbox="118 949 256 987"> <tr> <td>CAL</td> <td>0</td> </tr> </table> Μηδενικός βαθμονομητής σε ανθρώπινο ορό και αζίδιο (0,5%)	CAL	0	1 φιαλίδιο 3 ml	κίτρινο	Έτοιμο για χρήση	
CAL	0					
<table border="1" data-bbox="118 1084 256 1122"> <tr> <td>CAL</td> <td>N</td> </tr> </table> Βαθμονομητές 17-α-OH-προγεστερόνη N = 1 έως 5 (δείτε τις ακριβείς τιμές στις ετικέτες των φιαλιδίων) σε ανθρώπινο ορό και αζίδιο (0,5%)	CAL	N	5 φιαλίδια 0,5 ml	κίτρινο	Έτοιμο για χρήση	
CAL	N					
<table border="1" data-bbox="76 1308 320 1368"> <tr> <td>WASH</td> <td>SOLN</td> <td>CONC</td> </tr> </table> Διάλυμα πλύσης (TRIS-HCl)	WASH	SOLN	CONC	1 φιαλίδιο 10 ml	καφέ	Αραιώστε 70 x με απεσταγμένο νερό (χρησιμοποιήστε μαγνητικό αναδευτήρα).
WASH	SOLN	CONC				
<table border="1" data-bbox="76 1458 277 1496"> <tr> <td>CONTROL</td> <td>N</td> </tr> </table> Οροί ελέγχου N = 1 ή 2 σε ανθρώπινο ορό και θυμόλη	CONTROL	N	2 φιαλίδια λυοφιλοπονημένο	ασημί	Προσθέστε 0,5 ml απεσταγμένου νερού	
CONTROL	N					

Σημειώσεις: Χρησιμοποιείτε το μηδενικό βαθμονομητή για αραιώσεις δειγμάτων.

VI. ΑΝΑΛΩΣΙΜΑ ΠΟΥ ΔΕΝ ΠΑΡΕΧΟΝΤΑΙ

Τα ακόλουθα υλικά απαιτούνται αλλά δεν παρέχονται στο κιτ:

1. Απεσταγμένο νερό
2. Πιπέτες για διανομή: 25 μl, 500 μl και 3 ml (συνιστάται η χρήση πιπετών ακριβείας με αναλώσιμα πλαστικά ρύγχη)
3. Αναμεικτής στροβιλισμού (τύπου vortex)
4. Μαγνητικός αναδευτήρας
5. Υδατόλουτρο στους 37°C
6. Αυτόματη σύριγγα των 5 ml (τύπου Cornwall) για πλύση
7. Σύστημα αναρρόφησης (προαιρετικό)
8. Μπορεί να χρησιμοποιηθεί οποιοσδήποτε μετρητής γ ακτινοβολίας με δυνατότητα μέτρησης του ^{125}I (ελάχιστη απόδοση 70%).

VII. ΠΑΡΑΣΚΕΥΗ ΑΝΤΙΔΡΑΣΤΗΡΙΟΥ

- A. Οροί ελέγχου:** Ανασυστήστε τα υλικά ελέγχου με 0,5 ml απεσταγμένου νερού.

- B. Διάλυμα πλύσης εργασίας:** Προετοιμάστε επαρκή όγκο διαλύματος πλύσης εργασίας με προσθήκη 69 όγκων απεσταγμένου νερού σε 1 όγκο διαλύματος πλύσης (70x). Χρησιμοποιήστε μαγνητικό αναδευτήρα για την ομογενοποίηση. Απορρίψτε το μη χρησιμοποιημένο διάλυμα πλύσης εργασίας στο τέλος της ημέρας.

VIII. ΦΥΛΑΞΗ ΚΑΙ ΗΜΕΡΟΜΗΝΙΑ ΛΗΞΗΣ ΤΩΝ ΑΝΤΙΔΡΑΣΤΗΡΙΩΝ

- Πριν από το άνοιγμα ή την ανασύσταση, όλα τα συστατικά του κιτ παραμένουν σταθερά έως την ημερομηνία λήξης, η οποία αναγράφεται στην ετικέτα, εφόσον διατηρούνται σε θερμοκρασία 2 έως 8°C .
- Μετά την ανασύσταση, οι οροί ελέγχου παραμένουν σταθεροί για μία εβδομάδα σε θερμοκρασία 2 έως 8°C . Για μεγαλύτερες περιόδους φύλαξης, πρέπει να σχηματίζονται κλάσματα/δόσεις μίας χρήσης και να διατηρούνται στους -20°C για 3 μήνες.
- Φρέσκο, παρασκευασμένο διάλυμα πλύσης εργασίας θα πρέπει να χρησιμοποιείται την ίδια ημέρα.
- Μετά την πρώτη χρήση του, ο ιχνηθέτης παραμένει σταθερός έως την ημερομηνία λήξης, εφόσον διατηρείται στο αρχικό, ερμητικά κλειστό φιαλίδιο σε θερμοκρασία 2 έως 8°C .
- Τυχόν μεταβολές της φυσικής εμφάνισης των αντιδραστηρίων του κιτ ενδέχεται να υποδηλώνουν αστάθεια ή αλλοίωση.

IX. ΣΥΛΛΟΓΗ ΚΑΙ ΠΡΟΕΤΟΙΜΑΣΙΑ ΔΕΙΓΜΑΤΩΝ

- Τα δείγματα ορού ή πλάσματος πρέπει να φυλάσσονται σε θερμοκρασία $2-8^\circ\text{C}$.
- Εάν η εξέταση δεν πραγματοποιηθεί εντός 48 ωρών, συνιστάται η φύλαξη στους -20°C .
- Αποφεύγετε τη διαδοχική κατάψυξη και απόψυξη.
- Ο ορός και το ηπαρινισμένο πλάσμα παρέχουν παρόμοια αποτελέσματα (αποφεύγετε δείγματα κιτρικών): $Y(\text{Ορός}) = 0,92 \times (\text{ηπαρ. πλάσμα}) + 0,10$ $r = 1,0$ $n = 18$
- Το πλάσμα με EDTA παρέχει 15% χαμηλότερα αποτελέσματα από ότι ο ορός και το ηπαρινισμένο πλάσμα: $Y(\text{Ορός}) = 1,16 \times (\text{πλάσμα με EDTA}) - 0,10$ $r = 0,99$ $n = 18$

X. ΔΙΑΔΙΚΑΣΙΑ

- A. Σημειώσεις σχετικά με το χειρισμό**
Μην χρησιμοποιείτε το κιτ ή τα συστατικά μετά την ημερομηνία λήξης. Μην αναμειγνύετε υλικά από διαφορετικές παρτίδες κιτ. Φέρετε όλα τα αντιδραστήρια σε θερμοκρασία δωματίου πριν από τη χρήση. Αναμείξτε καλά όλα τα αντιδραστήρια και τα δείγματα με απαλή ανακίνηση ή ανάδευση. Χρησιμοποιείτε ένα καθαρό αναλώσιμο ρύγχος πιπέτας για την προσθήκη κάθε διαφορετικού αντιδραστηρίου και δείγματος προκειμένου να αποφύγετε την επιμόλυνση. Η ακρίβεια βελτιώνεται με χρήση πιπετών υψηλής ακριβείας ή αυτοματοποιημένου εξοπλισμού διανομής με πιπέτες. Τηρείτε τους χρόνους επώασης. Προετοιμάστε μια καμπύλη βαθμονόμησης για κάθε ανάλυση και μη χρησιμοποιείτε δεδομένα από προηγούμενες αναλύσεις.

B. Διαδικασία

1. Σημάνετε επιστρωμένα σωληνάρια εις διπλούν για κάθε βαθμονομητή, δείγμα και ορό ελέγχου. Για τον προσδιορισμό των μετρήσεων μόνον με ιχνηθέτη ^{125}I ("total"), σημάνετε 2 κοινά(μη επιστρωμένα σωληνάρια).
2. Αναμείξτε για λίγο (με αναμεικτική στροβιλισμού τύπου vortex) βαθμονομητές, δείγματα και ορούς ελέγχου και διανείμετε 25 μl από έκαστο σε αντίστοιχα σωληνάρια.
3. Διανείμετε 0,5 ml 17-α-OH-προγεστερόνης σημασμένης με ^{125}I σε κάθε σωληνάριο, συμπεριλαμβανοντας τα μη επιστρωμένα σωληνάρια που αφορούν τις μετρήσεις του ιχνηθέτη ^{125}I ("total").
4. Ανακινήστε απαλά με το χέρι τη βάση στήριξης των σωληναρίων για να απελευθερώσετε τυχόν παγιδευμένες φυσαλίδες.
5. Επαώστε για 3 ώρες στους $+37^\circ\text{C}$.
6. Αναρροφήστε (ή μεταγγίστε) το περιεχόμενο κάθε σωληναρίου (με εξαίρεση εκείνα που αφορούν τις μετρήσεις του ιχνηθέτη ^{125}I ("total")). Βεβαιωθείτε ότι το πλαστικό ρύγχος του αναρροφητή φθάνει στον πυθμένα του επιστρωμένου σωληναρίου προκειμένου να αφαιρεθεί όλη η ποσότητα του υγρού.
7. Πλύνετε τα σωληνάρια με 3 ml διαλύματος πλύσης εργασίας (με εξαίρεση εκείνα που αφορούν τις μετρήσεις του ιχνηθέτη ^{125}I) και αναρροφήστε (ή μεταγγίστε). Αποφύγετε το σχηματισμό αφρού κατά τη διάρκεια της προσθήκης του διαλύματος πλύσης εργασίας.
8. Αφήστε τα σωληνάρια να σταθούν σε όρθια θέση για δύο λεπτά και αναρροφήστε τη σταγόνα υγρού που απομένει.
9. Μετρήστε τα σωληνάρια σε μετρητή γ ακτινοβολίας για 60 δευτερόλεπτα.

XI. ΥΠΟΛΟΓΙΣΜΟΣ ΤΩΝ ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΩΝ

- Υπολογίστε τη μέση τιμή των διπλών προσδιορισμών.
- Υπολογίστε τη δεσμευμένη ραδιενέργεια ως ποσοστό της δέσμευσης που προσδιορίζεται στο σημείο μηδενικού βαθμονομητή (0) σύμφωνα με τον ακόλουθο τύπο:

$$B/B0 (\%) = \frac{\text{Μετρήσεις (Βαθμονομητής ή δείγμα)}}{\text{Μετρήσεις (μηδενικός βαθμονομητής)}} \times 100$$

- Με χρήση ημιλογαριθμικού ή Logit-log χαρτιού γραφήματος 3 κύκλων, παραστήστε γραφικά τις τιμές (B/B0(%)) για κάθε σημείο βαθμονομητή ως συνάρτηση της συγκέντρωσης της 17-α-OH-προγεστερόνης για κάθε σημείο βαθμονομητή και απορρίψτε τις εμφανείς μη αποδεκτές τιμές.
- Για την κατασκευή της καμπύλης βαθμονόμησης είναι δυνατό να χρησιμοποιηθούν επίσης μέθοδοι με τη βοήθεια ηλεκτρονικού υπολογιστή. Εάν χρησιμοποιείται αυτόματη επεξεργασία αποτελεσμάτων, συνιστάται προσαρμογή καμπύλης λογιστικής συνάρτησης 4 παραμέτρων.
- Με αναγωγή των τιμών των δειγμάτων (B/B0 (%)), προσδιορίστε τις συγκεντρώσεις της 17-α-OH-προγεστερόνης των δειγμάτων από την καμπύλη αναφοράς.
- Για κάθε προσδιορισμό, πρέπει να ελέγχεται το ποσοστό του συνολικού ιχνηθέτη που δεσμεύεται εν τη απουσία μη σημασμένης 17-α-OH-προγεστερόνης (B0/T).

XII. ΤΥΠΙΚΑ ΔΕΔΟΜΕΝΑ

Τα ακόλουθα δεδομένα προορίζονται μόνο ως παράδειγμα και δεν πρέπει να χρησιμοποιούνται ποτέ αντί της καμπύλης βαθμονόμησης πραγματικού χρόνου.

17OH-RIA-CT		cpm	B/B0 (%)
Κρούσεις του ιχνηθέτη ¹²⁵ I ("total")		48579	
Βαθμονομητής	0,00 ng/ml	19831	100,0
	0,15 ng/ml	15587	78,6
	0,53 ng/ml	10398	52,4
	1,02 ng/ml	7074	35,7
	3,10 ng/ml	2930	14,8
	11,10 ng/ml	1028	5,2

XIII. ΑΠΟΛΟΣΗ ΚΑΙ ΠΕΡΙΟΡΙΣΜΟΙ

A. Όριο ανίχνευσης

Μετρήθηκαν είκοσι μηδενικοί βαθμονομητές μαζί με ένα σύνολο άλλων βαθμονομητών.

Το όριο ανίχνευσης, οριζόμενο ως η φαινομενική συγκέντρωση δύο τυπικών αποκλίσεων κάτω από τις μέσες μετρήσεις σε μηδενική δέσμευση, ήταν 0,02 ng/ml.

B. Ειδικότητα

Η ειδικότητα υπολογίστηκε με τον εμβολιασμό μιας ποσότητας δειγμάτων 17OH ($\pm 0,5$ ng/ml) με στεροειδή, τα οποία ενδέχεται να υπάρχουν σε δείγματα ασθενών.

Ένωση	Προσθεθείσα ποσότητα (ng/ml)	Διασταυρούμενη αντίδραση (%)
17OH-προγεστερόνη	-	100
Προγεστερόνη	500	0,7
17-α-υδροξυπρεγνολόνη	1000	0,3
21-δεδυκορτιζόλη	1000	0,5
Πρεγνολόνη	500	0,022
11-δεδυκορτιζόλη	500	0,5
Κορτικοστερόνη	500	ND
11-δεδυκορτικοστερόνη	500	0,035
Κορτιζόλη	2500	0,008
Τεστοστερόνη	5000	ND
Ανδροστενοδιόνη	5000	0,001
Οιστραδιόλη	5000	0,001

Γ. Ακρίβεια

ΓΙΑ ΤΟΝ ΙΔΙΟ ΠΡΟΣΔΙΟΡΙΣΜΟ

ΜΕΤΑΞΥ ΔΙΑΦΟΡΕΤΙΚΩΝ ΠΡΟΣΔΙΟΡΙΣΜΩΝ

Ορός	N	<X> ± T.A. (ng/ml)	Σ.Δ. (%)	Ορός	N	<X> ± T.A. (ng/ml)	Σ.Δ. (%)
A	10	0,43 ± 0,03	6,2	A	20	0,77 ± 0,07	9,2
B	10	2,35 ± 0,13	5,6	B	20	1,97 ± 0,10	5,2
Γ	10	7,55 ± 0,38	5,1				

T.A.: Τυπική απόκλιση, Σ.Δ.: Συντελεστής διακύμανσης

Δ. Ορθότητα

ΔΟΚΙΜΑΣΙΑ ΑΡΑΙΩΣΗΣ

Ορός	Αραίωση	Θεωρητική συγκέντρωση (ng/ml)	Μετρηθείσα συγκέντρωση (ng/ml)
1	1/1	-	3,83
	1/2	1,92	2,16
	1/4	0,96	1,13
	1/8	0,48	0,53
	1/16	0,24	0,25
2	1/1	-	6,65
	1/2	3,33	3,32
	1/4	1,66	2,12
	1/8	0,83	0,88
	1/16	0,42	0,39

Τα δείγματα αραιώθηκαν με το μηδενικό βαθμονομητή.

ΔΟΚΙΜΑΣΙΑ ΑΝΑΚΤΗΣΗΣ

Δείγμα	Προσθεθείσα 17OH (ng/ml)	Ανακτηθείσα 17OH (ng/ml)	Ανακτηθείσα (%)
1	6,65	6,10	92
	5,17	4,32	84
	2,93	2,69	92
	1,25	1,22	98
	0,92	0,87	95
2	7,37	7,23	98
	5,90	5,78	98
	3,60	3,57	99
	2,01	2,14	107
	1,69	1,65	98

Συντελεστής μετατροπής:

Από ng/ml σε nmol/l: x 3,03

Από nmol/l σε ng/ml: x 0,33

Από όσο είναι δυνατό να γνωρίζουμε, δεν υπάρχει διεθνές υλικό αναφοράς για την παράμετρο αυτή.

Μέθοδος αναφοράς: 50 δείγματα ορού ασθενών (τιμές από 0,3 ng/ml έως 10,0 ng/ml) υποβλήθηκαν σε προσδιορισμό εκ παραλλήλου με τη μέθοδο αναφοράς τριτομένου υδρογόνου. Η σύγκριση (linear regression analysis) είναι αρκετά καλή.

17OH-RIA-CT = 0,99 (αναφορά ³H) + 0,06 ng/ml r = 0,96

E. Μεσοδιάστημα μεταξύ της διανομής τελευταίου βαθμονομητή και δείγματος

Όπως φαίνεται στη συνέχεια, τα αποτελέσματα του προσδιορισμού παραμένουν αξιόπιστα ακόμα και όταν διανέμεται ένα δείγμα 36 λεπτά μετά την προσθήκη του βαθμονομητή στα επιστρωμένα σωληνάρια.

ΜΕΣΟΔΙΑΣΤΗΜΑ

Ορός (ng/ml)	0'	12'	24'	36'
Ορός 1	0,50	0,58	0,56	0,56
Ορός 2	0,86	0,86	0,93	0,83
Ορός 3	1,22	1,25	1,24	1,26
Ορός 4	1,86	1,90	1,93	1,93
Ορός 5	3,29	3,70	3,46	3,48
Ορός 6	4,52	4,76	5,18	4,65

XIV. ΕΣΩΤΕΡΙΚΟΣ ΠΟΙΟΤΙΚΟΣ ΕΛΕΓΧΟΣ

- Το ποσοστό του συνολικού ιχνηθέτη που δεσμεύεται εν τη απουσία μη σημασιμένης 17-α-OH-προγεστερόνης (B0/T) πρέπει να είναι > 25%.
- Εάν τα αποτελέσματα που λαμβάνονται για τον ορό ελέγχου 1 ή/και τον ορό ελέγχου 2 δε βρίσκονται εντός του πεδίου τιμών που καθορίζεται στην ετικέτα του φιαλιδίου, τα αποτελέσματα δεν είναι δυνατό να χρησιμοποιηθούν, εκτός εάν έχει δοθεί ικανοποιητική εξήγηση για την ασυμφωνία.
- Εάν είναι επιθυμητό, κάθε εργαστήριο μπορεί να δημιουργήσει τα δικά του μείγματα δειγμάτων ελέγχου (pools), τα οποία πρέπει να διατηρούνται καταψυγμένα σε κλάσματα. Μην καταψύχετε-αποψύχετε περισσότερο από δύο φορές.
- Τα κριτήρια αποδοχής για τη διαφορά μεταξύ των διπλών αποτελεσμάτων των δειγμάτων θα πρέπει να βασίζονται σε ορθές εργαστηριακές πρακτικές.

XV. ΤΙΜΕΣ ΑΝΑΦΟΡΑΣ

Οι τιμές αυτές παρέχονται μόνον ως οδηγός. Κάθε εργαστήριο θα πρέπει να καθιερώσει το δικό του πεδίο φυσιολογικών τιμών.

	Πεδίο τιμών συγκέντρωσης (εκατοστημόρια 2,5 έως 97,5%) (ng/ml)	Αριθμός ατόμων
Φυσιολογικοί άνδρες	0,59 – 3,44	72
Φυσιολογικές γυναίκες	0,11 - 1,08	48
· Ωοθυλακική φάση	0,95 - 5,00	49
· Ωχρινική φάση		
Κύηση	2,50 – 9,78	43
· Πρώτο τρίμηνο	3,40 – 8,50	31
· Δεύτερο τρίμηνο	4,53 – 18,86	35
· Τρίτο τρίμηνο		

XVI. ΠΡΟΦΥΛΑΞΕΙΣ ΚΑΙ ΠΡΟΕΙΔΟΠΟΙΗΣΕΙΣ

Ασφάλεια

Μόνο για διαγνωστική χρήση in vitro.

Το kit αυτό περιέχει το ¹²⁵I (Χρόνος ημιζωής: 60 ημέρες), μια ραδιενεργή ουσία η οποία εκπέμπει ιονίζουσα ακτινοβολία X (28 keV) και γ (35.5 keV). Αυτό το ραδιενεργό προϊόν μπορεί να μεταφέρεται και να χρησιμοποιείται μόνον από εξουσιοδοτημένα άτομα. Η αγορά, φύλαξη, χρήση και ανταλλαγή ραδιενεργών προϊόντων υπόκεινται στη νομοθεσία της χώρας του τελικού χρήστη. Σε καμία περίπτωση δεν πρέπει να χορηγείται το προϊόν σε ανθρώπους ή ζώα.

Όλος ο χειρισμός του ραδιενεργού υλικού θα πρέπει να εκτελείται σε καθορισμένο χώρο, μακριά από χώρους τακτικής διέλευσης. Στο εργαστήριο πρέπει να διατηρείται ημερολόγιο για την παραλαβή και τη φύλαξη ραδιενεργών υλικών. Εξοπλισμός και γυάλινα σκεύη του εργαστηρίου, τα οποία θα μπορούσαν να μολυνθούν με ραδιενεργές ουσίες, θα πρέπει να φυλάσσονται σε ξεχωριστό χώρο για την πρόληψη επιμόλυνσης των διαφόρων ραδιοϊσοτόπων.

Τυχόν διαρροές ραδιενεργών υγρών πρέπει να καθαρίζονται αμέσως σύμφωνα με τις διαδικασίες ασφάλειας από ραδιενέργεια. Τα ραδιενεργά απόβλητα πρέπει να απορρίπτονται σύμφωνα με τους τοπικούς κανονισμούς και τις κατευθυντήριες οδηγίες των αρχών που έχουν δικαιοδοσία στο εργαστήριο. Η τήρηση των βασικών κανόνων ασφάλειας από ραδιενέργεια παρέχει επαρκή προστασία.

Τα συστατικά ανθρώπινου αίματος που περιλαμβάνονται στο kit αυτό έχουν ελεγχθεί με μεθόδους εγκεκριμένες στην Ευρώπη ή/και από τον FDA και έχει διαπιστωθεί ότι είναι αρνητικά ως προς την παρουσία HBsAg, αντι-HCV, αντι-HIV-1 και 2. Καμία γνωστή μέθοδος δεν είναι δυνατό να παρέχει πλήρη διασφάλιση ότι παράγωγα του ανθρώπινου αίματος δε θα μεταδώσουν ηπατίτιδα, AIDS ή άλλες λοιμώξεις. Επομένως, ο χειρισμός αντιδραστηρίων, δειγμάτων ορού ή πλάσματος θα πρέπει να γίνεται σύμφωνα με τις τοπικές διαδικασίες περί ασφάλειας.

Όλα τα ζωικά προϊόντα και παράγωγα έχουν συλλεχθεί από υγιή ζώα. Τα βόεια συστατικά προέρχονται από χώρες όπου δεν έχει αναφερθεί BSE. Παρ' όλ' αυτά, συστατικά που περιέχουν ζωικές ουσίες θα πρέπει να αντιμετωπίζονται ως δυνητικώς μολυσματικά.

Αποφεύγετε οποιαδήποτε επαφή του δέρματος με αντιδραστήρια (χρησιμοποιείται αζίδιο του νατρίου ως συντηρητικό). Το αζίδιο στο kit αυτό ενδέχεται να αντιδράσει με μόλυβδο και χαλκό των υδραυλικών σωληνώσεων και να σχηματίσει με τον τρόπο αυτό ιδιαίτερα εκρηκτικά αζίδια μετάλλων.

Κατά τη διάρκεια του βήματος πλύσης, εκπλύνετε την αποχέτευση με μεγάλη ποσότητα νερού, για την πρόληψη τυχόν συσσώρευσης αζιδίου. Μην καπνίζετε, μην πίνετε, μην τρώτε και μη χρησιμοποιείτε καλλυντικά στο χώρο εργασίας. Μην διανέμετε με πιπέτα χρησιμοποιώντας το στόμα σας. Χρησιμοποιείτε προστατευτική ενδυμασία και γάντια μιάς χρήσης.

XVII. ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ

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 Endocrinology 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.

XVIII. ΠΕΡΙΛΗΨΗ ΤΟΥ ΠΡΩΤΟΚΟΛΛΟΥ

	ΚΡΟΥΣΕΙΣ "TOTAL" μl	ΒΑΘΜΟΝ ΟΜΗΤΕΣ μl	ΔΕΙΓΜΑ (TA) ΟΡΟΙ ΕΛΕΓΧΟΥ μl
Βαθμονομητές (0-5) Δείγματα, υλικά ελέγχου Ιχνηθέτης	- - 500	25 - 500	- 25 500
Επόαση	3 ώρες στους 37° C		
Διαχωρισμός Διάλυμα πλύσης εργασίας Διαχωρισμός	-	αναρρόφηση 3,0 ml προσεκτική αναρρόφηση	
Μέτρηση	Μέτρηση σωληναρίων επί 60 δευτερόλεπτα		

Αρ. καταλόγου DIASource: KIP1409	Αριθμός P.I.: 1700475/el	Αρ. αναθεώρησης: 110217/1
----------------------------------	--------------------------	---------------------------

Használat előtt olvassa el a teljes használati utasítást.

17OH-RIA-CT

I. VIZSGÁLAT CÉLJA

Immunradiometriás eljárás emberi vérsavó vagy vérplazma 17- α -hidroxiprogoszteron (17OH) tartalmának *in vitro* mennyiségi meghatározására.

II. ÁLTALÁNOS INFORMÁCIÓK

- A. **Bejegyzett név:** DIASource 17OH-RIA-CT Reagenskészlet
- B. **Katalógusszám:** KIP1409 : 96 vizsgálat
- C. **Gyártó :** DIASource ImmunoAssays S.A.
Rue du Bosquet, 2, B-1348 Louvain-la-Neuve, Belgium.

Gyakorlati jellegű vagy rendeléssel kapcsolatos kérdésekkel hívja a következő számot:

Tel: +32 (0) 10 84.99.11

Fax: +32 (0) 10 84.99.90

III. KLINIKAI HÁTTER

A A 17- α -hidroxiprogoszteron élettani szerepe

17- α -hidroxiprogoszteron (17OH) egy 21 szénatomot tartalmazó szteroid hormon (molekulatömege 330,3), melyet a mellékvesék, a petefészkek, a herék, és a méhlepény állítanak elő 17- α -hidroxipregnenolonból. A 17OH 11. és 21. szénatomja hidroxilálódik, és így 11-dezoxikortizol, majd kortizol keletkezik.

B. A 17- α -hidroxiprogoszteron mérésének klinikai felhasználása

A vérsavó, illetve az amnionfolyadék 17OH szintjének meghatározása alkalmas a veleszületett mellékvese hyperplasia (CAH) diagnosztizálására. A CAH kialakulásának hátterében bizonyos enzimek (hat különböző enzim) funkciózavara áll. Az enzimek hiányos működése miatt az ACTH-szint megemelkedik, így mellékvese hyperplasia alakul ki, illetve számos szteroid prekursorának szintje is megnő. A 17OH szint mérésének fontos szerepe lehet más betegségek felderítésében is, például varicocele (here-visszértágulat) esetén (a 17OH és a tesztoszteron szint mérésével a Leydig-sejtek működéséről kaphatunk információt), illetve a prosztata idősebb páciensekben előforduló jóindulatú hypertrophiájának (BPH) és karcinómájának (PCA) diagnosztizálásakor is (az ezekben a betegségekben szenvedő férfiak vérplazmájának 17OH szintje szignifikánsan alacsonyabb, mint egészséges társaiké).

A 17OH szint mérésének indikációja lehet még: férfiak nemzéképtelensége, kislányok peripubertális virilizációja, korai adrenarche (ezekben az esetekben a 17OH szintje emelkedett, ACTH stimuláció nélkül, vagy a stimuláció után).

IV. A MÓDSZER ELVE

Ismert mennyiségű ¹²⁵I-dal jelölt szteroid verseng a mintában vagy a kalibrátorban található szteroiddal a polisztrén csövek falához rögzített ismert mennyiségű ellenanyag kötőhelyeiért. A csövek falához kötött ellenanyagok nagy mértékű specifikussága miatt nincs szükség sem tisztításra, sem kromatográfiára. A csöveket 3 órán át 37°C-on kell inkubálni, majd a folyadékot el kell távolítani. Ekkor a kompetitív reakció leáll. A csöveket ezután át kell mosni 3 ml hígított mosóoldattal, majd a folyadékot ismét el kell távolítani. A kalibrátorok segítségével felrajzolható egy kalibrációs görbe, amiről a minták 17OH-koncentrációit interpolációval olvashatók le.

V. A REAGENSZÉSZLET TARTALMA

Reagens	Mennyiség 96 mintához	Szín	Feloldás			
Anti-17- α -OH-progeszteronnal borított csövek	2 x 48	lila	Használatra kész			
<table border="1" style="display: inline-table; vertical-align: middle;"> <tr> <td>Ag</td> <td>¹²⁵I</td> </tr> </table> TRACER: ¹²⁵ I-dal jelölt 17- α -OH-progeszteron (HPLC tisztaságú), bovin szérum albumin és nátrium-azid (<0,1%) tartalmú foszfor/citromsav pufferben	Ag	¹²⁵ I	1 ampulla 55 ml 190 kBq	piros	Használatra kész	
Ag	¹²⁵ I					
<table border="1" style="display: inline-table; vertical-align: middle;"> <tr> <td>CAL</td> <td>0</td> </tr> </table> Nulla kalibrátor nátrium-azid (0,5%) tartalmú emberi vérsavóban	CAL	0	1 ampulla 3 ml	sárga	Használatra kész	
CAL	0					
<table border="1" style="display: inline-table; vertical-align: middle;"> <tr> <td>CAL</td> <td>N</td> </tr> </table> Kalibrátorok 17- α -OH-progeszteron N = 1 - 5 (a pontos értéket 1. az ampullák címkéin) nátrium-azid (0,5%) tartalmú emberi vérsavóban	CAL	N	5 ampulla 0,5 ml	sárga	Használatra kész	
CAL	N					
<table border="1" style="display: inline-table; vertical-align: middle;"> <tr> <td>WASH</td> <td>SOLN</td> <td>CONC</td> </tr> </table> Mosóoldat (TRIS-HCl)	WASH	SOLN	CONC	1 ampulla 10 ml	barna	Hígítsa 70 x desztillált vízzel (használjon mágneses keverőt).
WASH	SOLN	CONC				
<table border="1" style="display: inline-table; vertical-align: middle;"> <tr> <td>CONTROL</td> <td>N</td> </tr> </table> Kontrollok - N = 1 vagy 2 thymolt tartalmazó emberi vérsavó	CONTROL	N	2 ampulla liofilizált	ezüst	Adjon hozzá 0,5 ml desztillált vizet	
CONTROL	N					

Megjegyzés: Minták hígításához használja a nulla kalibrátort

VI. A FELHASZNÁLÓ ÁLTAL BIZTOSÍTOTT ESZKÖZÖK

A következő eszközöket a készlet nem tartalmazza, de szükségesek a vizsgálat elvégzéséhez:

- Desztillált víz
- Pipetták: 25 μ l, 500 μ l és 3 ml beméréséhez (ajánlott pontos pipetták és eldobható műanyag pipettahegyek használata)
- Vortex
- Mágneses keverő
- 37°C-os vízfürdő
- 5 ml automata fecskendő (Cornwall) a mosáshoz
- Vízleásvivattyú (választható)
- Bármely, ¹²⁵I mérésére alkalmas gamma-sugármérő (minimális hozam 70%).

VII. REAGENSEK ELŐKÉSZÍTÉSE

- Kontrollok:** Oldja fel a kontrollokat 0,5 ml desztillált vízben.
- Hígított mosóoldat:** Készítsen megfelelő mennyiségű hígított mosóoldatot úgy, hogy 69 rész desztillált vízhez 1 rész mosóoldatot (70x) kever. Homogenizálja mágneses keverő segítségével. A napi vizsgálatok végeztével öntse ki a megmaradt hígított mosóoldatot.

VIII. A REAGENSEK TÁROLÁSA ÉS ELTARTHATÓSÁGA

- Felnyitás és feloldás nélkül a reagens 2-8°C-on tárolva a címkén feltüntetett időpontig eltarthatók.

- Feloldás után a kontrollok 2-8°C-on egy hétig, több csöbe szétosztva -20°C-on lefagyaszta legfeljebb 3 hónapig eltarthatók.
- A frissen készült hígított mosóoldatot még aznap fel kell használni.
- Amennyiben felnyitás után a tracer az eredeti, jól lezárt ampullában 2-8°C-on tárolja, akkor a címkén feltüntetett időpontig eltartható.
- A reagens fizikai tulajdonságainak megváltozása valószínűleg azt jelzi, hogy megromlottak.

IX. MINTAVÉTEL ÉS ELŐKÉSZÍTÉS

- Tárolja a vérsavó vagy vérplazma mintákat 2-8°C-on.
- Amennyiben nem végzi el a vizsgálatot 48 órán belül, ajánlott a mintákat -20°C-on szétosztva tárolni.
- Kerülje a minták többszöri lefagyasztását és felolvasztását.
- Savó és heparinos plazma minták hasonló eredményt adnak (ne használjon citrátos mintákat): $Y(\text{savó}) = 0,92 \times (\text{hep. plazma}) + 0,10$
 $r = 1,0 \quad n = 18$
- EDTA-s plazma a savónál, és a heparinos plazmánál 15%-kal alacsonyabb eredményt ad: $Y(\text{savó}) = 1,16 \times (\text{EDTA-s plazma}) - 0,10$
 $r = 0,99 \quad n = 18$

X. ELJÁRÁS

A. Tudnivalók

Ne használja a reagenset a lejáratí idejükön túl. Ne keverjen össze eltérő gyártási számú reagenskészletekből származó anyagokat. Használat előtt várja meg, amíg a reagens szobahőmérsékletre melegednek.

Óvatos mozgattással vagy keveréssel alaposan homogenizálja a reagenset. Minden reagens és minta beméréséhez használjon tiszta eldobható pipettahegyet, hogy elkerülje az anyagok beszennyeződését. Nagy pontosságú pipetták, vagy automata pipettázó készülék használata javítja a vizsgálat pontosságát. Tartsa be a megadott inkubációs időket. Minden vizsgálathoz készítsen új kalibrációs görbét, ne használja korábbi mérések adatait.

B. A vizsgálat menete

- Feliratozzon 2-2 csövet a kalibrátorok, a minták és a kontrollok számára. A teljes radioaktivitás méréséhez használjon 2 reagens nélküli csövet (totálok).
- Rövid vortexelés után mérjen 25 μ l-t a kalibrátorokból, kontrollokból és mintákból a megfelelő csövekbe.
- Mérjen 0,5 ml ¹²⁵I-dal jelölt 17- α -OH-progeszteront minden csöbe (a totálokba is).
- Kézzel óvatosan rázza meg a kémcsőállványt, hogy a csövekben maradt levegőbuborékok eltávozzanak.
- Inkubálja a csöveket 37°C-on 3 órán át.
- Szívja le (vagy öntse le) a csövek tartalmát (kivéve a totálok). Ügyeljen, hogy a vízlégszivattyú műanyag hegye leérjen a csövek aljáig, és így az összes folyadékot eltávolítsa.
- Mossa a csöveket 3 ml hígított mosóoldattal (kivéve a totálokat), majd távolítsa el a folyadékot. Vigyázzon, hogy a mosóoldat beméréskor ne habosodjon.
- Hagyja állni a csöveket 2 percig, majd távolítsa el a megmaradt folyadékcséppet.
- Mérje a radioaktivitást gamma-sugármérővel 60 másodpercig.

XI. EREDMÉNYEK KISZÁMÍTÁSA

- Számolja ki a párhuzamos mérések átlagát.
- Számítsa ki a megkötött radioaktivitás százalékos értékét a nulla kalibrátorra kapott eredmény felhasználásával az alábbi képlet alapján:

$$B/B_0(\%) = \frac{\text{kontroll vagy minta cpm}}{B_0(\text{nulla kalibrátor}) \text{ cpm}} \times 100$$

- Féllogaritmikus vagy logit-log milliméterpapíron ábrázolja a kalibrátorok B/B₀(%) értékeit a hozzájuk tartozó 17- α -OH-progeszteron-koncentrációk függvényében. Hagyja figyelmen kívül a nyilvánvalóan kieső értékeket.
- Számítógép segítségével is felrajzolható a kalibrációs görbe. Ez esetben használjon 4-paraméteres logisztikus görbeillesztést.
- A kalibrációs görbe alapján határozza meg a minták 17- α -OH-progeszteron-koncentrációját B/B₀(%) értékeik interpolációjával.
- Minden vizsgálat során határozza meg a jelöletlen 17- α -OH-progeszteron nélkül bekötődő tracer százalékos mennyiségét (B₀/T).

XII. JELLEMZŐ MÉRÉSI EREDMÉNYEK

A következő adatok csak példaként szolgálnak, soha ne használja őket a valós idejű kalibráció helyett.

17OH-RIA-CT		cpm	B/Bo (%)
Teljes radioaktivitás		48579	
Kalibrátor	0,00 ng/ml	19831	100,0
	0,15 ng/ml	15587	78,6
	0,53 ng/ml	10398	52,4
	1,02 ng/ml	7074	35,7
	3,10 ng/ml	2930	14,8
	11,10 ng/ml	1028	5,2

XIII. A VIZSGÁLAT JELLEMZŐI ÉS KORLÁTAI

A. A kimutathatóság alsó határa

Húsz nulla kalibrátort vizsgáltak meg más kalibrátorokkal együtt. A kimutathatóság alsó határa 0,02 ng/ml-nek bizonyult, ami a nulla kalibrátor cpm értékeinek átlagából számolható ki a standard deviáció kétszeresének levonásával.

B. Specificitás

A specificitást úgy vizsgálták, hogy 17OH-tartalmú ($\pm 0,5$ ng/ml) mintákhoz olyan szteroidokat adtak, amelyek jelen lehetnek a betegekben.

Vegyület	Hozzáadott mennyiség (ng/ml)	Keresztreaktivitás (%)
17OH-Progeszteron	-	100
Progeszteron	500	0,7
17- α -hidroxipregnenolon	1000	0,3
21-deoxikortizol	1000	0,5
Pregnenolon	500	0,022
11-deoxikortizol	500	0,5
Kortikoszteron	500	ND
11-deoxikortikoszteron	500	0,035
Kortizol	2500	0,008
Tesztoszteron	5000	ND
Androsztendion	5000	0,001
Ösztradiol	5000	0,001

C. Reprodukálhatóság

VIZSGÁLATON BELÜLI VIZSGÁLATOK KÖZÖTTI

Savó	N	<X> \pm SD (ng/ml)	CV (%)	Savó	N	<X> \pm SD (ng/ml)	CV (%)
A	10	0,43 \pm 0,03	6,2	A	20	0,77 \pm 0,07	9,2
B	10	2,35 \pm 0,13	5,6	B	20	1,97 \pm 0,10	5,2
C	10	7,55 \pm 0,38	5,1				

SD: standard deviáció; CV: variációs koefficiens

D. Pontosság

HÍGÍTÁSI VIZSGÁLAT

Savó	Hígítás	Elméleti koncentráció (ng/ml)	Mért koncentráció (ng/ml)
1	1/1	-	3,83
	1/2	1,92	2,16
	1/4	0,96	1,13
	1/8	0,48	0,53
	1/16	0,24	0,25
2	1/1	-	6,65
	1/2	3,33	3,32
	1/4	1,66	2,12
	1/8	0,83	0,88
	1/16	0,42	0,39

A minták hígítása a nulla kalibrátorral történt.

VISSZANYERÉS

Minta	Hozzáadott 17OH (ng/ml)	Visszanyert 17OH (ng/ml)	Visszanyerés (%)
1	6,65	6,10	92
	5,17	4,32	84
	2,93	2,69	92
	1,25	1,22	98
	0,92	0,87	95

2	7,37	7,23	98
	5,90	5,78	98
	3,60	3,57	99
	2,01	2,14	107
	1,69	1,65	98

Mértékegységek átváltása:
ng/ml-ről nmol/l-re: $\times 3,03$
nmol/l-ről ng/ml-re: $\times 0,33$

Ismereteink szerint jelenleg nem létezik nemzetközi referencia anyag ennek a paraméternek a vizsgálatára.

Referencia eljárás: 50 beteg vérsavóját (amelyek a 0,3-10 ng/ml tartományba estek) vizsgálták meg a párhuzamosan a 17OH-RIA-CT-vel és a tríciumos referencia eljárással. A lineáris regressziós elemzés meglehetősen jó eredményt adott.
 $17\text{OH-RIA-CT} = 0,99$ (^3H referencia eljárás) + $0,06$ ng/ml $r = 0,96$

E. Az utolsó kalibrátor és a minták bemérése között eltelt idő

Ahogy ezt az alábbi adatok is mutatják, a vizsgálat eredményeit nem befolyásolja, ha egy minta bemérése akár 36 perccel az utolsó kalibrátor után történik.

ELTELT IDŐ

Vérsavó (ng/ml)	0'	12'	24'	36'
Vérsavó 1	0,50	0,58	0,56	0,56
Vérsavó 2	0,86	0,86	0,93	0,83
Vérsavó 3	1,22	1,25	1,24	1,26
Vérsavó 4	1,86	1,90	1,93	1,93
Vérsavó 5	3,29	3,70	3,46	3,48
Vérsavó 6	4,52	4,76	5,18	4,65

XIV. BELSŐ MINŐSÉGELLENŐRZÉS

- Jelöletlen 17- α -OH-progeszteron hiányában a teljes megkötött tracer mennyiségének (B0/T) >25%-nak kell lennie.
- Ha a kontroll 1-re és 2-re kapott eredmények kívül esnek az ampullák címkéin feltüntetett tartományon, a vizsgálat eredményei nem használhatók fel, kivéve, ha ismert az eltérés pontos oka.
- Igény esetén bármely laboratórium készíthet egy saját, kontrollként szolgáló savó-poolt, amit azután szétosztva, lefagyaszthatja kell tárolni. Ne fagyassza le és olvassa fel őket kettőnél többször.
- A párhuzamos vizsgálatok eredményei közötti eltérés elfogadható mértékét a GLP (Good Laboratory Practises) alapján kell meghatározni.

XV. REFERENCIATARTOMÁNY

Az alábbi értékek csak irányadó jellegűek, minden laboratóriumnak meg kell határoznia saját referenciatartományát.

	Koncentrációtartomány (2,5 to 97,5% percentilis) (ng/ml)	Minták száma
Átlag férfipopuláció	0,59 – 3,44	72
Átlag női populáció		
Follicularis fázis	0,11 – 1,08	48
Lutealis fázis	0,95 – 5,00	49
Terhesség		
Első trimeszter	2,50 – 9,78	43
Második trimeszter	3,40 – 8,50	31
Harmadik trimeszter	4,53 – 18,86	35

XVI. MUNKAÉVELEM

Biztonsági előírások

Csak in vitro diagnosztikai felhasználásra.

A kit röntgen (28 keV) és gamma (35,5 keV) sugárzó ^{125}I izotópot (felezési idő: 60 nap) tartalmaz.

A reagenskészletben található radioaktív anyagot csak arra jogosult személyek vehetik át és használhatják fel. Radioaktív termékek beszerzésére, tárolására, használatára, és cseréjére az adott ország törvényei érvényesek. A reagensek alkalmazása embereken és állatokon is minden körülmények között tilos.

Minden, radioaktív reagenssel végzett műveletet egy arra kijelölt, elkülönített helyen kell elvégezni. A laboratóriumba érkezett radioaktív anyagok átvételéről és tárolásáról vezetett jegyzőkönyvet a laboratórium területén kell tartani. Azokat a laboratóriumi eszközöket és üvegedényeket, amelyek radioaktív anyaggal szennyeződhetnek, különítse el, hogy elkerülje a különböző radioizotópokkal történő keresztszennyeződést.

Amennyiben bármilyen radioaktív anyag kiömlik, azonnal takarítsa fel az erre vonatkozó előírásoknak megfelelő módon. A keletkező radioaktív hulladékot a helyi szabályoknak és az illetékes hatóságok erre vonatkozó útmutatásának megfelelően kell kidobni. Ha betartja a radioaktív anyagok kezelésére vonatkozó alapvető szabályokat, megfelelően védett lesz a sugárfertőzéstől.

A készlet emberi vérből készült reagenseit európai szabványok szerinti és/vagy az FDA által minősített módszerrel HBsAg-tól, valamint anti-HCV, és anti-HIV-1 és 2 ellenanyagoktól mentesnek találták. Azonban egyetlen ma ismert módszer alapján sem állítható biztosan, hogy az emberi vérből készült anyagok nem okozhatnak hepatitiszt, AIDS-et vagy más fertőző betegséget. Ezért minden ilyen reagenst és minden savó-, illetve plazmamintát a fertőző anyagokra vonatkozó helyi biztonsági előírásoknak megfelelően kell kezelni.

Minden állati eredetű reagens és termék egészséges állatokból származik. A szarvasmarha eredetű reagens olyan országokból származnak, ahonnan eddig nem jelentettek BSE esetet. Ennek ellenére minden állati eredetű anyagot tartalmazó reagenst potenciálisan fertőzésveszélyesként kell kezelni.

Vigyázzon, hogy a reagensek bőrrre ne kerüljenek (tartósítószer: nátrium-azid). A reagensekben található nátrium-azid robbanásveszélyes fém-azidokat képezhet ólom és réz csővezetékek anyagával. A csövek mosásakor nagy mennyiségű vízzel együtt öntse ki ezeket az anyagokat, hogy megelőzze az azid felgyülemelését.

Ne dohányozzon, ne fogyasszon ételt vagy italt, illetve ne használjon kozmetikumokat a laboratóriumban. Ne pipettázzon szájjal. Munka közben viseljen laborköpenyt és egyszer használatos kesztyűt.

XVIII. AZ ELJÁRÁS ÖSSZEFOGLALÁSA

	Totálók µl	Kalibrátorok µl	Minták, kontrollok µl
Kalibrátorok (0-5)	-	25	-
Minták, kontrollok	-	-	25
Tracer	500	500	500
Inkubáció	3 órán keresztül 37°C-on		
Folyadék eltávolítása	-	Szívja ki	
Hígított mosóoldat	3,0 ml		
Folyadék eltávolítása	Szívja ki óvatosan		
Mérés	Radioaktivitás mérése 60 másodpercig		

DIASource Katalógusszám : KIP1409	P.I. Szám : 1700475/hu	Verziószám : 110217/1
--------------------------------------	---------------------------	--------------------------

Frissítés időpontja: 2011-02-17

XVII. IRODALOM

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

Przed zastosowaniem należy przeczytać cały protokół.

17OH-RIA-CT

I. PRZEZNACZENIE

Oznaczenie radioimmunologiczne do ilościowego pomiaru *in vitro* ludzkiego 17- α -hydroksyprogesteronu (17OH) w surowicy i osoczu.

II. INFORMACJE OGÓLNE

- A. **Nazwa firmowa:** Zestaw DIASource 17OH-RIA-CT
- B. **Numer katalogowy:** KIP1409 : 96 oznaczeń
- C. **Wyprodukowano przez:** DIASource ImmunoAssays S.A.
Rue du Bosquet, 2, B-1348 Louvain-la-Neuve, Belgia.

Dział pomocy technicznej oraz informacje dotyczące zamówień:
Tel: +32 (0)10 84.99.11 Fax: +32 (0)10 84.99.90

III. INFORMACJE KLINICZNE

A *Aktywność biologiczna 17- α -hydroksyprogesteronu*

17- α -hydroksyprogesteron (17OH) jest hormonem steroidowym z grupą hydroksylową przy węglu C-21 (masa cząsteczkowa 330,3) powstającym z 17- α -hydroksy pregnenolonu w nadnerczach, jak również w jajnikach, jądrach i łożysku. 17OH jest hydroksylowane w pozycjach 11 i 21, co prowadzi do powstania 11-deoksykortyzolu i ostatecznie kortyzolu.

B. *Zastosowania kliniczne oznaczenia 17- α -hydroksyprogesteronu*


Należy przyjąć, że stężenie 17OH w surowicy bądź płynie owodniowym pozwala na postawienie rozpoznania wrodzonego przerostu nadnerczy (CAH). Występowanie CAH ma związek z defektem swoistego enzymu (opisano niedobory sześciu różnych enzymów). W wyniku tych niedoborów, dochodzi do zwiększenia wytwarzania ACTH, powstania przerostu nadnerczy i wzrostu stężeń wielu prekursorów steroidów. Ponadto interesująca jest rola 17OH u pacjentów z żylakami powrózka nasiennego. (17OH i testosteron służą za markery funkcji komórek Leydiga) i u starzejących się mężczyzn są stosowane do wykrywania łagodnego rozrostu stercza (BPH) oraz raka stercza (PCA) (poziom 17OH w osoczu jest znacząco niższy w grupach pacjentów z PCA i BPH niż u zdrowych mężczyzn).

Inne obszary badań 17OH są następujące: niepłodność męska, dziewczęta z objawami wirylizacji w okresie pokwitania, dzieci z przedwczesnym dojrzewaniem (w tych przypadkach, aktywność 17OH jest podwyższona bez, lub po stymulacji ACTH).

IV. ZAGADNIENIA DOTYCZĄCE METODY

W celu pomiaru substancji obecnej w próbce lub w kalibratorze, odpowiednią ilość cząstek steroidu oznakowanych ^{125}I współzawodniczy ze steroidem o określonej ilości miejsc na przeciwciałach unieruchomionych na ściance próbek polistyrenowej. Z powodu wysokiej swoistości przeciwciał opłaszczonych na ściankach próbki, ekstrakcja, ani chromatografia nie są potrzebne. Po 3 godzinach inkubacji w temperaturze 37 °C reakcja współzawodnictwa jest przerywana przez aspirację. Następnie próbki są płukane przy pomocy 3 ml roztworu płuczącego i aspirowane. Wykreślana jest krzywa kalibracyjna a stężenia 17OH w próbkach są określane na podstawie nałożenia dawki na krzywą kalibracyjną.

V. ODCZYNNIKI DOSTARCZONE

Odczynniki	Zestaw 96 oznaczeń	Kolor	Rekonstytucja			
 Próbkówki opłaszczone przeciwciałami anti-17- α -OH-progesteronu	2 x 48	purpurowy	Gotowe do zastosowania.			
<table border="1" data-bbox="119 660 255 705"> <tr> <td>Ag</td> <td>^{125}I</td> </tr> </table> ZNACZNIK IZOTOPOWY: Znakowany jodem 125 17- α -OH-progesteron (czystości HPLC) w kwaśnym buforze fosforanowym/cytrynianowym z albuminą z surowicy bydziej i azydkiem (<0,1%)	Ag	^{125}I	1 fiolka 55 ml 190 kBq	czerwony	Gotowe do zastosowania.	
Ag	^{125}I					
<table border="1" data-bbox="119 907 255 952"> <tr> <td>CAL</td> <td>0</td> </tr> </table> Kalibrator zerowy w ludzkiej surowicy z azydkiem (0,5%)	CAL	0	1 fiolka 3 ml	żółty	Gotowe do zastosowania.	
CAL	0					
<table border="1" data-bbox="119 996 255 1041"> <tr> <td>CAL</td> <td>N</td> </tr> </table> Kalibratory 17- α -OH-progesteronu N = 1 do 5 (dokładne wartości na etykietach fiolek) w ludzkiej surowicy z azydkiem (0,5%)	CAL	N	5 fiolek 0,5 ml	żółty	Gotowe do zastosowania.	
CAL	N					
<table border="1" data-bbox="71 1164 319 1209"> <tr> <td>WASH</td> <td>SOLN</td> <td>CONC</td> </tr> </table> Roztwór płuczący (TRIS HCl)	WASH	SOLN	CONC	1 fiolka 10 ml	brązowy	Rozcieńczyć 70x wodą destylowaną (wykorzystać mieszadło magnetyczne).
WASH	SOLN	CONC				
<table border="1" data-bbox="71 1288 319 1332"> <tr> <td>CONTROL</td> <td>N</td> </tr> </table> Kontrole - N = od 1 do 2 w ludzkiej surowicy z tymolem	CONTROL	N	2 fiołki (zawartość liofilizowana)	srebrny	Dodać 0,5 ml wody destylowanej	
CONTROL	N					

Uwaga: Do rozcieńczania próbek należy użyć kalibratora zerowego.

VI. MATERIAŁY WYMAGANE, ALE NIEDOSTARCZONE

Poniższe materiały są wymagane, ale nie są dostarczone w zestawie:

1. Woda destylowana
2. Pipety do dozowania: 25 μl , 500 μl i 3 ml (zaleca się korzystanie z dokładnych pipet z jednorazowymi końcówkami plastikowymi)
3. Mieszadło wirowe
4. Mieszadło magnetyczne
5. Łaźnia wodna z temperaturą 37 °C
6. Strzykawka automatyczna o objętości 5 ml (rodzaj Cornwall) do płukania
7. Układ do aspiracji (opcjonalnie)
8. Może być wykorzystywany jakikolwiek licznik gamma odpowiedni do pomiaru ^{125}I (minimalny uzysk 70%).

VII. PRZYGOTOWANIE ODCZYNNIKÓW

- A. Kontrole:** Kontrole należy rekonstruować przy pomocy 0,5 ml wody destylowanej.
- B. Roboczy roztwór płuczący:** Właściwą objętość roboczego roztworu płuczącego należy przygotować dodając 69 objętości wody destylowanej do 1 objętości roztworu płuczącego (70x). Do homogenizacji należy wykorzystać mieszadło magnetyczne. Niewykorzystany roboczy roztwór płuczający należy wylać pod koniec dnia.

VIII. PRZECHOWYWANIE I DATA WAŻNOŚCI ODCZYNNIKÓW

- Przed otwarciem lub rekonstytucją wszystkie składniki zestawu zachowują trwałość do daty ważności przedstawionej na etykiecie, jeżeli są przechowywane w temperaturze od 2 do 8°C.
- Po rekonstytucji kontrole zachowują trwałość przez jeden tydzień w temperaturze 2 do 8°C. W razie konieczności przechowywania przez dłuższy okres czasu, należy przygotować niewielkie objętości kontroli, co pozwala przechowywać je w temperaturze -20 °C przez 3 miesiące.
- Świeżo przygotowany roboczy roztwór płuczający powinien być wykorzystany w tym samym dniu.
- Po jego pierwszym zastosowaniu, znacznik izotopowy zachowuje trwałość do podanej daty ważności jeżeli jest przechowywany w oryginalnej, dobrze zamkniętej fiole w temperaturze od 2 do 8°C.
- Zmiany w wyglądzie fizycznym odczynników w zestawie mogą wskazywać na ich niestabilność lub zużycie.

IX. POBIERANIE I PRZYGOTOWANIE MATERIAŁU DO BADANIA

- Próbki surowicy muszą być przechowywane w temperaturze 2-8°C.
- Jeżeli oznaczenie nie jest wykonywane w ciągu 48 godzin, zaleca się przechowywanie w temperaturze -20°C.
- Unikać powtarzanych cykli zamrażania i rozmrażania.
- Surowica i osocze krwi pobranej na heparynę zapewniają podobne wyniki (należy unikać próbek pobranych na cytrynian):
Y (surowica) = 0,92 x (osocze krwi pobranej na heparynę) + 0,10
r = 1,0 n = 18
- Osocze krwi pobranej na EDTA powoduje uzyskiwanie wyników o 15% niższych, niż uzyskiwane z osocza krwi pobranej na heparynę:
Y (surowica) = 1,16 x (osocze krwi pobranej na EDTA) - 0,10
r = 0,99 n = 18

X. PROCEDURA

A. Uwagi dotyczące obsługi

Nie wolno wykorzystywać składników zestawu po upływie daty ważności. Nie wolno mieszać materiałów pochodzących z różnych serii zestawów. Przed wykorzystaniem wszystkie odczynniki powinny osiągnąć temperaturę pokojową. Wszystkie odczynniki i próbki należy dokładnie wymieszać przez delikatne potrząsanie lub obracanie. Aby uniknąć zanieczyszczenia krzyżowego, do dodawania poszczególnych odczynników i próbek należy wykorzystywać czyste końcówki jednorazowe pipet. Pipety wysokiej precyzji lub pipety automatyczne poprawiają precyzję wykonania oznaczenia. Przestrzegać czasów inkubacji. Przygotować krzywą kalibracyjną dla każdego cyklu pomiarowego, nie wolno wykorzystywać danych z poprzednich oznaczeń.

B. Procedura

1. Dla każdego kalibratora, próbki i kontrole należy oznaczyć opłaszczone próbki w badaniach podwójnych. W celu określenia całkowitych zliczeń należy oznaczyć 2 zwykłe próbki
2. Szybko wymieszać wirując: kalibratory, próbki i kontrole, i dozować po 25 μl każdej substancji do odpowiednich próbek.
3. Do każdej próbki, w tym do próbek nieopłaszczonych do całkowitego zliczania, dodać po 0,5 ml 17- α -OH-progesteronu oznakowanego jodem 125 .
4. Delikatnie potrząsnąć statywem w celu uwolnienia uwięzionych pęcherzyków powietrza.
5. Inkubować przez 3 godziny w temperaturze 37°C.
6. Aspirować (lub odlać) zawartość każdej próbki (z wyjątkiem próbek do całkowitego zliczania). Aby usunąć cały płyn należy upewnić się, że plastikowa końcówka aspiratora osiągnęła dno opłaszczonej próbki.
7. Przeplukać próbki przy pomocy 3 ml roboczego roztworu płuczącego (z wyjątkiem próbek do całkowitego zliczania) i aspirować zawartość (lub odlać ją). W trakcie dodawania roboczego roztworu płuczącego należy unikać wytwarzania piany.
8. Pozostawić próbki w pozycji stojącej do góry na dwie minuty i aspirować pozostałe krople płynu.
9. Zliczać próbki w liczniku gamma przez 60 sekund.

XI. OBLICZANIE WYNIKÓW

1. Obliczyć średnią oznaczeń podwójnych.
2. Obliczyć związaną radioaktywność jako odsetek wiązania określonego w zerowym punkcie kalibracji (0) zgodnie z poniższym wzorem:

$$B/B0(\%) = \frac{\text{Liczba zliczeń (dla kalibratora lub próbki)}}{\text{Liczba zliczeń (dla kalibratora zerowego)}} \times 100$$

- Na 3 arkuszach półlogarytmicznych lub papierze milimetrowym wykreślić wartości (B/B0(%)) dla każdego punktu kalibratora jako funkcję stężenia 17- α -OH-progesteronu każdego punktu kalibratora. Odrzucić oczywiste wartości graniczne.
- Do opracowania krzywej kalibracyjnej mogą być wykorzystane również metody wspomagania komputerowego. Jeżeli ma być zastosowane automatyczne przetwarzanie wyników, zaleca się dopasowanie krzywej logistycznej 4 parametrowej.
- Nakładając wartości (B/B0 (%)) próbki należy określić stężenia 17- α -OH-progesteronu w próbkach z krzywej kalibracyjnej.
- Dla każdego oznaczenia należy sprawdzić odsetek całkowitego związanego znacznika izotopowego przy braku nieoznakowanego 17- α -OH-progesteronu (B0/T).

XII. PRZYKŁAD DANYCH TYPOWYCH

Poniższe dane są przedstawione wyłącznie w celach przykładowych i nie powinny być nigdy stosowane zamiast rzeczywistych krzywych kalibracyjnych.

17OH-RIA-CT	cpm	B/Bo (%)
Zliczanie całkowite	48579	
Kalibrator		
0,00 ng/ml	19831	100.0
0.15 ng/ml	15587	78.6
0.53 ng/ml	10398	52.4
1.02 ng/ml	7074	35.7
3.10 ng/ml	2930	14.8
11.10 ng/ml	1028	5.2

XIII. DZIAŁANIE I OGRANICZENIA

A. Granica wykrywania

Dwadzieścia kalibratorów zerowych oznaczano wraz z zestawem innych kalibratorów.

Granica wykrywania, zdefiniowana jako odmienne stężenie dwóch odchyłeń standardowych powyżej przeciętnej wartości zliczania przy wiązaniu zerowym kształtowała się na poziomie 0,02 ng/ml.

B. Swoistość

Swoistość oznaczono przez dodanie do próbek zbiorczych oznaczanych na 17OH znanych ilości ($\pm 0,5$ ng/ml) steroidów, które mogłyby występować w próbkach pobranych od pacjentów.

Składnik	Ilość dodana (ng/ml)	Reaktywność krzyżowa (%)
17OH-progesteron	-	100
Progesteron	500	0.7
17- α -hydroksypregnenolon	1000	0.3
21-deoksykortyzol	1000	0.5
Pregnenolon	500	0.022
11-deoksykortyzol	500	0.5
Kortykosteron	500	ND
11-deoksykortykosteron	500	0.035
Kortyzol	2500	0.008
Testosteron	5000	ND
Androstenedion	5000	0.001
Estradiol	5000	0.001

C. Precyzja

W SERII

POMIĘDZY SERIAMI

Surowica	N	<X> \pm SD (ng/ml)	CV (%)	Surowica	N	<X> \pm SD (ng/ml)	CV (%)
A	10	0.43 \pm 0.03	6.2	A	20	0.77 \pm 0.07	9.2
B	10	2.35 \pm 0.13	5.6	B	20	1.97 \pm 0.10	5.2
C	10	7.55 \pm 0.38	5.1				

SD : Odchylenie standardowe; CV: Współczynnik zmienności

D. Dokładność

BADANIE ROZCIĘCZENIA

Surowica	Rozcieńczenie	Stęż. teoretyczne (ng/ml)	Stęż. zmierzone (ng/ml)
1	1/1	-	3.83
	1/2	1.92	2.16
	1/4	0.96	1.13
	1/8	0.48	0.53
	1/16	0.24	0.25
2	1/1	-	6.65
	1/2	3.33	3.32
	1/4	1.66	2.12
	1/8	0.83	0.88
	1/16	0.42	0.39

Próbki rozcieńczono kalibratorem zerowym.

BADANIE ODZYSKU

Próbka	Dodany 17OH (ng/ml)	Odzysk 17OH (ng/ml)	Odzysk (%)
1	6.65	6.10	92
	5.17	4.32	84
	2.93	2.69	92
	1.25	1.22	98
	0.92	0.87	95
2	7.37	7.23	98
	5.90	5.78	98
	3.60	3.57	99
	2.01	2.14	107
	1.69	1.65	98

Współczynnik przeliczeniowy:

Z ng/ml na nmol/l: $\times 3,03$

Z nmol/l na ng/ml: $\times 0,33$

Zgodnie z naszą najlepszą wiedzą, dla tego parametru nie istnieje międzynarodowy odczynnik referencyjny.

Metoda referencyjna: Oznaczono 50 próbek surowicy uzyskanych od pacjentów (wartości z zakresu od 0,3 ng/ml do 10,0 ng/ml), równolegle przeprowadzając oznaczenie referencyjną metodą ^3H . Wyniki analizy regresji liniowej są całkiem dobre.

17OH-RIA-CT = 0,99 (referencyjna met. ^3H) + 0,06 ng/ml $r = 0,96$

E. Opóźnienie pomiędzy oznaczeniem ostatniego kalibratora i dozowaniem próbki

Jak wykazano, wyniki pomiaru pozostają dokładne nawet wówczas, gdy od momentu dodania kalibratora do opłaszczonych próbek minęło 36 minut.

OPÓŹNIENIE

Surowica (ng/ml)	0'	12'	24'	36'
Surowica 1	0.50	0.58	0.56	0.56
Surowica 2	0.86	0.86	0.93	0.83
Surowica 3	1.22	1.25	1.24	1.26
Surowica 4	1.86	1.90	1.93	1.93
Surowica 5	3.29	3.70	3.46	3.48
Surowica 6	4.52	4.76	5.18	4.65

XIV. WEWNĘTRZNA KONTROLA JAKOŚCI

- Procentowy odsetek całkowitego, związanego znacznika izotopowego przy braku nieoznakowanego 17- α -OH-progesteronu (B0/T) musi być $> 25\%$.
- Jeżeli wyniki uzyskane dla kontroli 1 i/lub 2 nie znajdują się w zakresie określonym na etykiecie fiołki, wyniki nie mogą zostać wykorzystane dopóki nie uda się znaleźć właściwego wyjaśnienia tego odchylenia.
- Jeżeli to konieczne, każde laboratorium może wykonać własne próbki zbiorcze w celach kontrolnych, które powinny być zamrożone w małych objętościach. Nie wolno zamrażać i rozmrażać więcej niż dwukrotnie.
- Dopuszczalne kryteria dotyczące różnicy pomiędzy wynikami oznaczeń podwójnych próbek powinny być zgodne z zasadami prawidłowej pracy w laboratorium.

XV. ZAKRESY REFERENCYJNE

Wartości są przedstawione wyłącznie w celach orientacyjnych, każde laboratorium powinno opracować własne wartości referencyjne.

	Zakres stężeń (2,5 do 97,5% percentyla) (ng/ml)	Liczba osobników
Zdrowi mężczyźni	0.59 – 3.44	72
Zdrowe kobiety		
· Faza folikularna	0.11 - 1.08	48
· Faza lutealna	0.95 - 5.00	49
Ciąża		
· Pierwszy trymestr	2.50 – 9.78	43
· Drugi trymestr	3.40 – 8.50	31
· Trzeci trymestr	4.53 – 18.86	35

XVI. ŚRODKI OSTROŻNOŚCI I OSTRZEŻENIA

Bezpieczeństwo

Tylko do diagnostyki *in vitro*.

Zestaw zawiera ¹²⁵I (Okres połowicznego rozpadu: 60 dni), emitujący promieniowanie jonizujące X (28 keV) i γ (35,5 keV).

Ten produkt radioaktywny może być transportowany i wykorzystany wyłącznie przez osoby autoryzowane; zakup, przechowywanie, stosowanie i wymiana produktów radioaktywnych podlega regulacjom prawnym kraju użytkownika końcowego. W żadnym wypadku produkt nie może być podawany ludziom lub zwierzętom.

Obsługa materiałów radioaktywnych powinno być przeprowadzana w miejscach do tego przeznaczonych, z dala od miejsc ogólnej użyteczności. W laboratorium musi być przechowywany rejestr przyjęć i przechowywania materiałów radioaktywnych. Wyposażenie laboratorium oraz szkło, które może być skażone substancjami radioaktywnymi powinno być oddzielone w celu uniknięcia krzyżowego zanieczyszczenia różnych radioizotopów.

Wszelkie płyny z substancji radioaktywnych muszą być natychmiast oczyszczone zgodnie z procedurami dotyczącymi bezpieczeństwa radiologicznego. Odpady radioaktywne muszą być usuwane zgodnie z miejscowymi przepisami i ogólnie przyjętymi wytycznymi obowiązującymi w laboratorium. Przestrzeganie podstawowych zasad bezpieczeństwa radiologicznego zapewnia wystarczające zabezpieczenie.

Składniki zawierające ludzką krew, dostarczone w zestawie, zostały przebadane metodami zaaprobowanymi przez instytucje europejskie i/lub FDA. Stwierdzono, że nie zawierają one HbsAg, przeciwciał anti-HCV, anti-HIV-1 i 2. Żadna ze znanych metod nie może dać całkowitej pewności że materiały pochodzenia ludzkiego nie przeniosą czynników zakaźnych wirusowego zapalenia wątroby, AIDS i innych. Dlatego postępowanie z odczynnikami i próbkami surowicy lub osocza powinno być zgodne z miejscowymi procedurami dotyczącymi bezpieczeństwa.

Produkty pochodzenia zwierzęcego były pobierane od zdrowych zwierząt. Składniki bydłace pochodzą z krajów, w których nie odnotowano występowania BSE. Pomimo to, składniki zawierające substancje pochodzenia zwierzęcego powinny być traktowane jako potencjalnie zakaźne.

Unikać kontaktu skóry z odczynnikami (zawierają azydek sodowy jako środek konserwujący). Azydek znajdujący się w zestawie może reagować z miedzią i ołowiem w układzie kanalizacyjnym tworząc związki o właściwościach wybuchowych. W czasie płukania odprowadzany płyn należy płukać dużymi objętościami wody, aby zapobiec kumulacji azydów.

Nie wolno palić, spożywać napojów ani pokarmów, bądź używać kosmetyków w miejscu pracy. Nie pipetować ustami. Zakładać ubranie ochronne i rękawiczki jednorazowe.

XVII. 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 Endocrinology 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.

XVIII. PODSUMOWANIE PROTOKOŁU

	CALKOWITA LICZBA ZLICZEŃ μl	KALIBRATORY ml	PRÓBKA(I) KONTROLE ml
Kalibratory (0-5)	-	25	-
Próbki, kontrole	-	-	25
Znacznik izotopowy	500	500	500
Inkubacja	3 godziny w 37°C		
Rozdzielenie Roboczy roztwór płuczący	-	aspiracja 3,0 ml	
Rozdzielenie	aspirować z ostrożnością		
Zliczanie	Zliczanie próbek przez 60 sekund		

Nr katalogowy DIASource: KIP1409	P.I. Number : 1700475/pl	Nr aktualizacji : 110217/1
-------------------------------------	-----------------------------	-------------------------------

Data wydania : 2011-02-17

Leia todo o protocolo antes de utilizar.

17OH-RIA-CT

I. UTILIZAÇÃO PREVISTA

Radioimunoensaio para adeterminação quantitativa *in vitro* do 17- α -hidroxiprogesterona (17OH) humano no soro e no plasma.

II. INFORMAÇÕES GERAIS

- A. **Nome do proprietário :** DIAsource-Kit 17OH-RIA-CT
- B. **Número do catálogo :** KIP1409 : 96 testes
- C. **Produzido por :** DIAsource ImmunoAssays S.A.
Rue du Bosquet, 2, B-1348 Louvain-la-Neuve, Bélgica.

Para obter informações sobre aquisição ou assistência técnica , contacte :
Bélgica Tel : +32 (0)10 84.99.11 Fax : +32 (0)10 84.99.90
Ou o representante local

III. SIGNIFICADO CLÍNICO-

A *Atividade Biológica da 17- α -hidroxiprogesterona*

17- α -hidroxiprogesterona (17OH) é um hormônio esteróide C-21 (peso molecular 330.3) que é produzido pela 17- α -hedroxi pregnenolona na adrenal e também nos ovários, testículos e placenta. 17OH é hidroxilado na posição 11 e 21 para produzir cortisol via 11-deoxicortisol.

B. *Aplicações Clínicas da determinação da 17- α -hidroxiprogesterona*


Como regra, a dosagem de 17OH em soro ou fluido amniótico são relevantes para o diagnóstico da hiperplasia adrenal congênita (HAC). Esta HAC é devido ao defeito específico na enzima (seis diferentes deficiências enzimáticas tem sido descritas). Como resultado destas deficiências, há um aumento de ACTH produzindo hiperplasia adrenal e elevação de muitos precursores esteróides . Mas é também muito interessante para conhecer o valor de 17OH em pacientes com varicocele. (17OH e testosterona representam marcadores da função das células de Leydig) e em pacientes homens mais velhos, para detectar Hipertrofia Prostática Benigna (BPH) e carcinoma de próstata (PCA) (plasma 17OH é significativamente baixo em grupos PCA e BPH quando comparados com homens normais).

Existem outros pontos para investigações com 17OH como : infertilidade masculina, mulheres com virilização peripubertal, crianças com adrenarca prematura (nestes casos, os valores de 17OH são aumentados sem ou após ACTH estimulação).

IV. PRINCÍPIO DO MÉTODO

Uma quantidade fixa de 17OH marcado com ^{125}I compete com o 17OH a ser medido, que esteja presente na amostra ou no calibrador, para uma quantidade fixa de locais de anticorpo, que é imobilizado nas paredes dos tubos de poliestireno. Nem a extração nem a cromatografia são necessárias, devido à elevada especificidade dos anticorpos revestidos. Após uma incubação de 3 horas à 37°C, a reacção de competição termina com a operação de aspiração. A seguir os tubos são lavados com 3ml de solução de lavagem de trabalho e novamente aspirados. Traça-se uma curva de calibração e as concentrações de 17OH nas amostras são determinadas por interpolação da dose a partir da curva de calibração.

V. REAGENTES FORNECIDOS

Reagentes	Kit 96 Testes	Código de cor	Reconstituição			
 Tubos revestidos com anti 17OH	2 x 48	roxo	Pronto para utilizar			
<table border="1" data-bbox="108 645 247 689"><tr><td>Ag</td><td>^{125}I</td></tr></table> Marcador: 17OH marcado com ^{125}I (grau HPLC) em tampão fosfato / ácido cítrico com soro bovina albumina e azida (<0,1%)	Ag	^{125}I	1 recipiente 55 ml 190 kBq	vermelho	Pronto para utilizar	
Ag	^{125}I					
<table border="1" data-bbox="108 817 247 862"><tr><td>CAL</td><td>0</td></tr></table> Calibrador Zero em soro human e azida (0,5%)	CAL	0	1 recipiente 3 ml	amarelo	Pronto para utilizar	
CAL	0					
<table border="1" data-bbox="108 913 247 958"><tr><td>CAL</td><td>N</td></tr></table> Calibradores 17OH - N = 1 para 5 (ver os valores exactos nos rótulos do recipiente) em soro human e azida (0,5%)	CAL	N	5 recipientes 0,5 ml	amarelo	Pronto para utilizar	
CAL	N					
<table border="1" data-bbox="63 1064 311 1108"><tr><td>WAS</td><td>SOLN</td><td>70x</td></tr></table> Solução de lavagem (TRIS-HCl)	WAS	SOLN	70x	1 recipiente 10 ml	castanho	Dilua 70 x com água destilada (use um agitador magnético).
WAS	SOLN	70x				
<table border="1" data-bbox="95 1160 263 1205"><tr><td>CONTR</td><td>N</td></tr></table> Controlos - N = 1 ou 2 No soro humano e timol	CONTR	N	2 recipientes liofilizados	prateado	Adicione 0,5 ml de água destilada	
CONTR	N					

Note : Use o calibrador zero para diluições de amostras.

VI. MATERIAL NÃO FORNECIDO

O seguinte material é necessário, mas não fornecido com o kit:

1. Água destilada
2. Pipetas automáticas: 25 µl, 500 µl e 3 ml (recomenda-se a utilização de pipetas precisas, com pontas descartáveis)
3. Misturador de vortex
4. Agitador magnético
5. Banho maria à 37°C
6. Pipeta automática de 5 ml para lavagem (tipo Cornwall)
7. Sistema de aspiração (opcional)
8. Qualquer contador gamma capaz de medir ^{125}I pode ser utilizado (min alcance de 70%).

VII. PREPARAÇÃO DOS REAGENTES

- A. **Controlos** : Reconstitua os controlos com 0,5 ml de água destilada.
- B. **Solução de lavagem de trabalho** : Prepare um volume adequado de Solução de lavagem de trabalho ao adicionar 69 volumes de água destilada para 1 volume de solução de lavagem (70x). Use um agitador magnético para homogeneizar. Rejeite a solução não utilizada no final do dia.

VIII. ARMAZENAMENTO E PRAZO DE VALIDADE DOS REAGENTES

- Antes de abrir e reconstituir, todos os componentes do kit são estáveis até ao final do prazo de validade, indicado no rótulo desde que mantido entre 2 to 8°C.
- Após reconstituição, os controlos são estáveis durante 1 semana entre 2 a 8°C. Durante períodos de armazenamento mais longos, devem ser feitas alíquotas e mantidas a -20°C por 3 meses
- A solução de lavagem de trabalho deve ser feita e utilizada no mesmo dia.
- Depois da 1ª utilização o marcador é estável até final do prazo de validade,

desde que mantido no recipiente original, bem fechado entre 2 to 8°C.
- Alterações no aspecto dos reagentes do kit podem indicar instabilidade ou degradação.

IX. RECOLHA E PREPARAÇÃO DE AMOSTRAS

- Amostras de soro ou plasma devem ser mantidas entre 2-8°C.
- Se a análise não for realizada em 48 hrs, recomenda-se conservar a -20°C.
- Evite ciclos de congelamento e descongelamento sucessivos.
- Plasma heparinizado o soro dá resultados similares (permite amostras citrato)
 $Y (\text{Soro}) = 0,92 \times (\text{plasma hep.}) + 0,10 \quad r = 1,0 \quad n = 18$
- O plasma com EDTA tem resultados 15 % mais baixos do que o soro :
 $Y (\text{Serum}) = 1,16 \times (\text{plasma com EDTA}) - 0,10 \quad r = 0,99 \quad n = 18$

X. PROCEDIMENTO

A. Notas de manipulação

Não utilize o kit ou qualquer componente depois da expiração do prazo de validade. Não misture componentes de diferentes lotes. Antes de utilizar todos os componentes devem estar à temperatura ambiente (TA). Misture bem os reagentes e as amostras, por agitação ou rotação suaves. Para evitar contaminações cruzadas utilize uma ponta de pipeta limpa e descartável, para adição de cada componente. Pipetas de alta precisão ou equipamento automático de pipetagem melhoram a precisão. Respeite os períodos de incubação. Prepare uma curva de calibração para cada análise, não utilize dados de análises prévias.

B. Procedimento

1. Rotule os tubos revestidos em duplicado, para cada calibrador, amostra, controlo. Para a determinação das contagens totais, rotule 2 tubos normais.
2. Agite ligeiramente no vortex calibradores, amostras e controlos e dispense 25µl de cada, para os tubos respectivos.
3. Dispense 0,5 ml de 17OH marcado com I 125 para cada tubo, incluindo os tubos normais para as contagens totais.
4. Agite suavemente o suporte dos tubos, para libertar possíveis bolhas de ar.
5. Incube durante 3 horas à 37°C.
6. Aspire o conteúdo de cada tubo (excepto os das contagens totais). Assegure-se que a ponta plástica do aspirador atinge o fundo do tubo revestido, para remover todo o líquido.
7. Lave os tubos com 3 ml de solução de lavagem de trabalho (excepto os das contagens totais) e aspire. Evite formação de espuma quando adiciona a solução de lavagem.
8. Depois da lavagem, deixe os tubos direitos durante 2 minutos e seguidamente aspire a última porção de líquido.
9. Conte os tubos num contador gamma durante 60 segundos.

XI. CÁLCULO DOS RESULTADOS

1. Calcule a média das determinações em duplicata.
2. Calcule a radioactividade de ligação como uma percentagem da ligação determinada no ponto do calibrador zero (0), de acordo com a fórmula seguinte:

$$B/B_0(\%) = \frac{\text{Contagens (Calibrador ou amostra)}}{\text{Contagens (calibrador Zero)}} \times 100$$

3. Utilizando um papel de gráfico semi-logarítmico de 3 ciclos ou logit-log trace os valores (B/B₀(%)) para cada ponto de calibração como uma função da concentração do 17OH em cada ponto, rejeitando os "outliers" (casos marginais) óbvios.
4. Os métodos informáticos também podem ser utilizados para construir a curva de calibração. Se o processamento dos resultados for automático, ajuste na curva da função logística com 4 parâmetros é recomendado.
5. Por interpolação dos valores das amostras (B/B₀(%)), determine as concentrações de 17OH das amostras da curva de referência.
6. Para cada análise, a percentagem de marcador total ligado na ausência de 17OH (B₀/T) marcado, deve ser verificada.

XII. DADOS TÍPICOS

Os dados seguintes são apenas para exemplificação e nunca devem ser utilizados em detrimento dos dados reais da curva de calibração.

17OH-RIA-CT	cpm	B/Bo (%)
Contagens total	48579	
Calibrador		
0,00 ng/ml	19831	100,0
0,15 ng/ml	15587	78,6
0,53 ng/ml	10398	52,4
1,02 ng/ml	7074	35,7
3,10 ng/ml	2930	14,8
11,10 ng/ml	1028	5,2

XIII. DESEMPENHO E LIMITES

A. Limite de detecção

Foram analisados 20 calibradores zero, juntamente com um conjunto de outros calibradores.

O limite de detecção, definido como a concentração aparente, 2 DP abaixo das contagens médias com zero ligações, foi de 0,02 ng/ml.

B. Especificidade

A especificidade foi estimada por um pool de amostras 17OH ($\pm 0,5$ ng/ml) reforçadas com esteróides os quais devem estar presentes em amostras dos pacientes.

Composto	Quantidade adicionada (ng/ml)	Reactividade-cruzada (%)
17OH-Progesterona	-	100
Progesterona	500	0,7
17- α -hidroxipregnenolona	1000	0,3
21-deoxicortisol	1000	0,5
Pregnenolona	500	0,022
11-deoxicortisol	500	0,5
Corticosterona	500	ND
11-deoxicorticosterona	500	0,035
Cortisol	2500	0,008
Testosterona	5000	ND
Androstenediona	5000	0,001
Estradiol	5000	0,001

C. Precisão

PRECISÃO INTRA-ENSAIO

PRECISÃO INTER-ENSAIO

Soro	N	<X> \pm DP (ng/ml)	CV (%)	Soro	N	<X> \pm DP (ng/ml)	CV (%)
A	10	0,43 \pm 0,03	6,2	A	20	0,77 \pm 0,07	9,2
B	10	2,35 \pm 0,13	5,6	B	20	1,97 \pm 0,10	5,2
C	10	7,55 \pm 0,38	5,1				

DP: Desvio Padrão; CV: Coeficiente de variação

D. Exactidão

TESTE DE DILUIÇÃO

Amostra	Diluição	Conc. teórico (ng/ml)	Conc. medida (ng/ml)
1	1/1	-	3,83
	1/2	1,92	2,16
	1/4	0,96	1,13
	1/8	0,48	0,53
	1/16	0,24	0,25
2	1/1	-	6,65
	1/2	3,33	3,32
	1/4	1,66	2,12
	1/8	0,83	0,88
	1/16	0,42	0,39

As amostras foram diluídas com calibrador zero.

TESTE DE RECUPERAÇÃO

Amostra	17OH adicionado (ng/ml)	17OH recuperado (ng/ml)	Recuperação (%)
1	6,65	6,10	92
	5,17	4,32	84
	2,93	2,69	92
	1,25	1,22	98
	0,92	0,87	95
2	7,37	7,23	98
	5,90	5,78	98
	3,60	3,57	99
	2,01	2,14	107
	1,69	1,65	98

Fator de conversão:

De ng/ml para nmol/L : $\times 3,03$

De nmol/L para ng/ml : $\times 0,33$

Não existe material de referência internacional para este parâmetro, que seja do nosso conhecimento

Método de referência: 50 amostras de soro de pacientes (valores de 0,3 ng/ml a 10,0 ng/ml) foram analisados junto com o método comum de referência. A análise de regressão linear é quase boa.

17OH-RIA-CT = 0,99 (3 H referência) + 0,06 ng/ml $r = 0,96$

E. Intervalo de atraso de tempo entre o último calibrador e a dispensa de amostra

Conforme demonstrado a seguir, os resultados das análises continuam precisos, mesmo quando é dispensada uma amostra 36 minutos depois da adição do calibrador aos tubos revestidos.

INTERVALO DE ATRASO DE TEMPO

Soro (ng/ml)	0'	12'	24'	36'
Serum 1	0,50	0,58	0,56	0,56
Serum 2	0,86	0,86	0,93	0,83
Serum 3	1,22	1,25	1,24	1,26
Serum 4	1,86	1,90	1,93	1,93
Serum 5	3,29	3,70	3,46	3,48
Serum 6	4,52	4,76	5,18	4,65

XIV. CONTROLO DE QUALIDADE INTERNO

- A percentagem total de marcadores ligados na ausência de 17OH não marcados (B0/T) deve ser $> 25\%$.
- Se os resultados obtidos para o controlo 1 e/ou controlo 2 não estão dentro do intervalo especificado no rótulo do recipiente, os resultados não podem ser utilizados, a menos que seja dada uma explicação satisfatória para a discrepância encontrada.
- Se for desejável, cada laboratório pode fazer os seus próprios conjuntos de amostras de controlo, que podem ser mantidas congeladas em alíquotas. Não faça ciclos de congelação/descongelação mais do que 2 vezes.
- Aceitação do critério para a diferença entre os resultados em duplicatas das amostras devem ser realizadas em Boas Práticas de Laboratório.

XV. INTERVALOS DE REFERÊNCIA

Estes valores são dados apenas por segurança; cada laboratório deve estabelecer seus próprios valores normais.

	Varição de concentração (2,5 a 97,5%) (ng/ml)	Números de indivíduos
Homens normais	0,59 – 3,44	72
Mulheres normais		
. Fase folicular	0,11 - 1,08	48
. Fase Luteal	0,95 - 5,00	49
Gravidez		
. Primeiro trimestre	2,50 – 9,78	43
. Segundo trimestre	3,40 – 8,50	31
. Terceiro trimestre	4,53 – 18,86	35

XVI. AVISOS E PRECAUÇÕES

Segurança

Apenas para uso em diagnóstico *in vitro*.

Este kit contém ¹²⁵I (meia-vida: 60 dias), emitindo radiações X (28 keV) e γ (35.5 keV) ionizantes.

Este produto radioactivo pode apenas ser transportado e utilizado por pessoal autorizado: a compra, armazenamento, utilização e troca de produtos radioactivos estão sujeitas à legislação nacional vigente. Em nenhum caso, este produto pode ser administrados a seres humanos ou a animais.

Toda a manipulação radioactiva deve ser efectuada em local próprio e exclusivo para tal. Deve ser mantido no laboratório, um livro de registo para a recepção e armazenamento de material radioactivo. O equipamento do laboratório e equipamento de vidro que possa ser contaminado com radioactividade, deve ser segregado para evitar contaminação cruzada com diferentes isótopos. Qualquer derrame de material radioactivo deve ser imediatamente limpo, de acordo com os procedimentos de radioprotecção. O lixo radioactivo deve ser rejeitado de acordo com a legislação vigente e as regras do laboratório. A adesão às regras básicas da radiosegurança, fornece a protecção adequada.

Os componentes de sangue humano incluídos neste kit foram testados por métodos aprovados pela legislação europeia e/ou FDA e dados como negativos para o HBsAg, anti-HCV, anti-HIV-1 e 2. Não existe nenhum método, até agora conhecido, que oferece total segurança quanto à impossibilidade de transmissão de hepatite, HIV ou outras infecções, por via do sangue humano. Por isso, deve manipular os reagentes, o soro ou o plasma de acordo com as regras locais de segurança, quanto a materiais potencialmente infecciosos.

Todos os produtos de origem animal e seus derivados foram recolhidos de animais saudáveis. Os componentes bovinos, vieram de países sem casos notificados de BSE. No entanto, todos estes componentes devem ser manipulados como potencialmente infecciosos.

Evite o contacto da pele e mucosas com os reagentes (azida sódica como conservante). A azida pode reagir com o chumbo e o cobre das canalizações e formar compostos explosivos. Rejeitar com abundante quantidade de água corrente para evitar acumulações destes compostos.

Não fume, coma, beba ou aplique cosméticos na área de trabalho. Não pipete com o auxílio da boca. Use vestuário adequado de protecção e luvas.

XVII. 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 adrenence.
Journal of Clinical Endocrinology 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.

XVIII. RESUMO DO PROTOCOLO

	CONTAGENS TOTAIS (μ l)	CALIBRA- DORES (μ l)	CONTROLO S DAS AMOSTRAS (μ l)
Calibradores (0 to 5)	-	25	-
Amostras, controlos e marcadores	- 500	- 500	25 500
Incubação	3 horas a 37°C		
Separação Solução de lavagem de trabalho Separação	-	aspirar 3,0 ml aspirar	
Contagem	Contar os tubos durante 60 segundos		

Nº do catálogo DIAsource : KIP1409	Nº de P.I.: 1700475/pt	Nº de revisão : 110217/1
---------------------------------------	---------------------------	-----------------------------

Data da revisão : 2011-02-17

	Used symbols
	Consult instructions for use
	Storage temperature
	Use by
LOT	Batch code
REF	Catalogue number
CONTROL	Control
I V D	In vitro diagnostic medical device
	Manufacturer
	Contains sufficient for <n> tests
WASH SOLN CONC	Wash solution concentrated
CAL 0	Zero calibrator
CAL N	Calibrator #
CONTROL N	Control #
Ag 1251	Tracer
Ab 1251	Tracer
Ag 1251 CONC	Tracer concentrated
Ab 1251 CONC	Tracer concentrated
	Tubes
INC BUF	Incubation buffer
ACETONITRILE	Acetonitrile
SERUM	Serum
DIL SPE	Specimen diluent
DIL BUF	Dilution buffer
ANTISERUM	Antiserum
IMMUNOADSORBENT	Immunoabsorbent
DIL CAL	Calibrator diluent
REC SOLN	Reconstitution solution
PEG	Polyethylene glycol
EXTR SOLN	Extraction solution
ELU SOLN	Elution solution
GEL	Bond Elut Silica cartridges
PRE SOLN	Pre-treatment solution
NEUTR SOLN	Neutralization solution
TRACEUR BUF	Tracer buffer
µP	Microtiterplate
Ab HRP	HRP Conjugate
Ag HRP	HRP Conjugate
Ab HRP CONC	HRP Conjugate concentrate
Ag HRP CONC	HRP Conjugate concentrate
CONJ BUF	Conjugate buffer
CHROM TMB CONC	Chromogenic TMB concentrate
CHROM TMB	Chromogenic TMB solution
SUB BUF	Substrate buffer
STOP SOLN	Stop solution
INC SER	Incubation serum
BUF	Buffer
Ab AP	AP Conjugate
SUB PNPP	Substrate PNPP
BIOT CONJ CONC	Biotin conjugate concentrate
AVID HRP CONC	Avidine HRP concentrate
ASS BUF	Assay buffer
Ab BIOT	Biotin conjugate
Ab	Specific Antibody
SAV HRP CONC	Streptavidin HRP concentrate
NSB	Non-specific binding
2nd Ab	2nd Antibody
ACID BUF	Acidification Buffer
DIST	Distributor

	<u>Symboles utilisés</u>
	Consulter les instructions d'utilisation
	Température de conservation
	Utiliser jusqu'à
LOT	Numéro de lot
REF	Référence de catalogue
CONTROL	Contrôle
I V D	Dispositif médical de diagnostic in vitro
	Fabricant
	Contenu suffisant pour <n> tests
WASH SOLN CONC	Solution de lavage concentrée
CAL 0	Calibrateur zéro
CAL N	Calibrateur #
CONTROL N	Contrôle #
Ag 125I	Traceur
Ab 125I	Traceur
Ag 125I CONC	Traceur concentré
Ab 125I CONC	Traceur concentré
	Tubes
INC BUF	Tampon d'incubation
ACETONITRILE	Acétonitrile
SERUM	Sérum
DIL SPE	Diluant du spécimen
DIL BUF	Tampon de dilution
ANTISERUM	Antisérum
IMMUNOADSORBENT	Immunoabsorbant
DIL CAL	Diluant de calibrateur
REC SOLN	Solution de reconstitution
PEG	Glycol Polyéthylène
EXTR SOLN	Solution d'extraction
ELU SOLN	Solution d'elution
GEL	Cartouches Bond Elut Silica
PRE SOLN	Solution de pré-traitement
NEUTR SOLN	Solution de neutralisation
TRACEUR BUF	Tampon traceur
TIT	Microplaque de titration
Ab HRP	HRP Conjugué
Ag HRP	HRP Conjugué
Ab HRP CONC	HRP Conjugué concentré
Ag HRP CONC	HRP Conjugué concentré
CONJ BUF	Tampon conjugué
CHROM TMB CONC	Chromogène TMB concentré
CHROM TMB	Solution chromogène TMB
SUB BUF	Tampon substrat
STOP SOLN	Solution d'arrêt
INC SER	Sérum d'incubation
BUF	Tampon
Ab AP	AP Conjugué
SUB PNPP	Tampon PNPP
BIOT CONJ CONC	Biotine conjugué concentré
AVID HRP CONC	Avidine HRP concentré
ASS BUF	Tampon de test
Ab BIOT	Biotine conjugué
Ab	Anticorps spécifique
SAV HRP CONC	Concentré streptavidine HRP
NSB	Liant non spécifique
2nd Ab	Second anticorps
ACID BUF	Tampon d'acidification

	<u>Gebrauchte Symbolen</u>
	Gebrauchsanweisung beachten
	Lagern bei
	Verwendbar bis
LOT	Chargenbezeichnung
REF	Bestellnummer
CONTROL	Kontrolle
I V D	In Vitro Diagnostikum
	Hersteller
	Ausreichend für <n> Ansätze
WASH SOLN CONC	Waschlösung-Konzentrat
CAL 0	Null kalibrator
CAL N	Kalibrator #
CONTROL N	Kontrolle #
Ag 125I	Tracer
Ab 125I	Tracer
Ag 125I CONC	Tracer Konzentrat
Ab 125I CONC	Tracer Konzentrat
	Röhrchen
INC BUF	Inkubationspuffer
ACETONITRILE	Azetonitril
SERUM	Humanserum
DIL SPE	Probenverdünner
DIL BUF	Verdünnungspuffer
ANTISERUM	Antiserum
IMMUNOADSORBENT	Immunadsorbens
DIL CAL	Kalibratorverdünnung
REC SOLN	Rekonstitutionslösung
PEG	Polyethylenglykol
EXTR SOLN	Extraktionslösung
ELU SOLN	Eluierungslösung
GEL	Bond Elut Silikakartuschen
PRE SOLN	Vorbehandlungslösung
NEUTR SOLN	Neutralisierungslösung
TRACEUR BUF	Tracer-Puffer
U U	Mikrotiterplatte
Ab HRP	HRP Konjugat
Ag HRP	HRP Konjugat
Ab HRP CONC	HRP Konjugat Konzentrat
Ag HRP CONC	HRP Konjugat Konzentrat
CONJ BUF	Konjugatpuffer
CHROM TMB CONC	Chromogenes TMB Konzentrat
CHROM TMB	Farblösung TMB
SUB BUF	Substratpuffer
STOP SOLN	Stopplösung
INC SER	Inkubationsserum
BUF	Puffer
Ab AP	AP Konjugat
SUB PNPP	Substrat PNPP
BIOT CONJ CONC	Biotin-Konjugat-Konzentrat
AVID HRP CONC	Avidin-HRP-Konzentrat
ASS BUF	Assaypuffer
Ab BIOT	Biotin-Konjugat
Ab	Spezifischer Antikörper
SAV HRP CONC	HRP Streptavidinkonzentrat
NSB	Unspezifische Bindung
2nd Ab	Sekundärer Antikörper
ACID BUF	Ansäuerungspuffer

	<u>Gebruikte symbolen</u>
	Raadpleeg de gebruiksaanwijzing
	Bewaartemperatuur
	Houdbaar tot
LOT	Lotnummer
REF	Catalogusnummer
CONTROL	Controle
I V D	Medisch hulpmiddel voor in-vitro diagnostiek
	Fabrikant
	Inhoud voldoende voor <n> testen
WASH SOLN CONC	Wasoplossing, geconcentreerd
CAL 0	Nulkalibrator
CAL N	Kalibrator #
CONTROL N	Controle #
Ag 125I	Tracer
Ab 125I	Tracer
Ag 125I CONC	Tracer geconcentreerd
Ab 125I CONC	Tracer geconcentreerd
	Buisjes
INC BUF	Incubatiebuffer
ACETONITRILE	Acetonitrile
SERUM	Serum
DIL SPE	Specimen diluent
DIL BUF	Verdunningsbuffer
ANTISERUM	Antiserum
IMMUNOADSORBENT	Immunoabsorbent
DIL CAL	Kalibratorverdunner
REC SOLN	Reconstitutieplossing
PEG	Polyethyleen glycol
EXTR SOLN	Extractieplossing
ELU SOLN	Elutieoplossing
GEL	Bond Elut Silica kolom
PRE SOLN	Pre-behandelingsoplossing
NEUTR SOLN	Neutralisatieoplossing
TRACEUR BUF	Tracerbuffer
TIT	Microtiterplaat
Ab HRP	HRP Conjuugaat
Ag HRP	HRP Conjuugaat
Ab HRP CONC	HRP Conjuugaat geconcentreerd
Ag HRP CONC	HRP Conjuugaat geconcentreerd
CONJ BUF	Conjuugaat buffer
CHROM TMB CONC	Chromogene TMB geconcentreerd
CHROM TMB	Chromogene Oplossing TMB
SUB BUF	Substraatbuffer
STOP SOLN	Stopoplossing
INC SER	Incubatieserum
BUF	Buffer
Ab AP	AP Conjuugaat
SUB PNPP	Substraat PNPP
BIOT CONJ CONC	Geconcentreerd Biotine conjuugaat
AVID HRP CONC	Geconcentreerd Avidine-HRP conjuugaat
ASS BUF	Assay buffer
Ab BIOT	Biotine conjuugaat
Ab	Specifiek antilichaam
SAV HRP CONC	Streptavidine-HRP concentraat
NSB	Aspecifieke binding
2nd Ab	2de antilichaam
ACID BUF	Verzuringbuffer

	<u>Símbolos utilizados</u>
	Consultar las instrucciones de uso
	Limitación de temperatura
	Fecha de caducidad
LOT	Código de lote
REF	Número de catálogo
CONTROL	Control
I V D	Producto sanitario para diagnóstico in vitro
	Fabricante
	Contenido suficiente para <n> ensayos
WASH SOLN CONC	Solución de lavado concentrada
CAL 0	Calibrador cero
CAL N	Calibrador #
CONTROL N	Control #
Ag 125I	Trazador
Ab 125I	Trazador
Ag 125I CONC	Trazador concentrada
Ab 125I CONC	Trazador concentrada
	Tubos
INC BUF	Tampón de incubación
ACETONITRILE	Acetonitrilo
SERUM	Suero
DIL SPE	Diluyente de Muestra
DIL BUF	Tampón de dilución
ANTISERUM	Antisuero
IMMUNOADSORBENT	Inmunoadsorbente
DIL CAL	Diluyente de calibrador
REC SOLN	Solución de Reconstitución
PEG	Glicol Polietileno
EXTR SOLN	Solución de extracción
ELU SOLN	Solución de elución
GEL	Cartuchos Bond Elut Silica
PRE SOLN	Solución de Pre-tratamiento
NEUTR SOLN	Solución de Neutralización
TRACEUR BUF	Tampón de trazador
TLU	Placa de microvaloración
Ab HRP	HRP Conjugado
Ag HRP	HRP Conjugado
Ab HRP CONC	HRP Conjugado concentrada
Ag HRP CONC	HRP Conjugado concentrada
CONJ BUF	Tampón de Conjugado
CHROM TMB CONC	Cromógena TMB concentrada
CHROM TMB	Solución Cromógena TMB
SUB BUF	Tampón de sustrato
STOP SOLN	Solución de Parada
INC SER	Suero de Incubación
BUF	Tampón
Ab AP	AP Conjugado
SUB PNPP	Sustrato PNPP
BIOT CONJ CONC	Concentrado de conjugado de biotina
AVID HRP CONC	Concentrado avidina-HRP
ASS BUF	Tampón de ensayo
Ab BIOT	Conjugado de biotina
Ab	Anticuerpo específico
SAV HRP CONC	Estreptavidina-HRP Concentrado
NSB	Unión no específica
2nd Ab	Segundo anticuerpo
ACID BUF	Tampón de Acidificación

	<u>Simboli utilizzati</u>
	Consultare le istruzioni per l'uso
	Limitazioni di temperatura
	Utilizzare entro
LOT	Numero di lotto
REF	Numero di catalogo
CONTROL	Controllo
I V D	Dispositivo medico-diagnostico in vitro
	Fabbricante
	Contenuto sufficiente per <n> saggi
WASH SOLN CONC	Tampone di lavaggio concentrato
CAL 0	Calibratore zero
CAL N	Standard #
CONTROL N	Controllo #
Ag 125I	Marcato
Ab 125I	Marcato
Ag 125I CONC	Marcato concentrato
Ab 125I CONC	Marcato concentrato
	Provette
INC BUF	Tampone incubazione
ACETONITRILE	Acetonitrile
SERUM	Siero
DIL SPE	Diluyente campione
DIL BUF	Tampone diluizione
ANTISERUM	Antisiero
IMMUNOADSORBENT	Immunoassorbente
DIL CAL	Diluyente calibratore
REC SOLN	Soluzione di ricostituzione
PEG	Polietilenglicole
EXTR SOLN	Soluzione di estrazione
ELU SOLN	Soluzione di eluizione
GEL	Cartucce di silice bond elut
PRE SOLN	Soluzione di pretrattamento
NEUTR SOLN	Soluzione di neutralizzazione
TRACEUR BUF	Tracer Buffer
U U	Piastra di microtitolazione
Ab HRP	HRP Coniugato
Ag HRP	HRP Coniugato
Ab HRP CONC	HRP Coniugato concentrato
Ag HRP CONC	HRP Coniugato concentrato
CONJ BUF	Buffer coniugato
CHROM TMB CONC	Cromogena TMB concentrato
CHROM TMB	Soluzione cromogena TMB
SUB BUF	Tampone substrato
STOP SOLN	Soluzione di arresto
INC SER	Incubazione con siero
BUF	Buffer
Ab AP	AP Coniugato
SUB PNPP	Substrato PNPP
BIOT CONJ CONC	Concentrato coniugato con biotina
AVID HRP CONC	Concentrato avidina HRP
ASS BUF	Soluzione tampone per test
Ab BIOT	Coniugato con biotina
Ab	Anticorpo Specifico
SAV HRP CONC	Streptavidina-HRP concentrata
NSB	Legame non-specifico
2nd Ab	2° Anticorpo
ACID BUF	Tampone Acidificante

	<u>Επεξήγηση συμβόλων</u>
	Συμβουλευτείτε τις οδηγίες χρήσης
	Θερμοκρασία αποθήκευσης
	Ημερομηνία λήξης
LOT	Αριθμός παρτίδας
REF	Αριθμός καταλόγου
CONTROL	Πρότυπο ελέγχου
I V D	In Vitro Διαγνωστικό Ιατροτεχνολογικό προϊόν
	Κατασκευαστής
	Περιεχόμενο επαρκές για «n» εξετάσεις
WASH SOLN CONC	Συμπυκνωμένο διάλυμα έκπλυσης
CAL 0	Μηδενικός βαθμονομητής
CAL N	Βαθμονομητής #
CONTROL N	Ορός ελέγχου #
Ag 125I	Ιζηθέτης
Ab 125I	Ιζηθέτης
Ag 125I CONC	Χρωμογόνος Ιζηθέτης
Ab 125I CONC	Χρωμογόνος Ιζηθέτης
	Σωληνάκια
INC BUF	Ρυθμιστικό διάλυμα επώασης
ACETONITRILE	Ακετονιτρίλιο
SERUM	Ορός
DIL SPE	Διάλυμα αραιώσεως δειγμάτων
DIL BUF	Ρυθμιστικό διάλυμα αραιώσεως
ANTISERUM	Αντιορός
IMMUNOADSORBENT	Ανοσοπροσροφητικό
DIL CAL	Αραιωτικό βαθμονομητών
REC SOLN	Διάλυμα ανασύστασης
PEG	Πολυαιθυλενογλυκόλη
EXTR SOLN	Διάλυμα εκχύλισης
ELU SOLN	Διάλυμα έκλυσης
GEL	Φύσιγγες πυριτίου Bond Elut
PRE SOLN	Διάλυμα προεπεξεργασίας
NEUTR SOLN	Διάλυμα εξουδετέρωσης
TRACEUR BUF	Ρυθμιστικό διάλυμα
TLT	Πλάκα μικροτιτλοδότησης
Ab HRP	HRP Σύζευγμα
Ag HRP	HRP Σύζευγμα
Ab HRP CONC	Χρωμογόνος HRP Σύζευγμα
Ag HRP CONC	Χρωμογόνος HRP Σύζευγμα
CONJ BUF	Ρυθμιστικό διάλυμα συζεύγματος
CHROM TMB CONC	Χρωμογόνος TMB
CHROM TMB	Διάλυμα χρωμογόνου TMB
SUB BUF	Ρυθμιστικό διάλυμα υποστρώματος
STOP SOLN	Ανασχετικό αντιδραστήριο
INC SER	Ορός επώασης
BUF	Ρυθμιστικό διάλυμα
Ab AP	AP Σύζευγμα
SUB PNPP	PNPP υποστρώματος
BIOT CONJ CONC	Συμπυκνωμένο αντιδραστήριο συζευγμένο με βιοτίνη
AVID HRP CONC	Συμπυκνωμένο διάλυμα αβιδίνης-HRP
ASS BUF	Ρυθμιστικό διάλυμα προσδιορισμού
Ab BIOT	αντιδραστήριο συζευγμένο με βιοτίνη
Ab	Ειδικό Αντίσωμα
SAV HRP CONC	Συμπυκνωμένη στρεπταβιδίνη συνεξευγμένη με HRP
NSB	μη-ειδική δέσμευση
2nd Ab	2ο Αντίσωμα
ACID BUF	Ρυθμιστικό Διάλυμα όξινο

	<u>Használt szimbólumok</u>
	Olvassa el a használati útmutatót
	Tárolási hőmérséklet
	Lejárat idő
LOT	Gyártási kód
REF	Katalógus szám
CONTROL	Kontrol
I V D	In vitro diagnosztikai eszköz
	Gyártó
	Tartalma <n> teszt elvégzésére elegendő
WASH SOLN CONC	Mosó folyadék koncentrátum
CAL 0	Zero kalibrátor
CAL N	Kalibrátor #
CONTROL N	Kontrol #
Ag 125I	Nyomjelző izotóp
Ab 125I	Nyomjelző izotóp
Ag 125I CONC	Nyomjelző izotóp koncentrátum
Ab 125I CONC	Nyomjelző izotóp koncentrátum
	Csővek
INC BUF	Inkubáló puffer
ACETONITRILE	Acetonitril
SERUM	Szérum
DIL SPE	Mintahígító
DIL BUF	Hígító puffer
ANTISERUM	Antiszérum
IMMUNOADSORBENT	Immunadszorbens
DIL CAL	Kalibrátor hígító
REC SOLN	Mintaelőkészítő oldat
PEG	Polietilén glikol
EXTR SOLN	Extrakciós oldat
ELU SOLN	Eluáló oldat
GEL	Bond Elut Silica szilikagél patronok
PRE SOLN	Előkezelő oldat
NEUTR SOLN	Semlegesítő oldat
TRACEUR BUF	Nyomjelző izotóp hígító puffer
ULF	Mikrotiter lemez
Ab HRP	HRP konjugátum
Ag HRP	HRP konjugátum
Ab HRP CONC	HRP konjugátum koncentrátum
Ag HRP CONC	HRP konjugátum koncentrátum
CONJ BUF	Konjugátum puffer
CHROM TMB CONC	Kromogén TMB koncentrátum
CHROM TMB	Kromogén TMB oldat
SUB BUF	Szubsztrát puffer
STOP SOLN	Stop oldat
INC SER	Inkubációs szérum
BUF	Puffer
Ab AP	AP konjugátum
SUB PNPP	Szubsztrát PNPP
BIOT CONJ CONC	Biotin konjugátum koncentrátum
AVID HRP CONC	Avidin HRP koncentrátum
ASS BUF	Vizsgálati puffer
Ab BIOT	Biotin konjugátum
Ab	Specifikus ellenanyag
SAV HRP CONC	Sztreptavidin HRP koncentrátum
NSB	Nem-specifikus kötődés
2nd Ab	Másodlagos ellenanyag
ACID BUF	Savas puffer

	<u>Stosowane symbole</u>
	Przed zastosowaniem zapoznać się z instrukcją
	Temperatura przechowywania
	Zużyć przed
LOT	Kod serii
REF	Numer katalogowy
CONTROL	Kontrola
I V D	Urządzenie medyczne do diagnostyki in vitro
	Producent
	Zawartość wystarczająca do <n> testów
WASH SOLN CONC	Roztwór płuczący stężony
CAL 0	Kalibrator zerowy
CAL N	Kalibrator nr
CONTROL N	Kontrola nr
Ag 125I	Znacznik izotopowy
Ab 125I	Znacznik izotopowy
Ag 125I CONC	Znacznik izotopowy stężony
Ab 125I CONC	Znacznik izotopowy stężony
	Probówki
INC BUF	Wymagana inkubacja buforu
ACETONITRILE	Acetonitryl
SERUM	Surowica
DIL SPE	Rozcieńczalnik próbki
DIL BUF	Bufor do rozcieńczania
ANTISERUM	Antysurowica
IMMUNOADSORBENT	Immunoabsorbent
DIL CAL	Rozcieńczalnik kalibratora
REC SOLN	Roztwór do rozcieńczania
PEG	Glikol poli(oksy)etylenowy
EXTR SOLN	Roztwór ekstrakcyjny
ELU SOLN	Roztwór elucyjny
GEL	Kolumny krzemionkowe Bond Elut
PRE SOLN	Roztwór do przygotowania wstępnego
NEUTR SOLN	Roztwór neutralizujący
TRACEUR BUF	Bufor znacznika
TUF	mikropłytki
Ab HRP	Koniugat peroksydazy chrzanowej
Ag HRP	Koniugat peroksydazy chrzanowej
Ab HRP CONC	Koncentrat koniugatu peroksydazy chrzanowej
Ag HRP CONC	Koncentrat koniugatu peroksydazy chrzanowej
CONJ BUF	Bufor do koniugacji
CHROM TMB CONC	Koncentrat chromogenu TMB (czterometylobenzydyny)
CHROM TMB	Roztwór chromogenu TMB (czterometylobenzydyny)
SUB BUF	Bufor substratu
STOP SOLN	Roztwór zatrzymujący reakcję
INC SER	Wymagana inkubacja surowicy
BUF	Bufor
Ab AP	Koniugat AP (fosfatazy alkalicznej)
SUB PNPP	p-nitrofenylofosforan substratowy
BIOT CONJ CONC	Koncentrat koniugatu biotyny
AVID HRP CONC	Koncentrat peroksydazy chrzanowej z awidyną
ASS BUF	Bufor do oznaczania
Ab BIOT	Koniugatu biotyny
Ab	Przeciwciało swoiste
SAV HRP CONC	Koncentrat streptawidyny HRP
NSB	Wiązanie nieswoiste
2nd Ab	Drugie przeciwciało
ACID BUF	Bufor zakwaszający

	<u>Símbolos utilizados</u>
	Consulte instruções de utilização
	Temperatura de conservação
	Utilizar antes de
LOT	Código de lote
REF	Número de catálogo
CONTROL	Controlo
I V D	Dispositivo médico de diagnóstico in vitro
	Fabricante
	Conteúdo suficiente para <n> testes
WASH SOLN CONC	Solução de lavagem concentrada
CAL 0	Calibrador zero
CAL N	Calibrador #
CONTROL N	Controlo #
Ag 125I	Marcador
Ab 125I	Marcador
Ag 125I CONC	Marcador concentrada
Ab 125I CONC	Marcador concentrada
	Tubos
INC BUF	Tampão de incubação
ACETONITRILE	Acetonitrilo
SERUM	Soro
DIL SPE	Diluidor de espécimes
DIL BUF	Tampão de diluição
ANTISERUM	Anti-soro
IMMUNOADSORBENT	Imunoadsorvente
DIL CAL	Diluyente do calibrador
REC SOLN	Solução de Reconstituição
PEG	Poliétileno-glicol
EXTR SOLN	Solução de Extração
ELU SOLN	Solução de Eluição
GEL	Cartuchos de sílica Bond Elut
PRE SOLN	Solução de pré-tratamento
NEUTR SOLN	Solução de neutralização
TRACEUR BUF	Tampão Marcador
TLT	Placa de micro titulação
Ab HRP	HRP Conjugação
Ag HRP	HRP Conjugação
Ab HRP CONC	HRP Conjugação concentrada
Ag HRP CONC	HRP Conjugação concentrada
CONJ BUF	Conjuge o tampão
CHROM TMB CONC	Cromogénica TMB concentrada
CHROM TMB	Solução Cromogénica TMB
SUB BUF	Tampão de substrato
STOP SOLN	Solução de Paragem
INC SER	Soro de incubação
BUF	Tampão
Ab AP	AP Conjugação
SUB PNPP	Substrato PNPP
BIOT CONJ CONC	Concentrado conjugado de biotina
AVID HRP CONC	Concentrado HRP de avidina
ASS BUF	Tampão de ensaio
Ab BIOT	Conjugado de biotina
Ab	Anticorpo específico
SAV HRP CONC	Estreptavidina HRP concentrado
NSB	Ligações não específicas
2nd Ab	Anticorpo secundário
ACID BUF	Tampão de acidificação