

PATHOZYME® PROGESTERONE Ref OD487

Immunoenzymatyczny test do ilościowego oznaczania progesteronu w ludzkiej surowicy lub osoczu.

Przechowywać w temp. 2°C - 8°C. NIE ZAMRAŻAĆ. Do diagnostyki „in vitro”.

WPROWADZENIE

Progesteron jest 21-węglowym steroidem, który jest syntetyzowany z tkaniaowego i korażcego cholesterolu. Cholesterol jest transformowany do pregnenolonu, który następnie ulega konwersji za dehydrogenazą i izomerażą do progesteronu. Głównymi miejscami produkcji są nadnercza i jajniki, a w czasie ciąży łożysko. Większość tego steroidu jest metabolizowana w wątrobie do pregnenoliu i koniugacji z glukuronianem przed wydzieleniem przez nerki.

Progesteron wykazuje szerokie, różnorodne oddziaływanie narządowe. Podstawową rolą progesteronu jest oddziaływanie na narządy rozrodcze. U mężczyzn, progesteron jest pośrednio konieczny do produkcji kortykoidów i androgenów. U kobiet, progesteron pozostaje względnie stały w czasie fazy folikularnej cyklu miesięczkowego. Jego stężenie szybko wzrasta po owulacji i utrzymuje się przez 4-6 dni na wysokim poziomie, a następnie spada do poziomu wyjściowego 24 godziny przed rozpoczęciem krwawienia. W ciąży, produkcja progesteronu łożyskowego silnie wzrasta, 10 – 20 -krotnie w stosunku do poziomu pik w fazie lutealnej.

Oznaczanie poziomu progesteronu służy w ten sposób do określenia owulacji jak również do opisywania zaburzeń fazy lutealnej. Oznaczanie progesteronu wykorzystywane jest do monitorowania terapii progesteronowej i oceny wczesnego okresu ciąży.

PRZEZNACZENIE

PATHOZYME PROGESTERONE jest testem, w którym wykorzystano metodę immunoenzymatyczną (EIA) do ilościowego oznaczania progesteronu w ludzkiej surowicy lub osoczu.

Do użytku w laboratorium.

ZASADA

PATHOZYME PROGESTERONE jest testem, w którym wykorzystano metodę kompetycyjnego łączenia się pomiędzy progesteronem w badanej próbce i progesteronem-HRP koniugatu ze stałą ilością króliczych przeciwciał anty-progesteronowych. W czasie inkubacji, kozie anty-królicze przeciwciała IgG opłaszczane na kubeczkach są inkubowane ze standardami, kontrolami i badanymi próbkami zawierającymi progesteron, koniugatem HRP-progesteronu i odczynnikami zawierającym królicze przeciwciała anty-progesteronowe. W czasie inkubacji, określona ilość progesteronu znakowanego peroksydazą chrzanową współzawodniczy z endogennym progesteronem obecnym w standardach, badanych próbkach lub surowicach kontrolnych o miejsce wiążące na specyficznych przeciwciałach progesteronowych.

W ten sposób, ilość progesteronu znakowanego peroksydazą chrzanową, która może ulec przyłączeniu obecnego do kubeczka progresywnie spada jeżeli stężenie progesteronu w badanej próbce wzrasta.

Nadmiar niezwiązanego progesteronu znakowanego peroksydazą chrzanową (koniugat) zostaje usunięty, a kubeczki poddane procesowi płukania. Dodanie substratu (TMB) inicjuje reakcję barwną, efektem czego jest pojawienie się niebieskiego koloru. Zatrzymanie reakcji następuje po dodaniu odczynnika zatrzymującego reakcję, a pomiar absorpcji dokonywany jest spektrofotometrycznie przy długości fali 450 nm. Intensywność zabarwienia jest proporcjonalna do ilości obecnego enzymu i odwrotnie zależna od ilości nieoznakowanego progesteronu w badanej próbce.

Krzywą kalibracyjną uzyskuje się przez wykreślenie w układzie współrzędnych stężenia standardów w odniesieniu do ich absorpcji. Stężenie estradiolu w badanych próbkach i surowicach kontrolnych nastawionych równoległe ze standardami może być wyliczone z wykreślonej krzywej kalibracyjnej.

Test wykwalibrowano względem wewnętrznego standardu. Nie ma międzynarodowego wzorca dla tego testu.

SKŁAD ZESTAWU

Ref
OD477



Microtitre Plate	12 x 8 wells x 1
Dzieloną mikropłytkę z kubeczkami opłaszczonymi kozimi anty-króliczymi przeciwciałami w klasie IgG, umieszczoną w foliowej torebce ze środkiem pochłaniającym wilgoć.	
Cal A	0 ng / ml
Standard referencyjny: ludzka surowica pozbawiona progesteronu. Gotowy do użycia. (Bezbarwny)	
Cal B	0.5 ng / ml
Standard referencyjny: Progesteron rozcieńczony w ludzkiej surowicy. Gotowy do użycia. (Bezbarwny)	
Cal C	3.0 ng / ml
Standard referencyjny: Progesteron rozcieńczony w ludzkiej surowicy. Gotowy do użycia. (Bezbarwny)	
Cal D	10 ng / ml
Standard referencyjny: Progesteron rozcieńczony w ludzkiej surowicy. Gotowy do użycia. (Bezbarwny)	
Cal E	25 ng / ml
Standard referencyjny: Progesteron rozcieńczony w ludzkiej surowicy. Gotowy do użycia. (Bezbarwny)	
Cal F	50 ng / ml
Standard referencyjny: Progesteron rozcieńczony w ludzkiej surowicy. Gotowy do użycia. (Bezbarwny)	
Control 1	Level as stated on vial
Surowica zawierająca rozpuszczony Gotowa progesteron o znanym mianie. Gotowa do użycia. (Bezbarwna)	

Control 2	Level as stated on vial	0.5 ml		
Surowica zawierająca rozpuszczony progesteron o znanym mianie. Gotowa do użycia. (Bezbarwna)				
REAG Ab	Progesterone	7 ml		
Odczynnik zawierający królicze przeciwciała anty-progesteronowe. Gotowy do użycia. (Różowy)				
Conj	11 X	1.3 ml		
Progesteron znakowany peroksydazą chrzanową. Gotowy do użycia. (Bezbarwny)				
DIL	CONJ	13 ml		
Buforowany roztwór fosforanowy zawierający stabilizatory białkowe. Gotowy do użycia. (Niebieski)				
Subs	TMB	11 ml		
Roztwór substratu: 3,3', 5,5' tetrametylobenzidyna w buforze octanowym. Gotowy do użycia. (Bezbarwny)				
Soln	Stop	HCl	1M	11 ml
Odczynnik zatrzymujący reakcję: kwas solny rozcieńczony w czystej wodzie. Gotowy do użycia. (Bezbarwny)				
Instrukcja i druk protokołu.				
1 + 1				

MATERIAŁY WYMAGANE DO WYKONANIA OZNACZENIA, NIE ZAŁĄCZONE DO ZESTAWU

Pipety: 100µl, 200µ, 1000µl i 5000µl.
Korcówki do pipet.
Papier absorbacyjny.
Czynnik mikropylek z filtrem 450 nm.
Papier milimetryowy.
Dokładnie umyte szkło laboratoryjne.

ŚRODKI OSTROŻNOŚCI

Zestaw **PATHOZYME PROGESTERONE** zawiera materiał pochodzenia ludzkiego. Wykonano badania na obecność przeciwciał HCV, HIV I i II – wynik negatywny oraz HBsAg zgodnie z zatwierdzonymi przez FDA procedurami. Ponieważ żadne znane procedury nie dają całkowitej pewności, iż pozyskany materiał pochodzenia ludzkiego nie zawiera innych czynników zakaźnych, produkt należy traktować jako potencjalnie zakaźny i zaleca się obchodzić z nim ze szczególną ostrożnością i uwagą. Zaleca się również zachowanie środków ostrożności przy wykonywaniu oznaczenia traktując wszystkie odczynniki jako potencjalnie zakaźne. Nie spożywać.

Zestaw **PATHOZYME PROGESTERONE** nie zawiera substancji niebezpiecznych sklasyfikowanych przez aktualne, brytyjskie regulacje dotyczące substancji chemicznych. Jednakże zaleca się aby wszystkie odczynniki traktować jako potencjalny materiał niebezpieczny. Wszystkie zalecenia muszą być zgodne z lokalnymi rozporządzeniami.

Zestaw **PATHOZYME PROGESTERONE** zawiera rozcieńczony kwas solny jako odczynnik zatrzymujący reakcję – środek żrący. Używać z zachowaniem środków ostrożności. W przypadku kontaktu płukać obficie wodą.

Odczynniki wchodzące w skład zestawu **PATHOZYME PROGESTERONE** zawierają 1% Proclin™ 300* jako konserwant, który może być środkiem toksycznym jeśli zostanie spożyty. W przypadku kontaktu płukać obficie wodą i udać się po pomoc medyczną.

*Proclin™ 300 jest chroniony znakiem towarowym firmy ROHM & HAAS Limited.

PRZECHOWYWANIE

Odczynniki muszą być przechowywane w temperaturze 2°C - 8°C.

Test będzie spełniał standardy jakości podane w specyfikacji do końca daty ważności, która jest podana na zestawie i poszczególnych składnikach. Data ważności to ostatni dzień miesiąca podany na buteleczce i etykiecie zestawu. Nie używać odczynników przeterminowanych.

Nie poddawać odczynników działaniu zbyt wysokiej temperatury. Unikać wystawiania na bezpośrednie działanie światła słonecznego.

NIE ZAMRAŻAĆ ODCZYNNIKÓW – zamrożenie powoduje nieodwracalny rozkład.

PRZYGOTOWANIE I PRZECHOWYWANIE PRÓBK

Surowica: Pobrać próbkę krwi żyłnej, odstawić do wykrzepnięcia i oddzielenia surowicy. Odwirować wykrzepioną krew i odciągnąć surowicę. Zaleca się używać świeżą surowicę.

Osocze: Pobrać próbkę krwi żyłnej do próbki zawierającej EDTA. Odwirować próbkę i odciągnąć osocze. Zaleca się używać świeże osocze.

Nie używać do badania próbek zhemolizowanych, mętnych lub lipemicznych, powyższe może fałszować wyniki.

Surowica lub osocze mogą być przechowywane do 48 godzin w temperaturze 2°C - 8°C. W przypadku dłuższego przechowywania, próbkę zamrozić w temp. - 20°C (możliwość przechowywania do 1 roku). Rozmrożoną próbkę wymieszać przed wykonaniem oznaczenia.

Nie używać azydku sodowego jako konserwantu, może hamować aktywność enzymu peroksydazy.

Unikać wielokrotnego zamrażania i rozmrażania próbek, powyższe może fałszować wyniki.

PRZYGOTOWANIE ODCZYNNIKÓW

Przed użyciem wszystkie odczynniki doprowadzić do temperatury pokojowej (20°C - 25°C) i delikatnie wymieszać. Unikać spienienia.

Roztwór roboczy koniugatu: rozcieńczyć koncentrat koniugatu przez zmieszanie 1 części koncentratu koniugatu z 10 częściami rozcieńczalnika koniugatu (rozcieńczenie 1/11). Na każdy kubeczek wymagane jest 100µl gotowego roztworu. Roztwór roboczy koniugatu jest trwały jeden miesiąc w temperaturze 2°C - 8°C.

OGRANICZENIA

Test jest nieważny jeżeli do badania użyto innego materiału niż surowica lub osocze pobrane na EDTA. Żadna modyfikacja procedury nie jest dozwolona. Interpretacja uzyskanych wyników powinna być przeprowadzona w oparciu o wywiad lekarski. Diagnostyka nie może być oparta wyłącznie o jedno badanie kliniczne.

PROCEDURA

1. Przed wykonaniem oznaczenia wszystkie odczynniki i próbki badania doprowadzić do temperatury pokojowej (20°C - 25°C).
2. Do każdej serii badań należy nastawić nową krzywą kalibracyjną. Umieścić odpowiednią ilość kubeczków w ramce mikroplastyki. Zanotować pozycje standardów i próbek badanych na druku protokołu załączonym do zestawu.
3. Nie używane kubeczki umieścić w szczelnie zamkniętej foliowej torebce ze środkiem pochłaniającym wilgoć i ponownie włożyć do lodówki (2°C - 8°C).
4. Do odpowiednich kubeczków odpipetować po 25µl standardów i próbek badanych.
5. Do każdego kubeczka dodać po 100µl roztworu koniugatu.
6. Do każdego kubeczka dodać po 50µl odczynnika zawierającego królicze przeciwciała anty-progesteronowe. Mieszać delikatnie przez 30 sekund. Ten punkt jest ważny dla procedury.
7. Inkubować 90 minut w temperaturze pokojowej (20°C - 25°C).
8. Ręczne płukanie: Po zakończeniu inkubacji wylać zawartość z kubeczków do pojemnika na odpady. Osuszyć kubeczki kładąc je do góry dnem na papierze absorbującym. Upewnić się czy w pojemniku na zlewki znajduje się odpowiedni środek odkazający.
9. Napełnić kubeczki wodą destylowaną, do każdego kubeczka naleć minimum 300µl. Wytrząsnąć zawartość z kubeczków do pojemnika na odpady. Osuszyć kubeczki kładąc je do góry dnem na papierze absorbującym. Przemycić puste kubeczki 5-krotnie.
10. Energicznie uderzać kubeczkami na papierze absorbującym lub papierowym ręczniku, tak aby usunąć resztki wody.
11. Płukanie przy użyciu płuczki automatycznej: upewnić się, że płuczka dozuje 300µl płynu na każdy kubeczek oraz czy do pojemnika na zlewki został dodany odpowiedni środek odkazający. Przemycić puste kubeczki 5-krotnie wodą destylowaną. Po zakończeniu płukania usunąć resztki płynu poprzez energiczne uderzanie kubeczkami na papierze absorbującym lub papierowym ręczniku.
12. Do wszystkich kubeczków dodać po 100 µl roztworu substratu. Mieszać delikatnie przez 5 sekund.
13. Inkubować 20 minut w ciemnym miejscu w temperaturze pokojowej (20°C - 25°C).
14. Zatrzymać reakcję przez dodanie do każdego kubeczka po 100µl odczynnika zatrzymującego reakcję.
15. Delikatnie mieszać przez 30 sekund. Upewnić się, że barwa niebieska całkowicie uległa zmianie na barwę żółtą.
16. Natychmiast odczytać wartości absorbancji (w czasie nie dłuższym niż 10 minut) na czytniku mikroplastyk przy długości fali 450 nm.

WYKRYWANIE I USUWANIE BŁĘDÓW

Test jest przeznaczony do użycia przez laboranta z minimum doświadczenia analitycznego.

Nie używać rozłożonych lub zanieczyszczonych odczynników.

Do pipetowania surowic używać jednorazowych końcówek w celu uniknięcia wzajemnego zanieczyszczenia próbek.

Zalecane jest nastawianie kalibratorów i próbek badanych w dubletach, chociaż nie jest konieczne wymagane. Próbkę badaną i kalibrator powinny być pipetowane z zachowaniem jednakowych warunków przeprowadzenia analizy.

Zaleca się nastawianie jednorazowo nie więcej niż 32 kubeczków w przypadku ręcznego pipetowania, pipetowanie standardów i próbek badanych powinno być zakończone w ciągu 3 minut. Nastawienie całej mikroplastyki (96 kubeczków) jest możliwe w przypadku automatycznego pipetowania.

Po użyciu każdego odczynnika natychmiast zamknąć buteleczkę odpowiednią nakrętką.

Unikać wielokrotnego pipetowania (wielokrotnego otwierania) odczynników pobranych z magazynu – może to być przyczyną ich zanieczyszczenia.

Nie mieszać odczynników lub opłaszonych kubeczków mikroplastyki z różnych zestawów. Zachować szczególną uwagę aby nie dotykać ścian kubeczków w trakcie ich rozdzielania.

Nie dopuścić aby odczynniki podczas pipetowania sphywały po ściankach kubeczków. Przed wykonaniem oznaczenia przenieść wszystkie odczynniki do temperatury pokojowej (20°C - 25°C). Delikatnie wymieszać wszystkie odczynniki poprzez delikatne odwracanie lub obracanie.

Raz rozpoczęta procedura powinna być kontynuowana tak, aby podczas wykonywania oznaczenia kubeczki nie zostały wysuszone.

Nie zanieczyszczać roztworu substratu, może to spowodować, że cały zestaw nie będzie aktywny.

Sprawdzić precyzję i dokładność sprzętu laboratoryjnego używanego podczas procedury wykonania oznaczenia tak, aby być pewnym odwracalności wyników.

Nie używane paski, przed ponownym włożeniem do lodówki (temp. 2°C - 8°C), powinny być ściśle zamknięte (zamknięcie typu zip-lock) w foliowej torebce ze środkiem pochłaniającym wilgoć.

OBLICZANIE WYNIKÓW

Obliczyć średnią wartość absorbancji (A_{450}) dla każdego kalibratora i próbek badanych. Wykreślić krzywą kalibracyjną na papierze milimetrowym odkładając na osi X: stężenia poszczególnych kalibratorów wyrażone w jednostkach ng/ml, a na osi Y: odpowiadające im wartości absorbancji. Z wykresu krzywej kalibracyjnej odczytać wartości progesteronu w ng/ml dla próbek badanych. Do odczytu użyć wylczone wartości średnie. Jeżeli wyniki kontroli lub znanych próbek badanych nie dają oczekiwanych wartości test należy uznać za nieważny. Jeśli do obliczeń używamy aparatury z oprogramowaniem wówczas krzywą kalibracyjną obliczyć w oparciu o równanie poligonalne z ekstrapolacją krzywej.

WARTOŚCI OCZEKIWANE I CZUŁOŚĆ

Uzyskana krzywa kalibracyjna powinna mieć kształt hiperboliczny odwrotnie proporcjonalny od uzyskanych wartości absorbancji w stosunku do odpowiednich wartości stężeń kalibratorów. Test można uznać za ważny jeżeli wartość absorbancji kalibratora A jest większa niż 1,5, a wartość absorbancji kalibratora F jest mniejsza niż 0,75.

Zalecane jest aby każde laboratorium ustaliło własne zakresy wartości prawidłowych w oparciu o daną populację pacjentów. Zakresy wartości prawidłowych testem PATHOZYME PROGESTERONE uzyskano w losowo wybranych surowicach pozyskanych z laboratoriów klinicznych działających w lecznictwie otwartym i przedstawiono poniżej:

Mężczyźni	Dorośli	0.05-1.25ng/ml
	Chłopcy przed okresem dojrzewania	0-0.68ng/ml
Kobiety	Faza folikularna	0.10-1.60ng/ml
	Faza lutealna	2.50-32.0ng/ml
	Po menopauzie	0.06-1.60ng/ml
	W ciąży	>250ng/ml
	I trymestr	10.3 - 44.0 ng/ml
	II trymestr	19.5 - 82.5 ng/ml
III trymestr	64.0 - 229.0 ng/ml	

CZUŁOŚĆ

Minimalny wykrywany powyższym testem poziom progesteronu wynosi 0.05ng/ml.

SPECYFICZNOŚĆ

Sprawdzono interferencję dla poniższych substancji. Wartości procentowe wskazują na interferencję w 50% przesiesieniu do progesteronu.

Wyniki interferencji dla kilku endogennych i farmaceutycznych steroidów przedstawiono w tabeli poniżej:

Interferencja (%) = $\frac{\text{wykryte stężenie progesteronu} \times 100}{\text{stężenie steroidu}}$

Steroid	Interferencja
Progesteron	100%
Androsteron	0.086%
Kortykosteron	0.74%
Kortyzon	0.11%
Cholesterol	<0.08%
Estradiol	<0.01%
Estron	0.08%

OCENA WYNIKÓW

Test kalibrowano względem innych uznanych testów konkurencyjnych oraz względem wewnętrznych standardów.

Współczynnik zmienności testu PATHOZYME PROGESTERONE jest mniejszy lub równy 10%.

Do porównania testów Omega Pathozyne Progesterone kit i DRG BIOC Kit użyto próbek o wartościach progesteronu pomiędzy 0.35 ng/ml a 73.83 ng/ml i uzyskano następujące wyniki.

Liczba próbek badanych	106
Współczynnik korelacji	0.96
Wartość nachylenia krzywej	1.16
Punkt przecięcia z osią OY	1.53
Wartość średnia testem Omega	18.0 ng/ml
Wartość średnia testem DRG	14.17 ng/ml

Testy wykazują dobrą korelację.

PIŚMIENNICTWO

1. Radwanska, E., Frankenberg, J., and Allen. E., Plasma Progesterone Levels in Normal and Abnormal Early Pregnancy. Fertility and Sterility **30**, 398-402 (1978).
2. Autrere, M.B., and Benson, H., Progesterone: An Overview and Recent Advances. J. Par. Sci. **65**, 783-800 (1976).
3. March, C.M., Goebelsmann, U., Nakamura, R.M., and Mischell, D.R. Roles of Estradiol and Progesterone in Eliciting the Midcycle Luteinising Hormone and Follicle-Stimulating Hormone Surges. J. Clin. Endo. And Metab. **48**: 507-513, (1979).
4. Ross, G.T., Van De Wiele, R.L., and Frantz, A.G. The Ovaries and the Breasts in Textbook of Endocrinology, R.H. Williams ed. P355-407, W.B. Saunders, Phil. (1981).
5. Chatteraj, S.C., Endocrine Function in Fundamentals of Clinical Chemistry, N.W. Tietz ed. p699-823, W.B. Saunders, Phil. Chap. 13 (1976).
6. Shepard, M.K., and Fainstat, T. Comparison of Serum Progesterone and Endometrial Biopsy for Confirmation of Ovulation and Evaluation of Luteal Function. Fertility and Sterility, **28**: 541; (1977).
7. Johansson, E.D., and Johansson, L.E. Progesterone Levels in Amniotic Fluid and Plasma from Women. I. Levels During Normal Pregnancy. Acta. Obstet. Gynaecol. Scand. **50**: 339; (1971).
8. USA Centre for Disease Control/National Institute of Health Manual "Biosafety in Microbiological and Biomedical Laboratories" 1984.

SKRÓCONA WERSJA WYKONANIA OZNACZENIA

1. Do odpowiednich kubeczków odpipetować po 25µl standardów, próbek badanych i surowic kontrolnych.
2. Do każdego kubeczka dodać po 100µl roboczego roztworu koniugatu.
3. Następnie do każdego kubeczka dodać po 50µl króliczych przeciwciał anty-progesteronowych. Delikatnie mieszać przez 30 sekund.
4. Inkubować 90 minut w temperaturze pokojowej (20°C - 25°C).
5. Wylać zawartość z kubeczków i przepłukać 5-krotnie wodą destylowaną.
6. Do każdego kubeczka dodać po 100µl roztworu substratu i delikatnie mieszać przez 5 sekund.
7. Inkubować 20 minut w ciemnym miejscu w temperaturze pokojowej (20°C - 25°C).
8. Do każdego kubeczka dodać po 100µl odczynnika zatrzymującego reakcję i delikatnie mieszać przez 30 sekund.
9. Natychmiast odczytać wartość absorbancji (w czasie nie dłuższym niż 10 minut) przy użyciu czytnika płytek przy długości fali 450 nm.

8098 ISSUE 4 Revised July 2010
© Omega Diagnostics Ltd., 2010. POLISH.



OMEGA DIAGNOSTICS LTD
Omega House, Hillfoots Business Village
Alva, FK12 5DQ, Scotland, United Kingdom
odl@omegadiagnostics.co.uk
www.omegadiagnostics.com
AN ISO 9001 & 13485 CERTIFIED COMPANY