



Progesterone ELISA

IVD



REF

DEM-DE1561



96 wells

08/07

Contents / Inhaltsverzeichnis / Contenuti / Contenido / Contenu

1	INTRODUZIONE	18
2	PRINCIPIO DEL TEST	18
3	PRECAUZIONI	18
4	COMPONENTI DEL KIT	19
5	CAMPIONI.....	20
6	ATTUAZIONE DEL TEST	20
7	VALORI NORMALI	22
8	CONTROLLO QUALITÀ	22
9	CARATTERISTICHE DEL TEST	22
10	LIMITAZIONE DEL TEST	23
11	ASPETTI LEGALI	23
12	BIBLIOGRAFIA.....	23

1 INTRODUZIONE

Il test immuno-enzimatico **DEMEDIATEC Progesterone** contiene materiale per la determinazione quantitativa di Progesterone in siero e plasma.

Questo test kit è adatto soltanto per l'uso diagnostico.

2 PRINCIPIO DEL TEST

Il test Progesterone ELISA è un test immunologico in fase solida con enzimi ancorati su un substrato (ELISA), basato sul principio del legame competitivo.

I micropozzetti sono ricoperti con un anticorpo policlonale diretto contro un unico sito antigenico della molecola Progesterone. Progesterone endogena di un campione compete con il Progesterone coniugato alla perossidasi di rafano per il sito di legame sull'anticorpo ancorato nel micropozzo. Dopo l'incubazione il coniugato non legato è lavato via.

La quantità della perossidasi coniugata legata è inversamente proporzionale alla concentrazione di Progesterone nel campione. Dopo l'aggiunta della soluzione substrato l'intensità del colore sviluppato è inversamente proporzionale alla concentrazione di Progesterone nel campione del paziente.

3 PRECAUZIONI

- Questo kit è adatto soltanto per l'uso diagnostico in vitro.
- Informazioni su sostanze pericolose contenute nel kit sono riportate nel regolamento di sicurezza.
- Tutti i componenti del kit che contengono siero o plasma umano sono controllati e confermati negativi per la presenza di HIV I/II, HbsAg e HCV con metodi conformi alle norme FDA. Ciononostante tutti i componenti dovrebbero essere trattati come potenziali sostanze nocive nella manutenzione e nello smaltimento.
- Il contatto con la soluzione stop dovrebbe essere evitato perché contiene 0.5 M H₂SO₄. L'acido solforico può provocare irritazioni cutanee e ustioni.
- Non pipettare con la bocca ed evitare il contatto con componenti del kit con la pelle o con le mucose.
- Nelle aree in cui il test viene utilizzato non fumare, mangiare, bere o fare uso di prodotti cosmetici.
- Nella manutenzione dei campioni o reagenti del kit portare guanti di latex monouso. La contaminazione dei reagenti o dei campioni con microbi può dare risultati falsi.
- L'utilizzo dovrebbe avvenire secondo regole che seguono le rispettive norme di sicurezza nazionali sulle sostanze nocive.
- Non utilizzare i reagenti dopo la scadenza indicata sul kit.
- Ogni indicazione sulla quantità indicata del protocollo del kit deve essere accuratamente seguito. Risultati ottimali possono essere ottenuti soltanto con l'uso di pipette calibrate e spettrofotometro calibrato.
- Componenti del kit con numeri di lotto diversi non devono essere combinati. È consigliabile di non utilizzare pozzetti di piastre diversi, anche se si tratta dello stesso lotto. I kit potrebbero essere stati magazzinati o spediti a condizioni diverse, cosicché le caratteristiche di legame potrebbero divergere leggermente.
- I componenti chimici e reagenti preparati o già utilizzati devono essere trattati e smaltiti secondo le norme di sicurezza nazionali sulle sostanze nocive.
- I regolamenti di sicurezza di questo prodotto possono essere richiesti direttamente dalla ditta Demeditec Diagnostics GmbH. I regolamenti di sicurezza corrispondono alle norme EU 91/155 EC.

4 COMPONENTI DEL KIT

4.1 Contenuto del kit

1. **Microtiterwells** (Micropozzetti), 12x8 file (separatamente staccabili), 96 pozzetti. pozzetti ricoperti con l'anti-Progesterone anticorpo policlonale.
2. **Standard (Standard 0-6)**, 7 flaconi, 1 mL, pronto all'uso;
Concentrazioni: 0; 0.3; 1.25; 2.5; 5; 15; 40 ng/mL;
Conversione: 1 ng/mL = 3.18 nmol/l;
Contiene 0.03% Proclin 300 + 0,005% gentamicin sulfate come conservante.
3. **Enzyme Conjugate** (Tracciante enzimatico), 1 flacone, 25 mL, pronto all'uso, Progesterone coniugato alla perossidasi di rafano;
* Contiene 0,03% Proclin 300, 0,015% BND e 0,010% MIT come conservante.
4. **Substrate Solution** (Soluzione di substrato), 1 flacone, 25 mL, pronto all'uso, TMB (benzidine tetrametilico).
5. **Stop Solution** (Soluzione d'arresto), 1 flacone, 14 mL, pronto all'uso, contiene 1 N acidic solution.
Evitare il contatto con la soluzione d'arresto. Può causare irritazioni cutanee e ustioni.
6. **Wash Solution** (Soluzione di lavaggio), 1 flacone, 30 mL (concentrata 40X), vedi „preparazione dei reagenti“

- * BND = 5-bromo-5-nitro-1,3-dioxane
MIT = 2-methyl-2H-isothiazol-3-one

Nota: Ulteriore *Standard 0* per la diluizione dei campioni può essere richiesto alla ditta.

4.1.1 Materiali richiesti ma non contenuti nel kit

- Uno spettrofotometro calibrato per micropozzetti (450±10 nm)
- Micropipette calibrate di precisione a volume variabile.
- Carta assorbente.
- Acqua distillata.

4.2 Magazzinaggio e stabilità del kit

A 2-8 °C i reagenti non aperti rimangono reattivi fino alla data di scadenza indicata. Non usare reagenti oltre questa data.

Tutti i reagenti aperti devono essere magazzinati a 2-8 °C. I micropozzetti devono essere magazzinati a 2-8 °C. Una volta aperti i pacchi, questi devono essere richiusi accuratamente.

Test kits aperti rimangono attivi per due mesi se magazzinati alle condizioni sopra descritte.

4.3 Preparazione dei reagenti

Prima dell'uso portare tutti i reagenti e il numero necessario di pozzetti a temperatura ambiente.

Wash Solution

Diluire 30 mL della soluzione di lavaggio concentrata con 1170 mL di acqua deionizzata fino ad un volume finale di 1200 mL.

La soluzione di lavaggio diluita è stabile per 2 settimane a temperatura ambiente.

4.4 Smaltimento del kit

Lo smaltimento del kit deve avvenire secondo le regole a norma di legge. Informazioni particolareggiate per questo prodotto si trovano nel regolamento di sicurezza, capitolo 13.

4.5 Test kits danneggiati

Nel caso di gravi danneggiamenti del kit o dei suoi componenti deve avvenire una dichiarazione scritta alla ditta DEMEDITEC, al più tardi una settimana dopo il ricevimento del kit. Componenti danneggiati non dovrebbero essere utilizzati per il test. Questi componenti devono essere magazzinati fino alla soluzione del problema. Dopo di che essi devono essere smaltiti secondo le norme ufficiali.

5 CAMPIONI

Siero o plasma (EDTA-, Eparina- or citrate plasma) può essere usato per questo test.

Non usare campioni emolitici, itterici o lipemici.

Attenzione: Se i campioni contengono sodio azide non devono essere utilizzati per questo test.

5.1 Collezione dei campioni

Siero:

Collezionare sangue tramite puntura venale (p.es. Sarstedt Monovette # 02.1388.001), far coagulare e separare il siero centrifugando a temperatura ambiente.

Non centrifugare prima che la coagulazione sia completata. Campioni di pazienti con una terapia anticoagulante possono richiedere più tempo per la coagulazione.

Plasma:

Il sangue dovrebbe essere collezionato in tubetti da centrifuga contenenti un anticoagulante e centrifugando immediatamente dopo la puntura.

(P.es. per EDTA plasma Sarstedt Monovette – red cap - # 02.166.001; per eparina plasma Sarstedt Monovette – orange cap - # 02.165.001; per citrate plasma Sarstedt Monovette – green cap - # 02.167.001.)

5.2 Magazzinaggio dei campioni

I campioni dovrebbero essere magazzinati ben chiusi fino a 24 ore a 2-8 °C.

Campioni magazzinati per un periodo più lungo dovrebbero essere congelati solo una volta a -20 °C prima dell'analisi. Congelare soltanto una volta. Invertire campioni scongelati alcune volte prima dell'uso.

5.3 Diluizione dei campioni

Se in un campione di siero viene trovata una concentrazione oltre lo standard più alto, questo campione può essere diluito 10 o 100 volte con lo Standard 0 e nuovamente determinato.

Della diluizione deve essere però tenuto conto.

Esempio:

- a) diluizione 1:10: 10 µL siero + 90 µL *Standard 0* (agitare bene)
- b) diluizione 1:100: 10 µL della diluizione a) + 90 µL *Standard 0* (agitare bene).

6 ATTUAZIONE DEL TEST

6.1 Indicazioni generali

- Tutti i reagenti e i campioni devono essere portati a temperatura ambiente e ben mescolati prima dell'uso. Evitare la formazione di schiume.
- Una volta iniziato il procedimento del test, questo deve essere portato alla fine senza interruzione.
- Per ogni componente, standard, controllo o campione è necessario utilizzare una nuova punta monouso per evitare reazioni incrociate.
- La densità ottica dipende dal tempo d'incubazione e dalla temperatura. Perciò si rende necessario di preparare tutti i reagenti, di aprire i tappi dei flaconi e di appostare tutti i pozzetti nelle appropriate posizioni. Soltanto una tale preparazione garantisce gli stessi tempi per ogni processo di pipettamento.
- Come regola generale vale che la reazione enzimatica si svolge linearmente proporzionale con il tempo e con la temperatura.

6.2 Esecuzione del test

Ogni analisi deve includere una curva standard.

1. Fissare i pozzetti necessari sul supporto.
2. Pipettare **25 µL** di ogni Standard, controllo e campione nei pozzetti, cambiando ogni volta la punta monouso.
3. Incubare per **5 minuti** a temperatura ambiente.
4. Pipettare **200 µL** Enzyme Conjugate in ogni pozzetto. Agitare bene per 10 secondi. È molto importante raggiungere un completo mescolamento.
5. Incubare per **60 minuti** a temperatura ambiente
6. Rovesciare la piastra per vuotare i pozzetti. Lavare i pozzetti 3 volte con soluzione di lavaggio diluita (400 µL in ogni pozzetto). Rimuovere le gocce d'acqua rimanenti rivoltando la piastra su carta assorbente.

Importante:

La sensibilità e la precisazione di questo kit sono fortemente influenzate dal corretto esecuzione del lavaggio!

7. Aggiungere **200 µL** della Substrate Solution ad ogni pozzetto.
8. Incubare per **15 minuti** a temperatura ambiente.
9. Fermare la reazione enzimatica aggiungendo **100 µL** della Stop Solution ad ogni pozzetto.
10. Determinare la densità ottica a **450 ± 10 nm** con un fotometro per microtiter-piastre **entro 10 minuti** dopo l'aggiunta della Stop Solution.

6.3 Rilevamento dei risultati

1. Determinare i valori medi della densità ottica per ogni set di standard, controlli e campioni.
2. Costruire una curva standard: riportare i valori medi della densità ottica (OD) di ogni standard contro la rispettiva concentrazione dove i valori delle OD si devono trovare sull'asse verticale (Y) e le concentrazioni sull'asse orizzontale (X).
3. Utilizzando il valore medio delle OD per ogni campione si determina la rispettiva concentrazione dalla curva standard.
4. Metodo automatico: I risultati in IFU sono stati calcolati automaticamente usando un (fitting) avvicinamento con il 4 PL (4 Parameter Logistics). Altri funzioni usati per l'elaborazioni dei dati possono dare risultati leggermente differenti
5. La concentrazione dei campioni può essere determinata direttamente dalla curva standard. Campioni con una concentrazione più elevata dello standard più concentrato devono essere diluiti. Di questo fattore di diluizione deve essere tenuto conto per il calcolo della concentrazione.

6.3.1 Esempio di una curva standard

In seguito è riportato un esempio di una curva standard con DEMEDITEC ELISA.

Standard	Densità ottiche (450 nm)
Standard 0 (0 ng/mL)	1,52
Standard 1 (0.3 ng/mL)	1,17
Standard 2 (1.25 ng/mL)	0,88
Standard 3 (2.5 ng/mL)	0,69
Standard 4 (5.0 ng/mL)	0,55
Standard 5 (15 ng/mL)	0,35
Standard 6 (40 ng/mL)	0,13

7 VALORI NORMALI

È consigliabile che ogni laboratorio determini i propri valori normali e anormali.

In uno studio condotto su persone apparentemente sane usando il test DEMEDITEC Progesterone ELISA i seguenti valori sono stati ottenuti:

Donne

Fase follicolare	0,2 - 1,4 ng/mL
Fase luteale	4 - 25 ng/mL
Menopausa	0,1 - 1 ng/mL

Uomini 0,1 - 1 ng/mL

8 CONTROLLO QUALITÀ

È consigliabile utilizzare i campioni controllo secondo le norme di legge. Attraverso l'utilizzo dei campioni controllo si può raggiungere una verifica dei risultati giorno per giorno. Dovrebbero essere adoperati campioni controllo sia con un livello normale sia con uno patologico.

Le referenze con i rispettivi risultati del laboratorio QC sono elencati nel QC certificato, che è allegato al kit. I valori riportati nel QC certificato si riferiscono al lotto del kit attuale e dovrebbero essere utilizzati per un raffronto dei risultati.

È altresì consigliabile di partecipare a programmi di sicurezza sulla qualità nazionali o internazionali, per assicurarsi dell'esattezza dei risultati.

Appropriati metodi statistici per l'analisi dei valori controllo e delle rappresentazioni grafici dovrebbero essere adoperati. Nel caso che i risultati del test non combaciano con il campo di accettazione indicato dal materiale di controllo, i risultati dei pazienti devono essere considerati invalidi. In questo caso si prega di controllare i seguenti fattori d'errore: pipette, cronometri, fotometro, data di scadenza dei reagenti, condizione di magazzino e d'incubazione, metodi di aspirazione e di lavaggio.

Se dopo il controllo dei suddetti fattori non è rilevabile alcun errore, si prega di contattare il fornitore o direttamente la ditta DEMEDITEC.

9 CARATTERISTICHE DEL TEST

9.1 Assay Dynamic Range

Le concentrazioni determinabili con questo test stanno tra 0 – 40 ng/mL.

9.2 Specificità degli anticorpi (reazioni ad incrocio)

I seguenti reagenti sono stati testati per la loro capacità di dare reazioni incrociate con questo test:

Steroid	Reattività ad incrocio (%)
Progesterone	100,00
17 α OH Progesterone	0,30
Estriolo	< 0,10
Estradiolo 17 β	< 0,10
Testosterone	< 0,10
11-Desoxycorticosterone	1,10
DHEA-S	< 0,02
Cortisol	< 0,02
Corticosterone	0,20
Pregnenolone	0,35
Cortison	< 0,10
11-Desoxycortisol	0,10

9.3 Sensitività analitica

La sensitività analitica è stata calcolata dai valori medi meno due deviazioni standard di venti (20) repliche dello *Standard 0* ed erano 0,045 ng/mL.

9.4 Precisione

Per dettagli più precisi consultare la metodica in inglese.

9.5 Ritrovato

Per dettagli più precisi consultare la metodica in inglese.

9.6 Linearità

Per dettagli più precisi consultare la metodica in inglese.

10 LIMITAZIONE DEL TEST

10.1 Sostanze interferenti

Ogni manutenzione impropria dei campioni o modificazione del protocollo può influenzare i risultati. Emoglobina (fino a 4 mg/mL), bilirubina (fino a 0,5 mg/mL) e trigliceridi (fino a 1,8 mg/mL) non influenzano i risultati di questo test.

10.2 Droghe interferenti

Fino ad oggi nessuna sostanza (farmaco) è conosciuta a noi che abbia influenzato la determinazione di Progesterone nel campione.

10.3 Effetto Hook di alti dosaggi

Nessun effetto gancio (effetto hook) è stato osservato in questo test.

11 ASPETTI LEGALI

11.1 Affidabilità dei risultati

Il test deve essere eseguito esattamente secondo il protocollo dato dal produttore. Inoltre l'utente deve seguire le regole del GLP (Good Laboratory Practice) o eventualmente altre regole comportamentali o disposizioni legali. Questo vale soprattutto per l'uso delle referenze. È molto importante utilizzare un numero appropriato di referenze in parallelo ai campioni test per poter controllare l'esattezza e la precisione del test. I risultati del test sono validi soltanto se tutte le referenze cadono nei margini prestabiliti e se tutti gli altri parametri del test soddisfano la specificazione per questo test. Se esistono dubbi o domande su questi risultati, si prega di contattare la ditta DEMEDITEC.

11.2 Conseguenze terapeutiche

Soltanto sulla base dei risultati dei laboratori non dovrebbero essere intraprese delle conseguenze terapeutiche di alcun tipo, anche se i risultati del test sono d'accordo con gli aspetti articolati nel punto 11.1. Ogni risultato di laboratorio è soltanto una parte di un quadro clinico completo di un paziente.

Soltanto in casi in cui i risultati di un test del laboratorio si accordano con il quadro clinico dell'ammalato, si possono intraprendere delle conseguenze terapeutiche.

Il risultato del test da solo non è base sufficiente per lo stabilimento di una terapia.

11.3 Responsabilità legali

Ogni cambiamento del protocollo del test e/o lo scambio o il mescolamento di componenti provenienti da cariche diverse possono influenzare negativamente i risultati e compromettere la validità del test. Questi cambiamenti e/o scambi annullano ogni diritto al risarcimento.

Si respingano inoltre tutti i richiami risultanti da interpretazioni sbagliate da parte dell'utente secondo il paragrafo 11.2. Nel caso di reclamazione, la garanzia del produttore è limitato al valore massimo del test kit. Ogni danno provocato durante il trasporto del kit non sottostà alla responsabilità del produttore.

12 BIBLIOGRAFIA

Per dettagli più precisi consultare la metodica in inglese.

Li StarFish distribuisce: