



DCM004-13

Ed. 01/2024

17OH PROGESTERONE ELISA

per analisi di routine

Determinazione immunoenzimatica diretta di 17-OH progesterone nel siero o plasma umano.

IVD

LOT

See external label

2°C 8°C

 $\Sigma = 96$ tests

REF DKO004

1. DESTINAZIONE D'USO

Per uso diagnostico *in vitro*

Per uso professionale in laboratorio

17OH Progesterone ELISA è un dispositivo diagnostico manuale *in vitro* destinato alla determinazione quantitativa di 17-OH progesterone nel siero o nel plasma umano da popolazioni adulte e pediatriche. I risultati devono essere impiegati in associazione ad altri dati clinici e di laboratorio come supporto nella diagnosi e monitoraggio dei diversi disturbi del surrene.

2. RILEVANZA CLINICA

Il 17-OH progesterone (17-OHP) è un importante composto intermedio della biosintesi degli steroidi. Livelli elevati di 17-OHP sono legati alla disfunzione della via di biosintesi steroidea che porta a un eccesso di androgeni. Pertanto, le misurazioni di 17-OHP sono utili per la diagnosi differenziale delle condizioni cliniche legate a un fenotipo iperandrogenico e correlate a disfunzioni surrenali in entrambi i sessi.

L'iperplasia surrenale congenita (CAH) è un gruppo di malattie autosomiche recessive caratterizzate da un'alterata sintesi del cortisolo^{1,4}. La causa predominante della patologia (nel 95% dei casi) è la mutazione del gene *CYP21A2* che codifica la steroido 21-idrossilasi surrenale. La 21-idrossilasi è responsabile della conversione del 17-OHP in 11-deossicortisolo e del progesterone in deossicorticosterone. La valutazione dei livelli di 17-OHP fornisce informazioni di supporto per la diagnosi differenziale di CAH causata da mutazioni dei geni coinvolti nella sintesi del cortisolo da mutazioni del gene *CYP21A2*.

La misurazione di 17-OHP è anche considerata utile per sostenere la diagnosi di altre patologie caratterizzate da iperandrogenismo, quali la sindrome dell'ovaio policistico (PCOS)⁵ e l'irsutismo nelle donne, la pubertà precoce⁶ e l'adrenarca precoce. La determinazione dei livelli di 17-OHP viene utilizzata in questi casi per escludere una diagnosi di CAH classica e non classica.

I pazienti affetti da CAH devono essere trattati con glucocorticoidi e mineralcorticoidi. Il trattamento con glucocorticoidi è di particolare importanza per evitare la crisi surrenale e la virilizzazione dovuta all'eccessiva sintesi degli

androgeni^{2,4,7}. Poiché l'obiettivo dei trattamenti con glucocorticoidi non è la soppressione completa della sintesi di 17-OHP, è importante garantire un adeguato monitoraggio del trattamento per valutare il corretto dosaggio dei farmaci. Questo è gestito dalla valutazione regolare dei livelli di 17-OHP (e di androstenedione) come indicatori tradizionali dell'adeguatezza del trattamento con glucocorticoidi nella CAH⁵.

3. PRINCIPIO DEL METODO

Il test 17OH Progesterone ELISA è un dosaggio immunometrico enzimatico competitivo (ELISA) in cui il 17-OH progesterone (antigene) nel campione compete con il 17-OH progesterone antigenico coniugato con perossidasi di rafano (HRP) per il legame al numero limitato di anticorpi anti 17-OH progesterone rivestiti sulla micropiastra (fase solida).

Dopo l'incubazione, la separazione del legato dal libero viene eseguita con un semplice lavaggio della fase solida. Quindi, l'enzima HRP nella parte libera reagisce con il substrato (H_2O_2) e il substrato TMB e sviluppa un colore blu che cambia in giallo quando viene aggiunta la soluzione di arresto (H_2SO_4). L'intensità del colore è inversamente proporzionale alla concentrazione di 17-OH progesterone nel campione.

La concentrazione di 17-OH progesterone nel campione viene calcolata attraverso una curva di calibrazione.

4. REAGENTI, MATERIALI E STRUMENTAZIONE

4.1. Reagenti e materiali forniti nel kit

1. Calibratori (6 fiale, 1 mL ciascuna)

Siero umano, ProClin >0.0015%, NaN_3 <0.1%

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

2. Controllo (2 fiale, 1 mL ciascuna)

Siero umano, ProClin >0.0015%, NaN_3 <0.1%

Controllo A	REF DCE045/0403A-0
Controllo B	REF DCE045/0403B-0

La concentrazione dei controlli è indicata sul certificato di analisi

3. Coniugato (1 fiala, 22 mL)
Proclin >0,0015%, BSA 0,1%
17-OH progesterone coniugato con perossidasi di rafano (HRP) **REF DCE002/0402-0**
4. Micropiastra rivestita (1 micropiastra frangibile)
Micropiastra rivestita con anticorpo anti 17-OH progesterone **REF DCE002/0403-0**
5. Substrato TMB (1 fiala, 15 mL)
H₂O₂-TMB 0,26 g/L (evitare qualsiasi contatto con la pelle)
ProClin <0,0015% **REF DCE004-0**
6. Soluzione di arresto (1 fiala, 15 mL)
Acido solforico 0,15 mol/L (evitare qualsiasi contatto con la pelle) **REF DCE005-0**
7. Soluzione di lavaggio conc. 10X (1 fiala, 50 mL)
Tampone fosfato 0,2 M pH 7,4, Proclin >0,0015% **REF DCE054-0**

4.2. Materiali richiesti ma non forniti

Acqua distillata

4.3. Materiali e strumentazione ausiliari

Erogatore automatico

Pipette di precisione

Lettore di micropiastre (450 nm, 620-630 nm)

5. AVVERTENZE

- Questo kit è destinato all'uso *in vitro* esclusivamente da parte di professionisti. Non per uso interno o esterno in esseri umani o animali.
- Utilizzare adeguati dispositivi di protezione individuale mentre si lavora con i reagenti forniti.
- Seguire le buone prassi di laboratorio (GLP, Good Laboratory Practice) per la manipolazione di emoderivati.
-  Materiali di origine animale usati per la preparazione di questo kit sono stati ottenuti da animali sani e le proteine bovine sono state ottenute da paesi non affetti da BSE, ma comunque questi materiali dovrebbero essere usati come potenzialmente contagiosi.
-  Tutto il materiale di origine umana utilizzato nella preparazione dei reagenti è stato testato e risultato negativo per gli anticorpi dell'HIV 1 e 2, HbsAg e HCV. Nessun metodo di prova, tuttavia, può offrire la completa garanzia che HIV, HBV, HCV o altri agenti infettivi siano assenti. Pertanto, i calibratori e i controlli devono essere manipolati allo stesso modo del materiale potenzialmente infettivo.
- Alcuni reagenti (calibratori, controllo, coniugato e soluzione di lavaggio) contengono piccole quantità ProClin™ 300 (>0,0015%, <0,06%) come conservante. Evitare il contatto con pelle o mucose.
- **Classificazione secondo il regolamento (CE) n. 1272/2008 [CLP]**
Sensibilizzazione cutanea, categoria 1



Contiene: ProClin 300

Attenzione

Indicazioni di pericolo:

H317 - Può provocare una reazione allergica cutanea.

Consigli di prudenza:

P261 - Evitare di respirare la polvere/i fumi/i gas/la nebbia/i vapori/gli aerosol.

P280 - Indossare guanti/indumenti protettivi/proteggere gli occhi/proteggere il viso/proteggere l'udito.

P321 - Trattamento specifico (vedere istruzioni supplementari di pronto soccorso su questa etichetta).

P333+P313 - In caso di irritazione o eruzione della pelle: Consultare un medico.

P362+P364 - Togliere tutti gli indumenti contaminati e lavarli prima di indossarli nuovamente.

- Alcuni reagenti (calibratori e controlli) contengono piccole quantità di azoturo di sodio (NaN₃) <0,1% come conservante. L'azoturo di sodio può essere tossico se ingerito o assorbito attraverso la pelle o gli occhi; inoltre, può reagire con le tubature di piombo o rame per formare azoturi metallici potenzialmente esplosivi. Se si utilizza un lavandino per rimuovere i reagenti, lavare con abbondante acqua per evitare l'accumulo di azoturi.
- Il substrato TMB contiene un irritante, che può essere dannoso se inalato, ingerito o assorbito per via cutanea. Per prevenire lesioni, evitare l'inalazione, l'ingestione o il contatto con pelle e occhi.
- La soluzione di arresto consiste in una soluzione diluita di acido solforico. L'acido solforico è velenoso e corrosivo e può essere tossico se ingerito. Per prevenire ustioni chimiche, evitare il contatto con pelle e occhi.
- Evitare l'esposizione del reagente TMB/H₂O₂ a luce solare diretta, metalli o ossidanti. Non congelare la soluzione.

6. PRECAUZIONI

- Attenersi rigorosamente alla sequenza dei passaggi di pipettaggio forniti in questo protocollo. I dati sulle prestazioni qui rappresentati sono stati ottenuti utilizzando i reagenti specifici elencati in queste istruzioni per l'uso.
- Tutti i reagenti devono essere conservati refrigerati a 2-8 °C nel contenitore originale. Tutte le eccezioni sono chiaramente indicate.
- Lasciare che tutti i componenti del kit e i campioni raggiungano la temperatura ambiente (22-28 °C) e mescolare bene prima dell'uso.
- Non scambiare i componenti di kit di lotti diversi. La data di scadenza stampata sulle etichette della confezione e delle fiale deve essere rispettata. Non utilizzare alcun componente del kit dopo la data di scadenza.
- Se l'utente utilizza un equipo automatizado, tiene la responsabilidad de asegurarse de que el kit ha sido debidamente validado para su uso previsto.
- La rimozione incompleta o imprecisa del liquido dai pozzetti potrebbe influenzare la precisione del dosaggio e/o aumentare il background. Per migliorare le prestazioni del kit sui sistemi automatici, si raccomanda di aumentare il numero di lavaggi.
- È importante che il tempo di reazione in ogni pozzetto sia mantenuto costante per ottenere risultati riproducibili. Il pipettaggio dei campioni non deve andare oltre i dieci minuti per evitare deviazioni del dosaggio. Se sono necessari più di 10 minuti, seguire lo stesso ordine di erogazione. Se si utilizza più di una piastra, si raccomanda di ripetere la curva dose-risposta in ogni piastra.
- L'aggiunta della soluzione di substrato TMB avvia una reazione cinetica, che viene terminata dall'aggiunta

della soluzione di arresto. Pertanto, il substrato TMB e la soluzione di arresto devono essere aggiunti nella stessa sequenza per eliminare qualsiasi deviazione temporale durante la reazione.

- Osservare le linee guida per l'esecuzione del controllo di qualità nei laboratori medici analizzando i controlli e/o i sieri in pool.
- La massima precisione è richiesta per la ricostituzione e l'erogazione dei reagenti.
- I campioni microbiologicamente contaminati, altamente lipemici, itterici o emolizzati non devono essere utilizzati nel dosaggio.
- I lettori di piastre misurano verticalmente. Non toccare il fondo dei pozzetti.
- Quando si pipettano i reagenti del dosaggio, compresi campioni, calibratori e controlli, è necessario utilizzare puntali monouso nuovi per ridurre il rischio di contaminazione da carryover. In caso contrario, i risultati potrebbero non essere validi.

7. CONSERVAZIONE E STABILITÀ DEI REAGENTI

Conservare il kit a 2-8 °C, al buio.

- Il kit è stabile a 2-8 °C fino alla data di scadenza indicata sull'etichetta esterna del kit.
- Una volta aperto, il kit è stabile a 2-8 °C per 6 mesi.
- La soluzione di lavaggio diluita è stabile per 30 giorni a 2-8 °C.

Nota importante: aprire il sacchetto contenente la micropiastre rivestita solo quando è a temperatura ambiente e chiuderlo immediatamente dopo l'uso.

8. RACCOLTA E CONSERVAZIONE DEI CAMPIONI

Il dosaggio deve essere effettuato su campioni di siero (provette di campionamento standard o provette contenenti gel per la separazione del siero) o plasma (litio eparina, sodio eparina o EDTA di potassio).

Conservazione dei campioni	Durata
2-8 °C	96 ore
Cicli di congelamento/scongelamento	4 cicli

9. PROCEDURA

9.1. Preparazione di calibratori e controlli

I calibratori sono pronti per l'uso e hanno la seguente concentrazione di 17-OH progesterone:

	C ₀	C ₁	C ₂	C ₃	C ₄	C ₅
ng/mL	0	0,2	0,6	2	6	16

I controlli sono pronti per l'uso.

9.2. Preparazione del coniugato

Il coniugato è pronto per l'uso.

9.3. Preparazione della soluzione di lavaggio

Diluire il contenuto della fiala "Soluzione di lavaggio conc. 10X" con acqua distillata fino a un volume finale di 500 mL prima dell'uso. Per i volumi più piccoli, rispettare il rapporto di diluizione 1:10.

È possibile osservare la presenza di cristalli all'interno della soluzione di lavaggio concentrata; in tal caso, mescolare a temperatura ambiente fino alla completa dissoluzione dei cristalli. Per una maggiore precisione, diluire l'intero flacone di soluzione di lavaggio concentrata a 500 mL, avendo cura anche di trasferire completamente i cristalli sciacquando il flacone, quindi mescolare fino a quando i cristalli non si dissolvono completamente.

9.4. Preparazione dei campioni

La determinazione di 17-OH progesterone può essere effettuata su campioni di siero (provette di campionamento standard o provette contenenti gel per la separazione del siero) o plasma (litio eparina, sodio eparina o EDTA di potassio) umano.

Conservare il campione a -20 °C se la determinazione non viene eseguita lo stesso giorno della raccolta del campione. Prima dell'uso, miscelare delicatamente per 5 minuti con un miscelatore a rotazione.

9.5. Procedura

- **Lasciare che tutti i reagenti raggiungano la temperatura ambiente (22-28 °C) per almeno 30 minuti.** Alla fine del dosaggio, conservare immediatamente i reagenti a 2-8 °C: evitare una lunga esposizione a temperatura ambiente.
- Le strisce di micropozzetti rivestiti non utilizzate devono essere rilasciate in modo sicuro nella busta di alluminio contenente l'essiccante e conservate a 2-8 °C.
- Per evitare potenziali contaminazioni microbiche e/o chimiche, i reagenti inutilizzati non devono mai essere trasferiti nelle fiale originali.
- Poiché è necessario eseguire la determinazione in duplicato per migliorare la precisione dei risultati della prova, preparare due pozzetti per ogni punto della curva di calibrazione (C₀-C₅), due per ogni controllo, due per ogni campione, uno per il bianco.

Reagente	Calibratore	Campione/Controllo	Bianco
Calibratore C ₀ -C ₅	25 µL		
Campione/Controllo		25 µL	
Coniugato	200 µL	200 µL	

Incubare per 1 ora a 37 °C (± 0,5 °C).

Rimuovere il contenuto da ogni pozzetto, lavare i pozzetti 6 volte con 300 µL di soluzione di lavaggio diluita.

Nota importante: durante ogni fase di lavaggio, agitare delicatamente la piastra per 5 secondi e rimuovere la soluzione in eccesso picchiando la piastra capovolta su un tovagliolo di carta assorbente.

Se si utilizza un lavatore automatico, dopo l'ultimo ciclo di lavaggio rimuovere la soluzione in eccesso allo stesso modo.

Substrato TMB	100 µL	100 µL	100 µL
Incubare a temperatura ambiente (22÷28 °C) per 15 minuti al buio.			
Soluzione di arresto	100 µL	100 µL	100 µL
Agitare delicatamente la micropiastra. Leggere l'assorbanza (E) a 450 nm contro una lunghezza d'onda di riferimento di 620-630 nm o contro il bianco entro 5 minuti.			

10. CONTROLLO QUALITÀ

Le buone prassi di laboratorio (GLP) richiedono l'inclusione di campioni per il controllo della qualità in ogni serie di dosaggi al fine di verificare le prestazioni del dosaggio. I controlli devono essere trattati come campioni sconosciuti e i risultati devono essere analizzati con metodi statistici appropriati.

I controlli forniti nel kit devono essere testati come se fossero sconosciuti e hanno lo scopo di agevolare la valutazione della validità dei risultati ottenuti in ogni piastra di dosaggio.

La concentrazione media di ciascun livello di controllo è documentata nel rapporto del controllo di qualità incluso in ciascun kit. Tali livelli di concentrazione media sono determinati in base a diversi dosaggi eseguiti in duplicato in più posizioni su ciascuna piastra.

DiaMetra raccomanda agli utenti di conservare le annotazioni grafiche dei valori di controllo generati con ciascun dosaggio, tra cui medie mobili, DS e CV%. Queste informazioni faciliteranno l'analisi delle tendenze dei controlli per quanto riguarda le prestazioni dei lotti di controllo attuali e pregressi rispetto ai dati forniti nel controllo di qualità. Le tendenze aiuteranno a identificare i dosaggi che generano valori di controllo significativamente diversi dal rispettivo intervallo medio.

Quando si interpretano i dati dei controlli, occorre tenere conto del fatto che il prodotto è stato progettato e sviluppato come prodotto per l'utilizzo manuale. L'intervallo riportato sul certificato del controllo di qualità deve essere appropriato per i dosaggi eseguiti manualmente e rispettando rigorosamente la procedura di dosaggio descritta sopra. Gli esperti del controllo di qualità riconoscono che, a causa delle differenze di condizioni e di prassi, si avrà sempre una variabilità nei valori medi e nella precisione delle misurazioni dei controlli eseguite da laboratori diversi⁸.

11. CALCOLO DEI RISULTATI

Sono disponibili vari pacchetti software di elaborazione dei dati, che possono essere utilizzati per generare la curva di calibrazione media e per calcolare le concentrazioni medie di campioni e controlli sconosciuti. **È necessario** un adattamento della curva logistica a 4 parametri (4PL) **che includa il calibratore 0**.

In alternativa, è possibile preparare una curva di calibrazione su carta millimetrata semilogaritmica tracciando un grafico con l'assorbanza media sull'asse delle ordinate e la concentrazione dell'analita sull'asse delle ascisse. Nella

curva di calibrazione deve essere incluso il calibratore 0. Leggere il valore medio dell'assorbanza di ciascun campione sconosciuto dalla curva.

Affinché i risultati del dosaggio siano considerati validi, i calibratori e i controlli del kit devono rientrare nelle specifiche riportate nel certificato di analisi specifico del lotto.

In caso contrario, i risultati dei test associati non saranno validi e i campioni dovranno essere analizzati nuovamente.

12. INTERVALLO DI MISURAZIONE

L'intervallo di misurazione del test (AMR) è 0,26-16 ng/mL. Qualsiasi valore inferiore a 0,26 ng/mL deve essere indicato come "< 0,26 ng/mL". Qualsiasi valore superiore a 16 ng/mL deve essere indicato come "> 16 ng/mL".

13. METROLOGIA E TRACCIABILITÀ

Il test 17OH Progesterone ELISA è stato standardizzato in base a standard interni di riferimento (matrice sierica) il cui valore è stato assegnato a un metodo LC-MS/MS disponibile in commercio.

14. VALORI ATTESI

I seguenti intervalli sono stati determinati utilizzando il test 17OH Progesterone ELISA e sono forniti unicamente a scopo informativo. Il 95% degli intervalli di riferimento per adulti apparentemente sani è stato calcolato attraverso un metodo non parametrico secondo le linee guida tratte dal documento CLSI C28-A "Defining, Establishing and Verifying Reference Intervals in the Clinical Laboratory".

	n	Mediana (ng/mL)	Intervallo di riferimento (ng/mL)
Donne			
Fase luteinica	123	0,45	< LoQ - 2,19
Fase follicolare	122	0,32	< LoQ - 2,10
Post-menopausa	122	< LoQ	< LoQ - 0,95
Uomini	122	0,75	< LoQ - 1,97
Bambini (3-18 anni)	124	< LoQ	< LoQ - 1,48

Gli intervalli sopraindicati devono essere considerati solo come linee guida; si raccomanda a ogni laboratorio di stabilire i propri intervalli di valori attesi sulla base della propria popolazione di pazienti.

15. PARAMETRI CARATTERISTICI

Sono mostrati i dati più rappresentativi delle prestazioni. I risultati ottenuti nei singoli laboratori possono variare.

15.1. Capacità di rilevamento

Il limite del bianco (LoB), il limite di rilevamento (LoD) e il limite della determinazione quantitativa (LoQ) sono stati definiti basandosi sulla procedura CLSI EP17-A, "Protocols for Determination of Limits of Detection and Limits of Quantitation" utilizzando 6 bianchi e 6 campioni a basso livello.

Sensibilità	Concentrazione
Limite del bianco (LoB)	0,02 ng/mL
Limite di rilevamento (LoD)	0,11 ng/mL
Limite della determinazione quantitativa (LoQ)	0,26 ng/mL

15.2. Esattezza

L'esattezza è stata dimostrata attraverso il confronto del test 17OH Progesterone ELISA mediante un LC-MS/MS disponibile in commercio utilizzando campioni di donatori nativi. Fare riferimento alla sezione 15.5.

15.3. Precisione

La precisione del test 17OH Progesterone ELISA è stata determinata eseguendo un complesso studio di precisione.

Ripetibilità: un totale di 6 campioni di siero è stato analizzato in 5 repliche, una volta al giorno per 5 giorni da 3 operatori. I dati di un lotto rappresentativo sono mostrati di seguito:

Campione	n	Conc. media (ng/mL)	Intra-test (ripetibilità)	
			DS	% CV
1	75	0,90	0,10	11,4%
2	75	1,45	0,15	10,0%
3	75	2,10	0,20	9,3%
4	75	5,14	0,49	9,5%
5	75	8,94	0,74	8,3%
6	75	14,50	1,11	7,6%

Riproducibilità: un totale di 6 campioni di siero è stato analizzato in 5 repliche, una volta al giorno per 5 giorni da 3 operatori. I dati di un lotto rappresentativo sono mostrati di seguito:

Campione	n	Conc. media (ng/mL)	All'interno del laboratorio (riproducibilità)	
			DS	% CV
1	75	0,90	0,12	13,0%
2	75	1,45	0,17	11,6%
3	75	2,10	0,23	11,1%
4	75	5,14	0,55	10,7%
5	75	8,94	0,82	9,2%
6	75	14,50	1,29	8,9%

15.4. Linearità

La linearità è stata valutata secondo le linee guida basate su CLSI EP-06, "Evaluation of the Linearity of Quantitative Measurement Procedures". Per la concentrazione di 17-OH progesterone mediante il test 17OH Progesterone ELISA, la procedura di misurazione mostra linearità per l'intervallo da 0,2 a 17,22 ng/mL entro la deviazione ammissibile di linearità (ADL) di $\pm 15\%$.

15.5. Confronto del metodo

Il test 17OH Progesterone ELISA è stato confrontato con un metodo LC-MS/MS disponibile in commercio seguendo la procedura CLSI EP-9A, "Method Comparison and Bias Estimation Using Patient Samples". Ogni metodo ha esaminato un totale di 120 campioni, selezionati per rappresentare un ampio intervallo di concentrazioni di 17-OH progesterone. L'analisi di regressione di Passing-Bablok è stata effettuata su dati comparativi:

n	Pendenza [IC 95%]	Intercetta (ng/mL) [IC 95%]	Coefficiente di correlazione (r)
120	0,91 [da 0,87 a 0,97]	0,21 [Da 0,16 a 0,28]	0,99

15.6. Specificità analitica

La specificità è stata valutata con i seguenti reagenti crociati.

Reagente crociato	Concentrazione testata (unità)	Reattività crociata media %
11-deossicortisolo	80 ng/mL	2,15%
Progesterone	2.000 ng/mL	0,47%
Pregnenolone	2.000 ng/mL	0,15%
Testosterone	2.000 ng/mL	0,07%
17β-estradiolo	2.000 ng/mL	0,01%
Aldosterone	2.000 ng/mL	0,00%
Estriolo	2.000 ng/mL	0,00%
Estrone-3-solfato	2.000 ng/mL	0,00%
Spironolattone	2.000 ng/mL	0,00%
Androstenedione	2.000 ng/mL	0,05%
Androsterone	2.000 ng/mL	0,04%
Corticosterone	2.000 ng/mL	0,09%
Cortisolo	2.000 ng/mL	0,10%
Cortisone	2.000 ng/mL	0,07%
DHEA	2.000 ng/mL	0,07%
DHEA-S	20.000 ng/mL	0,01%
DHT	2.000 ng/mL	0,04%
Prednisolone	3.000 ng/mL	0,02%
Prednisone	2.000 ng/mL	0,01%

Le seguenti sostanze non interferiscono con un bias $> \pm 15\%$ nel test 17OH Progesterone ELISA quando le concentrazioni sono inferiori alla soglia dichiarata presentata nella tabella seguente.

Reagente potenzialmente interferente	Concentrazione di soglia
Bilirubina, coniugata	20 mg/dL
Bilirubina, non coniugata	20 mg/dL
Emoglobina	200 mg/dL
Trigliceridi	600 mg/dL

15.7. Studio su siero-plasma

È stato condotto uno studio di confronto tra matrici del test 17OH Progesterone ELISA per valutare la differenza tra i tipi di provette (provette per la separazione del siero (SST), per plasma in litio eparina, per plasma in sodio eparina e plasma in K2 EDTA) rispetto ai campioni di controllo (siero tappo rosso, senza additivo) secondo le linee guida CLSI (EP9-A). È stato valutato un totale di 27 campioni (23 nativi, 4 additivati) per coprire l'intervallo. L'analisi di regressione di Passing-Bablok è stata effettuata su dati comparativi:

Tipo di campione	Pendenza [IC 95%]	Intercetta (ng/mL) [IC 95%]	Coefficiente di correlazione (r)
SST	1,02 [da 0,91 a 1,13]	-0,03 [da -0,21 a 0,11]	0,99
Litio eparina	1,00 [da 0,87 a 1,04]	0,00 [da -0,07 a 0,08]	0,99
Sodio eparina	1,00 [da 0,94 a 1,10]	-0,02 [da -0,14 a 0,03]	0,99
EDTA	1,04 [da 0,90 a 1,12]	-0,03 [da -0,19 a 0,09]	0,99

16. LIMITAZIONI D'USO

- Come nel caso di qualsiasi procedura diagnostica, i risultati devono essere interpretati unitamente ai dati clinici del paziente e alle altre informazioni a disposizione del medico.
- Gli anticorpi eterofili nel siero umano possono reagire con le immunoglobuline dei reagenti, interferendo con gli immunodosaggi *in vitro*⁹. I pazienti regolarmente esposti agli animali o a prodotti derivati da siero animale possono essere soggetti a questa interferenza, quindi si potrebbero osservare valori anomali.

17. GESTIONE DEI RIFIUTI

I reagenti devono essere smaltiti in conformità alle normative locali.

Tutti i materiali che sono entrati in contatto con i campioni e i reagenti devono essere smaltiti in conformità con le normative nazionali, regionali e locali.

18. BIBLIOGRAFIA

1. Honour JW. 17-Hydroxyprogesterone in children, adolescents and adults. *Ann Clin Biochem.* 2014 Jul;51(Pt 4):424-40.
2. Speiser PW, Arlt W, Auchus RJ, Baskin LS, Conway GS, Merke DP, Meyer-Bahlburg HFL, Miller WL, Murad MH, Oberfield SE, White PC. Congenital Adrenal Hyperplasia Due to Steroid 21-Hydroxylase Deficiency: An Endocrine Society Clinical Practice Guideline. *J Clin Endocrinol Metab.* 2018 Nov 1;103(11):4043-4088.
3. Bornstein SR, Allolio B, Arlt W, Barthel A, Don-Wauchope A, Hammer GD, Husebye ES, Merke DP, Murad MH, Stratakis CA, Torpy DJ. Diagnosis and Treatment of Primary Adrenal Insufficiency: An Endocrine Society Clinical Practice Guideline. *J Clin Endocrinol Metab.* 2016 Feb;101(2):364-89.
4. Sharma R, Seth A. Congenital adrenal hyperplasia: issues in diagnosis and treatment in children. *Indian J Pediatr.* 2014 Feb;81(2):178-85.
5. Legro RS, Arslanian SA, Ehrmann DA, Hoeger KM, Murad MH, Pasquali R, Welt CK; Endocrine Society. Diagnosis and treatment of polycystic ovary syndrome: an Endocrine Society clinical practice guideline. *J Clin Endocrinol Metab.* 2013 Dec;98(12):4565-92.
6. Grandone A, Marzuillo P, Luongo C, Toraldo R, Mariani M, Miraglia Del Giudice E, Perrone L. Basal levels of 17-hydroxyprogesterone can distinguish children with isolated precocious pubarche. *Pediatr Res.* 2018 Oct;84(4):533-536.
7. Rachoń D. Differential diagnosis of hyperandrogenism in women with polycystic ovary syndrome. *Exp Clin Endocrinol Diabetes.* 2012 Apr;120(4):205-9.
8. Basic QC Practices On-line Course; <http://www.Westgard.com>.
9. Boscatto, LM. and Stuart, MC., 'Heterophilic antibodies: a problem for all immunoassays'. *Clin Chem*, 34, 1988, pp 27-33

19. IDENTIFICATORE DELLE REVISIONI

Le aggiunte o le modifiche alle istruzioni per l'uso sono indicate dall'evidenziazione in grigio.

20. RECLAMI SUI PRODOTTI E SUPPORTO TECNICO

Per un paziente/utente/terza parte nell'Unione Europea e nei Paesi con un regime normativo simile (Regulation 2017/746/EU on IVD Medical Devices); se, durante l'uso di questo dispositivo o come risultato del suo utilizzo, si è verificato un incidente grave, segnalarlo al produttore e/o al suo rappresentante autorizzato e all'autorità normativa nazionale.

Il produttore può essere contattato tramite il relativo servizio clienti o il team di supporto tecnico. I dettagli di contatto sono disponibili di seguito e sul sito Web dell'azienda: www.diametra.com.

Ed. 01/2024

DCM004-13



DCM004-13

Ed. 01/2024

17OH PROGESTERONE ELISA

for routine analysis

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

IVD

LOT

See external label

2°C 8°C

 $\Sigma = 96$ tests

REF DKO004

1. INTENDED PURPOSE

For *In Vitro* Diagnostic Use For Laboratory Professional Use

17OH Progesterone ELISA is a manual *in vitro* diagnostic device intended for the quantitative determination of 17OH Progesterone in human serum or plasma from adult and paediatric populations. Results are to be used in conjunction with other clinical and laboratory data as an aid in the diagnosis and monitoring of various disorders of the adrenal glands.

2. CLINICAL SIGNIFICANCE

17-OH Progesterone (17-OH P) is an important intermediate of steroid biosynthesis. Elevated levels of 17-OH P are linked to dysfunction of steroid biosynthetic pathway that leads to an androgen excess. Therefore, measurements of 17-OH P are useful for the differential diagnosis of clinical conditions related to an hyperandrogenic phenotype and linked to adrenal disfunctions in both sexes.

Congenital Adrenal Hyperplasia (CAH) is a group of autosomal recessive disorders characterised by impaired cortisol synthesis^{1,4}. The predominant cause of the condition (95% of cases) is mutations of the *CYP21A2* gene that encodes the adrenal steroid 21-hydroxylase. 21-hydroxylase is responsible for conversion of 17-OHP to 11-deoxycortisol and progesterone to deoxycorticosterone. Assessment of 17-OH P levels provides supporting information for the differential diagnosis of CAH caused by mutations of the genes involved in cortisol synthesis from *CYP21A2* gene mutations.

Measurement of 17-OH P is also considered useful in supporting diagnosis of other conditions characterised by hyperandrogenism such as polycystic ovarian syndrome (PCOS)⁵ and hirsutism in women, precocious puberty⁶ and precocious adrenarche. Determination of 17-OH P levels are used in such cases to exclude a diagnosis of CAH and non-classical CAH.

Patients affected by CAH shall be treated with glucocorticoids and mineral-corticoids. Treatment with glucocorticoids are of particular importance to avoid adrenal crisis and virilization due to excessive androgen

synthesis^{2,4,7}. Since the goal of glucocorticoid treatments is not the complete suppression of 17-OH P synthesis, it is important to ensure appropriate monitoring of treatment to evaluate the correct dosage of the drugs. This is managed by the regular assessment of 17-OH P (and androstenedione) levels as traditional indicators of the adequacy of glucocorticoids treatment in CAH⁵.

3. PRINCIPLE OF THE METHOD

The 17OH Progesterone ELISA is a competitive enzyme immunometric assay (ELISA) where 17OH Progesterone (antigen) in the sample competes with the antigenic 17OH Progesterone conjugated with horseradish peroxidase (HRP) for binding to the limited number of antibodies anti 17OH Progesterone coated on the microplate (solid phase).

After the incubation, the bound/free separation is performed by a simple solid phase washing. Then, the enzyme HRP in the bound fraction reacts with the Substrate (H_2O_2) and the TMB Substrate and develops a blue colour that changes into yellow when the Stop Solution (H_2SO_4) is added. The colour intensity is inversely proportional to the 17OH Progesterone concentration of in the sample.

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

4. REAGENTS, MATERIALS AND INSTRUMENTATION

4.1. Reagents and materials supplied in the kit

1. Calibrators (6 vials, 1 mL each)

Human serum, ProClin >0.0015%, NaN_3 <0.1%

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

2. Control (2 vials, 1 mL each)

Human serum, ProClin >0.0015%, NaN_3 <0.1%

Control A	REF DCE045/0403A-0
Control B	REF DCE045/0403B-0

Control concentrations are indicated on the Certificate of Analysis

3. Conjugate (1 vial, 22 mL)
ProClin >0.0015%, BSA 0.1%
17OH Progesterone conjugated with Horseradish peroxidase (HRP) **REF DCE002/0402-0**
4. Coated Microplate (1 breakable microplate)
Microplate coated with anti 17OH Progesterone antibody **REF DCE002/0403-0**
5. TMB Substrate (1 vial, 15 mL)
H₂O₂-TMB 0.26 g/L (*avoid any skin contact*)
ProClin <0.0015% **REF DCE004-0**
6. Stop Solution (1 vial, 15 mL)
Sulphuric acid 0.15 mol/L (*avoid any skin contact*) **REF DCE005-0**
7. 10X Conc. Wash Solution (1 vial, 50 mL)
0.2M phosphate buffer pH 7.4 ProClin >0.0015% **REF DCE054-0**

4.2. Materials required but not provided

Distilled water

4.3. Auxiliary materials and instrumentation

Automatic dispenser
Precision Pipetting Devices
Microplate reader (450 nm, 620-630 nm)

5. WARNINGS

- This kit is intended for *in vitro* use by professional persons only. Not for internal or external use in Humans or Animals.
- Use appropriate personal protective equipment while working with the reagents provided.
- Follow Good Laboratory Practice (GLP) for handling blood products.
-  Material of animal origin used in the preparation of the kit has been obtained from animals certified as healthy and the bovine protein has been obtained from countries not infected by BSE, but these materials should be handled as potentially infectious.
-  All human source material used in the preparation of the reagents has been tested and found negative for antibody to HIV 1&2, HbsAg, and HCV. No test method however can offer complete assurance that HIV, HBV, HCV or other infectious agents are absent. Therefore, the Calibrators and the Controls should be handled in the same manner as potentially infectious material.
- Some reagents (calibrators, controls, conjugate and wash solution) contain small amounts of ProClin™ 300 (>0.0015%, <0.06%) as preservative. Avoid contact with skin or mucosa.
- **Classification according to Regulation (EC) No. 1272/2008 [CLP]**
Skin sensitivity, Category 1



Warning

Contains: ProClin 300

Hazard statements:

H317 - May cause an allergic skin reaction.

Precautionary statements:

P261 - Avoid breathing dust/fume/gas/mist/vapours/spray.
P280 - Wear protective gloves/protective clothing/eye protection/face protection/hearing protection.
P321 - Specific treatment (see supplemental first aid instruction on this label).
P333+P313 - If skin irritation or rash occurs: Get medical advice/attention.
P362+P364 - Take off contaminated clothing and wash it before reuse.

- Some reagents (calibrators and controls) contain small amounts of Sodium Azide (NaN₃) <0.1% as preservative. Sodium Azide may be toxic if ingested or absorbed through the skin or eyes; moreover, it may react with lead or copper plumbing to form potentially explosive metal azides. If you use a sink to remove the reagents, wash through with large amounts of water to prevent azide build-up.
- The TMB Substrate contains an irritant, which harmful if inhaled, ingested or absorbed through the skin. To prevent injury, avoid inhalation, ingestion or contact with skin and eyes.
- The Stop Solution consists of a diluted sulphuric acid solution. Sulphuric acid is poisonous, corrosive and can be toxic if ingested. To prevent chemical burns, avoid contact with skin and eyes.
- Avoid the exposure of reagent TMB/H₂O₂ to directed sunlight, metals or oxidants. Do not freeze the solution.

6. PRECAUTIONS

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

- Observe the guidelines for performing quality control in medical laboratories by assaying controls and/or pooled sera.
- Maximum precision is required for reconstitution and dispensation of the reagents.
- Samples microbiologically contaminated, highly lipemic, icteric or haemolysed should not be used in the assay.
- Plate readers measure vertically. Do not touch the bottom of the wells.
- Fresh disposable tips must be used when pipetting assay reagents including samples, calibrators and controls to mitigate the risk of carryover contamination. Failure to do so may lead to invalid results.

7. REAGENT STORAGE AND STABILITY

Store the kit at 2 – 8°C in the dark.

- The kit is stable at 2 – 8°C until the expiry date stated on the external kit label.
- Once opened, the kit is stable at 2 – 8°C for 6 months.
- The diluted wash solution is stable for 30 days at 2-8°C.

Important note: open the bag containing the Coated Microplate only when it is at room temperature and close it immediately after use.

8. SAMPLE COLLECTION AND STORAGE

The assay should be performed using serum (standard sampling tubes or tubes containing serum separating gel) or plasma (lithium heparin, sodium heparin or potassium EDTA) samples.

Sample Storage	Duration
2 – 8 °C	96 hours
Freeze/thaw cycles	4 cycles

9. PROCEDURE

9.1. Preparation of Calibrators and Controls

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

	C ₀	C ₁	C ₂	C ₃	C ₄	C ₅
ng/mL	0	0.2	0.6	2	6	16

The Controls are ready to use.

9.2. Preparation of the Conjugate

The conjugate is ready to use.

9.3. Preparation of the Wash Solution

Dilute the content of the vial "Conc. Wash Solution 10X" with distilled water to a final volume of 500 mL prior to use. For smaller volumes respect the 1:10 dilution ratio.

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

9.4. Preparation of Samples

The determination of 17OH Progesterone can be performed in human serum (standard sampling tubes or tubes containing serum separating gel) or plasma (lithium heparin, sodium heparin or potassium EDTA) samples.

Store the sample at -20°C if the determination is not performed on the same day of the sample collection. Before using, mix gently, for 5 minutes, with a roller mixer.

9.5. Procedure

- **Allow all reagents to reach room temperature (22-28°C) for at least 30 minutes.** At the end of the assay, immediately store the reagents at 2-8°C: avoiding long exposure to room temperature.
- Unused coated microwell strips should be released securely in the foil pouch containing desiccant and stored at 2-8°C.
- To avoid potential microbial and/or chemical contamination, unused reagents should never be transferred into the original vials.
- As it is necessary to perform the determination in duplicate in order to improve accuracy of the test results, prepare two wells for each point of the calibration curve (C₀-C₅), two for each Control, two for each sample, one for Blank.

Reagent	Calibrator	Sample/Control	Blank
Calibrator C ₀ -C ₅	25 µL		
Sample/Control		25 µL	
Conjugate	200 µL	200 µL	

Incubate for 1 hour at 37°C (± 0.5 °C).

Remove the contents from each well; wash the wells 6 times with 300 µL of diluted Wash Solution.

Important note: during each washing step, gently shake the plate for 5 seconds and remove excess solution by tapping the inverted plate on an absorbent paper towel.

In the case you use an automatic washer, after the last washing cycle remove the excess solution at the same manner.

TMB Substrate	100 µL	100 µL	100 µL
Incubate at room temperature (22±28°C) for 15 minutes in the dark.			
Stop Solution	100 µL	100 µL	100 µL

Shake the microplate gently.

Read the absorbance (E) at 450 nm against a reference wavelength of 620-630 nm or against Blank within 5 minutes.

10. QUALITY CONTROL

Good Laboratory Practice (GLP) requires the use of quality control specimens in each series of assays in order to check the performance of the assay. Controls should be treated as unknown samples, and the results analysed with appropriate statistical methods.

The kit controls provided in the kit should be tested as unknowns and are intended to assist in assessing the validity of results obtained with each assay plate.

The mean concentration of each control level is documented in the QC report included with each kit. These mean concentration levels are determined over several assays which are run in duplicate in multiple locations across each plate.

DiaMetra recommends the users to maintain graphic records of the control values generated with each assay run, including the running means, SDs and %CVs. This information will facilitate the controls trending analysis relating to the performance of current and historical control lots relative to the supplied Quality Control data. The trending will assist in the identification of assays which give control values significantly different from their average range.

When interpreting control data, users should note that this product was designed and developed as a manual product. The range stated on the QC certificate should be appropriate for assays that are performed manually and with strict adherence to the Assay Procedure described above. It is recognised by Quality Control professionals, that as a result of differences in conditions and practices, there will always be variability in the mean values and precision of control measurements between different laboratories⁸.

11. CALCULATION OF RESULTS

A variety of data reduction software packages are available, which may be employed to generate the mean calibration curve and to calculate the mean concentrations of unknown samples and controls. A 4-parameter logistic (4PL) curve fit, **including Calibrator 0 is required.**

Alternatively, a calibration curve may be prepared on semi-log graph paper by plotting mean absorbance on the Y-axis against concentration of analyte on the X-axis. Calibrator 0 should be included in the calibration curve. Read the mean absorbance value of each unknown sample off the curve.

In order for the assay results to be considered valid the kit calibrators and control must fall within the specifications detailed in the lot specific certificate of analysis.

If a control is out of its specified range, the associated test results are invalid and samples must be retested.

12. MEASURING RANGE

The assay measuring range (AMR) is 0.26 – 16 ng/mL. Any value that reads below 0.26 ng/mL should be reported as “< 0.26 ng/mL”. Any value that reads above 16 ng/mL should be reported as “> 16 ng/mL”.

13. METROLOGY AND TRACEABILITY

The 17OH Progesterone ELISA has been standardised against internal reference standards (serum matrix) which have been value assigned to a commercially available LC-MS/MS method.

14. EXPECTED VALUES

The following ranges were determined using the 17OH Progesterone ELISA and are provided for information only. The 95 % reference interval for apparently healthy adults were calculated by a non-parametric method following guidance from CLSI C28-A “Defining, Establishing and Verifying Reference Intervals in the Clinical Laboratory”.

	n	Median (ng/mL)	Reference interval (ng/mL)
Women			
Luteal phase	123	0.45	<LoQ – 2.19
Follicular phase	122	0.32	<LoQ – 2.10
Post-menopausal	122	<LoQ	<LoQ – 0.95
Men	122	0.75	<LoQ – 1.97
Children (3 – 18 years)	124	<LoQ	<LoQ – 1.48

The above ranges should be considered as guidelines only; it is recommended that each laboratory establish its own expected range based upon its own patient population.

15. PERFORMANCE CHARACTERISTICS

Representative performance data are shown. Results obtained at individual laboratories may vary.

15.1. Detection Capability

The limit of blank (LoB), limit of detection (LoD) and limit of quantitation (LoQ) were determined with guidance from CLSI EP17-A, “Protocols for Determination of Limits of Detection and Limits of Quantitation” using 6 blanks and 6 low level samples.

Sensitivity	Concentration
Limit of Blank (LoB)	0.02 ng/mL
Limit of Detection (LoD)	0.11 ng/mL
Limit of Quantitation (LoQ)	0.26 ng/mL

15.2. Trueness

Trueness has been demonstrated through method comparison of the 17OH Progesterone ELISA to a commercially available LC-MS/MS using native donor samples – refer to section 15.5.

15.3. Precision

Precision of the 17OH Progesterone ELISA was determined by performing a complex precision study.

Repeatability: A total of 6 serum samples were assayed in 5 replicates, once a day for 5 days by 3 operators. Data from one representative lot is shown below:

Sample	n	Mean Conc. (ng/mL)	Within run (Repeatability)	
			SD	CV%
1	75	0.90	0.10	11.4%
2	75	1.45	0.15	10.0%
3	75	2.10	0.20	9.3%
4	75	5.14	0.49	9.5%
5	75	8.94	0.74	8.3%
6	75	14.50	1.11	7.6%

Reproducibility: A total of 6 serum samples were assayed in 5 replicates, once a day for 5 days by 3 operators. Data from one representative lot is shown below:

Sample	n	Mean Conc. (ng/mL)	Within Laboratory (Reproducibility)	
			SD	CV%
1	75	0.90	0.12	13.0%
2	75	1.45	0.17	11.6%
3	75	2.10	0.23	11.1%
4	75	5.14	0.55	10.7%
5	75	8.94	0.82	9.2%
6	75	14.50	1.29	8.9%

15.4. Linearity

Linearity was evaluated based on CLSI EP-06, "Evaluation of the Linearity of Quantitative Measurement Procedures". For 17OH Progesterone concentration by 17OH Progesterone ELISA, the measurement procedure shows linearity for the interval from 0.2 to 17.22 ng/mL within the allowable deviation of linearity (ADL) of $\pm 15\%$.

15.5. Method comparison

The 17OH Progesterone ELISA was compared against a commercially available LC-MS/MS method following CLSI EP-9A, "Method Comparison and Bias Estimation Using Patient Samples". A total of 120 samples, selected to represent a wide range of 17OH Progesterone concentrations was assayed by each method. Passing-Bablok regression analysis was performed on the comparative data:

n	Slope [95% CI]	Intercept (ng/mL) [95% CI]	Correlation coefficient (r)
120	0.91 [0.87 to 0.97]	0.21 [0.16 to 0.28]	0.99

15.6. Analytical Specificity

The specificity was assessed with the following cross-reactants.

Cross-reactant	Concentration tested (unit)	Mean %Cross reactivity
11-deoxycortisol	80 ng/mL	2.15%
Progesterone	2000 ng/L	0.47%
Pregnenolone	2000 ng/mL	0.15%
Testosterone	2000 ng/mL	0.07%
17 β -Estradiol	2000 ng/mL	0.01%
Aldosterone	2000 ng/mL	0.00%
Estriol	2000 ng/mL	0.00%
Estrone-3-Sulphate	2000 ng/mL	0.00%
Spironolactone	2000 ng/mL	0.00%
Androstenedione	2000 ng/mL	0.05%
Androsterone	2000 ng/mL	0.04%
Corticosterone	2000 ng/mL	0.09%
Cortisol	2000 ng/mL	0.10%
Cortisone	2000 ng/mL	0.07%
DHEA	2000 ng/mL	0.07%
DHEA-S	20000 ng/mL	0.01%
DHT	2000 ng/mL	0.04%
Prednisolone	3000 ng/mL	0.02%
Prednisone	2000 ng/mL	0.01%

The following substances do not interfere with a bias of $> \pm 15\%$ in the 17OH Progesterone ELISA when the concentrations are below the stated threshold presented in the following table.

Potentially Interfering Reagent	Threshold Concentration
Bilirubin, conjugated	20 mg/dL
Bilirubin, unconjugated	20 mg/dL
Haemoglobin	200 mg/dL
Triglyceride	600 mg/dL

15.7. Serum-plasma study

The 17OH Progesterone ELISA matrix comparison study was performed to evaluate the difference across tube types (serum separator tubes (SST), lithium heparin plasma, sodium heparin plasma and K2 EDTA plasma) versus the control samples (red top serum, without additive) following CLSI (EP9-A) guidelines. A total of 27 samples (23 native, 4 spiked) to cover the assay range were evaluated. Passing-

Bablok regression analysis was performed on the comparative data:

Sample type	Slope [95% CI]	Intercept (ng/mL) [95% CI]	Correlation coefficient (r)
SST	1.02 [0,91 to 1,13]	-0.03 [-0,21 to 0,11]	0.99
Lithium Heparin	1.00 [0,87 to 1,04]	0.00 [-0,07 to 0,08]	0.99
Sodium Heparin	1.00 [0,94 to 1,10]	-0.02 [-0,14 to 0,03]	0.99
EDTA	1.04 [0,90 to 1,12]	-0.03 [-0,19 to 0,09]	0.99

16. LIMITATIONS OF USE

- As in the case of any diagnostic procedure, results must be interpreted in conjunction with the patient's clinical presentation and other information available to the physician.
- Heterophilic antibodies in human serum can react with reagent immunoglobulins, interfering with *in vitro* immunoassays⁹. Patients routinely exposed to animals or to animal serum products can be prone to this interference and anomalous values may be observed.

17. WASTE MANAGEMENT

Reagents must be disposed of in accordance with local regulations.

All materials that have come into contact with samples and reagents must be disposed of in accordance with country, state and local regulations.

18. BIBLIOGRAPHY

1. Honour JW. 17-Hydroxyprogesterone in children, adolescents and adults. *Ann Clin Biochem*. 2014 Jul;51(Pt 4):424-40.
2. Speiser PW, Arlt W, Auchus RJ, Baskin LS, Conway GS, Merke DP, Meyer-Bahlburg HFL, Miller WL, Murad MH, Oberfield SE, White PC. Congenital Adrenal Hyperplasia Due to Steroid 21-Hydroxylase Deficiency: An Endocrine Society Clinical Practice Guideline. *J Clin Endocrinol Metab*. 2018 Nov 1;103(11):4043-4088.
3. Bornstein SR, Allolio B, Arlt W, Barthel A, Don-Wauchope A, Hammer GD, Husebye ES, Merke DP, Murad MH, Stratakis CA, Torpy DJ. Diagnosis and Treatment of Primary Adrenal Insufficiency: An

Endocrine Society Clinical Practice Guideline. *J Clin Endocrinol Metab*. 2016 Feb;101(2):364-89.

4. Sharma R, Seth A. Congenital adrenal hyperplasia: issues in diagnosis and treatment in children. *Indian J Pediatr*. 2014 Feb;81(2):178-85.
5. Legro RS, Arslanian SA, Ehrmann DA, Hoeger KM, Murad MH, Pasquali R, Welt CK; Endocrine Society. Diagnosis and treatment of polycystic ovary syndrome: an Endocrine Society clinical practice guideline. *J Clin Endocrinol Metab*. 2013 Dec;98(12):4565-92.
6. Grandone A, Marzuillo P, Luongo C, Toraldo R, Mariani M, Miraglia Del Giudice E, Perrone L. Basal levels of 17-hydroxyprogesterone can distinguish children with isolated precocious pubarche. *Pediatr Res*. 2018 Oct;84(4):533-536.
7. Rachoń D. Differential diagnosis of hyperandrogenism in women with polycystic ovary syndrome. *Exp Clin Endocrinol Diabetes*. 2012 Apr;120(4):205-9.
8. Basic QC Practices On-line Course; <http://www.Westgard.com>.
9. Boscato, LM. and Stuart, MC., 'Heterophilic antibodies: a problem for all immunoassays'. *Clin Chem*, 34, 1988, pp 27–33

19. REVISION IDENTIFIER

Additions or changes to the IFU are indicated by grey highlighting.

20. PRODUCT COMPLAINTS AND TECHNICAL SUPPORT

For a patient/user/third party in the European Union and in countries with similar regulatory regime (Regulation 2017/746/EU on IVD Medical Devices); if, during the use of this device or as a result of its use, a serious incident has occurred, please report it to the manufacturer and/or its authorised representative and to your national regulatory authority.

The manufacturer can be contacted through their customer service or technical support team. The contact details can be found below and on the company website: www.diametra.com.

Ed. 01/2024

DCM004-13



DCM004-13

Ed. 01/2024

17OH PROGESTERONE ELISA

para el análisis de rutina

Determinación inmunoenzimática directa de la progesterona 17OH en suero o plasma humano.

IVD

LOT

Ver etiqueta
externa

2°C 8°C

 $\Sigma = 96$ pruebas

REF DKO004

1. FINALIDAD PREVISTA

Para uso en diagnóstico *in vitro*
Para uso profesional de laboratorio

El 17OH Progesterone ELISA es un dispositivo manual de diagnóstico *in vitro* destinado a la determinación cuantitativa de la progesterona 17OH en suero o plasma humano de poblaciones adultas y pediátricas. Los resultados deben usarse conjuntamente con otros datos clínicos y de laboratorio para ayudar en el diagnóstico y tratamiento de trastornos de las glándulas suprarrenales.

2. IMPORTANCIA CLÍNICA

La progesterona 17-OH (17-OH P) es un producto intermedio importante de la biosíntesis de esteroides. Los niveles elevados de 17-OH P están vinculados a un mal funcionamiento de la vía de biosíntesis de esteroides que deriva en un exceso de andrógenos. Por tanto, las mediciones de 17-OH P son útiles para el diagnóstico diferencial de las afecciones clínicas asociadas a un fenotipo hiperandrogénico y vinculado a disfunciones suprarrenales en ambos sexos.

La hiperplasia adrenal congénita (CAH) es un grupo de trastornos recesivos autosómicos que se caracteriza por una disfunción de la síntesis de cortisol¹⁻⁴. La causa predominante de la afección (95 % de los casos) son mutaciones del gen *CYP21A2*, el cual codifica el esteroide adrenal 21-hidroxilasa. La 21-hidroxilasa se encarga de la conversión de la 17-OHP en 11-desoxicortisol y de la progesterona en desoxicorticosterona. Una evaluación de los niveles de 17-OH P ofrece información que respalda el diagnóstico diferencial de la CAH derivada de mutaciones de los genes que intervienen en la síntesis del cortisol a partir de mutaciones del gen *CYP21A2*.

La medición de la 17-OH P también se considera un pilar útil del diagnóstico de otros trastornos caracterizados por el hiperandrogenismo, como el síndrome de ovario poliquístico (PCOS)⁵ y el hirsutismo en mujeres, la pubertad precoz⁶ y la adrenarquia precoz. La determinación de los niveles de 17-OH se utiliza en esos casos para excluir el diagnóstico de la CAH y la CAH no clásica.

A los pacientes afectados de CAH se les tratará con glucocorticoides y mineralcorticoides. El tratamiento con glucocorticoides es de especial importancia para evitar las crisis adrenales y la virilización derivadas de una síntesis excesiva de andrógenos^{2,4,7}. Como la finalidad de los tratamientos con glucocorticoides no es la supresión completa de la síntesis de 17-OHP, es importante asegurarse de supervisar debidamente el tratamiento a fin de evaluar la posología correcta de los fármacos. Esto se hace mediante la evaluación regular de los niveles de 17-OH P (y androstenediona) como indicadores tradicionales de la idoneidad del tratamiento con glucocorticoides en la CAH⁵.

3. PRINCIPIO DEL MÉTODO

El 17OH Progesterone ELISA es un ensayo enzimático inmunométrico competitivo (ELISA) en el que la progesterona 17OH (antígeno) de la muestra compite con la progesterona 17OH antigénica conjugada con peroxidasa de rábano picante (HRP) para unirse al número limitado de anticuerpos antiprogesterona 17OH recubiertos en la microplaca (fase sólida).

Tras la incubación, la separación ligada/libre se realiza mediante un simple lavado en fase sólida. A continuación, la enzima HRP de la fracción ligada reacciona con el sustrato (H_2O_2) y el sustrato de TMB, y desarrolla un color azul que cambia a amarillo cuando se añade la solución de detención (H_2SO_4). La intensidad del color es inversamente proporcional a la concentración de progesterona 17OH de la muestra.

La concentración de progesterona 17OH en la muestra se calcula mediante una curva de calibración.

4. REACTIVOS, MATERIALES E INSTRUMENTACIÓN

4.1. Reactivos y materiales incluidos en el kit

1. Calibradores (6 viales de 1 mL cada uno)

Suero humano, ProClin >0,0015%, NaN_3 <0,1%

CAL0

REF DCE002/0406-0

CAL1

REF DCE002/0407-0

CAL2

REF DCE002/0408-0

CAL3

REF DCE002/0409-0

CAL4

REF DCE002/0410-0

CAL5

REF DCE002/0411-0

2. Control (2 viales de 1 mL cada uno)

Suero humano, ProClin >0,0015%, NaN_3 <0,1%

Control A

REF DCE045/0403A-0

Control B

REF DCE045/0403B-0

Las concentraciones de los controles se indican en el certificado de análisis

3. Conjugado (1 vial, 22 mL)

Progesterona 17OH conjugada con peroxidasa de rábano picante (HRP), ProClin >0,0015%

REF DCE002/0402-0

4. Microplaca recubierta (1 microplaca que se puede romper)

Microplaca recubierta de anticuerpos antiprogesterona 17OH

REF DCE002/0403-0

5. Sustrato de TMB (1 vial, 15 mL)

H_2O_2 -TMB 0,26 g/L (evitar el contacto con la piel)

ProClin <0,0015%

REF DCE004-0

6. Solución de detención (1 vial, 15 mL)

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

REF DCE005-0

7. Conc. 10X Solución de lavado (1 vial, 50 mL)

Tampón fosfato 0,2 M pH 7,4, ProClin >0,0015%

REF DCE054-0

4.2. Materiales necesarios pero no suministrados

Agua destilada

4.3. Materiales auxiliares e instrumentación

Dispensador automático

Dispositivos de pipetas de precisión

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

5. ADVERTENCIAS

- Este kit está destinado al uso *in vitro* realizado exclusivamente por profesionales. No es para uso interno o externo en personas ni animales.
- Utilice el equipo de protección personal adecuado cuando trabaje con los reactivos suministrados.
- Siga las prácticas de laboratorio recomendadas (BPL) para manipular productos sanguíneos.
-  Materiales de origen animal utilizados para la elaboración de este kit se obtuvieron a partir de animales sanos y las proteínas de bovino se obtuvieron de los países no afectados por la EEB, aun así estos materiales se deben manejar como potencialmente infecciosos.
-  Todo el material de origen humano utilizado en la preparación de los reactivos ha sido sometido a pruebas que han dado resultado negativo para los anticuerpos contra el VIH-1 y VIH-2, el HbsAg y el VHC. Sin embargo, ningún método de prueba puede ofrecer una garantía total de ausencia de VIH, VHB, VHC u otros agentes infecciosos. Por lo tanto, los calibradores y los controles deben manejarse de la misma manera que el material potencialmente infeccioso.
- Algunos reactivos (calibradores, controles, conjugado and solución de lavado) contienen pequeñas cantidades de ProClin™ 300 (>0,0015%, <0,06%) como conservante. Evite el contacto con la piel o las mucosas.

• Clasificación según Reglamento (UE) n° 1272/2008 [CLP]

Sensibilización cutánea, categoría 1



Contiene: ProClin 300

Atención

Indicaciones de peligro:

H317 - Puede provocar una reacción alérgica en la piel.

Consejos de prudencia:

P261 - Evitar respirar el polvo/el humo/el gas/la niebla/los vapores/el aerosol.

P280 - Llevar guantes/ropa de protección/equipo de protección para los ojos/la cara/los oídos.

P321 - Se necesita un tratamiento específico (ver instrucciones de primeros auxilios en esta etiqueta).

P333+P313 - En caso de irritación o erupción cutánea: Consultar a un médico.

P362+P364 - Quitar las prendas contaminadas y lavarlas antes de volver a usarlas.

- Algunos reactivos (calibradores y control) contienen pequeñas cantidades de azida sódica (NaN_3) <0,1% como conservante. La azida sódica puede ser tóxica si se ingiere o se absorbe a través de la piel o los ojos; además, puede reaccionar con las tuberías de plomo o cobre para formar azidas metálicas potencialmente explosivas. Si elimina los reactivos en un fregadero, lávelos con gran cantidad de agua para evitar la acumulación de azida.
- El sustrato de TMB contiene un irritante que es perjudicial si se inhala, se ingiere o se absorbe a través de la piel. Para evitar lesiones, evite la inhalación, la ingestión o el contacto con la piel y los ojos.
- La solución de detención consiste en una solución diluida de ácido sulfúrico. El ácido sulfúrico es venenoso, corrosivo y puede ser tóxico si se ingiere. Para evitar quemaduras químicas, evite el contacto con la piel y los ojos.
- Evite la exposición del reactivo TMB/ H_2O_2 a la luz solar directa, a metales o a oxidantes. No congele la solución.

6. PRECAUCIONES

- Siga estrictamente la secuencia de pasos de pipeteado que se indica en este protocolo. Los datos de rendimiento representados en este documento se obtuvieron utilizando los reactivos específicos indicados en estas instrucciones de uso.
- Todos los reactivos deben conservarse refrigerados entre 2 y 8 °C en su envase original. Las excepciones se indican claramente.
- Deje que todos los componentes del kit y las muestras alcancen la temperatura ambiente (22-28 °C) y mezcle bien antes de usarlos.
- No intercambie componentes del kit procedentes de diferentes lotes. Debe respetarse la fecha de caducidad impresa en las etiquetas de la caja y de los viales. No utilice ningún componente del kit después de su fecha de caducidad.
- Si el usuario utiliza un equipo automatizado, tiene la responsabilidad de asegurarse de que el kit ha sido debidamente validado para su uso previsto.
- La eliminación incompleta o imprecisa del líquido de los pocillos podría alterar la precisión del ensayo y/o

aumentar el fondo. Para mejorar el rendimiento del kit en sistemas automáticos se recomienda aumentar el número de lavados.

- Es importante que el tiempo de reacción en cada pocillo se mantenga constante para obtener resultados reproducibles. El pipeteo de las muestras no debe prolongarse más de diez minutos para evitar errores en el ensayo. Si se necesitan más de 10 minutos, siga el mismo orden de dispensación. Si se utiliza más de una placa, se recomienda repetir la curva dosis-respuesta en cada placa.
- La adición de la solución de sustrato de TMB inicia una reacción cinética, que finaliza al añadir la solución de detención. Por lo tanto, el sustrato de TMB y la solución de detención deben añadirse en la misma secuencia para eliminar las posibles desviaciones temporales durante la reacción.
- Respete las directrices para realizar el control de calidad en los laboratorios médicos mediante el ensayo de controles y/o sueros combinados.
- Se requiere la máxima precisión en la reconstitución y dispensación de los reactivos.
- No se deben usar en el ensayo muestras contaminadas microbiológicamente, muy lipémicas, **ictéricas** o hemolizadas.
- Los lectores de placas miden en vertical. No toque el fondo de los pocillos.
- **Deben emplearse puntas desechables nuevas al pipetear reactivos de ensayo, incluidas las muestras, los calibradores y los controles, para mitigar el riesgo de contaminación por arrastre. De lo contrario, los resultados podrían no ser válidos.**

7. ALMACENAMIENTO Y ESTABILIDAD DE LOS REACTIVOS

Almacene el kit a 2-8 °C en un lugar oscuro.

- El kit es estable a 2-8 °C hasta la fecha de caducidad indicada en su etiqueta externa.
- Una vez abierto, el kit es estable a 2-8 °C durante 6 meses.
- La solución de lavado diluida es estable durante 30 días a 2-8 °C.

Nota importante: abra la bolsa que contiene la microplaca recubierta solo cuando esté a temperatura ambiente y ciérrela inmediatamente después de su uso.

8. RECOGIDA Y ALMACENAMIENTO DE LAS MUESTRAS

El ensayo debe realizarse usando muestras de suero (tubos de muestras estándar o tubos que contienen gel de separación de suero) o plasma (heparina de litio, heparina de sodio o EDTA de potasio).

Almacenamiento de muestras	Duración
2-8 °C	96 horas
Ciclos de congelación/descongelación	4 ciclos

9. PROCEDIMIENTO

9.1. Preparación de calibradores y controles

Los calibradores están listos para utilizarse y tienen la siguiente concentración de progesterona 17OH:

	C ₀	C ₁	C ₂	C ₃	C ₄	C ₅
ng/mL	0	0.2	0.6	2	6	16

Los controles están listos para su uso.

9.2. Preparación del conjugado

El conjugado está listo para su uso.

9.3. Preparación de la solución de lavado

Diluir el contenido del vial "Conc. Wash Solution 10X" con agua destilada hasta un volumen final de 500 mL antes de usarlo. Para volúmenes más pequeños, respete la relación de dilución de 1:10.

Es posible que observe la presencia de cristales dentro de la solución de lavado concentrada; en este caso, mezcle a temperatura ambiente hasta la completa disolución de los cristales. Para una mayor precisión, diluya todo el frasco de solución de lavado concentrada a 500 mL, teniendo cuidado también de transferir los cristales enjuagando completamente el frasco y luego mezclando hasta que los cristales se disuelvan completamente.

9.4. Preparación de las muestras

La determinación de la progesterona 17OH puede realizarse usando muestras de suero humano (tubos de muestras estándar o tubos que contienen gel de separación de suero) o plasma (heparina de litio, heparina de sodio o EDTA de potasio).

Almacenar la muestra a -20 °C si la determinación no se lleva a cabo el mismo día que se recoge la muestra. Antes de utilizar, mezclar suavemente durante 5 minutos con un mezclador de rodillos.

9.5. Procedimiento

- **Deje que todos los reactivos alcancen la temperatura ambiente (22-28 °C) durante al menos 30 minutos.** Al finalizar el ensayo, almacene inmediatamente los reactivos a 2-8 °C: evite la exposición prolongada a la temperatura ambiente.
- Las tiras de micropocillos recubiertas no utilizadas deben dejarse de forma segura en el envoltorio de papel de aluminio que contiene desecante y almacenarse a 2-8 °C.
- Para evitar que se produzca una posible contaminación microbiana y/o química, los reactivos no utilizados nunca se deberán transferir a los viales originales.
- Como es necesario realizar la determinación por duplicado para mejorar la precisión de los resultados de la prueba, prepare dos pocillos para cada punto de la curva de calibración (C₀-C₅), dos por cada control, dos para cada muestra y uno para el blanco.

Reactivo	Calibrador	Muestra/ Control	Blanco
Calibrador C ₀ -C ₅	25 µL		
Muestra/ Control		25 µL	
Conjugado	200 µL	200 µL	

Incubar durante 1 hora a 37 °C ($\pm 0,5$ °C).

Retire el contenido de cada pocillo; lave los pocillos 6 veces con 300 µL de solución de lavado diluida.

Nota importante: en cada paso de lavado, agite ligeramente la placa durante 5 segundos y elimine el exceso de solución golpeando la placa invertida sobre un paño de papel absorbente.

En caso de utilizar una lavadora automática, después del último ciclo de lavado elimine la solución sobrante de la misma manera.

Sustrato de TMB	100 µL	100 µL	100 µL
--------------------	--------	--------	--------

Incubar a temperatura ambiente (22-28 °C) durante 15 minutos en la oscuridad.

Solución de detención	100 µL	100 µL	100 µL
--------------------------	--------	--------	--------

Agite suavemente la microplaca.

Compare la absorbancia (E) a 450 nm con la obtenida con una longitud de onda de referencia de 620-630 nm o con el blanco en un plazo de 5 minutos.

10. CONTROL DE CALIDAD

Las prácticas de laboratorio recomendadas (BPL) requieren el uso de muestras de control de calidad en cada serie de ensayos para comprobar el rendimiento del ensayo. Los controles deberán tratarse como muestras desconocidas y los resultados deberán analizarse con métodos estadísticos adecuados.

Los controles incluidos en el kit deberán ser probados como desconocidos y están destinados a ayudar a evaluar la validez de los resultados obtenidos con cada placa de ensayo.

La concentración media de cada nivel de control se documenta en el informe de control de calidad que se incluye en cada kit. Los niveles de concentración media se determinan respecto de varios análisis, los cuales se realizan por duplicado en varios puntos diferentes de cada placa.

DiaMetra recomienda que los usuarios mantengan registros gráficos de los valores de control que se generan con cada ensayo, incluida la media de ejecución, la DE (desviación estándar) y el % CV. Esta información facilitará los ensayos de tendencia de los controles relacionados con el rendimiento de lotes de control actuales e históricos relativos a los datos de control de calidad proporcionados. La tendencia facilitará la identificación de los análisis que generan valores de control significativamente distintos de su intervalo medio.

Al interpretar los datos de control, los usuarios deberán tener en cuenta que este producto fue diseñado y

desarrollado como un producto manual. El rango establecido en el certificado de control de calidad deberá ser adecuado para los ensayos que se realizan manualmente y en estricto cumplimiento del procedimiento de ensayo anteriormente descrito. Los profesionales del control de la calidad reconocen que, como resultado de las diferencias en las condiciones y en las prácticas, siempre habrá variaciones entre laboratorios en los valores medios y en la precisión de las mediciones de control⁸.

11. CÁLCULO DE LOS RESULTADOS

Hay disponibles diversos paquetes de software de reducción de datos que se pueden utilizar para generar el promedio de la curva de calibración y para calcular el promedio de las concentraciones de muestras y controles desconocidos. Es necesario un ajuste de curva logístico de 4 parámetros (4PL), **incluido el calibrador 0**.

También se puede preparar una curva de calibración en papel semilogarítmico mediante el trazado de la absorbancia media en el eje Y frente a la concentración de analitos en el eje X. El calibrador 0 debe incluirse en la curva de calibración. Lea el valor de absorbancia medio de cada muestra desconocida que se encuentra fuera de la curva.

Para que los resultados del ensayo se consideren válidos, los calibradores y el control del kit deben ajustarse a las especificaciones detalladas en el certificado de análisis específico del lote.

Si un control está fuera de su rango especificado, los resultados de la prueba asociados no son válidos y se deben volver a realizar pruebas de las muestras.

12. RANGO DE MEDICIÓN

El rango de medición del ensayo (AMR) es de 0,26–16 ng/mL. Cualquier valor que sea inferior a 0,26 ng/mL debe informarse como “<0,26 ng/mL”. Cualquier valor que sea superior a 16 ng/mL debe informarse como “>16 ng/mL”.

13. METROLOGÍA Y TRAZABILIDAD

El 17OH Progesterone ELISA ha sido estandarizado con respecto a los estándares de referencia internos (matriz de suero), cuyo valor ha sido asignado a un método LC-MS/MS disponible.

14. VALORES ESPERADOS

Los rangos siguientes se determinaron usando el 17OH Progesterone ELISA y se facilitan solo con fines informativos. El intervalo de referencia del 95 % para adultos aparentemente sanos se calcularon mediante un método no paramétrico siguiendo la orientación de CLSI C28-A “Defining, Establishing and Verifying Reference Intervals in the Clinical Laboratory”.

	n	Mediana (ng/mL)	Intervalo de referencia (ng/mL)
Mujeres			
Fase luteínica	123	0,45	<LoQ – 2,19
Fase folicular	122	0,32	<LoQ – 2,10
Posmenopáusicas	122	<LoQ	<LoQ – 0,95
Hombres	122	0,75	<LoQ – 1,97
Niños (3–18 años)	124	<LoQ	<LoQ – 1,48

Los rangos anteriores deberán ser considerados como directrices solamente; se recomienda que cada laboratorio establezca su propio rango previsto en función de su propia población de pacientes.

15. CARACTERÍSTICAS DEL ENSAYO

Se muestran los datos de rendimiento representativos. Los resultados obtenidos en diferentes laboratorios pueden diferir.

15.1. Capacidad de detección

El límite de blanco (LoB), el límite de detección (LoD) y el límite de cuantificación (LoQ) se determinaron con orientación del documento CLSI EP17-A, "Protocols for Determination of Limits of Detection and Limits of Quantitation, usando 6 blancos y 6 muestras de bajo nivel.

Sensibilidad	Concentración
Límite de blanco (LoB)	0,02 ng/mL
Límite de detección (LoD)	0,11 ng/mL
Límite de cuantificación (LoQ)	0,26 ng/mL

15.2. Veracidad

Se ha demostrado la veracidad mediante la comparación del método 17OH Progesterone ELISA con un LC-MS/MS disponible en el mercado que utiliza muestras de donantes nativos; consulte la sección 15.5.

15.3. Precisión

La precisión de 17OH Progesterone ELISA se determinó mediante la realización de un estudio de precisión complejo.

Repetibilidad: Se analizaron un total de 6 muestras de suero en 5 réplicas, una vez al día durante 5 días por 3 operadores. A continuación se muestran los datos de un lote representativo:

Muestra	n	Medio conc. (ng/mL)	Intraprueba (repetibilidad)	
			DE	CV %
1	75	0,90	0,10	11,4 %
2	75	1,45	0,15	10,0 %
3	75	2,10	0,20	9,3 %
4	75	5,14	0,49	9,5 %
5	75	8,94	0,74	8,3 %
6	75	14,50	1,11	7,6 %

Reproducibilidad: Se analizaron un total de 6 muestras de suero en 5 réplicas, una vez al día durante 5 días por 3 operadores. A continuación se muestran los datos de un lote representativo:

Muestra	n	Medio conc. (ng/mL)	Dentro del laboratorio (reproducibilidad)	
			DE	CV %
1	75	0,90	0,12	13,0 %
2	75	1,45	0,17	11,6 %
3	75	2,10	0,23	11,1 %
4	75	5,14	0,55	10,7 %
5	75	8,94	0,82	9,2 %
6	75	14,50	1,29	8,9 %

15.4. Linealidad

La linealidad se evaluó en base a CLSI EP-06, "Evaluation of the Linearity of Quantitative Measurement Procedures". Para la concentración de progesterona 17OH mediante 17OH Progesterone ELISA, la medición muestra linealidad para el intervalo de 0,2 a 17,22 ng/mL dentro de la desviación de linealidad permitida (ADL) de ± 15 %.

15.5. Comparación de métodos

El 17OH Progesterone ELISA se comparó con un método LC-MS/MS disponible en el mercado de conformidad con CLSI EP-9A, "Method Comparison and Bias Estimation Using Patient Samples". Con cada método se realizó el ensayo de un total de 120 muestras seleccionadas para representar un amplio intervalo de concentraciones de progesterona 17OH. Se realizó el análisis de regresión de Passing y Bablock en los datos comparativos:

n	Pendiente [IC del 95 %]	Intersección (ng/mL) [IC del 95 %]	Coefficiente de correlación (r)
120	0,91 [0,87 a 0,97]	0,21 [0,16 a 0,28]	0,99

15.6. Especificidad analítica

La especificidad se evaluó con los siguientes reaccionantes cruzados.

Reaccionante cruzado	Concentración probada (unidad)	Promedio en % de reactividad cruzada
11-desoxicortisol	80 ng/mL	2,15 %
Progesterona	2000 ng/mL	0,47 %
Pregnenolona	2000 ng/mL	0,15 %
Testosterona	2000 ng/mL	0,07 %
17β-estradiol	2000 ng/mL	0,01 %
Aldosterona	2000 ng/mL	0,00 %
Estriol	2000 ng/mL	0,00 %
Estrona-3-sulfato	2000 ng/mL	0,00 %
Espironolactona	2000 ng/mL	0,00 %
Androstenediona	2000 ng/mL	0,05 %
Androsterona	2000 ng/mL	0,04 %
Corticosterona	2000 ng/mL	0,09 %
Cortisol	2000 ng/mL	0,10 %
Cortisona	2000 ng/mL	0,07 %
DHEA	2000 ng/mL	0,07 %
DHEA-S	20 000 ng/mL	0,01 %
DHT	2000 ng/mL	0,04 %
Prednisolona	3000 ng/mL	0,02 %
Prednisona	2000 ng/mL	0,01 %

Las siguientes sustancias no interfieren con un sesgo de $> \pm 15\%$ en la 17OH Progesterone ELISA cuando las concentraciones están por debajo del umbral indicado presentado en la siguiente tabla.

Reactivos que pueden interferir	Límite máximo de concentración
Bilirrubina, conjugada	20 mg/dL
Bilirrubina, no conjugada	20 mg/dL
Hemoglobina	200 mg/dL
Triglicéridos	600 mg/dL

15.7. Estudio en suero-plasma

El estudio de comparación de la matriz de 17OH Progesterone ELISA se realizó para evaluar la diferencia entre los tipos de tubos (tubos separadores de suero [SST], plasma de heparina de litio, plasma de heparina sódica y plasma K2 EDTA) frente a las muestras de control (tapón rojo para suero, sin aditivos) siguiendo las directrices CLSI (EP9-A).

Se evaluó un total de 27 muestras (23 nativas, 4 con aditivos) para cubrir el intervalo. Se realizó el análisis de regresión de Passing y Bablock en los datos comparativos:

Tipo de muestra	Pendiente [IC del 95 %]	Intersección (ng/mL) [IC del 95 %]	Coefficiente de correlación (r)
SST	1,02 [0,91 a 1,13]	-0,03 [-0,21 a 0,11]	0,99
Heparina de litio	1,00 [0,87 a 1,04]	0,00 [-0,07 a 0,08]	0,99
Heparina sódica	1,00 [0,94 a 1,10]	-0,02 [-0,14 a 0,03]	0,99
EDTA	1,04 [0,90 a 1,12]	-0,03 [-0,19 a 0,09]	0,99

16. LÍMITES DE USO

- Como en cualquier procedimiento diagnóstico, los resultados se deberán interpretar junto con los hallazgos clínicos del paciente y otra información de la que el médico disponga.
- Los anticuerpos heterofílicos en el suero humano pueden presentar reacciones con las inmunoglobulinas reactivas, que interfieren con los inmunoensayos *in vitro*⁹. Los pacientes que se exponen habitualmente a animales o a productos de suero animal pueden ser propensos a esta interferencia y puede que se observen valores anómalos.

17. GESTIÓN DE RESIDUOS

Los reactivos deben eliminarse de acuerdo con la normativa local.

Todos los materiales que hayan entrado en contacto con las muestras y los reactivos deben eliminarse de acuerdo con la normativa nacional, estatal y local.

18. BIBLIOGRAFÍA

1. Honour JW. 17-Hydroxyprogesterone in children, adolescents and adults. Ann Clin Biochem. 2014 Jul;51(Pt 4):424-40.
2. Speiser PW, Arlt W, Auchus RJ, Baskin LS, Conway GS, Merke DP, Meyer-Bahlburg HFL, Miller WL, Murad MH, Oberfield SE, White PC. Congenital Adrenal Hyperplasia Due to Steroid 21-Hydroxylase Deficiency: An Endocrine Society Clinical Practice Guideline. J Clin Endocrinol Metab. 2018 Nov 1;103(11):4043-4088.
3. Bornstein SR, Allolio B, Arlt W, Barthel A, Don-Wauchope A, Hammer GD, Husebye ES, Merke DP, Murad MH, Stratakis CA, Torpy DJ. Diagnosis and Treatment of Primary Adrenal Insufficiency: An Endocrine Society Clinical Practice Guideline. J Clin Endocrinol Metab. 2016 Feb;101(2):364-89.
4. Sharma R, Seth A. Congenital adrenal hyperplasia: issues in diagnosis and treatment in children. Indian J Pediatr. 2014 Feb;81(2):178-85.
5. Legro RS, Arslanian SA, Ehrmann DA, Hoeger KM, Murad MH, Pasquali R, Welt CK; Endocrine

Society. Diagnosis and treatment of polycystic ovary syndrome: an Endocrine Society clinical practice guideline. *J Clin Endocrinol Metab.* 2013 Dec;98(12):4565-92.

6. Grandone A, Marzuillo P, Luongo C, Toraldo R, Mariani M, Miraglia Del Giudice E, Perrone L. Basal levels of 17-hydroxyprogesterone can distinguish children with isolated precocious pubarche. *Pediatr Res.* 2018 Oct;84(4):533-536.
7. Rachoń D. Differential diagnosis of hyperandrogenism in women with polycystic ovary syndrome. *Exp Clin Endocrinol Diabetes.* 2012 Apr;120(4):205-9.
8. Basic QC Practices On-line Course; <http://www.Westgard.com>.
9. Boscato, LM. and Stuart, MC., 'Heterophilic antibodies: a problem for all immunoassays'. *Clin Chem*, 34, 1988, pp 27–33

(UE) 2017/746 sobre los productos sanitarios para diagnóstico in vitro); si, durante el uso de este dispositivo o como resultado de su uso, se ha producido un incidente grave, informe del mismo al fabricante y/o a su representante autorizado y al organismo regulador nacional.

Se puede contactar con el fabricante a través de su servicio de atención al cliente o del equipo de asistencia técnica. Los datos de contacto se encuentran a continuación y en el sitio web de la empresa: www.diametra.com.

Ed. 01/2024

DCM004-13

19. DENTIFICADOR DE REVISIÓN

Las adiciones o cambios en las instrucciones de uso se han resaltado en gris.

20. RECLAMACIONES SOBRE PRODUCTOS Y ASISTENCIA TÉCNICA

Para un paciente/usuario/tercero en la Unión Europea y en países con un régimen regulatorio similar (Reglamento

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