



## Sistema di Test Progesterone Codice prodotto: 4825-300

### 1.0 INTRODUZIONE

**Uso previsto:** determinazione quantitativa della concentrazione di Progesterone nel siero o plasma umano con un dosaggio immunoenzimatico su micropiastra, colorimetrico

### 2.0 SOMMARIO E SPIEGAZIONE DEL TEST

La misurazione del progesterone nel siero o nel plasma è considerata il modo più affidabile per valutare il suo tasso di produzione.

Il progesterone è un ormone steroideo, che svolge un ruolo importante nella preparazione e nel mantenimento della gravidanza. Viene sintetizzato dal colesterolo tramite pregnenolone, quindi rapidamente metabolizzato a pregnandiol principalmente nel fegato.<sup>2,9,13</sup> L'ovulo e la placenta sono i principali siti di produzione, ma una piccola quantità è prodotta anche dalla corteccia surrenale sia negli uomini che nelle donne. I livelli circolanti di progesterone, che sono caratteristicamente bassi durante la fase follicolare, aumentano bruscamente durante la fase luteale dei cicli mestruali, raggiungendo un massimo approssimativamente da 5 a 10 giorni dopo il picco di LH a metà ciclo.<sup>12</sup> A meno che non si verifichi una gravidanza, si verifica un brusco calo dei livelli follicolari circa 4 giorni prima del successivo periodo mestruale. Questo modello costituisce la logica alla base dell'uso ben consolidato delle misurazioni del progesterone sierico come metodo semplice e affidabile per il rilevamento dell'ovulazione.<sup>3,4,16</sup>

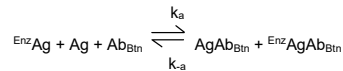
Per le misurazioni di routine, sono preferibili i test immunologici che utilizzano anticorpi specifici steroidi. I saggi immunologici iniziali per il progesterone sierico utilizzavano solventi organici per rimuovere lo steroide dalle proteine leganti endogene come la globulina legante i corticosteroidi (CBG) e l'albumina. La misurazione diretta del progesterone nel siero o plasma è considerata il metodo di scelta per le applicazioni di routine. Sia RIA che EIA (e alcune FIA) sono disponibili sul mercato. Dal momento che la RIA riguarda la gestione della radioattività e causa problemi di smaltimento dei rifiuti radioattivi, vari metodi non isotopici hanno sostituito la RIA. Questi metodi utilizzano anticorpi molto specifici per determinare i livelli di progesterone in circolazione.

Il kit in elisa monobind per il progesterone utilizza un anticorpo specifico anti-progesterone e non richiede l'estrazione del siero o del plasma. La reattività crociata ad altri steroidi presenti in natura e strutturalmente correlati è bassa. L'impiego di numerosi riferimenti sierici di concentrazione di progesterone nota consente la costruzione di un grafico di attività e concentrazione. Dal confronto con la curva dose-risposta, l'attività di un campione sconosciuto può essere correlata con la concentrazione di progesterone.

### 3.0 PRINCIPIO

#### Immunoenzimatico competitivo (TIPO 7):

I reagenti essenziali necessari per un saggio immunoenzimatico includono l'anticorpo, il coniugato enzima-antigene e l'antigene nativo. Dopo aver miscelato l'anticorpo biotinilato, il coniugato enzima-antigene e un siero contenente l'antigene nativo, una reazione alla competizione mente correlati è bassa. L'impiego di numerosi riferimenti sierici di concentrazione di progesterone nota consente la costruzione di un grafico di attività e concentrazione. Dal confronto con la curva dose-risposta, l'attività di un campione sconosciuto può essere correlata con la concentrazione di progesterone.



$\text{Ab}_{\text{BtN}}$  = Anticorpo Biotinilato (Quantità costante)  
 $\text{Ag}$  = Antigene Nativo (Quantità Variabile)  
 $\text{EnzAg}$  = Enzima-antigene Coniugati (Quantità Costante)  
 $\text{AgAb}_{\text{BtN}}$  = Complesso anticorpo-antigene  
 $\text{EnzAgAb}_{\text{BtN}}$  = Enzima-antigene Coniugato – Complesso anticorpo  
 $k_a$  = valore Costante di Associazione  
 $k_{-a}$  = valore Costante di Dissociazione  
 $K = k_a / k_{-a}$  = equilibrio Costante

Si verifica una reazione simultanea tra la biotina attaccata all'anticorpo e la streptavidina immobilizzata sul micropozzetto. Ciò influisce sulla separazione della frazione legata all'anticorpo dopo la decantazione o l'aspirazione.

$\text{AgAb}_{\text{BtN}} + \text{EnzAgAb}_{\text{BtN}} + \text{Streptavidina}_{\text{CW}} \rightarrow \text{Complesso Immobilizzato}$   
 $\text{Streptavidina}_{\text{CW}} = \text{streptavidina immobilizzata bene}$   
 $\text{Complesso Immobilizzato} = \text{complesso a sandwich legato alla superficie solida}$

L'attività enzimatica nella frazione legata all'anticorpo è inversamente proporzionale alla concentrazione dell'antigene nativo. Utilizzando diversi riferimenti sierici di antigene nota, è possibile generare una curva di risposta alla dose da cui è possibile determinare la concentrazione di antigene di uno sconosciuto.

### 4.0 REATTIVI

#### Materiali forniti:

##### A. Calibratori per Progesterone - 1ml/fiacone - Icone A-G

Sette (7) fialoncini di riferimento siero per Progesterone a concentrazioni di 0 (A), 0,3 (B), 2,0 (C), 5,0 (D), 15 (E), 30, (F) e 60 (G) ng/ml. Conservare a 2-8 °C. Un conservante ha stato aggiunto. I calibratori possono essere espressi in molar concentrazioni (nM / L) moltiplicando per 3,18.  
 Ad esempio: 1ng/ml x 3,18 = 3,18 nM / L

##### B. Reagente enzimatico Progesterone - 6,0 ml / fiasco (E)

Una (1) fiala di coniugato Progesterone (analogo) perossidi da pastore (HRP) in una matrice stabilizzante di proteine con colorante. Conservare a 2-8 °C.

##### C. Reagente biotina Progesterone - 6,0 ml/fiacone – Icon V

Una (1) fiala di reagente contiene con anti-Progesterone biotinilato purificato coniugato IgG di coniglio in tampone, giallo ow colorante e conservante. Conservare a 2-8 °C.

##### D. piastra rivestita di streptavidina - 96 pozzetti – Icon J

Una micropiastra da 96 pozzetti rivestita con 1,0 mg / ml di streptavidina e confezionato in una busta di alluminio con un agente essiccante. Conservare a 2-8 °C.

##### E. Soluzione di lavaggio Concentrato - 20ml / fiasco - Icon

Una (1) fiala contiene un tensioattivo in soluzione salina tamponata. E stato aggiunto con conservante. Conservare a 2-8 °C.

##### F. Reagente Substrate – 12 ml/fiacone – Icon SN

Una (1) fiala contiene tetrametilbenzidina (TMB) e perossido di idrogeno (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>) in tampone. Conservare a 2-8 °C.

##### G. Soluzione di stop - 8ml/fiacone – Icon

Una (1) fiala contiene un acido forte (H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>). Conservare a 2-8 °C.

#### H. Istruzioni del prodotto

**Nota 1:** Non usare i reagenti oltre la data di scadenza del kit.

**Nota 2:** Evitare l'esposizione prolungata al calore e alla luce. I reagenti aperti sono stabili per sessanta (60) giorni se conservati a 2-8 °C. La stabilità del kit e dei componenti è

#### identificati sull'etichetta.

**Nota 3:** i reagenti sopra riportati si riferiscono a una singola micropiastra da 96 pozzetti.

#### 4.1 necessari ma non forniti:

1. Pipetta in grado di erogare 0,025 e 0,050 (25 e 50µl) con una precisione migliore di 1,5%.
2. Dispenser (s) per le consegne ripetitive di 0,050, 0,100 ml e 0,350ml volumi con una precisione migliore di 1,5%.
3. Erogatore di volume regolabile (200-1000µl) per coniugato.
4. Lavatore di micropiastra o fiascone di compressione (opzionale)
5. Lettore di micropiastra con capacità di assorbanza della lunghezza d'onda 450nm e 620nm.
6. Carta assorbente per macchiare i pozzetti della micropiastra
7. Copertura di plastica o micropiastra per le fasi di incubazione
8. Aspiratore a vuoto (opzionale) per le fasi di lavaggio
9. Timer
10. Materiali per il controllo della qualità

### 5.0 PRECAUZIONI

**Per uso diagnostico in vitro  
Non per Interna o Esterna uso in esseri umani o animali**

Tutti i prodotti contenenti siero umano sono stati trovati per essere non reattivo per epatite B antigene di superficie, HIV 1 & 2 e HCV Anticorpi di FDA necessario effettuare esperimenti. Dal momento che nessun test può offrire completa garanzia che gli agenti infettivi, tutti umani prodotti derivati da siero devono essere trattati come potenziale pericolosità capaci di trasmettere malattie. Buone procedure di laboratorio per la movimentazione di prodotti ematici può essere trovato presso il Centro per Disease Control / National Institute of Health, "Biosafety in Microbiologici e Biomedical Laboratories, "2nd Edition, 1988, HHS No. pubblicazione (CDC) 88-8395.

**Smaltimento sicuro dei componenti del kit deve essere secondo locale requisito normativo e statutario.**

### 6.0 RACCOLTA E PREPARAZIONE DEI CAMPIONI

I campioni devono essere sangue; siero o plasma in tipo e la consuete precauzioni nella raccolta dei campioni devono essere osservati. Per un confronto accurato per stabilire i valori normali, prelevare un campione di siero mattina a digiuno. Il sangue deve raccolto in provetta o (per il plasma) con provette sottovuoto (s) contenente eparina. Lasciare che il sangue coaguli di campioni di siero. Centrifugare la campione per separare il siero o plasma dalle cellule.

I campioni possono essere refrigerati a 2-8° C per un periodo massimo di cinque (5) giorni. Se il campione (s) non può essere testato entro questo tempo, il campione (s) possono essere conservati a temperature di -20° C per fino a 30 giorni. Evitare l'uso di dispositivi contaminati. Evitare ripetuti congelamenti e scongelamenti. Se testati in duplicato, È necessaria 0.050ml del campione.

### 7.0 CONTROLLO QUALITÀ

Ogni laboratorio dovrebbe testare controlli con livelli di bassa, normale e di alta gamma per il controllo delle prestazioni dell'analisi. Questi controlli devono essere trattati come ignoti ed i valori determinati in ogni test effettuato. Tabelle di controllo qualità dovrebbero essere mantenute per seguire le prestazioni dei reagenti forniti. Metodi statistici adeguati dovrebbero essere impiegati per accertare le tendenze. Il laboratorio dovrebbe fissare i test entro i limiti delle prestazioni. Inoltre, assorbanza massima dovrebbe essere coerente con l'esperienza passata. La deviazione significativa dalle prestazioni stabilite può indicare il cambiamento inosservato negli condizioni sperimentali o degradazione dei reagenti del kit. Reagenti Freschi devono essere utilizzati per determinare il motivo delle variazioni.

### 8.0 PREPARAZIONE DEL REAGENTE

1. **Tampone di lavaggio**  
Diluire la soluzione di lavaggio a 1000ml con acqua distillata o acqua deionizzata in un contenitore adatto. Il Tampone diluito Può essere conservati a 2-30 °C per un massimo di 60 giorni.

**Nota:** Non utilizzare i reagenti che sono contaminati o che hanno crescita dei batteri.

### 9.0 PROCEDURA DI PROVA

*Prima di procedere con il test, portare tutti i reagenti, i calibratori di riferimento del siero ei controlli a temperatura ambiente (20-27° C).*

**\*\* Procedura di prova deve essere effettuata da una persona qualificata o formazione professionale \*\***

1. Formattare i pozzetti di micropiastra per ogni riferimento di siero, controllo e pazienti provino in duplicato. **Rimettere i pozzetti inutilizzati nella busta di alluminio e conservare a 2-8 °C.**
2. Pipettare 0.025 ml (25 µL) del siero di riferimento appropriato, controllo o campione nel well assegnato.
3. Aggiungere 0,050 ml (50 pl) di reagente enzimatico Progesterone a tutti i pozzetti
4. Agitare delicatamente la micropiastra per 10-20 secondi per mescolare.
5. Aggiungere 0,050 ml (50 pl) di reagente per biotina di Progesterone a tutti pozzetti.
6. Agitare delicatamente la micropiastra per 10-20 secondi per mescolare.
7. Coprire e incubare per 60 minuti a temperatura ambiente.
8. Eliminare il contenuto della micropiastra per decantazione o aspirazione. Se decantazione, asciugare la micropiastra con carta assorbente.
9. Aggiungere 0,350ml (350µl) di tampone di lavaggio (consultare la sezione Preparazione dei reagenti), decantare (toccare e macchia) o aspirare. Ripetere due (2) supplementari volte per un totale di tre (3) lavaggi. **automatica o lavatore manuale. Seguire le istruzioni del produttore per un uso appropriato. Se una compressione bottiglia viene impiegato, riempire ogni pozzetto premendo il contenitore (evitando bolle d'aria) per erogare il lavaggio. Decantare il lavaggio e ripetere due (2) volte.**
10. Aggiungere 0,100 ml (100 microlitri) di soluzione di substrato di lavoro per tutti i pozzetti (Vedi Sezione Preparazione del reagente). **Aggiungere sempre i reagenti in stesso ordine per minimizzare le differenze di tempo di reazione tra i pozzetti.**
11. **NON AGITARE piastra dopo l'aggiunta del substrato**
12. Incubare a temperatura ambiente per venti (20) minuti.
13. Aggiungere quantità di 0.050 ml (50 microlitri) di soluzione di stop a ogni pozzetto e delicatamente mescolare per 15-20 secondi. **Aggiungere sempre i reagenti nello stesso Per ridurre al minimo le differenze tempi di reazione dei Pozzetti.**
14. Leggere l'assorbanza in ciascun pozzetto a 450nm (usando una lunghezza d'onda di riferimento di 620-630nm) in un lettore di micropiastra. **I risultati dovrebbero essere letti entro quindici (15) minuti dall'aggiunta della soluzione di soluzione.**

**Nota:** Diluire i campioni sospettati di concentrazioni superiori 60 ng / ml 1:5 e 1:10 con il calibratore di Progesterone '0' ng / ml o pool di siero di pazienti maschi con un valore basso noto per il Progesterone.

### 10.0 CALCOLO DEI RISULTATI

**Una curva standard è utilizzata per determinare le concentrazioni di Progesterone in campioni incogniti.**

1. Registrare le assorbanze ottenute dalla stampa del lettore di micropiastra come illustrato nell'esempio 1.
2. Tracciare l'assorbanza per ciascun riferimento siero duplicato rispetto al corrispondente concentrazione di Progesterone in ng / ml su carta millimetrata lineare (non la media dei duplicati dei riferimenti siero prima stampa).
3. Collegare i punti con una curva di best-fit.
4. Per determinare la concentrazione di Progesterone per uno sconosciuto, individuare l'assorbanza media dei duplicati per ogni Sconosciuto sull'asse verticale del grafico, trovare la punto di intersezione sulla curva, e leggere la concentrazione (In ng / ml) rispetto all'asse orizzontale del grafico (il duplicato dell'ignoto possono essere mediate, come indicato). Nell'esempio seguente, l'assorbanza media (0,517) interseca la curva dose-risposta a 8,1 ng / ml di Concentrazione di Progesterone (vedere Figura 1).

**Nota:** il software di riduzione dei dati Computer progettato per ELISA saggi possono essere utilizzati anche per la riduzione dei

