

INSTRUÇÕES DE USO

PROGESTERONA ELISA

Teste de ELISA para a Determinação Quantitativa de Progesterona em Soro ou Plasma Humano.

Reagentes suficientes para 96 determinações

1. SUMÁRIO

A Progesterona é o primeiro composto biologicamente ativo na via de biossíntese dos esteróides e é formada no córtex adrenal, nos testículos, nos ovários e na unidade feto-placentária das mulheres. O LH regula a síntese e secreção da Progesterona a partir do corpo lúteo. Os níveis máximos do hormônio são alcançados entre 5 a 8 dias após a ovulação, decrescendo para níveis de fase folicular antes da próxima menstruação, caso não haja implantação do óvulo. Se ocorrer implantação, os níveis da Progesterona mantêm-se elevados e aumentam progressivamente ao longo da gravidez. Tanto na gravidez normal quanto na ectópica, os níveis do hormônio apresentam-se elevados, assim como na hiperplasia adrenal congênita e em alguns carcinomas adrenais e ovarianos. O nível do hormônio encontra-se diminuído na amenorréia e agenesia gonadal.

A principal função da Progesterona é preparar o útero para a implantação do óvulo e para a manutenção da gravidez nos primeiros meses, atuando também em conjunto com a Prolactina no preparo dos seios para a lactação.

A determinação dos níveis de Progesterona é útil para monitorar o funcionamento dos ovários, confirmar a ovulação, avaliar as deficiências da fase lútea e verificar a eficácia dos procedimentos utilizados para a indução da ovulação. As dosagens de Progesterona no soro ou plasma também são usadas para monitorar terapia de reposição hormonal e para avaliar os riscos de aborto espontâneo no início da gravidez.

2. PRINCÍPIO

Neste método, os padrões da curva e as amostras de soro ou plasma em análise são adicionados aos respectivos poços da microplaca que foram previamente recobertos por anticorpos anti-Progesterona. A Progesterona presente na amostra e nos padrões da curva, compete com a Progesterona conjugada à enzima peroxidase, pelas ligações aos anticorpos anti-Progesterona imobilizados na microplaca. Após a etapa de incubação, o excesso da Progesterona não-imobilizada é eliminado na etapa de lavagem e o substrato enzimático é então adicionado. A hidrólise do substrato pela peroxidase gera uma reação de cor azul. Esta, por sua vez, torna-se amarela após a adição da solução de parada. A intensidade da cor, cuja absorbância é lida a 450 nm, é inversamente proporcional à quantidade de Progesterona presente na amostra biológica. Através da construção de uma curva-padrão é possível determinar quantitativamente a concentração do hormônio em amostras de soro ou plasma humano.

Tempo total de incubação: 1 hora e 15 minutos.

3. COMPONENTES DO KIT

- a. **MICROPLACA:** 1 placa contendo 12 tiras com 8 poços cada, recobertos por anticorpos monoclonais anti-Progesterona. Embalagem selada contendo dessecante
Pronto para uso
- b. **PADRÕES DA CURVA:** 1 mL de soro humano diluído em solução protéica tamponada contendo Progesterona nas concentrações:
PADRÃO A: 0,0 ng/mL PADRÃO C: 1,0 ng/mL PADRÃO E: 40,0 ng/mL
PADRÃO B: 0,2 ng/mL PADRÃO D: 8,0 ng/mL
Prontos para uso

- c. **CONJUGADO:** 6 mL de solução tampão contendo Progesterona conjugados à peroxidase. Contêm estabilizantes e conservantes.
Pronto para uso
- d. **SUBSTRATO:** 12 mL de solução tamponada de tetrametilbenzidina (TMB) estabilizada e peróxido de hidrogênio (H₂O₂).
Pronto para uso
- e. **SOLUÇÃO DE PARADA 0,15 M:** 12 mL de solução de ácido sulfúrico (H₂SO₄) 0,15 M.
Pronto para uso
- f. **FOLHAS ADESIVAS:** 2 unidades.
- g. **MANUAL DE INSTRUÇÕES DE USO**

4. ARMAZENAMENTO

- Os reagentes e a Microplaca, na embalagem original inviolada, são estáveis até a data de validade determinada na etiqueta, se conservados entre +2 e +8 °C.
- As tiras não-utilizadas da Microplaca devem ser mantidas na embalagem original selada contendo o dessecante para a sua proteção contra a umidade e a luz.
- Não expor os reagentes à luz solar ou à luz forte durante o armazenamento ou utilização. Manter o Substrato sempre ao abrigo da luz.

5. MATERIAIS NECESSÁRIOS NÃO-INCLUÍDOS NO KIT

- Água deionizada.
- Micropipetas calibradas e suas respectivas ponteiros descartáveis.
- Agitador tipo vórtex e papel absorvente.
- Cronômetro.
- Sistema de lavagem de placas manual ou automático com capacidade para 300 µL.
- Leitora de microplacas com filtros a 450 nm e, se possível, a 620-630 nm.

6. PRECAUÇÕES DE USO

O kit de **PROGESTERONA ELISA** é somente para o uso em **DIAGNÓSTICO *IN VITRO***

MATERIAIS POTENCIALMENTE INFECCIOSOS

- Os Padrões da Curva, contendo componentes de natureza humana, foram testados e determinados como não-reativos para HBsAg, para os anticorpos contra HCV e HIV. Apesar disto, não há nenhum método de teste que possa oferecer completa confiabilidade para ausência do vírus HIV, da Hepatite B ou de outros agentes infecciosos. Portanto, estes reagentes devem ser manipulados como materiais potencialmente infecciosos.
- Precauções devem ser adotadas ao coletar, armazenar e manipular as amostras biológicas.
- Usar luvas. Não pipetar com a boca. Não fumar, comer ou beber em áreas onde amostras ou reagentes do kit estiverem sendo manuseados.
- Não utilizar o produto após a data de validade.
- Evitar o contato do Substrato com agentes oxidantes ou superfícies metálicas, através da utilização de recipientes plásticos descartáveis limpos ou estéreis.
- Manusear a solução de ácido sulfúrico (Solução de Parada) com cautela. Se houver contato com olhos e pele, lavar com água em abundância e procurar orientação médica.
- Os restos de amostras, reagentes e líquido de descarte devem ser descontaminados com solução desinfetante, tal como hipoclorito de sódio 5%, antes de serem desprezados.

- Para descartar os reagentes e o material biológico sugerimos aplicar as normas locais, estaduais e federais de proteção ambiental. Maiores informações, consultar as FISPQ dos produtos obtidas pelo e-mail sac@btbiotec.com.br ou pelo telefone (11) 5093.2288.

7. COLETA E PREPARO DA AMOSTRA

- Coletar as amostras de sangue e processá-las imediatamente para obtenção de soros ou plasmas sem hemólise. Para a coleta do plasma, utilizar o anticoagulante EDTA ou Heparina.
- As amostras de soros ou plasmas hemolisados, ictericos, lipêmicos ou com contaminação microbiológica, não devem ser utilizadas pois podem gerar resultados falsos.
- As amostras biológicas que não foram processadas no mesmo dia da coleta devem ser refrigeradas de +2 a +8° C por até 5 dias ou congeladas a -20° C por até 30 dias. Evitar ciclos repetidos de congelamento e descongelamento das amostras.
- Se após a refrigeração ou congelamento, as amostras apresentarem restos de fibrina, centrifugá-las anteriormente ao uso.

8. PROCEDIMENTO

Operações Prévias

- Antes da realização do teste, estabilizar todos os componentes do kit e amostras à temperatura ambiente (+15 a +30°C) e homogeneizá-los suavemente.
- Deixar que a Microplaca atinja a temperatura ambiente (+15 a +30°C) antes de abrir a sua embalagem. Separar somente as tiras necessárias à realização do teste, mantendo as restantes na embalagem contendo o dessecante. Retirar o ar da embalagem e fechá-la hermeticamente.
- Montar o protocolo de identificação e orientação de aplicação das amostras e dos Padrões da Curva na placa onde será realizada a análise. Reservar dois poços para o preparo do Branco e para dispensar os Padrões da Curva e as amostras biológicas EM DUPLICATA.
Exemplo: Poço A1 e B1 para o Branco, C1 e D1 para o *Padrão A*, E1 e F1 para o *Padrão B*, G1 e H1 para o *Padrão C*, A2 e B2 para o *Padrão D*, C2 e D2 para o *Padrão E*, a partir do poço E2 para as amostras.

Realização do Teste

- Dispensar 50 µL dos Padrões da Curva e amostras biológicas nos respectivos poços da Microplaca (em duplicata).
- Adicionar 50 µL do Conjugado em cada poço da Microplaca, exceto nos poços A1 e B1 do Branco.
- Agitar a placa gentilmente por 20 a 30 segundos para a sua homogeneização. **Cobrir os poços com a folha adesiva e incubar a placa por 1 hora a+ 37°C.**
- Descartar o conteúdo de todos os poços por aspiração ou decantação. Adicionar 300 µL de água deionizada, aspirar ou decantar o líquido e repetir o processo mais 2 vezes (total de 3 lavagens). Esta etapa deve ser realizada adequadamente para garantir resultados confiáveis e precisos. Remover o fluido restante, batendo vigorosamente a placa invertida sobre folhas de papel absorvente. Se a remoção do líquido for feita por decantação, a placa deve ser seca em papel absorvente a cada lavagem.
- Dispensar 100 µL do Substrato em todos os poços (inclusive no Branco) e agitar a placa gentilmente por 20 a 30 segundos para a sua homogeneização. **Cobrir novamente os poços com a folha adesiva e incubar a placa por, exatamente, 15 minutos à temperatura ambiente (+15 a +30°C) e ao abrigo da luz.**
- Adicionar 100 µL da Solução de Parada em todos os poços (inclusive no Branco), na mesma seqüência de adição dos reagentes. Agitar a placa gentilmente por 15 a 20 segundos para a sua homogeneização.
- Ler a absorbância a 450 nm com o leitor de ELISA em, no máximo, 30 minutos. Usar os poços A1 e B1 como “Branco” para zerar o aparelho ou, quando isso não for possível, descontar o valor do “Branco” de todos os valores medidos.

9. CONTROLE DE QUALIDADE

- A cada ensaio é necessário repetir a curva-padrão. Se mais de uma placa for usada, cada uma deve ter sua própria curva-padrão.
- Para monitorar a performance do teste é aconselhável incluir controles internos. Estes controles devem ser tratados como as demais amostras e seus valores devem ser determinados a cada ensaio.
- É aconselhável manter os registros de Controle de Qualidade para monitorar a performance dos reagentes em uso. Testes estatísticos adequados devem ser utilizados para verificar a reprodutibilidade dos ensaios. Diferenças significativas podem indicar alterações inobservadas nas condições experimentais ou a degradação dos reagentes do kit. Reagentes novos devem ser usados para determinar a causa das variações.

10. CÁLCULO DOS RESULTADOS

Através da construção de uma curva dose-resposta (curva-padrão) usando os Padrões fornecidos no kit, é possível calcular a concentração de Progesterona nas amostras testadas. Isso pode ser feito com auxílio de qualquer programa de computador que faça gráfico, ou manualmente, em papel milimetrado.

- a. Registrar em uma tabela os valores de absorvância a 450 nm para cada poço correspondente aos Padrões da Curva e amostras biológicas. Calcular o **Valor Médio (VM)** das absorvâncias das duplicatas através da fórmula:

$$VM = \frac{(Abs1 + Abs2)}{2}$$

- b. Para construir a curva-padrão, utilizar os valores de absorvância de cada duplicata dos Padrões da Curva e não o valor médio das duplicatas.
- c. Plotar em um gráfico as absorvâncias das duplicatas dos Padrões da Curva (eixo Y vertical) em função da concentração de Progesterona correspondente (eixo X horizontal). Estabelecer o melhor traçado para a curva-padrão.
- d. Determinar a concentração de Progesterona (em ng/mL) para cada amostra biológica, projetando a absorvância média das duplicatas sobre a curva-padrão.

11. VALORES DE REFERÊNCIA

Os valores de referência para Progesterona em soro ou plasma humano são:

Mulheres em Gravidez	
Semanas	Progesterona (ng/mL)
18 – 21	53 – 76
22 – 25	60 – 86
26 – 29	71 – 133
30 – 33	86 – 142
34 – 37	104 – 175
38 – 41	117 – 187

Mulheres	
	Progesterona (ng/mL)
Fase folicular	0,1 – 1,4
Fase luteínica	4,0 – 25,0
Menopausa	< 1,0

	Progesterona (ng/mL)
Homens	< 1,0

12. LIMITAÇÕES DO PROCEDIMENTO

Performance do Ensaio

- Amostras com contaminação microbiológica, lipêmicas, ictericas ou hemolisadas podem causar resultados duvidosos, portanto, não devem ser utilizadas.

- Os componentes do kit devem estar límpidos e dentro do prazo de validade.
- Não devem ser utilizados componentes de diferentes lotes ou reagentes de outros fabricantes.
- Evitar a contaminação cruzada entre amostras e entre reagentes do kit.
- Para que os resultados sejam reprodutíveis, as instruções fornecidas devem ser rigorosamente seguidas, respeitando os limites de tempo e temperatura das incubações.
- A pipetagem deve ser precisa, evitando diferenças entre as duplicatas. Para que não ocorram variações significativas nos tempos de incubação, a pipetagem das amostras não deve exceder a 10 minutos e a adição dos reagentes deve ser efetuada sempre na mesma seqüência.
- Falhas nos procedimentos de lavagem podem levar a resultados inválidos.
- A leitora de microplacas mede a absorbância no sentido vertical. Deve-se, portanto, evitar tocar o fundo dos poços.
- Em caso de dúvidas, entrar em contato com o Serviço de Atendimento ao Cliente (SAC) através do telefone (11) 5093.2288 ou do e-mail sac@btbiotec.com.br, tendo em mãos o nome e código do produto, bem como o número de lote impresso em cada um dos componentes do kit.

Interpretação

- O resultado obtido utilizando este kit é auxiliar ao diagnóstico clínico e deve ser interpretado associando-se ao histórico clínico dos pacientes, achados clínicos e outros procedimentos de diagnóstico.
- Cada laboratório deve estabelecer seus próprios critérios para interpretação dos resultados, baseando-se na população em estudo.
- Este método permite a determinação de Progesterona humana em amostras biológicas que possuam um intervalo de concentração entre 0,2 a 40,0 ng/mL. Caso sejam quantificados valores superiores de Progesterona, por exemplo no caso de gravidez, diluir a amostra e considerar o fator de diluição durante o cálculo do resultado.
- O significado clínico da determinação da Progesterona pode se tornar inválido se o paciente estiver em tratamento com cortisona ou hormônios esteroidais naturais ou sintéticos.

13. CARACTERÍSTICAS DE DESEMPENHO

Sensibilidade

O produto PROGESTERONA ELISA possui uma sensibilidade de 2 pg (picogramas) ou 0,04 ng/mL de Progesterona na amostra biológica. O limite mínimo detectável foi determinado pela variabilidade do Padrão A, utilizando-se dois desvios-padrão (intervalo de confiança de 95%).

Especificidade

A possibilidade de ocorrência de reação cruzada do anticorpo anti-Progesterona foi calculada como a razão entre a dose da substância interferente e a dose de Progesterona necessária para obter-se a mesma absorbância. Em valores percentuais, quanto mais aproximado de 100%, maior é a possibilidade da ocorrência da reatividade cruzada.

Substância	Reatividade Cruzada	Substância	Reatividade Cruzada
Progesterona	100 %	Estradiol	$< 1 \times 10^{-2}$ %
11 α -OH Progesterona	18 %	Testosterona	$< 1 \times 10^{-2}$ %
17 α -OH Progesterona	16 %	Cortisol	$< 1 \times 10^{-3}$ %
20 α -OH Progesterona	1 %	Colesterol	$< 1 \times 10^{-2}$ %

Precisão

Para determinar a precisão inter e intra-análise, foram testados *pool* de soros-controle com diferentes níveis de Progesterona. Observou-se um coeficiente de variação de 2,9% e 4,8% respectivamente.

Análise Comparativa

O produto PROGESTERONA ELISA foi comparado a um outro análogo disponível para comercialização no mercado que utiliza a metodologia de Radioimunoensaio. Foram utilizadas amostras biológicas (N = 25) contendo diferentes níveis de Progesterona. A Equação de Regressão e o Coeficiente de Correlação apresentados na tabela abaixo, indicam o alto grau de concordância entre os métodos.

Equação de Regressão	Coeficiente de Correlação
$y = - 0,226 + 0,965 (x)$	0,996

14. GARANTIA DA QUALIDADE

Antes de serem liberados para o consumo, todos os produtos da BTI Bio Tecnologia Industrial Ltda são testados pelo Laboratório de Controle de Qualidade. A qualidade dos produtos é assegurada até a data de validade mencionada na embalagem de apresentação, desde que armazenados e transportados nas condições adequadas.

15. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- a. Wisdom, G.B. Clin. Chem. 22/8 1243 - 1255 (1976)
- b. De Villa, G.O. et al. J.Clin. Endoc. Metob. 35,458 (1972).
- c. Hubl, W., Fehert, T., Ronde, W., Dormer, G., Taubert, H.H., Freymann, E. Endokrinologie, 1982, 79 (2), 165
- d. Arakawa, H., Maeda, M., Tsuji, A. Chem. Pharm. Bull. Tokyo (1982) 30 8, 3036
- e. D. Riad - Fanny, G.F. Read, R.F. Walker and K. Griffiths. Endocr. Reviews, vol. 3 N° 4 (1982) 304 367.

VSG

Código: IU 03/062 Versão: 01 Data de Revisão: 30/07/2008
--

FABRICADO POR: BTI – Bio Tecnologia Industrial Ltda CNPJ: 03.654.699/0001-00 SAC (11) 5093 2288 – sac@btibiotec.com.br Av. José Cândido da Silveira 2100 – sls 08, 10 e 18 - Horto Cep: 31.170-000 - Belo Horizonte – MG – Brasil Resp. Técnico: Dr. Luiz Eduardo De Nicola - CRBM 1452.

Registro na ANVISA: 8004957.0193
