www.dialab.at

ELISA

Mikrotitrační metoda

Progesteron

REF: K00225

Pro in vitro diagnostické použití

Produktový leták

ELISA pro **kvantitativní** stanovení progesteronu v lidském séru nebo plazmě

CE IVD

Mikrotitrační metoda – 96 jamková

(12 x 8 jamkových antigenem potažených proužků)

Jednotlivě zlomitelné

OBECNÉ INFORMACE

- **Metoda**
  Kompetitivní imunoenzymatická kolorimetrická metoda
- **Vlnová délka**

  Měřící filtr: 450 nm

- **Doba inkubace**

  75 minut (60 min při 37°C/15 min při pokojové teplotě)

- **Enzymový konjugát**

  HRP (křenová peroxidáza)

- **Substrát**

  TMB (3,3’,5,5’- Tetrametyl-benzidin)

- **Vzorek**

  Sérum nebo plazma

- **Kalibrační rozsah**

  0 – 40 ng/mL

- **Citlivost**

  0.05 ng/mL

1. REAGENCIE, MATERIÁL A PŘÍSTROJOVÉ VYBAVENÍ

1.1 Reagencie a materiál dodávaný v kitu

Kalibrátor (C_A-C_B-C_C-C_D-C_E): 5x1.0 mL/vialka
Kalibrátory progesteronu mají následující koncentrace:

	C_A	C_B	C_C	C_D	C_E
ng/mL	0	0.2	1.0	8.0	40.0

Jsou stabilní do data exspirace kitu. Po otevření vialky jsou kalibrátory stabilní po dobu 6 měsíců při 2-8 °C.

Kontrola progesteronu: 1x 1 L, koncentrace kontroly je závislá na šarži a je uvedena na záznamu kontroly kvality.

Konjugát: 1x 22 mL/vialku konjugátu progesteron -HRP

Potažená mikrotitrační destička: Nabsorbovaná IgG protilátka proti progesteronu

Roztok substrátu: 1x 15 m L/vialku H_2O_2-TMB 0.26g/L (zabraňte jakémukoli styku s pokožkou)

Zastavovací roztok: 1x 15 mL/vialku kyseliny sírové 0.15 mol/L (zabraňte jakémukoli styku s pokožkou)

Promývací pufr: 1x 50 mL, fosfátový pufr 0.2 M, 10x konc.

1.2 Potřebné reagencie, které nejsou dodávány s kitem

- Destilovaná voda

1.3 Potřebný materiál a přístrojové vybavení

- Automatický dávkovač
- Reader mikrotitračních destiček

1.4 Poznámky

Všechny reagencie skladujte při 2 – 8 °C ve tmě. Sáček s mikrotitrační destičkou otevírejte, pouze když je ohřátá na pokojovou teplotu a okamžitě po použití uzavřete. Po otevření je kit stabilní do data exspirace.

2. KLINICKÝ VÝZNAM

Progesteron je C-21 steroidní hormon zapojen v ženském menstruačním cyklu, těhotenství (podporuje těhotenství) a embryogenezi u lidí a jiných druhů. Progesteron je hlavním přirizeně se vyskytujícím progestogenem.
Progesteron je důležitý pro syntézy aldosteronu (mineralokortikoid), jako i 17-hydroxyprogesteron pro kortizol (glukokortikoid).
Hladiny progesteronu jsou relativně nízké u dětí a u žen po menstruaci. Dospělí muži mají hladiny podobné tím u žen během folikulární fáze menstruačního cyklu.
U žen jsou hladiny progesteronu relativně nízké během předovulační fáze menstruačního cyklu, stoupají po ovulaci, a jsou zvýšeny během luteální fáze. Pokud dojde k těhotenství, jsou hladiny progesteronu ze začátku udržovány na luteální úrovni. Po vzniku placenty a během tvorby mléka jsou hladiny progesteronu velice nízké. Pokles hladin progesteronu po porodu je jedním ze spouštěčů tvorby mléka. Progesteron je tvořen v nadledvinách, v pohlavních žlázách (specificky po ovulaci v žlutém tělísku), mozku a během těhotenství v placentě.

Progesteron proměňuje endometrium do jejího sekrečního stavu pro připravení dělohy k nidaci. Pokud nedojde k těhotenství, hladiny progesteronu poklesnou, co vede u lidí k menstruaci.
Progesteron patři do skupiny neurosteroidů, které se nalézají ve vysokých koncentracích v jistých oblastech mozku a jsou tam tvořeny. Neurosteroidy ovlivňují fungování synapsí, jsou neuroprotektivní a ovlivňují myelinizaci.
Progesteron má mnoho účinků mimo reprodukčního systému. Progesteron je termogenní, snižuje křeče a uvolňuje hladké svalstvo. Dále rozšiřuje průdušky a reguluje sliznici. Progesteron působí jako protizánětlivý činitel a reguluje imunitní odpověď. Progesteron také pomáhá při thyroidních funkcích a při tvorbě kostí osteoblasty. Měření sérové koncentrace progesteronu se používá při vyhodnocování funkce vaječníků.

3. PRINCIP

Progesteron (antigen) ve vzorku soutěží s antigenním progesteronem značeným křenovou peroxidázou (HRP) o omezené množství vazebných míst protilátek proti progesteronu potažených na destičkách (pevná fáze).
Po inkubaci se vykonává separace navázaných a volných molekul jednoduchým promytím pevné fáze.
Potom enzym HRP v navázané frakci reaguje se substrátem (H_2O_2) a roztokem substrátu a vytváří modrou barvu, která se mění na žlutou po přidání zastavovacího roztoku (H_2SO_4).
Intenzita barvy je nepřímo úměrná koncentraci progesteronu ve vzorku.
Koncentrace progesteronu ve vzorku je vypočtena pomocí kalibrační křivky.

4. VAROVÁNÍ

- Tento kit je určen pro profesionální in vitro použití. Ne pro vnitřní nebo vnější užití u lidí nebo zvířat.
- Při práci s dodanými reagenciemi používejte vhodné osobní ochranné vybavení.
- Během manipulace s krevními produkty dodržujte správnou laboratorní praxi (GLP).
- Některé reagencie obsahují malé množství Proclin300^R jako konzervantu. Zabraňte styku s pokožkou a sliznicemi.
- Substrát TMB obsahuje dráždivou látku, která může být nebezpečná po vdechnutí, požití nebo po absorpci pokožkou. Pro předcházení poranění zabraňte vdechnutí, požití nebo styku s pokožkou a očima.
- Zastavovací roztok pozůstává z roztoku zředěné kyseliny sírové. Kyselina sírová je jedovatá a korozivní a může být toxická po požití. Pro předcházení chemickým poleptáním zabraňte styku s pokožkou a očima.
- Vyhněte se vystavení substrátu TMB/H_2O_2 přímému světlu, kovům a oxidantům. Roztok nezamrazujte.
- Tato metoda umožňuje stanovení progesteronu od 0.2 ng/mL do 40.0 ng/mL.
- Pro vyšší hodnoty, například v těhotenství, vzorek zřeďte; faktor ředění použijte při výpočtu konečných výsledků.
- Klinický význam stanovení progesteronu může být zneplatněn, pokud byl pacient léčen kortizonem nebo přírodními nebo syntetickými steroidy.

5. BEZPEČNOSTNÍ OPATŘENÍ

- Dodržujte prosím přesně postupnost pipetovacích kroků uvedených v tomto protokolu.

Zde uvedené údaje činnosti byly získány s použitím specifických reagencií uvedených v těchto pokynech k použití.

- Všechny reagencie musí být skladovány v chladu při teplotě 2 - 8 °C v jejich původních nádobách. Jakékoli výjimky jsou jasně uvedeny. Reagencie jsou stabilní do data exspirace, pokud jsou skladovány a je s nimi manipulováno podle pokynů.
- Před testováním nechte všechny součásti kitu a vzorky dosáhnout pokojovou teplotu (22-28 °C) a dobře je promíchejte.
- Nezaměňujte součásti kitu z různých šarží. Datum exspirace vytisknutý na označeních krabice a vialek je nutné dodržovat. Nepoužívejte žádné součásti kitu po datu exspirace.
- Pokud používáte automatizované vybavení je vaší zodpovědností ujistit se, že kit byl vhodně otestován.
- Neúplné nebo nepřesné odstranění kapaliny z jamek může ovlivnit přesnost analýzy a/nebo zvýšit pozadí.
- Je důležité, aby byla ve všech jamkách udržena konstantní doba reakce, kvůli opakovatelnosti výsledků. Pipetování vzorků by nemělo trvat déle než 10 minut, aby se zamezilo driftu analýzy. Pokud je potřebných víc jako 10 minut, dodržujte stejné pořadí dávkování. Pokud se používá více než jedna destička, doporučuje se zopakovat kalibrační křivku odezvy v každé destičce.
- Přidání roztoku substrátu spouští kinetickou reakci, která je ukončena přidáním zastavovacího roztoku. Proto musí být TMB substrát a zastavovací roztok přidávány v stejné sekvenci, aby se zamezilo jakýmkoli časovým změnám v průběhu reakce.
- Dodržujte směrnice pro vykonávání kontroly kvality v zdravotnických laboratořích měřením kontrol nebo spoolovaných (spojených) sér.
- Pro rozpouštění a dávkování reagencií je potřebná maximální přesnost.
- V analýze by se neměly používat mikrobiologicky kontaminované vzorky. Stejně by se neměly používat vysoce lipemické nebo hemolyzované vzorky.
- Readery destiček měří vertikálně. Nedotýkejte se spodní strany destičky.

6. POSTUP TESTU

6.1 Příprava kalibrátorů

Kalibrátory jsou připraveny k použití a mají následující koncentrace progesteronu:

	C_0	C_1	C_2	C_3	C_4
ng/mL	0	0.2	1.0	8.0	40.0

Před použitím nechte 5 minut na rotačním shakeru.
Kalibrátory jsou stabilní do data exspirace uvedeného na označení. Po otevření jsou stabilní po dobu šesti měsíců při 2 - 8°C.

6.2 Příprava vzorku

Stanovení progesteronu je možné vykonat jak v plazmě, tak i v séru. Pokud stanovení neprobíhá v den odběru vzorku, skladujte vzorky při - 20 °C. Vyhněte se opakovanému zamrazování a rozmrazování vzorků.
Kontrola je připravena k použití.

6.3 Příprava promývacího roztoku

Obsah každé vialky koncentrátu pufrovaného promývacího roztoku (10x) zřeďte před použitím destilovanou vodou na celkový objem 500 mL. Pro menší objemy dodržujte poměr ředění 1:10. Zředěný promývací roztok je stabilní 30 dní při 2-8 °C.

V koncentrovaném promývacím roztoku je možné pozorovat přítomnost krystalů. V tomto případě jej míchejte při pokojové teplotě až do úplného rozpuštění krystalů. Pro větší přesnost zřeďte celou láhev koncentrovaného promývacího roztoku na 500 mL, dbejte na to, abyste krystaly kompletně přesunuli vypláchnutím láhve, a potom míchejte do jejich úplného rozpuštění.

6.4 Postup

Všechny reagencie nechte dosáhnout pokojové teploty (22 – 28 °C)

Nepoužité potažené mikrotitrační proužky je třeba bezpečně uzavřít ve vřecku s desikantem a uskladnit při 2-8 °C.
Pro zabránění potencionální mikrobiální nebo chemické kontaminace se nepoužité reagencie nesmí přenášet zpátky do původních nádob.
Protože je nezbytné vykonávat stanovení v duplikátech kvůli zvýšení přesnosti výsledků testu, připravte si dvě jamky pro každý z pěti bodů kalibrační křivky (C_0 – C_4), dvě pro každou kontrolu, dvě pro každý vzorek, a jednu pro blank.

Pipetujte:

	Kalibrátor	Vzorek/Kontrola	Blank
Vzorek/Kontrola	---	20 µL	---
Kalibrátor C_0 – C_4	20 µL	---	---
Konjugát	200 µL	200 µL	---

Inkubujte při 37 °C po dobu 1 hodiny.
Odstraňte obsah každé jamky; jamky promyjte třikrát 300 µL zředěného promývacího roztoku.
Důležitá poznámka: během každého promývacího kroku destičkou 5 sekund jemně zatřeste a odstraňte nadbytečný roztok oklepáním obrácené destičky o absorpční papírový ubrousek.
Automatická promývačka: v případě že používáte automatickou promývačku, promyjte jamky alespoň 5 krát.
Pipetujte:

	Kalibrátor	Vzorek/Kontrola	Blank
Roztok substrátu	100 µL	100 µL	100 µL

Inkubujte při pokojové teplotě (22 – 28 °C) po dobu 15 minut ve tmě.

Pipetujte:

	Kalibrátor	Vzorek/Kontrola	Blank
Zastavovací roztok	100 µL	100 µL	100 µL

Destičkou jemně třeste.
Změřte absorbanci při 450 nm oproti referenční vlnové délce 620 – 630 nm nebo oproti blanku v průběhu 5 minut.

7. KONTROLA KVALITY

Každá laboratoř musí měřit kontroly při normální, vysoké a nízké hladině rozsahu progesteronu pro sledování činnosti metody. S těmito kontroly je třeba zacházet jako s neznámými a v každém provedeném testovacím běhu pro ně stanovit hodnoty. Je potřebné udržovat tabulky kontroly kvality kvůli sledování činnosti dodávaných reagencií. Pro zjištění trendů je potřebné použít vhodné statistické metody. Jednotlivá laboratoř si musí určit přijatelné limity činnosti metody. Další parametry, které je potřebné sledovat, jsou 80, 50 a 20 % průsečíky kalibrační křivky pro opakovatelnost od běhu k běhu. Dále musí být maximální absorbance konsistentní s dřívějšími měřeními. Značná odchylka od určené činnosti může značit nepostřehnutou změnu

v experimentálních podmínkách nebo degradaci reagencií kitu. Pro určení důvodu změn je potřebné použít čerstvé reagencie.

8. VÝSLEDKY

8.1 Průměrná absorbance

Vypočtete průměrnou absorbanci každého bodu kalibrační křivky a pro každý vzorek.

8.2 Kalibrační křivka

Vyneste průměrnou hodnotu absorbance kalibrátorů oproti jejich koncentraci. Přeložte nejlépe se překrývající křivku přes vynesené body. (4 parametrická logistická)

8.3 Výpočet výsledků

Interpolujte hodnoty vzorků z kalibrační křivky, abyste získali příslušné hodnoty koncentrace uvedené v ng/mL.

9. REFERENČNÍ ROZSAH

Muži:	< 1.0 ng/mL		**Těhotenství:**	Týdny:	ng/mL
Ženy:	Folikulární fáze:	0.1 – 1.4 ng/mL		18-21	53-76
	Střed luteální fáze	4.0 – 25.0 ng/mL		22-25	60-86
	menopauza	< 1.0 ng/mL		26-29	71-133
				30-33	86-142
				34-37	104-175
				38-41	117-187

Věnujte prosím pozornost faktu, že stanovení rozsahu očekávaných hodnot pro „normální“ populaci v dané metodě je závislé na mnoha faktorech, jako jsou specificita a citlivost použité metody a druh vyšetřované populace. Proto by mala každá laboratoř posuzovat výrobcem udaný rozsah jako obecný příklad a vytvořit vlastní rozsah očekávaných hodnot založený na populaci vyskytující se v místě její působnosti.

10. CHARAKTERISTIKY ČINNOSTI

10.1 Preciznost

10.1.1 Rozptyl v rámci analýzy

Rozptyl v rámci analýzy byl určen opakovaným měřením (20x) dvou různých kontrolních sér v jedné analýze. Rozptyl v rámci analýzy je ≤ 4 %.

10.1.2 Rozptyl mezi analýzami

Rozptyl mezi analýzami byl určen opakovaným (10x) měřením třech různých kontrolních sér v různých šaržích. Rozptyl mezi analýzami je ≤ 9 %.

10.2 Specificita

Křížové reakce protilátky vypočteny při 50 % podle Abrahama jsou uvedeny v tabulce:

Progesteron	100 %
Testosteron	0.37 %
17 α-OH Progesteron	0.29 %
17β Estradiol	0.0013 %
Estron	0.00053 %
Estriol	< 0.0001 %
Kortizol	< 0.0001 %

10.3 Přesnost
Výtěžnost 1.0 – 2.0 – 4.0 – 8.0 ng/mL progesteronu přidaného ke vzorku poskytla průměrnou hodnotu (±SD) 100.88 % ± 8.29 % vzhledem k původní koncentraci.

10.4 Citlivost
Nejnižší stanovitelná koncentrace progesteronu, kterou je možné odlišit od nulového kalibrátoru je 0.05 ng/mL při 95 % konfidenční hranici.

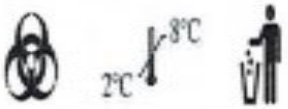
10.5 Korelace s RIA
DIALAB progesteron ELISA byla porovnána s komerčně dostupným Adaltis Progesteron EIAGen kitem. Bylo změřeno 31 vzorků séra v obou testovaných systémech. Byla vypočtena křivka lineární regresní křivka
y= 0.97 x + 0.04
r= 0.887

11. NAKLÁDÁNÍ S ODPADEM

Reagencie musí být likvidovány podle místních nařízení.

12. LITERATURA

- Wisdom, G.B. Clin. Chem 22 (8), 1243-1255 (1976)
- De Villa, G.O., et al. J. Cli. Endocr. Metab. 35, 458 (1972)
- Joyce, B.G., Graham F.R., and Fahmy, D.R. Steroids 29, no 6, 761, (1977)
- Winkel P., Gaede P., and Lyngbye, J Clin. Chem.22 (4), 422 (1976)
- Rajkowski K.N., Cittanova N., Desfosses B., and Jayle M.F. . Steroids 29, no 5 (1977)



ELISA Enzyme Linked Immunosorbent Assay

DIALAB

DIALAB Produktion und Vertrieb von chemisch – technischen Produkten und Laborinstrumenten Gesellschaft m.b.H.
A – 2351 Wiener Neudorf, Austria, IZ-NÖ Süd, Hondastrasse, Objekt M55
Phone: ++43 (0) 2236 660910-0, Fax: ++43 (0) 2236 660910-30, e-mail: office@dialab.at