



# RIA 17 $\alpha$ - Hydroxyprogesterone

**REF** IM1452

## TABLE OF CONTENTS

English . . . . .	2	Polski (PL) . . . . .	32
Français (FR) . . . . .	5	Čeština (CZ) . . . . .	35
Deutsch (DE) . . . . .	8	Slovenčina (SK) . . . . .	38
Italiano (IT) . . . . .	11	Türkçe (TR) . . . . .	41
Español (ES) . . . . .	14	Русский (RU) . . . . .	44
Português Portugal (PT-PT) . . . . .	17	Србија (SR) . . . . .	47
Ελληνικά (EL) . . . . .	20	Português Brasil (PT-BR) . . . . .	50
中文 (ZH-CN) . . . . .	23	APPENDIX . . . . .	53
Lietuviškai (LT) . . . . .	26	REFERENCES . . . . .	56
Magyar (HU) . . . . .	29		

---

Immunotech s.r.o. ( 贝克曼库尔特公司分公司 )  
代为 Beckman Coulter, Inc. 生产  
Radiova 1  
102 27 Prague 10  
The Czech Republic  
电话 : + 420 272 017 444

Beckman Coulter do Brasil Com. e Imp. de Prod. de Lab. Ltda  
Alameda Rio Negro, 500, 15º andar, Torre B Alphaville Industrial  
CEP 06.454-00 Barueri, São Paulo, Brasil  
CNPJ: 42.160.812/0001-44 Telefone: 0800-771-8818

ООО «Бекмен Культер», 109004 Москва, Россия, ул. Станиславского, д. 21, стр. 3.  
Тел. +7 (495) 228 67 00, e-mail: beckman.ru@beckman.com



IMMUNOTECH s.r.o., Radiova 1, 102 27 Prague 10, Czech Republic

# RIA 17 $\alpha$ - Hydroxyprogesterone

**REF** IM1452

## RADIOIMMUNOASSAY FOR THE IN VITRO DETERMINATION OF 17 $\alpha$ -HYDROXYPROGESTERONE IN HUMAN SERUM AND PLASMA

For *in vitro* diagnostic use.

### PRINCIPLE

The radioimmunoassay of 17 $\alpha$ -Hydroxyprogesterone (17 OH-P) is a competition assay. The same kit may be employed for the measurement of 17 OH-P:

either directly in serum or EDTA plasma,

or after the extraction of the sample with ether and evaporation of the solvent, followed by re-suspension in the zero calibrator.

Serum or plasma samples, extracts, controls and calibrators are incubated with 125I-labeled 17 OH-P as a tracer, in antibody-coated tubes. After incubation, the contents of the tubes are rinsed so as to remove unbound 125I-labelled 17 OH-P. The bound radioactivity is then determined in a gamma counter. A calibration curve is established and unknown values are determined by interpolation from the standard curve.

### WARNING AND PRECAUTIONS

#### General remarks:

- The vials with calibrators and controls should be opened as shortly as possible to avoid excessive evaporation.
- Do not mix the reagents from kits of different lots.
- A standard curve must be established with each assay.
- It is recommended to perform the immunoassay in duplicate.
- Each tube must be used only once.

#### Basic rules of radiation safety

The purchase, possession, utilization, and transfer of radioactive material is subject to the regulations of the country of use. Adherence to the basic rules of radiation safety should provide adequate protection:

- No eating, drinking, smoking or application of cosmetics should be carried out in the presence of radioactive materials.
- No pipeting of radioactive solutions by mouth.
- Avoid all contact with radioactive materials by using gloves and laboratory overalls.
- All manipulation of radioactive substances should be done in an appropriate place, distant from corridors and other busy places.
- Radioactive materials should be stored in the container provided in a designated area.
- A record of receipt and storage of all radioactive products should be kept up to date.
- Laboratory equipment and glassware which are subject to contamination should be segregated to prevent cross-contamination of different radioisotopes.
- Each case of radioactive contamination or loss of radioactive material should be resolved according to established procedures.
- Radioactive waste should be handled according to the rules established in the country of use.

#### Sodium azide

Some reagents contain sodium azide as a preservative. Sodium azide may react with lead, copper or brass to form explosive metal azides. Dispose of the reagents by flushing with large amounts of water through the plumbing system.

#### Materials of human origin

The materials of human origin, contained in this kit, were found negative for the presence of antibodies to HIV 1 and HIV 2, antibodies to HCV, as well as of Hepatitis B surface antigen (HBsAg). However, they should be handled as if capable of transmitting disease. No known test method can offer total assurance that no virus is present. Handle this kit with all necessary precautions.

All serum and plasma samples should be handled as if capable of transmitting hepatitis or AIDS and waste should be discarded according to the country rules.

#### Ethyl ether

Ethyl ether is a volatile and highly flammable organic solvent. Extraction and evaporation must be done in a ventilated hood. Avoid any contact with a flame and do not pipette reagents by mouth.

### GHS HAZARD CLASSIFICATION

Wash Solution (20X) DANGER



H360

May damage fertility or the unborn child.

P201

Obtain special instructions before use.

P280

Wear protective gloves, protective clothing and eye/face protection.

P308+P313

IF exposed or concerned:  
Get medical advice/attention.  
Boric Acid 0.1 - 0.3%  
Sodium Borate Decahydrate 0.1 - 0.3%

**SDS**

Safety Data Sheet is available at [techdocs.beckmancoulter.com](http://techdocs.beckmancoulter.com)

### SPECIMEN COLLECTION, PROCESSING, STORAGE AND DILUTION

- Collect blood in dry tubes or in tubes with EDTA.
- Separate serum or plasma from cells by centrifugation.
- Serum and plasma samples may be stored at 2-8°C, if the assay is to be performed within 24 hours. For longer storage keep frozen (at < -18°C, 1 year maximum) after aliquoting so as to avoid repeated freezing and thawing. Thawing of sample should be performed at room temperature.
- If samples have concentrations greater than the highest calibrator, they must be diluted into the zero calibrator.

Serum and EDTA plasma values for 30 samples (serum values ranging from 0.24 to 1.88 ng/mL) were compared using the 17 OH-P RIA kit. Results are as follows:

$$[\text{EDTA-plasma}] = 0.9026[\text{serum}] + 0.0283,$$

$$R = 0.9747$$

### MATERIALS PROVIDED

All reagents in the kit are stable until the expiration date indicated on the kit label, when stored at 2-8°C. Expiry dates printed on vial labels apply to the long-term storage of components by the manufacturer only, prior to assembly of the kit. Do not take into account.

Storage conditions for reagents after reconstitution or dilution are indicated in paragraph Procedure.

**Anti-17 OH-P antibody-coated tubes: 2 x 50 tubes** (ready-to-use)

**125I-labeled 17 $\alpha$ -Hydroxyprogesterone: one vial (45 mL)** (ready-to-use)

The vial contains <640 kBq, at the date of manufacture, of 125I-labeled 17 OH-P in buffer containing proteins and a dye.

Note: Occasional presence of clotted particles in the tracer does not affect assay performance.

**Calibrators: one 2 mL vial, five 0.5 mL vials** (ready-to-use)

The calibrator vials contain from 0 to approximately 50 ng/mL (0 to approximately 151 nmol/L) of 17 OH-P in human serum with sodium azide (<0.1%). The exact concentration is indicated on each vial label. Calibrators are verified to an internal reference standard.

The zero calibrator (5 mL) may be ordered separately, too (cat. #B23373).

### Control samples: two vials (lyophilized)

The control vial contains 17 OH-P in human serum with sodium azide (<0.1%). The volume for reconstitution is indicated on the vial label. The expected values are in the concentration range indicated on a supplement.

### Wash solution (20x): one 50 mL vial

Concentrated solution has to be diluted before use.

## MATERIALS REQUIRED, BUT NOT PROVIDED

In addition to standard laboratory equipment, the following items are required:

For the assay:

- Precision micropipet (25 µL and 400 µL).
- Semi-automatic pipets (25 µL, 400 µL and 2 mL).
- Vortex type mixer.
- Horizontal or orbital shaker.
- Aspiration system.
- Gamma counter set for <sup>125</sup>I

For the extraction step (optional):

- Precision micropipette (200 µL)
- Glass pipets (2.5 mL, 5 mL, 10 mL).
- Glass vials (from 6 mL to 15 mL).
- Glass tubes for recovery of ether phase.
- Evaporator (speedvac type) or 37°C water bath.
- Analytical grade ethyl ether.

## PROCEDURE

### Preparation of reagents

Let all the reagents come to room temperature.

### Reconstitution of control samples

The content of the vials is reconstituted with the volume of distilled water indicated on the label. Wait for 10 min following reconstitution and mix gently to avoid foaming before dispensing. Store the reconstituted solutions at 2-8°C until the expiry date of the kit.

### Preparation of wash solution

Pour the content of the vial into 950 mL of distilled water and homogenize. The diluted solution may be stored at 2-8°C until the expiry date of the kit.

### Extraction of samples (optional; see § Limitations)

Note: The extraction must be done in clean glass vials or tubes, pre-rinsed with ethyl ether.

Samples only are extracted before assay; do not extract calibrators.

- Bring samples to room temperature and mix well before starting extraction.
- Number one vial for each sample.
- Place 200 µL of each sample into corresponding vial.
- Add 5 mL of ethyl ether to vials. Stopper carefully.
- Vortex vials vigorously (2 x 1 minute).
- Let stay vials on the table for minimum 5 minutes.
- Take off carefully 2.5 mL of organic phase without contaminating with aqueous phase and place it into numbered glass tubes.
- Evaporate ether phase completely with either evaporator (e.g. speedvac type) or by placing tubes into 37°C water bath.

Note 1: The tubes must be firmly attached to test tubes rack, since after evaporation of the ether; they will be lighter and tend to float off.

At this stage it is possible to stopper the tubes containing the dry extracts and to store them for up to 7 days in the cold (2-8°C) prior to continuing the assay.

- Re-dissolve dry ether extracts in 200 µL of the zero calibrator. Vortex vigorously (30 sec, 2000 rpm), wait for 15 minutes, vortex again.

Note 2: If a larger volume is necessary, instead of taking off 2.5 mL of organic phase, keep vials at <-18°C until aqueous phase freezes, take off carefully 5 mL of organic phase without contaminating with aqueous phase, evaporate it and re-dissolve it in 400 µL of the zero calibrator.

## Immunoassay procedure

Bring all reagents to room temperature before pipeting.

Step 1 Additions	Step 2 Incubation	Step 3 Counting
To antibody coated tubes add successively:  25 µL of calibrator, control, sample or 50 µL of extract and 400 µL of tracer.* Mix.	Incubate 120 minutes at 18 - 25°C with shaking (≥280 rpm).	Aspirate carefully the content of tubes (except the 2 tubes «total cpm»)  Wash twice with 2 mL of wash solution. Aspirate.  Count bound cpm (B) and total cpm (T) for 1 min.

\*Add 400 µL of tracer to 2 additional tubes to obtain total cpm.

## RESULTS

Results are obtained from the standard curve by interpolation. The curve serves for the determination of 17 OH-P concentrations in samples measured at the same time as the calibrator.

### Standard curve

The results in the quality control department were calculated using *spline* curve fit with *B/T* or *B/B<sub>0</sub>* on the logit vertical axis and analyte concentration of the calibrators on the logarithmic horizontal axis (ng/mL).

Other data reduction methods may give slightly different results.

Total activity: 179,362 cpm				
Calibrators	17OH-P (ng/mL)	cpm (n=3)	B/T (%)	B/B <sub>0</sub> (%)
0	0	55,975	31.21	100.0
1	0.12	44,882	25.02	80.18
2	0.40	31,190	17.39	55.72
3	1.90	12,557	7.00	22.43
4	12.5	2,515	1.40	4.49
5	50.0	895	0.50	1.60

(Example of standard curve, do not use for calculation)

### Samples

For each sample, locate the B/T or B/B<sub>0</sub> on the vertical axis and read off the corresponding 17 OH-P concentration on the horizontal axis.

To convert ng/mL into nmol/L, multiply results by 3.026.

## EXPECTED VALUES

It is suggested that each laboratory establishes its own normal values. The following values obtained with healthy subjects are indicative only.

Adults	N	Median	Min.	Max.	2.5 <sup>th</sup>	97.5 <sup>th</sup>
					Percentile	Percentile
(ng/mL)						
Men	55	0.93	0.53	2.22	0.55	1.99
Women						
Follicular Phase	111	0.48	0.13	1.67	0.21	1.45
Luteal Phase	112	1.52	0.42	3.20	0.61	2.88
Preovulatory Peak	22	1.39	0.54	2.04	0.55	2.01
Contraception	30	0.37	0.17	1.48	0.18	1.47
Women after menopause	38	0.38	0.13	0.92	0.16	0.79
Pregnancy 1 <sup>st</sup> trimester	45	2.03	0.78	5.75	0.93	3.82
Pregnancy 2 <sup>nd</sup> trimester	44	2.23	0.60	6.86	1.23	3.70

Detail information about expected values for children (sorted according to age and sex) can be found in the data sheet "APPENDIX".

## QUALITY CONTROL

Good laboratory practices imply that control samples must be used regularly to ensure the quality of the results obtained. These samples

must be processed exactly the same way as the assay samples, and it is recommended to analyze their results using appropriate statistical methods.

In case of packaging deterioration or if data obtained show some performance alteration, please contact your local distributor or use the following e-mail address: [imunochem@beckman.com](mailto:imunochem@beckman.com)

## PERFORMANCE CHARACTERISTICS

(For more details, see the data sheet "APPENDIX")

Representative data are provided for illustration only. Performance obtained in individual laboratories may vary.

### Sensitivity

**Limit of detection (LoD):** 0.07 ng/mL

The LoD for 17 OH-P is 0.07 ng/mL, determined consistent with guidelines in CLSI document EP17-A2 [1] based on the proportions of false positives ( $\alpha$ ) less than 5% and false negatives ( $\beta$ ) less than 5%; using determinations, with 120 blank and 120 low level samples; and Limit of Blank (LoB) of 0.04 ng/mL.

### Specificity

The antibody used in the immunoassay is specific for 17- $\alpha$ -hydroxyprogesterone.

### Precision

#### Repeatability and within-laboratory precision

The precision of the assay was determined consistent with guidelines in CLSI document EP05-A3 [2]. For repeatability the coefficients of variation were found below or equal to 10.5% for serum samples. For within laboratory precision the coefficients of variation were found below or equal to 12.8% for serum samples.

### Accuracy

#### Linearity

The assay demonstrated to be linear from 0.12 to 50.88 ng/mL using serum samples (determined consistent with guidelines in CLSI document EP06-A [3]).

### Dilution test

High-concentration serum samples were serially diluted with zero calibrator. The recovery percentages ranged from 95.7% to 119%.

### Recovery test

Serum samples were spiked with known quantities of 17 OH-P. The recovery percentages ranged from 100% to 119%.

**Measurement range** (from LoD to the highest calibrator):

0.07 ng/mL to approximately 50 ng/mL

## LIMITATIONS

The non-respect of the instructions in this package insert may affect results significantly.

Results should be interpreted in the light of the total clinical presentation of the patient, including clinical history, data from additional tests and other appropriate information.

For more details, see the data sheet "APPENDIX".

Very young infants (particularly less than 6 months old) have very high levels of 17OH-pregnenolone sulfate. In that particular case, extraction with ether prior to the 17 OH-P assay is recommended.

In spite of low cross reactivity, one can observe falsely high levels of 17 OH-P after regular administration of spironolactone. Spironolactone therapy must therefore be interrupted at least three weeks prior to the assay to ensure absence of interference.

For assays employing antibodies, the possibility exists for interference by heterophile antibodies in the patient sample. Patients who have been regularly exposed to animals or have received immunotherapy or diagnostic procedures utilizing immunoglobulins or immunoglobulin fragments may produce antibodies, e.g. HAMA, that interfere with immunoassays.

Such interfering antibodies may cause erroneous results. Carefully evaluate the results of patients suspected of having these antibodies.

# RIA 17 $\alpha$ - Hydroxyprogesterone

**REF** IM1452

## DOSAGE RADIOIMMUNOLOGIQUE POUR LE DOSAGE IN VITRO DE LA 17 $\alpha$ -HYDROXYPROGESTERONE DANS LE SERUM ET LE PLASMA HUMAIN

Utilisation comme test de diagnostic *in vitro*.

### PRINCIPE

Le dosage radioimmunologique de la 17 $\alpha$ -hydroxyprogesterone (17 OH-P) est un dosage par compétition. Cette même trousses permet de doser :

soit directement sur sérum ou plasma EDTA,

soit après extraction des échantillons à l'éther et évaporation du solvant, sur des extraits remis en solution dans le calibrateur zéro.

Les échantillons à doser et les calibrateurs sont incubés dans des tubes recouverts d'anticorps avec un traceur 17 OH-P marqué à l'iode 125. Après l'incubation, le contenu des tubes est rincé afin d'éliminer 17 OH-P marqué à l'iode 125 non lié. La radioactivité liée est alors mesurée dans un compteur gamma. Une courbe d'étalonnage est établie. Les valeurs inconnues sont déterminées par interpolation à l'aide de cette courbe.

### AVERTISSEMENTS ET PRÉCAUTIONS

#### Précautions générales

- Les flacons de calibrateurs et de contrôles doivent être ouverts des temps aussi courts que possible afin d'éviter une évaporation trop importante.
- Ne pas mélanger des réactifs de lots différents.
- Effectuer simultanément la courbe standard et le dosage des échantillons.
- Il est recommandé de réaliser les dosages en double.
- Chaque tube ne doit être utilisé qu'une seule fois.

#### Les règles de bases de la radio protection

L'achat, la possession, l'utilisation et l'échange de matières radioactives sont soumis aux réglementations en vigueur dans le pays de l'utilisateur. L'application des règles de base de protection contre les rayonnements ionisants assure une protection adéquate. Certaines d'entre elles sont rappelées ci-après :

- Ne pas manger, ni boire, ni fumer, ni appliquer de cosmétiques dans les laboratoires où des produits radioactifs sont utilisés.
- Ne pas pipeter des solutions radioactives avec la bouche.
- Eviter le contact direct avec tout produit radioactif en utilisant des blouses et des gants de protection.
- Toute manipulation de matières radioactives se fera dans un local approprié, éloigné de tout passage.
- Les produits radioactifs seront stockés dans leur conditionnement d'origine dans un local approprié.
- Un cahier de réception et de stockage de produits radioactifs sera tenu à jour.
- Le matériel de laboratoire et la verrerie qui ont été contaminés doivent être éliminés au fur et à mesure afin d'éviter une contamination croisée de plusieurs isotopes.
- Chaque cas de contamination ou perte de substance radioactive devra être résolu selon les procédures établies.
- Toute mise aux déchets de matière radioactive se fera en accord avec les règlements en vigueur.

#### Azide de sodium

Certains réactifs contiennent de l'azide de sodium comme agent conservateur. L'azide de sodium peut réagir avec le plomb, le cuivre et le laiton, et former des azides métalliques explosifs. Lors du rejet de telles solutions à l'évier, laisser couler un volume important d'eau dans les canalisations.

#### Les produits d'origine humaine

Les produits d'origine humaine contenus dans les réactifs de cette trousses ont subi un dépistage négatif, concernant les anticorps anti-VIH 1, et VIH 2, les anticorps VHC, et l'antigène de surface HBs, mais doivent cependant être

manipulés comme des produits infectieux. En effet, aucune méthode connue ne peut assurer l'absence complète de virus, c'est pourquoi il est nécessaire de prendre des précautions lors de leur manipulation.

Tous les échantillons de sérum ou de plasma doivent être manipulés comme étant susceptibles de contenir les virus de l'hépatite ou du SIDA et les déchets doivent éliminés selon les réglementations nationales en vigueur.

#### Ether éthylique

L'éther éthylique est un solvant organique volatil et très inflammable. Effectuer l'extraction et l'évaporation sous une hotte ventilée. Éviter tout contact avec une flamme et ne pas pipeter les réactifs avec la bouche.

### CLASSIFICATION DES RISQUES SGH

Solution de lavage (20 X) DANGER



H360

Peut nuire à la fertilité ou au fœtus.

P201

Se procurer les instructions avant utilisation.

P280

Porter des gants de protection, des vêtements de protection et un équipement de protection des yeux/du visage.

P308+P313

EN CAS d'exposition prouvée ou suspectée : demander un avis médical/consulter un médecin.

Acide borique 0,1 - 0,3 %  
Borate de sodium décahydraté 0,1 - 0,3 %

**SDS**

La fiche technique santé-sécurité est disponible à l'adresse [techdocs.beckmancoulter.com](http://techdocs.beckmancoulter.com)

### PRELEVEMENT, PREPARATION, CONSERVATION ET DILUTION DES ECHANTILLONS

- Recueillir le sang dans des tubes avec ou sans additifs, ou contenant de l'EDTA.
- Séparer le sérum ou le plasma des cellules par centrifugation.
- Les échantillons sériques ou plasmatiques peuvent être conservés à 2-8 °C si le dosage est réalisé dans les 24 heures. Sinon, il est préférable de les conserver congelés (< -18 °C, 1 an maximum) et de préférence aliquotés, afin d'éviter les congélations et décongélations successives. La décongélation des échantillons doit être effectuée à température ambiante.
- Si les échantillons analysés ont une concentration supérieure au calibrateur le plus élevé de la gamme, ils doivent être dilués dans le calibrateur zéro.

Les valeurs pour le sérum et le plasma EDTA de 30 échantillons (les valeurs sériques s'échelonnant entre 0,24 et 1,88 ng/mL) ont été comparées en utilisant le kit 17 OH-P RIA. Les résultats sont les suivants :

[EDTA-plasma] = 0,9026 [sérum] + 0,0283,

R = 0,9747

### MATÉRIEL FOURNI

Tous les réactifs de la trousses conservés à 2-8 °C sont stables, jusqu'à la date de péremption mentionnée sur la trousses. Les dates d'expiration imprimées sur les étiquettes des flacons concernent uniquement le stockage à long terme de réactifs par le fabricant, avant l'assemblage de la trousses. Ne pas en tenir compte.

Les conditions de conservation des réactifs après reconstitution ou dilution sont indiquées dans le paragraphe Procédure.

**Tubes revêtus d'anticorps anti-17 OH-P : 2 x 50 tubes** (prêts à l'emploi)

**17 $\alpha$ -hydroxyprogesterone marquée à l'iode 125 : 1 flacon de 45 mL** (prêt à l'emploi)

Le flacon contient <640 kBq, en début de lot, de 17 OH-P marquée à l'iode 125 dans un tampon contenant des protéines et un colorant.

Remarque : La présence occasionnelle de particules dans le traceur n'affecte pas les performances du dosage.

**Calibrateurs : 1 flacon de 2 mL et 5 flacons de 0,5 mL** (prêts à l'emploi)

Les flacons de calibrateur contiennent entre 0 à environ 50 ng/mL (0 à environ 151 nmol/L) de 17 OH-P dans un sérum humain en présence d'azide de sodium (< 0,1 %). La concentration exacte est indiquée sur chaque étiquette de flacon. Les calibrateurs sont validés selon un étalon interne de référence.

Le calibrateur zéro (5 mL) peut être aussi commandé séparément (réf. #B23373).

**Sérums de contrôle : 2 flacons** (lyophilisés)

Les flacons de contrôle contiennent de la 17 OH-P dans du sérum humain en présence d'azide de sodium (<0,1 %). Les volumes de reconstitution sont indiqués sur les étiquettes des flacons. Les valeurs attendues sont dans la gamme de concentration indiquée sur le supplément.

**Solution de lavage (20x) : un flacon de 50 mL**

Solution concentrée, à diluer avant usage.

## MATÉRIEL REQUIS MAIS NON FOURNI

En plus de l'équipement de laboratoire usuel, il est nécessaire d'utiliser le matériel suivant :

Pour le dosage:

- Micropipette de précision (25  $\mu$ L et 400  $\mu$ L).
- Pipettes semi-automatique (25  $\mu$ L, 400  $\mu$ L et 2 mL).
- Mélangeur de type vortex.
- Agitateur à mouvement de va et vient horizontal ou à plateau oscillant.
- Système d'aspiration.
- compteur gamma calibré pour l'iode 125.

Pour l'étape d'extraction (facultatif):

- micropipette de précision (200  $\mu$ L).
- Pipettes en verre (2,5 mL, 5 mL, 10 mL).
- Flacons en verre (de 6 mL à 15 mL).
- Tubes en verre pour la récupération de la phase organique.
- Evaporateur (type speedvac) ou bain-marie à 37 °C.
- Ether éthylique (qualité purex, pour analyse).

## PROCÉDURE

### Préparation des réactifs

Equilibrer les réactifs à la température du laboratoire.

### Préparation des sérums de contrôle

Reconstituer le contenu des flacons avec le volume d'eau distillée indiqué sur l'étiquette. Attendre 10 min après reconstitution et mélanger délicatement pour éviter la formation de mousse pendant la distribution. Conserver les solutions reconstituées à 2-8 °C jusqu'à la date de péremption de la trousse.

### Préparation de la solution de lavage

Verser le contenu du flacon dans 950 mL d'eau distillée. Homogénéiser. La solution diluée peut être conservée à 2-8 °C jusqu'à la date de péremption de la trousse.

### Extraction des échantillons biologiques (facultatif; voir § Limites)

NB : L'extraction doit être réalisée dans des tubes (ou des fioles) en verre propres, rincés à l'éther avant l'emploi.

Réaliser l'extraction uniquement sur les échantillons biologiques ; ne pas extraire les calibrateurs.

- Amener les réactifs à température ambiante. Homogénéiser avant de commencer l'extraction.
- Numéroter un tube pour chaque patient.

- Mettre 200  $\mu$ L de chaque échantillon dans les tubes ainsi numérotés.
- Ajouter 5 mL d'éther éthylique dans chaque fiole. Boucher soigneusement.
- Agiter vigoureusement chaque tube à l'aide d'un vortex (2x 1 minute).
- Laisser les tubes sur la table pendant 5 minutes minimum.
- Récupérer délicatement 2,5 mL de la phase organique, (phase supérieure) sans entraîner la phase aqueuse, dans des tubes en verre numérotés.
- Évaporer complètement la phase étherée avec un évaporateur (par ex., de type SpeedVac) ou en plaçant les tubes d'échantillon dans un bac d'eau à 37 °C.

Note 1: Les tubes placés dans le bain-marie à 37 °C doivent être soigneusement fixés sur le portoir, car à la fin de l'évaporation de l'éther éthylique, les tubes étant plus légers peuvent se retrouver dans l'eau du bain-marie.

A ce stade, il est possible de boucher les tubes contenant les extraits secs, de les garder jusqu' à 7 jours à 2-8 °C avant de poursuivre le dosage.

- Remettre en solution l'extrait biologique, en ajoutant 200  $\mu$ L de calibrateur zéro. Agiter vigoureusement à l'aide d'un vortex (30 secondes, 2000 tr/min). Attendre 15 minutes puis vortexer à nouveau.

Note 2 : Si un volume plus grand est nécessaire, au lieu de prendre 2,5 mL de phase organique, placer les tubes à <-18 °C jusqu'à congélation de la phase aqueuse. Récupérer délicatement 5 mL de la phase organique, (phase supérieure) sans entraîner la phase aqueuse. Evaporer complètement la phase organique puis remettre en suspension l'extrait avec 400  $\mu$ L de calibrateur zéro.

### Mode opératoire de l'immunodosage

Equilibrer les réactifs à la température du laboratoire avant utilisation.

Etape 1 Répartition	Etape 2 Incubation	Etape 3 Comptage
Dans les tubes recouverts d'anticorps, distribuer successivement : 25 $\mu$ L de calibrateur, de contrôle, d'échantillon ou 50 $\mu$ L d'extrait et 400 $\mu$ L de traceur, Agiter.	Incuber 120 minutes à 18-25 °C avec agitation ( $\geq$ 280 rpm).	Aspirer soigneusement le contenu de chaque tube (sauf les 2 tubes "cpm totaux"). Laver 2 fois avec 2 mL de solution de lavage. Aspirer.  Compter les cpm liés (B) et cpm totaux (T) pendant 1 min.

\*Ajouter 400  $\mu$ L de traceur dans 2 tubes supplémentaires pour obtenir les cpm totaux.

## RÉSULTATS

Les résultats sont déduits de la courbe standard par interpolation. La courbe sert à déterminer les taux 17 OH-P de tous les échantillons mesurés en même temps que les calibrateurs.

### Courbe standard

Les résultats obtenus par le service chargé du contrôle de qualité ont été calculés en utilisant un ajustement de courbe *spline* avec  $B/T$  ou  $B/B_0$  sur l'axe vertical logit et la concentration en analyte des calibrateurs sur l'axe horizontal logarithmique (ng/mL).

L'utilisation d'un autre mode de calcul peut conduire à des résultats légèrement différents.

Activité totale : 179 362 cpm				
Calibrateurs	17OH-P (ng/mL)	cpm (n=3)	B/T (%)	B/B <sub>0</sub> (%)
0	0	55 975	31,21	100,0
1	0,12	44 882	25,02	80,18
2	0,40	31 190	17,39	55,72
3	1,90	12 557	7,00	22,43
4	12,5	2 515	1,40	4,49
5	50,0	895	0,50	1,60

(Exemple de courbe standard, ne pas utiliser pour les calculs)

## Echantillons

Pour chaque échantillon, repérer le rapport B/T ou B/B<sub>0</sub> sur l'axe vertical, puis le point correspondant de la courbe standard et en déduire par lecture sur l'axe horizontal la concentration en 17 OH-P de l'échantillon.

Pour convertir des concentrations de ng/mL en nmol/L, multipliez les résultats par 3,026.

## VALEURS ATTENDUES

Il est recommandé à chaque laboratoire d'établir ses propres valeurs normales. Les valeurs suivantes déterminées chez des sujets sains sont données à titre indicatif.

Adults	N	Médiane	Min.	Max.	2.5ème	97.5ème
					Percentiles	Percentiles
(ng/mL)						
Hommes	55	0,93	0,53	2,22	0,55	1,99
Femmes						
Phase folliculaire	111	0,48	0,13	1,67	0,21	1,45
Phase lutéale	112	1,52	0,42	3,20	0,61	2,88
Phase périovulatoire	22	1,39	0,54	2,04	0,55	2,01
Sous contraceptif:						
Femmes après ménopause	30	0,37	0,17	1,48	0,18	1,47
1 <sup>er</sup> trimestre de grossesse	38	0,38	0,13	0,92	0,16	0,79
2 <sup>e</sup> trimestre de grossesse	45	2,03	0,78	5,75	0,93	3,82
3 <sup>e</sup> trimestre de grossesse	44	2,23	0,60	6,86	1,23	3,70

Les renseignements détail de valeur attendue pour les enfants (diviser par l'âge et l' sexe) est dans la feuille « APPENDIX ».

## CONTRÔLE DE QUALITÉ

Les bonnes pratiques de laboratoire impliquent que des échantillons de contrôle soient utilisés dans chaque série de dosage pour s'assurer de la qualité des résultats obtenus. Ces échantillons devront être traités de la même façon que les prélèvements à doser et il est recommandé d'en analyser les résultats à l'aide de méthodes statistiques appropriées.

En cas de détérioration de l'emballage ou si les résultats obtenus montrent une perte de performance du produit, veuillez contacter notre service Support Technique. E-mail : imunochem@beckman.com

## PERFORMANCES DU DOSAGE

(Voir la feuille "APPENDIX" pour plus de détails)

Les données représentatives ne sont fournies qu'à titre d'illustration. Les performances obtenues dans les laboratoires individuels peuvent varier.

### Sensibilité

Limite de détection (LoD) : 0,07 ng/mL

La LoD pour le 17 OH-P est de 0,07 ng/mL, ce qui a été déterminé conforme aux consignes du document du CLSI EP17-A2 [1] sur la base de proportions de faux positifs ( $\alpha$ ) inférieures à 5 % et de faux négatifs ( $\beta$ ) inférieures à 5 % ; en utilisant les déterminations de 120 échantillons à blanc et de 120 échantillons de faible concentration ; et une limite du blanc (LoB) de 0,04 ng/mL.

### Spécificité

L'anticorps utilisé dans l'immunodosage est spécifique au 17- $\alpha$ -hydroxyprogestérone.

## Précision

### Répétabilité et précision intra-laboratoire

La précision du dosage a été déterminée conformément aux lignes directrices du document du CLSI EP05-A3 [2]. Pour ce qui est de la répétabilité, les coefficients de variation déterminés se sont avérés inférieurs ou égaux à 10,5 % pour les échantillons de sérum. Pour ce qui est de la précision intra-laboratoire, les coefficients de variation déterminés se sont avérés inférieurs ou égaux à 12,8 % pour les échantillons de sérum.

### Exactitude

#### Linéarité

Le dosage s'est montré linéaire de 0,12 à 50,88 ng/mL à l'aide d'échantillons de sérum (ce qui a été jugé conforme aux consignes du document du CLSI EP06-A [3]).

#### Epreuve de dilutions

Les échantillons de sérum fortement concentrés ont été dilués en série avec le calibrateur de concentration zéro. Les pourcentages de récupération étaient compris entre 95,7 % et 119 %.

#### Epreuve de surcharge

Les échantillons sériques ont été dopés avec des quantités connues de 17 OH-P. Les pourcentages de récupération étaient compris entre 100 % et 119 %.

Plage de mesure (de LoD au calibrateur le plus élevé) :

De 0,07 ng/mL à environ 50 ng/mL

## LIMITES

Le non-respect des recommandations indiquées dans cette notice peut avoir un impact significatif sur les résultats.

Les résultats doivent être interprétés à la lumière du dossier clinique complet du patient, incluant l'historique clinique et les données de tests additionnels et toute autre information appropriée.

Voir la feuille "APPENDIX" pour plus de détails.

Les très jeunes enfants (en particulier jusqu'à 6 mois de vie) ont des taux de sulfate de 17 OH-prégnénolone très élevés. Dans ce cas, il est recommandé de pratiquer le dosage de 17 OH-P après extraction à l'éther.

Malgré une réactivité croisée faible, on peut observer des taux faussement élevés de 17 OH-P lors de la prise régulière de spironolactone. Il faut donc un arrêt thérapeutique d'au moins 3 semaines pour être sûr que l'on s'est affranchi de cette interférence.

Pour les tests employant des anticorps, il existe la possibilité d'une interférence par des anticorps hétérophiles présents dans l'échantillon du patient. Les patients qui ont été régulièrement exposés à des animaux ou qui ont reçu une immunothérapie ou qui ont subi des procédures diagnostiques utilisant des immunoglobulines ou des fragments d'immunoglobulines peuvent produire des anticorps, par exemple des anticorps HAMA (anticorps humains anti-souris), qui interfèrent avec les tests immunologiques.

Ces anticorps qui interfèrent peuvent être la cause de résultats erronés. Evaluer avec précaution les résultats de patients suspectés de posséder ces anticorps.



# RIA 17 $\alpha$ - Hydroxyprogesterone

**REF** IM1452

## RADIOIMMUNOASSAY FÜR DIE IN-VITRO BESTIMMUNG VON 17 $\alpha$ -HYDROXYPROGESTERON IN HUMANEM SERUM UND PLASMA *In-vitro*-Diagnostikum.

### PRINZIP

Der Radioimmunoassay 17 $\alpha$ -Hydroxyprogesteron (17 OH-P) ist ein kompetitiver Bindungsassay. Derselbe Test kann verwendet werden zur Bestimmung von 17 OH-P

entweder direkt im Serum oder EDTA Plasma

oder nach Extraktion der Probe mit Ether und Evaporation des Lösungsmittels und nachfolgender Resuspension mit Nullstandard.

Serum- oder Plasmaproben, Extrakte, Kontrollen und Kalibratoren werden in mit Antikörpern beschichteten Röhrchen mit einem 125I-markierten 17 OH-P-Tracer inkubiert. Nach der Inkubation wird die Flüssigkeit abgesaugt, und die Röhrchen gewaschen um die ungebundenen 125I-markierten 17 OH-P zu entfernen. Die gebundene Radioaktivität wird in einem Gamma-Counter gemessen. Eine Kalibrationskurve wird erstellt und unbekannte Probenwerte werden mittels Interpolation aus der Standardkurve bestimmt.

### WARNUNGEN UND VORSICHTSMASSNAHMEN

#### Allgemeinhinweise:

- Die Kalibrator- und Kontrollfläschchen sollten so kurz wie möglich geöffnet werden, um eine übermäßige Verdunstung zu vermeiden.
- Reagenzien aus Kits von verschiedenen Produktionsserien sollten nicht miteinander vermischt werden.
- Eine Standardkurve ist für jeden Assay notwendig.
- Der Assay sollte in Doppelbestimmung durchgeführt werden.
- Jedes Röhrchen darf nur einmal verwendet werden.

#### Grundregeln der Handhabung von Radioaktivität

Annahme, Besitz und Verwendung, Lagerung, Transport und Beseitigung unterliegen den Vorschriften der Atomenergie- bzw. der jeweiligen staatlichen Behörde. Die Einhaltung der Grundregeln beim Umgang mit Radioaktivität sollte eine ausreichende Sicherheit gewährleisten:

- In Räumen, in denen mit radioaktiven Materialien gearbeitet wird, sollte Essen, Trinken, Rauchen und das Auftragen von Kosmetika vermieden werden.
- Keine Mundpipette verwenden.
- Direkter Kontakt mit radioaktiven Materialien sollte durch Tragen entsprechender Schutzkleidung (Laborkittel, Handschuhe) vermieden werden.
- Das Arbeiten mit radioaktiven Stoffen muß in dafür speziell gekennzeichneten Bereichen, die vom normalen Laborbetrieb abgetrennt sind, erfolgen.
- Radioaktive Materialien sollten in einem speziell gekennzeichneten Bereich gelagert werden.
- Ein Register der Eingänge und Lagerung aller radioaktiven Produkte sollte ständig aktualisiert werden.
- Kontaminierte Labor- und Glasgeräte sollten isoliert werden, um eine Kreuzkontamination von verschiedenen Radioisotopen zu verhindern.
- Kontaminationen des Arbeitsplatzes müssen unverzüglich sorgfältig nach den üblichen Verfahren entfernt werden.
- Radioaktiver Abfall muss entsprechend den Richtlinien jedes Einsatzortes entsorgt werden.

#### Natriumazid

Zur Vermeidung mikrobieller Kontamination enthalten einige Reagenzien Natriumazid. Natriumazid kann mit Blei, Kupfer oder Messing zu explosiven Metallaziden reagieren. Um dies zu vermeiden, sollte bei einer Entsorgung über Rohrleitungen mit viel Wasser nachgespült werden.

#### Bestandteile menschlichen Ursprungs

Bestandteile menschlichen Ursprungs, die für diesen Kit verwendet wurden, sind auf HIV-1 und HIV-2 Antikörper, HCV Antikörper und Hepatitis B surface

Antigen (HbsAg) getestet und als nicht reaktiv befunden wurden. Es ist so vorzugehen, als ob eine tatsächliche Ansteckungsgefahr bestünde. Keine Testmethode kann völlige Sicherheit bieten. Der Kit sollte mit allen notwendigen Sicherheitsvorkehrungen behandelt werden.

Alle Serum- und Plasmaproben sollten als potentielle Überträger von Hepatitis und AIDS behandelt und Abfälle entsprechend den jeweiligen Länderbestimmungen entsorgt werden.

#### Diethylether

Ethylether ist ein flüchtiges und hoch entzündliches organisches Lösungsmittel. Extraktion und Evaporation müssen in einem gut belüfteten Abzug stattfinden. Von offenem Feuer fernhalten. Keine Mundpipette verwenden.

### GHS-GEFAHRSTOFFKLASSIFIZIERUNG

Waschlösung (20X)

GEFAHR



H360

Kann die Fruchtbarkeit beeinträchtigen oder das Kind im Mutterleib schädigen.

P201

Vor dem Gebrauch besondere Anweisungen einholen.

P280

Schutzhandschuhe, Schutzkleidung und Augenschutz/Gesichtsschutz tragen.

P308+P313

BEI Exposition oder falls betroffen: Ärztlichen Rat einholen/ärztliche Hilfe hinzuziehen.  
Borsäure 0,1 - 0,3 %  
di-Natriumtetraborat-Decahydrat 0,1 - 0,3 %

**SDS**

Das Sicherheitsdatenblatt ist auf [techdocs.beckmancoulter.com](http://techdocs.beckmancoulter.com) verfügbar.

### PROBENENTNAHME, -BEHANDLUNG, -LAGERUNG UND VERDÜNNUNG

- Das Blut sollte in Röhrchen gesammelt werden, die entweder keine Zusätze oder EDTA enthalten.
- Trennen Sie Die Zellen vom Serum oder Plasma durch Zentrifugation.
- Serum- und Plasmaproben können bei 2-8 °C gelagert werden, wenn der Assay innerhalb von 24h durchgeführt wird. Für eine längere Lagerung sollte die Probe aliquotiert und eingefroren werden (< -18 °C, maximum 1 Jahr). Das Auftauen sollte bei Raumtemperatur erfolgen.
- Wenn die Proben Konzentrationen über dem höchsten Kalibratorwert haben, müssen sie mit Nullkalibrator verdünnt werden.

Die Serum- und EDTA-Plasmapwerte wurden unter Verwendung des 17-OH-P-RIA-Kits bei 30 Proben (mit Serumwerten im Bereich von 0,24–1,88 ng/mL) verglichen. Folgende Ergebnisse wurden erzielt:

[EDTA-Plasma] = 0,9026 [Serum] + 0,0283,

R = 0,9747

### MITGELIEFERTE MATERIALIEN

Die Reagenzien sind bis zum Verfallsdatum verwendbar, wenn sie bei 2-8 °C gelagert werden. Auf die Fläschchen gedruckte Verfallsdaten betreffen nur die Langzeitlagerung beim Hersteller, vor der Zusammensetzung des Kits. Bitte nicht beachten.

Lagerungsbedingungen für Reagenzien nach der Rekonstitution oder Verdünnung werden im Abschnitt „Durchführung“ angegeben.



**Röhrchen mit anti-17 OH-P Antikörpern beschichtet : 2 x 50 Röhrchen** (gebrauchsfertig)

**125I-markiertes 17 $\alpha$ -Hydroxyprogesteron: ein 45 mL Fläschchen** (gebrauchsfertig)

Das Fläschchen enthält <640 kBq (am Tag der Herstellung) 125I-markiertes 17 OH-P in Puffer mit Proteinen und einem Farbstoff.

Bemerkung: Gelegentlich kann eine leichte Ausfällung des I-125 Tracers auftreten, die jedoch keinen Einfluß auf die Testbestimmung hat.

**Kalibratoren: 1 Fläschchen mit 2 mL, 5 Fläschchen mit 0,5 mL** (gebrauchsfertig)

Die Kalibrator-Fläschchen enthalten 0 bis circa 50 ng/mL (0 bis circa 151 nmol/L) 17-OH-P in einem humanem Serum mit Natriumazid (< 0,1 %). Die exakte Konzentration steht auf jedem Fläschchen-Etikett. Die Kalibratoren sind gemäß einem internen Referenzstandard verifiziert.

Der Nullkalibrator (5 mL) kann separat bestellt werden (Nr. #B23373).

**Serumkontrolle: 2 Fläschchen** (lyophilisiert)

Die Kontrollen enthalten 17 OH-P in humanem Serum und Natriumazid (<0,1 %). Das Volumen zum Auflösen ist auf dem Etikett vermerkt. Die erwarteten Werte finden Sie auf einem Beipackzettel.

**Waschlösung (20x): eine Flasche 50 mL**

Die konzentrierte Lösung muss vor Gebrauch verdünnt werden.

## ERFORDERLICHE, JEDOCH NICHT MITGELIEFERTE MATERIALIEN

Zusätzlich zu der Standardlaborausstattung, werden die folgenden Materialien benötigt:

Für den Assay

- Präzisionspipette (25  $\mu$ L und 400  $\mu$ L).
- Halbautomatische Pipetten (25  $\mu$ L, 400  $\mu$ L und 2 mL).
- Vortex-Mixer.
- Horizontal- oder Orbitalschüttler.
- Absaugsystem.
- Gamma-Counter für <sup>125</sup>I

Für den Extraktions-Schritt (optional)

- Präzisionspipette (200  $\mu$ L).
- Glaspipetten (2,5 mL, 5 mL und 10 mL).
- Glasröhrchen (von 6 mL bis 15 mL).
- Glasöhrchen für die Wiederaufnahme der Etherphase.
- Evaporator (Speedvac) oder 37 °C Wasserbad.
- Äthyl-Äther analytischer Qualität

## DURCHFÜHRUNG

### Reagenzienvorbereitung

Die Reagenzien sollten Raumtemperatur haben.

### Wiederaufnahme der Serumkontrollen

Den Inhalt der Kontrollfläschchen mit der Menge destilliertem Wasser auflösen, die auf den Etiketten vermerkt ist. 10 Min. stehen lassen und vor dem Pipettieren ohne Schaumbildung vorsichtig mischen. Aufgelöste Kontrollen bei 2-8 °C bis zum Verfallsdatum des Kits lagern.

### Präparation der Waschlösung

Den Inhalt der Flasche in 950 mL destilliertes Wasser schütten und homogenisieren. Die verdünnte Lösung ist bei 2-8 °C bis zum Verfallsdatum haltbar.

### Extraktion der Proben (optional; siehe § Einschränkungen)

Anmerkung: Die Extraktion muss in sauberen Glasgefäßen durchgeführt werden, die vorher mit Ether gespült wurden.

Die Extraktion vor dem Versuch erfolgt nur für Proben; es erfolgt keine Extraktion für Kalibratoren.

- Vor der Extraktion müssen die Proben auf Raumtemperatur gebracht und gut geschüttelt werden
- Nummerieren Sie ein Röhrchen für jede Probe.

- Fügen Sie 200  $\mu$ L jeder Probe in die entsprechenden Röhrchen hinzu.
- 5 mL Ethylether in die Fläschchen hinzugeben. Vorsichtig zustopfen.
- Die Röhrchen gründlich vortexen (2x 1 Minute).
- Röhrchen für mindestens 5 Minuten stehen lassen.
- Vorsichtig 2,5 mL der organischen Phase abnehmen, ohne die wässrige Phase zu kontaminieren und in ein entsprechend beschriftetes Röhrchen überführen.
- Die Etherphase entweder mit einem Verdampfer (z. B. vom Speedvac-Typ) oder durch Platzieren der Röhrchen in einem Wasserbad bei 37 °C verdampfen.

Anmerkung 1: die Röhrchen müssen gut an dem Teströhrchen-Rack befestigt werden, da sie nach der Evaporation des Ethers leichter sind und ansonsten an der Oberfläche schwimmen können.

Hier können die Röhrchen mit den eingetrockneten Extrakte mit einem Stopfen verschlossen werden und bis zu sieben Tage lang bei 2-8 °C gelagert werden, vor Durchführung der Bestimmung.

- Die trockenen Ether-Extrakte mit 200  $\mu$ L Nullstandard aufnehmen. Röhrchen kräftig vortexen (30 s, 2000 rpm), 15 Minuten stehen lassen und erneut vortexen.

Anmerkung 2: Falls ein größeres Volumen benötigt wird kann, anstelle der Abnahme von 2,5 mL von der organischen Phase, das Röhrchen bei -18 °C gelagert werden, bis die wässrige Phase tieferen ist. Dann vorsichtig 5 mL von der organischen Phase abnehmen, ohne die wässrige Phase zu kontaminieren, eindampfen und in 400  $\mu$ L Nullstandard aufnehmen.

### Testdurchführung

Die Reagenzien sollten Raumtemperatur haben vor dem Pipettieren.

Schritt 1 Zugabe	Schritt 2 Inkubation	Schritt 3 Messung
Zugabe zu den beschichteten Röhrchen (in dieser Reihenfolge): 25 $\mu$ L Kalibrator, Kontrolle, Probe oder 50 $\mu$ L Extrakt und 400 $\mu$ L Tracer,* Mischen.	120 Minuten bei 18-25 °C auf einem Schüttler inkubieren ( $\geq$ 280 rpm).	Röhrchen absaugen (außer den zwei Röhrchen für die Totalaktivität). Zweimal mit 2 mL Waschlösung waschen. Absaugen.  Gebundene cpm (B) und Totalaktivität (T) bestimmen (1 min)

\*Pipettieren Sie 400  $\mu$ L Tracer in 2 zusätzliche Röhrchen, um die Totalaktivität zu erhalten.

## ERGEBNISSE

Die Ergebnisse werden aus der Standardkurve mittels Interpolation ermittelt. Die Kurve dient zur Bestimmung der 17 OH-P-Konzentration in den Proben, die zur gleichen Zeit wie die Standardkurve gemessen wurden.

### Standardkurve

Die Ergebnisse wurden in der Abteilung für Qualitätskontrolle anhand einer *Spline*-Kurvenanpassung mit *B/T* oder *B/B<sub>0</sub>* auf der vertikalen Logit-Achse und der Analytkonzentration der Kalibratoren auf der logarithmischen horizontalen Achse (ng/mL) berechnet.

Andere Datenreduktions-Methoden können zu leicht abweichenden Ergebnissen führen.

Gesamtaktivität: 179 362 cpm				
Kalibratoren	17OH-P (ng/mL)	cpm (n=3)	B/T (%)	B/B <sub>0</sub> (%)
0	0	55 975	31,21	100,0
1	0,12	44 882	25,02	80,18
2	0,40	31 190	17,39	55,72
3	1,90	12 557	7,00	22,43
4	12,5	2 515	1,40	4,49
5	50,0	895	0,50	1,60

(Beispiel einer Standardkurve, nicht zur Berechnung verwenden)

### Proben

Für jede Probe wird der B/T oder B/B<sub>0</sub>-Wert auf der y-Achse bestimmt und die entsprechende 17 OH-P-Konzentration auf der x-Achse abgelesen.

Um die Werte von ng/mL in nmol/L umzurechnen, müssen sie mit 3,026 multipliziert werden.

## ERWARTETE WERTE

Jedes Labor sollte seinen eigenen Normalbereich in Gruppen von gesunden Testpersonen festlegen. Die hier angegebenen Werte dienen nur als Richtlinie.

Adults	N	Median	Min.	Max.	2.5 Perzentil	97.5 Perzentil
Männer	55	0,93	0,53	2,22	0,55	1,99
Frauen						
Follikelphase	111	0,48	0,13	1,67	0,21	1,45
Lutealphase	112	1,52	0,42	3,20	0,61	2,88
Präovulatorischer Peak	22	1,39	0,54	2,04	0,55	2,01
Kontrazeption	30	0,37	0,17	1,48	0,18	1,47
Frauen (Menopause)	38	0,38	0,13	0,92	0,16	0,79
1. Trimester der Schwangerschaft	45	2,03	0,78	5,75	0,93	3,82
2. Trimester der Schwangerschaft	44	2,23	0,60	6,86	1,23	3,70

Detaillierte Information über die erwarteten Kinderwerte (aufgeschlüsselt nach Alter und Geschlecht) sind im Datenblatt "APPENDIX" aufgeführt.

## QUALITÄTSKONTROLLE

Zur Einhaltung der Laborgrundregeln sollten regelmäßig Kontrollproben benutzt werden, um die Qualität der Ergebnisse zu sichern. Diese Proben müssen in genau derselben Weise wie die Assay Proben getestet werden, und die Analyse der Ergebnisse sollte mit angebrachten statistischen Methoden stattfinden.

Im Falle von Verpackungsschäden oder einer Leistungsbeeinträchtigung des Produkts, kontaktieren Sie bitte Ihren lokalen Vertreiber oder benutzen Sie die folgende e-mail: imunochem@beckman.com

## SPEZIFISCHE LEISTUNGSMERKMALE

(Für mehr Details, siehe die Beilage "APPENDIX").

Repräsentative Daten dienen nur der Veranschaulichung. Die in einzelnen Labors erzielten Leistungen können anders ausfallen.

### Empfindlichkeit

**Nachweisgrenze (LoD):** 0,07 ng/mL

Die Nachweisgrenze (LoD) für 17-OH-P beträgt 0,07 ng/mL und wurde im Einklang mit den Richtlinien im CLSI-Dokument EP17-A2 [1] bestimmt, basierend auf den Proportionen falsch-positiver Ergebnisse ( $\alpha$ ) kleiner als 5 % und falsch-negativer Ergebnisse ( $\beta$ ) kleiner als 5 %, wobei Bestimmungen mit 120 Leerwertproben und 120 Proben mit geringem Volumen und ein Grenzwert für den Leerwert von 0,04 ng/mL verwendet wurden.

### Spezifität

Der im Immunassay verwendete Antikörper ist spezifisch für 17- $\alpha$ -Hydroxyprogesteron.

## Präzision

### Wiederholbarkeit und Präzision innerhalb eines Labors

Die Präzision des Assays wurde im Einklang mit den Richtlinien im CLSI-Dokument EP05-A3 [2] bestimmt. Hinsichtlich der Wiederholbarkeit ergaben die Variationskoeffizienten einen Wert von weniger oder gleich 10,5 % bei Serumproben. Hinsichtlich der Präzision innerhalb eines Labors ergaben die Variationskoeffizienten einen Wert von weniger oder gleich 12,8 % bei Serumproben.

### Genauigkeit

#### Linearität

Der Assay erwies sich unter Verwendung von Serumproben als linear von 0,12–50,88 ng/mL (wurde im Einklang mit den Richtlinien im CLSI-Dokument EP06-A [3] bestimmt).

#### Verdünnungstest

Serumproben mit hohen Konzentrationen wurden seriell mit dem Nullkalibrator verdünnt. Der Wiederfindungsprozentsatz lag zwischen 95,7 % und 119 %.

#### Wiederfindungstest

Die Serumproben wurden mit bekannten Mengen 17-OH-P versetzt. Der Wiederfindungsprozentsatz lag bei 100–119 %.

**Meßbereich** (von LoD bis zum höchsten Kalibrator):

0,07 ng/mL bis etwa 50 ng/mL

## EINSCHRÄNKUNGEN

Die Nichtbeachtung der Anweisungen in dieser Packungsbeilage kann die Ergebnisse signifikant beeinflussen.

Die erhaltenen Ergebnisse sind vor dem Hintergrund der gesamten klinischen Situation des Patienten unter Berücksichtigung seiner klinischen Vorgeschichte, den Ergebnissen anderer Testergebnisse sowie weiteren vorliegenden Informationen zu interpretieren.

Für mehr Details vgl. den Anhang "APPENDIX".

Sehr junge Kinder (insbesondere jünger als 6 Monate) haben sehr hohe 17 OH-Pregnenolon-Sulfat-Werte. In diesem besonderen Fall wird zu einer Ether-Extraktion vor der Durchführung des 17 OH-P- Assays geraten.

Trotz niedriger Kreuzreaktion können falsch erhöhte 17-OH-P Werte nach regelmäßiger Verabreichung von Spironolacton beobachtet werden. Um diese Interferenz zu vermeiden, sollte eine Spironolacton-Therapie mindestens drei Wochen vor dem Assay unterbrochen werden.

Bei Assays, die Antikörper nutzen, besteht die Möglichkeit einer Störung durch in der Patientenprobe enthaltene heterophile Antikörper. Patienten, die regelmäßig mit Tieren in Kontakt kommen oder sich immuntherapeutischen oder -diagnostischen Verfahren unter Einsatz von Immunglobulinen oder Immunglobulin-Fragmenten unterzogen haben, können Antikörper bilden (wie bspw. HAMA), welche die Immunoassays stören.

Derartige störende Antikörper können zu fehlerhaften Ergebnissen führen. Die Ergebnisse von Patienten, bei denen das Vorliegen derartiger Antikörper zu vermuten ist, sind sorgfältig zu untersuchen.

## RIA 17 $\alpha$ - Hydroxyprogesterone

**REF** IM1452

### KIT RADIOIMMUNOLOGICO PER LA DETERMINAZIONE IN VITRO DEL 17 $\alpha$ -IDROSSIPROGESTERONE IN SIERO E PLASMA UMANI

Per uso diagnostico *in vitro*.

#### PRINCIPIO

Il dosaggio immunoradiometrico del 17 $\alpha$ -Idrossiprogesterone (17 OH-P) è un test competitivo. Il kit può essere utilizzato per la determinazione del 17 OH-P:

direttamente nel siero o plasma-EDTA

oppure dopo estrazione dei campioni con etere ed evaporazione del solvente, seguita dalla risospensione dell'estratto con il calibratore zero.

I campioni di siero o plasma, gli estratti, i controlli ed i calibratori vengono incubati con 17 OH-P marcato con 125I in provette sensibilizzate con anticorpo. Al termine dell'incubazione le provette vengono lavate per rimuovere 17 OH-P marcato con 125I non legato. La radioattività legata viene quindi misurata con un contatore gamma. Viene stabilita una curva standard e la concentrazione di 17 OH-P dei campioni viene ricavata per interpolazione da tale curva.

#### AVVERTENZE E PRECAUZIONI

##### Considerazioni generali:

- Aprire i flaconi dei calibratori e controlli nel più breve tempo possibile per evitarne l'eccessiva evaporazione.
- Non utilizzare reattivi di lotti diversi.
- Inserire la curva standard in ogni esperimento.
- Eseguire il dosaggio in duplicato.
- Le provette sono monouso.

##### Norme di radioprotezione

L'acquisto, la detenzione, l'utilizzo e il trasporto di materiale radioattivo sono soggetti a regolamentazione locale. Lo scrupoloso rispetto delle norme per l'uso di sostanze radioattive fornisce una protezione adeguata agli utilizzatori.

- Nei luoghi dove si usano sostanze radioattive non è consentito consumare cibi o bevande, fumare o usare cosmetici.
- Non pipettare materiale radioattivo con pipette a bocca.
- Usare sempre guanti e camici da laboratorio quando si manipola materiale radioattivo.
- Tutte le manipolazioni di sostanze radioattive devono essere fatte in posti appropriati, lontano da corridoi ed altri posti affollati.
- Le sostanze radioattive devono essere conservate in propri contenitori in appositi locali che devono essere interdetti alle persone non autorizzate.
- Deve essere tenuto un registro di carico e scarico del materiale radioattivo.
- Il materiale di laboratorio e la vetreria deve essere dedicato all'uso di isotopi specifici per evitare cross-contaminazioni.
- In caso di contaminazione o dispersione di materiale radioattivo, fare riferimento alle norme locali di radioprotezione.
- I rifiuti radioattivi devono essere smaltiti secondo le norme locali di radioprotezione.

##### Sodio azide

Alcuni reattivi contengono sodio azide come conservante, che può reagire con piombo, rame o ottone presenti nelle tubature di scarico per formare metallo-azidi esplosivi. Smaltire questi reattivi facendo scorrere abbondante acqua negli scarichi.

##### Materiale di origine umana


Alcuni reattivi presenti nel kit sono di origine umana e si sono rivelati negativi per anticorpi anti HIV1 e HIV2, anticorpi anti HCV e antigene di superficie dell'epatite B (HbsAg). Questi reattivi devono essere manipolati come in grado di trasmettere malattie infettive. Non sono disponibili metodi in grado di offrire la certezza assoluta che questi o altri agenti infettivi siano assenti. Manipolare questi reattivi come potenziali fonti di infezioni.

Manipolare tutti i campioni di sangue come potenziali fonti di infezioni. (Ad es. epatite o AIDS). I rifiuti devono essere smaltiti secondo le disposizioni legislative e la regolamentazione vigente in ciascun Paese.

##### Etere etilico

L'etere etilico è un solvente organico volatile altamente infiammabile. Eseguire l'estrazione e l'evaporazione sotto cappa ventilata. Evitare ogni contatto con fiamme libere e non pipettare i reattivi con pipette a bocca.

#### CLASSIFICAZIONE PERICOLI GHS

Soluzione di lavaggio (20X)	PERICOLO	
		
H360		Può nuocere alla fertilità o al feto.
P201		Procurarsi istruzioni specifiche prima dell'uso.
P280		Indossare guanti/indumenti protettivi e proteggere gli occhi/il viso.
P308+P313		IN CASO di esposizione o di possibile esposizione, consultare un medico. Acido borico 0,1 - 0,3% Decaidrato borato di sodio 0,1 - 0,3%

**SDS**

La scheda tecnica sulla sicurezza è disponibile su [techdocs.beckmancoulter.com](http://techdocs.beckmancoulter.com)

#### RACCOLTA, MANIPOLAZIONE, DILUIZIONE E CONSERVAZIONE DEI CAMPIONI

- Raccogliere i campioni in provette senza anticoagulante o con EDTA.
- Separare per centrifugazione il siero o il plasma dalla parte corpuscolata.
- I campioni possono essere conservati fino a 24 ore a 2-8 °C o, suddivisi in aliquote, a -18 °C (fino ad un anno) o a temperature inferiori per periodi più lunghi. Evitare ripetuti cicli di congelamento-scongelo dei campioni. Scongelo i campioni a temperatura ambiente.
- Diluire i campioni a concentrazione superiore alla concentrazione del calibratore più elevato con il calibratore zero.

I valori di siero e plasma EDTA per 30 campioni (valori di siero compresi tra 0,24 e 1,88 ng/mL) sono stati messi a confronto utilizzando il kit RIA 17 OH-P. I risultati sono i seguenti:

$$[\text{plasma EDTA}] = 0,9026[\text{siero}] + 0,0283,$$

$$R = 0,9747$$

#### MATERIALI FORNITI

I reattivi, conservati a 2-8 °C, sono stabili fino alla data di scadenza riportata sul kit. Le date di scadenza riportate sulle etichette di ciascun flacone si riferiscono alla conservazione dei reattivi stabilita in produzione, prima del loro inserimento nel kit.

Le modalità di conservazione dei reagenti dopo la ricostituzione o la diluizione sono riportate nel paragrafo Procedura.

**Provette sensibilizzate con anticorpo anti-17 OH-P: 2 x 50 provette** (pronte per l'uso)

**17  $\alpha$ -Idrossiprogesterone marcato con 125I: Un flacone (45 mL)** (pronto per l'uso)

Il flacone contiene meno di 640 kBq (alla data di marcatura) di 17 OH-P 125I in tampone contenente proteine e colorante.

Annotazione: L'eventuale presenza della coagulazione nel radioindicatore non ha alcun effetto sulla qualità della determinazione.

**Calibratori: un flacone da 2 mL, cinque flaconi da 0,5 mL** (pronti per l'uso)

Le fiale del calibratore contengono da 0 a circa 50 ng/mL (da 0 a circa 151 nmol/L) di 17 OH-P in siero umano con sodio azide (< 0,1%). La

concentrazione esatta è indicata su ciascuna etichetta della fiala. I calibratori vengono verificati sulla base di uno standard di riferimento interno.

E' possibile ordinare separatamente il calibratore zero aggiuntivo (5 mL) (cat. #B23373).

#### Controllo: Due flaconi (liofilizzati)

I flaconi dei controlli contengono 17 OH-P in siero umano con sodio azide (<0,1%). Sull'etichetta di ciascun flacone sono riportati il volume richiesto per la ricostituzione e l'intervallo di concentrazione atteso.

#### Soluzione di lavaggio (20x): Un flacone 50 mL

Soluzione concentrata da diluire prima dell'uso.

### MATERIALI RICHIESTI MA NON FORNITI

Oltre alla normale attrezzatura da laboratorio, è richiesto il materiale seguente:

Per il dosaggio:

- Micropipetta di precisione (25 µL e 400 µL).
- Pipetta semiautomatica (25 µL, 400 µL e 2 mL).
- Agitatore tipo vortex.
- Agitatore oscillante per provette.
- Sistema di aspirazione.
- contatore gamma programmato per leggere <sup>125</sup>I.

Per la fase di estrazione (facoltativa):

- micropipette di precisione (200 µL).
- Pipette in vetro (2,5 mL, 5 mL, 10 mL).
- Flaconi in vetro (da 6 mL a 15 mL).
- Provette di vetro per il recupero della fase organica.
- Evaporatore (tipo "speedvac") o bagno termostato a 37 °C.
- Etere etilico (qualità purex, per analisi).

## PROCEDURA

### Preparazione dei reattivi

Portare i reattivi a temperatura ambiente.

### Ricostituzione dei sieri di controllo

Ricostituire il contenuto dei flaconi con il volume di acqua distillata riportato sull'etichetta. Attendere 10 min ed agitare delicatamente evitando la formazione di schiuma prima di dispensare. Conservare le soluzioni ricostituite a 2-8 °C fino alla data di scadenza del kit.

### Preparazione della soluzione di lavaggio

Diluire il contenuto del flacone con 950 mL e agitare con cura. La soluzione diluita è stabile a 2-8 °C fine alla scadenza del kit.

### Estrazione dei campioni (opzionale: vedere § Limitazioni)

NB: Utilizzare flaconi o provette di vetro puliti, precedentemente risciacquati con etere.

Estrarre soltanto i campioni; non estrarre i calibratori.

- Portare i campioni a Temperatura Ambiente e miscele bene i campioni prima di procedere all'estrazione.
- Numerare una provetta per ciascun campione.
- Mettere 200 µL di ciascun campione nelle provette corrispondenti.
- Aggiungere 5 mL di etere etilico a ciascun flacone. Tappare con cura.
- Agitare energicamente ciascun flacone con l'agitatore vortex (2 x 1 minuto).
- Lasciare a riposo i flaconi sul bancone per un minimo di 5 minuti.
- Trasferire con cura 2,5 mL di fase organica priva di fase acquosa in provette di vetro numerate.
- Far completamente evaporare la fase eterea con un evaporatore (ad es. tipo speedvac) o mettendo le provette in un bagno d'acqua a 37 °C.

Nota 1: Fissare le provette al portaprovette con cura, poiché, terminata l'evaporazione dell'etere, diventano più leggere tendendo a galleggiare nell'acqua del bagno termostato.

Ad evaporazione completa è possibile tappare le provette e conservarle fino a 7 giorni a 2-8 °C.

- Ridisciogliere gli estratti secchi con 200 µL di calibratore zero. Agitare energicamente con agitatore vortex (30 sec, 2000 rpm), attendere 15 minuti e agitare di nuovo con l'agitatore vortex.

Nota 2: Se si rendesse necessario utilizzare un maggiore volume di etere, mantenere i flaconi a <-18 °C fino a congelamento della fase acquosa, trasferire con cura 5 mL di fase organica priva di fase acquosa, evaporare e ridisciogliere in 400 µL di calibratore zero.

### Metodo dell'immunodosaggio

Prima dell'uso lasciare equilibrare i reattivi a temperatura ambiente.

Fase 1 Dispensazione	Fase 2 Incubazione	Fase 3 Conteggio
Aggiungere in successione alle provette sensibilizzate:  25 µL di calibratore, controllo, campione o 50 µL di estratto e 400 µL di marcato. Mescolare.	Incubare per 120 minuti a 18 - 25 °C in agitazione (≥ 280 rpm)	Aspirare con cura il contenuto delle provette (eccetto le 2 provette per l'attività totale). Lavare 2 volte con 2mL di soluzione di lavaggio. Aspirare.  Contare la radioattività legata (B) e l'attività totale (T) per 1 min.

\*Aggiungere 400 µL di marcato a 2 provette non sensibilizzate per la determinazione dell'attività totale.

## RISULTATI

Le concentrazioni di 17 OH-P dei campioni e controlli vengono calcolate per interpolazione sulla curva standard. Dosare campioni e controlli assieme ai calibratori.

### Curva standard

I risultati registrati dal reparto responsabile del controllo di qualità sono stati calcolati utilizzando l'adattamento della curva con metodo *spline* con  $B/T$  o  $B/B_0$  sull'asse verticale logit e la concentrazione di analiti dei calibratori sull'asse orizzontale logaritmico (ng/mL).

Altri metodi di interpolazione dati possono dare risultati leggermente differenti.

Totale attività: 179.362 cpm				
Calibratori	17OH-P (ng/mL)	cpm (n=3)	B/T (%)	B/B <sub>0</sub> (%)
0	0	55.975	31,21	100,0
1	0,12	44.882	25,02	80,18
2	0,40	31.190	17,39	55,72
3	1,90	12.557	7,00	22,43
4	12,5	2.515	1,40	4,49
5	50,0	895	0,50	1,60

(Esempio di curva standard. Non usare per calcolare il valore dei propri campioni)

### Campioni

Calcolare  $B/T$  o  $B/B_0$  per ogni campione, riportarlo sull'asse delle ordinate e leggere le concentrazioni corrispondenti sull'asse delle ascisse.

Fattore di conversione per passare da ng/mL a nmol/L: Moltiplicare i risultati per 3,026.

## VALORI ATTESI

Ogni laboratorio deve stabilire i propri limiti di riferimento in campioni provenienti da soggetti caratterizzati clinicamente. Si prega di considerare solo come guida i valori sotto riportati.

Adults	N	Media	Min.	Max.	2.5%	97.5%
					percentil	percentil
(ng/mL)						
Uomini	55	0,93	0,53	2,22	0,55	1,99
Donne						
Fase follicolare	111	0,48	0,13	1,67	0,21	1,45
Fase luteale	112	1,52	0,42	3,20	0,61	2,88
Picco preovulatorio	22	1,39	0,54	2,04	0,55	2,01
Contracezione	30	0,37	0,17	1,48	0,18	1,47
Donne in post menopausa	38	0,38	0,13	0,92	0,16	0,79
1° trimestre di gravidanza	45	2,03	0,78	5,75	0,93	3,82
2° trimestre di gravidanza	44	2,23	0,60	6,86	1,23	3,70

Informazioni dettagliate sui valori attesi per i bambini (ordinati per età e sesso) si possono trovare in "APPENDIX").

## CONTROLLO DI QUALITÀ

Si consiglia ad ogni laboratorio di dosare regolarmente campioni di controllo per verificare la qualità dei risultati ottenuti. Questi campioni devono essere manipolati esattamente come i campioni in esame; i risultati devono essere analizzati con metodi statistici appropriati.

In caso il kit fosse danneggiato o i dati ottenuti mostrino un'alterazione della performance, si prega di contattare il distributore locale o di scrivere all'indirizzo e-mail seguente: [imunochem@beckman.com](mailto:imunochem@beckman.com)

## CARATTERISTICHE DELLE PRESTAZIONI

(Ulteriori dati sono riportati in "APPENDIX")

Vengono forniti dati rappresentativi a mero scopo illustrativo. I risultati possono variare da laboratorio a laboratorio.

### Sensibilità

**Limite di rilevazione (LoD):** 0,07 ng/mL

Il limite di rilevazione (LoD) per 17 OH-P è 0,07 ng/mL ed è stata dichiarata coerente con le linee guida del documento CLSI EP17-A2 [1] in base alle proporzioni di falsi positivi ( $\alpha$ ) inferiori al 5% e falsi negativi ( $\beta$ ) inferiori al 5%. È stata stabilita utilizzando le determinazioni, con 120 campioni vuoti e 120 campioni con livello basso. Il limite del bianco (LoB) è 0,04 ng/mL.

### Specificità

L'anticorpo utilizzato nel dosaggio immunometrico è specifico per 17- $\alpha$ -idrossiprogesterone.

### Precisione

#### Ripetibilità e precisione intra-laboratorio

La precisione del dosaggio è stata stabilita in conformità alle linee guida del documento CLSI EP05-A3 [2]. Per la ripetibilità i coefficienti di variazione

erano minori o uguali al 10,5% per i campioni di siero. Per la precisione intra-laboratorio i coefficienti di variazione erano minori o uguali al 12,8% per i campioni di siero.

### Accuratezza

#### Linearità

Il dosaggio ha dimostrato di rimanere lineare da 0,12 a 50,88 ng/mL utilizzando campioni di siero (stabilito in conformità alle linee guida del documento CLSI EP06-A [3]).

#### Test di diluizione

I campioni di siero ad alta concentrazione sono stati diluiti in serie con il calibratore zero. Le percentuali di recupero vanno dal 95,7% al 119%.

#### Test di recupero

I campioni di siero sono stati corretti con quantitativi noti di 17 OH-P. Le percentuali di recupero vanno dal 100% al 119%.

**Intervallo di misurazione** (dal limite di rilevazione al calibratore più elevato):

Da 0,07 ng/mL a circa 50 ng/mL

## LIMITAZIONI

Rispettare accuratamente le istruzioni d'uso per evitare risultati aberranti.

I risultati devono essere interpretati in base alla valutazione clinica complessiva della paziente, che comprende la storia clinica, i dati ottenuti con altri test diagnostici o strumentali ed altre informazioni appropriate.

Ulteriori dati sono riportati in Appendice.

I bambini molto piccoli (in particolare con meno di 6 mesi) hanno un livello di 17 OH-pregnenolone solfato molto elevato. In questo particolare caso, si raccomanda di eseguire l'estrazione con etere prima del test di 17 OH-P.

Malgrado cross-reazioni ridotte, si possono osservare valori falsamente elevati di 17 OH-P in seguito alla regolare somministrazione di spironolattone. La terapia a base di spironolattone deve quindi essere interrotta almeno tre settimane prima di realizzare il test per assicurarsi che non ci siano interferenze.

Nei test anticorpali, esiste la possibilità di interferenza degli anticorpi eterofili presenti nei campioni dei pazienti. I pazienti regolarmente a contatto con animali o sottoposti a immunoterapia o a procedure diagnostiche a base di immunoglobuline o frammenti di immunoglobuline possono produrre anticorpi, p.e. HAMA, che interferiscono con gli immunodosaggi.

Tali anticorpi interferenti possono portare a risultati errati. Valutare attentamente i risultati di pazienti che potrebbero presentare questi anticorpi.

# RIA 17 $\alpha$ - Hydroxyprogesterone

**REF** IM1452

## RADIOINMUNOENSAYO PARA LA DETERMINACIÓN IN VITRO DE LA 17 $\alpha$ -HIDROXIPROGESTERONA EN SUERO HUMANO Y PLASMA

Para uso en diagnóstico *in vitro*.

### PRINCIPIO

El radioinmunoensayo de 17  $\alpha$ -Hidroxiprogesterona (17 OH-P) es un ensayo competitivo. El mismo equipo puede ser empleado para la medición de 17 OH-P:

directamente en suero o plasma con EDTA o,

indirectamente, después de la extracción de la muestra con éter y evaporación del solvente, seguido de la resuspensión con el calibrador cero.

Las muestras de suero o plasma, los extractos, el control y los calibradores se incuban con el trazador 125I 17 OH-P en tubos recubiertos con el anticuerpo. Después de la incubación se aspira el contenido de los tubos y estos se lavan para retirar el 17 OH-P marcado con 125I pero no enlazado. Se determina la actividad enlazada mediante un contador gamma. Los valores desconocidos se determinan mediante interpolación con la curva estándar.

### ADVERTENCIAS Y PRECAUCIONES

#### Precauciones generales

- Los viales de los calibradores y controles deben ser abiertos durante el menor tiempo posible, para así evitar evaporaciones excesivas.
- No mezclar los reactivos de lotes diferentes.
- Incluir una curva estándar en cada ensayo.
- Es recomendado realizar el ensayo por duplicado.
- Cada tubo debe estar utilizado solamente una vez.

#### Reglas básicas de seguridad radiológica

La compra, posesión, uso y transferencia de material radiactivo están sujetos de las disposiciones legales del país en el que se utiliza. El cumplimiento de las normas básicas de seguridad radiológica proporciona una protección adecuada.

- No se debe comer, beber, fumar o aplicarse cosméticos en presencia de materiales radiactivos.
- No pipetear las soluciones radiactivas con la boca.
- Evitar cualquier contacto con materiales radiactivos mediante el uso de guantes y bata de laboratorio.
- Toda manipulación de material radiactivo debe realizarse en el lugar adecuado, alejado de corredores y espacios ocupados.
- Los materiales radiactivos deben almacenarse en el contenedor aprobado en una zona especializada.
- Se debe llevar y conservar actualizado un registro de las entradas y almacenamiento de todos los productos radiactivos.
- El equipo y material de vidrio de laboratorio que son objeto de contaminación se deben separar para evitar la contaminación con otros radioisótopos.
- Cada caso de contaminación radiactiva, o de pérdida de materiales radiactivos se debe resolver de acuerdo con los procedimientos establecidos.
- El desecho radiactivo debe manipularse de acuerdo a las reglas establecidas por el país donde se utiliza.

#### Azida sódica

Algunos reactivos contienen azida sódica como conservador. La azida sódica puede reaccionar con el plomo, el cobre y el bronce para formar azidas metálicas explosivas. Deseche los reactivos a través del sistema de drenaje mediante lavado con grandes cantidades de agua.

#### Material de origen humano

Los reactivos de este equipo son de origen humano y fueron negativos a las pruebas de HIV 1, de HIV 2; de HCV, así como de hepatitis B (Hbs Ag). Sin embargo, deben manejarse como si fueran capaces de transmitir enfermedad. Ninguna prueba conocida puede ofrecer la seguridad completa de la ausencia de agentes virulentos. Maneje estos reactivos con todas las precauciones necesarias.

Todas las muestras de suero y plasma deben manejarse como si fueran capaces de transmitir enfermedades (ej. hepatitis o SIDA). Por lo tanto los residuos se deberán eliminar de acuerdo con las reglamentaciones de las agencias autorizadas que tengan jurisdicción sobre el laboratorio, y con las normativas de cada país.

#### Etil éter

El etil éter es un solvente orgánico volátil y muy inflamable. La extracción y evaporación de este deben realizarse bajo una campana de extracción. Evitar cualquier contacto con una llama y no pipetear los reactivos con la boca.

### CLASIFICACIÓN DE MATERIAL PELIGROSO SEGÚN EL SGA

Solución de lavado (20 PELIGRO unidades)



H360

Puede perjudicar a la fertilidad o dañar al feto.

P201

Procurarse las instrucciones antes del uso.

P280

Use guantes, ropa y equipo de protección para los ojos y la cara.

P308+P313

EN CASO DE exposición confirmada o supuesta: consultar a un médico.

Ácido bórico 0,1 - 0,3 %  
Sodio tetraborato decahidrato 0,1 - 0,3 %

#### SDS

La hoja de datos de seguridad está disponible en [techdocs.beckmancoulter.com](http://techdocs.beckmancoulter.com)

### RECOLECCIÓN, PROCESAMIENTO, ALMACENAMIENTO Y DILUCIÓN DE LAS MUESTRAS

- Recoga la sangre en tubos secos ó con EDTA.
- Separar el suero o el plasma de las células mediante centrifugación.
- Las muestras séricas o plasmáticas pueden ser conservadas a 2-8 °C si el ensayo se realiza dentro de las 24 horas. Si se requiere almacenar las muestras durante un periodo mayor, preparar alícuotas para evitar repetidas descongelaciones y congelaciones y almacenar las muestras a < -18 °C, 1 año máximo. El descongelamiento de las muestras debe ser realizado a temperatura ambiente.
- Si las muestras tienen concentraciones más altas que el mayor de los calibradores, éstas deben ser diluidas con el calibrador cero.

Los valores de plasma con EDTA y suero para 30 muestras (valores de suero que van de 0,24 a 1,88 ng/mL) se compararon mediante el kit 17 OH-P RIA. Los resultados son los siguientes:

[Plasma con EDTA] = 0,9026[suero] + 0,0283,

R = 0,9747

### MATERIALES PROPORCIONADOS

Todos los reactivos provistos-sin abrir- son estables entre 2 y 8 °C hasta la fecha de caducidad del equipo, la cual se indica en la etiqueta externa. Las fechas de caducidad impresas sobre las etiquetas de los frascos son válidas sólo para el fabricante, durante su almacenamiento a largo plazo hasta antes del ensamblaje del equipo. No tener en cuenta.

Las condiciones de almacenamiento de los reactivos después de la reconstitución o dilución se indican en el párrafo Procedimiento.

**Tubos recubiertos con anticuerpo Anti-17 OH-P: 2 x 50 tubos** (listos para usar)

**Trazador de 17 $\alpha$ -Hidroxiprogesterona marcado con 125I: 1 frasco de 45 mL** (listo para usar)

El frasco contiene <640 kBq, el día de su elaboración de 17 OH-P marcado con 125I en buffer con proteínas y un colorante.

Nota: La presencia eventual de precipitado en el trazador no tiene influencia sobre la calidad de la determinación.

**Calibradores: 1 vial x 2 mL, 5 viales x 0,5 mL** (listos para usar)

Los viales de calibrador contienen de 0 a alrededor de 50 ng/mL (de 0 a unos 151 nmol/L) de 17 OH-P en suero humano con azida sódica (< 0,1 %). La concentración exacta se indica en la etiqueta de cada vial. Los calibradores se verifican con un estándar de referencia interno.

El calibrador cero (5 mL) puede ser también pedido por separado, cod # B23373.

**Muestras de control: 2 frascos** (liofilizados)

Los viales controles contienen 17 OH-P en suero humano con azida sódica (<0,1 %). El volumen de reconstitución se indica en la etiqueta de cada vial. Los valores esperados se encuentran en el rango de concentración indicado en la hoja suplemento.

**Solución de lavado (20x): un frasco de 50 mL**

La solución concentrada debe diluirse antes de su uso.

## MATERIALES NECESARIOS PERO NO INCLUIDOS

Además del equipo normal de laboratorio se requiere lo siguiente:

Para el ensayo:

- Micropipeta de precisión (25 µL y 400 µL).
- Pipeta semiautomática (25 µL, 400 µL y 2 mL).
- Agitador tipo vórtex.
- Agitador con movimiento de vaivén horizontal y orbital
- Sistema de aspiración.
- Contador gamma calibrado para I<sup>125</sup>.

Para el paso de extracción (opcional):

- Micropipetas de precisión (200 µL).
- Pipetas de vidrio (2,5 mL, 5 mL y 10 mL).
- Viales de vidrio ( desde 6 mL hasta 15 mL).
- Tubos de vidrio para recuperar la fase orgánica.
- Evaporador (tipo speedvac) o baño maría a 37 °C.
- Éter etílico de grado analítico

## PROCEDIMIENTO

### Preparación de los reactivos

Permita que todos los reactivos alcancen la temperatura ambiente.

### Reconstitución de las muestras Controles.

El contenido de los viales se reconstituye con el volumen de agua destilada indicada en la etiqueta. Una vez reconstituido, espere 10 minutos y mezcle suavemente para evitar la formación de espuma antes de dispensar. La solución reconstituida se almacena entre 2-8 °C hasta el vencimiento del kit.

### Preparación de la solución de lavado

Verter el contenido de un frasco en 950 mL de agua destilada y homogeneizar. La solución diluida se puede almacenar entre 2 y 8 °C hasta la fecha de caducidad del equipo.

### Extracción de las muestras (opcional; ver § Limitaciones)

Nota: La extracción debe realizarse en frascos de vidrio limpios o en tubos previamente prelavados con éter

Las muestras deben extraerse solo antes del ensayo. No extraer los calibradores.

- Llevar las muestras a temperatura ambiente y mezclar bien antes de comenzar la extracción
- Numerar un frasco por cada muestra.
- Poner 200 µL de cada muestra en el frasco correspondiente.
- Adicionar 5 mL de etil éter a cada frasco. Tapar cuidadosamente.
- Mezclar vigorosamente los frascos con ayuda del vórtex (2 x 1 minuto).
- Deje los viales en la mesada por un mínimo de 5 minutos.

- Remueva cuidadosamente 2,5 mL de la fase orgánica sin contaminarla con la fase acuosa, en tubos de vidrio, previamente numerados.
- Evapore la fase etérea completamente con el evaporador (p. ej., tipo speedvac) o colocando los tubos en el baño María a 37 °C.

Nota 1: Los tubos deben estar bien fijados a su soporte porque pesan menos al evaporarse el éter y corren el riesgo de flotar.

En esta etapa, tapar los tubos que contengan los extractos secos y almacenarlos de 2 a 8 °C como máximo 7 días antes de continuar con el análisis.

- Re-disolver los extractos de éter secos en 200 µL del calibrador cero. Agite vigorosamente (30 segundos, 2000 rpm), espere 15 minutos, y vortexee nuevamente.

Nota 2: Si se necesita un volumen mayor, en vez de remover 2,5 mL de la fase orgánica, conserve los viales a <-18°C hasta que la fase acuosa se congele, remueva cuidadosamente 5 mL de la fase orgánica sin contaminar con la fase acuosa, evapore y re-disuelva en 400 µL del calibrador cero.

### Procedimiento del inmunoanálisis

Permitir que los reactivos alcancen la temperatura ambiente antes de su uso.

Paso 1 Adiciones	Paso 2 Incubación	Paso 3 Contaje
En los tubos recubiertos de anticuerpos, añadir sucesivamente:  25 µL de calibrador, control, muestra o 50 µL del extracto y 400 µL de trazador,* Mezclar.	Incuba 120 minutos entre 18°C-25°C con agitación (≥ 280 rpm).	Aspirar cuidadosamente el contenido de los tubo (excepto el de los dos tubos de cpm total). Lavar dos veces con 2 mL de solución de lavado. Aspirar.  Cuentas incorporadas cpm (B) y las cpm totales (T) por 1 min.

\*Adicionar 400 µL de trazador a 2 tubos adicionales para obtener las cpm totales

## RESULTADOS

Los resultados se obtienen por interpolación con la curva estándar. La curva sirve para la determinación de las concentraciones de 17 OH-P en las muestras medidas al mismo tiempo que los calibradores.

### Curva estándar

Los resultados del departamento de control de calidad se calcularon usando el ajuste de curva *spline* con  $B/T$  o  $B/B_0$  en el eje logit vertical y la concentración de analitos de los calibradores en el eje logarítmico horizontal (ng/mL).

Otros métodos de reducción de datos pueden dar resultados ligeramente diferentes.

Actividad total: 179 362 cpm				
Calibradores	17OH-P (ng/mL)	cpm (n=3)	B/T (%)	B/B <sub>0</sub> (%)
0	0	55 975	31,21	100,0
1	0,12	44 882	25,02	80,18
2	0,40	31 190	17,39	55,72
3	1,90	12 557	7,00	22,43
4	12,5	2515	1,40	4,49
5	50,0	895	0,50	1,60

(Ejemplo de curva estándar, no utilizar para realizar los cálculos)

### Muestras

Para cada muestra marcar sobre el eje vertical el B/T o el B/B<sub>0</sub> y sobre el eje horizontal marcar la concentración correspondiente de la 17 OH-P.

Para convertir ng/mL en nmol/L, multiplicar los resultados por 3,026.

## VALORES ESPERADOS

Se recomienda que cada laboratorio establezca sus propios valores de referencia. Los valores que se muestran a continuación fueron obtenidos de sujetos sanos y deben de considerarse solo como orientativos.



Adults	N	Mediana	Min.	Max.	2.5	97.5
					Percentil	Percentil
(ng/mL)						
Hombres	55	0,93	0,53	2,22	0,55	1,99
Mujeres						
Fase Folicular	111	0,48	0,13	1,67	0,21	1,45
Fase Lútea	112	1,52	0,42	3,20	0,61	2,88
Pico preovulatorio	22	1,39	0,54	2,04	0,55	2,01
Concepción	30	0,37	0,17	1,48	0,18	1,47
Mujeres despues la menopausia	38	0,38	0,13	0,92	0,16	0,79
1.º trimestre de embarazo	45	2,03	0,78	5,75	0,93	3,82
2.º trimestre de embarazo	44	2,23	0,60	6,86	1,23	3,70

Información detallada acerca de los valores esperados para niños clasificada de acuerdo a la edad y al sexo) puede ser encontrada en la hoja de datos "APPENDICES".

## CONTROL DE CALIDAD

La obtención de óptimos resultados implica que las muestras testigo sean usadas en cada serie de experimentos para asegurar la calidad de los resultados obtenidos. Dichas muestras testigo deben ser procesadas de la misma manera que las muestras a analizar. Es recomendado que los resultados sean analizados utilizando los métodos estadísticos apropiados.

En caso de detectar un deterioro en el emvasado del producto ó que los resultados expresen una alteración en las características del mismo, contactar con el Distribuidor local ó notificar a la dirección de e-mail: [imunochem@beckman.com](mailto:imunochem@beckman.com)

## CARACTERÍSTICAS DEL RENDIMIENTO

(Ver la hoja "APPENDIX" para más detalles)

Se facilitan datos representativos solo a modo de ejemplo. El rendimiento obtenido en los distintos laboratorios puede variar.

### Sensibilidad

Límite de detección (LD): 0,07 ng/mL

El LD para la 17 OH-P es de 0,07 ng/mL, considerado como coherente con las directrices del documento EP17-A2 [1] del CLSI en función de las proporciones de falsos positivos ( $\alpha$ ) inferiores al 5 % y falsos negativos ( $\beta$ ) inferiores al 5 %; usando determinaciones, con 120 muestras en blanco y 120 muestras de bajo nivel; y con límite de blanco (LB) de 0,04 ng/mL.

### Especificidad

El anticuerpo que se usa en el inmunoanálisis es específico para 17 $\alpha$ -hidroxiprogesterona.

### Precisión

#### Repetibilidad y precisión intralaboratorio

Se ha considerado que la precisión del ensayo se ajusta a las directrices del documento EP05-A3 [2] del CLSI. En cuanto a la repetibilidad, los

coeficientes de variación fueron inferiores o iguales al 10,5 % para las muestras de suero. En cuanto a la precisión intralaboratorio, los coeficientes de variación fueron inferiores o iguales al 12,8 % para las muestras de suero.

### Precisión

#### Linealidad

Se ha puesto de manifiesto que el ensayo es lineal de 0,12 a 50,88 ng/mL usando muestras de suero (considerado como coherente con las directrices del documento EP06-A [3] del CLSI).

#### Prueba de dilución

Las muestras de suero de alta concentración se diluyeron en serie con el calibrador cero. Los porcentajes de recuperación fueron del 95,7 % al 119 %.

#### Prueba de recuperación

Las muestras de suero se enriquecieron con cantidades conocidas de 17 OH-P. Los porcentajes de recuperación fueron del 100 % al 119 %.

Rango de medida (desde LD hasta el calibrador más alto):

De 0,07 ng/mL a unos 50 ng/mL

## LIMITACIONES

El no respetar las instrucciones de uso puede afectar significativamente a los resultados.

Los resultados deberán ser interpretados como una ayuda dentro de la situación clínica del paciente, incluyendo la historia clínica, así como los datos provenientes de otras testas adicionales.

Para mayores detalles ver la página de "APPENDICES".

El suero de los niños muy jóvenes (particularmente los de menos de 6 meses) tienen valores elevados de la sulfato de 17 OH-Pregnenolona. Se recomienda en este caso particular, la extracción con éter previo al ensayo de la 17OH-P.

A pesar de tener una baja reactividad cruzada, uno puede observar resultados falsamente elevados de la 17 OH-P durante la toma regular de spironolactona. La terapia con Spironolactona debe ser interrumpida al menos 3 semanas previas al ensayo para asegurarse la ausencia de interferencias.

En los ensayos en los que se utilizan anticuerpos existe la posibilidad de que se produzcan interferencias debido a la presencia de anticuerpos heterófilos en la muestra del paciente. Los pacientes que hayan estado en contacto regularmente con animales o hayan recibido inmunoterapia o procedimientos diagnósticos con inmunoglobulinas o fragmentos de inmunoglobulinas pueden producir anticuerpos, p.ej. HAMA, que interfieren con los inmunoensayos.

Esos anticuerpos que crean interferencias pueden causar resultados erróneos. Evaluar cuidadosamente los resultados de los pacientes que se sospeche que puedan tener esos anticuerpos.

## RIA 17 $\alpha$ - Hydroxyprogesterone

**REF** IM1452

### RADIOIMUNOENSAIO PARA A DETERMINAÇÃO IN VITRO DE 17 $\alpha$ -HIDROXIPROGESTERONA NO SORO E PLASMA HUMANA

Para utilização em diagnóstico *in vitro*.

#### PRINCÍPIO

O radioimunoensaio de 17  $\alpha$ -hidroxiprogesterona (17 OH-P) é um ensaio competitivo. O mesmo kit pode ser utilizado para a medição de 17 OH-P:

quer directamente no soro ou plasma EDTA,

ou, após a extracção da amostra com éter e a evaporação do solvente, seguida de re-suspensão com o calibrador zero.

As amostras de soro ou plasma, os extractos, os controlos e os calibradores são incubados com 17 OH-P marcada com I125, em tubos revestidos com anticorpo. Após o período de incubação segue-se a lavagem e conseqüente remoção do 17 OH-P marcado, com iodo 125, não ligado. De seguida, procede-se à leitura da ligação radioactiva no contador gamma. A curva de calibração é criada e os valores desconhecidos são determinados por interpolação a partir da curva padrão.

#### AVISOS E PRECAUÇÕES

##### Orientações Gerais:

- Os frascos dos calibradores e controlos devem estar abertos durante o menor tempo possível, de forma a evitar evaporação excessiva.
- Não misture os reagentes de kits de diferentes lotes.
- Deve ser estabelecida uma curva padrão em cada ensaio.
- Recomenda-se a realizar o imunoensaio em duplicado.
- Cada tubo deve ser utilizado uma vez.

##### Regras básicas de segurança para radiação

A compra, uso e transferência de material radioactivo estão sujeitos à regulamentação de cada país. A adesão às regras básicas de segurança para a radiação fornecem a protecção adequada:

- Não comer, beber, fumar ou aplicar cosméticos na presença de materiais radioactivos.
- Não pipetar o material radioactivo com a boca.
- Evite qualquer contacto com o material radioactivo utilizando-se luvas e EPI's de laboratório.
- Toda a manipulação de material radioactivo deve ser feita em local apropriado, distante de corredores e locais muito utilizados.
- Materiais radioactivos devem ser armazenados no frasco fornecido e em área designada.
- O registro de recepção e armazenamento de produtos radioactivos devem ser mantidos atualizados.
- Equipamentos laboratoriais e vidrarias que estão sujeitas à contaminação devem ser separados para prevenir a contaminação cruzada de radioisótopos diferentes.
- Cada caso de contaminação ou perda de material radioactivo deve ser efectuada de acordo com os procedimentos estabelecidos.
- Descarte dos reagentes e materiais deve ser de acordo com a regulamentação aplicável.

##### Azida Sódica

Alguns dos reagentes contêm azida sódica como conservante. Azida Sódica reage com chumbo, cobre e mistura de metais formando material de azida explosivo. Descarte os reagentes com uma grande quantidade de água no sistema sanitário.

##### Soro Humano

Os materiais de origem humana, contidos neste kit, foram considerados negativos para a presença de anticorpos para VIH 1 e VIH 2, anticorpos anti-HCV, bem como para o antigénio de superfície da hepatite B (HBsAg). No entanto, devem ser tratados como potencialmente infectantes. Nenhum método de teste conhecido pode oferecer total garantia de que nenhum vírus está presente. Lidar com esse kit com todas as precauções necessárias.

Todas as amostras de soro e plasma devem ser manuseadas como capazes de transmitir hepatite ou HIV, e os resíduos devem ser descartados de acordo com as regras estabelecidas por cada país.

PI-IM1452-07

##### Éter etílico

Éter etílico é um solvente orgânico volátil e muito inflamável. A extracção e evaporação deve ser feita numa hotte ventilada. Evite qualquer contacto com chama e não pipete os reagentes com a boca.

#### CLASSIFICAÇÃO DE PERIGO GHS

Solução de lavagem PERIGO  
(20x)



H360

Pode afetar a fertilidade ou o nascituro.

P201

Pedir instruções específicas antes da utilização.

P280

Use luvas de protecção, vestuário de protecção e protecção ocular/protecção facial.

P308+P313

EM CASO DE exposição ou suspeita de exposição: consulte um médico.

Ácido bórico 0,1 - 0,3%

Borato de sódio

decahidratado 0,1 - 0,3%

**SDS**

A Ficha de dados de segurança está disponível em [techdocs.beckmancoulter.com](http://techdocs.beckmancoulter.com)

#### COLHEITA, PROCESSAMENTO, ARMAZENAMENTO, E DILUIÇÃO DAS AMOSTRAS

- Colher em tubo seco, ou tubos contendo EDTA.
- Separe o soro ou plasma das células por centrifugação.
- As amostras podem ser armazenadas de 2-8 °C, se o ensaio for realizado dentro de 24 horas. Para longos períodos de armazenamento mantenha congelado a < -18 °C (máximo de 1 ano), depois de preparar as alíquotas a fim de evitar ciclos repetidos de descongelamento. O descongelamento das amostras deve ser efectuado à temperatura ambiente.
- Qualquer amostra com valor superior ao calibrador mais alto deve ser diluída com o calibrador zero.

Os valores de soro e plasma EDTA para 30 amostras (amostras de soro de 0,24 a 1,88 ng/mL) foram comparados utilizando o kit de RIA de 17 OH-P. Os resultados são os seguintes:

[Plasma EDTA] = 0,9026[soro] + 0,0283,

R = 0,9747

#### MATERIAIS FORNECIDOS

Todos os reagentes fechados do kit são estáveis até a data de validade apontada no rótulo do kit, quando armazenado de 2-8 °C. As datas de validade impressa nos rótulos são válidas, somente, para armazenamento dos componentes em longo prazo pelo fabricante.

As condições de armazenamento dos reagentes após reconstituição ou diluição são indicadas no parágrafo Procedimento.

**Tubos revestidos com anticorpo Anti- 17OH-P: 2 x 50 tubos** (pronto a usar)

**Marcador de 125I ligado 17 $\alpha$ -Hidroxiprogesterona: um frasco 45 mL** (pronto a usar)

O frasco contém <640 kBq, na data de fabricação, de 125I-ligado a 17-OH-P num tampão com proteínas e corante.

Nota: A presença ocasional de partículas no marcador não afeta o desempenho do ensaio.

**Calibradores: um frasco de 2 mL, cinco frascos de 0,5 mL** (pronto a usar)

Os frascos do calibrador contêm entre 0 e aproximadamente 50 ng/mL (0 e aproximadamente 151 nmol/L) de 17 OH-P em soro humano com azida sódica (<0,1%). A concentração exata está indicada no rótulo de cada frasco.

Os calibradores são verificados relativamente a um padrão de referência interno.

O calibrador zero (5 mL) pode ser adquirido separadamente (cat. # B23373).

**Amostras de controlo: dois frascos** (lío-filizados)

O frasco de controlo contém 17 OH-P em soro humano com azida sódica (<0,1%). O volume para a reconstituição é indicada no rótulo do frasco. Os valores esperados são na gama de concentração indicada num suplemento.

**Solução de Lavagem (20x): um frasco de 50 mL**

Solução concentrada, deve ser diluída antes do uso.

## MATERIAIS NECESSÁRIOS, MAS NÃO FORNECIDOS

Em adição ao material usual de laboratório, é ainda necessário:

Para o ensaio:

- Micropipeta de precisão (25 µL e 400 µL).
- Pipetas Semi-automáticas (25 µL, 400 µL e 2 mL).
- Agitador tipo Vortex
- Agitador capaz.
- Sistema de Aspiração.
- Contador gama ajustado para 125I.

Para a etapa de extração (opcional):

- Micropipeta de precisão (200 µL)
- Pipetas de vidro (2,5 mL, 5 mL, 10 mL).
- Frascos de vidro (a partir de 6 mL a 15 mL).
- Os tubos de vidro para a recuperação da fase éter.
- Evaporador (tipo SpeedVac) ou Banho de água a 37 °C.
- Éter etílico (grau analítico).

## PROCEDIMENTO

### Preparação dos Reagentes

Deixe todos os reagentes atingirem a temperatura ambiente.

### Reconstituição das amostras de controlo

O conteúdo dos frascos é reconstituído com o volume de água destilada indicada no rótulo. Aguarde 10 minutos após a reconstituição e misture com cuidado para evitar a formação de espuma antes de pipetar. Armazenar as soluções reconstituídas a 2-8 °C até a data de validade do kit.

### Preparação de solução de lavagem

Misture o conteúdo do frasco em 950 mL de água destilada e homogeneize. A solução diluída deve ser armazenada entre 2-8 °C até a data validade do kit.

### Extração de amostras (opcional, ver § Limitações)

Nota: A extração deve ser feita em frascos ou tubos de vidro limpos, pré-lavados com éter.

As amostras devem ser extraídas apenas antes do ensaio, não extrair calibradores.

- Colocar as amostras à temperatura ambiente e misturar bem antes de começar a extração.
- Numerar um tubo para cada amostra.
- Colocar 200 µL de cada amostra no tubo correspondente.
- Adicionar 5 mL de éter etílico a cada frasco. Selar o tubo com cuidado.
- Passar os tubos no Vortex vigorosamente (2 x 1 minuto).
- Deixar os tubos em repouso pelo menos 5 minutos.
- Retirar cuidadosamente 2,5 mL da fase orgânica, sem contaminar a fase aquosa e colocar nos tubos de vidro numerados.
- Evapore totalmente a fase etérea através de um evaporador (por exemplo, do tipo speedvac) ou colocando tubos de amostra em banho de água a uma temperatura de 37 °C.

Nota 1: Os tubos devem ser fixados firmemente no suporte, uma vez que após a evaporação do éter, eles serão mais leves e tendem a flutuar.

Nesta fase, é possível tapar os tubos que contêm os extractos secos e armazená-los durante um período máximo de 7 dias no frio (2-8 °C), antes de continuar o ensaio.

- Dissolver éter seco extraído com 200 µL do calibrador zero. Colocar no vortex vigorosamente (30 sec, 2000 rpm), aguardar 15 minutos e voltar a colocar no vortex.

Nota 2: Se um volume maior é necessário, em vez de retirar 2,5 mL de fase orgânica, manter os frascos a <-18° C, até congelar fases aquosa; retirar cuidadosamente 5 mL da fase orgânica, sem contaminar a fase aquosa; evaporar e re-dissolver em 400 µL de calibrador zero.

### Procedimento do Imunoensaio

Deixe todos os reagentes atingir a temperatura ambiente antes da pipetagem.

Passo 1 Pipetagens	Passo 2 Incubação	Passo 3 Contagem
Nos tubos revestidos, adicione sucessivamente:  25 µL do calibrador, controlo, amostra, ou 50 µL do extracto e 400 µL do marcador.* Homogeneize.	Incube 120 minutos a 18-25 °C com agitação (≥280 rpm).	Aspire cuidadosamente o conteúdo dos tubos (exceto os 2 tubos contagem total «total cpm»).  Lavar duas vezes com 2 mL de solução de lavagem. Aspirar.  Proceder à contagem de todos os tubos, durante 1 minuto.

\*Adicione 400 µL do marcador a 2 tubos adicionais para obter "cpm total".

## RESULTADOS

Os resultados são obtidos a partir da curva padrão por interpolação. A curva é utilizada para a determinação da 17 OH-P nas amostras doseadas ao mesmo tempo que os calibradores.

### Curva Padrão

Os resultados do departamento de controlo de qualidade foram calculados utilizando um ajuste de curva *polinomial* com  $B/T$  ou  $B/B_0$  no eixo vertical logarítmico e concentração de analito dos calibradores no eixo horizontal logarítmico (ng/mL).

Outros métodos de redução de dados podem dar resultados ligeiramente diferentes.

Atividade total: 179 362 cpm				
Calibradores	17OH-P (ng/mL)	cpm (n=3)	B/T (%)	B/B <sub>0</sub> (%)
0	0	55 975	31,21	100,0
1	0,12	44 882	25,02	80,18
2	0,40	31 190	17,39	55,72
3	1,90	12 557	7,00	22,43
4	12,5	2515	1,40	4,49
5	50,0	895	0,50	1,60

(Exemplo de curva padrão, não utilize para cálculo)

### Amostras

Para cada amostra, estabeleça a relação B/T ou B/B<sub>0</sub> no eixo vertical da curva padrão e leia a concentração correspondente de 17 OH-P nas amostras no eixo horizontal.

Para converter ng/mL em nmol/L, multiplicar pelo factor 3.026.

## VALORES ESPERADOS

É sugerido que cada laboratório estabeleça seus próprios valores normais. Os seguintes valores obtidos com sujeitos saudáveis são somente indicativos:

Adults	N	Mediana	Min.	Max.	2.5%	97.5%
					percentil	percentil
(ng/mL)						
Homens	55	0,93	0,53	2,22	0,55	1,99
Mulheres						
Fase Folicular	111	0,48	0,13	1,67	0,21	1,45
Fase Lútea	112	1,52	0,42	3,20	0,61	2,88
Pico pré-ovulatório	22	1,39	0,54	2,04	0,55	2,01
Contraceção	30	0,37	0,17	1,48	0,18	1,47
Mulheres após a Menopausa:	38	0,38	0,13	0,92	0,16	0,79
1.º trimestre de gravidez	45	2,03	0,78	5,75	0,93	3,82
2.º trimestre de gravidez	44	2,23	0,60	6,86	1,23	3,70

Pode encontrar informação detalhada sobre os valores esperados nas crianças (de acordo com idade e género) no "APPENDIX".

## CONTROLO DE QUALIDADE

As boas práticas de laboratório recomendam que os controlos sejam feitos regularmente para assegurar a qualidade dos resultados obtidos. As amostras devem ser processadas em simultâneo com os controlos, e os resultados analisados com métodos estatísticos apropriados.

Em caso de deterioração da embalagem ou se o dado obtido mostrar alguma alteração de performance, por favor contacte o distribuidor local ou utilize o seguinte endereço de e-mail: imunochem@beckman.com.

## CARACTERÍSTICAS DE DESEMPENHO

(Para mais detalhes, veja a data sheet "APPENDIX")

São fornecidos dados representativos apenas para fins ilustrativos. O desempenho pode variar de um laboratório para outro.

### Sensibilidade

Limite de deteção (LD): 0,07 ng/mL

O LD para 17 OH-P é de 0,07 ng/mL, determinado como sendo consistente com as diretrizes no documento EP17-A2 do CLSI [1] com base nas proporções de falsos-positivos ( $\alpha$ ) inferiores a 5% e falsos-negativos ( $\beta$ ) inferiores a 5%; utilizando determinações, com 120 amostras em branco e 120 amostras de nível baixo e Limite do Branco (LB) de 0,04 ng/mL.

### Especificidade

O anticorpo utilizado no imunoensaio é específico para 17- $\alpha$ -Hidroxiprogesterona.

### Precisão

#### Repetibilidade e precisão no laboratório

A precisão do ensaio foi determinada como sendo consistente com as diretrizes no documento EP05-A3 do CLSI [2]. Para repetibilidade, foram encontrados coeficientes de variação inferiores ou iguais a 10,5% para

amostras de soro. Para precisão no laboratório, foram encontrados coeficientes de variação inferiores ou iguais a 12,8% para amostras de soro.

### Exactidão

#### Linearidade

O ensaio demonstrou ser linear de 0,12 a 50,88 ng/mL utilizando amostras de soro (determinado como sendo consistente com as diretrizes no documento EP06-A do CLSI [3]).

#### Teste de Diluição

As amostras de soro altamente concentradas foram diluídas em série com o calibrador zero. As percentagens de recuperação variaram entre 95,7% e 119%.

#### Teste de Recuperação

As amostras de soro foram misturadas com quantidades conhecidas de 17 OH-P. As percentagens de recuperação variaram entre 100% e 119%.

#### Intervalo de medição (de LD ao calibrador mais alto):

0,07 ng/mL e aproximadamente 50 ng/mL

## LIMITAÇÕES

O não cumprimento das instruções deste protocolo pode afectar, significativamente, os resultados.

Os resultados devem ser interpretados conjuntamente com a clínica do doente, incluindo história clínica, dados de testes adicionais e outras informações apropriadas.

Para obter mais informações, consulte a ficha de dados «ANEXO».

Crianças muito jovens (em particular com menos de 6 meses de idade) apresentam níveis muito elevados de de 17-OH pregnenolona sulfato. Neste caso particular, a extracção com éter antes do ensaio 17OH-P, é recomendado.

Apesar de reactividade cruzada baixa, pode-se observar níveis falsamente elevados de 17 OH-P após a administração regular de espironolactona. A terapia com espironolactona deve, portanto, ser interrompida, pelo menos, três semanas antes do ensaio para assegurar a ausência de interferência.

Em ensaios que usam anticorpos, há possibilidade de interferência por anticorpos heterófilos nas amostras de doentes. Os doentes expostos regularmente a animais, que receberam imunoterapia ou procedimentos diagnósticos utilizando imunoglobulinas ou fragmentos de imunoglobulinas podem produzir anticorpos, ex. HAMA, que interferem com os imunoensaios.

Tais anticorpos interferentes podem produzir resultados errados. Os resultados de doentes suspeitos de ter estes anticorpos devem ser avaliados com cuidado.

## RIA 17 α - Hydroxyprogesterone

**REF** IM1452

### ΡΑΔΙΟΑΝΟΣΟΕΞΕΤΑΣΗ ΓΙΑ ΤΟΝ IN VITRO ΠΟΣΟΤΙΚΟ ΠΡΟΣΔΙΟΡΙΣΜΟ ΤΗΣ 17α-ΥΔΡΟΞΥΠΡΟΓΕΣΤΕΡΟΝΗ ΣΕ ΑΝΘΡΩΠΙΝΟ ΟΡΟ ΚΑΙ ΠΛΑΣΜΑ

Για διαγνωστική χρήση *in vitro*.

### ΑΡΧΗ ΤΗΣ ΔΙΑΔΙΚΑΣΙΑΣ

Η ανοσοεξέταση της 17α-υδροξυπρογεστερόνης (17 OH-P) είναι εξέταση ανταγωνισμού. Το ίδιο kit μπορεί να χρησιμοποιηθεί για τη μέτρηση της 17 OH-P:

είτε απευθείας στον ορό ή το πλάσμα,

είτε έπειτα από την εκχύλιση του δείγματος με αιθέρα και εξάτμιση του διαλυτικού μέσου.

Τα δείγματα ορού ή πλάσματος, τα εκχυλίσματα, τα δείγματα ελέγχου και τα βαθμονομητές επωάζονται με 17 OH-P επισημασμένο με Iώδιο-125 ως ιχνηθέτη, σε σωληνάρια επιστρωμένα με αντίσωμα. Μετά την επώαση τα σωληνάρια ξεπλένονται, ώστε να απομακρυνθεί το μη δεσμευμένο επισημασμένο με 125I 17 OH-P. Στη συνέχεια η δεσμευμένη ραδιενέργεια μετράται σε gamma counter. Κατασκευάζεται πρότυπη καμπύλη και οι άγνωστες τιμές προσδιορίζονται με παρεμβολή στην καμπύλη αυτή.

### ΠΡΟΕΙΔΟΠΟΙΗΣΗ ΚΑΙ ΠΡΟΦΥΛΑΞΕΙΣ

Γενικές παρατηρήσεις:

- Τα φιαλίδια των ορών βαθμονόμησης και των ορών ελέγχου πρέπει να ανοίγονται όσο το δυνατόν λιγότερο, προς αποφυγήν εξάτμισως του περιεχομένου.
- Μην ανακατεύετε αντιδραστήρια από διαφορετικές παρτίδες.
- Κάνετε ταυτόχρονα την πρότυπη καμπύλη και τον ποσοτικό προσδιορισμό των δειγμάτων.
- Σας συστήνεται να πραγματοποιείτε δύο φορές τον κάθε προσδιορισμό.
- Κάθε σωληνάριο πρέπει να χρησιμοποιηθεί μόνο μια φορά.

### Προστασία από την ιονίζουσα ακτινοβολία

Η αγορά, η κατοχή, η χρήση και η μεταφορά του ραδιενεργού υλικού υπόκεινται στους κανονισμούς της χώρας στην οποία το υλικό αυτό χρησιμοποιείται. Η συμμόρφωση με τους βασικούς κανόνες ασφάλειας από την ακτινοβολία παρέχει επαρκή προστασία.

- Υπό την παρουσία ραδιενεργών υλικών, μην καταναλώνετε τρόφιμα ή ποτά, μην καπνίζετε και μη χρησιμοποιείτε καλλυντικά.
- Μη χρησιμοποιείτε το στόμα για να πιπιετάρτε τα ραδιενεργά υλικά.
- Αποφύγετε κάθε άμεση επαφή με τα ραδιενεργά υλικά, και χρησιμοποιείτε γάντια και εργαστηριακή ποδιά.
- Κάθε χειρισμός ραδιενεργού υλικού πρέπει να γίνεται σε κατάλληλο χώρο, μακριά από διαδρόμους και άλλα πολυσύχναστα μέρη.
- Το αρχείο παραλαβής και αποθήκευσης ραδιενεργών υλικών πρέπει να είναι πάντα ενημερωμένο.
- Το αρχείο παραλαβής και αποθήκευσης ραδιενεργών υλικών πρέπει να είναι πάντα ενημερωμένο.
- Ο εργαστηριακός εξοπλισμός ή τα γυάλινα σκεύη που έχουν μολυνθεί από ραδιενεργά υλικά πρέπει να απομονώνονται, προκειμένου να αποφευχθεί μόλυνση από διαφορετικά ραδιοϊσότοπα.
- Κάθε περίπτωση ραδιενεργής μόλυνσης ή απώλειας ραδιενεργού υλικού θα πρέπει να επιλύεται με βάση τις ισχύουσες διαδικασίες.
- Ο χειρισμός των ραδιενεργών αποβλήτων πρέπει να ακολουθεί τους κανονισμούς της χώρας στην οποία χρησιμοποιείται το ραδιενεργό υλικό.

### Αζίδιο του Νατρίου

Κάποια αντιδραστήρια περιέχουν αζίδιο του Νατρίου ως συντηρητικό. Το αζίδιο του Νατρίου μπορεί να αντιδράσει με το χαλκό ή το μόλυβδο προς το σχηματισμό εκρηκτικών αζιδίων των μετάλλων. Η απόρριψη των αντιδραστηρίων πρέπει να γίνεται μέσα από το υδραυλικό σύστημα, χρησιμοποιώντας μεγάλες ποσότητες νερού.

### Υλικό ανθρώπινης προέλευσης

Τα ανθρώπινης προέλευσης υλικά που περιέχονται στα αντιδραστήρια του kit βρέθηκαν αρνητικά, σε ότι αφορά στα αντισώματα αντι-HIV 1 και HIV 2,

στα αντισώματα HCV και το επιφανειακό αντιγόνο της Ηπατίτιδας Β (HbsAg). Παρόλα αυτά, ο χειρισμός τους πρέπει να γίνεται σαν να ήταν ικανά να μεταδώσουν τις ασθένειες. Δεν υπάρχει κάποια γνωστή μέθοδος ελέγχου που να διασφαλίζει με απόλυτη βεβαιότητα ότι δεν υπάρχει παράγοντας μόλυνσης, γι' αυτόν τον λόγο είναι απαραίτητο να λαμβάνονται προφυλάξεις κατά τη διάρκεια του χειρισμού.

Όλα τα δείγματα ορού και πλάσματος πρέπει να τα χειρίζεστε ως ικανά να μεταδώσουν ηπατίτιδα ή AIDS. Κάθε σωληνάριο πρέπει να χρησιμοποιηθεί μόνο μια φορά.

### Αιθυλαιθέρας

Ο αιθυλαιθέρας είναι ένας πτητικός και ιδιαίτερος εύλεκτος οργανικός διαλύτης. Η εκχύλιση και η εξάτμιση πρέπει να γίνονται σε εξαεριζόμενο απορροφητήρα. Αποφύγετε κάθε επαφή με φλόγα και μην πιπιετάρτε τα αντιδραστήρια με το στόμα.

### ΤΑΞΙΝΟΜΗΣΗ ΕΠΙΚΙΝΔΥΝΟΤΗΤΑΣ ΚΑΤΑ ΠΕΣ

Διάλυμα πλύσης (20X) ΚΙΝΔΥΝΟΣ



H360

P201

P280

P308+P313

Μπορεί να βλάψει τη γονιμότητα ή το έμβρυο. Εφοδιαστείτε με τις ειδικές οδηγίες πριν από τη χρήση. Να φοράτε προστατευτικά γάντια, προστατευτικά ενδύματα και μέσα ατομικής προστασίας για τα μάτια/το πρόσωπο. Σε περίπτωση έκθεσης ή πιθανότητας έκθεσης: συμβουλευθείτε/επισκεφθείτε γιατρό. Βορικό οξύ 0,1 - 0,3% Δεκαένυδρο βορικό νάτριο 0,1 - 0,3%

**SDS**

Το Δελτίο δεδομένων ασφάλειας είναι διαθέσιμο στη διεύθυνση [techdocs.beckmancoulter.com](http://techdocs.beckmancoulter.com)

### ΣΥΛΛΟΓΗ, ΕΠΕΞΕΡΓΑΣΙΑ, ΑΠΟΘΗΚΕΥΣΗ ΚΑΙ ΑΡΑΙΩΣΗ ΤΩΝ ΔΕΙΓΜΑΤΩΝ

- Συλλέξτε το αίμα σε σωληνάρια είτε χωρίς προσθετικά είτε με EDTA.
- Διαχωρίστε τον ορό ή το πλάσμα από τα κύτταρα με φυγοκέντρηση.
- Τα δείγματα ορού ή πλάσματος μπορούν να διατηρηθούν στους 2-8 °C, αν η εξέταση πρόκειται να γίνει μέσα σε 24 ώρες. Για μεγαλύτερο χρονικό διάστημα, διατηρήστε τα κατεψυγμένα (< -18 °C, για 1 χρόνο το πολύ). Η απόψυξη των δειγμάτων πρέπει να γίνει σε θερμοκρασία δωματίου.
- Για την απευθείας διαδικασία, αν τα δείγματα έχουν μεγαλύτερες συγκεντρώσεις από το βαθμονομητής με την υψηλότερη συγκέντρωση, πρέπει να αραιωθούν με τον μηδενικό βαθμονομητή.

Οι τιμές ορού και πλάσματος EDTA για 30 δείγματα (τιμές ορού από 0,24 έως 1,88 ng/mL) συγκρίθηκαν με χρήση του kit RIA 17 OH-P. Τα αποτελέσματα έχουν ως εξής:

[πλάσμα EDTA] = 0,9026 [ορός] + 0,0283,

R = 0,9747

### ΠΑΡΕΧΟΜΕΝΑ ΥΛΙΚΑ

Όλα τα αντιδραστήρια είναι σταθερά μέχρι την ημερομηνία λήξης που αναγράφεται στην ετικέτα του kit, όταν αποθηκεύονται σε θερμοκρασία 2-8 °C. Οι ημερομηνίες λήξης που αναγράφονται στις ετικέτες των φιαλιδίων αφορούν αποκλειστικά στη μακροπρόθεσμη αποθήκευση των αντιδραστηρίων από τον κατασκευαστή, πριν από τη συναρμολόγηση του kit. Να μη λαμβάνονται υπόψη.

Οι συνθήκες αποθήκευσης των αντιδραστηρίων μετά από ανασύσταση ή αραιώση αναφέρονται στην παράγραφο «Διαδικασία».

## Σωληνάρια επιστρωμένα με αντίσωμα κατά της 17 OH-P: 2 x 50 σωληνάρια (έτοιμα προς χρήση)

### 17α-υδροξυπρογεστερόνη επισημασμένη με 125I: 1 φιαλίδιο των 45 mL (έτοιμο προς χρήση).

Το φιαλίδιο περιέχει, την ημέρα που παρασκευάζεται <640 kBq επισημασμένης με Ιώδιο 125 17 OH-P σε ρυθμιστικό διάλυμα που περιέχει πρωτεΐνες και μία χρωστική.

Παρατήρηση: Η τυχόν παρουσίαση ιζήματος εντός ραδιοανίχνευσης δεν επηρεάζει την ποιότητα της ανάλυσης.

### Βαθμονομητές: 1 φυαλίδιο 2 mL, 5 φιαλίδια των 0,5 mL (έτοιμο προς χρήση)

Τα φιαλίδια βαθμονομητή περιέχουν 0 έως περίπου 50 ng/mL (0 έως περίπου 151 nMol/L) 17 OH-P σε ανθρώπινο ορό με αζίδιο του νατρίου (<0,1%). Η ακριβής συγκέντρωση αναγράφεται στην ετικέτα κάθε φιαλιδίου. Οι βαθμονομητές επαληθεύτηκαν βάσει εσωτερικού προτύπου αναφοράς.

Ο μηδενικός βαθμονομητής (5 mL) μπορεί να παραγγελθεί και ξεχωριστά (cat #B23373)

### Δείγματα ελέγχου: 2 φιαλίδια (λυοφιλημένα)

Περιέχει 17OH-P σε ανθρώπινο ορό με αζίδιο του Νατρίου (< 0,1%). Ο όγκος για την ανασύσταση αναγράφεται στο φυαλίδιο. Οι αναμενόμενες τιμές κυμαίνονται μεταξύ των συγκεντρώσεων που αναγράφονται σε συμπληρωματικό φυλλάδιο.

### Διάλυμα πλύσης (20x): ένα φιαλίδιο των 50 mL

Το συμπυκνωμένο διάλυμα πρέπει να αραιωθεί πριν από τη χρήση.

## ΑΠΑΙΤΟΥΜΕΝΑ ΥΛΙΚΑ ΠΟΥ ΔΕΝ ΠΑΡΕΧΟΝΤΑΙ

Ο απαιτούμενος εργαστηριακός εξοπλισμός, επιπλέον του συνήθους, είναι ο εξής:

Για την εξέταση:

- Μικροπιπέτες ακριβείας (25 µL και 400 µL).
- γυάλινη πιπέτα (25 µL, 400 µL, 2 mL).
- Μίξερ τύπου vortex.
- shaker με οριζόντια πλατφόρμα παλινδρόμησης ή με πλατφόρμα ταλάντωσης.
- Σύστημα απόχυσης.
- gamma counter σει για Ιώδιο 125

Για το βήμα εκχύλισης (προαιρετικό):

- μικροπιπέτα ακριβείας (200 µL).
- Γυάλινες πιπέτες (2,5 µL, 5 mL, 10 mL).
- Γυάλινα φιαλίδια με πώματα (από 6 mL μέχρι 15 mL).
- Γυάλινα σωληνάρια των 6 mL για τη φάση ανάκτησης του αιθέρα.
- Εξατμιστήρας (τύπου speedvac) ή υδατόλουτρο 37 °C.
- αναλυτικά βαθμονομημένος αιθυλικός αιθέρας

## ΔΙΑΔΙΚΑΣΙΑ

### Προετοιμασία αντιδραστηρίων

Αφήστε όλα τα αντιδραστήρια να φθάσουν σε ισορροπία σε θερμοκρασία δωματίου.

### Προετοιμασία των ορών ελέγχου

Το περιεχόμενο των φυαλιδίων διαλύεται με τον ογκο απεσταγμένου νερού που αναγράφεται πάνω στη ετικέτα. Περιμένετε 10 λεπτά μετά από την ανασύσταση και ανακατέψτε με προσοχή χωρίς να δημιουργηθεί αφρός, πριν τη διανομή του αντιδραστηρίου στα σωληνάρια. Τα αραιωμένα φυαλίδια μπορούν να διατηρηθούν μέχρι την ημερομηνία λήξης του αντιδραστηρίου στους 2-8 °C.

### Προετοιμασία του διαλύματος πλύσης

Προσθέστε το περιεχόμενο του φυαλιδίου σε 950 mL απεσταγμένου νερού και ομογενοποιήστε. Το αραιωμένο διάλυμα μπορεί να αποθηκευθεί στους 2-8 °C μέχρι την ημερομηνία λήξης του kit.

### Εκχύλιση δειγμάτων (προεραϊκό, βλέπε § ΠΕΡΙΟΡΙΣΜΟΙ)

Σημείωση: Η εκχύλιση πρέπει να γίνει σε καθαρά γυάλινα φυαλίδια ή σωληνάρια.

Τα δείγματα εκχυλίσονται πριν την εκτέλεση; Μην εκχυλίσεται τους βαθμονομητές

- Αφήστε τα δείγματα να φτάσουν σε θερμοκρασία δωματίου και ανακατέψτε καλά πριν αρχίσετε την εκχύλιση
- Αριθμήστε ένα σωληνάριο για κάθε δείγμα.
- Τοποθετήστε 200 µL κάθε δείγματος σε αντίστοιχο φυαλίδιο
- Προσθέστε 5 mL αιθυλαιθέρα σε κάθε φυαλίδιο. Κλείστε προσεκτικά.
- Ανακατέψτε τα σωληνάρια δυνατά στο vortex. (2x1 λεπτό)
- Αφήστε τα δείγματα στο πάγκο για το λιγότερο 5 λεπτά
- Αφαιρέστε προσεκτικά 2,5 mL από την οργανική φάση χωρίς να την μολύνετε με υγρή φάση και τοποθετήστε σε αριθμημένα γυάλινα σωληνάρια.
- Εξατμίστε εντελώς τη φάση του αιθέρα με οποιονδήποτε εξατμιστή (π.χ. τύπου speedvac) ή τοποθετώντας σωληνάρια σε υδατόλουτρο θερμοκρασίας 37 °C.

Σημείωση 1: τα σωληνάρια πρέπει να είναι σφικτά δεμένα σε υποδοχέα δοκιμαστικών σωληναρίων, γιατί μετά από την εξατμίση του αιθέρα, θα είναι ελαφρύτερα και θα τείνουν να επιπλεύσουν.

Σε αυτή τη φάση είναι δυνατό να πωματίστε τα σωληνάρια που περιέχουν τα ξηρά εκχυλίσματα και να τα αποθηκεύσετε μέχρι 7 ημέρες στην ψύξη (2-8 °C) πριν συνεχίσετε την εξέταση.

- Επαναδιαλύστε τα στεγνά εκχυλίσματα αιθέρα σε 200 µL του μηδενικού βαθμονομητή. Ανακατέψτε δυνατά στο vortex (30 sec, 2000 rpm). Περιμένετε 15 λεπτά και ξαναανακατέψτε στο vortex.

Σημείωση 2: εάν μεγαλύτερος όγκος χρειάζεται, αντί να πάρετε 2,5 mL της οργανικής φάσης, κρατήστε τα φυαλίδια <-18 °C μέχρι η υγρή φάση να παγώσει, πάρτε 5 mL της οργανικής φάσης χωρίς να την μολύνετε με την υγρή φάση, και επαναδιαλύστε την σε 400 µL του μηδενικού βαθμονομητή.

### Διαδικασία ανοσοεξέτασης

Αφήστε τα αντιδραστήρια να φτάσουν σε ισορροπία σε θερμοκρασία δωματίου πριν από τη χρήση.

Βήμα 1 Προσθήκες	Βήμα 2 Επώαση	Βήμα 3 Μέτρηση
Στα επιστρωμένα σωληνάρια προσθέστε διαδοχικά:  25 µL βαθμονομητές, ορού ελέγχου, δείγματος ή 50 µL εκχυλίσματος και 400 µL ιχνηθέτη* Ανακατέψτε.	Επώαση 120 λεπτά στους 18-25 °C σε ανακίνηση (≥280 rpm)	Αποχύστε προσεκτικά το περιεχόμενο των σωληναρίων (εκτός από τα 2 σωληνάρια «ολικές κρούσεις»). Πλύντε 2 φορές με 2 mL διαλύματος πλύσης. Αποχύστε.  Μετρήστε τη ραδιενέργεια των δεσμευμένων (B) και ολικών (T) κρούσεων Για 1 λεπτό.

\*Προσθέστε 400 µL ιχνηθέτη σε 2 επιπλέον σωληνάρια για να υπολογίσετε τις ολικές κρούσεις.

## ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ

Τα αποτελέσματα των δειγμάτων υπολογίζονται με παρεμβολή στην πρότυπη καμπύλη. Η καμπύλη χρησιμοποιείται για τον προσδιορισμό των συγκεντρώσεων 17 OH-P σε δείγματα που μετρώνται ταυτόχρονα με τα βαθμονομητές.

### Πρότυπη καμπύλη

Τα αποτελέσματα στο τμήμα ποιοτικού ελέγχου υπολογίστηκαν με τη χρήση της καμπύλης προσαρμογής μοντέλου *spline* με τον λόγο  $B/T$  ή  $B/B_0$  στον κάθετο άξονα  $\log_{10}$  και τη συγκέντρωση της αναλυόμενης ουσίας των βαθμονομητών στον οριζόντιο λογαριθμικό άξονα (ng/mL).

Άλλες μέθοδοι αναγωγής των δεδομένων μπορεί να δώσουν ελαφρώς διαφορετικά αποτελέσματα.

Συνολική δραστηριότητα: 179.362 cpm				
Βαθμονομητές	17OH-P (ng/mL)	cpm (n=3)	B/T (%)	B/B <sub>0</sub> (%)
0	0	55.975	31,21	100,0
1	0,12	44.882	25,02	80,18
2	0,40	31.190	17,39	55,72
3	1,90	12.557	7,00	22,43
4	12,5	2.515	1,40	4,49
5	50,0	895	0,50	1,60

(Παράδειγμα τυπικής καμπύλης, μην την χρησιμοποιείτε για υπολογισμούς)

#### Δείγματα

Για κάθε δείγμα, σημειώστε τον λόγο B/T ή B/B<sub>0</sub> στον κάθετο άξονα, έπειτα το αντίστοιχο σημείο στην πρότυπη καμπύλη και διαβάστε στον οριζόντιο άξονα την αντίστοιχη συγκέντρωση της 17 OH-P του δείγματος.

Για να μετατρέψετε τις συγκεντρώσεις από ng/mL σε nmol/L, πολλαπλασιάστε τα αποτελέσματα με το 3,026.

### ΑΝΑΜΕΝΟΜΕΝΕΣ ΤΙΜΕΣ

Προτείνουμε το κάθε εργαστήριο να καθιερώνει τις δικές τους τιμές αναφοράς. Οι τιμές που ακολουθούν και που προέκυψαν από υγιή άτομα είναι απλώς ενδεικτικές.

Adults	N	Διάμεσος	Min.	Max.	2.5% ποσοστό	97.5% ποσοστό
(ng/mL)						
Άνδρες	55	0,93	0,53	2,22	0,55	1,99
Γυναίκες						
θυλακιδώδης φάση	111	0,48	0,13	1,67	0,21	1,45
Ωχρινική φάση	112	1,52	0,42	3,20	0,61	2,88
Ωοθυλακιόρρηξη	22	1,39	0,54	2,04	0,55	2,01
Αντισύλληψη	30	0,37	0,17	1,48	0,18	1,47
Γυναίκες μετά την εμμηνόπαυση	38	0,38	0,13	0,92	0,16	0,79
1 <sup>ο</sup> τρίμηνο εγκυμοσύνης	45	2,03	0,78	5,75	0,93	3,82
2 <sup>ο</sup> τρίμηνο εγκυμοσύνης	44	2,23	0,60	6,86	1,23	3,70

Λεπτομερής περιγραφή πληροφοριών σχετικά με τις αναμενόμενες τιμές για παιδιά (ανά ηλικία και φύλο), παραθέτονται στο φύλλο "APPENDIX".

### ΕΛΕΓΧΟΣ ΠΟΙΟΤΗΤΑΣ

Η σωστή εργαστηριακή πρακτική προϋποθέτει την τακτική χρήση δειγμάτων ελέγχου, προκειμένου να διασφαλίζεται η ποιότητα των αποτελεσμάτων. Η επεξεργασία των δειγμάτων αυτών πρέπει να γίνεται με τον ίδιο τρόπο με τον οποίο γίνεται η επεξεργασία των άγνωστων δειγμάτων. Επιπλέον, συστήνεται η ανάλυση των αποτελεσμάτων τους να γίνεται με τη βοήθεια των κατάλληλων στατιστικών μεθόδων.

Σε περίπτωση επιδείνωσης συσκευασίας ή εάν τα αποτελέσματα που προέκυψαν έχουν τροποποίηση απόδοσης, παρακαλούμε ελάτε σε επαφή με τον τοπικό διανομέα σας ή χρησιμοποιήστε την ακόλουθη διεύθυνση ηλεκτρονικού ταχυδρομείου: [imunochem@beckman.com](mailto:imunochem@beckman.com)

### ΧΑΡΑΚΤΗΡΙΣΤΙΚΑ ΑΠΟΔΟΣΗΣ

(βλέπε τη σελίδα "APPENDIX" για περισσότερες λεπτομέρειες)

Τα αντιπροσωπευτικά δεδομένα παρέχονται μόνο ως παράδειγμα.

Η απόδοση που επιτυγχάνεται σε κάθε εργαστήριο μπορεί να διαφέρει.

#### Ευαισθησία

**Όριο Ανίχνευσης (OA):** 0,07 ng/mL

Το OA για τη 17 OH-P είναι 0,07 ng/mL, τιμή που βρέθηκε σύμφωνη με τις κατευθυντήριες οδηγίες του εγγράφου EP17-A2 [1] του CLSI βάσει των

αναλογιών ψευδώς θετικών (α) κάτω του 5% και ψευδώς αρνητικών (β) κάτω του 5%. Έχει τεκμηριωθεί με χρήση προσδιορισμών με 120 τυφλά δείγματα, 120 δείγματα χαμηλού επιπέδου. Το Όριο Τυφλού (OT) είναι 0,04 ng/mL.

#### Εξειδίκευση

Το αντίσωμα που χρησιμοποιείται στον ανοσοπροσδιορισμό είναι ειδικό για τη 17-α-υδροξυπρογεστερόνη.

#### Ακρίβεια

##### Επαναληψιμότητα και ενδοεργαστηριακή ακρίβεια

Η ακρίβεια της ανάλυσης βρέθηκε σύμφωνη με τις κατευθυντήριες οδηγίες του εγγράφου EP05-A3 [2] του CLSI. Ως προς την επαναληψιμότητα, οι συντελεστές μεταβλητότητας βρέθηκαν να είναι χαμηλότεροι ή ίσοι με 10,5% για τα δείγματα ορού. Ως προς την ενδοεργαστηριακή ακρίβεια, οι συντελεστές μεταβλητότητας βρέθηκαν να είναι χαμηλότεροι ή ίσοι με 12,8% για τα δείγματα ορού.

#### Ακρίβεια

##### Γραμμικότητα

Η ανάλυση αποδείχθηκε γραμμική από 0,12 έως 50,88 ng/mL με χρήση δειγμάτων ορού (τιμή σύμφωνη με τις κατευθυντήριες οδηγίες του εγγράφου EP06-A [3] του CLSI).

#### Δοκιμή αραιώσεως

Τα δείγματα ορού υψηλής συγκέντρωσης αραιώθηκαν διαδοχικά με μηδενικό βαθμονομητή. Τα ποσοστά ανάκτησης κυμάνθηκαν από 95,7% έως 119%.

#### Δοκιμή ανάκτησης

Τα δείγματα ορού ενισχύθηκαν με γνωστές ποσότητες 17 OH-P. Τα ποσοστά ανάκτησης κυμάνθηκαν από 100% έως 119%.

#### Εύρος μέτρησης (από το OA έως τον υψηλότερο βαθμονομητή):

0,07 ng/mL έως περίπου 50 ng/mL

### ΠΕΡΙΟΡΙΣΜΟΙ

Η μή τήρηση των οδηγιών που περιέχονται στο έντυπο μπορεί να επηρεάσει σημαντικά τα αποτελέσματα.

Τα αποτελέσματα πρέπει να ερμηνευθούν λαμβάνοντας υπόψη τη συνολική κλινική παρουσίαση της ασθενούς, συμπεριλαμβανομένων της κλινικής ιστορίας, των δεδομένων από συμπληρωματικές εξετάσεις και άλλων κατάλληλων πληροφοριών.

βλέπε τη σελίδα APPENDIX για περισσότερες λεπτομέρειες.

Πολύ μικρά παιδιά (ιδιαίτερως όσα είναι μικρότερα των 6 μηνών) έχουν πολύ υψηλά επίπεδα 17 OH-θειικής πρεγνενολόνης. Σε αυτή την ιδιαίτερη περίπτωση, συνιστάται η εκχύλιση με αιθέρα πριν από 17 OH-P εξέταση.

Παρά χαμηλή διασταυρωτή αντιδραστικότητα, μπορεί να παρατηρηθεί ψευδώς υψηλών επιπέδων 17 OH-P μετά την κανονική χορήγηση σπειρονολακτονής. Η θεραπεία σπειρονολακτονής πρέπει επομένως να διακοπεί τουλάχιστον τρεις εβδομάδες πριν από την εξέταση για να εξασφαλιστεί η απουσία παρεμβολής.

Για προσδιορισμούς που χρησιμοποιούν αντισώματα, υπάρχει πιθανότητα παρεμβολής από ετερόφιλα αντισώματα στο δείγμα του ασθενούς. Οι ασθενείς που ήρθαν σε συχνή επαφή με ζώα ή έκαναν ανοσοθεραπεία ή διαγνωστικές επεμβάσεις με τη βοήθεια ανοσοσφαιρινών ή τμήματα ανοσοσφαιρίνης πιθανόν να παραγάγουν αντισώματα, π.χ. HAMA, που παρεμβάλλουν στους ανοσοπροσδιορισμούς.

Τα εν λόγω παρεμβάλλοντα αντισώματα πιθανόν να προκαλέσουν εσφαλμένα αποτελέσματα. Να αξιολογείτε προσεκτικά τα αποτελέσματα ασθενών που υποπτεύεστε ότι φέρουν αυτά τα αντισώματα.



## 使用放射性免疫分析法对人体血清或血浆内17 $\alpha$ -羟孕酮的浓度进行体外测定 用于体外诊断

SDS 化学品安全技术说明书见 techdocs.beckmancoulter.com

### 检验原理

17 $\alpha$ -羟孕酮 (17羟孕酮) 的放射免疫分析是一种竞争分析法。相同的试剂盒可用于17 $\alpha$ 羟孕酮的测量：

直接在血清或EDTA血浆里。

或试样用乙醚提取且溶剂脱水后，通过零号标准品重新悬浮。

血清或血浆试样，提取物、控制试样和校准试样都使用125I标记的17 $\alpha$ 羟孕酮作为示踪剂在抗体涂层的试管内进行培育。培育完成后，吸出管内溶液并测量结合放射性。建立校准曲线，未知值通过标准曲线的插值法来确定。

### 警告和注意事项

#### 总论：

- 每瓶的校正液和对照液应儘快打開以免過度揮發。
- 不能将不同批次的试剂盒内的试剂混合在一起。
- 每次测定分析时都要建立标准曲线。
- 建议做两次免疫测定。
- 每支试管仅用一次。

#### 放射性安全的基本规则

对放射性物质的购买、拥有、使用和转移要依照使用国家的规定。辐射安全基本规则应提供足够的保障：

- 在放射性物質的使用區域中，不可吃東西、喝飲料、抽煙或使用化妝品
- 不要用嘴吸取放射性溶液。
- 当与放射性物质接触时，要使用手套和实验室工作服。
- 所有针对放射性物质的操作都应当在适当的场所进行，要远离走廊和其它人多的地方。
- 放射性物质应贮存在指定的容器里，并指定地方存放。
- 放射性产品的接收和储存记录应随时更新。
- 有可能受到污染的实验室设备及玻璃器皿应加以分开，避免造成不同放射性同位素间的交叉污染。
- 所有放射性污染或放射性物质遗失案例均应按照既定程序来处理。
- 放射性废弃物应遵照使用地所在国家/地区的既定法规进行处置。

#### 叠氮化钠

有些试剂中含有作为防腐剂的叠氮化钠。叠氮化钠可与铅、铜或黄铜反应产生爆炸性金属叠氮化物。对试剂的清除处理要通过卫生管道系统使用大量的水冲洗。

#### 人源材料

试剂中所含的人源材料经过检测，未发现含有HIV1，HIV2抗体，HCV抗体以及乙肝表面抗原 (HBsAg)。然而在处理这些试剂时，要按照含有疾病传染源的标准进行。没有检测程序能够确保试样不含任何病毒，所以在使用这些试剂时要采取必要的安全措施。

所有血清试样应加以处理以防止肝炎或艾滋病的传播，而且废弃的试样也要按照国家的规定做好处理。

#### 乙醚

乙醚是一种挥发性的易燃有机溶剂。对它的提取和蒸发必须要在通风罩内进行。避免与火焰接触，不要用嘴吸取试剂。

### GHS 危险等级分类

20 倍清洗液

危险



H360

可能对生殖能力或胎儿造成伤害。

P201

使用前取得专用说明。

P280

戴防护手套、穿防护服、戴防护眼罩/面具。

### 样本采集、处理、存放和稀释

- 用于试管或含有EDTA的试管来采集血样。
- 使用离心法将血清与血细胞分离开来。
- 如果对血清和血浆试样的测定将在24小时内完成，就可以在2-8°C温度范围内进行贮存。如要长期贮存，应在< -18°C (1年) 的温度条件下将它们冷冻贮存。为了避免反复冻融，建议准备几份等份试样。试样重新溶解时应该在室温下进行。
- 如果试样的浓度高于最高校准试样浓度，需要使用零号标准品进行稀释。

使用 17 OH-P RIA 试剂盒比较 30 份样本 (血清值范围为 0.24-1.88 ng/mL) 的血清和 EDTA 血浆值。结果如下：

[EDTA-血浆] = 0.9026 [血清] + 0.0283，

R = 0.9747

### 提供的材料

该试剂盒内所有试剂，如果是在2-8°C温度范围贮存，在试剂盒标签上的有效期限到期之前，其性能都是稳定的。小瓶上的有效期适用于制造商对试剂的长期储存，不要以之为准。

有关试剂经复溶或稀释后的储存条件，请参阅“流程”段落。

**抗17 $\alpha$ 羟孕酮抗体涂层的试管：2套，每套50只 (备用)**

**125I标记的17 $\alpha$ -羟孕酮：1小瓶，45mL (备用)**

该试剂在生产的时候，含有放射性为640kBq的125I标记的17 $\alpha$ 羟基孕酮，且内含蛋白质和一种染料。

注意：标记物中偶尔出现的凝结颗粒不会对试剂盒的性能表现造成影响。

**校准试样：1瓶2 mL，5瓶每瓶0.5 mL (备用)**

校准品小瓶含有添加在人血清中的 0 到约 50 ng/mL (0 到约 151 nmol/L) 的 17 OH-P 和叠氮化钠 (< 0.1%)。每个试剂瓶标签上都标明了准确的浓度。校准品经验证可作为内部参考标准。

零号标准品 (5mL装) 可以分开订购，试剂编号为B23373

**对照血清：2瓶(冷凍乾燥品)**

质控品小瓶中装有含17 $\alpha$ 羟孕酮的人血清，还含有叠氮化钠 (< 0.1%)。重新溶解所需要的添加的液体体积见试剂瓶上的标注。质控品的预期值范围将在随带的文件中写明。

**洗涤液 (20x)：1小瓶，每瓶50毫升**

浓溶液在使用前必须稀释。

### 所需但未提供的材料

除了标准的实验室设备外，以下物品是必须的：

用于测定分析：

- 精密的微量吸管 (25  $\mu$ L和400 $\mu$ L)
- 半自动吸管 (25  $\mu$ L, 400  $\mu$ L 和 2 mL)
- 涡旋混匀器。
- 振荡器 ( $\geq$ 280rpm)
- 抽吸系统
- 適用<sup>125</sup>I的迦瑪計數器

用于提取程序 (可选择)：

- 精密的微量吸管 (200 $\mu$ L)
- 玻璃吸管 (2.5 mL, 5mL, 10mL)
- 玻璃试管 (从6mL到15mL)
- 的耐热玻璃管，用于回收乙醚。
- 蒸发器 (真空离心蒸发浓缩型) 或37°C的水浴。
- 分析级乙醚

## 方法

### 试剂的准备

让所有试剂达到室温温度。

### 控制试样的复原稀释

按照标签上标明的体积加入蒸馏水重新溶解质控样本。等待10分钟轻轻摇晃混合均匀，以避免产生泡沫。重新溶解后的液体可以在2-8°C的条件下储存到有效期满。

### 洗涤液的制备

向试剂瓶的溶液里倒入950毫升的蒸馏水并使其混合均匀。在试剂盒的有效期到期之前，此稀释溶液可在2-8°C的温度范围内贮存。

### 提取样本（选做，见限制条件章节）

注意：提取操作必须在干净的玻璃容器中进行。使用乙醚预漂洗。

试样仅在测定前提取；不要提取校准试样。

- 开始提取前，让试样回到室温并充分混合。
- 每种试样使用一小瓶。
- 每种试样取200微升，放进相应试剂瓶。
- 向每个试剂瓶加入5毫升乙醚。小心用塞子塞住。
- 用力涡旋试剂瓶（1分钟，2次）。
- 将容器静止在桌子上5分钟
- 小心取出2.5 mL有机相，避免水相污染，放入编号的玻璃管中。
- 用蒸发器（例如 speedvac 型号）或将管放入37°C水浴中完全蒸发醚相。

注意1：试管必须稳固地放在试管架上，乙醚蒸发后，它们变得更轻并容易漂浮起来。

用塞子塞住含有干性提取物的试管，在继续测定之前可以将其冷藏贮存（2-8°C）7天。

- 用200微升的零号标准品再溶解干乙醚提取物。用力涡旋（30秒，2000rpm）等待15分钟，再涡旋一次。

注意2：如果需要更多的样本，可以不采用上面的办法，将试管在-18°C条件下冷冻，彻底冻结水相。小心取出5mL的有机相避免沾染上水相。蒸发并用400uL零号标准品重新溶解。

### 免疫测定程序

在加样前让所有试剂恢复到室温

第一步： 添加	第二步： 培育	第三步： 计算
向抗体涂覆的试管内先后成功地加入：  25uL的标准品、控制试样或测定样本，或50uL的提取样本和400uL示踪剂。 充分混合。	在18-25°C环境下温育120分钟振动（≥280rpm）	小心抽吸试管内溶液（除了2支试管«每分钟总计数»） 使用2mL清洗液清洗2次  每分钟计数和每分钟总计数，进行1分钟

\*将400uL示踪剂添加到另外的2支试管内，以获取每分钟总计数

## 结果

通过插值标准曲线获取测定结果。试样中17羟孕酮浓度的测定所用到的曲线分析与校准试样同时进行。

### 标准曲线

质量控制部门的测定结果是根据对数几率纵轴上与B/T或B/B<sub>0</sub>拟合的样条曲线以及对数横轴上校准品的分析物浓度（ng/mL）计算得出。

利用其他资料缩减的统计方法所得到的结果可能会稍微不同。

活动总数：179,362 cpm				
校准品	17羟孕酮（纳克/毫升）	cpm (3次)	B/T (%)	B/B <sub>0</sub> (%)
0	0	55,975	31.21	100.0
1	0.12	44,882	25.02	80.18
2	0.40	31,190	17.39	55.72
3	1.90	12,557	7.00	22.43
4	12.5	2,515	1.40	4.49
5	50.0	895	0.50	1.60

(标准曲线范例，请勿用此进行计算)

### 试样

在标准曲线的纵轴上读取每种试样的B/T值或B/B<sub>0</sub>值，并从横轴上读出试样的相应17羟孕酮浓度值。

要想将ng/mL转换成nmol/L单位，只要将ng/mL的单位值乘以3.026即可。

## 预计值

建议各个实验室应确立自己的标准数值范围。以下是通过对健康人的测定获取的结果，仅供参考。

Adults	N	中值	Min.	Max.	2.5% 百分比	97.5% 百分比
		(ng/mL)				
男	55	0.93	0.53	2.22	0.55	1.99
女						
卵泡期	111	0.48	0.13	1.67	0.21	1.45
黄体期	112	1.52	0.42	3.20	0.61	2.88
Preovulatory peak	22	1.39	0.54	2.04	0.55	2.01
避孕	30	0.37	0.17	1.48	0.18	1.47
绝经后的女性	38	0.38	0.13	0.92	0.16	0.79
妊娠早期	45	2.03	0.78	5.75	0.93	3.82
妊娠中期	44	2.23	0.60	6.86	1.23	3.70

儿童预期值的详细信息（按年龄和性别分类）可以从“附录”的数据表中查到。

## 质量控制

最佳实验室管理规范暗示控制试样必须定期使用，以确保获取良好质量结果。这些试样的操作程序要与测定试样完全一致，建议运用合适的统计方法对其结果进行分析。

如果包装损坏了或获取的数据显示其性能上存在变化，请与当地经销商联系或通过邮件imunochem@beckman.com联系。

## 性能特征

(更多详情，参见“附录”一览表)

典型的数据结果仅作为一个例证提供给大家。各个实验室测得的性能表现可能会有所不同。

### 灵敏度

检测限 (LoD) : 0.07 ng/mL

17 OH-P 的 LoD 为 0.07 ng/mL，依据如下条件，该值与 CLSI 文档 EP17-A2 [1] 指南一致：假阳性 (α) 小于 5% 和假阴性 (β) 小于 5% 的比例；使用 120 份空白和 120 份低水平样本的测量值；以及 0.04 ng/mL 的空白检测限 (LoB)。

### 特异性

免疫分析中使用的抗体对 17-α-羟孕酮具有特异性。

### 精确性

#### 重复性和实验室内精确度

测定的精确度与 CLSI 文档 EP05-A3 [2] 指南一致。对于重复性，血清样本的变异系数低于或等于 10.5%。对于实验室内精确度，血清样本的变异系数低于或等于 12.8%。

### 准确性

#### 线性度

使用血清样本证实该测定在 0.12-50.88 ng/mL 范围内呈线性（与 CLSI 文档 EP06-A [3] 指南一致）。

### 稀释试验

用零校准品连续稀释高浓度血清样本。百分比测定值为 95.7%-119%。

### 回收试验

将已知量的 17 OH-P 掺入血清样本。百分比测定值为 100%-119%。

**测量范围** (从 LoD 到最高校准品) :

0.07 ng/mL 至约 50 ng/mL

## 限制

如果不按照此包装说明书里的说明进行, 这将可能对结果产生重大影响。

在解读测验结果时, 应当全面地考虑患者的临床表现, 包括他的病史, 别的项目的检测报告或其它适当的信息。

更多详情请参见技术说明书“附录”。

幼婴 (尤其是不到6个月大的幼婴) 体内含有很高浓度的17 OH-孕烯醇酮硫酸盐。在这种情况下, 在对17羟孕酮测定之前, 建议使用乙醚萃取。

尽管交叉反应性较低, 在定期服用安体舒通 (螺内酯) 后, 可以观察到17羟孕酮的浓度异常偏高。因此在测定之前, 安体舒通疗法必须最少中断三个星期以确保没有干扰。

因测定时使用抗体, 病人样体里可能会存在异嗜性抗体干扰。病人过去经常接触动物或接受过疫苗或诊疗, 而这些疫苗或诊疗用上了可能产生抗体的免疫球蛋白或免疫球蛋白碎片 (像: 抗小鼠抗体), 这将会给免疫测定带来干扰。

此类具有干扰性的抗体可能会引起结果的错误。需对被怀疑带有此类抗体病人的结果进行仔细的核查。

## RIA 17 $\alpha$ - Hydroxyprogesterone

**REF** IM1452

### RINKINYS RADIOIMUNINIAM 17 $\alpha$ -OH-P NUSTATYMU I VITRO ŽMOGAUS KRAUJO SERUME IR PLAZMOJE Diagnostikai *in vitro*.

#### PRINCIPAS

Radioimuninis 17alfa-hidroksiprogesterono (17 OH-P) nustatymas priskiriamas prie konkurencinių tyrimų tipų. Rinkinys gali būti naudojamas 17 OH-P nustatyti dviem būdais:

tiesiogiai kraujo serumo ar etilendiamintetraacto (EDTA) plazmoje, arba po mėginių ekstrahavimo eteriu, tirpiklio išgaravimo ir sausų ekstraktų ištirpinimo nuliniame kalibratoriuje.

Tiriami kraujo serumo ar plazmos pavyzdžiai, ištirpinti eteriniai ekstraktai, kontroliniai ir kalibravimo mėginiai inkubuojami su 125I-17 OH-P mėgintuvėliuose, padengtuose antikūniais. Inkubavimui pasibaigus mėgintuvėliuose esantis skystis nukošiamas, praplaunami nesurišti pažymėti 17 OH-P ir matuojamas 125 I surištas radioaktyvumas. Nubraižoma kalibravimo kreivė, o nežinomi dydžiai yra nustatomi interpoliuojant pagrindinę kreivę.

#### ĮSPĖJIMAI IR ATSARGUMO PRIEMONĖS

##### Bendros pastabos:

- Buteliukus su kalibravimo ir kontroliniais mėginiais laikyti atidarytus minimalų laiko tarpą, kad neišgaruotų skystis.
- Nemaišyk skirtingų rinkinių partijų reagentus.
- Standartinė kreivė turi būti nustatyta kiekvienam tyrimui.
- Tyrimą siūloma atlikti naudojant dublikatus.
- Kiekvienas mėgintuvėlis turi būti panaudotas tik vieną kartą.

##### Pagrindinės radiacinės saugos taisyklės

Įsigyjant, naudojant ir gabenant radioaktyvias medžiagas būtina laikytis toje šalyje nustatytų radiacinio saugumo normų ir darbo su radioaktyviomis medžiagomis sanitarinių taisyklių. Laboratorijose draudžiama valgyti, gerti, rūkyti, naudoti kosmetiką.

- Šalia radioaktyviųjų medžiagų negalima valgyti, gerti, rūkyti ar taikyti kosmetikos priemonės
- Negalima pipetuoti radioaktyviųjų tirpalų burna.
- Venkite bet kokio kontakto su radioaktyviomis medžiagomis, mūvėdami pirštineis ir vilkėdami laboratorinius chalatus.
- Visos manipuliacijos su radioaktyviomis medžiagomis turi būti vykdomos tinkamoje vietoje, toli nuo koridorių ir kitų judrių vietų.
- Radioaktyvios medžiagos turi būti saugomos konteineryje tam skirtoje vietoje.
- Turi būti vedama savalaikė visų radioaktyviųjų produktų gavimo ir saugojimo registracija.
- Laboratorinė įranga ir stikliniai indai, kurie gali būti užteršti, turėtų būti atskirti, siekiant išvengti kryžminio užteršimo skirtingais radioizotopais.
- Kiekvienas radioaktyvaus užteršimo ar radioaktyvios medžiagos praradimo atvejis turi būti tvarkomas pagal nustatytas procedūras.
- Radioaktyvios atliekos turi būti tvarkomos pagal šalyje nustatytas taisykles.

##### Natrio azidas

Kai kuriuose rinkinio komponentuose yra natrio azido, atliekančio konservanto vaidmenį. Reaguodamas su švinu, variu arba žalvariu, natrio azidas sudaro sprogstamus metalų azidus. Apdorotus reagentus reikia atskiesti dideliu vandentiekio vandens kiekiu, po to juos galima nupilti į kanalizaciją.

##### Žmogaus kilmės medžiagos

Žmogaus kilmės medžiagos, kurių yra rinkinio komponentų sudėtyje, neturi HIV 1, HIV 2, HCV antikūnių ir hepatito B (HBsAg) paviršinio antigeno antikūnių. Tačiau nė vienas šiuolaikinės analizės metodas negali garantuoti, kad tiriamojoje medžiagoje nėra infekcinių agentų. Todėl dirbant su rinkinio komponentais būtina laikytis saugumo priemonių.

Su visais serumo ir plazmos mėginiais elgėtis kaip su galinčiais perduoti hepatitą ar AIDS atliekos turi būti pašalinamos, vadovaujantis valstybės nustatyta tvarka.

PI-IM1452-07

##### Etilo eteris

Etilo eteris labai lakus ir degus. Eterio ekstrakciją ir garinimą būtina atlikti traukos spintoje. Vengti atviros ugnies. Netraukti reagentų burna.

### VISUOTINAI SUDERINTOS SISTEMOS (GHS) PAVOJINGUMO KLASIFIKACIJA

Ploviklis (20X)

PAVOJINGA



H360

Gali pakenkti vaisingumui arba negimusiajam vaikui.

P201

Prieš naudojimą gauti specialias instrukcijas.

P280

Mūvėti apsaugines pirštines, vilkėti apsauginę aprangą ir naudoti akių (veido) apsaugos priemones.

P308+P313

ESANT sąlyčiui arba jeigu numanomas sąlytis: kreiptis į gydytoją.  
Boro rūgštis 0,1 - 0,3 %  
Natrio borato dekahidratas 0,1 - 0,3 %

**SDS**

Saugos duomenų lapą galima gauti interneto svetainėje [techdocs.beckmancoulter.com](http://techdocs.beckmancoulter.com)

### MĖGINIŲ ĖMIMAS, PARUOŠIMAS, LAIKYMAS IR PRASKIEDIMAS

- Surinkti kraują į švairius sausus mėgintuvėlius ar mėgintuvėlius, kuriuose yra EDTA.
- Atskirkite serumą ar plazmą nuo forminių elementų centrifuguojant.
- Serumo ir plazmos mėginius galima laikyti 2-8 °C temperatūroje 24 valandų bėgyje. Ilgesniam laikymui juos reikia suskirstyti į alikvotus ir užšaldyti < -18 °C temperatūroje (iki 1 metų). Vengti pakartotino mėginių užšaldymo ir atitirpinimo. Mėginiai turi būti atitirpinami kambario temperatūroje.
- Jeigu mėginių koncentracija didesnė nei didžiausia kalibratoriaus koncentracija, mėginiai turi būti skiedžiami nuliniu kalibratoriumi.

30 mėginių (serumo koncentracijos nuo 0,24 iki 1,88 ng/ml) serumo ir EDTA plazmos reikšmės palygintos naudojant 17 OH-P radioimuninio tyrimo (RIA) rinkinį. Gauti tokie rezultatai:

[EDTA plazma] = 0,9026[serumas] + 0,0283;

R = 0,9747

### PATEIKIAMOS MEDŽIAGOS

Laikant 2-8°C temperatūroje, visi rinkinio reagentai išlieka stabilūs iki etiketėje nurodyto rinkinio tinkamumo naudojimui laiko pabaigos. Galiojimo terminai, nurodyti buteliukų su reagentais etiketėse, taikomi tik jų laikymui gamybinėmis sąlygomis iki rinkinio komplektavimo momento ir netaikomi užsakovo gautai produkcijai.

Reagentų laikymo sąlygos po jų ištirpinimo ar praskiedimo nurodytos skyriuje „Procedūra“.

**Mėgintuvėliai, padengti 17 OH-P antikūniais: 2 x 50 vnt.** (paruošti naudojimui).

**Žymuo, 125I-17 OH-P tirpalas: 1 buteliukas, 45 ml** (paruoštas naudojimui).

Pagaminimo dieną buteliuke yra <640 kBk 125I-17 OH-P buferyje su baltymu ir dažikliu.

Pastaba: kartais ženklinimo tirpale pasitaikantys sutirštėję gumulėliai įtakos atliekamo tyrimo kokybei neturi.

**Kalibravimo mėginiai: vienas 2 ml buteliukas ir penki buteliukai po 0,5 ml** (paruošti naudojimui)

Kalibratorių buteliukuose yra nuo 0 iki maždaug 50 ng/ml (nuo 0 iki maždaug 151 nmol/l) koncentracijos 17 OH-P žmogaus serume su natrio azidu (< 0,1 %). Tiksli koncentracija nurodyta kiekvieno buteliuko etiketėje. Kalibratoriai patikrinti pagal vidinį etaloninį standartą.

Nulinį kalibratorių (5 ml) galima užsisakyti ir atskirai (kat. nr. B23373).

**Kontrolinis serumas: 2 buteliukai** (liofilizuoti preparatai).

Kontroliniuose buteliukuose yra 17 OH-P žmogaus serume su natrio azidu (<0,1 %). Skiedimui reikalingas skysčio kiekis yra nurodytas ant buteliuko etiketės. Numatomas koncentracijų diapazonas nurodytas informaciniame lapelyje.

**Praplovimo tirpalas (20x): 1 buteliukas, 50 ml.**

Koncentruotą tirpalą prieš naudojimą reikia praskiesti.

## REIKALINGOS, BET NEPATEIKIAMOS MEDŽIAGOS

Be standartinės laboratorinės įrangos, reikalingi:

Tiesioginiam nustatymui:

- mikropipetės (25 µl ir 400 µl)
- pusiau automatinės pipetės (25 µl, 400 µl ir 2 ml)
- Siurbimo sistemos
- horizontalaus ar orbitinio kratytuvo;
- Horizontalaus ar orbitalinio purtytuvo
- gama skaičiuotuvas <sup>125</sup>I aktyvumui skaičiuoti.

Ekstrakcijos procedūrai (esant reikalui):

- mikropipetė (200 µl);
- stiklinės pipetės (2,5 ml, 5 ml ir 10 ml)
- stikliniai buteliukai nuo 6 ml iki 15 ml talpos
- stikliniai mėgintuvėliai eterinei fazei atskirti
- eterio garintuvas (Speed Vac tipo) arba vandens vonia (37 °C)
- tyrimams skirtas etilo eteris.

## PROCEDŪRA

### Reagentų paruošimas

Palaikykite visus reagentus į kambario temperatūrą.

### Kontrolinių mėginių skiedimas

Į buteliukus įpilamas ant etiketės nurodytas distiliuoto vandens kiekis. Palaukti dešimt minučių, po to švelniai sumaišyti, kad nesusidarytų putos prieš išpilant. Paruošti tirpalai laikomi 2-8 °C temperatūroje iki rinkinio galiojimo pabaigos.

### Praplaunamojo tirpalo paruošimas

Supilkite buteliuko turinį į 950 ml distiliuoto vandens ir išmaišykite. Praskiestą tirpalą galima sugoti 2-8 °C temperatūroje, kol nesibaigs rinkinio galiojimo laikas.

### Bandinių ekstrakcija (esant reikalui, žr. Ribojimai)

Dėmesio: Ekstrakcija atliekama iš anksto eteriu apiplautuose švairuose stikliniuose buteliukuose arba mėgintuvėliuose.

Ekstrakcijos procedūra būtina tik kraujo plazmos arba serumo bandiniams. Neekstrahuoti kalibravimo mėginių.

- Prieš pradėdant ekstrakciją, sušildyti mėginius iki kambario temperatūros ir gerai išmaišyti.
- Pažymėti po vieną stiklinį buteliuką kiekvienam mėginiui.
- Į atitinkamus buteliukus įlašinti po 200 µl analizuojamų mėginių.
- Į kiekvieną buteliuką įlašinti po 5 ml etilo eterio ir kruopščiai uždaryti juo mėgintuvėliais.
- Intensyviai sumaišyti buteliukų turinį sūkuriniame maišytuve (2x1 min).
- Palikite buteliukus pastovėti ant stalo ne mažiau 5 min.
- Atsargiai, neužtrešdami vandens fazės, paimkite 2,5 ml organinės fazės ir perpilkite į sunumeruotus stiklinius mėgintuvėlius.
- Garintuve (pavyzdžiui, sparčiojo vakuomo tipo) arba sudėję mėgintuvėlius į 37 °C temperatūros vandens vonelę visiškai išgarinkite eterio fazę.

1 pastaba. Mėgintuvėliai turi būti tvirtai pritvirtinti prie stovo, nes išgaravus eteriui jie gali išplaukti.

Šioje stadijoje tyrimą galima sustabdyti. Uždarytus mėgintuvėlius su sausu ekstraktu galima laikyti iki 7 dienų 2-8 °C temperatūroje.

- Į mėgintuvėlius su sausu ekstraktu įlašinti po 200 µl nulinio kalibratoriaus. Kruopščiai maišyti mėgintuvėlių turinį sūkuriniame maišytuve (30 s, 2000 aps/min), palaukti 15 min ir vėl maišyti.

2 pastaba. Jei reikalingas didesnis kiekis, nenupylę 2,5 ml organinės fazės mėgintuvėlius laikykite <-18 °C temperatūroje, kol užšals vandens fazė, atsargiai nupilkite 5 ml organinės fazės, stengdamiesi neužteršti vandens fazės, išgarinkite ir ištirpinkite, naudodami 400 µl nulinio kalibratoriaus.

### Radioimuninis tyrimas

Prieš pipetavimą padėk visus reagentus į kambario temperatūrą.

I žingsnis Reagentų papildymas	II žingsnis Inkubacija	III žingsnis Rezultatų matavimas
Į antikūnais padengtus mėgintuvėlius nuosekliai įpilti: 25 µl kalibravimo, kontrolinių ir analizuojamų mėginių arba 50 µl ekstrakto ir  400 µl žymėto atomo* Sumaišyk.	Uždaryti mėgintuvėlius. Inkubuoti 120 minučių 18-25°C temperatūroje purtant (ne mažiau 280 aps./min)	Kruopščiai išpilk mėgintuvėlių turinius (išskyrus "T"). Du kartus perplauti 2 ml plovimo tirpalo. Išpilti.  Išmatuok (B) ir bendrą <sup>125</sup> I aktyvumą (T) (skč./min.) 1 min.

\*Į du papildomus mėgintuvėlius įlašinti po 400 µl žymens bendram <sup>125</sup>I ("T" mėginio) aktyvumui įvertinti.

## REZULTATAI

Rezultatai skaičiuojami interpoliacijos metodu pagal kalibravimo kreivę, gautą kartu su nežinomų mėginių analize.

### Kalibravimo kreivė

Kokybės kontrolės skyriuje pateikti rezultatai apskaičiuoti naudojant *glodžiosios* kreivės pritaikymą, logistinėje vertikaliojoje ašyje nurodant *B/T arba B/B<sub>0</sub>*, o logaritminėje horizontaliojoje ašyje – kalibratorių analitės koncentraciją (ng/ml).

Naudojant kitus duomenų redukcijos metodus, rezultatai gali šiek tiek skirtis.

Bendrasis aktyvumas: 179 362 skč./min.				
Kalibratoriai	17OH-P (ng/ml)	skč./min. (n=3)	B/T (%)	B/B <sub>0</sub> (%)
0	0	55 975	31,21	100,0
1	0,12	44 882	25,02	80,18
2	0,40	31 190	17,39	55,72
3	1,90	12 557	7,00	22,43
4	12,5	2 515	1,40	4,49
5	50,0	895	0,50	1,60

(Tipinės kalibravimo kreivės pavyzdys. Nesinaudoti skaičiuojant rezultatus).

### Ėminiai

Kiekvienam mėginiui kalibravimo grafiko vertikalioje ašyje rasti reikšmė B/T arba B/B<sub>0</sub>, o horizontalioje ašyje atitinkamą 17 OH-P koncentraciją.

Koncentracijų pervedimui iš ng/ml į nmol/l, būtina padauginti gautą rezultatą iš 3.026.

## TIKĖTINOS VERTĖS

Rekomenduojama kiekvienai laboratorijai nusistatyti savo normos dydžius. Žemiau pateikti iš sveikų asmenų gauti dydžiai yra tik indikatyvūs.

Adults	N	Mediana	Min.	Max.	2,5 %	97,5 %
					percentilis	percentilis
(ng/ml)						
Vyrai	55	0,93	0,53	2,22	0,55	1,99
Moterų						
Folikulų fazė	111	0,48	0,13	1,67	0,21	1,45
Geltonkūnio fazė	112	1,52	0,42	3,20	0,61	2,88
priešovuliacinio piko periodu	22	1,39	0,54	2,04	0,55	2,01
Kontracepcija	30	0,37	0,17	1,48	0,18	1,47
Moterys po menopauzės	38	0,38	0,13	0,92	0,16	0,79
Nėštumas, 1-asis trimestras	45	2,03	0,78	5,75	0,93	3,82
Nėštumas, 2-asis trimestras	44	2,23	0,60	6,86	1,23	3,70

koeficientai mažesni arba lygūs 10,5 %. Tiriant laboratorijos glaudumą nustatyti serumo mėginių pokyčio koeficientai mažesni arba lygūs 12,8 %

#### Tikslumas

#### Tiesiškumas

Naudojant serumo mėginius parodyta, kad tyrimas yra tiesinis nuo 0,12 iki 50,88 ng/ml (nustatyta, kad tai atitinka CLSI dokumento EP06-A [3] rekomendacijas).

#### Praskiedimo testas

Didelės koncentracijos serumo mėginiai iš eilės atskiesti nulinės koncentracijos kalibratoriumi. Atkūrimo procentinės reikšmės buvo nuo 95,7 % iki 119 %.

#### „Atsidarymo“ testas

Serumo mėginiai buvo papildyti žinomais 17 OH-P kiekiais. Atkūrimo procentinės reikšmės buvo nuo 100 % iki 119 %.

**Matavimo diapazonas** (aptikimo ribos (LoD) iki didžiausiosios koncentracijos kalibratoriaus):

Nuo 0,07 ng/ml iki maždaug 50 ng/ml.

#### RIBOJIMAI

Tyrimo metodikos nepaisymas gali iškraipyti tyrimo rezultatus.

Tyrimo rezultatai turi būti interpretuojami bendrame paciento klinikinio vaizdo kontekste, įskaitant anamnezę, kitų testų duomenis ir kitokią tinkamą informaciją.

Daugiau informacijos žr. duomenų lapo dalyje „PRIEDAS“.

Pas labai mažus vaikus (ypač 6 mėnesių amžiuje) pastebimas labai aukštas 17 OH-pregnenolono-sulfato lygis. Tokiais atvejais rekomenduojama atlikti tyrimą su išankstine 17 OH-P ekstrakcija eterio pagalba.

Nežiūrint į žemą kryžminę reakciją, pas pacientus, reguliariai gaunančius spironolaktoną, gali būti pastebimas klaidingai padidintas 17 OH-P lygis. Šiuo atveju gydymą spironolaktonu būtina nutraukti ne mažiau kaip prieš 3 savaites prieš atliekant tyrimą.

Tyrimams, kuriuose naudojami antikūnai, gali trukdyti paciento mėginyje esantys heterofiliniai antikūnai. Pacientai, nuolat kontaktuojantys su gyvūnais arba tie, kuriems taikyta imunoterapija arba diagnostinės procedūros naudojant imunoglobulinius ar imunoglobulinų fragmentus, gali sintetinti antikūnus, pvz., HAMA, trukdančius atlikti imuninius tyrimus.

Tokie trukdantys antikūnai gali lemti klaidingus rezultatus. Pacientų, kurie įtariami turintys šių antikūnų, rezultatus reikia vertinti atsargiai.

Detali informacija apie numatomų verčių vaikams (surūšiuotas pagal amžių ir lytį) galima rasti duomenų lapo priede "APPENDIX"

#### KOKYBĖS KONTROLĖ

Vadovaujantis „Good laboratory practices“ (geri laboratoriniai įgūdžiai) metodais atliekamų tyrimų kokybei patikrinti, būtina reguliariai naudoti kontrolinius pavyzdžius, kurių tyrimo etapai tokie patys kaip ir tiriamųjų mėginių. Kokybės tikrinimo rezultatus patartina apdoroti taikant specialius statistinius metodus.

Tuo atveju, kai pakuotė rimtai pažeista arba gauti rezultatai nesutampa su tyrimų charakteristikomis, prašome kreiptis į mūsų specialistus: Elektroninis paštas: imunochem@beckman.com

#### ANALITINĖS CHARAKTERISTIKOS

(detalesnė informacija pateikiama skyriuje „APPENDIX“)

Tipingi duomenys pateikiami tik kaip iliustracija. Atskirose laboratorijose gauti efektyvumo duomenys gali skirtis.

#### Jautris

**Aptikimo riba (LoD)** 0,07 ng/ml

17 OH-P aptikimo riba (LoD) yra 0,07 ng/ml, nustatyta pagal CLSI dokumento EP17-A2 [1] rekomendacijas, pagrįstas mažesne nei 5 % klaidingai teigiamų rezultatų ( $\alpha$ ) ir mažesne nei 5 % klaidingai neigiamų rezultatų ( $\beta$ ) proporcija, naudojant 120 tuščiųjų ir 120 mažos koncentracijos mėginių tyrimų rezultatus; ruošinio riba (LoB) yra 0,04 ng/ml.

#### Specifiškumas

Imunoanalizei naudojamas antikūnas yra specifiskas 17- $\alpha$ -hidroksiprogesteronui.

#### Preciziškumas

#### Pakartojamumas ir laboratorijos glaudumas

Nustatyta, kad tyrimo glaudumas atitinka CLSI dokumento EP05-A3 [2] rekomendacijas. Tiriant pakartojamumą nustatyti serumo mėginių pokyčio



# RIA 17 $\alpha$ - Hydroxyprogesterone

**REF** IM1452

## RADIOIMMUNOASSAY A 17 $\alpha$ -HYDROXYPROGESTERONE IN VITRO MEGHATÁROZÁSÁRAHUMAN SZÉRUMBÓL ÉS PLAZMÁBÓL

*In vitro* diagnosztikai használatra

### MŰKÖDÉSI ELV

A 17  $\alpha$ -Hydroxyprogesterone (17 OH-P) radioimmunoassay egy kompetitív assay. Ugyanazon készlet alkalmas a 17-OHP mérésére:

közvetlenül szérumból, vagy plazmából

vagy éteres extrakciót majd oldószer elpárologtatást követően zéró kalibrátorban történő reszuspenzióval.

A szérum, vagy plazma minták, kontroll es kalibrátorok I-<sup>125</sup> jelölt 17-OHP tracerrel együtt inkubálódnak a bevonatos csövekben. Az inkubációt követően a csövek tartalmát kiöblítjük a nem kötődött <sup>125</sup>I-jelzett 17 OH-P eltávolítására. A kötött radioaktivitást gamma-számlálóban mérjük. A létrehozott kalibrációs görbe alapján az ismeretlen minták értékét a standard görbéről interpolációval határozzuk meg.

### FIGYELMEZTETÉSEK ÉS ÓVINTÉZKEDÉSEK

**Általános megjegyzések:**

- A kalibrátorokat és kontrollokat tartalmazó üvegeket a lehető legrövidebb ideig tartsák nyitva a nagymértékű párolgás elkerülése érdekében.
- Ne keverjen össze különböző gyártási számú reagenseket.
- Minden vizsgálatához készítsen standardgörbét.
- Ajánlatos két-két párhuzamosan dolgoznunk a mérések során.
- Minden csövet csak egyszer használjunk.

#### Alapvető sugárzásbiztonsági szabályok

Radioaktív anyagok beszerzését, felhasználását és szállítását külön jogszabályok írják elő. Az alábbi alapvető szabályok betartása megfelelő védelmet biztosíthat:

- Radioaktív anyagok jelenlétében ne fogyasszon ételt, italt, ne dohányozzon és ne használjon kozmetikumokat.
- Ne pipettázzon szájjal radioaktív oldatokat.
- Kerülje a radioaktív anyagokkal történő érintkezést: munka közben viseljen egyszer használatos kesztyűt és laboratóriumi köpenyt.
- Minden radioaktív anyagokkal végzett műveletet egy erre megfelelő, folyosóktól és más fogalmas részekről távol eső helyen kell elvégezni.
- A radioaktív reagenseket egy erre kijelölt helyen tartott edényben kell tárolni.
- A laboratóriumba érkezett radioaktív anyagok átvételéről és tárolásáról vezessen jegyzőkönyvet.
- Azokat a laboratóriumi eszközöket és üvegedényeket, amelyek radioaktív anyaggal szennyeződhetnek, különítse el, hogy elkerülje a különböző radioizotópokkal történő keresztszennyeződést.
- Sugárszennyeződés vagy radioaktív anyag kiömlése esetén tartsa be az erre vonatkozó előírásokat.
- A radioaktív hulladékot kezelje az adott országban érvényes szabályoknak megfelelően.

#### Nátrium azid

Néhány reagens tartósítószerként nátrium-azidot tartalmaz. A nátrium azid reakciója ólommal, rézzel, vagy sárgarézzel robbanékony fémazidokat eredményezhet. Ezért a nátrium azid tartalmú reagenseket a lefolyóba történő kiöntés után nagy mennyiségű folyó vízzel öblítsük le.

#### Emberi eredetű anyagot

Az ebben a kitben található emberi eredetű komponenseket is tartalmazó reagensek mindegyike negatív HIV 1, HIV 2, HCV ellenanyagokra, továbbá Hepatitis B felszíni antigénre (HBsAg). Mindazonáltal úgy kell őket kezelni, mintha képesek lennének e betegségek átvételére. Jelenleg nincs olyan módszer, mellyel e vírusok meglete teljes bizonyossággal kizárható lenne. Ezért a kitéket az összes szükséges biztonsági előírás betartásával kezeljük.

Minden szérum, és plazmamintát AIDS vagy hepatitis-fertőzést okozni képes anyagként kell kezelni. Minden potenciálisan fertőzésveszélyes anyagot az adott országban érvényes előírásoknak megfelelően kell kidobni.

#### Etil-éter

Az etil-éter tűzveszélyes és illékony szerves oldószer. Az extrakciónak elszívófülkében kell történnie. Kerülje el, hogy lánggal érintkezzen, és ne pipettázza a reagenst szájjal.

### GHS SZERINTI VESZÉLYESSÉGI BESOROLÁS

20-szoros töménységű VESZÉLY!  
mosóoldat



H360

P201

P280

P308+P313

Károsíthatja a termékenységet és a születendő gyermeket. Használat előtt ismerje meg a vizsgálatra vonatkozó különleges utasításokat. Védőkesztyű, védőruha és szemvédő/arcvédő használata kötelező. Expozíció vagy annak gyanúja esetén: orvosi ellátást kell kérni. Bórsav 0,1 - 0,3% Nátrium-borát dekahidrát 0,1 - 0,3%

**SDS**

A biztonsági adatlap megtalálható a következő internetes helyen: [techdocs.beckmancoulter.com](http://techdocs.beckmancoulter.com)

### MINTAVÉTEL, FELDOLGOZÁS, TÁROLÁS ÉS HIGÍTÁS

- A vért natív, vagy EDTA-s csövekbe vehetjük le.
- A szérumot, vagy plazmát centrifugálással különítsük el a sejtektől.
- A szérum és plazma mintákat 2-8 °C között tárolhatjuk, ha a vizsgálatot 24 órán belül elvégezzük. Hosszabb idejű tárolás esetén – aliquotokra történő szétosztást követően – a mintákat < -18 °C-on tároljuk, kerüljük a többszöri fagyasztást-olvasztást.
- Ha a minta koncentrációja nagyobb, mint a legmagasabb kalibrátor értéke, akkor a minta zéró kalibrátorral hígítandó.

30 szérum- és EDTA-s plazmaminta (a szérumminták koncentrációja 0,24–1,88 ng/mL) összehasonlítása történő a 17-OH-P radioimmunassay (RIA) kittel. Az eredmények a következők:

[EDTA-s plazma] = 0,9026 [szérum] + 0,0283

R = 0,9747

### SZÁLLÍTOTT ANYAGOK

A kitben található összes reagens - a kit 2-8 °C-on történő tárolása esetén – a címkén jelzett lejárati ideig megőrzi stabilitását. A csövek címkéjén jelzett lejárati idők a gyártó részére szolgáltatóknak információt az adott komponens hosszú távú eltarthatóságával kapcsolatban. Kérjük ezt az adatot ne vegyék figyelembe!

A reagens feloldás vagy hígítás utáni tárolási feltételeit lásd az Eljárás című fejezetben.

**Anti-17 OH-P antitest bevonatú cső: 2 x 50 cső** (használatra kész)

**<sup>125</sup>I-jelölt 17  $\alpha$ -Hydroxyprogesterone: egy üveg (45 mL)** (használatra kész)

Az üveg <640 kBq, <sup>125</sup>I-labeled 17 OH-P-t tartalmaz a gyártás napján fehérjéket és festékeket tartalmazó pufferben.

Megjegyzés: Alkalmi jelenléte alvadtt részecskék a tracer nem befolyásolja assay teljesítményét.

**Kalibrátorok: 5 x 0,5 mL ampulla + 1 x 2 mL ampulla "zero" kalibrátor** (használatra kész)

A kalibrátorfolyadék 0 és körülbelül 50 ng/mL (0 és körülbelül 151 nmol/L) közötti mennyiségű 17-OH-P-t tartalmaznak nátrium-azidot (< 0,1%) tartalmazó



humán szérumban. A pontos koncentráció mindegyik fiola címkéjén van feltüntetve. A kalibrátorok hitelesítése egy belső referenciastandard segítségével történik.

A zéró kalibrátor (5 mL) külön is rendelhető (katalógus # B23373)

#### Kontroll minták: 2 fiola (liofolezett)

A kontroll üvegek 17 OH-P tartalmaznak nátrium-aziddal (<0.1%) tartósított humán szérumban. A rekonstrukcióhoz szükséges térfogat az üvegeken olvasható. A koncentrációtartományban megadott várt értékek a mellékletben találhatóak.

#### Mosó oldat (20x): 1 x 50 mL-es cső

Koncentrált oldat, melyet használat előtt hígítani kell.

## SZÜKSÉGES, DE NEM SZÁLLÍTOTT ANYAGOK

A standard laboratóriumi felszerelésen kívül az alábbiak szükségesek:

Az assayhez:

- Precíziós mikropipetta (25 µL és 400 µL).
- Félautomata pipetta (25 µL, 400 µL és 2 mL).
- Vortex típusú keverő
- Vízszintes vagy körkörös rázógép
- Leszívórendszer
- <sup>125</sup>I mérésére alkalmas gamma számláló

Az extrakciós lepeshez (opcionális):

- Precíziós mikropipetta (200 µL).
- Üveg pipetta (2.5 mL, 5 mL, 10 mL).
- Üvegek (6 mL-15 mL).
- Üvegcsövek az éteres fázis visszanyerésére.
- Evaporátor (gyorsvákuum típusú) vagy 37°C-os vízfürdő.
- Analitikai tisztaságú etil-éter.

## ELJÁRÁS

### A reagensek előkészítése

Hagyjuk, hogy az összes reagens felvegye a szobahőmérsékletet!

### A kontrol minták beoldása

Oldja fel az ampullák tartalmát a címkén megadott mennyiségű desztillált vízben. Ezután várjon 10 percig, majd keverje meg az ampullákat óvatosan, hogy ne habosodjanak a bemérés előtt. Tárolja a feloldott reagenseket 2-8 °C-on a reagenskészlet lejárati idejéig.

### A mosóoldat elkészítése

Öntsük az üveg tartalmát 950 mL of desztillált vízbe és jól keverjük össze. A hígított oldat 2-8 °C-on tartva a kit lejárati idejéig használható.

### Minta extrakció (opcionális; Isd. § Korlátozások)

Megjegyzés: az extrakciót tiszta üvegben, vagy üveg csőben kell elvégezni, éteres előöblítéssel.

meghatározás előtt csak a mintákat extrahálja; a kalibrátorokat ne!

- Az extrakció előtt a mintát hozza szobahőmérsékletre és alaposan keverje össze.
- Számozzunk be egy-egy üvegcsövet minden egyes mintának.
- Mérjen 200 µL mintát a megfelelő csövekbe.
- Adjunk 5 mL etil-étert az üvegekhez. Dugaszoljuk le az üvegeket alaposan.
- Erőteljesen vortexelje az üvegeket (2x1 percig).
- Hagyja állni az üvegeket az asztalon 5 percig.
- Szívjon le óvatosan 2.5 mL organikus fázist úgy, hogy a vizes fázissal ne szennyeződjön, majd mérje az oldatot számozott üvegcsőbe.
- Az éter fázist teljesen párologtassa el evaporátorban (pl. speedvac típusú vákuum centrifugában), vagy helyezze a mintacsöveket 37 °C-os vízfürdőbe.

1. megjegyzés: A csöveket szoros mintatartóba helyezze, mivel az éter elpárolgását követően könnyűvé válnak és elúsznak.

A beszártítás után a csövek ledugózva 7 napig tárolhatók 2-8°C-on.

- Oldja vissza az éteres extraktumot 200 µL zéró standardban. Vortexeljen alaposan (30 s, 2000 rpm), várjon 15 percet, majd vortexeljen ismét.

2. megjegyzés: Ha nagyobb mennyiségre lenne szükség, a 2.5 mL éteres fázis leszívás helyett helyezze az üvegeket fagyaszűtőbe, <18 °C-ra, míg a vizes fázis kifagy, majd óvatosan szívja le az 5mL-es organikus fázist úgy, hogy a vizes fázissal ne szennyeződjön, párologtasson, majd oldja vissza a száraz extraktumot 400 µL zéró kalibrátorban.

### A vizsgálat menete

Bemérés előtt várja meg, amíg a reagensek felmelegednek szoba-hőmérsékletre.

1. lépés Bemérések	2. lépés Inkubáció	3. lépés Aktivitásmérés
Az ellenanyagát bevont csövekhez adtuk:  25 µL kalibrátor, kontroll, minta vagy 50 µL extraktum és 400 µL tracer* Keverje össze.	Inkubáljon rázón (≥280 rpm) 120 percig 18 - 25 °C-on.	Szívja le óvatosan a 2 csövek tartalmát (a 2 «törlés esemény/perc» cső kivételével). Mossa kétszer 2 mL mosóoldattal. Szívja ki a csövek tartalmát.  Mérje a kötött (B) és totál (T) aktivitást (esemény/perc) 1 percig.

\*mérjen 400 µL tracer-t 2 külön csőhöz a totál esemény/perc meghatározásához.

## EREDMÉNYEK

Az eredmények a standard görbe alapján interpolációval számíthatók. A mintákkal egy időben mert kalibrátorok adataiból származó standard görbe használható a koncentráció számoláshoz.

### Standard görbe

A minőségbiztosítási osztályon az eredmények számítása *illesztett* görbe mentén történt, ahol a  $B/T$  vagy a  $B/B_0$  értéke a logit függőleges tengelyen, a kalibrátorok analitikonkoncentrációja pedig a logaritmikus vízszintes tengelyen (ng/mL) található.

Más adat redukciós eljárások kissé eltérő eredményeket adhatnak.

Teljes aktivitás: 179 362 esemény/perc				
Kalibrátorok	17OH-P (ng/mL)	esemény/perc (n=3)	B/T (%)	B/B <sub>0</sub> (%)
0	0	55 975	31,21	100,0
1	0,12	44 882	25,02	80,18
2	0,40	31 190	17,39	55,72
3	1,90	12 557	7,00	22,43
4	12,5	2515	1,40	4,49
5	50,0	895	0,50	1,60

(A megadott standard görbe csak minta, ne használjuk számításokhoz.)

### Minták

A függőleges tengelyen a minta  $B/T$  vagy  $B/B_0$  értéket megkeresve, s azt a görbe alapján a vízszintes tengelyre vetítve, a minta 17-OH-P koncentrációja leolvasható.

A ng/mL nmol/L-re történő átváltásához szorozzuk meg az eredményt 3.026-tal.

## VÁRHATÓ ÉRTÉKEK

Javasolt, hogy minden laboratórium saját maga állapítsa meg referencia tartományát. Az alábbi, egészségesek vizsgálata során kapott adatok csak tájékoztató jellegűek.

Adults	N	Közé- pérték	Min.	Max.	2.5	97.5
					percentilis	percentilis
(ng/mL)						
Férfiak	55	0,93	0,53	2,22	0,55	1,99
Nők						
Follicularis fázis	111	0,48	0,13	1,67	0,21	1,45
Luteális fázis	112	1,52	0,42	3,20	0,61	2,88
Preovulációs csúcs	22	1,39	0,54	2,04	0,55	2,01
Kontraceptívum	30	0,37	0,17	1,48	0,18	1,47
Nők menopauza után	38	0,38	0,13	0,92	0,16	0,79
Terhesség 1. trimeszter	45	2,03	0,78	5,75	0,93	3,82
Terhesség 2. trimeszter	44	2,23	0,60	6,86	1,23	3,70

A gyermekkori (életkor és nem szeribnti) várt értékekre vonatkozó részletes információ a metodikai leírás „APPENDIX” fejezetében található.

## MINŐSÉG-ELLENŐRZÉS

A megfelelő laboratóriumi eljárásokat (GLP) szabályozó követelmények szerint időről időre kontrol mintákkal kell ellenőrizni, hogy az eredmények megfelelőek-e. A kontrol mintákat pontosan a vizsgálati mintáknak megfelelő módon kell előkészíteni és lemérni. Ajánlatos az eredményeket megfelelő statisztikai módszerekkel kiértékelni.

Amennyiben a csomagolás sérült, vagy az adatok a kiteljesítőképeségének romlására utalnak, kérjük, hogy lépjen kapcsolatba országának Immuntech képviselőjével, vagy írjon a következő e-mail címre: [imunochem@beckman.com](mailto:imunochem@beckman.com)

## MINŐSÉGI JELLEMZŐK

(További részletek a Mellékletben)

A reprezentatív adatok kizárólag szemléltető jellegűek. A különálló laboratóriumok eredményei ettől eltérhetnek.

### Érzékenység

**Kimutathatósági határérték (LoD):** 0,07 ng/mL

A 17-OH-P LoD értéke 0,07 ng/mL, ami a CLSI EP17-A2 [1] dokumentumnak megfelelően került meghatározásra; az álpozitív eredmények aránya ( $\alpha$ ) kevesebb volt, mint 5%, az álnegatív eredmények aránya ( $\beta$ ) kevesebb volt, mint 5%; 120 17-OH-P-t nem tartalmazó és 120 alacsony koncentrációt tartalmazó mintát vizsgáltak, és a vak határérték (LoB) 0,04 ng/mL volt.

### Specifitás

Az immunassayben használt antitestek specifikusak a 17- $\alpha$ -hidroxiprogesteronra.

### Pontosság

#### Megismételhetőség és laboratóriumon belüli pontosság

A vizsgálat pontosságát a CLSI által kiadott EP05-A3 [2] dokumentum alapján határozták meg. A megismételhetőségre vonatkozó variációs

koeficiens legfeljebb 10,5% volt szérumminták esetében. A laboratóriumon belüli pontosságra vonatkozó variációs koeficiens legfeljebb 12,8% volt szérumminták esetében.

### Valósság

#### Linearitás

Kimutatták, hogy szérumminták esetében a vizsgálat lineáris a 0,12–50,88 ng/mL tartományban (ezt a CLSI által kiadott EP06-A [3] dokumentumnak megfelelően határozták meg).

#### Hígítási teszt

Magas koncentrációt tartalmazó szérummintákat sorozatosan hígítottak zéró kalibrátorral. A visszanyerési arány a 95,7% és 119% közötti tartományban volt.

#### Visszanyerési teszt

A szérummintákhoz ismert mennyiségben 17-OH-P-t adtak. A visszanyerési arány 100–119% között volt.

**Mérési tartomány** (az LoD és a legmagasabb koncentrációjú kalibrátor értéke között):

0,07 ng/mL-től kb. 50 ng/mL-ig

## KORLÁTOZÁSOK

A jelen leírásban foglalt előírások be nem tartása jelentős mértékben befolyásolhatja az eredményeket.

Az eredmények a beteg teljes klinikai képének (klinikai anamnézis, egyéb vizsgálatok eredményei, más releváns információk) tükrében értelmezhetők.

További részletekért lásd a „FÜGGELÉK” adatlapot.

Nagyon fiatal (főként 6 hónapos kor alatti) csecsemőknek nagyon magas a 17 OH-pregnenolon szulfát szintje. Ebben a különleges esetben az assay-t megelőzően éteres extrakciós módszer javasolt.

Az alacsony keresztreaktivitás ellenére fals magas 17-OH-P értékek észlelhetők spironolacton kezelést követően. Emiatt a spironolactone terápiát a vizsgálat előtt legalább 3 héttel meg kell szakítani, hogy az interferencia elkerülhető legyen.

Antitesteket tartalmazó tesztek esetén fennáll a páciens mintában esetleg meglévő heterofil antitestek interferenciájának lehetősége. Azok a páciensek, akik rendszeresen állatokkal érintkeznek vagy kezelés vagy diagnosztikus eljárás során immunglobulinokat vagy immunglobulin fragmenteket kaptak, antitestek (pl. HAMA) termelődéssel reagálhatnak, melyek az immunoassay-vel interferálnak.

Ezek okozhatnak hibás eredményeket. Fokozott körültekintéssel értékelje az olyan páciensektől származó mintákat, akiknél valószínűsíthető, hogy ilyen antitestek vannak jelen.

## RIA 17 $\alpha$ - Hydroxyprogesterone

**REF** IM1452

### RADIOIMMUNOLOGICZNA METODA DO OZNACZANIA IN VITRO 17 $\alpha$ -HYDROKSYPROGESTERONU W LUDZKIEJ SUROWICY I OSOCZU

Do użytku diagnostycznego *in vitro*.

#### ZASADA

Zestaw radioimmunologiczny do oznaczania 17 $\alpha$ -hydroksyprogesteronu (17OH-P) jest zestawem kompetycyjnym. Ten sam zestaw może być użyty do mierzenia 17OH-P:

bezpośrednio w surowicy lub EDTA-osocz

lub po ekstrakcji próbek eterem i odparowaniu rozpuszczalnika, a następnie rozpuszczenie ich w kalibratorze zero.

Próbki surowicy lub osocza, ekstrakty, kontrole i kalibratory są inkubowane z 17 OH-P znakowanym 125I, jako znacznikiem, w probówkach pokrytych przeciwciałem. Po inkubacji zawartość próbek jest wyplukiwana, aż do usunięcia 17 OH-P znakowanego 125I. Związana radioaktywność jest oznaczana w liczniku gamma. Zawartość hormonu w danej próbce jest odczytywana z krzywej standardowej.

#### OSTRZEŻENIE I ŚRODKI OSTROŻNOŚCI

Uwagi ogólne:

- Fiolki z kalibratorami i kontrolami nie powinny pozostawać otwarte przez czas dłuższy niż jest to konieczne aby uniknąć nadmiernego odparowania zawartości fiołki.
- Nie należy mieszać odczynników z różnych serii produkcyjnych.
- Krzywa standardowa musi być wykonana podczas każdego oznaczania.
- Zalecane jest wykonywanie oznaczeń w duplikatach.
- Każda próbka może być użyta tylko raz.

**Podstawowe zasady bezpieczeństwa podczas postępowania z promieniowaniem**

Wejście w posiadanie, używanie, utylizacja i transfer materiałów radioaktywnych powinno być zgodne z prawem obowiązującym w danym kraju. Przestrzeganie podstawowych zasad bezpieczeństwa przy stosowaniu materiałów radioaktywnych powinno zapewnić odpowiednią ochronę:

- Nie jeść, nie pić, nie palić wyrobów tytoniowych, nie aplikować kosmetyków w obecności materiałów radioaktywnych.
- Nie pipetować radioaktywnych roztworów przy użyciu ust.
- Unikać wszelkiego kontaktu z materiałami radioaktywnymi poprzez stosowanie rękawic i ubrań ochronnych.
- Wszystkie czynności przy użyciu materiałów radioaktywnych powinny być wykonywane w przeznaczonym do tego celu miejscu, znajdującym się w odpowiedniej odległości od korytarzy i innych pomieszczeń.
- Materiały radioaktywne powinny być przechowywane w zabezpieczonym pojemniku.
- Należy zapisać datę przyjęcia radioaktywnych produktów, a czas ich przechowywania powinien być zgodny z odpowiednim terminem.
- Sprzęt laboratoryjny i naczynia, które uległy kontaminacji powinny być oddzielone od pozostałych, aby nie spowodować kontaminacji krzyżowej różnymi radioizotopami
- W sytuacji zanieczyszczenia radioizotopami i/lub zgubieniu radioaktywnego materiału powinno być powzięte postępowanie zgodne z prawem obowiązującym w kraju użytkownika.
- Radioaktywne odpady powinny być przechowywane zgodnie z przepisami obowiązującymi w kraju użytkownika.

#### Azydek sodu

Niektóre odczynniki zawierają azydek sodu jako środek konserwujący. Azydek sodu wchodzi w reakcję z ołowiem, miedzią lub mosiądzem, tworząc związki wybuchowe. W związku z tym odczynniki zawierające azydek sodu powinny być rozcieńczane dużą ilością wody przed wylaniem ich do kanalizacji.

#### Materiały pochodzące od człowieka

Materiały pochodzące od człowieka użyte w tym zestawie mają wynik negatywny po badaniach na obecność przeciwciał HIV1 i HIV2, przeciwciał przeciw HCV, powierzchniowego antygenu Hepatitis B (HBsAg). Mimo to powinny być traktowane jak materiał zakaźny. Nie ma testu dającego pełną gwarancję nieobecności wirusa. Należy obchodzić się z tym zestawem z zachowaniem wszelkich środków ostrożności.

Wszystkie surowice i osocza należy tak traktować jakby były materiałem do zakażenia hepatitis lub AIDS, a niszczenie odpadów powinno być przeprowadzone zgodnie z przepisami obowiązującymi w danym kraju.

#### Eter etylowy

Eter etylowy jest wysoce łatwopalnym rozpuszczalnikiem organicznym. Ekstrakcja i odparowywanie muszą być przeprowadzane pod wyciągiem. Unikać kontaktu z otwartym płomieniem. Nie pipetować odczynników ustami.

#### KLASYFIKACJA ZAGROŻEŃ WG GHS

Roztwór płuczający (20X) NIEBEZPIECZEŃSTWO



H360	Może działać szkodliwie na płodność lub na dziecko w łonie matki.
P201	Przed użyciem zapoznać się ze specjalnymi środkami ostrożności.
P280	Stosować rękawice ochronne, odzież ochronną i ochronę oczu/ochronę twarzy.
P308+P313	W przypadku narażenia lub styczności: Zasięgnąć porady/zgłosić się pod opiekę lekarza. Kwas borowy 0,1 - 0,3% Dziesięciowodny boran sodu 0,1 - 0,3%



Karta charakterystyki jest dostępna w witrynie [techdocs.beckmancoulter.com](http://techdocs.beckmancoulter.com)

#### ZBIERANIE PRÓB, PRZYGOTOWYWANIE, ROZCIEŃCZANIE I PRZECHOWYWANIE

- Pobierać krew do suchych próbek lub zawierających EDTA.
- Oddzielić surowce lub osocze od komórek poprzez wirowanie.
- Próbki surowicy i osocza powinny być przechowywane w 2-8°C, jeżeli oznaczanie zostanie przeprowadzone w ciągu 24 godzin. Jeżeli oznaczanie będzie przeprowadzone później, to należy odpowiednio rozdozowane próbki zamrozić (< -18°C, najdłużej 1 rok), aby nie powtarzać zamrażania i rozmrażania tej samej próbki. Rozmrażanie próbki powinno być przeprowadzane w temperaturze pokojowej.
- Jeżeli stężenia próbek są większe niż najwyższy kalibrator, to muszą być one rozcieńczone w kalibratorze zero.

Wartości w surowicy i osocz EDTA dla 30 próbek (wartości w surowicy od 0,24 do 1,88 ng/mL) porównano wykorzystując zestaw testu RIA 17 OH-P. Wyniki są następujące:

[Osocze EDTA] = 0,9026[surowica] + 0,0283,

R = 0,9747

#### MATERIAŁY DOSTARCZONE

Wszystkie nienaruszone odczynniki zestawu są stabilne zgodnie z ich datą ważności umieszczoną na etykiecie zestawu, pod warunkiem przechowywania ich w temperaturze 2-8°C. Daty ważności są wydrukowane tylko na etykietach fiolek z przedłużonym okresem składowania składników przez producenta. Nie należy brać ich pod uwagę.

Warunki przechowywania odczynników po upływie czasu rekonstrukcji lub rozcieńczeniu są podane w akapicie Procedura.

**Probówki pokryte przeciwciałem przeciw 17 OH-P: 2 x 50 probówek** (gotowy do użycia)

**Znacznik 17 OH-P znakowany 125I: jedna fiołka 45 mL** (gotowy do użycia)

Fiołka zawiera <640 kBq, w dniu produkcji, 17 OH-P znakowanego 125I w buforze z białkami i z barwnikiem.

Uwaga: Ewentualna obecność osadów w znaczniku nie ma żadnego wpływu na jakość pracy zestawu.

**Kalibratory: jedna fiołka 2 mL, pięć fiołek po 0,5 mL** (gotowy do użycia)

Fiołki kalibratora zawierają od 0 do około 50 ng/mL (od 0 do około 151 nmol/L) 17 OH-P w surowicy ludzkiej z azydkiem sodu (< 0,1%). Dokładne stężenie jest wskazane na etykiecie każdej fiołki. Kalibratory są zweryfikowane do wewnętrznego wzorca referencyjnego.

Kalibrator zero (5 mL) może być także zamówiony oddzielnie (kod: #B23373).

**Surowica kontrolna: 2 fiołki** (zliofilizowana)

Fiołki zawierają 17 OH-P w surowicy ludzkiej z azydkiem sodu (<0,1%). Objętość do rozcieńczenia jest wskazana na etykiecie fiołki. Oczekiwane wartości są w zakresie stężeń podanym w suplementacji.

**Płyn do płukania (20x): jedna 50 mL fiołka**

Koncentrat musi być rozcieńczony przed użyciem.

## MATERIAŁY WYMAGANE, ALE NIEDOSTARCZANE

Poza standardowym wyposażeniem laboratorium wymagane są następujące urządzenia:

Do oznaczania

- Dokładna pipeta (25 µL i 400 µL).
- Półautomatyczna pipeta (25 µL, 400 µL i 2 mL).
- Mieszadło wirowe („vortex“).
- Pozioma lub orbitalna wytrząsarka.
- System odciągający.
- licznik gamma do <sup>125</sup>J.

Do etapu ekstrakcji (do wyboru)

- Dokładna pipeta (200 µL).
- Szklana pipeta (2,5 mL, 5 mL 10 mL).
- Szklane fiołki (od 6 mL do 15 mL)
- Szklane probówki do odzyskania fazy eterowej.
- Parownica (typu szybka próżnia) lub łaźnia wodna na 37°C.
- Eter etylowy czysty do analiz.

## PROCEDURA

### Przygotowanie odczynników

Wszystkie odczynniki należy doprowadzić do temperatury pokojowej.

### Odtworzenie prób kontrolnych

Zawartość fiołek jest rozcieńczana wodą destylowaną o objętości jaka jest wskazana na etykiecie. Odczekać 10 minut po ropuszczeniu i delikatnie wymieszać w celu uniknięcia spienienia przed rozdozowaniem. Rozcieńczone roztwory przechowywać w temperaturze 2–8°C do końca okresu ważności zestawu.

### Przygotowanie roztworu do płukania

Umieścić zawartość fiołki w 950 mL wody destylowanej i zamieszać. Płyn może być przechowywany w 2-8°C, zgodnie z datą ważności zestawu.

### Ekstrakcja próbek (opcjonalnie; patrz § Ograniczenia)

Uwaga: Ekstrakcja musi być przeprowadzona w czystych szklanych fiołkach lub probówkach, przepłukanych eterem etylowym i zakrytych teflonowym lub szklanym korkiem.

Tylko próbki są ekstrahowane przed oznaczaniem; nie ekstrahować kalibratorów.

- Przed ekstrakcją próbki doprowadzić do temperatury pokojowej.
- Ponumerować jedną fiołkę dla każdej próbki.
- Dodać 200 µL próbki do odpowiadającej jej fiołki.

- Dodać 5 mL eteru etylowego do każdej fiołki. Zakorkować dokładnie.
- Energicznie zamieszać wirowo (Vortex: 2 x 1 minuta)
- Pozostawić fiołki na stole przez minimum 5 minut.
- Pobrać ostrożnie 2,5 mL fazy organicznej bez zanieczyszczania fazą wodną i umieścić w ponumerowanej szklanej probówce.
- Odparować całkowicie fazę eteru przy użyciu wyparki (np. typu speedvac) lub umieszczając probówki z próbką w łaźni wodnej 37°C.

Uwaga 1: Probówki muszą być mocno umocowane w statywie, ponieważ po odparowaniu eteru etylowego staną się lżejsze i będą miały tendencję do zmiany położenia.

Na tym etapie procedura może być przerwana. Zakorkowane probówki z suchym ekstraktem można przechowywać w 2-8°C do 7 dni, przed kontynuowaniem oznaczenia.

- Ponownie rozpuścić suchy eterowy ekstrakt w 200 µL kalibratora zero Zamieszać intensywnie wirowo (Vortex: 30 sekund, 2000 obrotów/min.), odczekać 15 minut i ponownie mieszać wirowo.

Uwaga 2: Jeżeli konieczna jest większa objętość, zamiast pobierania 2,5 mL fazy organicznej, umieścić fiołki w <-18°C do zamarznięcia fazy wodnej, pobrać ostrożnie 5 mL fazy organicznej bez zanieczyszczenia fazą wodną, odparować i ponownie rozpuścić w 400 µL kalibratora zero.

### Procedura oznaczane immunologicznego

Wszystkie odczynniki przed pipetowaniem należy doprowadzić do temperatury pokojowej.

Etap 1 Dodawanie	Etap 2 Inkubacja	Etap 3 Zliczanie
Do pokrytych przeciwciałem probówek dodać kolejno: 25 µL kalibratora, kontroli, próbki lub 50 µL ekstraktu i 400 µL znacznika* Zamieszać.	Inkubować 120 minut w 18 - 25°C z wytrząsaniem (≥280 obr/min)	Odciągnąć dokładnie zawartość probówek (z wyjątkiem 2 „całkowite cpm”) Przepłukać dwukrotnie 2 mL płynu do płukania. Odessać.  Zliczać związane cpm (B) i całkowite cpm (T) 1 min.

\*Dodać 400 µL znacznika do 2 dodatkowych probówek, aby otrzymać całkowite cpm

## WYNIKI

Wyniki należy odczytać z krzywej standardowej. Krzywa standardowa służy do oznaczania stężenia 17 OH-P w próbkach mierzonych w tym samym czasie co kalibratory.

### Krzywa standardowa

Wyniki w dziale kontroli jakości obliczono przy użyciu krzywej *składanej* dopasowania do  $B/T$  lub  $B/B_0$  na osi pionowej w skali logit i stężeniem analitu w kalibratorach na logarytmicznej osi poziomej (ng/mL).

Zastosowanie innych metod do opracowania danych może dać nieco inne wyniki.

Łączna aktywność: 179 362 cpm				
Kalibratory	17OH-P (ng/mL)	cpm (n=3)	B/T (%)	B/B <sub>0</sub> (%)
0	0	55 975	31,21	100,0
1	0,12	44 882	25,02	80,18
2	0,40	31 190	17,39	55,72
3	1,90	12 557	7,00	22,43
4	12,5	2515	1,40	4,49
5	50,0	895	0,50	1,60

(Przykładowe wartości do krzywej wzorcowej, nie do zastosowania)

### Próbki

Dla każdej próbki odnajdź  $B/T$  lub  $B/B_0$  na osi pionowej i odczytaj odpowiadające tej wartości stężenie 17 OH-P, znajdujące się na osi poziomej.

Aby przeliczyć ng/mL na nmol/L (nM) pomnóż wynik przez 3.026.

## OCZEKIWANE WARTOŚCI

Sugeruje się, aby w każdym laboratorium ustalono własne wartości normalne. Poniższe wartości otrzymano tylko od osób zdrowych i są one jedynie wskazówką:

Adults	N	Mediana	Min.	Maks.	2.5%	97.5%
					percenty	percenty
(ng/mL)						
Mężczyźni	55	0,93	0,53	2,22	0,55	1,99
Kobiety						
Faza folikularna	111	0,48	0,13	1,67	0,21	1,45
Faza lutealna	112	1,52	0,42	3,20	0,61	2,88
Szczyt przedowulacyjny	22	1,39	0,54	2,04	0,55	2,01
Antykoncepcja	30	0,37	0,17	1,48	0,18	1,47
Kobiety po menopauzie	38	0,38	0,13	0,92	0,16	0,79
1. trymestr ciąży	45	2,03	0,78	5,75	0,93	3,82
2. trymestr ciąży	44	2,23	0,60	6,86	1,23	3,70

Szczegółowe informacje dotyczące oczekiwanych wartości u dzieci (wg wieku i płci) można znaleźć w dodatku z danymi "APPENDIX".

## KONTROLA JAKOŚCI

Dobrze funkcjonujące laboratorium dla swej wiarygodności stosuje regularnie wewnętrzną kontrolę jakości otrzymanych wyników. Te próbki muszą być przygotowywane i oznaczane zgodnie z procedurą. Ich przydatność do oceny każdego zestawu będzie właściwa przy zastosowaniu odpowiedniej analizy statystycznej.

W przypadku uszkodzenia paczki lub jeżeli opracowanie otrzymanych wyników sprawia trudności proszę się kontaktować z miejscowym dystrybutorem lub pod adresem E-mail: imunochem@beckman.com

## CHARAKTERYSTYKA TESTU

(Po więcej wiadomości zajrzyj do zestawu danych w "DODATKU")

Reprezentatywne dane są przedstawiane tylko do celów ilustracyjnych. Uzyskiwane parametry mogą się różnić w zależności od laboratoriów.

### Czułość

Granica wykrywalności (LoD): 0,07 ng/mL

Wartość LoD 17 OH-P wynosi 0,07 ng/mL, określona zgodnie z dokumentem EP17-A2 CLSI [1] na podstawie proporcji wyników fałszywie dodatnich ( $\alpha$ ) mniej niż 5% i fałszywie ujemnych ( $\beta$ ) mniej niż 5%; wykorzystując oznaczenia 120 próbek ślepych i 120 próbek o niskim stężeniu; wartość granicy próby ślepej (LoB) wynosi 0,04 ng/mL.

### Specyficzność

Przeciwciało zastosowane w oznaczeniu immunochemicznym jest swoiste wobec 17- $\alpha$ -hydroksyprogesteronu.

### Precyzja

#### Powtarzalność i precyzja wewnątrzlaboratoryjna

Precyzja oznaczenia została określona zgodnie z wytycznymi w dokumencie EP05-A3 CLSI [2]. W przypadku powtarzalności, współczynniki zmienności

były równe lub niższe od 10,5% dla próbek surowicy. W przypadku precyzji wewnątrzlaboratoryjnej, współczynniki zmienności były równe lub niższe od 12,8% dla próbek surowicy.

### Kontrola dokładności

#### Liniowość

Wykazano, że oznaczenie jest liniowe w zakresie od 0,12 do 50,88 ng/mL przy użyciu próbek surowicy (zgodnie z wytycznymi w dokumencie EP06-A CLSI [3]).

#### Test rozcieńczenia

Próbki surowicy o wysokim stężeniu zostały rozcieńczone wielokrotnie w kalibratorze zerowym. Odsetki odzysku wahały się od 95,7% do 119%.

#### Test odzysku

Do próbek surowicy dodano znane ilości 17 OH-P. Odsetki odzysku wynosiły od 100% do 119%.

**Zakres pomiarowy** (od LoD do najwyższego kalibratora):

od 0,07 ng/mL do około 50 ng/mL

## OGRANICZENIA

Niestosowanie się do instrukcji załączonej do zestawu może znacznie wpływać na wyniki.

Wyniki powinny być interpretowane w świetle całkowitego obrazu klinicznego pacjenta, włączając historię choroby, dane z innych testów i inne stosowne informacje.

Po więcej wiadomości zajrzyj do zestawu danych w "DODATKU".

Bardzo małe dzieci (szczególnie w wieku poniżej 6 miesięcy) mają bardzo wysokie stężenie siarczanu 17 OH-pregnenolonu. Z tego szczególnego powodu zalecana jest ekstrakcja 17 OH-P przed jego oznaczeniem.

Można zaobserwować fałszywie wysokie stężenie 17 OH-P w próbkach od pacjentów regularnie przyjmujących spironolakton. Aby wykluczyć tego rodzaju interferencję, pacjent przed oznaczeniem 17 OH-P musi przerwać terapię spironolaktonem na trzy tygodnie.

W przypadku oznaczeń z wykorzystaniem przeciwciał istnieje możliwość zakłóceń spowodowanych przez obce przeciwciała w próbce pacjenta. Pacjenci, którzy byli regularnie wystawieni na kontakt ze zwierzętami lub byli poddawani immunoterapii lub zabiegom diagnostycznym z użyciem immunoglobulin lub fragmentów immunoglobulin, mogą wytworzyć przeciwciała (np. HAMA) zakłócające wyniki oznaczeń immunologicznych.

Takie przeciwciała zakłócające mogą prowadzić do uzyskania błędnych wyników. Należy starannie przeanalizować wyniki u pacjentów z podejrzeniem obecności tych przeciwciał.

# RIA 17 $\alpha$ - Hydroxyprogesterone

**REF** IM1452

## IN VITRO RADIOIMUNOANALYTICKÉ STANOVENÍ 17 $\alpha$ -HYDROXYPROGESTERONU V LIDSKÉM SÉRU A PLAZMĚ

Pro diagnostické účely *in vitro*.

### PRINCIP

Radioimunoanalytické stanovení 17 $\alpha$ -Hydroxyprogesteronu (17 OH-P) je kompetitivní stanovení. Tato souprava může být použita buď pro stanovení 17 OH-P

přímo v séru nebo EDTA-plazmě

nebo po extrakci vzorku éterem, odpaření rozpouštědla a po následném rozpuštění suchých extraktů v nulovém kalibrátoru.

Vzorky séra nebo plazmy, extrakty, kontrolní vzorky a kalibrátory se inkubují s radioindikátorem 125I -značeným 17 OH-P ve zkumavkách potažených protilátkou. Po inkubaci se obsah zkumavek vymyje, aby se odstranil nenasávaný značený 17 OH-P. Vázaná aktivita 125I se poté měří na gama-čítači. Sestrojí se kalibrační křivka a z ní se odečtou koncentrace 17 OH-P v neznámých vzorcích.

### VAROVÁNÍ A OPATŘENÍ

Obecné poznámky:

- Lahvičky s kalibrátory a kontrolními vzorky by měly být otevřené co nejkratší dobu, aby nedošlo k nežádoucímu odpaření roztoku.
- Nemíchejte substance ze souprav různých šarží.
- Pro každou novou sérii analýz je nutné provést novou kalibraci.
- Doporučuje se imunoanalytické stanovení provádět v duplikátech.
- Každá zkumavka může být použita jen jednou.

#### Základní pravidla radiační bezpečnosti

Tento radioaktivní materiál mohou přijímat, skladovat a používat pouze pracoviště, která splňují platné zákonné předpisy upravující podmínky pro bezpečné nakládání s otevřenými radionuklidovými zářiči. Při práci s radioaktivními látkami dodržujte následující pravidla:

- Všechny radioaktivní látky musí být skladovány v původním balení a jen na místech k tomu určených.
- Příjem a spotřeba radioaktivních látek musí být evidována.
- Práce s radioaktivními látkami musí být prováděny pouze ve vyhrazených prostorách.
- Pipetování nesmí být prováděno ústy.
- V laboratořích určených k práci s radioaktivními látkami je zakázáno jíst, pít, kouřit, líčit se a pod.
- Obalový materiál, který není kontaminován, je možno odložit do běžného odpadu pouze po odstranění varovných nápisů a značek.
- Povrch pracovních stolů, který by mohl být kontaminován, je třeba pravidelně kontrolovat. Všechno laboratorní sklo, které bylo použito pro práci s radioaktivními látkami, musí být řádně dekontaminováno a proměřeno před dalším použitím.
- V případě kontaminace nebo úniku radioaktivního materiálu postupujte podle stanovených předpisů.
- Radioaktivní odpad likvidujte v souladu s platnými zákony a předpisy.

#### Azid sodný

Některé substance jsou konzervovány azidem sodným. Azid sodný může reagovat s olovem, mědí nebo mosazí za vzniku příslušných výbušných azidů. Proto likvidované reagentie splachujte velkým množstvím vody.

#### Materiál lidského původu

Materiál lidského původu obsažený v reagentiích této soupravy měl negativní test na přítomnost protilátek proti viru HIV 1 a 2, viru hepatitidy C a proti povrchovému antigenu hepatitidy B (HBsAg). Žádná z dostupných metod nemůže dát stoprocentní jistotu neinfekčnosti. Je tedy nutné pracovat s těmito reagentiemi jako s potenciálně infekčními.

Se všemi vzorky séra a plazmy musí být manipulováno jako s potenciálně infekčními (hepatitis nebo AIDS). Veškerý vzniklý odpad je třeba likvidovat podle platných předpisů.

#### Etyléter

PI-IM1452-07

Etyléter je vysoce těkavé a hořlavé rozpouštědlo. Extrakce a odpaření musí být provedeny v digestoři. Zabraňte styku s otevřeným ohněm. Nepipetujte ústy.

### KLASIFIKACE NEBEZPEČÍ PODLE GHS

Promývací roztok (20X) NEBEZPEČÍ



H360	Může poškodit reprodukční schopnost nebo plod v těle matky.
P201	Před použitím si obzarejte speciální instrukce.
P280	Používejte ochranné rukavice, ochranný oděv a ochranné brýle/obličejový štít.
P308+P313	PŘI expozici nebo podezření na ni: Vyhledejte lékařskou pomoc/ošetření. Kyselina boritá 0,1 - 0,3 % Boritan sodný, dekahydrát 0,1 - 0,3 %

**SDS**

Bezpečnostní list je k dispozici na adrese  
techdocs.beckmancoulter.com

### SBĚR A PŘÍPRAVA, SKLADOVÁNÍ A ŘEDĚNÍ VZORKŮ

- Odebírejte vzorky krve do zkumavek bez aditiv nebo s EDTA.
- Centrifugací oddělte od buněk frakci séra nebo plazmy.
- Vzorky séra a plazmy lze uchovávat při 2-8 °C, jestliže bude stanovení provedeno do 24 hodin. Při delším uchování je nutno vzorky zamrazit při (< -18 °C, maximálně 1 rok), nejlépe v alikvotech, aby se předešlo opakovanému rozmrazování a zmrazování. Rozmrazování provádějte při laboratorní teplotě.
- Je-li koncentrace ve vzorku vyšší než v nejvyšším kalibrátoru, je nutno vzorky ředit nulovým kalibrátorem.

Hodnoty 30 vzorků séra a plazmy s EDTA (hodnoty v séru byly v rozsahu od 0,24 do 1,88 ng/ml) byly porovnány pomocí soupravy 17 OH-P RIA. Byly získány následující výsledky:

[plazma s EDTA] = 0,9026[sérum] + 0,0283,

R = 0,9747

### POSKYTNUTÉ MATERIÁLY

Všechny reagentie v soupravě jsou stabilní do data expirace, uvedeného na štítku krabice, jestliže jsou skladovány při 2-8 °C. Data expirací uvedené na štítcích jednotlivých složek se vztahují pouze k dlouhodobému skladování u výrobce před kompletací souprav. Neberte na ně tedy, prosím, ohled.

Skladovací podmínky pro zředěné nebo rekonstituované reagentie jsou uvedeny v odstavci Postup.

**Zkumavky potažené polyklonální protilátkou proti 17 OH-P: 2 x 50 zkumavek** (připraveny k použití)

**17 $\alpha$ -Hydroxyprogesteron, značený 125I: 1 lahvička (45 ml);** připravena k použití.

Lahvička obsahuje ke dni výroby <640 kBq 125I značeného 17 OH-P v tlumivém roztoku s hovězím sérovým albuminem a barvivem.

Poznámka: Případný výskyt sraženiny v radioindikátoru nemá vliv na kvalitu stanovení.

**Kalibrátory: 1 lahvička (2 ml), 5 lahviček (po 0,5 ml);** připravené k použití.

Lahvičky s kalibrátory obsahují 0 až přibližně 50 ng/ml (0 až přibližně 151 nmol/l) 17 OH-P v lidském séru s azidem sodným (< 0,1 %). Přesná koncentrace je uvedena na štítku každé lahvičky. Kalibrátory jsou ověřovány podle interního referenčního standardu.

Nulový kalibrátor (5 ml) je možno objednat samostatně (kat.č. B23373).

## Kontrolní vzorky: 2 lahvičky (lyofilizované).

Lahvičky obsahují lyofilizovaný 17 OH-P v lidském séru s azidem sodným (<0,1 %). Obsah lahviček se rozpustí v destilované vodě, její objem je uveden na štítku lahvičky. Koncentrační rozmezí očekávaných hodnot jsou uvedena v příloze návodu.

## Promývací roztok 20x: 1 lahvička 50 ml

Koncentrovaný roztok musí být před použitím zředěn.

## VYŽADOVANÉ, ALE NEPOSKYTNUTÉ MATERIÁLY

Kromě obvyklého laboratorního zařízení je pro analýzu potřebné následující vybavení:

Pro stanovení:

- přesná mikropipeta (25 µl a 400 µl),
- nastavitelný opakovací dávkovač (25 µl, 400 µl; 2 ml),
- Vibrační míchadlo.
- Horizontální nebo orbitální třepačka.
- Vývěva.
- gama-čítač, kalibrovaný na <sup>125</sup>I

Pro extrakční krok (volitelné):

- přesná mikropipeta (200 µl),
- Skleněné pipety (2,5 ml, 5 ml, 10 ml).
- Skleněné lahvičky (6 ml-15 ml).
- Skleněné zkumavky na éterovou fázi.
- Odparka (typu Speed Vac) nebo 37 °C vodní lázeň.
- etyléter p.a.

## POSTUP

### Příprava a skladování reagensů

Vytemperujte všechny reagensy na laboratorní teplotu.

### Příprava kontrolních vzorků

Obsah lahviček se rozpustí v destilované vodě, její objem je uveden na štítku lahvičky. Po přidání vody nechte kontrolní vzorky volně rozpouštět 10 minut a potom lehce bez napěnění promíchejte. Rozpuštěné kontrolní vzorky skladujte ve 2-8 °C do data expirace soupravy.

### Příprava promývacího roztoku

Obsah lahvičky přidejte k 950 ml destilované vody a promíchejte. Zředěný roztok může být skladován při 2-8 °C do data expirace soupravy.

### Extrakce vzorku (volitelná; viz § Omezení)

Poznámka: Extrakce musí být provedena v čistých skleněných lahvičkách nebo zkumavkách, předem vypláchnutých éterem.

Před stanovením se extrahují pouze vzorky; neextrahujte kalibrátory.

- Před extrakcí nechte vzorky vytemperovat na lab. teplotu a řádně je promíchejte.
- Očísľujte pro každý vzorek jednu lahvičku.
- Napipetujte do odpovídajících lahviček po 200 µl vzorku
- Přidejte 5 ml etyléru do každé lahvičky, důkladně uzavřete.
- Lahvičky energicky promíchejte na míchadle typu Vortex (2 x 1 minutu).
- Ponechte lahvičky při laboratorní teplotě minimálně 5 minut.
- Opatrně odeberte 2,5 ml organické fáze, aby nedošlo ke kontaminaci vodnou fází a přeneste ji do očísľovaných skleněných zkumavek.
- Éterovou fázi zcela odpařte buď v odpařovači (např. typu speedvac) nebo zkumavky umístíte do vodní lázně o teplotě 37 °C.

Pozor: Zkumavky musí být pevně připevněny ke stojánku, protože po odpaření éteru se stanou lehčími a mají tendenci uplavat.

V tomto stádiu je možno zkumavky obsahující suchý extrakt uzavřít a skladovat je až 7 dní v chladu (2-8 °C) před další analýzou.

- Suché éterové extrakty rozpustíte ve 200 µl kalibrátoru 0. Důkladně promíchejte na míchadle (30 s, 2000 rpm), nechte 15 minut rozpouštět a znovu promíchejte na vibračním míchadle.

Poznámka: Pokud je potřebný větší objem vzorku, místo odebrání 2,5 ml éteru, zamrazte lahvičky při <-18 °C dokud vodná fáze nezmrzne, poté opatrně slejte organickou fázi (5 ml) aby nedošlo ke kontaminaci vodnou fází, odpařte a rozpustíte ve 400 µl kalibrátoru 0.

### Schéma postupu imunoanalytického stanovení

Nechte reagensy před pipetací vytemperovat na laboratorní teplotu.

Krok 1 Pipetace	Krok 2 Inkubace	Krok 3 Měření
Do potažených zkumavek postupně přidejte:  25 µl kalibrátoru, kontrolního vzorku, neznámého vzorku nebo 50 µl extraktu a 400 µl radioindikátoru* Promíchejte.	Inkubujte 2 h při 18-25 °C za stálého třepání (≥280 kmitů/min.)	Opatrně odsajte obsah každé zkumavky (s výjimkou 2 zkumavek pro T).  2 x promyjte 2 ml promývacího roztoku a odsajte.  Měřte po dobu 1 min. vázanou aktivitu (B) a celkovou aktivitu (T).

\*Napipetujte po 400 µl radioindikátoru do 2 nepotažených zkumavek pro zjištění celkové aktivity (T).

## VÝSLEDKY

Výsledky se získají interpolací z kalibrační křivky, která slouží pouze pro analýzu těch vzorků, které byly inkubovány společně s kalibrátory.

### Kalibrační křivka

Výsledky v sekci kontroly kvality byly vypočteny za použití aproximační křivky *spline* s parametrem *B/T* nebo *B/B<sub>0</sub>* na svíslé ose logit a koncentrací analytu v kalibrátorech na vodorovné log ose (ng/ml).

Jiné metody zpracování mohou dávat mírně rozdílné výsledky.

Celková aktivita: 179 362 cpm				
Kalibrátory	17OH-P (ng/ml)	cpm (n=3)	B/T (%)	B/B <sub>0</sub> (%)
0	0	55 975	31,21	100,0
1	0,12	44 882	25,02	80,18
2	0,40	31 190	17,39	55,72
3	1,90	12 557	7,00	22,43
4	12,5	2 515	1,40	4,49
5	50,0	895	0,50	1,60

(Příklad typického stanovení, nepoužívejte pro výpočet.)

### Vzorky

Na vertikální ose lokalizujte pro každý vzorek hodnoty B/T nebo B/B<sub>0</sub> a na horizontální ose odečtěte odpovídající koncentrace 17 OH-P v ng/ml.

Přepocet koncentrací z ng/ml na nmol/l se provede vynásobením výsledku faktorem 3,026.

## OČEKÁVANÉ HODNOTY

Každá laboratoř by si měla stanovit vlastní rozmezí referenčních hodnot. Následující hodnoty byly získány u zdravých jedinců a jsou zde uvedeny pro informaci.

Adults	N	Medián	Min.	Max.	2,5 %	97,5 %
					percentil	percentil
(ng/ml)						
Muži	55	0,93	0,53	2,22	0,55	1,99
Ženy						
Folikulární fáze	111	0,48	0,13	1,67	0,21	1,45
Luteální fáze	112	1,52	0,42	3,20	0,61	2,88
Preovulační pik	22	1,39	0,54	2,04	0,55	2,01
Antikoncepce	30	0,37	0,17	1,48	0,18	1,47
Ženy po menopauze	38	0,38	0,13	0,92	0,16	0,79
1. trimestr těhotenství	45	2,03	0,78	5,75	0,93	3,82
2. trimestr těhotenství	44	2,23	0,60	6,86	1,23	3,70



**Detailní informace o očekávaných hodnotách dětských vzorků (seřazených podle věku a pohlaví) jsou uvedeny v příloze "APPENDIX"**

## KONTROLA KVALITY

Správná laboratorní praxe předpokládá řádné a pravidelné používání kontrolních vzorků, aby mohla být zajištěna kontrola kvality stanovených výsledků. Kontrolní vzorky musí být stanoveny naprosto stejným způsobem jako neznámé vzorky a k vyhodnocení výsledků se mají použít vhodné statistické metody.

V případě závažného poškození obalu, nebo jestliže získané výsledky nejsou ve shodě s analytickými parametry stanovení, kontaktujte prosím naše odborné pracovníky. E-mail: [imunochem@beckman.com](mailto:imunochem@beckman.com)

## FUNKČNÍ CHARAKTERISTIKY

*(Podrobnosti jsou uvedeny v příloze "APPENDIX")*

Vzorová data slouží pouze k ilustrativním účelům. Výsledky získané v jednotlivých laboratořích se mohou lišit.

### Citlivost

**Mez měřitelnosti (LoD):** 0,07 ng/ml

Hodnota LoD pro 17 OH-P je 0,07 ng/ml a byla stanovena v souladu s pokyny uvedenými v dokumentu CLSI EP17-A2 [1] na základě podílu falešně pozitivních výsledků ( $\alpha$ ), který byl menší než 5 %, a podílu falešně negativních výsledků ( $\beta$ ), který byl menší než 5 %. Hodnota byla stanovena testováním 120 prázdných vzorků a 120 vzorků s nízkou hladinou. Mez prázdného vzorku (LoB) je 0,04 ng/ml.

### Specifita

Protilátka použitá v imunochemické analýze je specifická pro 17- $\alpha$ -hydroxyprogesteron.

### Přesnost

#### Opakovatelnost a laboratorní přesnost

Preciznost tohoto rozboru byla určena v souladu se směrnicemi uvedenými v dokumentu CLSI EP05-A3 [2]. Co se týká opakovatelnosti, jsou zjištěné variační koeficienty pro vzorky séra menší než nebo rovny 10,5 %. Variační koeficienty preciznosti v rámci laboratoře byly u vzorků séra stanoveny jako menší než nebo rovny 12,8 %.

### Správnost

#### Linearita

Rozbor ukázal lineární průběh od 0,12 do 50,88 ng/ml s použitím vzorků séra (stanoveno v souladu s pokyny uvedenými v dokumentu CLSI EP06-A [3]).

### Test ředění

Vzorky séra s vysokou koncentrací byly sériově zředěny nulovým kalibrátorem. Procenta výtěžnosti byla v rozsahu 95,7 % až 119 %.

### Test „recovery“

Ke vzorkům séra byla přidána známá množství 17 OH-P. Procenta výtěžnosti byla v rozsahu 100 % až 119 %.

**Rozsah stanovení** (od LoD do nejvyššího kalibrátoru):

0,07 ng/ml až přibližně 50 ng/ml

## OMEZENÍ

Nedodržení instrukcí uvedených v tomto návodu může vést k nesprávným výsledkům.

Výsledky stanovení by měly být interpretovány ve světle celkového klinického obrazu pacienta včetně anamnézy, údajů z dalších testů a jiných vhodných informací.

Podrobnosti jsou uvedeny v příloze "APPENDIX".

Velmi malé děti (mladší než 6 měsíce) mají velmi vysoké hodnoty 17OH-pregnenolonu sulfátu. V tomto případě doporučujeme extrakci vzorku éterem před vlastním stanovením 17 OH-P.

I když byla zjištěna velmi nízká zkřížená reakce, mohou se naměřit vysoké hodnoty 17-OHP u pacientů s pravidelnými dávkami spironolaktону. Terapie spironolaktónem by proto měla být přerušena nejméně 3 týdny před stanovením, aby se zabránilo interferenci.

U stanovení využívajících protilátky existuje možnost interference heterofilních protilátek přítomných v patientském vzorku. Pacienti, kteří byli pravidelně ve styku se zvířaty nebo podstoupili imunoterapii nebo diagnostické procedury využívající imunoglobuliny nebo fragmenty imunoglobulinů, mohou produkovat protilátky jako například HAMA (Human Anti-Mouse Antibodies - lidské protilátky proti myším proteinům), které interferují při imunologických stanoveních.

Takové interferující protilátky mohou vést k chybným výsledkům. Výsledky pacientů, u nichž existuje podezření na přítomnost takovýchto protilátek, posuzujte s opatrností.

# RIA 17 $\alpha$ - Hydroxyprogesterone

**REF** IM1452

## IN VITRO RÁDIOIMUNOANALYTICKÉ STANOVENIE 17 $\alpha$ -HYDROXYPROGESTERÓNU V ĽUDSKOM SÉRE A PLAZME

Na *in vitro* diagnostické použitie.

### PRINCÍP

Rádioimunoanalytické stanovenie 17 $\alpha$ -Hydroxyprogesterónu (17 OH-P) je kompetitívne stanovenie. Táto súprava sa môže použiť na stanovenie 17 OH-P

priamo v sére alebo EDTA plazme,

alebo na jeho stanovenie po extrakcii vzorky éterom, odparení rozpúšťadla a po následnom rozpustení suchých extraktov v nulovom kalibrátore.

Vzorky séra alebo plazmy, extrakty, kontrolné vzorky a kalibrátory sa inkubujú s rádioindikátorom 125I-označeným 17 OH-P v skúmavkách potiahnutých protilátkou. Po inkubácii sa obsah skúmaviek vymyje, aby sa odstránil nenaviazaný označený 17 OH-P. Viazaná aktivita 125I sa potom meria na gama-merači. Zostrojí sa kalibračná krivka a z nej sa odčítajú koncentrácie 17 OH-P v neznámych vzorkách.

### VÝSTRAHA A OPATRENIA

Obecné poznámky:

- Fľaštičky s kalibrátormi a kontrolnými vzorkami môžu byť otvorené čo najkratšiu dobu, aby nedošlo k nežiaducemu odparení roztoku.
- Nemiešajte substancie zo súprav rôznych šarží.
- Ku každému radu stanovení je treba vždy stanoviť novú kalibračnú závislosť.
- Doporučuje sa robiť imunoanalytické stanovenie v duplikátoch.
- Skúmavky sú iba na jedno použitie.

#### Základné pravidlá radiačnej bezpečnosti

Táto súprava obsahuje rádioaktívny materiál, ktorý môžu prijímať, skladovať a používať iba pracovníci, ktorí spĺňajú platné zákonné predpisy upravujúce podmienky pre bezpečné nakladanie s otvorenými rádionuklidovými zariadeniami. Pri práci s rádioaktívnymi látkami dodržujte nasledujúce pravidlá:

- Všetky rádioaktívne látky sa musia skladovať v pôvodnom balení a iba na miestach k tomu určených.
- Nesmie sa pipetovať ústami.
- Príjem a spotreba rádioaktívnych látok musia byť evidované.
- Práce s rádioaktívnymi látkami sa musia robiť iba vo vyhradených priestoroch.
- V laboratóriách určených na prácu s rádioaktívnymi látkami je zakázané jesť, piť, fajčiť, líčiť sa a pod.
- Obalový materiál, ktorý nie je kontaminovaný, možno odložiť do bežného odpadu až po odstránení výstražných nápisov a značiek.
- Povrch pracovných stolov, ktorý by mohol byť kontaminovaný, treba pravidelne kontrolovať.
- V prípade kontaminácie alebo úniku rádioaktívneho materiálu postupujte podľa stanovených predpisov.
- Rádioaktívny odpad likvidujte v súlade s platnými zákonmi a predpismi.

#### Azid sodný

Niektoré substancie sú konzervované azidom sodným. Azid sodný môže reagovať s olovom, meďou alebo mosadzou za vzniku príslušných výbušných azidov. Preto likvidované reagenty splachujte veľkým množstvom vody.

#### Materiál ľudského pôvodu

Materiál ľudského pôvodu obsiahnutý v reagentoch tejto súpravy mal negatívny test na prítomnosť protilátok proti vírusu HIV 1 a 2, vírusu hepatitídy C a proti povrchovému antigénu hepatitídy B (HBsAg). Žiadna z dostupných metód nedáva stopercentnú istotu neinfekčnosti. Je teda nutné pracovať s týmito reagentami ako s potenciálne infekčnými.

So všetkými vzorkami séra a plazmy musí byť manipulované ako s potenciálne infekčnými (hepatitis, alebo AIDS). Všetok vzniknutý odpad treba likvidovať podľa platných predpisov.

#### Etyléter

PI-IM1452-07

Etyléter je vysoko prchavý a horľavý rozpúšťadlo. Extrakcia a odparenie sa musia robiť v digestóriu. Zabráňte styku s otvoreným ohňom. Nepipetujte ústami.

### KLASIFIKÁCIA RIZÍK PODĽA GHS

Premývací roztok (20x) NEBEZPEČENSTVO



H360	Môže poškodiť plodnosť alebo nenarodené dieťa.
P201	Pred použitím sa oboznámte s osobitnými pokynmi.
P280	Noste ochranné rukavice, ochranný odev a ochranné okuliare/ochranu tváre.
P308+P313	Po expozícii alebo podozrení z nej: Vyhľadajte lekársku pomoc/starostlivosť. Kyselina boritá 0,1 - 0,3 % Dekahydrát boritanu sodného 0,1 - 0,3 %

**SDS**

Bezpečnostný list je k dispozícii na stránkach [techdocs.beckmancoulter.com](http://techdocs.beckmancoulter.com)

### ZBER A PRÍPRAVA, SKLADOVANIE A RIEDENIE VZORIEK

- Odoberajte vzorky krvi do skúmaviek bez aditív, alebo s EDTA.
- Centrifugáciou oddelíte od buniek frakciu séra alebo plazmy.
- Vzorky séra a plazmy sa môžu skladovať pri 2-8 °C, ak sa stanovenie urobí do 24 hodín. Pri dlhšom skladovaní treba vzorky zmraziť pri < -18 °C (maximálne 1 rok) najlepšie v alikvótoch, aby sa zabránilo opakovanému zmrazovaniu a rozmrazovaniu. Rozmrazenie vzorky sa vykonáva pri izbovej teplote.
- Ak majú vzorky vyššiu koncentráciu ako má najvyšší kalibrátor je potrebné ich zriediť nulovým kalibrátorom.

Hodnoty v sére a EDTA plazme pre 30 vzoriek (hodnoty v sére od 0,24 do 1,88 ng/ml) boli porovnané s využitím súpravy 17 OH-P RIA. Výsledky sú takéto:

[EDTA plazma] = 0,9026[sérum] + 0,0283,

R = 0,9747

### POSKYTOVANÝ MATERIÁL

Všetky reagenty v súprave sú stabilné do dátumu expirácie, uvedeného na štítku krabice, ak sú skladované pri 2-8 °C. Dátumy expirácií uvedené na štítkoch jednotlivých zložiek sa vzťahujú iba na dlhodobé skladovanie u výrobcu pred kompletizáciou súprav. Neberte na ne, prosím, ohľad.

Skladovacie podmienky pre činidlá po rekonštitúcii alebo zriedení sú uvedené v odseku Postup.

**Skúmavky potiahnuté protilátkou proti 17 OH-P: 2 x 50 skúmaviek** (prípravené na použitie)

**17 $\alpha$ -Hydroxyprogesterón označený 125I: 1 fľaštička 45 ml** (prípravená na použitie)

Fľaštička obsahuje ku dňu výroby menej ako 640 kBq 125I označeného 17 OH-P v tlmivom roztoku s proteínmi a farbivom.

Poznámka: Prípadný výskyt zrazeniny v rádioindikátore nemá vplyv na kvalitu stanovenia.

**Kalibrátory: 1 fľaštička 2 ml, 5 fľaštičiek 0,5 ml** (prípravené na použitie)

Fľaštičky s kalibrátorom obsahujú 0 až približne 50 ng/ml (0 až približne 151 nmol/l) 17 OH-P v ľudskom sére s azidom sodným (< 0,1 %). Presná koncentrácia je uvedená na štítku každej fľaštičky. Kalibrátory boli overené voči internému referenčnému štandardu.

Nulový kalibrátor (5 ml) je možné objednať zvlášť (cat. B23373).

**Kontrolné vzorky: 2 fľaštičky;** lyofilizáty.

Kontrolné vzorky obsahujú 17 OHP v ľudskom sére s azidom sodným (<0,1 %). Koncentračný rozsah očakávaných hodnôt je uvedený na štítku fľaštičky.

## Premývaci roztok (20x): 1 fľaštička (50 ml).

Koncentrovaný roztok sa musí pred použitím zriediť.

## POTREBNÝ MATERIÁL, KTORÝ SA NEPOSKYTUJE

Okrem obvyklého laboratórneho zariadenia je pre analýzu potrebné nasledujúce vybavenie:

Pre stanovenie:

- Presná mikropipeta (25 µl a 400 µl).
- Poloautomatická pipeta (25 µl, 400 µl a 2 ml).
- Vibračné miešadlo.
- horizontálna alebo orbitálna trepačka
- Výveva.
- gama-merač kalibrovaný na <sup>125</sup>I

Pre extrakčný krok (voliteľné):

- presná mikropipeta (200 µl),
- Sklenené pipety (2,5 ml, 5 ml, 10 ml).
- Sklenené fľaštičky (od 6 ml do 15 ml).
- Sklenené skúmavky na éterovú fázu.
- Odparka (typu Speed Vac) alebo 37 °C vodný kúpeľ.
- Etyléter p.a.

## POSTUP

### Príprava reagensí

Vytemperujte všetky reagensy na laboratórnu teplotu.

### Príprava kontrolných vzoriek

Obsah fľaštičiek sa rozpustí v objeme destilovanej vody uvedenej na etikete. Počkajte 10 min a po rozpustení jemne premiešajte, aby ste zabránili peneniu pred pipetovaním. Uchovávajte rozpustené pri 2-8 °C až do expirácie súpravy.

### Príprava premývacieho roztoku

Obsah fľaštičky pridajte k 950 ml destilovanej vody a premiešajte. Zriedený roztok sa môže skladovať pri 2-8 °C do dátumu expirácie súpravy.

### Extrakcia vzoriek (voliteľná; vid' § Obmedzenia)

Poznámka: Extrakcia sa musí urobiť v čistých sklenených fľaštičkách alebo skúmavkách vopred vypláchnutých éterom.

Pred stanovením sa extrahujú iba vzorky; neextrahujte kalibrátory.

- Pred extrakciou nechajte vzorky vytemperovať na lab. teplotu a riadne ich premiešajte.
- Očíslujte pre každú vzorku jednu fľaštičku.
- Napipetujte do odpovedajúcich fľaštičiek po 200 µl vzorky.
- Pridajte 5 ml etyléru do každej fľaštičky a dôkladne uzavrite.
- Fľaštičky energicky premiešajte na miešadle typu Vortex (2x po 1 minúte).
- Nechajte fľaštičky na stole najmenej 5 min.
- Opatrne odoberte 2,5 ml organickej fázy tak, aby nedošlo ku kontaminácii vodnou fázou, a preneste ju do očíslovaných sklenených skúmaviek.
- Éterovú fázu nechajte úplne odpariť buď pomocou odparovača (napr. typu speedvac), alebo vložením skúmaviek do vodného kúpeľa s teplotou 37 °C.

Poznámka 1: skúmavky musia byť pevne pripevnené k stojančeku, pretože po odparení éteru budú ľahšie a môžu odplávať.

V tomto štádiu možno skúmavky so suchým extraktom uzavrieť a skladovať 7 dní v chlade (2-8 °C) pred ďalšou analýzou.

- Suché éterové extrakty rozpustíte v 200 µl. Dôkladne premiešajte na miešadle (30 sek, 2000 rpm.) a nechajte stáť 15 min a opäť dôkladne premiešajte.

Poznámka 2: Ak je potrebný väčší objem vzorky, miesto odobratie 2,5 ml éteru zamrazte fľaštičky pri <-18 °C až kým vodná fáza nezmrzne. Potom

opatrne zlejte organickú fázu (5 ml) tak, aby nedošlo ku kontaminácii vodnou fázou. Odparte a rozpustíte v 400 µl kalibrátora 0.

### Schéma postupu imunoanalytického stanovenia

Nechajte reagensy pred pipetovaním vytemperovať na laboratórnu teplotu.

Krok 1 Pipetácia	Krok 2 Inkubácia	Krok 3 Meranie
Do potiahnutých skúmaviek postupne pridajte:  25 µl kalibrátora, kontrolnej vzorky, neznámej vzorky Alebo 50 µl extraktu a 400 µl rádioindikátora a Premiešajte.	Inkubujte 120 minút pri 18- 25 °C za stáleho trepania (≥ 280 kmitov/min).	Pozorne odsajte obsah každej skúmavky (s výnimkou 2 skúmaviek T).  2 x premyte 2 ml premývacieho roztoku a odsajte.  Merajte 1 minútu viazanú aktivitu (B) a celkovú aktivitu (T)

\*Napipetujte po 400 µl rádioindikátora do 2 nepotiahnutých skúmaviek na zistenie celkovej aktivity (T)

## VÝSLEDKY

Výsledky sa získajú interpoláciou z kalibračnej krivky, ktorá sa používa iba pre analýzu tých vzoriek, ktoré sa inkubovali spolu s kalibrátormi.

### Kalibračná krivka

Výsledky boli na oddelení kontroly kvality vypočítané preloženie krivky metódou *spline*. Na logit vertikálnu os sa vyniesli hodnoty *B/T* alebo *B/B<sub>0</sub>* a na logaritmickej horizontálnej osi koncentrácie analytu v kalibrátoroch (ng/ml).

Iné metódy spracovania môžu dávať mierne rozdielne výsledky.

Celková aktivita: 179 362 cpm				
Kalibrátory	17OH-P (ng/ml)	cpm (n=3)	B/T (%)	B/B <sub>0</sub> (%)
0	0	55 975	31,21	100,0
1	0,12	44 882	25,02	80,18
2	0,40	31 190	17,39	55,72
3	1,90	12 557	7,00	22,43
4	12,5	2515	1,40	4,49
5	50,0	895	0,50	1,60

(Príklad typického stanovenia, nepoužívajte pre výpočet.)

### Vzorky

Na vertikálnu os naneste pre každú vzorku hodnoty *B/T* alebo *B/B<sub>0</sub>* a na horizontálnej osi odčítajte odpovedajúce koncentrácie 17α-OH-progesterónu v ng/mL.

Pri prepočte koncentrácií z ng/ml na nM (nmol/l) vynásobte výsledky faktorom 3,026.

## OČAKÁVANÉ HODNOTY

Každé laboratórium by si malo stanoviť vlastný rozsah referenčných hodnôt. Uvádzané hodnoty sa získali od zdravých jedincov a sú iba informačné.

Adults	N	Medián	Min.	Max.	2.5 %	97.5 %
					percentil	percentil
(ng/ml)						
Muži	55	0,93	0,53	2,22	0,55	1,99
Ženy						
Folikulárna fáza	111	0,48	0,13	1,67	0,21	1,45
Luteálna fáza	112	1,52	0,42	3,20	0,61	2,88
Preovulačný pík	22	1,39	0,54	2,04	0,55	2,01
Antikoncepčia	30	0,37	0,17	1,48	0,18	1,47
Ženy po menopauze:	38	0,38	0,13	0,92	0,16	0,79
Tehotenstvo 1. trimester	45	2,03	0,78	5,75	0,93	3,82
Tehotenstvo 2. trimester	44	2,23	0,60	6,86	1,23	3,70

Detailné informácie o očakávaných hodnotách detských vzoriek (zrodených podľa veku a pohlavia) sú uvedené v prílohe " APPENDIX "

## KONTROLA KVALITY

Správna laboratórna prax predpokladá riadne a pravidelné používanie kontrolných vzoriek, aby mohla byť zaistená kontrola kvality stanovených výsledkov. Kontrolné vzorky sa musia stanovovať úplne rovnakým spôsobom ako neznáme vzorky a na vyhodnotenie výsledkov sa majú použiť vhodné štatistické metódy.

V prípade závažného poškodenia obalu, alebo ak získané výsledky nie sú v zhode s analytickými parametrami stanovenia, kontaktujte prosím našich odborných pracovníkov. E-mail: imunochem@beckman.com

## VÝKONNOSTNÉ CHARAKTERISTIKY (podrobnosti sú uvedené v prílohe "APPENDIX")

Vzorové dáta slúžia iba k informačným účelom. Výsledky získané v jednotlivých laboratóriách sa môžu líšiť.

### Citlivosť

**Medza merateľnosti (LoD):** 0,07 ng/ml

LoD pre 17 OH-P je 0,07 ng/ml, stanovená v súlade s odporúčaniami v dokumente CLSI EP17-A2 [1] na základe podielu falošne pozitívnych výsledkov ( $\alpha$ ) menej ako 5 % a falošne negatívnych výsledkov ( $\beta$ ) menej ako 5 %; s využitím stanovení so 120 prázdnyimi vzorkami a 120 vzorkami s nízkou hladinou; medza prázdnej vzorky (LoB) je 0,04 ng/ml.

### Špecifita

Protilátka používaná pri tejto imunoanalýze je špecifická pre 17- $\alpha$ -hydroxyprogesterón.

### Presnosť

#### Opakovateľnosť a presnosť v rámci laboratória

Presnosť analytického testu bola stanovená v súlade s odporúčaniami v dokumente CLSI EP05-A3 [2]. Pokiaľ ide o opakovateľnosť, pri vzorkách séra boli zistené hodnoty variačného koeficientu nižšie alebo rovné 10,5 %. Pokiaľ ide o presnosť v rámci laboratória, pri vzorkách séra boli zistené hodnoty variačného koeficientu nižšie alebo rovné 12,8 %.

### Správnosť

#### Linearita

Analytický test vykazoval lineárnosť od 0,12 do 50,88 ng/ml pri použití vzoriek séra (stanovené v súlade s odporúčaniami v dokumente CLSI EP06-A [3]).

## Test riedenia

Vzorky séra s vysokou koncentráciou boli sériovo nariadené nulovým kalibrátorom. Percentuálna výťažnosť sa pohybovala v rozsahu od 95,7 % do 119 %.

### Test „recovery“

Do vzoriek séra boli pridané známe množstvá 17 OH-P. Percentuálna výťažnosť sa pohybovala v rozsahu od 100 % do 119 %.

**Rozsah stanovenia** (od LoD do najvyššieho kalibrátoru):

0,07 ng/ml až približne 50 ng/ml

## OBMEDZENIA

Nedodržanie inštrukcií uvedených v tomto návode môže viesť k nesprávnym výsledkom.

Výsledky stanovení by mali byť interpretované v súlade s celkovým klinickým obrazom pacienta vrátane anamnézy, údajov z ďalších testov a iných vhodných informácií.

Podrobnosti sú uvedené v prílohe "APPENDIX".

Veľmi malé deti (mladšie ako 6 mesiace) majú veľmi vysoké hodnoty 17OH-pregnenolónsulfátu. V tomto prípade doporučujeme extrakciu vzorky éterom pred vlastným stanovením 17 OH-P.

Aj keď bola zistená veľmi nízka skrížená reakcia, môžu sa namerať vysoké hodnoty 17-OHP u pacientov s pravidelnými dávkami spironolaktónu. Terapia spironolaktónom sa preto musí prerušiť najmenej 3 týždne pred stanovením, aby sa zabránilo interferencii.

Pri stanoveniach využívajúcich protilátky existuje možnosť interferencie heterofilných protilátok prítomných v patientskej vzorke. Pacienti, ktorí pravidelne prichádzali do kontaktu so zvieratami alebo užívali imunoterapiu, prípadne podstúpili diagnostické procedúry využívajúce imunoglobulíny alebo fragmenty imunoglobulínov, môžu produkovať protilátky, napríklad ľudské protilátky proti myším proteínom (HAMA), ktoré interferujú pri imunologických stanoveniach.

Také interferujúce protilátky môžu mať za následok chybné výsledky. Výsledky pacientov, u ktorých existuje podozrenie na prítomnosť takýchto protilátok, posudzujte s opatrnosťou.

# RIA 17 α - Hydroxyprogesterone

**REF** IM1452

## İNSAN SERUM VEYA PLAZMASINDA 17 α-HİDROKSİPROGESTERON'UN IN VITRO TESPİTİ İÇİN RADIOIMMUNOASSAY TESTTİR *In vitro* diagnostik kullanımdır.

### PRENSİP

17 α-Hydroxyprogesterone (17 OH-P) radioimmunoassay kiti, bir yarışma deneyidir. Aynı kit, 17 OH-P ölçümü için de kullanılabilir.

Ya doğrudan serum veya EDTA'lı plazmada

Veya numune eter ve çözücü ile buharlaştırıldıktan sonra ekstraksiyon yapılarak ve sonra sıfır kalibratörde tekrar çözelti hazırlanarak

Serum veya plazma numuneleri, ekstrakte numuneler, kontrol ve kalibratörler, antikor-kaplanmış tüplerde, tracer olarak 125I-ışaretlenmiş 17 OH-P ile birlikte inkübe edilirler. Inkübasyon sonrasında, tüp sıvı içeriği yıkanır. Bağlanmış radyoaktivite bir gamma sayacında ölçülür. Bir kalibrasyon eğrisi oluşturulur ve bilinmeyen değerler interpolasyon yöntemiyle tespit edilirler.

### UYARILAR VE ÖNLEMLER

#### Genel yorumlar:

- Kalibratör ve kontrol şişeleri, buharlaşmayı önlemek amacıyla mümkün olduğunca kısa süreli açık kalmalıdır.
- Farklı lotlardan kit reaktiflerini karıştırmayınız.
- Her deney için bir standard eğrisi dahil edilmelidir.
- Testi duplike olarak çalışmak önerilmektedir.
- Her tüp sadece bir kez kullanılmalıdır.

#### Radyasyon güvenliği için temel kurallar

Satınalma, sahip olma, kullanma ve radyoaktif materyalin taşınması, kullanılan ülkenin yönetmeliğine tabidir. Radyasyon güvenliğinin temel kurallarına bağlı kalınması, yeterli korumayı sağlayacaktır.

- Radyoaktif materyallerin bulunduğu ortamda yeme, içme, sigara içme, kozmetik uygulaması gibi faaliyetler gerçekleştirilmemelidir.
- Radyoaktif materyallerin pipetlemesi ağızla yapılmamalıdır.
- Eldiven ve laboratuvar kıyafetleri giyerek, radyoaktif materyallerle teması önleyiniz.
- Radyoaktif malzemelerle ilgili bütün işlemler, kalabalık ortamlar ve koridorlardan uzakta uygun bir ortamda gerçekleştirilmelidir.
- Radyoaktif materyaller, bu malzemeler için ayrılmış bir bölümde ve kapalı bir dolapta saklanmalıdır.
- Radyoaktif ürünlerin girişi ve saklanması ile ilgili bir kayıt güncel olarak tutulmalıdır.
- Kontaminasyona uğramış laboratuvar ekipmanları ve tüpler, farklı radyoizotopların çapraz kontaminasyonunu önlemek için ayrı tutulmalıdır.
- Her bir radyoaktif kontaminasyon veya radyoaktif malzeme vakası, belirlenen prosedürler izlenerek çözümlenmelidir.
- Radyoaktif atıklar, ülkenin kurallarına uyularak ele alınmalı ve yok edilmelidir.

#### Sodyum asit

Bazı reaktifler koruyucu olarak sodyum asit içermektedir. Sodyum asit, kurşun, bakır veya pirinç ile reaksiyona girebilir ve patlayıcı metal asitler oluşturabilir. Reaktiflerin, lavabo ve boru sisteminden bol su akıtılarak giderilmesi gerekmektedir.

#### İnsan kaynaklı materyal

Bu kit içindeki insan kaynaklı materyaller, HIV 1 ve HIV 2 antikorları, HCV antikorları ve Hepatit B yüzey antijenleri (HbsAg) yönünden negatif bulunmuştur. Ancak, hastalık geçirebilecek materyal gibi işlem uygulanmalıdır. Virüs yokluğunu garanti edecek bir metod bulunmamaktadır. Bu kiti, bütün gerekli önlemleri alarak kullanınız.

Bütün serum ve plazmalara, hepatitler ve AIDS'i geçirebilecek gibi işlem yapılmalıdır. Atıklar, ülkenin kurallarına göre yok edilmelidir.

#### Etil eter

Etil eter, çok uçucu ve tutuşabilir organik bir çözücüdür. Ekstraksiyon ve evaporasyon, havalandırma çatısı (aspiratör) altında yapılmalıdır. Alevle temastan kaçınınız ve ağızla pipetleme yapmayınız.

## GHS TEHLİKE SINIFLANDIRMASI

Yıkama Çözültisi (20X) TEHLİKE



H360	Doğmamış çocukta hasara yol açabilir veya üremeye zarar verebilir.
P201	Kullanmadan önce özel talimatları okuyun.
P280	Koruyucu eldiven, koruyucu kıyafet ve göz koruyucu/yüz koruyucu kullanın.
P308+P313	Maruz kalma veya bu durumdan endişe edilmesi HALİNDE: Tıbbi yardım/bakım alın. Borik Asit 0,1 - %0,3 Sodyum Borat Dekahidrat 0,1 - %0,3

**SDS**

Güvenlik Bilgi Formuna [techdocs.beckmancoulter.com](http://techdocs.beckmancoulter.com) adresinden ulaşılabilir

## NUMUNE TOPLANMASI, SAKLANMASI VE DİLÜSYONU

- Kanı, kuru tüplere veya EDTA içeren tüplere alınır.
- Serum veya plazmayı hücrelerden santrifüjle ayırınız.
- Eğer test 24 saat içinde gerçekleştirilecekse, serum ve plazma numuneleri 2-8°C'de saklanabilir. Daha uzun süre saklanacaksa, tekrar çözüp dondurma işlemi için bölünüz ve dondurarak (< -18°C, maksimum 1 yıl) saklayınız. Numune-lerin çözülme işlemi oda ısısında gerçekleştirilmelidir.
- Eğer numuneler en yüksek kalibratörden daha yüksek yoğunluğa sahipse, sıfır kalibratör ile seyreltilmelidir.

30 örneğin (0,24 ile 1,88 ng/mL arasında serum değerleri) serum ve EDTA'lı plazma değerleri, 17 OH-P RIA kiti kullanılarak karşılaştırılmıştır. Sonuçlar aşağıda verilmektedir:

[EDTA-plazma]=0,9026[serum] + 0,0283,

R=0,9747

## SAĞLANAN MALZEMELER

2-8°C'de saklandığında bütün reaktifler, kit etiketindeki son kullanma tarihine kadar stabildir. Şişe üzerindeki son kullanma tarihleri sadece üretici tarafından içeriklerin uzun süreli saklanması durumunda geçerlidir.

Sulandırma veya seyreltme sonrasında reaktif saklama koşulları Prosedür paragrafında belirtilmiştir.

**Anti-17 OH-P antikor-kaplanmış tüpler: 2 x 50 tubes** (kullanıma hazır)

**125I-ışaretlenmiş 17 α-Hidroksiprogesteron: 45 mL bir şişe** (kullanıma hazır)

Şişe üretim tarihinde, proteinler ve boya içeren tampon içindeki 125I-ışaretlenmiş 17 OH-P'den, 640 kBq içerir.

Not: Tracer içinde olabilecek partiküller testin performansını etkilemez.

**Kalibratörler: 2 mL bir şişe, 0,5 mL beş şişe** (kullanıma hazır)

Kalibratör şişeleri, sodyum azidli (<%0,1) insan serumunda 0 ila yaklaşık 50 ng/mL (0 ila yaklaşık 151 nmol/L) 17 OH-P içerir. Kesin konsantrasyon her bir şişe etiketinde belirtilmiştir. Kalibratörler, kurum içi referans standardı ile doğrulanır.

Ayrıca 0 kalibratör (5 mL) sipariş edilebilir (Kat.No B23373)

**Kontrol serumu: iki şişe** (liyofillize)

Şişe, insan serumu ve sodyum asit (<%0,1) içinde 17 OH-P içerir. Beklenen değerler, şişe üzerindeki etiketteki konsantrasyon aralığında belirtilmiştir. Şişe içeriğinin çözülmesi için gereken volüm etiketinde belirtilmiştir. Beklenen konsantrasyon aralığı kit içinde ayrıca not olarak eklenmiştir.

## Yıkama solüsyonu (20x): 50 mL bir şişe

Konsantre solüsyon kullanmadan önce dilüe edilmelidir.

## GEREKLİ OLAN ANCAK SAĞLANMAYAN MALZEMELER

Standard laboratuvar ekipmanlarına ek olarak aşağıdaki malzemeler gerekmektedir:

Test için:

- Hassas mikropipet (25 µL ve 400 µL).
- Yarı-otomatik pipetler (25 µL, 400 µL ve 2 mL).
- Vorteks tipi mikser.
- Horizontal veya orbital shaker.
- Aspirasyon sistemi.
- 125 iyot için gamma counter seti.

Ekstraksiyon aşaması için (isteğe bağlı):

- Hassas mikropipet (200 µL).
- Cam pipetler (2,5 mL, 5 mL, 10 mL).
- Cam şişeler (6 mL ile 15 mL).
- Eter düzeltme fazı için cam tüpler.
- Buharlaştırıcı (speedvac tipi) veya 37°C su banyosu.
- Analitik sınıf etil eter.

## PROSEDÜR

### Reaktiflerin hazırlanması

Reaktifleri oda ısısına getiriniz.

### Kontrol serumlarının hazırlanması

Şişelerin içeriği etiketlerinde belirtilen miktarda distile su ile çözülmalıdır. Distile su eklendikten sonra 10 dakika bekleyiniz ve kullanmadan önce köpüklendirmeden yavaşça karıştırınız. Çözülmüş olan şişeyi kitin son kullanma tarihine kadar 2-8°C'de saklayınız.

### Yıkama solüsyonunun hazırlanması

Şişe içeriğini 950 mL distile su içine boşaltınız ve homojenize ediniz. Dilüe edilmiş solüsyon, 2-8°C'de etiket üzerindeki son kullanma tarihine kadar stabildir.

### Ekstraksiyon numuneleri (isteğe bağlı; bakınız § Sınırlamalar)

Not: Ekstraksiyon, eterle yıkanmış, temiz cam şişe veya tüplerde yapılmalıdır.

Testten önce, sadece numuneler ekstrakte edilmelidir, kalibratörler ekstrakte edilmemelidir.

- Ekstraksiyona başlamadan önce, numuneleri oda ısısına getiriniz.
- Her numune için bir şişe numaralandırınız.
- İlgili tüplere 200 µL numune pipetleyiniz.
- Her bir şişeye 5 mL etil eter ekleyiniz. Dikkatlice kapatınız.
- Şişeleri iyice vorteksleyiniz (2x1 dakika).
- Şişeleri 5 dakika bekletiniz.
- Akuöz faz ile kontamine etmeden, organik fazdan 2,5 mL alınız ve numaralandırılmış cam tüplere aktarınız.
- Eter fazını evaporatör (ör. speedvac tipi) ile veya tüpleri 37°C su banyosuna yerleştirerek tamamen buharlaştırınız.

Not 1: Tüpler, test tüp rack'ına iyice tutturulmuş olmalıdır. Çünkü, eterin uçurulmasından sonra tüpler hafifleşerek yerinden çıkma riski vardır.

Bu aşamada, kuru ekstrakt içeren tüpleri kapatarak soğukta (2-8°C'de) 7 gün saklamak ve teste ara vermek mümkündür.

- Kuru ekstraktları 200 µL sıfır kalibratör ile çözünüz. İyice vorteksleyiniz (30 saniye 2000 rpm), 15 dakika bekleyiniz, tekrar vorteksleyiniz.

Not 2: Eğer daha fazla volüm gerekiyorsa, organik fazdan 2,5 mL almak yerine, akuöz fazı <-18°C'de dondurarak 5 mL organik fazı akuöz fazla kontamine etmeden alınız, buharlaştırınız ve 400 µL sıfır kalibratör ile tekrar çözünüz.

### Immunoassay prosedürü

Pipetlemeden önce bütün reaktifleri oda ısısına getiriniz.

Aşama 1 Eklemler	Aşama 2 İnkübasyon	Aşama 3 Sayım
Antikor kaplanmış tüplere dikkatlice ekleyiniz:  25 µL kalibratör, kontrol, numune veya 50 µL ekstrakte ve 400 µL tracer* Karıştırınız.	120 dakika inkübe ediniz 18 - 25°C shakerda (≥280 rpm).	Tüplerin içeriğini aspire ediniz (2 «total sayım/dak» tüpleri hariç).  İki kez 2 mL yıkama solüsyonu ile yıkayınız. Aspire ediniz.  Bağlı sayım/dak (B) ve total sayım/dak (T)'yi 1 dakika sayınız.

\*Total sayım/dak'yi elde etmek için 2 ek tüpe 400 µL tracer ekleyiniz.

## SONUÇLAR

Sonuçlar, standard eğrisinden interpolasyon yoluyla alınır. Eğri, kalibratörlerle aynı anda ölçülen numunedeki 17 OH-P konsantrasyonunu belirlemede hizmet eder.

### Standard eğrisi

Kalite kontrol bölümündeki sonuçlar, logit dikey ekseninde B/T veya B/B<sub>0</sub> ve logaritmik yatay ekseninde kalibratörlerin analit konsantrasyonu (ng/mL) ile *spline* eğri uydurma kullanılarak hesaplanmıştır.

Diğer veri indirgeme metodları biraz farklı sonuçlar verebilir.

Toplam etkinlik: 179.362 sayım/dak				
Kalibratörler	17OH-P (ng/mL)	sayım/dak (n=3)	B/T (%)	B/B <sub>0</sub> (%)
0	0	55.975	31,21	100,0
1	0,12	44.882	25,02	80,18
2	0,40	31.190	17,39	55,72
3	1,90	12.557	7,00	22,43
4	12,5	2.515	1,40	4,49
5	50,0	895	0,50	1,60

(Standard eğrisi örneği, hesaplamada kullanmayınız)

### Numuneler

Her bir numune için, dikey ekseninde B/T veya B/B<sub>0</sub> yerini belirleyiniz ve yatay ekseninde ona karşılık gelen 17 OH-P konsantrasyonunu ng/mL olarak okuyunuz.

ng/mL'yi nmol/L'e (nM) dönüştürmek için sonuçları 3.026 ile çarpınız.

## BEKLENEN DEĞERLER

Her laboratuvarın kendi normal değerlerini oluşturması önerilmektedir. Aşağıdaki değerler sağlıklı bireylerden alınmıştır ve sadece yol göstericidir.

Adults	N	Medyan	Min.	Max.	%2.5	%97.5
					percentil	percentil
(ng/mL)						
Erkekler	55	0,93	0,53	2,22	0,55	1,99
Kadınlar						
Foliküler faz	111	0,48	0,13	1,67	0,21	1,45
Luteal faz	112	1,52	0,42	3,20	0,61	2,88
Ovülasyon öncesi pik	22	1,39	0,54	2,04	0,55	2,01
Kontrasepsiyon	30	0,37	0,17	1,48	0,18	1,47
Menopoz sonrası kadınlar	38	0,38	0,13	0,92	0,16	0,79
Hamileliğin 1. trimesteri	45	2,03	0,78	5,75	0,93	3,82
Hamileliğin 2. trimesteri	44	2,23	0,60	6,86	1,23	3,70

Çocuklar için beklenen değerler (yaş ve cinsiyete göre belirlenmiş), kullanma kılavuzunun "APPENDIX-EK" bölümünde bulunabilir.

## KALİTE KONTROL

İyi laboratuvar uygulamaları, alınan sonuçların kalitesini garanti altına almak için kontrol numunelerinin düzenli olarak kullanılmasını gerektirir. Bu numuneler, aynen test numuneleri gibi kullanılmalıdır ve sonuçlarının uygun istatistiksel metodlarla analiz edilmesi önerilmektedir.

Paketteki bozulma veya alınan verilerde deęişiklik olduęu durumlarda lütfen yerel distribütörünüzü arayınız veya aőağıdaki e-mail adresini kullanınız. imunochem@beckman.com

## PERFORMANS ÖZELLİKLERİ

(daha fazla bilgi için ekteki "APPENDIX-EK" veri formuna bakınız)

Temsili veriler yalnızca örnek olarak verilmiştir. Her bir laboratuarda elde edilen performans farklılık gösterebilir.

### Duyarlılık

**Tespit limiti (LoD):** 0,07 ng/mL

17 OH-P LoD'si 0,07 ng/mL'dir; bu deęer 120 kör ve 120 düşük seviyede örnekle tayinler yapılarak, %5'ten az yanlış pozitif ( $\alpha$ ) ve %5'ten az yanlış negatif ( $\beta$ ) oranlarına dayanılarak CLSI belgesi EP17-A2'deki [1] kılavuz ilkelerle tutarlı bir şekilde belirlenmiştir ve Kör Limiti (LoB) 0,04 ng/mL deęerindedir.

### Özgüllük

İmmünoanalizde kullanılan antikor 17- $\alpha$ -hidroksiprogesterona özgüdür.

### Kesinlik

#### Tekrarlanabilirlik ve laboratuvar içi kesinlik

Testin kesinlięi, CLSI belgesi EP05-A3'teki [2] kılavuz ilkelerle tutarlı şekilde belirlenmiştir. Tekrarlanabilirlik için, varyasyon katsayıları serum örnekleri için %10,5 veya bu deęerin altında bulunmuştur. Laboratuvar içi kesinlik için, varyasyon katsayıları serum örnekleri için %12,8 veya bu deęerin altında bulunmuştur.

### Doęruluk

#### Linearite

Serum örnekleri kullanıldığında testin 0,12 ile 50,88 ng/mL arasında doğrusal olduęu gösterilmiştir (CLSI belgesi EP06-A'daki [3] kılavuz ilkeler ile tutarlı şekilde belirlenmiştir).

### Dilüsyon testi

Yüksek konsantrasyonlu serum örnekleri sıfır kalibratörle seri olarak seyreltilmiştir. Geri kazanım yüzdeleri %95,7 ile %119 arasında olmuştur.

### Düzeltilme testi

Serum örneklerine bilinen miktarlarda 17 OH-P eklenmiştir. Geri kazanım yüzdeleri %100 ile %119 arasında deęişmiştir.

**Ölçüm aralıęı** (LoD'den en yüksek kalibratöre):

0,07 ng/mL ila yaklaşık 50 ng/mL

## SINIRLAMALAR

Bu kullanım kılavuzuna uyulmaması, sonuçları belirgin olarak etkileyebilir.

Sonuçlar, klinik hikaye, ek testlerden alınan veriler ve dięer bilgilerin de yeraldıęı hastanın toplam klinik durumu ışığı altında deęerlendirilmelidir.

Daha fazla bilgi için ekteki "APPENDIX-EK" veri formuna bakınız.

Çok küçük çocuklarda (özellikle 6 aydan küçük bebeklerde) çok yüksek 17 OH Pregnenolone Sülfat seviyesine rastlanır. Bu durumda, 17 OH P testi öncesinde ekstraksiyon önerilmektedir.

Spironolakton uygulamasından sonra, çok düşük çapraz reaksiyon ihtimaline rağmen, hatalı yüksek 17 OH-P seviyesine rastlanabilir. Bu sebeple, interferans olmaması için, testten en az 3 hafta öncesinde spironolakton tedavisi kesilmelidir.

Antikor içeren testlerde, hasta serumu içindeki heterofil antikorlar tarafından interferans olasılıęı bulunmaktadır. Hayvanlarla sürekli etkileşimde bulunan hastalar veya immunoterapi gören veya ör. HAMA gibi immunoassay ile etkileşim gösteren immunoglobulinler veya immunoglobulin fragmanlarının kullanıldıęı tedavi gören hastalarda antikor oluşturabilir.

Etkileşime giren bu tür antikorlar hatalı sonuçlar üretebilir. Bu antikorlara sahip olduęundan şüphe duyulan hastaların sonuçlarını dikkatle deęerlendirin.



# RIA 17 α - Hydroxyprogesterone

**REF** IM1452

## НАБОР ДЛЯ РАДИОИММУНОЛОГИЧЕСКОГО IN VITRO ОПРЕДЕЛЕНИЯ 17 АЛЬФА-ГИДРОКСИПРОГЕСТЕРОНА В СЫВОРОТКЕ И ПЛАЗМЕ КРОВИ ЧЕЛОВЕКА Для диагностики *in vitro*.

### ПРИНЦИП

Радиоиммунологическое определение 17 альфа-гидроксипрогестерон (17 ОН-Р) относится к конкурентным видам анализа. С помощью данного набора можно проводить определение 17 ОН-Р

для прямого определения в сыворотке или плазме (ЭДТА) крови, или для анализа образцов после экстракции эфиром, испарения растворителя и растворения сухих экстрактов «нулевым» калибратором.

Анализируемые образцы сыворотки или плазмы крови, растворенные эфирные экстракты, калибровочные и контрольные пробы инкубируют с 125I -17 ОН-Р в пробирках, покрытых антителами. После окончания инкубации содержимое пробирок удаляют, отмывают несвязанные меченые 17 ОН-Р и измеряют связанную активность 125I. Результаты рассчитываются методом интерполяции по калибровочной кривой.

### ПРЕДУПРЕЖДЕНИЯ И МЕРЫ ПРЕДОСТОРОЖНОСТИ

#### Общие замечания:

- Флаконы с калибраторами и контролями следует открывать непосредственно перед использованием, во избежание чрезмерного испарения.
- Не смешивать реагенты из наборов разных серий.
- Анализ калибровочных и исследуемых проб должен проводиться одновременно.
- Анализ рекомендуется проводить в дубликатах.
- Пробирки только для одноразового применения.

#### Основные правила радиационной безопасности

Получение, использование и транспортировка радиоактивных материалов должны происходить в соответствии с принятыми в данной стране нормами радиационной безопасности и санитарными правилами работы с радиоактивными веществами.

- В лабораториях запрещается принимать пищу, курить, пользоваться косметикой.
- Не пипетировать растворы радиоактивных веществ ртом.
- Для ограничения контакта с радиоактивными материалами рекомендуется использовать разовые перчатки и лабораторную спецодежду.
- Все манипуляции с радиоактивными веществами следует проводить в специально оборудованных для этого помещениях, удаленных от мест постоянного пребывания людей.
- Радиоактивные вещества следует хранить с использованием контейнеров в специально отведенных для этого местах.
- Необходимо регистрировать поступление и расход радиоактивных материалов.
- Лабораторное оборудование и посуду следует хранить отдельно, чтобы предотвратить их загрязнение радиоактивными изотопами.
- Любой случай радиоактивного загрязнения или исчезновения радиоактивного материала должен рассматриваться в соответствии с законодательством.
- Утилизация радиоактивных отходов должна осуществляться в соответствии с законодательством.

#### Азид натрия

Некоторые компоненты набора содержат азид натрия в качестве консерванта. Вступая в реакцию со свинцом, медью и латунью, азид натрия образует взрывоопасные азиды металлов. Отработанные реагенты следует разбавлять большим количеством водопроводной воды, после чего их можно сливать в канализацию.

### Материал человеческого происхождения

Материал человеческого происхождения, входящий в состав компонентов набора, не содержит антител к HIV 1, HIV 2, HCV и к поверхностному антигену вируса гепатита В (HBsAg). Тем не менее, ни один из существующих методов анализа не может гарантировать полного отсутствия инфекционных агентов в исследуемом материале. Поэтому при работе с компонентами набора следует соблюдать необходимые меры предосторожности.

С исследуемыми образцами сыворотки или плазмы крови следует обращаться как с потенциально инфекционным материалом, могущим содержать вирусы СПИД и гепатита. Утилизация отходов должна осуществляться в соответствии с законодательством.

#### Этиловый эфир

Этиловый эфир крайне летуч и огнеопасен. Экстракцию и испарение эфира следует проводить в вытяжном шкафу. Избегать открытого огня. Не пипетировать реагенты ртом.

### КЛАССИФИКАЦИЯ ОПАСНОСТЕЙ ПО СИСТЕМЕ СГС

Промывочный раствор ОПАСНО!  
(концентрированный в 20 раз)



H360

Может привести к нарушению репродуктивной функции или нанести вред ребенку в утробе матери.

P201

Перед использованием получить специальные инструкции.

P280

Надевать защитные перчатки, защитную одежду, средства защиты органов зрения / лица.

P308+P313

При воздействии или подозрении на воздействие: обратиться за медицинской помощью. Борная кислота 0,1 - 0,3% Натрия борат, декагидрат 0,1 - 0,3%

**SDS**

Паспорт безопасности доступен на сайте [techdocs.beckmancoulter.com](http://techdocs.beckmancoulter.com)

### ПОЛУЧЕНИЕ, ОБРАБОТКА, ХРАНЕНИЕ И РАЗВЕДЕНИЕ ОБРАЗЦОВ

- Собрать кровь в чистые сухие пробирки или пробирки с ЭДТА.
- Отделить сыворотку/плазму от клеток крови центрифугированием.
- Образцы сыворотки и плазмы можно хранить при 2-8°C в течение 24 часов. Для более длительного хранения их необходимо разделить на аликвоты и заморозить при температуре < -18°C, до 1 года. Избегать повторного замораживания-размораживания проб. Размораживать образцы следует при комнатной температуре.
- Если концентрация в образце превышает значение концентрации максимальной калибровочной пробы, образец следует развести нулевым калибратором.

Значения концентраций в сыворотке и в плазме с EDTA для 30 проб (диапазон концентраций в сыворотке — от 0,24 до 1,88 нг/мл) сравнивали со значениями для набора 17 ОН-Р RIA. Получены следующие результаты.

[Плазма с EDTA] = 0,9026[сыворотка] + 0,0283,

R = 0,9747

## ПРЕДОСТАВЛЯЕМЫЕ МАТЕРИАЛЫ

Все реагенты стабильны при 2-8°C до окончания срока годности набора. Сроки годности, указанные на этикетках флаконов с реагентами, относятся только к их хранению в производственных условиях вплоть до момента комплектации набора и не распространяются на полученную заказчиком продукцию.

Условия хранения реагентов после их восстановления или разведения указаны в разделе «Процедура».

**Пробирки, покрытые антителами к 17 ОН-Р: 2 x 50 шт.** (готовы к использованию)

**17 $\alpha$ -Гидроксипрогестерон, меченый 125I: один флакон (45 мл)** (готов к использованию)

На дату изготовления флакон содержит <640 кБк 125I меченого-17 ОН-Р в буфере с белком и красителем.

Примечание: Наличие сгустков в растворе метки не влияет на результат анализа.

**Калибровочные пробы: один флакон 2 мл, пять флаконов по 0,5 мл** (готовы к использованию)

Флаконы с калибратором содержат от 0 до приблизительно 50 нг/мл (от 0 до приблизительно 151 нмоль/л) 17 ОН-Р в сыворотке человека с натрия азидом (<0,1%). Точная концентрация указана на этикетке каждого флакона. Калибраторы проверены относительно внутреннего стандартного образца.

Нулевой калибратор (5 мл) может быть заказан отдельно (кат. № В23373).

**Контрольная сыворотка: 2 флакона** (лиофилизированные препараты)

Флаконы содержат 17 ОН-Р в сыворотке человека с азидом натрия (<0,1%). Объем разбавителя указан на этикетке флакона. Ожидаемые диапазоны концентраций указаны на вкладыше.

**Промывочный раствор (20x): 1 флакон, 50 мл**

Концентрированный раствор должен быть разведен перед использованием.

## НЕОБХОДИМЫЕ, НО НЕ ПРЕДОСТАВЛЯЕМЫЕ МАТЕРИАЛЫ

Помимо стандартного лабораторного оборудования необходимо иметь следующее:

Для прямого определения :

- микропипетки (25 мкл и 400 мкл).
- полуавтоматические пипетки (25 мкл, 400 мкл и 2 мл).
- вихревой смеситель типа vortex
- горизонтальный или орбитальный встряхиватель
- водоструйный насос
- гамма-счетчик для измерения активности <sup>125</sup>I

Для экстракции (при необходимости) :

- микропипетки (200 мкл)
- Стеклянные пипетки (2,5 мл, 5 мл и 10 мл).
- Стеклянные флаконы (от 6 до 15 мл).
- Стеклянные пробирки для отделения органической фазы.
- Испаритель для эфира (типа Speed Vac) или водяная баня на 37°C.
- этиловый эфир (ч.д.а.)

## ПРОЦЕДУРА

### Подготовка реагентов

Довести все реагенты до комнатной температуры.

### Растворение контрольных сывороток

Во флаконы внести дистиллированную воду в объеме, указанном на этикетке флакона. Через 10 минут аккуратно перемешать, избегая образования пены. Хранить восстановленные образцы при 2-8°C до окончания срока годности набора.

### Приготовление промывочного раствора

Тщательно смешать содержимое флакона с концентратом и 950 мл дистиллированной воды. Подготовленный к работе промывочный раствор можно хранить при 2-8°C до окончания срока годности набора.

### Экстракция образцов (при необходимости, см. п. Ограничения)

Внимание: Экстракцию проводят в чистых стеклянных флаконах или пробирках, предварительно ополоснутых эфиром.

Процедура экстракции необходима только для образцов плазмы или сыворотки крови. Не экстрагировать калибровочные пробы.

- Перед экстракцией довести образцы до комнатной температуры и хорошо перемешать.
- Промаркировать по одному стеклянному флакону для каждого образца.
- В соответствующие флаконы внести по 200 мкл анализируемых образцов.
- Во все флаконы добавить по 5 мл этилового эфира и тщательно закрыть их пробками.
- Интенсивно перемешать содержимое флаконов на вихревом смесителе (2 x 1 минуте).
- Оставить флаконы на столе на 5 минут.
- Аккуратно отобрать 2,5 мл органической фракции без загрязнения водной фракцией и поместить в промаркированные стеклянные пробирки.
- Полностью испарите фазу эфира либо испарителем (например, испарителем типа speedvac), либо поместив пробирки в водяную баню 37°C.

Внимание: пробирки должны быть надежно закреплены в штативе, т.к. после испарения эфира они станут легче и начнут всплывать.

На этой стадии выполнение анализа можно приостановить. Закрытые пробками пробирки с сухими экстрактами можно хранить при 2-8°C в течение 7 дней.

- В пробирки с сухими экстрактами внести по 200 мкл нулевого калибратора. Тщательно перемешать содержимое пробирок на вихревом смесителе (30 сек., 2000 об/мин), через 15 сек. Перемешивание повторить.

Примечание: Если необходим объем органической фракции больше 2,5 мл, выдержать флаконы при <-18°C до заморозания водной фракции, аккуратно отобрать 5 мл органической фракции без загрязнения водной фракцией, выпарить и добавить 400 мкл нулевого калибратора.

### Радиоиммунологический анализ

Перед использованием довести реагенты до комнатной температуры.

Стадия 1 Внесение реагентов	Стадия 2 Инкубация	Стадия 3 Измерение результатов
В покрытые антителами пробирки последовательно внести: 25 мкл калибровочных, контрольных и анализируемых проб, или 50 мкл экстрактов и 400 мкл метки и Перемешать.	Инкубировать 120 минут при 18-25°C И постоянном встряхивании ( $\geq 280$ об/мин).	Тщательно удалить содержимое пробирок (кроме проб Т).  Промыть пробирки 2 раза по 2 мл промывочного раствора. Удалить жидкость.  Измерить связанную (В) и общую (Т) активность <sup>125</sup> I (имп./мин.) в течение 1 минуты.

\*В две дополнительные пробирки для определения общего счета (Т) внести по 400 мкл метки.

## РЕЗУЛЬТАТЫ

Результаты рассчитывают методом интерполяции по калибровочной кривой, полученной одновременно с анализом неизвестных образцов.

## Калибровочная кривая

Результаты в отделении контроля качества рассчитаны с использованием подбора кривой «сплайн» с В/Т или В/В<sub>0</sub> по логистической вертикальной оси и концентрацией аналита калибраторов по логарифмической горизонтальной оси (нг/мл).

Другие методы обсчета могут давать несколько отличающиеся результаты.

Общая активность: 179 362 имп/мин				
Калибраторы	17ОН-Р (нг/мл)	Имп./мин. (n=3)	В/Т (%)	В/В <sub>0</sub> (%)
0	0	55 975	31,21	100,0
1	0,12	44 882	25,02	80,18
2	0,40	31 190	17,39	55,72
3	1,90	12 557	7,00	22,43
4	12,5	2 515	1,40	4,49
5	50,0	895	0,50	1,60

(Пример типичной калибровочной кривой. Не использовать для обсчета результатов.)

## Образцы

Для каждого образца найти на вертикальной оси калибровочного графика значение В/Т или В/В<sub>0</sub>, а на горизонтальной оси соответствующую концентрацию 17 ОН-Р.

Для перевода концентраций из нг/мл в нмоль/л, нужно умножить полученный результат на 3,026.

## ОЖИДАЕМЫЕ ЗНАЧЕНИЯ

В каждой лаборатории рекомендуется установить собственные уровни, соответствующие нормальным. Приведенные ниже значения являются ориентировочными.

Adults	N	Средняя	Мин.	Макс.	2.5% перцентиль	97.5% перцентиль
		(нг/мл)				
Мужчины	55	0,93	0,53	2,22	0,55	1,99
Женщины						
Фолликулярная фаза	111	0,48	0,13	1,67	0,21	1,45
Лютеиновая фаза	112	1,52	0,42	3,20	0,61	2,88
Преовуляторный пик	22	1,39	0,54	2,04	0,55	2,01
При контрацепции	30	0,37	0,17	1,48	0,18	1,47
Женщины в менопаузе	38	0,38	0,13	0,92	0,16	0,79
1 триместр беременности	45	2,03	0,78	5,75	0,93	3,82
2 триместр беременности	44	2,23	0,60	6,86	1,23	3,70

Подробная информация о ожидаемых значениях педиатрических образцов (отсортированных по возрасту и полу) приведены в разделе APPENDIX.

## КОНТРОЛЬ КАЧЕСТВА

В соответствии с требованиями Good laboratory practices для контроля качества проводимых исследований следует регулярно использовать контрольные образцы, которые должны проходить те же стадии анализа, что и анализируемые пробы. Результаты контроля качества рекомендуется обрабатывать с помощью специальных статистических методов.

В случае серьезного повреждения упаковки, или в случае несоответствия полученных результатов аналитическим характеристикам обратитесь, пожалуйста, к нашим специалистам. E-mail: imunochem@beckman.com или beckman.ru@beckman.com

## ТЕХНИЧЕСКИЕ ХАРАКТЕРИСТИКИ

(Более подробная информация приведена в разделе "APPENDIX")

Репрезентативные данные предоставлены исключительно для пояснений. Показатели, полученные в конкретной лаборатории, могут отличаться.

## Чувствительность

Предел чувствительности: 0,07 нг/мл

Предел обнаружения 17 ОН-Р, 0,07 нг/мл, определен согласно рекомендациям документа EP17-A2, подготовленного CLSI [1], на основании соотношений ложноположительных результатов ( $\alpha$ ) менее 5% и ложноотрицательных результатов ( $\beta$ ) менее 5%; для определения использовано 120 холостых проб и 120 проб с низкой концентрацией; предел бланка (LoB) составил 0,04 нг/мл.

## Специфичность

Антитело, используемое в иммунологическом анализе, является специфичным для 17- $\alpha$ -гидроксипрогестерона.

## Воспроизводимость

### Сходимость и внутрилабораторная прецизионность

Точность исследования определяется в соответствии с рекомендациями документа EP05-A3, изданного Институтом клинических и лабораторных стандартов (CLSI) [2]. Коэффициенты вариации при оценке сходимости результатов для проб сыворотки не превышают 10,5%. Коэффициенты вариации при оценке внутрилабораторной прецизионности для проб сыворотки не превышают 12,8%.

## Точность

### Линейность

Линейность результатов анализа сохранялась в диапазоне от 0,12 до 50,88 нг/мл с использованием проб сыворотки (определение проводили согласно рекомендациям документа EP06-A, подготовленного CLSI [3]).

### Тест на разведение

Пробы сыворотки с высокой концентрацией последовательно разводили нулевым калибратором. Процент восстановления находился в пределах от 95,7% до 119%.

### Тест на открытие стандартной добавки

В пробы сыворотки добавили известное количество 17 ОН-Р. Процент восстановления находился в пределах от 100% до 119%.

**Диапазон измерений** (от предела обнаружена до наивысшей концентрации калибратора):

от 0,07 нг/мл до приблизительно 50 нг/мл

## ОГРАНИЧЕНИЯ

Нарушение методики проведения анализа может привести к искажению результатов исследования.

Результаты определения должны быть интерпретированы в свете общей клинической картины пациента, включая анамнез, данные других тестов и подходящую иную информацию.

Более подробная информация приведена в разделе APPENDIX.

У очень маленьких детей (в частности, в возрасте до 6 месяцев) наблюдается очень высокий уровень 17 ОН-прегненолон-сульфата. В таких случаях рекомендуется проводить анализ с предварительной экстракцией 17 ОН-Р эфиром.

Несмотря на низкую прекрестную реакцию, у пациентов, регулярно получающих спиронолактон, могут наблюдаться ложно завышенные уровни 17 ОН-Р. В этой связи лечение спиронолактоном нужно прекратить не менее чем за три недели до проведения анализа.

При выполнении анализов с использованием антител возможна интерференция гетерофильными антителами в пробе пациента. У пациентов, имеющих постоянный контакт с животными или проходивших иммунотерапию или диагностические процедуры с использованием иммуноглобулинов или их фрагментов, могут вырабатываться антитела (т.е. НАМА), которые влияют на результаты иммунного анализа.

Интерференция со стороны этих антител может привести к получению ошибочных результатов. Тщательно проверяйте результаты анализов пациентов с подозрением на наличие этих антител.

# RIA 17 $\alpha$ - Hydroxyprogesterone

**REF** IM1452

## RADIOIMUNOTEST ZA IN VITRO ODREĐIVANJE 17 alfa – HIDROKSIPROGESTERONA U HUMANOM SERUMU I PLAZMI

Za *in vitro* dijagnostičku upotrebu.

### PRINCIP

Imunoradiometrijski test za određivanje 17 alfa–Hidroksiprogesterona je kompetitivni test. Isti test može da se koristi i za merenje 17 OH-P:

direktno iz seruma ili EDTA plazme,

ili posle ekstrakcije uzorka etrom i evaporacije rastvarača, praćeno resuspenzijom u nultom kalibratoru.

Uzorcima seruma, plazme, ekstrakti, kontrole i kalibratori se inkubiraju sa 17 OH-P, obeleženim sa <sup>125</sup>I u epruvetama obloženim antitelom. Nakon inkubacije, sadržaji epruveta se ispiraju da bi se uklonio nevezani 17 OH-P obeležen sa <sup>125</sup>I. Nakon toga se svakoj epruveti dodaje rastvor koji sadrži drugo monoklonalno antitelo obeleženo sa <sup>125</sup>I. Vezana radioaktivnost se onda određuje pomoću gama brojača. Dobija se kalibraciona kriva a nepoznate vrednosti se određuju interpolacijom standardne krive.

### UPOZORENJE I MERE OPREZA

#### Opšte napomene:

- Bočice sa kalibratorima i kontrolama treba da budu otvorene što je kraće moguće da bi se izbeglo prekomerno isparavanje.
- Ne mešati reagense iz kitova različitih lotova.
- Standardna kriva mora biti obuhvaćena sa svakim testom.
- Preporučeno je da se imunotest izvodi u duplikatu.
- Svaka epruveta mora da se upotrebi samo jedanput.

#### Osnovna pravila bezbednosti od radijacije

Kupovina, posedovanje, upotreba i prenos radioaktivnog materijala je predmet regulative zemlje korisnika. Pridržavanje osnovnih pravila bezbednosti od radijacije treba da obezbedi adekvatnu zaštitu:

- Ne treba jesti, piti, pušiti ili nanositi kozmetiku u prisustvu radioaktivnih materijala.
- Ne pipetirati radioaktivni rastvor ustima.
- Izbegavati svaki kontakt sa radioaktivnim materijalom upotrebom rukavica i laboratorijskog kombinezona.
- Sva manipulacija radioaktivnim supstancama treba da se obavi u odgovarajućem prostoru, udaljenom od hodnika i drugih prometnih mesta.
- Radioaktivni materijali treba da se čuvaju u kontejnerima koji su obezbeđeni u označenom prostoru.
- Zapis o prijemu i skladištenju svih radioaktivnih proizvoda treba da se vodi ažurno.
- Laboratorijska oprema i stakleno posuđe koje je podložno kontaminaciji treba da budu razdvojeni da bi se izbegla unakrsna kontaminacija različitim radioizotopima.
- Svaki slučaj radioaktivne kontaminacije ili gubitka radioaktivnog materijala treba da bude rešen u skladu sa ustanovljenim procedurama.
- Postupanje sa radioaktivnim otpadom treba da bude u skladu sa pravilima utvrđenim u zemlji korisnika.

#### Natrijum azid

Neki reagensi sadrže natrijum azid kao konzervans. Natrijum azid može da reaguje sa olovom, bakrom ili mesingom i da formira eksplozivne metalne azide. Odbacivati reagense ispiranjem sa velikom količinom vode kroz odvodni sistem.

#### Materijali humanog porekla

Materijal humanog porekla, sadržanog u ovom kitu, je negativan na prisustvo antitela na HIV 1 i HIV 2, antitela na HCV, kao i na Hepatitis B površinski antigen (HBsAg). Štaviše, sa njima treba rukovati kao da su mogući prenosnici bolesti. Ni jedna poznata metoda testiranja ne može u potpunosti potvrditi da virus nije prisutan. Rukujte sa ovim kitom sa svom neophodnom predostrožnošću.

Sa svim uzorcima seruma i plazme treba postupati kao da su sposobni za prenos hepatitisa ili AIDS-a tako da otpad treba odlagati u skladu sa propisima države.

#### Etil-etar

Etil etar je opasan i veoma zapaljiv organski rastvarač. Ekstrakcija i evaporacija moraju da se obavljaju u ventiliranom prostoru. Izbegavati svaki kontakt sa plamenom i ne pipetirati reagense ustima.

### GHS KLASIFIKACIJA OPASNOSTI

Rastvor za ispiranje OPASNOST  
(20X)



H360	Može da ošteti plodnost ili nerođeno dete.
P201	Potrebna su posebna uputstva pre upotrebe.
P280	Nositi zaštitne rukavice, zaštitnu odeću i zaštitna sredstva za oči/lice.
P308+P313	AKO ste izloženi ili zabrinuti: Potražite medicinski savet/mišljenje. Borna kiselina 0,1 - 0,3% Natrijum-borat dekahidrat 0,1 - 0,3%

**SDS**

Bezbednosni list je dostupan na internet adresi [techdocs.beckmancoulter.com](http://techdocs.beckmancoulter.com)

### PRIKUPLJANJE UZORAKA, OBRADA, SKLADIŠTENJE I RAZBLAŽIVANJE

- Krv sakupljati u suvim epruvetama sa EDTA.
- Odvojite serum ili plazmu od ćelija centrifugiranjem.
- Uzorcima seruma i plazme se mogu čuvati na 2-8°C, ako se test izvodi u okviru 24 sata. Za duže skladištenje držite ih zamrznutim (na < -18°C najviše godinu dana) nakon alikvotiranja kako bi se izbeglo ponovljeno zamrzavanje i odmrzavanje. Odmrzavanje uzorka se treba izvoditi na sobnoj temperaturi.
- Ako uzorci imaju koncentraciju veću od najvećeg kalibratora onda se oni moraju razblažiti nultim kalibratorom.

Vrednosti za serum i EDTA plazmu za 30 uzoraka (vrednosti za serum u opsegu od 0,24 do 1,88 ng/ml) upoređene su pomoću 17 OH-P RIA kompleta. Rezultati su sledeći:

$$[\text{EDTA-plazma}] = 0,9026[\text{serum}] + 0,0283,$$

$$R = 0,9747$$

### ISPORUČENI MATERIJALI

Svi reagensi kita su stabilni do isteka roka označenog na etiketi kita, pod uslovom da se čuvaju na 2-8°C. Rokovi odštampani na etiketama bočica važe za dugoročno skladištenje komponenti samo od strane proizvođača, pre sastavljanja kita. Ovo ne uzimajte u obzir.

Uslovi skladištenja za reagense nakon rekonstitucije ili razblaživanja navedeni su u proceduri u odeljku.

**Epruvete obložene Anti-17 OH-P antitelima: 2 x 50 epruveta** (spremnih za upotrebu)

**<sup>125</sup>I obeležen anti-17 OH-P: jedna bočica (45 ml)** (spremna za upotrebu)

Bočica sadrži <640 kBq, na dan proizvodnje, od <sup>125</sup>I-obeležene 17 OH-P u formi tečnosti koja sadrži proteine i boju.

Napomena: Povremeno prisustvo grudvica u obeleživaču ne utiče na performansu testa.

**Kalibrator: jedna bočica 2 ml, pet bočica 0,5 ml** (spremno za upotrebu)

Bočice kalibratora sadrže od 0 do oko 50 ng/ml (0 do oko 151 nmol/l) 17 OH-P u humanom serumu sa natrijum azidom (<0,1%). Tačna koncentracija je navedena na nalepnici svake bočice. Kalibratori su potvrđeni prema internom referentnom standardu.

Nulti kalibrator (5 ml) se može takođe posebno poručiti ( kat.br. #B23373)

### Kontrolni uzorci: dve bočice (liofilizovane)

Bočice sadrže 17 OH-P u humanom serumu sa natrijum azidom (<0,1%). Zapremina za rekonstituciju je navedena na etiketi na bočici. Očekivane vrednosti su u opsegu koncentracije navedenim na dodatku.

### Rastvor za pranje (20x): jedna bočica od 50 ml

Koncentrovani rastvor mora da se razblaži pre upotrebe.

## POTREBNI MATERIJALI KOJI NISU OBEZBEĐENI

Pored standardne laboratorijske opreme, potrebne su sledeće stavke:

Za test:

- Precizne mikropipete (25 µl and 400 µl).
- Poluautomatske pipete (25 µl, 400 µl i 2 ml).
- Vorteks tip miksera.
- Horizontalna ili kružna mešalica.
- Aspiracioni sistem.
- Gama brojač za <sup>125</sup>I

Za korak ekstrakcije (opcionarno):

- Precizna mikropipeta (200 µl).
- Staklene pipete (2,5 ml, 5 ml i 10 ml).
- Staklene bočice (od 6 ml do 15 ml).
- Staklene epruvete za uspostavljanje etarske faze.
- Evaporator (tip Speedvac) ili vodeno kupatilo na 37°C.
- Analički graduisan etiletar.

## POSTUPAK

### Priprema reagenasa

Neka svi reagensi dostignu sobnu temperaturu.

### Rekonstitucija kontrolnih uzoraka

Sadržaj bočica se rekonstituiše sa zapreminom destilovane vode navedenoj na etiketi. Sačekati najmanje 10 minuta i blago mešati da se izbegne penušanje pre nanošenja. Čuvati rekonstituisane alikvotirane kalibratore na temperaturi 2-8°C sve do roka upotrebe kita.

### Priprema rastvora za pranje

Sipati sadržaj bočice u 950 ml destilovane vode i homogenizirajte ga. Razblažen rastvor se može čuvati na 2-8°C do isteka roka upotrebe.

### Ekstrakcija uzoraka (opcionarno, videti Ograničenja)

Napomena: ekstrakcija se radi u čistim staklenim bočicama ili epruvetama, prethodno ispranim etil-alkoholom.

Ekstrakcija uzoraka se radi pre testiranja, nemojte raditi ekstrakciju kalibratora.

- Neka svi uzorci distignu sobnu temperaturu i dbor ih promešati pre ekstrakcije.
- Po jedan broj na bočici za svaki uzorak.
- Staviti po 200 µl svakog uzorka u odgovarajuću bočicu.
- Dodati po 5 ml etil etra u bočice. Pažljivo zatvoriti.
- Intenzivno vorteksirati bočice (2 x 1 min).
- Ostaviti bočice da stoje na stolu minimum 5 min.
- Skinuti pažljivo 2,5 ml organske faze bez kontaminacije vodene faze i staviti u obeležene staklene epruvete.
- Potpuno isparite etersku fazu ili isparivačem (npr. tipom speedvac) ili stavljanjem epruveta za uzorak u vodenu kupku na 37°C.

Napomena 1: Epruvete moraju biti čvrsto priljubljene u reku, pošto posle evaporacije etra postaju lakše i mogu da otplutaju.

U ovoj fazi je moguće prekinuti postupak. Zatvoriti epruvete koje sadrže suvi ekstrakt i čuvati 1 do 7 dana n 2-8°C.

- Rastvoriti suve ekstrakte etra u 200 µl nultog kalibratora. Intenzivno vorteksirati (30 sekundi, 2000 rpm), sačekati 15 minuta pa vorteksirati ponovo.

Napomena 2: Ako je potrebna veća zapremina, umesto uzimanja 2,5 ml organske faze, ostaviti bočice na temperaturi nižoj od -18°C dok se vodena faza ne smrzne, pažljivo skinuti 5 mL organske faze bez kontaminacije vodene faze, evaporirati i rastvoriti u 400 µL nultog kalibratora.

### Procedura imunitesta

Neka svi reagensi dostignu sobnu temperaturu.

Korak 1 Dodaci	Korak 2 Inkubacija	Korak 3 Brojanje
Obloženim epruvetama, sukcesivno dodavati :  25 µl kalibratora, kontrole, uzorka ili 50 µl ekstrakta i 400 µl obeleživača. Promešati.	Inkubirajte 120 minuta na 18-25°C uz mešanje (≥280 rpm).	Pažljivo aspirirati sadržaj epruveta (izuzev 2 epruvete «ukupan cpm»). Dva puta operite sa 2 ml rastvora za pranje. Aspirirati.  Brojati skok cpm (B) i ukupan cpm (T) za 1 min.

\*Dodati 400 µl obeleživača u 2 dodatne epruvete da se dobije ukupni cpm.

## REZULTATI

Rezultati su dobijeni interpolacijom sa standardne krive. Kriva služi za određivanje koncentracije 17 OH-P u uzorcima izmerene u isto vreme kad i kalibratori.

### Standardna kriva

Rezultati u odeljenju za kontrolu kvaliteta izračunati su upotrebom *splajn* (eng. spline) krive koja ima vrednosti *B/T* ili *B/B<sub>0</sub>* na logističkoj vertikalnoj osi i koncentraciju analita kalibratora na logaritamskoj horizontalnoj osi (ng/ml).

Druge metode redukcije podataka mogu dati neznatno različite rezultate.

Ukupna aktivnost: 179.362 cpm				
Kalibratori	17OH-P (ng/ml)	cpm (n=3)	B/T (%)	B/B <sub>0</sub> (%)
0	0	55.975	31,21	100,0
1	0,12	44.882	25,02	80,18
2	0,40	31.190	17,39	55,72
3	1,90	12.557	7,00	22,43
4	12,5	2.515	1,40	4,49
5	50,0	895	0,50	1,60

(Primer standardne krive, ne koristiti za proračun)

### Uzorci

Za svaki uzorak locirati odnos B/T ili B/B<sub>0</sub> na vertikalnoj osi standardne krive, očitati odgovarajuću koncentraciju 17 OH-P na horizontalnoj osi.

Za pretvaranje ng/ml u nmol/l pomnožiti rezultate sa 3,026.

## OČEKIVANE VREDNOSTI

Laboratorije trebaju da uspostave svoje vlastite referentne vrednosti. Sledeće vrednosti dobijene kod zdravih osoba su samo indikativne.

Adults	N	Srednji	Min.	Max.	2,5	97,5
					Percentil	Percentil
(ng/ml)						
Muškarci	55	0,93	0,53	2,22	0,55	1,99
Žene						
Folikularna faza	111	0,48	0,13	1,67	0,21	1,45
Lutealna faza	112	1,52	0,42	3,20	0,61	2,88
Preovulatorni pik	22	1,39	0,54	2,04	0,55	2,01
Kontracepcija	30	0,37	0,17	1,48	0,18	1,47
Žene posle menopauze	38	0,38	0,13	0,92	0,16	0,79
1. trimestar trudnoće	45	2,03	0,78	5,75	0,93	3,82
2. trimestar trudnoće	44	2,23	0,60	6,86	1,23	3,70

Detaljne informacije o očekivanim vrednostima za decu (sortirane prema starosti i polu) mogu se naći u listi podataka."APPENDIX".

## KONTROLA KVALITETA

Dobra laboratorijska praksa nalaže da se kontrolni uzorci moraju redovno koristiti da bi se osigurao kvalitet dobijenih rezultata. Ti uzorci se moraju obraditi na potpuno isti način kao i testirani uzorci, i preporučeno je da se njihovi rezultati analiziraju upotrebom odgovarajućih statističkih metoda.

U slučaju oštećenja pakovanja ili ako dobijeni podaci pokazuju neku promenu performansi, molimo da kontaktirate vašeg lokalnog distributera ili upotrebite sledeću e-mail adresu: [imunochem@beckman.com](mailto:imunochem@beckman.com)

## KARAKTERISTIKE PERFORMANSI

(za više detalja, videti "DODATAK")

Reprezentativni podaci su obezbeđeni u svrhu ilustracije. Performanse dobijene u pojedinačnim laboratorijama mogu da variraju.

### Osetljivost

**Limit detekcije (LoD):** 0,07 ng/ml

Limit detekcije (LoD) za 17 OH-P iznosi 0,07 ng/ml, a određen je u skladu sa smernicama u CLSI dokumentu EP17-A2 [1] na osnovu proporcija lažno pozitivnih vrednosti ( $\alpha$ ) manjih od 5% i lažno negativnih vrednosti ( $\beta$ ) manjih od 5%; korišćenjem određivanja, sa 120 uzoraka bez analita i 120 uzoraka niskog nivoa; i limita slepe probe (LoB) od 0,04 ng/ml.

### Specifičnost

Antitelo koje se koristi u imunotestu je specifično za 17- $\alpha$ -hidroksiprogesteron.

### Preciznost

#### Ponovljivost i preciznost u laboratoriji

Preciznost testa je određena u skladu sa smernicama u CLSI dokumentu EP05-A3 [2]. Za ponovljivost, utvrđene vrednosti koeficijenata varijacije bile su manje od ili jednake 10,5% za uzorke seruma. Za preciznost u laboratoriji, utvrđene vrednosti koeficijenata varijacije bile su manje od ili jednake 12,8% za uzorke seruma.

### Tačnost

#### Linearnost

Test je pokazao linearnost od 0,12 do 50,88 ng/ml pri korišćenju uzoraka seruma (određeno u skladu sa smernicama u CLSI dokumentu EP06-A [3]).

### Test razblaživanja

Visoke koncentracije uzoraka seruma serijski su razblažene nultim kalibratorom. Procenti iskorišćenja kretali su se u opsegu od 95,7% do 119%.

### Recovery test

U uzorke seruma dodate su poznate količine 17 OH-P. Procenti iskorišćenja kretali su se u opsegu od 100% do 119%.

**Merni opseg** (od LoD do najvišeg kalibratora):

0,07 ng/ml do oko 50 ng/ml

## OGRANIČENJA

Ne pridržavanje instrukcija u ovom uputstvu pakovanja može značajno da utiče na rezultate.

Rezultate treba interpretirati u skladu sa celokupnom kliničkom slikom pacijenta, uključujući i kliničku istoriju, podatke iz dodatnih testova i drugim odgovarajućim informacijama.

Za više detalja, videti "DODATAK".

Veoma mala odojčad (posebno mlađa od 6 meseci) imaju veoma visoke nivoa 17OH- pregnenolon sulfata. U ovakvim slučajevima preporučuje se ekstrakcija etrom pre izvođenja 17 OH-P testa.

I pored male verovatnoće pojave ukrštenih reakcije, lažno visoke vrednosti 17 OH-P mogu se naći posle primene spironolaktone. Terapija spironolaktonom mora zbog toga biti prekinuta bar tri nedelje pre testiranja da bi se osiguralo odsustvo interferencije.

Za testove koji upotrebljavaju antitela, postoji mogućnost mešanja od strane heterofilnih antitela u uzorku pacijenta. Pacijenti koji su bili redovno izloženi životinjama ili su primili imunoterapiju ili dijagnostičke procedure koje koriste imunoglobuline ili imunoglobulinske fragmente mogu proizvesti antitela, npr. HAMA, koji utiču na imunotestove.

Takva interferirajuća antitela mogu uzrokovati pogrešne rezultate. Pažljivo procenite rezultate pacijenata za koje se sumnja da imaju ova antitela.



# RIA 17 $\alpha$ -hidroxiprogesterona

**REF** IM1452

## RADIOIMUNOENSAIO PARA A DETERMINAÇÃO IN VITRO DE 17 $\alpha$ -HIDROXIPROGESTERONA NO SORO E NO PLASMA HUMANOS

Para uso em diagnóstico *in vitro*.

### PRINCÍPIO

O radioimunoensaio de 17 $\alpha$ -hidroxiprogesterona (17 OH-P) é um ensaio competitivo. O mesmo kit pode ser usado para a medição de 17 OH-P:

quer diretamente no soro ou no plasma EDTA,

ou após a extração da amostra com éter e a evaporação do solvente, seguida de ressuspensão no calibrador zero.

As amostras de soro ou plasma, os extratos, os controles e os calibradores são incubados com 17 OH-P marcada com 125I como rastreador, em tubos revestidos de anticorpos. A incubação o conteúdo dos tubos e enxaguado para se remover a 17 OH-P marcada com 125I não ligada. A radioatividade ligada é em seguida determinada em um contador gama. É estabelecida uma curva de calibração, e os valores desconhecidos são determinados por interpolação a partir da curva padrão.

### AVISOS E PRECAUÇÕES

#### Observações gerais:

- Os frascos com calibradores e controles devem permanecer abertos o menor tempo possível para evitar evaporação excessiva.
- Não misture os reagentes de kits de lotes diferentes.
- Deve ser estabelecida uma curva padrão em cada ensaio.
- Recomenda-se realizar o imunoensaio em duplicata.
- Cada tubo só deve ser usado uma vez.

#### Regas básicas de segurança para radiação

A compra, a posse, o uso e a transferência de materiais radioativos estão sujeitos às regulamentações do país em que eles forem utilizados. O cumprimento das regras básicas de segurança radiológica deve fornecer uma proteção adequada:

- Não se deve comer, beber, fumar nem aplicar cosméticos na presença de materiais radioativos.
- Não pipetar soluções radioativas com a boca.
- Utilize luvas e jaleco de laboratório para evitar qualquer contato com materiais radioativos.
- Toda manipulação de substâncias radioativas deve ser efetuada em local apropriado e longe de corredores e outras áreas muito frequentadas.
- Os materiais radioativos devem ser armazenados no recipiente fornecido e numa área designada.
- É necessário manter atualizado um registro de recebimento e armazenamento de todos os produtos radioativos.
- Os equipamentos e os objetos de vidro de laboratório que estejam sujeitos a contaminação devem ser segregados para se evitar a contaminação cruzada de diferentes radioisótopos.
- Cada caso de contaminação radioativa ou perda de material radioativo deve ser resolvido de acordo com os procedimentos estabelecidos.
- Os resíduos radioativos devem ser tratados de acordo com as regras estabelecidas por cada país.

#### Azida sódica

Alguns reagentes contêm azida sódica como conservante. A azida sódica pode reagir com chumbo, cobre ou latão, formando azidas metálicas explosivas. Descarte os reagentes através de lavagem com grandes quantidades de água no sistema de encanamento.

#### Materiais de origem humana

Os materiais de origem humana incluídos neste kit apresentaram resultados negativos quanto à presença de anticorpos de HIV 1 e de HIV 2, anticorpos de HCV e antígeno de superfície da hepatite B (HBsAg). No entanto, eles devem ser manuseados como sendo suscetíveis de transmitir doenças. Nenhum método de teste conhecido oferece total garantia quanto à ausência de vírus. Manuseie este kit com todas as precauções necessárias.

Todas as amostras de soro e plasma devem ser tratadas como suscetíveis de transmitir hepatite ou AIDS, e os resíduos devem ser descartados de acordo com as regras estabelecidas por cada país.

#### Éter etílico

O éter etílico é um solvente orgânico volátil e altamente inflamável. A extração e a evaporação devem ser feitas em uma coifa ventilada. Evite qualquer contato com chamas e não pipete os reagentes com a boca.

### CLASSIFICAÇÃO DE PERIGO DO GHS

Solução de lavagem (20X) PERIGO



H360

Pode afetar a fertilidade ou o nascituro.

P201

Obtenha instruções específicas antes do uso.

P280

Use luvas de proteção, roupa de proteção e proteção ocular/facial.

P308+P313

Em caso de exposição ou suspeita de exposição: consulte um médico.

Ácido bórico 0,1 - 0,3%

Borato de sódio

deca-hidratado 0,1 - 0,3%

**SDS**

A Folha de dados de segurança está disponível em [techdocs.beckmancoulter.com](http://techdocs.beckmancoulter.com)

### COLHEITA, PROCESSAMENTO, ARMAZENAGEM E DILUIÇÃO DA AMOSTRA

- Colete o sangue em tubos secos ou em tubos com EDTA.
- Separe o soro ou plasma das células por centrifugação.
- As amostras de soro e plasma podem ser armazenadas a 2–8°C se o teste for realizado no espaço de 24 horas. Para um armazenamento mais longo, mantenha-as congeladas ( $a < -18^{\circ}\text{C}$ , durante 1 ano no máximo) após tê-las dividido em alíquotas para evitar o congelamento e o descongelamento repetidos. O descongelamento de amostras deve ser efetuado à temperatura ambiente.
- Se houver amostras com concentrações superiores à do calibrador mais alto, elas deverão ser diluídas com o calibrador zero.

Os valores de 30 amostras de soro e plasma EDTA (valores séricos que variam de 0,24 a 1,88 ng/mL) foram comparados utilizando o kit de RIA de 17 OH-P. Os resultados foram os seguintes:

[Plasma-EDTA] = 0,9026 [soro] + 0,0283,

R = 0,9747

### MATERIAIS FORNECIDOS

Todos os reagentes do kit permanecem estáveis até a data de validade indicada no rótulo do kit, quando armazenados a 2–8°C. As datas de validade impressas nos rótulos dos frascos se aplicam somente ao armazenamento de longo prazo dos componentes pelo fabricante, antes da montagem do kit. Não levar em consideração.

As condições de armazenamento dos reagentes após a reconstituição ou diluição estão indicadas no parágrafo Procedimento.

**Tubos revestidos de anticorpo anti-17 OH-P: 2 x 50 tubos** (prontos para uso)

**17 $\alpha$ -hidroxiprogesterona marcada com 125I: um frasco (45 mL)** (pronto para uso)

Na data de fabricação, o frasco contém  $<640$  kBq de 17 OH-P marcada com 125I em tampão contendo proteínas e um corante.

Nota: A presença ocasional de partículas coaguladas no rastreador não afeta o desempenho do ensaio.



**Calibradores: um frasco de 2 mL, cinco frascos de 0,5 mL** (prontos para uso)

Os frascos do calibrador contêm entre 0 e aproximadamente 50 ng/mL (entre 0 e aproximadamente 151 nmol/L) de 17 OH-P em soro humano com azida sódica (<0,1%). A concentração exata está indicada no rótulo de cada frasco. Os calibradores são verificados relativamente a um padrão de referência interno.

O calibrador zero (5 mL) também pode ser encomendado separadamente (nº de cat. B23373).

**Amostras de controle: dois frascos** (liofilizadas)

O frasco de controle contém 17 OH-P em soro humano com azida sódica (<0,1%). O volume para reconstituição está indicado no rótulo do frasco. Os valores esperados estão dentro do intervalo de concentração indicado num suplemento.

**Solução de lavagem (20x): um frasco de 50 mL**

A solução concentrada tem de ser diluída antes do uso.

## MATERIAIS NECESSÁRIOS, MAS NÃO FORNECIDOS

Além de equipamentos de laboratório padrão, são necessários os seguintes itens:

Para o ensaio:

- Micropipeta de precisão (25 µL e 400 µL).
- Pipetas semiautomáticas (25 µL, 400 µL e 2 mL).
- Misturador do tipo vórtex.
- Agitador horizontal ou orbital.
- Sistema de aspiração.
- Contador gama ajustado para <sup>125</sup>I

Para a etapa de extração (opcional):

- Micropipeta de precisão (200 µL)
- Pipetas de vidro (2,5 mL, 5 mL, 10 mL).
- Frascos de vidro (de 6 mL a 15 mL).
- Tubos de vidro para a recuperação da fase éter.
- Evaporador (tipo SpeedVac) ou banho-maria a 37°C.
- Éter etílico (grau analítico).

## PROCEDIMENTO

### Preparação dos reagentes

Deixe todos os reagentes atingirem a temperatura ambiente.

### Reconstituição das amostras de controle

O conteúdo dos frascos é reconstituído com o volume de água destilada indicado no rótulo. Espere 10 minutos após a reconstituição e misture com cuidado para evitar a formação de espuma antes de dispensar. Armazene as soluções reconstituídas a 2–8°C até a data de validade do kit.

### Preparação da solução de lavagem

Despeje o conteúdo do frasco em 950 mL de água destilada e homogeneíze. A solução diluída pode ser armazenada a 2–8°C até a data de validade do kit.

### Extração de amostras (opcional; consulte § Limitações)

Nota: A extração deve ser feita em frascos ou tubos de vidro limpos, pré-enxaguados com éter etílico.

Somente as amostras são extraídas antes do ensaio; não extraia os calibradores.

- Faça as amostras atingirem a temperatura ambiente e misture bem antes de começar a extração.
- Numere um frasco para cada amostra.
- Coloque 200 µL de cada amostra no frasco correspondente.
- Adicione 5 mL de éter etílico aos frascos. Vede os frascos com cuidado.
- Agite os frascos em vórtex vigorosamente (2 x 1 minuto).
- Deixe os frascos em repouso sobre a mesa durante 5 minutos no mínimo.

- Retire cuidadosamente 2,5 mL da fase orgânica, sem contaminá-los com a fase aquosa, e coloque-os em tubos de vidro numerados.
- Faça evaporar completamente a fase do éter com evaporador (por exemplo, tipo speedvac) ou colocando os tubos em banho-maria a 37°C.

Nota 1: Os tubos devem ser fixados firmemente no suporte de tubos de teste, uma vez que após a evaporação do éter eles ficam mais leves e tendem a flutuar.

Nessa fase, é possível vedar os tubos que contêm os extratos secos e armazená-los durante um período máximo de 7 dias no frio (2–8°C), antes de continuar o ensaio.

- Dissolva novamente os extratos de éter secos em 200 µL do calibrador zero. Agite em vórtex vigorosamente (30 s, 2.000 rpm), aguarde 15 minutos e agite em vórtex novamente.

Nota 2: Se for necessário um volume maior, em vez de retirar 2,5 mL de fase orgânica, mantenha os frascos a <-18°C até a fase aquosa congelar, retire cuidadosamente 5 mL da fase orgânica sem contaminar a fase aquosa, evapore-a e dissolva-a novamente em 400 µL do calibrador zero.

### Procedimento de imunoensaio

Deixe que todos os reagentes atinjam a temperatura ambiente antes de pipetar.

Etapa 1 Adições	Etapa 2 Incubação	Etapa 3 Contagem
Nos tubos revestidos com anticorpos, adicione sucessivamente: 25 µL de calibrador, controle, amostra ou 50 µL do extrato e 400 µL de rastreador.* Misture.	Incube durante 120 minutos a 18–25°C com agitação (≥280 rpm).	Aspire cuidadosamente o conteúdo dos tubos (exceto os 2 tubos "total cpm" [cpm total]). Lave duas vezes com 2 mL de solução de lavagem. Aspire.  Proceda à contagem da cpm ligada (B) e da cpm total (T) durante 1 min.

\*Adicione 400 µL do rastreador a 2 tubos adicionais para obter a cpm total.

## RESULTADOS

Os resultados são obtidos a partir da curva padrão por interpolação. A curva serve para a determinação das concentrações de 17 OH-P em amostras medidas ao mesmo tempo que o calibrador.

### Curva padrão

Os resultados no departamento de controle de qualidade foram calculados usando o ajuste da curva *spline* com  $B/T$  ou  $B/B_0$  no eixo vertical logit e a concentração de analito dos calibradores no eixo horizontal logarítmico (ng/mL).

Outros métodos de redução de dados podem produzir resultados ligeiramente diferentes.

Atividade total: 179.362 cpm				
Calibradores	17OH-P (ng/mL)	cpm (n=3)	B/T (%)	B/B <sub>0</sub> (%)
0	0	55.975	31,21	100,0
1	0,12	44.882	25,02	80,18
2	0,40	31.190	17,39	55,72
3	1,90	12.557	7,00	22,43
4	12,5	2.515	1,40	4,49
5	50,0	895	0,50	1,60

(Exemplo de curva padrão, não usar para cálculo)

### Amostras

Para cada amostra, localize a relação  $B/T$  ou  $B/B_0$  no eixo vertical e leia a concentração correspondente de 17 OH-P no eixo horizontal.

Para converter ng/mL em nmol/L, multiplique os resultados por 3,026.

## VALORES ESPERADOS

Sugere-se que cada laboratório estabeleça seus próprios valores normais. Os valores a seguir, obtidos com indivíduos saudáveis, são apenas indicativos.

Adults	N	Mediana	Mín.	Máx.	2,5 <sup>o</sup>	97,5 <sup>o</sup>
					percentil	percentil
(ng/mL)						
Homens	55	0,93	0,53	2,22	0,55	1,99
Mulheres						
Fase folicular	111	0,48	0,13	1,67	0,21	1,45
Fase Lútea	112	1,52	0,42	3,20	0,61	2,88
Pico pré-ovulatório	22	1,39	0,54	2,04	0,55	2,01
Contracepção	30	0,37	0,17	1,48	0,18	1,47
Mulheres após a menopausa	38	0,38	0,13	0,92	0,16	0,79
1 <sup>o</sup> trimestre da gravidez	45	2,03	0,78	5,75	0,93	3,82
2 <sup>o</sup> trimestre da gravidez	44	2,23	0,60	6,86	1,23	3,70

Para obter informações mais detalhadas sobre os valores esperados nas crianças (classificados por idade e sexo), consulte a folha de dados "APPENDIX" ("ANEXO").

## CONTROLE DE QUALIDADE

As boas práticas de laboratório implicam o uso regular de amostras de controle para garantir a qualidade dos resultados obtidos. Essas amostras devem ser processadas exatamente da mesma forma que as amostras em ensaio, e é recomendável analisar os resultados utilizando métodos estatísticos adequados.

Em caso de deterioração da embalagem ou se os dados obtidos mostrarem alguma alteração do desempenho, entre em contato com seu revendedor local ou utilize o seguinte endereço de e-mail: [imunochem@beckman.com](mailto:imunochem@beckman.com)

## CARACTERÍSTICAS DE DESEMPENHO

(Para obter mais detalhes, consulte o "APPENDIX" ["ANEXO"] de folhas de dados)

Os dados representativos são proporcionados apenas para fins ilustrativos. O desempenho obtido em laboratórios individuais pode variar.

### Sensibilidade

**Limite de detecção (LoD):** 0,07 ng/mL

O LoD para 17 OH-P é de 0,07 ng/mL, determinado de acordo com as diretrizes do documento EP17-A2 do CLSI [1] com base nas proporções de falsos positivos ( $\alpha$ ) inferiores a 5% e falsos negativos ( $\beta$ ) inferiores a 5%; usando determinações, com 120 brancos e 120 amostras de baixo nível; e limite de branco (LoB) de 0,04 ng/mL.

### Especificidade

O anticorpo usado no imunoensaio é específico para 17- $\alpha$ -hidroxiprogesterona.

### Precisão

#### Repetibilidade e precisão intralaboratorial

A precisão do ensaio foi determinada de acordo com as diretrizes do documento EP05-A3 do CLSI [2]. Para repetibilidade, os coeficientes de

variação observados foram inferiores ou iguais a 10,5% para amostras de soro. Para a precisão entre laboratórios, os coeficientes de variação observados foram inferiores ou iguais a 12,8% para amostras de soro.

### Exatidão

#### Linearidade

O ensaio demonstrou ser linear de 0,12 a 50,88 ng/mL usando amostras de soro (determinado de acordo com as diretrizes do documento EP06-A do CLSI [3]).

#### Teste de diluição

Amostras de soro de alta concentração foram diluídas em série com o calibrador zero. As porcentagens de recuperação variaram entre 95,7% e 119%.

#### Teste de recuperação

Amostras de soro foram aditivadas com quantidades conhecidas de 17 OH-P. As porcentagens de recuperação variaram entre 100% e 119%.

**Intervalo das medições** (do LoD ao calibrador mais alto):

0,07 ng/mL a aproximadamente 50 ng/mL

## LIMITAÇÕES

O não cumprimento das instruções contidas neste folheto informativo pode afetar os resultados de forma significativa.

Os resultados devem ser interpretados conjuntamente com o quadro clínico do paciente, incluindo histórico clínico, dados de testes adicionais e outras informações pertinentes.

Para obter mais detalhes, consulte o "APPENDIX" (ANEXO) da folha de dados.

Lactentes muito jovens (especialmente aqueles com menos de 6 meses de idade) apresentam níveis muito altos de sulfato de 17OH-pregnenolona. Nesse caso particular, recomenda-se a extração com éter antes do ensaio de 17 OH-P.

Apesar da baixa reatividade cruzada, observam-se níveis altos falsos de 17 OH-P após a administração regular de espironolactona. A terapia com espironolactona deve, portanto, ser interrompida no mínimo três semanas antes do ensaio, para garantir a ausência de interferência.

Nos ensaios que utilizam anticorpos, existe a possibilidade de interferência dos anticorpos heterófilos contidos na amostra do paciente. Os pacientes expostos regularmente ao contato com animais ou que tenham sido submetidos a imunoterapia ou a procedimentos diagnósticos que utilizam imunoglobulinas ou fragmentos de imunoglobulinas podem produzir anticorpos, por exemplo HAMA, que interferem com os imunoensaios.

Tais anticorpos interferentes podem produzir resultados errôneos. Os resultados de pacientes suspeitos de terem esses anticorpos devem ser avaliados com cuidado.

## APPENDIX

### PERFORMANCE CHARACTERISTICS

Representative data are provided for illustration only. Performance obtained in individual laboratories may vary.

#### Interference

Serum samples containing 17- $\alpha$ -hydroxyprogesterone concentrations of app. 0.5 and 3 ng/mL were spiked with multiple concentrations of the substances below and assayed using 17 OH-P RIA kit. Values were calculated as described in CLSI EP07, 3rd ed. [4] and EP37, 1st ed. [5]. Interference was determined by testing controls (no interfering substance added) and matched test samples (with interfering substance added). No interference (defined as a shift in dose >15%) was found for addition of interferent up to concentration stated in the table below.

Interferent	Test concentration
Hemoglobin	10,191 $\mu$ g/mL
Conjugated bilirubin	435.9 $\mu$ g/mL
Unconjugated bilirubin	130.6 $\mu$ g/mL
Biotin	1,705 ng/mL
Ascorbic acid	65.67 $\mu$ g/mL
Acetylsalicylic acid	64.48 $\mu$ g/mL
Ibuprofen	211.5 $\mu$ g/mL
Cholesterol	8.13 mg/mL
Heparin	6,227 ng/mL
Prednisone	282.6 ng/mL
Prednisolone	1,282 ng/mL
Protein ( $\gamma$ -globulin)	136.8 mg/mL
Rheumatoid factor	19.76 IU/mL
TAG	12.32 mg/mL

#### Specificity

Data on cross-reactivity with several hormones are presented in the following table:

$$\text{Cross-reactivity (\%)} = \frac{17 \text{ OH-P concentration}}{\text{Compound concentration}} \times 100 \text{ at } 50\% \text{ binding of the zero calibrator}$$

COMPOUND	% CROSS-REACTIVITY
17- $\alpha$ -hydroxyprogesterone	100.0
11-deoxycortisol	2.24
17- $\alpha$ -hydroxypregnenolone sulfate	1.78
17- $\alpha$ -hydroxypregnenolone	1.00
Progesterone	0.28
11-deoxycorticosterone	ND
Aldosterone	ND
Androstenedione	ND
Corticosterone	ND
Cortisone	ND
DHEA	ND
Estradiol	ND
Estriol	ND
Estrone	ND
Etiocolanalone	ND
Pregnenolone	ND
Spironolactone	ND
Testosterone	ND

ND = Non-Detectable (< 0.1%)

#### Repeatability and within-laboratory precision

Five serum samples, five EDTA-plasma samples and five extracts were assayed for 20 days, 2 runs per day, triplicates per run. Assays were performed by two lab technicians, by two reagent lots. There were 120 individual measurements per sample with no invalid results.

Serum	Mean (ng/mL)	Repeatability		Within laboratory precision	
		SD (ng/mL)	C.V. (%)	SD (ng/mL)	C.V. (%)
S1	29.03	3.05	10.50	3.73	12.84
S2	15.88	1.19	7.50	1.44	9.05
S3	11.06	0.60	5.41	0.84	7.58
S4	1.00	0.04	4.28	0.07	7.13
S5	0.20	0.02	8.38	0.02	10.30

EDTA-plasma	Mean (ng/mL)	Repeatability		Within laboratory precision	
		SD (ng/mL)	C.V. (%)	SD (ng/mL)	C.V. (%)
P1	26.02	3.36	12.91	4.41	16.94
P2	19.49	1.54	7.91	2.74	14.05
P3	8.80	0.59	6.69	0.85	9.64
P4	0.69	0.05	7.35	0.07	9.98
P5	0.25	0.02	7.54	0.03	11.19

Extract	Mean (ng/mL)	Repeatability		Within laboratory precision	
		SD (ng/mL)	C.V. (%)	SD (ng/mL)	C.V. (%)
E1	30.49	2.63	8.62	5.83	19.13
E2	16.52	1.15	6.96	2.59	15.70
E3	10.73	0.64	5.93	1.45	13.54
E4	0.74	0.04	5.65	0.08	10.18
E5	0.26	0.02	7.11	0.03	11.45

#### Accuracy

##### Linearity

The assay demonstrated to be linear from 0.12 to 50.88 ng/mL using serum samples (determined consistent with guidelines in CLSI document EP06-A [3]).

The assay demonstrated to be linear from 0.15 to 62.04 ng/mL using EDTA-plasma samples (determined consistent with guidelines in CLSI document EP06-A [3]).

The assay demonstrated to be linear from 0.16 to 64.39 ng/mL using extracts (determined consistent with guidelines in CLSI document EP06-A [3]).

##### Dilution test

Three serum / EDTA-plasma samples / extracts were diluted into the zero calibrator and assayed according to assay procedure.

Serum	Dilution factor	17 $\alpha$ -hydroxyprogesterone (ng/mL)		Ratio (%)
		Measured	Expected	Measured/Expected
S1	-	30.00	-	-
	1:2	14.36	15.00	95.73
	1:4	7.45	7.50	99.33
	1:8	4.45	3.75	118.7
	1:16	2.22	1.88	118.4
S2	-	10.78	-	-
	1:2	5.91	5.39	109.6
	1:4	3.00	2.70	111.3
	1:8	1.48	1.35	109.8
	1:16	0.68	0.67	100.9
S3	-	5.83	-	-
	1:2	3.03	2.92	103.9
	1:4	1.61	1.46	110.5
	1:8	0.74	0.73	101.5
	1:16	0.36	0.36	98.80

EDTA-plasma	Dilution factor	17 $\alpha$ -hydroxyprogesterone (ng/mL)		Ratio (%)
		Measured	Expected	Measured/Expected
P1	-	14.73	-	-
	1:2	7.57	7.37	102.8
	1:4	3.93	3.68	106.7
	1:8	2.08	1.84	113.0
P2	1:16	0.99	0.92	107.5
	-	15.04	-	-
	1:2	8.64	7.52	114.9
	1:4	4.29	3.76	114.1
P3	1:8	2.20	1.88	117.0
	1:16	1.08	0.94	114.9
	-	9.02	-	-
	1:2	5.01	4.51	111.1
	1:4	2.59	2.26	114.9
	1:8	1.29	1.13	114.4
	1:16	0.61	0.56	108.2

EDTA-plasma	Endogen. conc. (ng/mL)	Added conc. (ng/mL)	Expected conc. (ng/mL)	Measured conc. (ng/mL)	Ratio (%) Measured/Expected
P1	0.45	0.25	0.70	0.78	112.1
	0.44	0.48	0.92	1.10	119.2
	0.44	1.92	2.37	2.53	107.0
P2	0.58	0.36	0.95	1.03	108.8
	0.57	0.71	1.27	1.51	118.6
	0.57	2.38	2.95	3.39	114.8
P3	1.80	0.93	2.72	2.72	99.92
	1.87	1.92	3.79	3.75	98.98
	1.76	4.55	6.31	5.57	88.29

Three samples were spiked by calibrator with higher concentration. Volume of added calibrator was up to 10% of volume of samples. Samples were extracted and assayed according to the procedure of the kit.

Extract	Endogen. conc. (ng/mL)	Added conc. (ng/mL)	Expected conc. (ng/mL)	Measured conc. (ng/mL)	Ratio (%) Measured/Expected
E1	1.13	0.66	1.78	1.75	98.15
	1.10	1.61	2.72	3.09	113.8
	1.07	3.13	4.19	4.90	116.8
E2	0.76	0.66	1.42	1.54	108.6
	0.75	1.30	2.05	2.29	111.8
	0.73	2.83	3.56	4.21	118.4
E3	0.38	0.29	0.67	0.74	111.1
	0.38	0.82	1.20	1.28	106.4
	0.38	1.92	2.30	2.57	111.8

#### Comparison of direct and indirect procedure

30 serum samples were assayed by direct and indirect procedure (sample values in direct procedure ranging from 0.23 to 2.22 ng/mL) using the 17 OH-P RIA kit. Results are as follows:

$$[\text{indirect procedure}] = 0.8448[\text{direct procedure}] + 0.0088,$$

$$R = 0.9633$$

#### Expected data for children

Results are sorted according to the age and sex.

Children	N	Median	Min.	Max.	2.5 <sup>th</sup>	97.5 <sup>th</sup>
					percentile	percentile
(ng/mL)						
0-2 months (after extraction)	40	1.41	0.23	3.08	0.42	2.91
3-5 months (after extraction)	20	0.67	0.33	1.69	0.33	1.68
6-23 months	26	0.72	0.13	2.51	0.14	2.35
Boys 2-11 years	38	0.31	0.09	2.21	0.14	1.41
Girls 2-9 years	32	0.50	0.16	2.41	0.19	1.63
Boys 12-15 years	17	0.67	0.30	2.18	0.32	2.10
Girls 10-15 years	25	0.86	0.33	3.21	0.42	2.64

#### <sup>125</sup>I Characteristics

$$T_{1/2} (^{125}\text{I}) = 1443 \text{ h} = 60.14 \text{ d}$$

<sup>125</sup> I	E (MeV)	%
Y	0.035	
X	0.027	114
	0.032	25

Extract	Dilution factor	17 $\alpha$ -hydroxyprogesterone (ng/mL)		Ratio (%)
		Measured	Expected	Measured/Expected
E1	-	22.50	-	-
	1:2	10.86	11.25	96.53
	1:4	6.16	5.63	109.5
	1:8	3.01	2.81	107.0
	1:16	1.44	1.41	102.4
E2	-	15.26	-	-
	1:2	7.33	7.63	96.07
	1:4	3.75	3.82	98.30
	1:8	1.82	1.91	95.41
	1:16	0.88	0.95	92.27
E3	-	10.11	-	-
	1:2	4.88	5.06	96.54
	1:4	2.54	2.53	100.5
	1:8	1.29	1.26	102.1
	1:16	0.64	0.63	101.3

#### Recovery test

Three serum / EDTA-plasma samples were spiked by calibrator with higher concentration. Volume of added calibrator was up to 10% of volume of samples. Samples were then assayed.


Serum	Endogen. conc. (ng/mL)	Added conc. (ng/mL)	Expected conc. (ng/mL)	Measured conc. (ng/mL)	Ratio (%) Measured/Expected
S1	0.76	0.36	1.12	1.13	100.8
	0.74	0.60	1.34	1.38	103.1
	0.74	2.38	3.12	3.24	103.7
S2	1.32	0.60	1.92	2.08	108.4
	1.34	1.92	3.26	3.43	105.2
	1.29	3.70	4.99	5.95	119.2
S3	1.82	0.82	2.64	2.64	99.99
	1.88	1.92	3.80	4.44	116.9
	1.77	4.55	6.32	7.06	111.7


## Symbols Key

**REF** Product Reference / Référence du produit / Produktreferenz / Riferimento prodotto / Número de referencia del producto / Referência do produto / Produktreferens / Κωδικός αναφοράς προϊόντος / 产品参考 / Gaminio nuoroda / Termékszám / Dane referencyjne produktu / Reference k produktu / Referenčné označenie výrobku / 제품 참조 자료 / Úrün Referansı / Ссылка на продукт / Референция за продукт / 產品參考

**IVD** In Vitro Diagnostic / Diagnostic in vitro / In-vitro-Diagnostikum / Diagnostica in vitro / Para diagnóstico in vitro / Diagnóstico in vitro / InVitro-diagnostik / Για διάγνωση in vitro / 体外诊断 / In vitro diagnostika / In vitro diagnosztikai felhasználásra / Diagnostyka in vitro / Diagnostika in vitro / 체외 진단 / In Vitro Diagnostik / Diagnostika in vitro / За ин витро диагностика / 體外診斷


**CONTENTS** Contents / Contenu / Inhalt / Contenuto / Contenido / Conteúdo / Περιεχόμενο / 組成 / Rinkinio sudėtis / Tartalom / Zawartość / Obsah / Obsah / 내용물 / İçindekiler / Содержание / Съдържание / 目錄


 Manufactured by / Fabriqué par / Hergestellt von / Prodotto da / Fabricado por / Tillverkas av / Κατασκευαστής / 製造商 / Gamintojas / Gyártó: / Producent / Výrobce / Výrobca / 제조 / Üretici / Изготовлено / Произведено от / 製造商


 Contains sufficient for <n> tests / Contenu suffisant pour "n" tests / Inhalt ausreichend für <n> Prüfungen / Contenuto sufficiente per "n" saggi / Contenido suficiente para <n> ensayos / Conteúdo suficiente para "n" ensaios / Räcker till "n" antal tester / Περιεχόμενο επαρκές για "n" εξετάσεις / 含量足够 <n> 次测试 / Turinio pakanka <n> tyrim / <n> teszthez elegendő mennyiséget tartalmaz / Zawartość wystarcza na <n> testów / Lze použít pro <n> testů / Obsah vystačí na <n> testov / <n> 테스트에 대해 충분한 양 포함 / <n> sayida test için yeterlidir / Содержит достаточно для количества тестов: <n> / Съдържа достатъчно за <n> теста / 內容物足夠執行 <n> 次測試

**CE** CE Mark / Marquage CE / CE-Kennzeichnung / Marchio CE / Mercado CE / Marcação CE / CE-märkning / Σήμανση CE / CE 标志 / CE ženklas / CE jelzés / Znak CE / Značka CE / Označenie CE / CE 표시 / CE İşareti / Маркировка CE / CE маркировка / CE 標識

**SDS** Safety Data Sheet / Fiche technique santé-sécurité / Sicherheitsdatenblatt / Scheda dati di sicurezza / Hoja de datos de seguridad / Ficha de Dados de Segurança / Säkerhetsdatablad / Φύλλο Δεδομένων Ασφάλειας / 安全数据单 / Saugos duomenų lapas / Biztonsági adatlap / Karta Charakterystyki Bezpieczeństwa / Bezpečnostní list / Bezpečnostný list / 안전보건자료 / Güvenlik Bilgi Formu / Паспорт безопасности / Информационен Лист За Безопасност / 安全性資料表

 Consult Instructions for Use / Consultez le mode d'emploi / Siehe Gebrauchsanweisung / Consultare le istruzioni per l'uso / Consulte las Instrucciones de uso / Instruções de utilização / Konsultera bruksanvisning / Συμβουλευτείτε τις οδηγίες χρήσης / 请参阅使用说明 / Skaitykite naudojimo instrukciją / Olvassa el a használati utasítást / Zapoznać się z instrukcją użycia / Postupujte podle návodu k použití / Prečítajte si návod na použitie / 사용 안내 문의 / Kullanma Talimatına Başvurun / Обратитесь к инструкциям / Вижте Инструкциите за употреба / 請參閱使用說明

 Temperature range(s) / Plage(s) de température / Temperaturbereich(e) / Intervallo/i di temperatura / Intervalo(s) de temperatura / Intervalo(s) de temperatura / Temperaturintervall / Εύρος(-η) θερμοκρασίας / 溫度範圍 / Temperatūros diapazonas (-ai) / Hőmérséklet-tartomány(ok) / Zakres(y) temperatury / Rozsahy teplot / Rozsah(y) teploty / 온도 범위 / Sıcaklık aralıkları / Диапазон(-ы) температуры / Температурен(ни) диапазон(и) / 溫度範圍

 Caution / Précaution / Achtung / Attenzione / Precaución / Atenção / Försiktighet / Προσοχή / 注意事项 / Įspėjimas / Figyelem / Uwaga / Upozornění / Upozornenie / 주의 / Dikkat / Внимание / 注意

 Expiration Date / Date D'expiration / Verfallsdatum, Verw. bis: / Data Di Scadenza / Fecha De Caducidad / Data de validade / Utgångsdatum / Ημερομηνία λήξης / 失效日期 / Galiojimo data / Lejárati idő / Data ważności / Datum expirace / Datum expirație / 만료 날짜 / Son Kullanma Tarihi / Срок годности / Срок на годност / 到期日

**LOT** Lot Number / Numéro de lot / Chargennummer / Numero di lotto / Lote número / Número de lote / Satsnummer / Αριθ. παρτίδας / 批次号 / partijos numeris / Tételszám / Numer serii / Číslo šarže / 로트 번호 / Lot Numarası / Номер партии / Номер на партида / 批號

 Date of Manufacture / Date de Fabrication / Herstellungsdatum / Data di Fabbricazione / Fecha de Fabricación / Data de Fabrico / Produktionsdatum / Ημερομηνία Παραγωγής / 生产日期 / Pagaminimo Data / Gyártás Dátuma / Data Produkcji / Datum Výroby / Datum Výroby / 제조 일자 / Üretim Tarihi / Дата Производства / Дата на Производство / 製造日期



Biohazard / Risque biologique / Biogefährdung / Rischio biologico / Riesgo biológico / Risco biológico / Biologisk fara / Βιολογικός κίνδυνος / 生物危害 / Biologisk fara / Veszélyes biológiai anyag / Zagrożenie biologiczne / Biologické riziko / Biologické riziko / 생물학적 위험 / Biyolojik tehlike / Биологическая опасность / Биологична опасност / 生物危害



Radioactive / Radioactif / Radioaktiv / Radioattivo / Radiactivo / Radioactivo / Radioaktiv / Ραδιενεργό / 放射性 / Radioaktyvioji medžiaga / Radioaktiv / Radioaktywny / Radioaktivní / Rádioaktívny / 방사성 / Radyoaktif / Радиоактивный / Радиоактивен / 具放射性

**DANGER**

DANGER / DANGER / GEFAHR / PERICOLO / PELIGRO / PERIGO / FARA / ΚΙΝΔΥΝΟΣ / 危險 / PAVOJUS / VESZÉLY / NIEBEZPIECZENSTWO / NEBEZPEČÍ / NEBEZPEČENSTVO / 위험 / TEHLÍKE / ОПАСНО / ОПАСНОСТ / 危險

**Ag**<sup>125I</sup>

**Ab**<sup>125I</sup>

Tracer / Traceur / Tracer / Marcato / Trazador / Marcador / Tracer / Ανιχνευτής / 追踪剂 / Atsekamoji medžiaga / Nyomjelző / Znacznik / Radioindikátor / Indikátor (tracer) / 트레이서 / Tracer'lar / метка / Индикатор / 追蹤劑

**CAL**

**CAL 0**

Calibrator / Calibrateur / Kalibrator / Calibratore / Calibrador / Calibrador / Kalibrator / Βαθμονομητής / 校准品 / Kalibravimo medžiaga / Kalibrátor / Kalibrator / kalibrátor / Kalibrátor / 보정 물질 / Kalibratör / Калибратор / Калибратор / 校正液

**CTRL**

Control / Contrôle / Kontrolle / Controllo / Control / Controllo / Kontrolle / Μάρτυρας / 质控品 / Kontrolliné / Kontroll / Kontrola / Kontrola / Kontrola / 정도관리 / Kontrol / Контроль / Контролна / 質控品

**TUBE**

Tubes / tubes / Röhrchen / provette / tubos / Tubos de amostra / Provrör / σωληνάκια / 试管 / Mégintüveliai / Csövek / Probówki / Zkumavky / Skúmavky / 튜브 / Tüpler / пробирки / Епруветки / 試管

**IFU**

Instruction for Use / Mode d'emploi / Gebrauchsanweisung / Istruzioni per l'uso / Instrucciones de uso / Instruções de utilização / Bruksanvisning / Οδηγίες χρήσης / 使用说明 / Naudojimo instrukcija / Használati utasítás / Instrukcja użycia / Návod k použití / Návod na použitie / 사용 안내 / Kullanma Talimatı / Инструкции / Инструкции за употреба / 使用说明

**SOLN|WASH|20x**

Wash Solution Concentrate 20X / Solution de lavage concentrée 20X / Waschlösungskonzentrat 20X / Concentrato di soluzione di lavaggio 20X / Solución de lavado concentrada 20X / Concentrado de solução de lavagem 20X / Tvättlösningkoncentrat 20X / Συμπυκνωμένο διάλυμα πλύσης 20X / 浓缩清洗液 20X / Plovimo tirpalu koncentratas 20X / 20X mosóoldat-koncentrátum / Koncentrat 20X roztworu płuczacego / Koncentrát mycího roztoku 20X / Koncentrát premývacieho roztoku 20X / 농축 세척액(20배) / Yıkama Çözeltisi Konsantresi 20X / Концентрат промывочного раствора 20X / Концентрат на разтвор за промиване 20X / 清洗溶液濃縮 20X

## REFERENCES

1. Approved Guideline - Evaluation of Detection Capability for Clinical Laboratory Measurement Procedures, EP17-A2. June 2012. Clinical and Laboratory Standards Institute.
2. Approved Guideline – Evaluation of Precision of Quantitative Measurement Procedures, EP05-A3. October 2014. Clinical and Laboratory Standards Institute.
3. Approved Guideline - Evaluation of the Linearity of Quantitative Measurement Procedures: A Statistical Approach, EP06-A. April 2003. Clinical and Laboratory Standards Institute.
4. Approved Guideline - Interference Testing in Clinical Chemistry, EP07, 3rd.ed. April 2018. Clinical and Laboratory Standards Institute.
5. Approved Guideline - Supplemental Tables for Interference Testing in Clinical Chemistry, EP37, 1st ed. April 2018. Clinical and Laboratory Standards Institute.