

17-OH Progesterone

CE

1. INTRODUCTION

17-hydroxyprogesterone (17-OH progesterone ou 17 α -OHP ou 17-OHP) est une hormone stéroïde C-21 produite par les glandes surrénales et les gonades, lors de la synthèse des glucocorticoïdes et des hormones stéroïdes. Il est dérivé de la progesterone via 17-hydroxylase, une enzyme P450c17, ou 17-hydroxy-3 β par hydroxystéroïdes dehydrogenasi/ Δ 5-4 isomérase.

Le 17-OH progesterone n'a pas défini le rôle physiologique sauf une molécule précurseur.

Les niveaux de sérum de 17-OH progesterone sont dépendants de l'âge, avec des pics observés pendant la vie fœtale et la période postnatale. Au cours de la première semaine de vie, les taux sériques de 17-OH progesterone a diminué d'environ 50 fois par rapport aux valeurs de sang de cordon. Une légère augmentation transitoire se produit après la naissance chez les hommes de 30-60 jours. Les niveaux pour les deux sexes reste faible et constante durant l'enfance et à augmenter progressivement au cours de la puberté, où ils atteignent des niveaux d'environ 100 ng/dl (~ 3,3 nmol/L).

Niveaux 17-OHP sont normalement une variation diurne ACTH - salarié, d'identifier de pointe du matin et les accidents de nuit. En outre, la production de l'ovaire de 17-OHP augmenté au cours de la phase lutéale du cycle menstruel.

Le 17-OHP est une progesterone naturelle au cours du troisième mois de grossesse, il ya augmentation de la production en raison de la surrénale fœtale.

Les taux normaux sont de 30 à 90 ng/dl chez les enfants, chez les femmes 15-70 ng/dl avant l'ovulation et 35-290 ng/dl au cours de la phase lutéale.

Les mesures de 17-OHP niveaux sont utiles pour évaluer de l'hyperplasie déficience congénitale des surrénales due à des enzymes typiques tels que 21-hydroxylase et 11 β -hydroxylase, conduisant à l'accumulation de 17-OHP.

En revanche, le patient rares à l'absence de 17 α -hydroxylase ont des niveaux très faibles ou indétectables de 17-OHP.

Des niveaux élevés de sérum de base 17-OHP et / ou après stimulation par l'ACTH sont présents dans le cas de l'hyperplasie des surrénales.

2. INDICATION D'UTILISATION

Méthode immunoenzymatique colorimétrique par compétition pour la détermination quantitative de la concentration de 17-OH Progesterone dans le sérum ou le plasma humain.

3. PRINCIPE DU DOSAGE

Le 17-OH Progesterone (antigène) présent dans l'échantillon rentre en compétition avec le 17-OH Progesterone antigénique marqué à la peroxydase de raifort (HRP, Conjugué) par rapport à l'anticorps anti-17-OH Progesterone adsorbé sur la microplaque (phase solide). Après de la incubation, la séparation libre-lié est obtenue par simple lavage de la phase solide. Après, l'enzyme HRP présent dans la fraction liée catalyse la réaction entre le substrat (H₂O₂) et le substrat TMB (TMB), en développant une coloration bleue qui vire au jaune après ajout de la solution d'arrêt (H₂SO₄).

L'intensité de la couleur développée est inversement proportionnelle à la concentration de 17-OH Progesterone dans l'échantillon. Un lecteur de microplaques ELISA permet la lecture de l'absorption à 450 nm.

4. MATERIELS

4.1. Réactifs fournis

- **Puits recouverts d'IgG Anti-17-OH Progesterone** : 12 bandes détachables enduites d'IgG Anti-17-OH Progesterone de 8 puits, en sachet d'aluminium refermable.
- **Solution stop** : 1 flacon contenant 15 ml d'acide sulfurique, 0.15 mol/l (éviter tout contact avec la peau).
- **Conjugué 17-OH Progesterone-HRP** : 1 flacon contenant 22 ml de 17-OH Progesterone marqué à la peroxydase de raifort.
- **Solution de TMB** : 1 flacon contenant 15 ml de 3, 3', 5, 5'-Tétraméthylbenzidine (H₂O₂-TMB 0.26g/l) (éviter tout contact avec la peau).
- **Solution de lavage (concentrée x 10)** : 1 flacon contenant 50 ml d'une solution de tampon phosphate concentrée 10 fois Tampon phosphaté 0,2 M, Proclin < 0,0015%
- **Contrôle de 17-OH Progesterone** : 1 flacon contenant 1 ml d'un lot spécifique d'une solution de contrôle prête à l'emploi. La concentration est indiquée sur l'étiquette.
- **Etalons 17-OH Progesterone** : 6 flacons, 1 ml chacun

Etalon 0:	0.0 ng/ml
Etalon 1:	0.2 ng/ml
Etalon 2:	0.6 ng/ml
Etalon 3:	2.0 ng/ml
Etalon 4:	6.0 ng/ml
Etalon 5:	20.0 ng/ml

4.2. Matériels fournis

- 1 support de plaque
- 1 jeu de feuilles de recouvrement
- 1 mode d'emploi
- 1 schéma de distribution et d'identification

4.3. Matériels et équipements requis

- Lecteur de microplaques ELISA, pour mesure l'absorbance à 450 nm, 620-630 nm
- Incubateur 37°C
- Equipement manuel ou automatique pour le rinçage des puits
- Pipettes
- Vortex
- Eau distillée
- Tubes jetables
- Chronomètre

5. STABILITE ET CONSERVATION

Les réactifs sont stables jusqu'à la date de péremption indiquée sur l'étiquette s'ils sont conservés entre 2°C et 8 °C à l'obscurité.

6. PREPARATION DES REACTIFS

Il est très important que tous les réactifs, échantillons et contrôles soient portés à température ambiante (22°C – 28 °C) pour au moins 30 minutes avant de commencer le dosage ! À la fin de l'essai conservent les réactifs immédiatement à 2-8 °C ; évitez la longue exposition à température ambiante.

6.1. Bandes détachables enduites

Les bandes détachables sont enduites d'anticorps d'IgG anti 17-OH Progesterone et sont prêtes à l'emploi. Conserver entre 2°C et 8°C. N'ouvrir l'emballage que si la pièce est à température ambiante. *Après avoir prélevé les bandes nécessaires, refermer immédiatement les autres dans le sachet d'aluminium avec le déshydratant fourni et les conserver entre 2°C et 8°C ; elles sont stables jusqu'à la date de péremption.*

6.2. Conjugué à 17-OH Progesterone-HRP

Solution de conjugué à 17-OH Progesterone-HRP prête à l'emploi.

6.3. Etalons de 17-OH Progesterone

Les étalons sont prêts à l'emploi et ont les concentrations de 17-OH Progesterone suivantes :

Etalon 0:	0.0 ng/ml
Etalon 1:	0.2 ng/ml
Etalon 2:	0.6 ng/ml
Etalon 3:	2.0 ng/ml
Etalon 4:	6.0 ng/ml
Etalon 5:	20.0 ng/ml

Après la première utilisation les contrôles restent stables pendant encore 6 mois s'ils sont conservés à 2 – 8 °C.

6.4. Solution TMB

Le flacon contient 15 ml d'un mélange de peroxyde d'hydrogène et de tétraméthylbenzidine. Le réactif est prêt à l'emploi et doit être conservé 2°C et 8°C à l'obscurité. *La solution doit être incolore ou avoir une légère teinte bleue. Si le substrat devient bleu, il a pu être contaminé et doit être remplacé.*

6.5. Solution stop

Le flacon contient 15 ml d'une solution d'acide sulfurique 0.15 M (R 36/38, S 26). Cette solution est prête à l'emploi et doit être conservée entre 2°C et 8 °C.

6.6. Solution de lavage

Diluer le contenu de la solution de lavage concentrée avec de l'eau distillée jusqu'à un volume final de 500 ml avant utilisation. Pour les petits volumes respecter la dilution au 10^{ème}. La solution de lavage diluée est stable pendant 30 jours entre 2°C et 8 °C. Il est possible d'observer la présence de cristaux dans la solution de lavage concentrée, dans ce cas, mélanger à température ambiante jusqu'à la dissolution complète des cristaux, pour une meilleure efficacité diluer tout le flacon de solution de lavage jusqu'à 500 ml en surveillant le transfert de cristaux avec le lavage de la bouteille, puis mélanger jusqu'à la dissolution complète des cristaux.

6.7. Contrôle

Le flacon contient 1 ml d'une solution de contrôle prête à l'emploi.

7. PRELEVEMENT ET PREPARATION DES ECHANTILLONS

Les échantillons de plasma ou de sérum humain pour ces dosages doivent être prélevés sur des patients à jeun. Conserver les échantillons à -20°C si la détermination n'est pas effectuée le jour du prélèvement. Si les échantillons sont conservés congelés, bien mélanger les échantillons décongelés avant le dosage. *Eviter les cycles répétés de congélation et de décongélation.*

8. PROCEDE DU DOSAGE

8.1. Préparation du dosage

Lire attentivement la notice d'emploi **avant de** réaliser le dosage. La fiabilité des résultats dépend du suivi strict du protocole. Avant de commencer le dosage, déterminer, sur le formulaire fourni dans le kit, le plan de distribution et d'identification des échantillons et des contrôles. Sélectionner le nombre de bandes ou de puits nécessaires et les placer sur le support. Le pipetage des échantillons ne doit pas prendre plus de 10 minutes afin d'éviter toutes dérives du dosage. Si cela dure plus de 10 minutes, suivre le même ordre d'utilisation. Si plusieurs plaques sont utilisées, il est recommandé de répéter la courbe dose/réponse. Réserver au moins :

1 puits	(ex. A1)	Pour le blanc
2 puits	(ex. B1+C1)	Pour l'étalon 0
2 puits	(ex. D1+E1)	Pour l'étalon 1
2 puits	(ex. F1+G1)	Pour l'étalon 2
2 puits	(ex. H1+A2)	Pour l'étalon 3
2 puits	(ex. B2+C2)	Pour l'étalon 4
2 puits	(ex. D2+E2)	Pour l'étalon 5
2 puits	(ex. F2+G2)	Pour le contrôle

Il est recommandé de déterminer les contrôles et les échantillons du patient en doublets.

Réaliser toutes les étapes du dosage dans l'ordre donné et sans interruption entre les étapes.

Un cône de pipette propre et jetable doit être utilisé pour distribuer chaque contrôle et échantillon.

1. Pipeter 25 µl d'étalons, de contrôles et d'échantillons dans leurs puits respectifs. Garder le puits A1 pour le blanc.
2. Ajouter 200 µl de conjugué dans chaque puits. Garder le puits A1 pour le blanc.
3. Couvrir les puits avec le couvercle fourni dans le kit.
4. **Incuber pendant 1 heure à 37 °C.**
5. À la fin de l'incubation, enlever le couvercle, aspirer le contenu des puits et laver chaque puits trois fois avec 300 µl de solution de lavage diluée. Eviter les débordements de puits de réaction. Pendant chaque pas de lessive, secouez doucement la plaque depuis 5 secondes et enlevez la solution d'excès en tapant la plaque inversée sur un essuie-mains en papier absorbant. (Si vous utilisez l'équipement automatisé, lavez les puits au moins 5 fois.
Note : *L'étape de lavage est très importante ! Un lavage insuffisant peut conduire à une précision faible et des valeurs d'absorbance faussement élevées.*
6. Pipeter 100 µl de solution de TMB dans tous les puits.
7. **Incuber pendant exactement 15 min à température ambiante (22 – 28°C) à l'obscurité.**
8. Pipeter 100 µl de solution stop dans tous les puits dans le même ordre à la même vitesse que pour la solution de TMB. Secouer doucement la microplaque.
La couleur bleue développée pendant l'incubation vire au jaune.
9. Mesurer l'absorbance (E) des échantillons à 450 nm contre une longueur d'onde de référence de 620-630 nm ou contre le blanc au cours de 5 minutes après l'adjonction de la solution stop.

8.2. Mesure

Faire le **zéro** du lecteur ELISA à l'aide du blanc dans le puits A1.

Si - pour des raisons techniques - le lecteur d'ELISA ne peut pas être ajusté à zéro en utilisant le blanc dans le puits A1, soustraire la valeur d'absorbance du puits A1 de toutes les autres valeurs d'absorbance mesurées afin d'obtenir des résultats fiables !

Mesurer l'absorbance de tous les puits à **450 nm** et enregistrer les valeurs d'absorbance pour chaque contrôle et échantillon de patient dans le plan de distribution et d'identification.

Calculer **les valeurs moyennes d'absorbance pour tous les doublets, si nécessaires.**

9. RESULTATS

9.1. Calcul des résultats

Calculer l'absorbance moyenne pour chaque point de la courbe étalon et de chaque échantillon. Tracer la valeur d'absorbance moyenne des étalons en fonction de la concentration. Dessiner le meilleur ajustement de la courbe sur les points tracés (4 paramètres logistiques).

Interpoler les valeurs des échantillons sur la courbe étalon pour obtenir les valeurs de concentrations correspondantes en mIU/ml.

9.2. Valeurs de Référence

Les valeurs de sérum ou de plasma 17-OH Progesterone sont comprises dans les intervalles suivants :

		ng/ml
FEMMES	phase folliculaire	0,2 - 1,3
	phase lutéinique	1,0 - 4,5
	ménopause	0,2 - 0,9
HOMMES		0,2 - 2,3
ENFANTS		0,2 - 0,9

10. CONTROLE QUALITE

Chaque laboratoire doit faire des contrôles de dosage à des niveaux de gammes normales, élevées et faibles de 17-OH Progesterone pour surveiller la performance des dosages. Ces contrôles doivent être considérés comme inconnus et les valeurs doivent être déterminées dans chaque test effectué. Les chartes de contrôles qualité doivent être maintenues pour suivre les performances des réactifs fournis. Des méthodes de statistiques pertinentes doivent être employées pour établir des tendances. Le laboratoire individuel doit établir des limites de performance de dosage acceptables. De plus, l'absorbance maximale doit être dans la même ligne que les expériences passées. Les déviations significatives provenant des performances établies peuvent indiquer un changement non remarquable dans les conditions expérimentales ou dans la dégradation des réactifs du kit. Les réactifs frais doivent être utilisés pour déterminer la raison des variations.

11. PERFORMANCE DU DOSAGE

11.1. Précision

Variation Intra Dosage

La variation intra dosage a été déterminée par un réplicat (x 20) sur trois sérums différents dans un dosage. La variation intra dosage est $\leq 8,2\%$.

Variation Inter Dosage

La variation inter dosage a été déterminée par un réplicat (x 10) sur trois sérums de contrôle différents en différents lots. La variation inter dosage est $\leq 13,8\%$.

11.2. Spécificité analytique

La réaction croisée des anticorps calculée à 50% selon Abraham :

1-OH Progestérone	100 %
11-Deossicortisol	0,846 %
Progestérone	0,590 %
Prégnénolone	0,250 %
Testostérone	0,017 %
17 beta- Estradiol	< 0,001 %
Aldostérone	< 0,001 %
Estriol	< 0,001 %
Estrone 3-sulfate	< 0,001 %
Spironolactone	< 0,001 %
Androstènedione	< 0,01 %
Androsterone	< 0,01 %
Corticostérone	< 0,01 %
Cortisol	< 0,01 %
Cortisone	< 0,01 %
DHEA	< 0,01 %
DHEA-S	< 0,01 %
DHT	< 0,01 %
Prednisolone	< 0,01 %

Prednisone	< 0,01 %
Cholestérol	< 0,01 %

11.3. Sensibilité Analytique

La plus petite concentration détectable de 17-OH Progesterone par l'étalon 0 est 0.05 ng/ml avec un niveau de confiance 95%.

11.4. Exactitude

L'ajout de 6,6 - 3,3 - 1,65 - 0,83 - 0,41 ng/ml de 17-OH Progesterone aux échantillons a donné une valeur moyenne (\pm écart-type) de 98,66 % \pm 5,99% en référence aux concentrations originales. Trois différents échantillons ont été dilués 2 - 4 - 8 fois avec l'étalon 0; la valeur moyenne (\pm écart-type est 95,31% \pm 4,88%.

11.5. Comparaison de méthode

La méthode ELISA de 17 OH-Progesterone a été comparée à un autre dosage disponible dans le commerce. 65 échantillons de serum ont été analysés selon les deux systèmes d'essais.

La régression linéaire a été calculée :

$$Y = 1,11 \cdot X - 0,04$$

$$r^2 = 0,935$$

Le nouveau kit 17-OH Progesterone de NovaTec a été comparé avec le kit 17-OH-Progesterone de NovaTec précédent. 65 échantillons de serum ont été analysés.

La régression linéaire a été calculée:

$$Y = 1,31 \cdot X - 0,49$$

$$r^2 = 0,90$$

12. LIMITES DE LA TECHNIQUE

Une contamination bactérienne ou des cycles de congélation-décongélation répétés peuvent affecter les valeurs d'absorbances.

13. PRECAUTIONS ET AVERTISSEMENTS

- En accord avec l'article 1 paragraphe 2b de la directive européenne 98/79/EC, l'utilisation des dispositifs médicaux de diagnostic in vitro est destinée par le fabricant à garantir la pertinence, les performances et la sécurité du produit. Par conséquent, la procédure de dosage, l'information, les précautions et mises en garde du mode d'emploi doivent être suivies de façon stricte. L'utilisation de ces kits avec des automates ou dispositifs similaires doit être validée. Aucun changement de la conception, composition et procédure de dosage, ainsi que l'utilisation avec d'autres produits non approuvés par le fabricant, ne sont autorisés ; seul l'utilisateur est responsable de tels changements. Le fabricant n'est pas responsable des faux résultats et des incidents dus à ces modifications. Le fabricant n'est pas responsable des résultats fournis par analyse visuelle des échantillons des patients.
- Uniquement pour diagnostic in vitro.
- Suivre les Bonnes Pratiques de Laboratoires (BPL) pour la manipulation de produits sanguins.
- Tous les composants d'origine humaine utilisés pour la fabrication de ces réactifs ont été analysés et ont été testés non réactifs aux antigènes HBs, en anticorps anti-VIH et en anticorps anti-VHC. Néanmoins, tous les produits doivent être considérés et traités comme étant potentiellement infectieux.
- Ne pas échanger les réactifs ou les bandes provenant de différents lots de production.
- Ne pas utiliser de réactifs provenant d'autres fabricants avec les réactifs de ce kit.
- Ne pas utiliser les réactifs après la date de péremption indiquée sur l'étiquette.
- Utiliser seulement des cônes de pipette, des distributeurs et du matériel de laboratoire propres.
- Ne pas échanger les bouchons des flacons, pour éviter la contamination croisée
- Fermer les flacons de réactifs immédiatement après l'utilisation pour éviter l'évaporation et la contamination microbienne.
- Avant une nouvelle utilisation, vérifier les flacons de conjugué et de contrôle, déjà utilisés, pour exclure une contamination microbienne.
- Pour éviter la contamination croisée et des résultats faussement élevés, introduire les échantillons de patients et le conjugué exactement au fond des puits en évitant les éclaboussures.
- Quand l'utilisation a automatisé l'équipement, l'utilisateur a la responsabilité de s'assurer que le kit a été convenablement évalué. Pour améliorer la performance du kit sur les systèmes automatiques ELISA, on recommande d'augmenter le nombre de se lave.
- Les réactifs contiennent de la Procline 300® en tant que conservateur
- Le TMB est irritant, ce qui peut être nocif s'il est inhalé, ingéré ou absorbé à travers la peau. Eviter toute inhalation, ingestion ou contact avec la peau et les yeux pour prévenir de ces risques.
- La solution stop est une solution d'acide sulfurique diluée. L'aide sulfurique est un poison corrosif et peut être toxique s'il est ingéré. Eviter tout contact avec la peau ou les yeux pour prévenir des brûlures chimiques.

- L'addition de la solution de substrat initie la réaction cinétique qui se termine par l'ajout de solution stop. Par conséquent, l'addition de solution de substrat et de solution stop doit être fait durant la manipulation pour éliminer tous risques de dépassement de la durée de réaction.
- Cette méthode permet la détermination de 17-OH Progesterone entre 0.2 – 20 ng/ml.
- Suivre la notice pour les contrôles qualité dans les laboratoires médicaux en dosant les contrôles et/ou les sérums.
- Les échantillons microbiologiquement contaminés ne doivent pas être utilisés pour le dosage. Les échantillons hautement lipémiques ou hémolysés ne doivent pas être utilisés non plus.
- Les lecteurs de microplaques mesurent verticalement. Ne pas toucher le fond des puits.
- La méthode ELISA de NovaTec est destinée à un personnel qualifié qui est familiarisé avec les Bonnes Pratiques de Laboratoire.

AVERTISSEMENT :	Aux concentrations utilisées, la Proclin 300® n'a que très peu de risque toxicologique s'il y a contact avec la peau ou les muqueuses !
-----------------	---

13.1. Elimination des déchets

Les résidus des produits chimiques et des préparations sont considérés en général comme des déchets dangereux. L'élimination de ce type de déchet est réglementée par des lois et réglementations nationales et régionales. Contacter les autorités compétentes ou les sociétés de gestion des déchets pour obtenir des renseignements sur l'élimination des déchets dangereux.

14. INFORMATION POUR LES COMMANDES

Prod. No.:	DNOV004	17-OH Progesterone (96 Dosages)
------------	---------	---------------------------------