

17-OH-Progesterone kit

ELISA Testkit zur quantitativen Bestimmung des 17-Hydroxyprogesterons in humanem Blutserum und Plasma
(Gebrauchsanweisung: Seite 4)

Enzyme immunoassay for quantitative determination of 17-OH-progesterone in human serum and plasma
(Instructions for use: page 29)

Manueller Test / Manual test
 Automatisierter Test / Automated test

Abschnitt / Section 13
Abschnitt / Section 14

IVD

17-OH-Progesterone Kit
 (Manueller Test)
 17-OH-Progesterone kit
 (manual test)



96 Untersuchungen
 96 tests

20-03

REF

17-OH-Progesterone Kit
 (Automatisierter Test für
 "Alisei")
 17-OH-Progesterone kit
 (automated test for "Alisei")















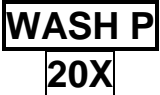










96 Untersuchungen
 96 tests

20-03 A

REF

1. KENNZEICHEN / SYMBOLS LEGEND

	In-vitro Diagnostika In vitro diagnostic medical device		EG- Konformitätserklärung EC Declaration of conformity
	Bestellnummer Catalogue number		Chargenbezeichnung Batch code
	Verwendbar bis Use by		Hersteller Manufacturer
	Herstellungsdatum Date of manufacture		Temperaturbegrenzung Temperature limitation
	Auflösen mit angegebenem Volumen Reconstitute with specified volume of liquid		Gebrauchsanweisung beachten Consult operating instructions
	Ausreichend für < n > Prüfungen Contains sufficient for <n> tests		Biogefährdung Biological risks
	Beschichtete Mikrotiterplatte (96 Kavitäten) Coated microplate (96 wells)		Konjugat Conjugate
	Waschlösung, 20x konzentriert Wash solution, 20X concentrated		Substrat Substrate
	Kalibratoren Calibrators		Stopplösung Stop solution
	Kontrolle Control		Optische Dichte Optical density
	Trial-Lösung, 5000x konzentriert Trial		Deionisiertes, destilliertes Wasser Deionized or distilled water
			Reizend Irritant
		Warning	

2. VERWENDUNGSZWECK

Der **17-OH-Progesterone Testkit** wird für die **quantitative** Bestimmung der Konzentration von **17-Hydroxyprogesteron (17-OHP)** in **menschlichem Blutserum** und **Plasma** verwendet.

Der Testkit ist in zwei Variationen erhältlich:

- REF 20-03** Für den manuellen Gebrauch;
REF 20-03 A Für den Gebrauch mit ELISA-Automat "Alisei", hergestellt durch die Firma Next Level S.r.l.

Die Gebrauchsanweisungen befinden sich:

- Abschnitt 13 Manueller Test;
 Abschnitt 14 Automatisierter Test "Alisei".

Anmerkung 1: *Die Konzentrationswerte der Kalibratoren können bei manuellem und automatisiertem Testkit variieren.*

Anmerkung 2: *Wir garantieren verlässliche Testergebnisse bei folgender Anwendung der Testkits:*

- REF 20-03 A** nur für ELISA-Automat "Alisei";
REF 20-03 nur für den manuellen Gebrauch.

Bei Verwendung einer nicht vordefinierten Methode ist der Anwender dafür verantwortlich, sicherzustellen, dass diese für ELISA-Kits angemessen getestet wurde.

17-OHP ist ein Steroidhormon mit einer Molekularmasse von ca. 330,5 Da. Es wird von der Nebennierenrinde und in den Gonaden (Geschlechtsdrüsen) sekretiert.

Der 17-OHP-Level weist parallel zur Kortisol-Sekretion tageszeitabhängige Schwankungen auf. Ein

Konzentrationsmaximum findet sich in den Proben, die in frühen Morgenstunden abgenommen wurden.

Bei nicht-schwangeren Frauen ist die 17-OHP-Konzentration im Blut vom Menstruationszyklus abhängig. 17-OHP wird genau wie Progesteron vom reifen Follikel und *Corpus luteum* sezerniert. Die 17-OHP-Konzentration erhöht sich wesentlich während der Schwangerschaft, weil es von der Nebennierenrinde des Fetus und von der Plazenta gebildet wird.

Eine quantitative Bestimmung des 17-OHP im Serum ist ein wertvolles Werkzeug zur Kontrolle der 21-Hydroxylaseaktivität der Nebennierenrinde. Ein Mangel an 21-Hydroxylase macht sich bei der angeborenen Nebennierenrinden-Hyperplasie bemerkbar und führt zu einer Überproduktion von 17-OHP sowie einem Anstieg dessen im peripheren Blut. Ein Mangel an 11-Hydroxylase ist dagegen nur mit einer mäßigen Erhöhung der 17-OHP-Konzentration verbunden. Daher spielt die Bestimmung dieses Steroidhormons bei der Differentialdiagnostik der angeborenen Nebennierenrinden-Hyperplasie eine wichtige Rolle.

3. TESTPRINZIP

Der **17-OH-Progesterone Testkit** ist ein kompetitiver Festphasen-Immunoassay. Während der Inkubation binden das 17-OHP der zu testenden Probe und das 17-OHP-HRP-Konjugat an die Antikörper, die an der Innenfläche der Kavitäten der Mikrotiterplatte gekoppelt sind, bis sich ein Gleichgewicht einstellt. Freies 17-OHP wird von dem an die

Antikörper gebundenem 17-OHP und dem 17-OHP-HRP-Konjugat beim Leeren der Kavitäten getrennt.

Dabei ist die Menge des gebundenen Konjugates umgekehrt proportional zur Menge des 17-OHP in der Probe (Abb.1).

Während der Inkubation mit der TMB-Lösung entwickelt sich die Farbreaktion. Die Farbintensität ist indirekt proportional zur 17-OHP-Konzentration der Probe. Die 17-OHP-Konzentration in der Patientenprobe wird mit einer Standardkurve, die mit dem Testkit erarbeitet wird, ausgelesen.

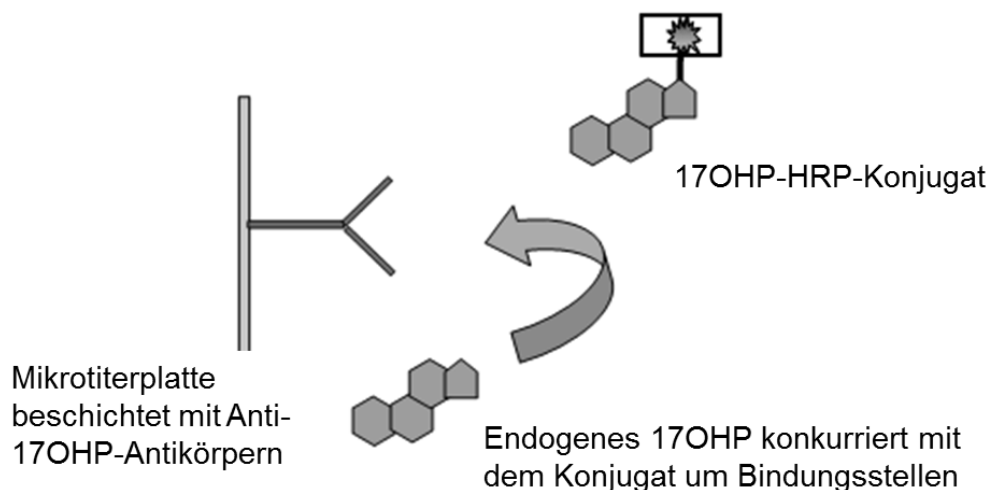


Abb1. Testschema

4. LAGERUNG UND STABILITÄT DES TESTKITS

Das Verfallsdatum des kompletten Testkits ist auf dem Außenetikett angegeben; das Verfallsdatum jeder einzelnen Testkomponente ist auf dem jeweiligen Etikett angegeben.

Der **17-OH-Progesterone Testkit** ist nach dem Empfang und bis zur Verwendung bei +2...+8 °C vorzugsweise in der

Originalverpackung des Herstellers zu lagern. Eine Lagerung bei Temperaturen bis +25 °C ist maximal für 5 Tage zulässig.

Die Haltbarkeitsdauer des Kits beträgt 18 Monate.

Nach dem Öffnen ist der Testkit bei einer Lagerung von +2...+8 °C bis zu 12 Monate haltbar. Wenn der Testkit in mehreren getrennten Experimenten verwendet wird, ist der Inhalt nach dem Öffnen wie folgt zu lagern aber die Komponenten dürfen nie länger als bis zu ihrem Ablaufdatum verwendet werden:

- Die ungenutzten Mikrotiterplatten-Streifen: in einem fest verschlossenen Druckverschlussbeutel, konzentrierte Waschlösung und Stopplösung bei +2...+8 °C bis zum Verfallsdatum;
- Fläschchen mit Konjugat, Kalibratoren und Kontrolle (gebrauchsfertig): bei +2...+8 °C für 12 Monate;
- Fläschchen mit Kalibratoren und Kontrolle (gelöst aus Lyophilisat): bei +2...+8 °C für maximal 1 Monat nach dem Öffnen;
- Fläschchen mit Substrat-Lösung: bei +2...+8 °C bis zum Verfallsdatum, lichtgeschützt;
- Fläschchen des Trial- und Waschpuffer-Konzentrats und der Stopplösung: bei +2...+8 °C bis zum Verfallsdatum;
- Gebrauchsfertige Waschlösung: in einem dicht verschlossenen Behälter bei Raumtemperatur (+18... +25 °C) für maximal 5 Tage oder bei +2...+8°C für maximal 4 Wochen;
- Gebrauchsfertige Trial-Lösung: in einem dicht verschlossenen Behälter bei Raumtemperatur (+18... +25 °C) für maximal 5 Tage.

Beschädigte Testkits

Im Falle einer schweren Beschädigung des Testkits oder der Komponenten muss Astra Biotech GmbH schriftlich innerhalb einer Woche nach dem Empfang der Ware informiert werden. Der Gebrauch stark beschädigter Komponenten für einen Testlauf wird nicht empfohlen.

5. PROBENGEWINNUNG UND LAGERUNG

Blut durch Venenpunktion entnehmen und in einem Antikoagulantien-freien Röhrchen (für Serum) oder einen Vakuumröhrchen mit EDTA oder Heparin (für Plasma) sammeln. Der Gebrauch anderer Antikoagulantien für den **17-OH-Progesterone Kit** ist nicht validiert. Zur Gewinnung von Serumproben das Blut gerinnen lassen. Durch Zentrifugation werden das Serum und Plasma von den Blutkörperchen abgetrennt. Es ist nicht zulässig, für eine Analyse hämolysiertes (hell rot) oder lipämisches (milchig) Serum, sowie Natriumazid-haltige Serumproben zu benutzen.

Die Blutserum- und Plasma-Proben sind bei +2...+8 °C nicht länger als 5 Tage zu lagern. Bei Notwendigkeit einer dauerhaften Aufbewahrung wird empfohlen, die Probe zu aliquotieren und bei Temperatur von ≤ -20 °C gefroren zu lagern. Ein wiederholtes Einfrieren ist zu vermeiden.

6. REFERENZWERTE

Mit Hilfe des **17-OH-Progesterone Testkits** wurden Blutserumproben, die von 9 bis 11 Uhr bei 120 gesunden 21- bis 45-jährigen Blutspendern beiden Geschlechts entnommen

wurden, untersucht. Die Ergebnisse sind unten dargestellt. Die angegebenen Bereiche dienen jedoch nur als eine Orientierungshilfe.

Gruppe	Nº	17-OHP-Konzentration (nmol/l)
<i>Frauen</i>	120	
Follikelphase		<0,3-2,06
Lutealphase		1,42-6,91
<i>Männer</i>		0,4-8,3

Es wird ausdrücklich empfohlen, dass jedes Labor einen eigenen Referenzbereich für die 17-OHP-Normkonzentrationen bestimmt.

7. QUALITÄTSKONTROLLE

Es wird empfohlen, Kontrollproben entsprechend der nationalen und regionalen Vorschriften zu benutzen. Der Einsatz der Kontrollproben sichert die Tag-zu-Tag Gültigkeit der Ergebnisse.

8. REAGENZIVORBEREITUNG

Vor dem Gebrauch müssen alle Reagenzien auf Raumtemperatur (+18...+25 °C) gebracht und gründlich gemischt werden.

MP Mikrotiterplatte

Die Verpackung mit der **Mikrotiterplatte** vor der Öffnung mindestens 30 Minuten bei Raumtemperatur (+18...+25 °C) lagern und anschließend wie folgt vorbereiten:

- Notwendige Anzahl der Streifen in den Rahmen einsetzen. Die unbenutzten Streifen in einen Druckverschlussbeutel legen und gut verschließen.

CAL CONTROL Kalibratoren und Kontrolle

Flüssige Kalibratoren und die flüssige Kontrolle sind gebrauchsfertig. Die lyophilisierten Kalibratoren und die Kontrolle wie folgt vorbereiten:

- Durch leichtes Klopfen auf den Deckel wird der Feststoff vom Flaschenrand gelöst.
- Die Fläschchen werden vorsichtig geöffnet und die Deckelkappen umgedreht auf eine trockene und saubere Oberfläche gelegt.
- 0,5 ml destilliertes oder deionisiertes Wasser wird jeweils in die Flaschen der Kalibratoren und der Kontrolle pipettieren, diese wieder mit jeweiligem Deckel verschlossen und 10 Minuten bei Raumtemperatur ohne Mischen inkubiert.
- Danach unter Vermeidung einer Schaumbildung sorgsam rühren bis der Feststoff komplett gelöst ist. Weitere 10 Minuten bei Raumtemperatur (+18...+25°C) unter periodischem Schütteln inkubieren. Es darf kein Feststoff im Deckel oder an den Wänden der Fläschchen zurückbleiben.

WASH P Waschlösung

Zubereitung der benötigten Menge der Waschlösung durch 20fache Verdünnung des Konzentrates mit destilliertem Wasser:

5 ml **WASH P 20X** + 95 ml Wasser

Sorgfältig mischen, Schaumbildung vermeiden.

SUB Substrat vor direktem Licht schützen.

9. PROBENVORBEREITUNG

Vor dem Gebrauch müssen die zu testenden Proben auf Raumtemperatur (+18...+25 °C) gebracht und gründlich, unter Vermeidung von Schaumbildung, gemischt werden.

10. TESTCHARAKTERISTIKA

10.1 Kalibrierung:

Der **17-OH-Progesterone Testkit** wurde gegen einen nach gravimetrischer Methode hergestellten Arbeitsstandard kalibriert. Die gravimetrische Methode basiert auf dem Abwiegen von aufgereinigtem, synthetischem 17-OHP in einer Analyten-freien Matrix.

10.2 Spezifität:

Die Kreuzreaktion der verwendeten polyklonalen 17-OHP-Antikörper mit anderen Steroiden ist in der folgenden Tabelle dargestellt:

Steroid	Kreuzreaktion, %
C21-Steroide	
17-OH-Progesteron	100
Pregnenolon	0,008
17-OH-Pregnenolon	0,626
17-OH-Pregnenolonsulfat	0,586
Progesteron	0,340
Desoxycorticosteron	0,018

11-Desoxycortisol	0,586
21-Desoxycortisol	1,690
Corticosteron	0,003
Aldosteron	< 0,001
Cortisol	0,003
C19-Steroide	
Androstendion	0,002
Testosteron	0,004
5- α -Dihydrotestosteron	< 0,001
DHEA	< 0,001
DHEAS	< 0,001
C18-Steroide	
17- β -Estradiol	< 0,001
17- α -Estradiol	< 0,001
Estron	< 0,001
Estriol	< 0,001

10.3 Analytische Sensitivität:

Die analytische Sensitivität des **17-OH-Progesterone Testkits**, die minimale Konzentration, die sich vom Kalibrator 0 sicher unterscheiden lässt, beträgt 0,3 nmol/l (manuelles und Alisei Testkit). Zur Ermittlung der analytischen Empfindlichkeit wurde der Mittelwert einer 10fach-Bestimmung der OD des Kalibrators 0 unter Berücksichtigung der Standardabweichung (minus 2 SD) gebildet.

10.4 Messbereich:

Der **17-OH-Progesterone Testkit** (manuelles und Alisei Testkit) ist validiert für die Detektion einer 17-OHP-Konzentration innerhalb eines Bereiches von 0,3- 60 nmol/l.

10.5 Messeinheiten:

Im **17-OH-Progesterone Testkit** sind die Konzentrationswerte der Kalibratoren in nmol/l dargestellt. Für eine Umrechnung in ng/ml muss der Konzentrationswert in nmol/l mit 0,33 multipliziert werden.

10.6 Intra-assay und Inter-Assay Varianz:

Um einen **Intra-Assay Variationskoeffizienten** festzulegen, wurden 6 Blutserumproben, jeweils in 2fach-Bestimmung untersucht. Die Testresultate sind in der Tabelle dargestellt:

Manuelles Testkit

Probe	Mittlere 17-OHP Konzentration, nmol/l	Intra-assay VK	
		SD	VK, %
1	2,8	0,1	2,6
2	8,2	0,2	2,7
3	12,0	0,3	2,5
4	15,6	0,3	1,9
5	23,2	0,9	3,6
6	34	2,0	5,9

Alisei Testkit

Probe	Mittlere 17-OHP Konzentration, nmol/l	Intra-Assay Vk	
		SD	VK, %
1	2,7	0,06	2,4
2	8,4	0,07	0,8
3	13,7	0,28	2,1
4	18,1	0,35	1,9
5	25,7	0,21	0,8
6	43,2	0,42	1,0

Um einen **Inter-Assay Variationskoeffizient** festzulegen, wurden 6 Blutserumproben drei Mal mit einem Intervall von

einer Woche von verschiedenen Anwendern untersucht. Jede Probe wurde 2 Mal gemessen. Die Testergebnisse sind in der Tabelle dargestellt:

Manuelles Testkit

Probe	Mittlere 17-OHP-Konzentration, nmol/l			Inter-assay VK	
	1. Test	2. Test	3. Test	SD	VK, %
1	1,3	1,4	1,4	0,03	2,2
2	2,8	2,9	2,7	0,1	1,6
3	8,3	8,1	8,2	0,1	0,8
4	15,2	15,5	15,1	0,2	1,3
5	24,3	24,8	24,6	0,3	1,0
6	34,2	34,6	36,2	1,1	3,0

Alisei Testkit

Probe	Mittlere 17-OHP-Konzentration, nmol/l			Inter-assay VK	
	1. Test	2. Test	3. Test	SD	VK, %
1	1,5	1,5	1,4	0,06	3,9
2	3,0	3,2	3,1	0,10	3,2
3	7,7	7,9	8,0	0,15	1,9
4	17,6	18,2	16,9	0,65	3,7
5	22,3	22,0	22,5	0,25	1,1
6	38,5	39,0	39,2	0,36	0,9


11. GRENZEN DER METHODE

Eine klinische Diagnose sollte nicht allein mit Hilfe der Ergebnisse einer einzelnen diagnostischen Methode erhoben werden. Zur Diagnosestellung sollten vom Arzt alle



verfügbaren klinischen und Laborbefunde berücksichtigt werden.

12. VORSICHTSMAßNAHMEN

- **Der Testkit ist ausschließlich zum in vitro–Gebrauch bestimmt.** Um zuverlässige Testergebnisse zu erhalten, ist die Arbeitsanleitung strikt einzuhalten. Diese Gebrauchsanweisung ist nur für den vorliegenden Testkit mit dem aufgeführten Inhalt gültig. Jeglicher Austausch der Kitkomponenten ist durch die CE-Regularien nicht gestattet.
- Der Testkit oder einzelne Kit-Komponenten dürfen nach Ablauf des auf der Verpackung angegebenen Verfallsdatums nicht mehr verwendet werden. Die vorn angegebene Haltbarkeit der verdünnten Komponenten muss ebenfalls berücksichtigt werden.
- Das Mischen oder die gleichzeitige Verwendung von Reagenzien verschiedener Testchargen, ausgenommen Substrat, Stopp- und Waschlösung, ist nicht gestattet.
- Substrat, Stopp- und Waschlösung anderer Hersteller nicht verwenden.
- Nur “P”-gekennzeichnete Waschlösung von Astra Biotech benutzen.
- Die Stopplösung ist eine 1 N Salzsäure (HCl–Lösung). Vermeiden Sie Haut- und Schleimhautkontakt. Bei Haut- oder Schleimhautkontakt den betroffenen Bereich mit fließendem Wasser spülen und gegebenenfalls einen Arzt aufsuchen.
- Bitte folgende bekannte Verfahrensregeln beachten:

- Reagenzien unmittelbar nach dem Waschen in die Kavitäten pipettieren.
 - Kontamination der Lösungen vermeiden;
 - Bei teilweiser Nutzung des Testkits nur benötigtes Volumen in ein gesonderten Behälter geben, nicht benutzte Reagenzien NICHT zurück in die ursprünglichen Original-Fläschchen füllen;
 - Direkte Sonneneinstrahlung während der Inkubation vermeiden;
 - Reagenzien in gleicher Reihenfolge pipettieren, um Unterschiede in den Reaktionszeiten zwischen den Kavitäten zu vermeiden. Die gesamte Pipettierzeit für Kalibratoren, Kontrolle und Proben darf 15 Minuten nicht überschreiten;
 - Die Temperatur der Inkubation aller immunologischer Reaktionen muss bei +37 °C liegen;
 - Den Boden der Kavitäten nicht berühren;
 - Kalibratoren müssen bei jedem Testlauf gemessen werden. Es wird außerdem empfohlen, die 17-OHP-Konzentration der Kontrolle jedes Mal zu bestimmen;
 - Entfernen Sie die Klebeschutzfolie vorsichtig um eine Kontamination zu vermeiden und verwenden Sie dieselbe Klebeschutzfolie nicht erneut.
- Die TMB-Lösung sollte farblos sein. Eine helle Färbung der Lösung ist zulässig. Vermeiden Sie direkte Sonneneinstrahlung des Substrates;
 -  Nach dem Gebrauch werden Streifen, Kalibratoren, Kontrollen, Proben und alle Verbrauchsmittel (Reaktionsgefäße, Fläschchen, Handschuhe, Pipettenspitzen), die mit den Proben während der

Bearbeitung oder Lagerung in Kontakt kamen, separat gesammelt und autoklaviert. Pipettenspitzen können anstelle des Autoklavierens durch Inkubation in desinfizierenden Substanzen sterilisiert werden. Nach der Sterilisation können alle Komponenten und Einmal-Artikel als nicht gefährlicher Müll behandelt werden. Andere Kitbestandteile werden auf konventionelle Weise entsorgt;

-  Während der manuellen Waschprozedur Überstände nicht in den Abfluss geben, sondern in einen Behälter mit Desinfektionsmittel.
-  Beim Umgang mit potentiell infektiösem Material müssen die folgenden Vorsichtsmaßnahmen beachtet werden:
 - Im Laborraum nicht rauchen, nicht trinken und nicht essen.
 - Schutzhandschuhe verwenden;
 - Nie mit dem Mund pipettieren;
 - Verspritzen von Flüssigkeiten vermeiden. Sollte doch Flüssigkeit vergossen worden sein, diese sofort aufnehmen und die verschmutzte Oberfläche desinfizieren.
- Bei der Verwendung des Testkits müssen die Anforderungen der guten Laborpraxis (GLP) inklusive aller Richtlinien beachtet werden.



Der Testkit beinhaltet Reizstoffe (**CONJ**, **CAL**, **CONTROL**). Daher sollten folgende Vorsichtsmaßnahmen beachtet werden:

- P261 - Einatmen von Staub / Rauch / Gas / Nebel / Dampf / Aerosol vermeiden;
- P272 - Kontaminierte Arbeitskleidung nicht außerhalb des Arbeitsplatzes tragen;
- P280 - Schutzhandschuhe / Schutzkleidung / Augenschutz / Gesichtsschutz tragen;
- P302+P352 - Bei Berührung mit der Haut: Mit viel Wasser und Seife waschen;
- P333+P313 - Bei Hautreizung oder -ausschlag: Ärztlichen Rat einholen / ärztliche Hilfe hinzuziehen;
- P363 - Kontaminierte Kleidung vor erneutem Tragen waschen;
- P501 - Inhalt/Behälter den nationalen Vorschriften entsprechend der Entsorgung zuführen.

Die Vorsichtsmaßnahmen entsprechen der Verordnung EG Nr. 1272/2008.

13. MANUELLER TEST (REF 20-03)

13.1. Packungsinhalt

MP	Mikrotiterplatte: Zwölf Streifen mit acht Kavitäten (insgesamt 96 Kavitäten), beschichtet mit polyklonalen 17-OHP-Antikörpern	1 Platte
CONJ	Konjugat: Lösung mit 17-OHP konjugiert mit Meerrettich Peroxidase (HRP)	9 ml, gebrauchsfertig
0-5 CAL	17-OHP Kalibratoren: Protein-Puffer oder Lyophilisate mit definierter 17-OHP-Konzentration: 0; 1; 2; 6; 10; 60 nmol/l (ungefähre Werte - verwenden Sie die Daten nicht für die Auswertung des Assays). Die Konzentrationen der Kalibratoren können sich zwischen Protokoll 1 und 2 unterscheiden. Die exakten Lot spezifischen 17-OHP-Konzentrationen sind im Quality Control Sheet angegeben.	6 Fläschchen mit je 0,5 ml gebrauchsfertig oder lyophilisiert
CONTROL	17-OHP Kontrolle: Protein-Puffer oder Lyophilisate mit definierter 17-OHP- Konzentration. Der Konzentrationsbereich kann sich zwischen Protokoll 1 und 2 unterscheiden. Der Lot spezifische 17-OHP-Konzentrationsbereich ist im Quality Control Sheet angegeben.	0,5 ml gebrauchsfertig oder lyophilisiert
SUB	Substrat (TMB): 3,3',5,5'-Tetramethylbenzidin in Citrat-	14 ml,

	Puffer, mit Wasserstoffperoxid	gebrauchsfertig
WASH P 20X	Waschlösung P, 20x konzentriert: Tensid in Salzlösung, ausreichend für die Vorbereitung von 560 ml Lösung.	2x14 ml konzentriert
STOP	Stopplösung: 1 N HCl - Lösung	14 ml, gebrauchsfertig
	Klebeschutzfolie	2x1 Folie (optional)

13.2 Erforderliche, aber nicht mitgelieferte Materialien und Equipment

- geeichte, verstellbare Einkanal-Pipetten mit Einweg-Pipettenspitzen;
- geeichte, verstellbare 8-Kanal-Pipette mit Einweg-Pipettenspitzen;
- Mikrotiterplatten-Inkubator (+37 °C) oder Mikrotiterplatten-Inkubator/-Schüttler (+37 °C, 650-800 rpm) Equipment zum manuellen oder automatischen Waschen;
- Spektralphotometer für Mikrotiterplatten (450 nm);
- Vortexer;
- Destilliertes oder entionisiertes Wasser;
- Messzylinder, Becherglas;
- Labor-Handschuhe;
- separate Behälter zum Pipettieren mit 8-Kanal-Pipette;
- Desinfektionsmittel;
- Absorbierendes Material (zum manuellen Waschen).

13.3 Testablauf

Der **17-OH-Progesterone Testkit** ist für 96 Untersuchungen bestimmt. Vorbehaltlich einer gleichzeitigen Anwendung aller Streifen ist der Testkit für die quantitative Bestimmung von 40 Unbekannten, 6 Kalibratoren, 1 Kontrolle und des Blank (OD der TMB-Lösung) in Zweifachbestimmung ausreichend.

13.3.1 Assay-Durchführung

Anmerkung: Bitte überprüfen Sie auf dem mit dem Kit gelieferten Qualitätskontrollblatt, für welches Assay-Protokoll Ihr Kit validiert wurde. Wenn Ihr Kit für das Assay Protocol 1 validiert wurde, folgen Sie bitte dem unten beschriebenen Assay Protocol 1. Wenn Ihr Kit zusätzlich für das Assay Protocol 2 validiert wurde, beachten Sie bitte die Ergänzung 1 zu der mit dem Kit gelieferten Gebrauchsanweisung.

Assay-Protokoll 1

(siehe auch Assay-Schema für Assay-Protokoll 1,
Abschnitt 13.5)

Anmerkung: Dazugehörige Konzentrationen der Kalibratoren und Kontrollbereiche für das Assay-Protokoll 1 sind im Qualitätskontrollblatt enthalten.

- A. 50 µl Kalibratoren [CAL] (0-5), Kontrolle [CONTROL] und Patientenprobe in Zweifachbestimmung in entsprechende Kavitäten pipettieren. 2 Kavitäten A1-A2 bleiben frei (Blank)!**
- B. In alle Kavitäten außer Kavitäten A1-A2 («Blank») 50 µl Konjugat [CONJ] pipettieren.**

Anmerkung: Die Gesamtzeit der Pipettiertschritte darf 15 Minuten nicht überschreiten, da es somit zu einer erheblichen Variation der Inkubationszeit zwischen den Proben kommt und das Testergebnis somit unzuverlässig sein kann.

Anmerkung: Wenn eine Klebeschutzfolie verwendet wird, nutzen sie diese jetzt um die Mikrotiterplatten zu verschließen.

C. 30 Minuten bei **+37 °C** unter Schütteln (**650 bis 800 rpm**) inkubieren.

Anmerkung: Wenn eine Klebeschutzfolie verwendet wird, entfernen sie diese nun vorsichtig von der Mikrotiterplatte.

D. 4x, wie unten beschrieben, waschen.

E. 100 µl Substrat **SUB** in jede Kavität pipettieren (auch Blank); Streifen **entweder bei Raumtemperatur im Dunkeln** für **15–30 Minuten** (abhängig von der Farbintensität) oder für **10 Minuten bei +37 °C** unter Schütteln (**650-800 rpm**) inkubieren.

F. In alle Kavitäten (auch Blank) **100 µl Stopplösung** **STOP** (in selber Reihenfolge und Geschwindigkeit wie das Substrat) pipettieren und für **1-2 Minuten bei Raumtemperatur** schütteln.

G. Messen der **Optischen Dichte** bei **450 nm** innerhalb von **20 Minuten**.

13.3.2 Waschen

Es wird empfohlen, ein automatisches Mikroplatten-Waschgerät mit 4 Waschzyklen und einem jeweiligen Waschvolumen von 300 µl pro Kavität und Zyklus zu benutzen.

Die Waschprozedur kann ebenso manuell durchgeführt werden:

- Überstand aus den Kavitäten in einen Behälter mit Desinfektionsmittel verwerfen.
- 300 µl der vorbereiteten Waschlösung in jede Kavität geben, die Platte für 5 bis 10 Sekunden sorgfältig schütteln und den Überstand verwerfen. 4 Mal wiederholen.
- Ausklopfen der Kavitäten auf einer saugfähigen Unterlage bis alle Flüssigkeit entfernt ist.

13.4 Datenverarbeitung

Bei Benutzung eines Photometers, welcher keine Nullstellung erlaubt, wird der OD-Wert der Kavitäten A1-A2 (Blank) von allen anderen OD-Werten vor weiterer Kalkulation subtrahiert.

Beispiel:

OD (Kalibrator 0) gemessen = 2,28 und OD (Blank) = 0,06;

OD (Kalibrator 0) berechnet = $2,28 - 0,06 = \underline{\underline{2,22}}$

13.4.1 Datenverlässlichkeit (für OD gemessen bei 450 nm)

Die Daten sollten folgende Kriterien erfüllen:

- Mittelwert der OD des Blank (Kavitäten A1-A2) $\leq 0,100$;
- Mittelwert der OD des Kalibrator 0 $\geq 1,500$ (nach Blank Subtraktion);
- Konzentration der Kontrolle muss innerhalb des Bereiches liegen, welcher auf dem *Qualitätskontrollblatt* angegebenen ist.

Sollten die gemessenen Daten die Bedingungen nicht erfüllen, werden die Resultate als unzulässig betrachtet und der Test sollte wiederholt werden.

13.4.2 Quantitative Bestimmung

Eine spezialisierte Software zur quantitativen Bestimmung wird empfohlen. Die Mittelwerte der OD der Kalibratoren werden gegen deren jeweilige 17-OHP-Konzentration mittels **4PL Näherung** (Abb. 2 Typische Standardkurve) aufgetragen. Die Konzentration des 17-OHP in der Probe wird mit der Standardkurve ermittelt.

Eine Extrapolation der Standardkurve für 17-OHP-Konzentrationswerte, die die Konzentration in Kalibrator 5 überschreiten (etwa 60 nmol/l), ist nicht zulässig.

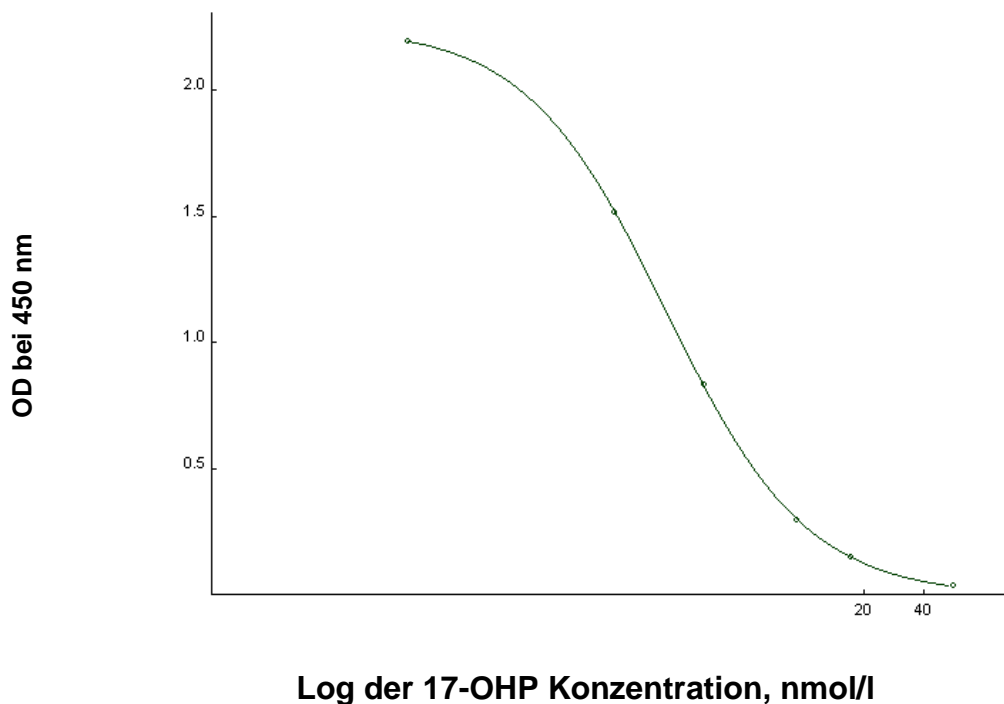


Abb. 2 Typische Standardkurve
Nicht zur Auswertung benutzen!

13.5 Assay-Schema zum Assay-Protokoll 1

Reagenzien	Kavität	«Blank»	CAL CONTROL L	Proben
CAL CONTROL		–	50 µl	–
Proben		–	–	50 µl
CONJ		–	50 µl	50 µl
Inkubation №1	30 Min, +37 °C, 650–800 rpm			
WASH P (verdünnt)	4 x 300 µl			
SUB	100 µl	100 µl	100 µl	100 µl
Inkubation №2	15-30 Min, +18...+25 °C, im Dunkeln			
	10 min, +37 °C, 650–800 rpm			
STOP	100 µl	100 µl	100 µl	100 µl
Rühren	1–2 Min, +18...+25 °C			
OD-Messung	450 nm			
Berechnung	Spezielle Software			

14. AUTOMATISIERTER TEST (REF 20-03 A)

14.1 Packungsinhalt

MP	Mikrotiterplatte: Zwölf Streifen mit acht Kavitäten (insgesamt 96 Kavitäten), beschichtet mit polyklonalen Anti-17-OHP-Antikörpern	1 Platte
CONJ	Konjugat: Lösung mit 17-OHP konjugiert mit Meerrettich Peroxidase (HRP)	9 ml, gebrauchsfertig
0-5 CAL	17-OHP Kalibratoren: Protein-Puffer oder Lyophilisate mit definierter 17-OHP-Konzentration: 0; 1; 2; 6; 10; 60 nmol/l (ungefähre Werte - bitte nicht für die Auswertung von realen Testdaten verwenden). Für Lot spezifische 17-OHP-Konzentrationen siehe Werte im Quality Control Sheet angegeben .	8 Fläschchen mit je 0,5 ml: CAL 1, 3 – 2 × 0,5 ml; CAL 0, 2, 4, 5 – 1 × 0,5 ml; gebrauchsfertig oder lyophilisiert
CONTROL	17-OHP Kontrolle: Protein-Puffer oder Lyophilisat mit definierter 17-OHP-Konzentration. Der 17-OHP-Konzentrationsbereich ist im Quality Control Sheet angegeben.	2 x 0,5 ml gebrauchsfertig oder lyophilisiert
WASH P 20X	Waschlösung P, 20x, konzentriert: Tensid in Salzlösung, ausreichend für die Vorbereitung von 1000 ml Lösung.	50 ml, konzentriert
SUB	Substrat (TMB-Lösung): 3,3',5,5'-Tetramethylbenzidin in Citrat-Puffer, mit Wasserstoffperoxid	14 ml, gebrauchsfertig
STOP	Stopplösung: 1 N HCl-Lösung	19 ml, gebrauchsfertig
TRIAL 5000X	Trial Lösung, 5000x konzentriert: Reinigungslösung	Ist separat zu beziehen

Anmerkung: *Extra Fläschchen der **CAL** 1 und 3 sowie **CONTROL** werden zur Rekalibrierung der Referenz-Standardkurve bereitgestellt. Genauere Informationen sind in der Gebrauchsanleitung des ELISA-Automaten "Alisei" zu finden.*

14.2 Erforderliche, aber nicht mitgelieferte Materialien und Equipment

- ELISA-Automat "Alisei";
- Polypropylen Röhren 12x75, Volumen: 5,5 ml;
- **TRIAL 5000X** Trial Lösung, 5000x konzentriert¹;
- Deionisiertes oder destilliertes Wasser;
- Laborhandschuhe.

14.3 Testverfahren

Der **17-OH-Progesterone Testkit** ist für 96 Untersuchungen bestimmt. Vorbehaltlich einer gleichzeitigen Anwendung aller Streifen reicht ein Testkit für eine Einzelbestimmung von 88 Serumproben, 6 Kalibratoren, 1 Kontrolle und für die Bestimmung des Blank (=OD der TMB-Lösung).

14.3.1 Reagenzienvorbereitung

Vor dem Gebrauch müssen alle Reagenzien auf Raumtemperatur (+18...+25 °C) gebracht und gründlich gemischt werden.

Anmerkung: *Vorbereitung der anderen Reagenzien siehe Abschnitt 8.*

TRIAL Trial-Lösung zum Reinigen der gerät-internen

¹ Reagenz ist nicht Teil des Kits und kann separat bezogen werden.

Hydraulikleitungen und Nadeln des ELISA-Automaten „Alisei“. Zubereitung der benötigten Menge der Trial-Lösung vor der Analyse durch 5000fache Verdünnung des Konzentrates mit destilliertem oder entionisiertem Wasser:

2 ml **TRIAL** **5000X** + 9998 ml Wasser

Sorgfältig mischen, Schaumbildung vermeiden.

14.3.2 Testablauf des automatisierten Tests

Bei Benutzung des ELISA-Automaten „Alisei“ ist die entsprechende Gebrauchsanweisung des Gerätes zu verwenden. Die Durchführung des Enzymassays mit „Alisei“ ist komplett automatisch: Pipettieren der Reagenzien, Waschschriffe, Inkubation, OD-Messung und Analyse der Testergebnisse. Das Programm zur Berechnung der 17-OHP-Konzentration ist im Gerät ebenfalls enthalten.

14.4. Datenverarbeitung

14.4.1. Datenverarbeitung (OD 450 nm)

Siehe Kriterien des Abschnittes **13.4.1**

14.5 Vorsichtsmaßnahmen

- Bei mehrfacher Nutzung des Testkits in einem ELISA-Automaten müssen die Reagenzien unmittelbar nach Beenden des Pipettiervorganges aus dem Automaten genommen werden, um den möglichen Verlust durch Verdunstung zu vermeiden. Die Reagenzien sind in den Kühlschrank zu stellen.
- Die Rekalibrierung anhand der Standardkurve eines Testkits mit anderer Lotnummer ist nicht zulässig.

2. INTENDED USE

The **17-OH-Progesterone** kit is provided for the **quantitative** determination of **17-OH-progesterone (17-OHP)** in human serum and plasma.

This test has 2 complete sets:

REF 20-03 for manual use;

REF 20-03 A must be used with ELISA automatic instrument “Alisei” manufactured by NEXT Level S.r.l. hereinafter referred to as analyser “Alisei”.

Instructions for use are described in:

section 13 for manual test,

section 14 for automated kit for “Alisei”.

Note 1: *Take into account that calibrators' nominals can be different for manual and automatic test kits.*

Note 2: *We guarantee applications of the test*

REF 20-03 A only on analyser “Alisei”,

REF 20-03 only for manual use.

While using a non-predefined method of use, it is under end user responsibility to make sure that it was appropriately tested for ELISA kits.

17-OHP is a steroid hormone with a molecular mass of 330.5 Da. It is secreted in the suprarenal gland cortex and sex glands.

A level of 17-OHP demonstrates circadian oscillations in parallel with cortisol secretion. Its maximum is detected in samples taken in the morning.

For non-pregnant females 17-OHP level in blood circulation depends on a menstrual period phase.

17-OHP is produced by mature ovarian follicle and by *corpus luteus*, as progesterone is. 17-OHP level increases essentially during pregnancy due to its buildup by adrenal cortex of foetus and by placenta.

Quantitative measurement of serum 17-OHP is a valuable tool for monitoring the activity of 21-hydroxylase of the suprarenal gland cortex. Usually lack of 21-hydroxylase is a result of congenital hyperplasia of suprarenal gland cortex and leads to over secretion of 17-OHP, the level of which rises in the peripheral blood. Here the deficiency of 11-hydroxylase leads only to moderate increase in concentration of 17-OHP. Thus, detection of this steroid hormone plays a very important role in differential diagnostics of congenital hyperplasia of suprarenal gland cortex.

3. PRINCIPLE OF THE TEST

The **17-OH-Progesterone** kit is a competitive solid phase enzyme immunoassay. During the incubation period 17-OHP of the tested samples and horseradish peroxidase (HRP) labeled 17-OHP binds to the antibodies coated onto the inner surface of the microplate wells until balance between them occurs. Separation of free and bound to antibodies 17-OHP and conjugate 17-OHP - peroxidase occurs while extracting the contents of the wells. The amount of bound conjugate is inversely proportional to the quantity of 17-OHP in the sample (Fig. 1).

During the incubation with TMB solution the colour is developing. The intensity of the colour is inversely proportional to the 17-OHP concentration in specimens.

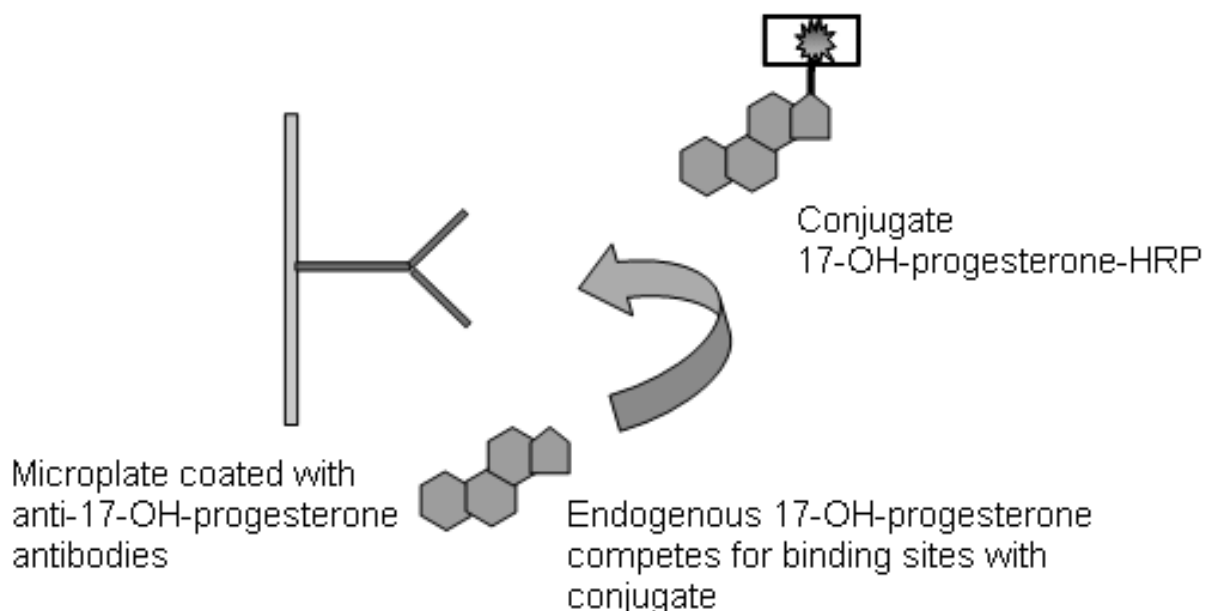


Fig. 1 Assay scheme

The 17-OHP concentration in the patient sample is read from a standard curve that is processed in each assay.

4. STORAGE AND STABILITY OF THE KIT

The expiration date of the kit is printed on the box label; the expiration date for each component is printed on the respective label.

17-OH-Progesterone kit should be stored at +2...+8 °C upon receipt, preferably in the original kit box, until the expiration date. Storage at +25 °C is allowed but for no more than 5 days.

Shelf life of the kit is 18 months.

After initial opening the kit is stable for 12 months if stored at +2...+8 °C.

If used in several separate experiments, after initial opening kit contents should be stored as follows but never used longer than the expiration date:

- unused strips: in a firmly closed resealable zipper bag at +2...+8 °C until the expiration date;
- vials with conjugate, calibrators and control (ready-to-use): at +2...+8 °C for 12 months; vials with calibrators and control (reconstituted): at +2...+8 °C for no more than 1 month after opening;
- vial with substrate: at +2...+8 °C until the expiration date, protected from light;
- vials with concentrated Trial, concentrated wash solution and stop solution: at +2...+8 °C until the expiration date;
- wash solution prepared for use: at room temperature (+18...+25 °C) for no more than 5 days or at +2...+8°C for no more than 4 weeks, in a firmly closed bottle;
- Trial solution prepared for use: at room temperature (+18...+25 °C) for no more than 5 days, in a firmly closed bottle.

Damaged Test Kits

In case of any severe damage of the test kit or components, Astra Biotech GmbH has to be informed in writing, during one week after receiving the kit. Usage of severely damaged single components for a test run is not recommended.

5. SAMPLE COLLECTION AND STORAGE

Collect blood by venipuncture in a tube without anticoagulants (for serum) or evacuated tube with EDTA or

heparin (for plasma). Possibility to use other anticoagulants for the **17-OH-Progesterone kit** is not established.

Allow blood to clot for serum samples. Centrifuge the specimens to separate serum or plasma from the blood corpuscles.

Do not use haemolyzed (bright red) or lipaemic (milky) blood samples as well as samples containing sodium azide as preservative.

Store the serum and plasma samples at +2...+8 °C for no more than 5 days. Aliquot and freeze the samples for longer storage (≤ -20 °C). Avoid repeated freezing.

6. EXPECTED VALUES

Serum samples collected between 9 and 11 a.m. from 120 apparently healthy people, both males and females, between the ages of 21–45, were assayed with **17-OH-Progesterone kit**. The results are listed below. These limits should be considered as guidelines only.

Group	No	17-OHP concentration range (nmol/L)
<i>Female</i>	120	
Follicular phase		<0.3-2.06
Luteal phase		1.42-6.91
<i>Male</i>		0.4-8.3

It is highly recommended each laboratory to determine its own reference range of 17-OHP concentrations.

7. QUALITY CONTROL

It is recommended to use control samples according to the state and federal regulations. The use of control samples is advised to assure the day to day validity of results.

8. REAGENT PREPARATION

Allow all the reagents to reach room temperature (+18...+25 °C), and then thoroughly stir.

MP Microplate

Keep the **microplate** at room temperature for at least 30 minutes before opening the bag. Place required number of strips onto strip holder. Place unused strips into the resealable zipper bag and reseal duly.

CAL **CONTROL** Calibrators and Control

Liquid **calibrators** and **control** are ready to use.

Prepare lyophilized calibrators and control as follows. Gently tap on the vial caps to knock off all the dry matter. Open the vials and carefully place the caps upside down on the clean dry surface. Add 0.5 mL of distilled or deionized water to each vial with lyophilized calibrators and control, close vials with the corresponding caps and leave for 10 min at room temperature without stirring. Then stir gently avoiding foaming, until the dry matter is completely dissolved. Leave for another 10 minutes at room temperature stirring gently periodically. Make sure that no dry matter is left on the caps and walls of the vials.

WASH P Wash solution

Prepare required volume of **wash solution** by dilution of the concentrate 20-fold with distilled or deionized water. For example:

5 mL of **WASH P 20X** + 95 mL of water

Mix thoroughly, avoid foaming.

SUB Substrate

Protect **substrate** from direct light.

9. SAMPLE PREPARATION

Allow samples to reach room temperature (+18...+25 °C). Stir samples gently in order to ensure homogeneity.

10. PERFORMANCE CHARACTERISTICS OF THE ASSAY**10.1. Calibration-Traceability:**

The **17-OH-Progesterone kit** was calibrated against the Working Standard, which had been manufactured by gravimetric method based on weighing purified synthetic 17-OHP into analyte-free matrix.

10.2. Specificity:

Cross-reaction of anti-17-OHP polyclonal antibodies with different steroids is shown below:

Steroid	Cross-reaction, %
C21-steroids	
17-OH-Progesterone	100
Pregnenolone	0.008
17-OH-Pregnenolone	0.626

17-OH-Pregnenolone sulfate	0.586
Progesterone	0.340
Deoxycorticosterone	0.018
11-Deoxycortisol	0.586
21-Deoxycortisol	1.690
Corticosterone	0.003
Aldosterone	< 0.001
Cortisol	0.003
C19-steroids	
Androstendione	0.002
Testosterone	0.004
5- α -Dihydrotestosterone	< 0.001
DHEA	< 0.001
DHEAS	< 0.001
C18-steroids	
17- β -Estradiol	< 0.001
17- α -Estradiol	< 0.001
Estrone	< 0.001
Estriol	< 0.001

10.3. Analytical Sensitivity:

Analytical sensitivity of **17-OH-Progesterone kit**, i.e. concentration, that can be distinguished from zero calibrator is 0.3 nmol/L (for manual and Alisei kit). It was defined as mean OD of 10 replicates of calibrator 0 minus 2 SD.

10.4. Measurement Range:

17-OH-Progesterone kit (manual and Alisei kit) was validated for measurement of 17-OHP concentration within the concentration diapason of 0.3 - 60 nmol/L.

10.5. Measurement Units:

In **17-OH-Progesterone kit** the concentrations of calibrators are specified in nmol/L. To convert into ng/mL, multiply the concentration in nmol/L by 0.33.

10.6. Intra- and Inter-Assay Variation (Precision):

For **Intra-Assay CV** determination, 6 serum samples were run, each in 2 replicates. The results are shown below.

Manual kit

Sample	Mean 17-OHP concentration, nmol/L	Intra-Assay CV	
		SD	CV, %
1	2.8	0.1	2.6
2	8.2	0.2	2.7
3	12.0	0.3	2.5
4	15.6	0.3	1.9
5	23.2	0.9	3.6
6	34	2.0	5.9

Alisei kit

Sample	Mean 17-OH-progesterone concentration, nmol/L	Intra-Assay CV	
		SD	CV, %
1	2.7	0.06	2.4
2	8.4	0.07	0,8
3	13.7	0.28	2.1
4	18.1	0.35	1.9
5	25.7	0.21	0.8
6	43.2	0.42	1.0

For **Inter-Assay CV** determination, 6 serum samples were assayed 3 times by different operators with 1-week interval. Each specimen was run in 2 replicates. The results are shown below.

Manual kit

Sample	Mean 17-OHP concentration, nmol/L			Inter-Assay CV	
	Assay 1	Assay 2	Assay 3	SD	CV, %
1	1.3	1.4	1.4	0.03	2.2
2	2.8	2.9	2.7	0.1	1.6
3	8.3	8.1	8.2	0.1	0.8
4	15.2	15.5	15.1	0.2	1.3
5	24.3	24.8	24.6	0.3	1.0
6	34.2	34.6	36.2	1.1	3.0

Alisei kit

Sample	Mean 17-OHP concentration, nmol/L			Inter-Assay CV	
	Assay 1	Assay 2	Assay 3	SD	CV, %
1	1.5	1.5	1.4	0.06	3.9
2	3.0	3.2	3.1	0.10	3.2
3	7.7	7.9	8.0	0.15	1.9
4	17.6	18.2	16.9	0.65	3.7
5	22.3	22.0	22.5	0.25	1.1
6	38.5	39.0	39.2	0.36	0.9

11. LIMITATION OF THE METHOD




Any clinical diagnosis should not be based on the results of in vitro diagnostic methods alone. For diagnosis establishment, a physician is supposed to consider all available clinical and laboratory findings.

12. SAFETY PRECAUTIONS

- **This kit is for in vitro diagnostic use only.** Operator should follow the manual closely in order to ensure reliable data. The manual is valid for the present kit only, within the

listed composition. Any substitution of kit components is not allowed by CE regulations.

- Do not use kit or its components after the expiration date indicated on the label. Take into account stability period for reconstituted reagents.
- Do not mix or use together reagents from different lots of the kit except substrate, stop solution and wash solution.
- Do not use substrate, stop solution and wash solution supplied by other vendors.
- Use only “P”-labeled Astra Biotech wash solution.
- Note that stop solution is 1 N HCl solution. Avoid contacts with skin and mucosa. In case of contact rinse affected area thoroughly with plenty of water and seek medical advice.
- Take into account the following common procedural notes:
 - always pipette reagents into wells immediately after washing procedure;
 - avoid contamination of the solutions;
 - in case of partial use of the kit, dispense only required volume of the reagent into the tray;
 - do not pour unused reagents back into the original vials;
 - avoid exposure to direct sunlight during incubations;
 - always pipette reagents in the same order to minimize reaction time differences between wells; the total dispensing time for the calibrators, control and samples must not exceed 15 min;
 - the incubation temperature for all the immunological reactions must be kept at +37 °C;
 - do not touch the bottom of the wells;

- calibrators should be measured in each separate assay. It is also recommended to measure each time 17-OHP concentration in the control;
- remove the adhesive foil carefully to avoid contamination and don't use the adhesive foil repeatedly.
- TMB solution should be colourless. Light colouring of solution is admissible. Avoid direct exposure of substrate to sunlight.
-  After usage strips, calibrators, control, specimens and all consumables which contacted with specimens during handling, storage or assay (tubes, vials, gloves, pipette tips etc.) should be collected separately and sterilized by autoclaving. Instead of autoclaving pipette tips may be sterilized by disinfectant treatment. After sterilization all components and expendable materials may be utilized as non-dangerous garbage. Other components of the kit should be discarded into conventional garbage.
-  During manual washing procedure do not discard the contents of the wells directly to drainage. Use a container with disinfectant solution.
-  As the kit contains potentially hazardous material, the following precautions should be taken:
 - do not smoke, eat or drink while performing the assay;
 - always use protective gloves;
 - never pipette material by mouth;
 - in case of spilling, wipe up the spills promptly and wash affected area thoroughly using decontaminant.
- GLP including all general and individual regulations should be applied for the kit usage.



As the kit contains irritant (**CONJ**, **CAL**, **CONTROL**), the following precautions should be observed:

- P261 - Avoid breathing spray;
- P272 - Contaminated work clothing should not be allowed out of the workplace;
- P280 - Wear protective gloves/protective clothing/eye protection;
- P302+P352 - IF ON SKIN: Wash with plenty of soap and water;
- P333+P313 - If skin irritation or rash occurs: Get medical advice/attention;
- P363 - Wash contaminated clothing before reuse;
- P501 - Dispose of contents/container in accordance with national regulation.

Precautionary statements according to Regulation EC No 1272/2008.

13. MANUAL TEST (REF 20-03)

13.1. Material Provided

MP	Microplate: 12 breakable 8-well strips (total 96 wells) coated with anti-17-OHP polyclonal antibodies	1 pcs
CONJ	Conjugate: solution containing 17-OHP conjugated with HRP	9 mL, ready to use
0-5 CAL	17-OHP calibrators: protein-based solutions or lyophilized preparations containing known 17-OHP concentrations – 0; 1; 2; 6; 10; 60 nmol/L (approximate values - do not use for evaluation of real assay data). The concentrations of calibrators may be different for Assay Protocol 1 and 2. For lot specific 17-OHP concentrations see values for respective Assay Protocol provided in the Quality Control Sheet.	6 vials, 0.5 mL each; ready to use or lyophilized
CONTROL	17-OHP control: protein-based solution or lyophilized preparation containing known 17-OHP concentration. The range of 17-OHP concentration may be different for Assay Protocol 1 and 2. For lot specific ranges of 17-OHP concentrations see values for respective Assay Protocol provided in the Quality Control Sheet.	0.5 mL, ready to use or lyophilized
SUB	Substrate (TMB solution): 3,3',5,5'-tetramethylbenzidine solution in citrate buffer containing hydrogen peroxide	14 mL, ready to use
WASH P	Wash solution P, 20X concentrated: surfactant in buffered saline, sufficient for	2x14 mL, concentrated

20X	preparation of 560 mL of solution	
STOP	Stop solution: 1 N HCl solution	14 mL, ready to use
	Adhesive foil	2x1 foil (optional)

13.2. Equipment and Materials Required but not provided

- 1-channel calibrated variable precision pipettes, with disposable tips;
- 8-channel calibrated variable precision pipette, with disposable tips;
- microplate incubator (+37 °C) or microplate incubator/shaker (+37 °C, shaking speed 650–800 rpm);
- manual or automatic equipment for rinsing wells;
- calibrated microplate reader (450 nm);
- vortex tube mixer;
- deionized or distilled water;
- graduated beaker and cylinder of appropriate volume;
- latex or plastic gloves;
- trays for pipetting reagents with 8-channel pipette;
- disinfectant;
- absorbent material (for manual wash).

13.3. Test Procedure

The **17-OH-Progesterone kit** is designed for 96 tests. This is sufficient for the **quantitative assay** of 40 unknowns, 6 calibrators, 1 control and 1 blank (OD of TMB solution) in duplicates, provided that all the strips are used simultaneously.

13.3.1. Assay Procedure

Note: *Please check in the Quality Control Sheet supplied with the kit for which Assay Protocol your kit has been validated. If your kit has been validated for Assay Protocol 1, please follow the Assay Protocol 1 described below. If your kit has been additionally validated for Assay Protocol 2, please consider the Supplement 1 to the Instructions for use provided with the kit.*

Assay Protocol 1

(see also Assay scheme to Assay Protocol 1, section 13.5)

Note: *Consider concentrations of calibrators and control range for Assay Protocol 1 provided in the Quality Control Sheet.*

- A.** Pipette **50 µL calibrators** **CAL** (0-5), **control** **CONTROL** and **patient's samples in duplicates** into the respective wells; **Leave wells A1-A2 empty for blank!**
- B.** Pipette **50 µL conjugate** **CONJ** into each well, **except wells A1-A2.**

Note: *total time of dispensing must not exceed 15 minutes, otherwise the test result may be unreliable, because the time of incubation will substantially vary for different samples.*

Note: *If an adhesive foil is used, put it now onto the plate to seal the cavities.*

C. Incubate strips for **30 minutes while shaking (650–800 rpm) at +37 °C.**

Note: *If an adhesive foil is used, remove it now from the plate.*

D. Wash 4 times, as described in section 13.3.2.

E. Pipette **100 µL substrate** **SUB** into each well (including blank); incubate **at room temperature in the dark for 15–30 minutes**, depending on the colour intensity, or **10 minutes while shaking (650–800 rpm) at +37 °C.**

F. Pipette **100 µL stop solution** **STOP** into each well (including blank) in the same sequence and at the same speed as used for dispensing TMB substrate. Shake for 1–2 min at room temperature.

G. Read **OD at 450 nm within 20 min.**

13.3.2. Wash Procedure

It is advisable to use an automatic microplate washer set at 4 wash cycles and a volume of 300 µL of wash solution per well per cycle.

If an automatic washer is not available, the wash procedure can be carried out manually as follows:

- remove the contents of the wells into a container with disinfectant;
- dispense 300 µL of wash solution (section 8) into each well, shake the plate carefully for 5–10 sec and remove the contents of the wells; repeat 4 times;
- strike the wells sharply on absorbent material to remove any liquid residue.

13.4. Data Processing

If the reader cannot be adjusted to zero using the substrate blank in wells A1-A2, subtract mean OD value of wells A1-A2 from all OD values before further calculations.

Example:

OD (Cal 0) measured = 2.28 and OD (blank) = 0.06;

OD (Cal 0) calculated = $2.28 - 0.06 = \underline{2.22}$

13.4.1. Data Reliability (for OD measured at 450 nm)

The data should meet the following criteria:

- average blank OD (in wells A1-A2) ≤ 0.100 ;
- average OD of Cal 0 ≥ 1.500 (after blank subtraction);
- control's concentration must fall within the acceptability range that is shown on the Quality Control Sheet.

If the data obtained do not meet the criteria, the results are considered unreliable and the test should be repeated.

13.4.2. Quantitative Determination

Specialized software for quantitative determination is recommended. Mean OD of calibrators are plotted versus their respective 17-OHP concentrations using **4PL fit** (see typical standard curve in Fig. 2). Calculate concentration of 17-OHP in samples using standard curve.

Any extrapolation of the standard curve to 17-OHP concentration above the nominal value of the calibrator 5 (approximately 60 nmol/L) is forbidden.

47/52

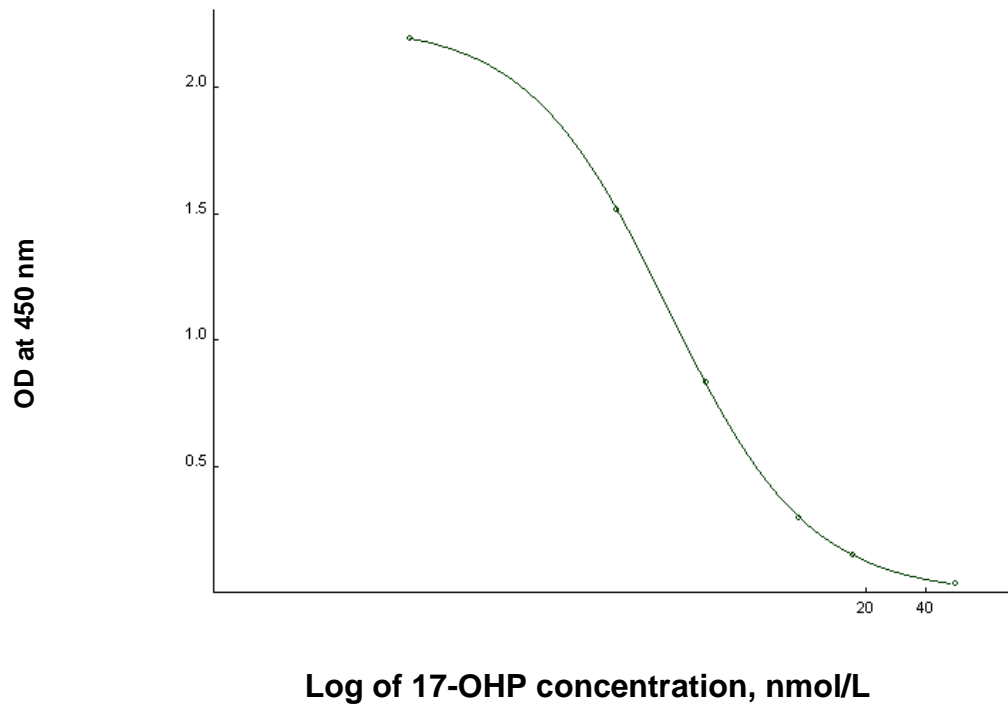


Fig. 2 Example of typical standard curve
Do not use for evaluation of real assay data!

13.5. Assay scheme to Assay Protocol 1

Reagents	Wells	«Blank»	CAL CONTROL	Samples
CAL CONTROL		–	50 µL	–
Samples		–	–	50 µL
CONJ		–	50 µL	50 µL
Incubation No.1	30 min, +37 °C, 650–800 rpm			
WASH P (diluted)	4 x 300 µL			
SUB		100 µL	100 µL	100 µL
Incubation No.2	15-30 min, +18...+25 °C, in the dark			
	10 min, +37 °C, 650–800 rpm			
STOP		100 µL	100 µL	100 µL
Stirring	1–2 min, +18...+25 °C			
OD measuring	450 nm			
Calculations	Corresponding software			

14. AUTOMATIC TEST (REF 20-03A)

14.1. Material Provided

MP	Microplate: 12 breakable 8-well strips (total 96 wells) coated with anti-17-OHP polyclonal antibodies	1 pcs
CONJ	Conjugate: solution containing 17-OHP conjugated with HRP	9 mL, ready to use
0-5 CAL	17-OHP calibrators: protein-based solution or lyophilized preparations containing known 17-OHP concentrations - 0; 1; 2; 6; 10; 60 nmol/L (approximate values - do not use for evaluation of real assay data). For lot specific 17-OHP concentrations see values provided in the Quality Control Sheet	8 vials, 0.5 mL each: CAL 1, 3 – 2 × 0.5 mL; CAL 0, 2, 4, 5 – 1 × 0.5 mL; ready to use or lyophilized
CONTROL	17-OHP control: protein-based solution or lyophilized preparation containing known 17-OHP concentration. For lot specific ranges of 17-OHP concentration see Quality Control Sheet	2 × 0.5 mL; ready to use or lyophilized
WASH P 20X	Wash solution P, 20X concentrated: surfactant in buffered saline, sufficient for preparation of 1000 mL of solution	50 mL, concentrated
SUB	Substrate (TMB solution): 3,3',5,5'-tetramethyl benzidine solution in citrate buffer containing hydrogen peroxide	14 mL, ready to use
STOP	Stop solution: 1 N HCl solution	19 mL, ready to use
TRIAL 5000X	Trial solution, 5000X concentrated: solution of detergent	It is delivered by separate order.

Note: *Extra vials of **CAL** 1, 3 and **CONTROL** are provided for recalibration on reference calibration curve. For detailed information see instructions for use for analyser “Alisei”.*

14.2. Equipment and Materials required but not provided

- Automatic analyser for ELISA kits on microplate (“Alisei”);
- multipurpose polypropylene tubes 12x75 volume 5.5 mL;
- **TRIAL** **5000X** Trial solution, 5000X concentrated²;
- deionized or distilled water;
- latex or plastic gloves.

14.3. Test Procedure

The **17-OH-Progesterone kit** is designed for 96 tests. This is sufficient for 88 unknowns, 6 calibrators, 1 control and 1 blank (OD of TMB solution) in monoplicates, provided that all the strips are used simultaneously.

14.3.1. Reagent Preparation

Allow all the reagents to reach room temperature, and then thoroughly stir.

Note: *Preparation of other reagents see in section 8.*

TRIAL Working solution of Trial for washing internal hydraulic lines and needles of automatic analyser

Prepare required volume of Trial solution by dilution of the concentrate 5000-fold with distilled or deionized water before analysis:

2 mL **TRIAL** **5000X** + 9998 mL water

Mix thoroughly, avoid foaming.

² Reagent is not included in the kit, it is delivered by separate order.

14.3.2. Assay Procedure for Automatic Test

While using for the procedure automatic instrument for microplates “Alisei”, refer to its relative manual.

The analysis on EIA analyser “Alisei” is completely automatic: pipetting of reagents, washing, incubation, OD measurement, analysis of results. The program of calculation 17-OHP concentration is hardwired in analyser memory.

14.4. Data Processing

14.4.1. Data Reliability (OD measurement at 450 nm)

See criteria in section 13.4.1.

14.5. Safety precautions

- If kit for automatic analyser “Alisei” is used in several separate experiments it is necessary to take reagents from automatic analyser “Alisei” immediately after pipetting them in the wells of all plates because liquid evaporates from vials. Put the reagents in refrigerator;
- Recalibration using calibration curve, obtained with a kit of any other lot, is not permitted.

August, 22, 2019



Astra Biotech GmbH
Rudower Chaussee 29,
12489 Berlin, Germany
Telefon: +49 (0)30 74696509
E-Mail: info@astrabiotech.de
www.astrabiotech.de