



**IMMUNOASSAYS AND SERVICES**

BIOGENIC AMINES & NEUROSCIENCE | ENDOCRINOLOGY | FOOD SAFETY

LABOR DIAGNOSTIKA NORD GmbH & Co.KG | Am Eichenhain 1 | 48531 Nordhorn | Germany | Tel. +49 5921 8197-0 | Fax +49 5921 8197-222 | info@ldn.de | www.ldn.de

---

**Instructions for use**  
**17-OH-Progesterone ELISA**

**REF**

**FR E-2800**



**IVD**



**INTRODUCTION****Intended Use**

Enzyme immunoassay for the in-vitro diagnostic quantitative determination of 17-OH-progesterone in human serum and plasma.

**Summary and explanation**

The steroid hormone 17-OH-progesterone (17-OHP) is produced in the adrenal cortex and in the gonads. Gestagenic effects exerted by 17-OHP are only small. Nevertheless, this hormone is of clinical significance because it represents the ultimate precursor of 11 $\beta$ -desoxycortisol (compounds, CpS). CpS is formed by hydroxylation of the carbon atom C 21. Enzyme activity of 21-hydroxylase in the adrenal cortex may thus be monitored by analyzing the level of 17-OHP in the blood.

Deficiencies in 21-hydroxylase, most commonly found in congenital adrenal hyperplasia, result in excessive secretion of 17-OHP and consequently in enhanced blood levels. Deficiencies in 11-hydroxylase, however, merely lead to moderately increased values of 17-OHP. The analysis of this steroid hormone, therefore, plays a significant role in the differential diagnosis of congenital adrenal hyperplasia.

In adult non-pregnant women, 17-OHP levels in the blood depend on the phase of the menstrual cycle. Like progesterone, 17-OHP is secreted by the mature follicle and the corpus luteum. Concentrations are generally higher after ovulation.

In addition, levels of 17-OHP are influenced by daytime rhythms which correlate with the adrenal secretion of cortisol. Maximal levels are found in samples collected between midnight and 8.00 a.m..

In adult men, there are few indications of similar fluctuations of 17-OHP levels.

During pregnancy, large amounts of 17-OHP are produced by the fetus, the placenta and the adrenal cortex. The hormone is secreted into the fetal and the maternal blood circulation. Maternal values of 17-OHP strongly increase after the 32. week of pregnancy reaching 4-fold higher levels than during the luteal phase of the menstrual cycle. 17-OHP may also be found in the umbilical cord of newborns.

**PRINCIPLE**

Solid phase enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) based on the competition principle. An unknown amount of antigen present in the sample and a fixed amount of enzyme labeled antigen compete for the binding sites of the antibodies coated onto the wells. After incubation the wells are washed to stop the competition reaction. After the substrate reaction the intensity of the developed colour is inversely proportional to the amount of the antigen in the sample. Results of samples can be determined directly using the standard curve.

**WARNINGS AND PRECAUTIONS**

1. This kit is for in vitro diagnostic use only. For professional use only.
2. Before starting the assay, read the instructions completely and carefully. Use the valid version of the package insert provided with the kit. Be sure that everything is understood.
3. The microplate contains snap-off strips. Unused wells must be stored at 2 °C to 8 °C in the sealed foil pouch and used in the frame provided.
4. Pipetting of samples and reagents must be done as quickly as possible and in the same sequence for each step.
5. Use reservoirs only for single reagents. This especially applies to the substrate reservoirs. Using a reservoir for dispensing a substrate solution that had previously been used for the conjugate solution may turn solution colored. Do not pour reagents back into vials as reagent contamination may occur.
6. Mix the contents of the microplate wells thoroughly to ensure good test results. Do not reuse microwells.
7. Do not let wells dry during assay; add reagents immediately after completing the rinsing steps.
8. Allow the reagents to reach room temperature (21-26°C) before starting the test. Temperature will affect the absorbance readings of the assay. However, values for the patient samples will not be affected.
9. Never pipet by mouth and avoid contact of reagents and specimens with skin and mucous membranes.
10. Do not smoke, eat, drink or apply cosmetics in areas where specimens or kit reagents are handled.
11. Wear disposable latex gloves when handling specimens and reagents. Microbial contamination of reagents or specimens may give false results.

12. Handling should be done in accordance with the procedures defined by an appropriate national biohazard safety guideline or regulation.
13. Do not use reagents beyond expiry date as shown on the kit labels.
14. All indicated volumes have to be performed according to the protocol. Optimal test results are only obtained when using calibrated pipettes and microtiterplate readers.
15. Do not mix or use components from kits with different lot numbers. It is advised not to exchange wells of different plates even of the same lot. The kits may have been shipped or stored under different conditions and the binding characteristics of the plates may result slightly different.
16. Avoid contact with Stop Solution. It may cause skin irritation and burns.
17. Chemicals and prepared or used reagents have to be treated as hazardous waste according to the national biohazard safety guideline or regulation.
18. For information please refer to Material Safety Data Sheets. Safety Data Sheets for this product are available upon request directly from the manufacturer.

## REAGENTS

### Reagents provided

**96**

#### FR E-2831 Microtiterplate

12x8 (break apart) strips, 96 wells; Wells coated with an anti-17-OH-progesterone antibody (polyclonal).

### Standards

ready to use

	Cat. no.	Standard	Concentration	Volume/Vial
STANDARD A	FR E-2801	Standard A (0)	0 ng/ml	1 ml
STANDARD B	FR E-2802	Standard B (1)	0.1 ng/ml	0.5 ml
STANDARD C	FR E-2803	Standard C (2)	0.4 ng/ml	0.5 ml
STANDARD D	FR E-2804	Standard D (3)	1.6 ng/ml	0.5 ml
STANDARD E	FR E-2805	Standard E (4)	6.5 ng/ml	0.5 ml
STANDARD F	FR E-2806	Standard F (5)	25 ng/ml	0.5 ml

CONTROL 1

+ CONTROL 2

#### FR E-2851 + FR E-2852 Control low / Control high

2 vials, 0.5 ml each, ready to use; containing 17-OH-progesterone in serum.

For control values and ranges please refer to QC-Datasheet.

CONJUGATE

#### FR E-2840 Enzyme Conjugate

1 vial, 11 ml, ready to use; 17-OH-progesterone conjugated to horseradish peroxidase;

SUBSTRATE

#### AR E-0055 Substrate Solution

1 vial, 22 ml, ready to use; Tetramethylbenzidine (TMB).

STOP-SOLN

#### AR E-0080 Stop Solution

1 vial, 7 ml, ready to use; contains 2 N acidic solution.

Avoid contact with the stop solution. It may cause skin irritations and burns.

WASH-CONC 10X

#### AR E-0030 Wash Solution

1 vial, 50 ml (10X concentrated);

see „Preparation of Reagents“.

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

### Material required but not provided

- Microcentrifuge
- A microtiter plate calibrated reader (450±10 nm)
- Microplate mixer operating at about 600 rpm, optionally

- Vortex mixer
- Calibrated variable precision micropipettes (25 µl, 50 µl, 100 µl, 200 µl).
- Absorbent paper.
- Distilled or deionized water
- Timer
- Semi logarithmic graph paper or software for data reduction

**Storage conditions**

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

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

**Reagents preparations**

Allow the reagents and the required number of wells to reach room temperature (21-26°C) before starting the test.

**Wash Solution**

Add deionized water to the 10X concentrated *Wash Solution*.

Dilute 50 ml of concentrated *Wash Solution* with 450 ml deionized water to a final volume of 500 ml.

*The diluted Wash Solution is stable for 12 weeks at room temperature.*

**Disposal of the kits**

The disposal of the kit must be made according to the national regulations. Special information for this product is given in the Material Safety Data Sheet.

**Damaged test kits**

In case of any severe damage of the test kit or components, the manufacturer have to be informed written, latest one week after receiving the kit. Severely damaged single components should not be used for a test run. They have to be stored until a final solution has been found. After this, they should be disposed according to the official regulations.

**SPECIMEN COLLECTION AND PREPARATION**

**Serum, Plasma**

The usual precautions for venipuncture should be observed. It is important to preserve the chemical integrity of a blood specimen from the moment it is collected until it is assayed. Do not use grossly haemolytic, icteric or grossly lipaemic specimens. Samples which appear turbid should be centrifuged before testing to remove any particulate material.

Storage:	2-8°C	≤ -20°C (Aliquots)	Keep away from heat or direct sun light Avoid repeated freeze-thaw cycles
Stability:	7 d	3 m	

**ASSAY PROCEDURE**

**General remarks**

- All reagents and specimens must be allowed to come to room temperature before use. All reagents must be mixed without foaming.
- Once the test has been started, all steps should be completed without interruption.
- Use new disposal plastic pipette tips for each standard, control or sample in order to avoid cross contamination.
- Absorbance is a function of the incubation time and temperature. Before starting the assay, it is recommended that all reagents are ready, caps removed, all needed wells secured in holder, etc. This will ensure equal elapsed time for each pipetting step without interruption.
- As a general rule the enzymatic reaction is linearly proportional to time and temperature.
- Respect the incubation times as stated in this instructions for use.

## Assay procedure

Each run must include a standard curve.

<b>1.</b> Secure the desired number of coated strips in the frame holder.
<b>2.</b> Dispense <b>25 µl</b> of each <b>Standard, Control and samples</b> <u>with new disposable tips</u> into appropriate wells.
<b>3.</b> Dispense <b>100 µl Enzyme Conjugate</b> into each well. Thoroughly mix for 10 seconds. It is important to have a complete mixing in this step.
<b>4.</b> Incubate for <b>60 minutes</b> at room temperature. Shaking on a horizontal shaker during incubation is not necessary, but it improves the sensitivity of the test slightly.
<b>5.</b> Briskly empty the contents of the wells by aspiration or by decanting. Rinse the wells 4 times with diluted Wash Solution (300 µl per well). Strike the wells sharply on absorbent paper to remove residual droplets. <b>Important note:</b> The sensitivity and precision of this assay is markedly influenced by the correct performance of the washing procedure!
<b>6.</b> Add <b>200 µl</b> of <b>Substrate Solution</b> to each well.
<b>7.</b> Incubate for <b>30 minutes</b> in the dark at room temperature.
<b>8.</b> Stop the enzymatic reaction by adding <b>50 µl</b> of <b>Stop Solution</b> to each well.
<b>9.</b> Determine the absorbance of each well at <b>450±10 nm</b> . It is recommended that the wells be read <u>within 15 minutes</u> .

## Calculation of results

1. Calculate the average absorbance values for each set of standards, controls and patient samples.
2. Construct a standard curve by plotting the mean absorbance obtained from each standard against its concentration with absorbance value on the vertical (Y) axis and concentration on the horizontal (X) axis.
3. Using the mean absorbance value for each sample determine the corresponding concentration from the standard curve.
4. Automated method: The results in the IFU have been calculated automatically using a 4 PL (4 Parameter Logistics) curve fit. 4 Parameter Logistics is the preferred calculation method. Other data reduction functions may give slightly different results.
5. The concentration of the samples can be read directly from this standard curve. Samples with concentrations higher than that of the highest standard have to be further diluted. For the calculation of the concentrations this dilution factor has to be taken into account.

## Conversion to SI units:

17-OH-Progesterone (ng/ml) x 3.03 = nmol/l

## Example of typical standard curve

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

<b>Standard</b>	<b>Optical Density (450 nm)</b>
Standard A 0.0 ng/ml	3.561
Standard B 0.1 ng/ml	2.764
Standard C 0.4 ng/ml	1.925
Standard D 1.6 ng/ml	1.136
Standard E 6.5 ng/ml	0.526
Standard F 25 ng/ml	0.226

## EXPECTED NORMAL VALUES

Apparently healthy subjects show the following values of 17-OH-Progesterone:

<b>Children</b>	3 -14 years	0.05 - 2.0 ng/ml
<b>Reproductive aged women</b>	Follicular phase:	0.1 - 1.0 ng/ml
	Luteal phase:	0.6 - 2.5 ng/ml
	Ovulation:	0.3 - 1.5 ng/ml
	Post ACTH:	< 3.2 ng/ml
	Third trimester:	2.0 - 12 ng/ml
	Postmenopausal women:	0.13 - 0.6 ng/ml
<b>Normal men</b>		0.5 - 3 ng/ml

The results itself should not be the only reason for any therapeutically consequences. They have to be correlated to other clinical observations and diagnostic tests.

It is strongly recommended that each laboratory establishes its own range of normal values.

## QUALITY CONTROL

Good laboratory practice requires that controls be run with each calibration curve. A statistically significant number of controls should be assayed to establish mean values and acceptable ranges to assure proper performance.

It is recommended to use control samples according to state and federal regulations. The use of control samples is advised to assure the day to day validity of results. Use controls at both normal and pathological levels.

The controls and the corresponding results of the QC-Laboratory are stated in the QC certificate added to the kit. The values and ranges stated on the QC sheet always refer to the current kit lot and should be used for direct comparison of the results.

It is also recommended to make use of national or international Quality Assessment programs in order to ensure the accuracy of the results.

Employ appropriate statistical methods for analysing control values and trends. If the results of the assay do not fit to the established acceptable ranges of control materials patient results should be considered invalid.

In this case, please check the following technical areas: Pipetting and timing devices; photometer, expiration dates of reagents, storage and incubation conditions, aspiration and washing methods.

After checking the above mentioned items without finding any error contact your distributor or the manufacturer directly.

## PERFORMANCE CHARACTERISTICS

### Analytical Sensitivity

The analytical sensitivity of the 17-OH-Progesterone ELISA was calculated by subtracting 2 standard deviations from the mean of twenty (20) replicate analyses of *Standard A*. The analytical sensitivity of the assay is 0.037 ng/ml.

### Specificity (Cross Reactivity)

The following materials have been evaluated for cross reactivity.

Substance	% Cross-reactivity
Androsterone	< 0,1%
5 $\alpha$ -Dihydrotestosterone	< 0,1%
Androstendione	< 0,1%
Testosterone	< 0,1%
Cortisol	< 0,1%
11-Desoxycortisol	1,9%
Progesterone	2,4%
Estradiol	< 0,1%
Estriol	< 0,1%
Pregnenolone	0,4%
Prednisolone	< 0,1%
Prednisone	< 0,1%

### Assay Dynamic Range

The range of the assay is between 0.1 – 25 ng/ml.

### Reproducibility

#### Intra-Assay

The intra-assay variation was determined by 20 replicate measurements of 3 serum samples within one run using the 17-OH-Progesterone ELISA. The within-assay variability is shown below:

	Sample 1	Sample 2	Sample 3
Mean (ng/ml)	0.72	5.77	16.58
SD (ng/ml)	0.05	0.19	0.60
CV (%)	7.0	3.3	3.6
n =	20	20	20

#### Inter-Assay

The inter-assay variation was determined by duplicate measurements of 3 serum samples in 10 different runs using the 17-OH-Progesterone ELISA. The inter-assay variability is shown below:

	Sample 1	Sample 2	Sample 3
Mean (ng/ml)	0.91	4.98	16.34
SD (ng/ml)	0.06	0.38	0.69
CV (%)	6.6	7.5	4.2
n =	10	10	10

### Recovery

Using the standard matrix a spiking solution was prepared (1000 ng/ml). Aliquots of 1, 2 and 3 µl, respectively, were spiked into 500 µl of three different sera, leaving the serum matrix of the spiked samples relatively intact. All samples were then measured by the 17-OH-Progesterone assay procedure. The percentage recoveries were determined by comparing expected and measured values of the samples.

Serum	Spiking	Measured concentration	Expected concentration	Recovery %
1	-	3,60	-	-
	2 ng/ml	5,99	5,60	107%
	4 ng/ml	7,54	7,60	99%
	6 ng/ml	10,43	9,60	109%
2	-	7,60	-	-
	2 ng/ml	9,95	9,60	104%
	4 ng/ml	12,82	11,60	110%
	6 ng/ml	15,68	13,60	115%
3	-	3,62	-	-
	2 ng/ml	6,01	5,62	107%
	4 ng/ml	7,76	7,62	102%
	6 ng/ml	9,71	9,62	101%

### Linearity

Three serum samples containing different amounts of analyte were assayed undiluted and diluted with the standard matrix. The percentage recovery was calculated by comparing the expected and measured values for 17-OH-progesterone.

Serum	Dilution	Measured concentration	Expected concentration	Recovery %
1	-	19,86	-	-
	1 in 2	10,62	9,93	107%
	1 in 4	5,56	4,97	112%
	1 in 8	2,85	2,48	115%
2	-	26,28	-	-
	1 in 2	13,38	13,14	102%
	1 in 4	6,46	6,57	98%
	1 in 8	3,36	3,28	102%
3	native	3,97	-	-
	1 in 2	1,91	1,99	96%
	1 in 4	1,01	0,99	102%
	1 in 8	0,56	0,50	112%

### LIMITATIONS OF PROCEDURE

Reliable and reproducible results will be obtained when the assay procedure is performed with a complete understanding of the package insert instruction and with adherence to good laboratory practice. Any improper handling of samples or modification of this test might influence the results.

### High-Dose-Hook Effect

No hook effect was observed in this test

### Drug Interferences

Until today no substances (drugs) are known to us, which have an influence to the measurement of 17-OH-progesterone in a sample.

### LEGAL ASPECTS

#### Reliability of Results

The test must be performed exactly as per the manufacturer's instructions for use. Moreover the user must strictly adhere to the rules of GLP (Good Laboratory Practice) or other applicable national standards and/or laws. This is especially relevant for the use of control reagents. It is important to always include, within the test procedure, a sufficient number of controls for validating the accuracy and precision of the test.

The test results are valid only if all controls are within the specified ranges and if all other test parameters are also within the given assay specifications. In case of any doubt or concern please contact the manufacturer.

### Therapeutic Consequences

Therapeutic consequences should never be based on laboratory results alone even if all test results are in agreement with the items as stated under point "Reliability of Results". Any laboratory result is only a part of the total clinical picture of a patient.

Only in cases where the laboratory results are in acceptable agreement with the overall clinical picture of the patient should therapeutic consequences be derived.

The test result itself should never be the sole determinant for deriving any therapeutic consequences.

### Liability

Any modification of the test kit and/or exchange or mixture of any components of different lots from one test kit to another could negatively affect the intended results and validity of the overall test. Such modification and/or exchanges invalidate any claim for replacement.

Claims submitted due to customer misinterpretation of laboratory results subject to point "Therapeutic Consequences". are also invalid. Regardless, in the event of any claim, the manufacturer's liability is not to exceed the value of the test kit. Any damage caused to the test kit during transportation is not subject to the liability of the manufacturer.

### REFERENCES

1. Abraham, G.E., R.S. Swerdloff, D. Tulchinsky et al: Radioimmunoassay of plasma 17-hydroxyprogesterone. J. Clin. Endocrinol. Metab. 33:42, 1971
2. Chrousos, G.P., D. L. Loriaux, D.L. Mann, et al: Late onset 21- hydroxylase deficiency mimicking idiopathic hirsutism or polycystic ovarian disease. Annals Intern. Med. 96:143, 1982.
3. Buster, J.E., R.J. Chang, D.L. Preston, et al: Interrelationships of circulating maternal steroids; progesterone, 16 $\alpha$ -hydroxyprogesterone, 17 $\alpha$ -hydroxyprogesterone, 20 $\alpha$ -dihydroprogesterone, gamma- 5-pregnenolone, gamma-5- pregnenolone-sulfate, gamma-5-pregnenolone-sulfate and 17-hydroxy gamma-5-pregnenolone, J. Clin. Endocrinol. Metab. 48:133, 1979.
4. New, M.I., B. Dupont, S. Pang, et al: An update on congenital adrenal hyperplasia. Recent Progress in Hormone Research, 37:105, 1981.
5. J. Hotchkiss, A. Drash, et al: Micro filter paper method for 17 $\alpha$ -hydroxyprogesterone radioimmunoassay: Its application for rapid screening for congenital adrenal hyperplasia. J. Clin. Endocrinol. Metab., 45:1003, 1977.
6. Lobo, R.A., U. Goebelsmann: Adult manifestation of congenital adrenal hyperplasia due to incomplete 21-hydroxylase deficiency mimicking polycystic ovarian disease. Am. J. Obstet. Gynecol., 138:720, 1980.
7. Urban, M.D., P.A. Lee and C.J. Migeon: Adult high infertility in men with congenital adrenalized hyperplasia. N. Engl. J. Med. 299:1392, 1978.
8. Meikle, A.W., R.J. Worley and C.D. West: Adrenal corticoid hyper-response in hirsute women. Fertil. Steril. 41:575, 1984
9. Ueshiba, H., Zerah M., New M. I.: Enzyme-linked Immunosorbent assay (ELISA). Method for screening of non-classical steroid 21-Hydroxylase deficiency. Norm. Metab. Res. 26:43, 1994
10. Liovic M et al. CYP17 gene analysis in hyperandrogenised women with and without exaggerated 17-hydroxyprogesterone response to ovarian stimulation. J. Endocrinol. Invest., 20:189, 1997

### Symbols:

	Storage temperature		Manufacturer		Contains sufficient for <n> tests
	Expiry date	<b>LOT</b>	Batch code	<b>IVD</b>	For in-vitro diagnostic use only!
	Consult instructions for use	<b>CONT</b>	Content	<b>CE</b>	CE labelled
	Caution	<b>REF</b>	Catalogue number	<b>RUO</b>	For research use only!

## **EINLEITUNG**

### **Verwendung**

Der 17-OH-Progesterone ELISA ist ein Enzymimmunoassay zur quantitativen Bestimmung von 17-OH-Progesteron in humanem Serum.

### **Zusammenfassung und Erläuterung**

Das Steroidhormon 17- $\alpha$ -Hydroxyprogesteron (17-OH-Progesteron, 17-OHP) wird sowohl in der Nebennierenrinde als auch in den Gonaden gebildet. Obwohl 17-OH-Progesteron nur eine geringe gestagene Wirkung zeigt, ist es doch von klinischem Interesse, da es eine unmittelbare Vorstufe des 11-Desoxycortisols (Compound S, CpS) ist. CpS wird aus 17-OH-Progesteron durch Hydroxylierung des Kohlenstoffatoms C21 gebildet. Daher ist 17-OH-Progesteron ein nützlicher indirekter Parameter für die 21-Hydroxylase-Enzymaktivität der Nebennierenrinde.

Bei einer angeborenen 21-Hydroxylasestörung, der häufigsten Form der kongenitalen adrenalen Hyperplasie (CAH), wird 17-OH-Progesteron im Überschuss sezerniert und deshalb im Blut in erhöhter Konzentration gefunden. Bei Patienten mit einem 11-Hydroxylasedefekt ist es dagegen mäßig erhöht. Die 17-OH-Progesteron-Bestimmung ist daher bei der Differentialdiagnostik der kongenitalen adrenalen Hyperplasie von großer klinischer Bedeutung.

Bei der erwachsenen, nichtschwangeren Frau im gebärfähigen Alter schwanken die 17-OH-Progesteron-Konzentrationen in Abhängigkeit vom Menstruationszyklus. In der Lutealphase sind die Konzentrationen höher als in der Follikelphase, da 17-OH-Progesteron genauso wie Progesteron vom reifen Follikel, besonders jedoch vom Corpus luteum sezerniert wird.

Die 17-OH-Progesteron-Werte sind tageszeitabhängig. Dieser Tagesrhythmus läuft parallel zu dem der adrenalen Cortisolsekretion ab. Die höchste Konzentration werden in Proben gefunden, die zwischen Mitternacht und 8 Uhr morgens abgenommen wurden.

Bei erwachsenen Männern gibt es nur wenige Hinweise auf systematische Schwankungen der 17-OH-Progesteron-Werte.

Während der Schwangerschaft wird 17-OH-Progesteron in großen Mengen vom Fetus, der Plazenta und der Nebennierenrinde gebildet und sowohl in den Kreislauf des Fetus als auch in den der Mutter abgegeben. Die mütterlichen 17-OH-Progesteron-Werte nehmen nach der 32. Schwangerschaftswoche sehr stark zu und sind am Ende der Schwangerschaft etwa viermal so hoch wie in der Lutealphase. Auch im Blut der Nabelschnur neugeborener Kinder ist 17-OH-Progesteron nachweisbar.

## **METHODIK UND TESTPRINZIP**

Der 17-OH-Progesterone ELISA ist ein Festphasen-Enzymimmunoassay, der auf dem Prinzip der kompetitiven Bindung basiert. Die unbekannte Menge an Antigen in der Probe und eine bekannte Menge an enzymmarkiertem Antigen konkurrieren um die Bindungsstellen des an die Vertiefungen der Mikrotiterstreifen gebundenen Antikörpers. Nach der Inkubation wird nicht gebundenes enzymmarkiertes Antigen durch Waschen entfernt. Die Intensität der gebildeten Farbe nach der Substratreaktion ist umgekehrt proportional zur Antigen-Konzentration in den Proben. Die Ergebnisse der Proben können direkt anhand der Standardkurve bestimmt werden.

## **HINWEISE UND VORSICHTSMASSNAHMEN**

1. Dieser Kit ist nur zum in vitro diagnostischen Gebrauch geeignet und sollte nur von medizinischem Fachpersonal durchgeführt werden.
2. Lesen Sie vor dem Testansatz sorgfältig die Packungsbeilage. Verwenden Sie nur die gültige, im Testkit enthaltene Arbeitsanleitung.
3. Die Mikrotiterplatte enthält teilbare, einzeln brechbare Mikrotiterstreifen. Unbenutzte Mikrotiterstreifen sollten im verschlossenen Folienbeutel bei 2 – 8°C aufbewahrt werden und im mitgelieferten Rahmen verwendet werden.
4. Proben und Reagenzien sollten so schnell wie möglich und in einer gleichbleibenden Sequenz pipettiert werden.
5. Verwenden Sie für jedes Reagenz einen separaten Pipettenaufsatz. Das gilt besonders für die Substrat-Lösung. Wenn der Pipettenaufsatz der Substrat-Lösung vorher z.B. für das Konjugat verwendet wurde, kommt es zu einem Farbumschlag der Substrat-Lösung. Gießen Sie Reagenzien nie zurück ins Fläschchen, da so Reagenz-Kontaminationen verursacht werden können.

6. Mischen Sie den Inhalt der Mikrotiterplatte sorgfältig, um gute Testergebnisse zu gewährleisten. Mikrotiterplatten nicht wiederverwenden!
7. Mikrotiterstreifen nicht austrocknen lassen während des Testlaufes. Nach jedem Waschschrift zügig im Testprotokoll fortfahren.
8. Bringen sie die Reagenzien vor dem Testansatz auf Raumtemperatur (21-26°C).
9. Nicht mit dem Mund pipettieren und den Kontakt von Kitbestandteilen und Proben mit Haut und Schleimhäuten vermeiden.
10. In den Bereichen, in denen Proben oder Kitbestandteile verwendet werden, nicht rauchen, essen oder Kosmetika verwenden.
11. Beim Umgang mit Proben oder Reagenzien Einweg-Latexhandschuhe tragen. Die Verunreinigung von Reagenzien oder Proben mit Mikroben kann zu falschen Ergebnissen führen.
12. Der Gebrauch sollte in Übereinstimmung mit den Verfahren erfolgen, welche durch eine nationale Gefahrenstoff-Sicherheitsrichtlinie festgelegt sind.
13. Reagenzien nicht nach dem auf dem Kit-Etikett angegebenen Verfallsdatum verwenden.
14. Alle in der Packungsbeilage angegebenen Mengen müssen genau eingehalten werden. Optimale Ergebnisse können nur durch Verwendung kalibrierter Pipetten und Mikrotiterplatten-Lesegeräte erreicht werden.
15. Komponenten von Kits mit unterschiedlichen Lotnummern nicht untereinander vertauschen oder mischen. Es wird empfohlen, keine Wells von verschiedenen Platten zu verwenden, auch nicht, wenn es sich um das gleiche Lot handelt. Die Kits können unter anderen Bedingungen gelagert oder versendet worden sein, so dass die Bindungscharakteristika der Platten leicht unterschiedlich ausfallen.
16. Der Kontakt mit der Stopp-Lösung sollte vermieden werden, da sie Hautreizungen und Verbrennungen verursachen kann.
17. Die Entsorgung aller Bestandteile sollte gemäß der Vorschriften einer entsprechenden nationalen Gefahrenstoff-Sicherheitsrichtlinie erfolgen.
18. Informationen zu im Kit enthaltenen gefährlichen Substanzen entnehmen Sie bitte dem Material Sicherheitsdatenblatt. Material Sicherheitsdatenblätter für dieses Produkt sind auf Anfrage direkt vom Hersteller erhältlich.

## KITBESTANDTEILE

### Mitgelieferte Komponenten

**96**

#### FR E-2831 Mikrotiterplatte

12 x 8 (einzeln brechbare) Mikrotiterstreifen mit 96 Vertiefungen; beschichtet mit anti-17-OH-Progesteron Antikörper (polyclonal).

### Standards

gebrauchsfertig

	Cat. no.	Standard	Konzentration	Volumen/Flasche
STANDARD A	FR E-2801	Standard A (0)	0 ng/ml	1 ml
STANDARD B	FR E-2802	Standard B (1)	0.1 ng/ml	0.5 ml
STANDARD C	FR E-2803	Standard C (2)	0.4 ng/ml	0.5 ml
STANDARD D	FR E-2804	Standard D (3)	1.6 ng/ml	0.5 ml
STANDARD E	FR E-2805	Standard E (4)	6.5 ng/ml	0.5 ml
STANDARD F	FR E-2806	Standard F (5)	25 ng/ml	0.5 ml

**CONTROL 1**

+ **CONTROL 2**

#### FR E-2851 + FR E-2852 Kontrolle niedrig / Kontrolle hoch

2 Fl., je 0.5 ml, gebrauchsfertig; enthält 17-OH-Progesteron in Serum. Kontrollwerte und -Bereiche entnehmen Sie bitte dem QC-Datenblatt.

**CONJUGATE**

#### FR E-2840 Enzymkonjugat

1 Fl., 11 ml, gebrauchsfertig; 17-OH-Progesteron, konjugiert mit HRP;

**SUBSTRATE**

#### AR E-0055 Substrat-Lösung

1 Fl., 22 ml, gebrauchsfertig; Tetramethylbenzidine (TMB).

**STOP-SOLN****AR E-0080 Stopp-Lösung**

1 Fl., 7 ml, gebrauchsfertig; enthält 2 N Säure.

**WASH-CONC 10X****AR E-0030 Waschlösung**

1 Fl., 50 ml (**10X** konzentriert);  
siehe "Vorbereitung der Reagenzien".

**Achtung:** Zusätzlicher Standard A zur Probenverdünnung ist auf Anfrage erhältlich.

**Nicht im Kit enthaltene aber erforderliche Geräte und Materialien**

Zentrifuge  
Kalibriertes Mikrotiterplatten-Lesegerät mit 450±10 nm Filter  
Mikrotiterplatten-Schüttler mit mehr als 600 rpm  
Vortex-Mixer  
Kalibrierte variable Präzisions-Mikropipetten (25 µl, 50 µl, 100 µl, 200 µl)  
Saugfähiges Papier  
Aqua dest.  
Zeitnahmegerät  
Semilogarithmisches Papier oder Software zur Datenverarbeitung

**Lagerung und Haltbarkeit des Kits**

Die ungeöffneten Reagenzien behalten bei Lagerung um 2-8°C ihre Reaktivität bis zum Verfallsdatum. Nach dem Verfallsdatum die Reagenzien nicht mehr verwenden. Nach dem Öffnen sollten alle Reagenzien bei 2-8°C gelagert werden.

Die Mikrotiterstreifen sollten bei 2-8°C gelagert werden. Der einmal geöffnete Folienbeutel sollte stets sehr sorgfältig wieder verschlossen werden.

**Vorbereitung der Reagenzien**

Alle Reagenzien sowie die benötigte Anzahl von Mikrotiterstreifen sollen vor dem Gebrauch auf Raumtemperatur gebracht werden.

**Waschlösung**

Die 10-fach konzentrierte Waschlösung (50 ml) mit 450 ml destilliertem Wasser auf ein Gesamtvolumen von 500 ml verdünnen. *Die verdünnte Waschlösung ist bei Raumtemperatur (21–26°C) für mindestens 12 Wochen stabil.*

**Entsorgung des Kits**

Die Entsorgung des Kits muss gemäß den nationalen gesetzlichen Vorschriften erfolgen. Spezielle Informationen für dieses Produkt finden Sie im Materialsicherheitsdatenblatt.

**Beschädigte Testkits**

Im Falle einer starken Beschädigung des Testkits oder der Komponenten muss der Hersteller in schriftlicher Form spätestens eine Woche nach Erhalt des Kits informiert werden. Stark beschädigte Einzelkomponenten sollten nicht für den Testlauf verwendet werden. Sie müssen gelagert werden, bis eine endgültige Lösung gefunden wurde. Danach sollten sie gemäß den offiziellen Richtlinien entsorgt werden.

**PROBENENTNAHME UND -VORBEREITUNG****Serum, Plasma (EDTA)**

Die üblichen Vorsichtsmaßnahmen bei der Blutabnahme sind einzuhalten. Die chemische Integrität der Blutproben muss vom Zeitpunkt der Blutabnahme bis zur Testdurchführung erhalten bleiben. Keine hämolytischen, ikterischen oder lipämischen Proben verwenden. Getrübte Proben sollten vor der Testdurchführung zentrifugiert werden, um Partikel zu entfernen.

Lagerung:	2-8°C	≤ -20°C (aliquotiert)	Vor Hitze und direkter Sonneneinstrahlung schützen. Wiederholtes Auftauen und Einfrieren vermeiden.
Haltbarkeit:	7 Tage	3 Monate	

## TESTDURCHFÜHRUNG

### Allgemeine Hinweise

- Alle Reagenzien und Proben müssen vor Gebrauch auf Raumtemperatur (21–26°C) gebracht und gut durchgemischt werden. Dabei sollte Schaumbildung vermieden werden.
- Wenn die Testdurchführung einmal begonnen wurde, muss sie ohne Unterbrechung zu Ende geführt werden.
- Für jeden Standard, jede Kontrolle oder Probe sollte eine neue Pipettenspitze verwendet werden, um Verschleppungen zu vermeiden.
- Die Optische Dichte ist abhängig von Inkubationszeit und Temperatur. Deshalb ist es notwendig, vor Beginn der Testdurchführung alle Reagenzien in einen arbeitsbereiten Zustand zu bringen, die Deckel der Fläschchen zu öffnen, alle benötigten Vertiefungen in den Halter zu setzen. Nur eine solche Vorbereitung garantiert gleiche Zeiten für jeden Pipettiervorgang ohne Pausen.
- Als generelle Regel gilt, dass die enzymatische Reaktion linear proportional zu Zeit und Temperatur ist.
- Die in der Gebrauchsanweisung angegebenen Inkubationszeiten müssen eingehalten werden.

### Testdurchführung

Jeder Testlauf muss eine Standardkurve beinhalten.

1.	Die benötigte Anzahl an <b>Mikrotiterstreifen</b> in der Halterung befestigen.
2.	Je <b>25 µl Standards, Kontrollen und Proben</b> <u>mit neuen Plastikspitzen</u> in die entsprechenden Vertiefungen geben.
3.	<b>100 µl</b> des verdünnten <b>Enzymkonjugats</b> in jede Vertiefung geben. Gründlich mischen, da eine komplette Vermischung in diesem Schritt sehr wichtig ist.
4.	<b>60 Minuten</b> bei Raumtemperatur inkubieren. Das Schütteln auf einem Mikrotiterplatten-Schüttler während der Inkubation ist nicht nötig, würde aber die Sensitivität geringfügig verbessern.
5.	Den Inhalt der Vertiefungen kräftig ausschütten. Vertiefungen <b>4mal</b> mit verdünnter <b>Waschlösung</b> (300 µl pro Vertiefung) waschen. Restliche Flüssigkeit durch Ausklopfen der Mikrotiterplatte auf saugfähigem Papier entfernen. <b>Achtung:</b> Die Sensitivität und Präzision des Assays wird deutlich durch die korrekte Durchführung des Waschschrilles beeinflusst.
6.	<b>200 µl Substratlösung</b> in jede Vertiefung geben.
7.	<b>30 Minuten</b> bei Raumtemperatur im Dunkeln inkubieren.
8.	Die enzymatische Reaktion durch Zugabe von <b>50 µl Stopp-Lösung</b> in jede Vertiefung abstoppen.
9.	Die Optische Dichte bei <b>450±10 nm</b> mit einem Mikrotiterplatten-Lesegerät innerhalb von 15 Minuten nach Zugabe der Stopp-Lösung bestimmen.

### Ergebnisermittlung

1. Die durchschnittlichen Werte der Optischen Dichte (OD) für jedes Set von Standards, Kontrollen und Patientenproben bestimmen.
2. Eine Standardkurve ermitteln durch Auftragen der mittleren Optischen Dichte jedes Standards gegen die Konzentration, wobei der OD-Wert auf der vertikalen (Y) Achse und die Konzentration auf der horizontalen (X) Achse eingetragen wird.
3. Unter Verwendung der mittleren OD wird für jede Probe die entsprechende Konzentration aus der Standardkurve ermittelt.
4. Automatische Methode: Die in der Arbeitsanleitung ermittelten Werte wurden automatisch mit Hilfe der 4 Parameter Gleichung (4PL, 4 Parameter Logistics) bestimmt. Andere Auswertungsfunktionen können leicht abweichende Werte ergeben.
5. Die Konzentration der Proben kann direkt von der Standardkurve abgelesen werden. Proben, die eine höhere Konzentration als die des höchsten Standards enthalten, müssen verdünnt werden. Dieser Verdünnungsfaktor muss bei der Berechnung der Konzentration beachtet werden.

### Umrechnung in SI Einheiten:

17-OH-Progesteron (ng/ml) x 3,03 = nmol/l

## Beispiel für eine Standardkurve

Nachfolgend wird ein typisches Beispiel für eine Standardkurve gezeigt. Diese darf aber nicht zur Kalkulation eines anderen Testlaufes verwendet werden.

Standard	Optische Dichte (450nm)
Standard A 0,0 ng/ml	3.561
Standard B 0,1 ng/ml	2.764
Standard C 0,4 ng/ml	1.925
Standard D 1,6 ng/ml	1.136
Standard E 6,5 ng/ml	0.526
Standard F 25 ng/ml	0.226

## ERWARTETE WERTE

Augenscheinlich gesunde Spender zeigten folgende 17-OH-Progesteron-Werte:

<b>Kinder</b>	3 -14 Jahre	0,05 – 2,0 ng/ml
<b>Reproduktionsphase der Frauen</b>	Follikelphase:	0,1 – 1,0 ng/ml
	Lutealphase:	0,6 – 2,5 ng/ml
	Ovulation:	0,3 – 1,5 ng/ml
	nach ACTH-Stimulation:	< 3,2 ng/ml
	Schwangerschaft (3. Trimester):	2,0 - 12 ng/ml
	Postmenopausale Frauen:	0,13 – 0,6 ng/ml
<b>Männer</b>		0,5 – 3,0 ng/ml

Therapeutische Konsequenzen sollten nicht allein auf Basis der mit diesem Test ermittelten Werte getroffen werden, sondern unter Berücksichtigung klinischer Beobachtungen und weiterer diagnostischer Tests. Es wird empfohlen, dass jedes Labor seine eigenen normalen und abnormalen Werte ermittelt.

## QUALITÄTSKONTROLLE

Es wird empfohlen, die Kontrollproben gemäß den nationalen gesetzlichen Bestimmungen einzusetzen. Durch die Verwendung von Kontrollproben wird eine Tag-zu-Tag Überprüfung der Ergebnisse erzielt. Es sollten Kontrollen sowohl mit normalen als auch pathologischen Werten eingesetzt werden.

Die Kontrollen mit den entsprechenden Ergebnissen des QC-Labors sind im QC-Zertifikat, das dem Kit beiliegt, aufgeführt. Die im QC-Blatt angegebenen Werte und Bereiche beziehen sich stets auf die aktuelle Kitcharge und sollten zum direkten Vergleich der Ergebnisse verwendet werden. Es wird empfohlen, an den einschlägigen Ringversuchen teilzunehmen.

Es sollten geeignete statistische Methoden zur Analyse von Kontroll-Werten und Trends angewendet werden. Wenn die Ergebnisse des Assays nicht mit den angegebenen Akzeptanzbereichen des Kontrollmaterials übereinstimmen, sollten die Patientenergebnisse als ungültig eingestuft werden.

In diesem Fall überprüfen Sie bitte die folgenden Bereiche: Pipetten und Zeitnehmer, Photometer, Verfallsdatum der Reagenzien, Lagerungs- und Inkubationsbedingungen, Absaug- und Waschmethode. Sollten Sie nach Überprüfung der vorgenannten Bereiche keinen Fehler erkannt haben, setzen Sie sich bitte mit Ihrem Lieferanten oder direkt mit dem Hersteller in Verbindung.

## ASSAY CHARACTERISTIKA

### Analytische Sensitivität

Die analytische Sensitivität, definiert als Mittelwert (n=20) minus der zweifachen Standardabweichung des Standards 0 beträgt 0,037 ng/ml.

### **Spezifität der Antikörper (Kreuzreaktivität)**

Die Daten entnehmen Sie bitte der ausführlichen englischen Arbeitsanleitung.

### **Messbereich**

Der Messbereich des Testes liegt zwischen 0,1 – 25 ng/ml.

Die Daten zu:

### **Präzision**

### **Wiederfindung**

### **Linearität**

entnehmen Sie bitte der ausführlichen englischen Arbeitsanleitung.

## **GRENZEN DES TESTS**

Jede unsachgemäße Behandlung von Proben oder Modifikationen dieses Tests können die Ergebnisse beeinflussen.

### **High-Dose-Hook Effekt**

Ein Hook-Effekt tritt in diesem Test nicht auf.

### **Beeinflussung durch Medikamente**

Uns sind bislang keine Stoffe (Medikamente) bekannt geworden, deren Einnahme die Messung des 17-OH-Progesteron-Gehaltes der Probe beeinflussen würde.

## **RECHTLICHE GRUNDLAGEN**

### **Zuverlässigkeit der Ergebnisse**

Der Test muss exakt gemäß der Testanleitung des Herstellers abgearbeitet werden. Darüber hinaus muss der Benutzer sich strikt an die Regeln der GLP (Good Laboratory Practice) oder andere eventuell anzuwendende Regeln oder nationale gesetzliche Vorgaben halten. Dies betrifft besonders den Gebrauch der Kontrollreagenzien. Es ist sehr wichtig, bei der Testdurchführung stets eine ausreichende Anzahl Kontrollen zur Überprüfung der Genauigkeit und Präzision mitlaufen zu lassen.

Die Testergebnisse sind nur gültig, wenn alle Kontrollen in den vorgegebenen Bereichen liegen, und wenn alle anderen Testparameter die vorgegebenen Spezifikationen für diesen Assay erfüllen. Wenn Sie bezüglich eines Ergebnisses Zweifel oder Bedenken haben, setzen Sie sich bitte mit dem Hersteller in Verbindung.

### **Therapeutische Konsequenzen**

Therapeutische Konsequenzen sollten keinesfalls nur aufgrund von Laborergebnissen erfolgen, selbst dann nicht, wenn alle Testergebnisse mit den unter „Zuverlässigkeit der Ergebnisse“ genannten Voraussetzungen übereinstimmen. Jedes Laborergebnis ist nur ein Teil des klinischen Gesamtbildes eines Patienten. Nur in Fällen, in denen die Laborergebnisse in akzeptabler Übereinstimmung mit dem allgemeinen klinischen Bild des Patienten stehen, sollten therapeutische Konsequenzen eingeleitet werden. Das Testergebnis allein sollte niemals als alleinige Grundlage für die Einleitung therapeutischer Konsequenzen dienen.

### **Haftung**

Jegliche Veränderungen des Testkits und/oder Austausch oder Vermischung von Komponenten unterschiedlicher Chargen von einem Testkit zu einem anderen, können die gewünschten Ergebnisse und die Gültigkeit des gesamten Tests negativ beeinflussen. Solche Veränderungen und/oder Austausch haben den Ausschluss jeglicher Ersatzansprüche zur Folge.

Reklamationen, die aufgrund von Falschinterpretation von Laborergebnissen durch den Kunden gemäß Punkt „Therapeutische Konsequenzen“ erfolgen, sind ebenfalls abzuweisen. Im Falle jeglicher Reklamation ist die Haftung des Herstellers maximal auf den Wert des Testkits beschränkt. Jegliche Schäden, die während des Transports am Kit entstanden sind, unterliegen nicht der Haftung des Herstellers.

## REFERENZEN

Angaben zu den Referenzen entnehmen Sie bitte der ausführlichen englischen Arbeitsanleitung.

### Symbole:

	Lagertemperatur		Hersteller		Enthält Testmaterial für <n> Teste
	Verwendbar bis	<b>LOT</b>	Chargennummer	<b>IVD</b>	In vitro Diagnostikum
	Vor Gebrauch Packungsbeilage lesen	<b>CONT</b>	Inhalt	<b>CE</b>	CE gekennzeichnet
	Achtung	<b>REF</b>	Katalog-Nummer	<b>RUO</b>	Nur für Forschungszwecke