

Especificidad

El antisuero utilizado en el ensayo es muy específico para la detección de 17 α -OH Progesterona. Los siguientes esteroides naturales fueron examinados para la reactividad cruzada.

Compuesto	Concentración (ng/mL)	% Reactividad cruzada
Estrona	10	0.10
Estradiol	40	0.02
Estriol	400	0.02
Progesterona	400	0.30
Cortisol	8000	0.01
Testosterona	200	0.01
Androstenediona	1000	0.01
DHEA-S	100000	0.00

Adición y Recuperación

Tres sueros de pacientes fueron adicionados con cantidades conocidas de 17-OHP y ensayados con adición y sin éstas por duplicados en el mismo ensayo. Los resultados fueron los siguientes:

17-OHP (ng/mL)	17-OHP Adicionado(ng/mL)	Valor Esperado (ng/mL)	Valor Medido (ng/mL)	Recuperación (%)
0.62	9.0	9.62	9.51	99
	7.0	7.62	8.27	109
	5.0	5.62	5.47	97

2016-10-13



17-OH PROGESTERONA ELISA

No. de Producto: PG338S (96 Pruebas)

USO INDICADO

El kit ELISA de 17- hidroxiprogesterona (17-OHP) está destinado a la determinación cuantitativa de 17- OHP en suero.

PRINCIPIO DE LA PRUEBA

La prueba de 17 α -OH Progesterona (17-OHP) se basa en el principio de unión competitiva entre la 17- OHP en la muestra de ensayo y la 17-OHP-HRP por una cantidad constante de anticuerpos de conejo anti-17-OHP. En el ensayo, los pozos recubiertos con IgG anti-conejo de cabra se incuban con 25 μ l de estándares de 17-OHP, 50 μ l de conjugado 17-OHP-HRP y 50 μ l de anti-17-OHP de conejo. La 17-OHP marcada con HRP compete con la 17-OHP en el estándar y en la muestra por un número fijo de sitios de unión del anticuerpo específico anti-17-OHP. Por lo tanto, la cantidad de 17-OHP peroxidasa conjugada inmunológicamente unida al pozo disminuye progresivamente a medida que aumenta la concentración de 17- OHP en la muestra. La 17-OHP sin unir se elimina en el proceso de lavado. Se añade el sustrato TMB, lo que resulta en el desarrollo del color azul. El desarrollo del color se detiene con la adición de la solución stop y la absorbancia se mide espectrofotométricamente a 450 nm. Se prepara una curva estándar relacionada con la intensidad del color con la concentración de 17-OHP.

MATERIALES PROPORCIONADOS	96 Pruebas
1. Micropocillos recubiertos con anti-conejo de cabra IgG	12x8x1
2. Estándares de 17-OHP: 6 viales (listos para usar)	0.5 ml
3. Reactivo de anticuerpo 17-OHP: 1 frasco (listo para usar)	7 ml
4. Diluyente de ensayo 17-OHP: 1 botella	7 ml
5. 17-OHP 20X Conjugado enzimático: 1 vial	0.45 ml
6. Sustrato TMB: 1 botella (lista para usar)	12 ml
7. Solución Stop: botella (lista para usar)	12 ml
8. Concentrado de lavado 20X: 1 frasco	25 ml

MATERIALES NO SUMINISTRADOS

1. Agua destilada o desionizada
2. Pipetas de precisión
3. Puntas de pipeta desechables
4. Lector ELISA capaz de leer absorbencia a 450 nm
5. Papel de absorción o toalla de papel
6. Papel gráfico

ALMACENAMIENTO Y ESTABILIDAD

1. Almacenar el kit a 2-8°C.
2. Mantener los micropocillos sellados en una bolsa seca con desecantes.
3. Los reactivos son estables hasta la expiración del kit.
4. No exponer los reactivos de prueba al calor, al sol o a la luz directa.

ADVERTENCIAS Y PRECAUCIONES

Posibles materiales biológicos peligrosos:

1. El calibrador y los controles contienen componentes de origen humano, que han sido probados y encontrados no reactivos para el antígeno de superficie de la hepatitis B, así como anticuerpos contra el VIH con reactivos autorizados por la FDA. Sin embargo, no existe un método de prueba que pueda ofrecer una garantía completa de que el VIH, el virus de la hepatitis B u otros agentes infecciosos estén ausentes. Estos reactivos deben tratarse con el nivel 2 de Bioseguridad, como se recomienda en el manual de los Centros para el Control y la Salud de enfermedades, "Bioseguridad en laboratorios microbiológicos y biomédicos." 1984.
2. Este kit está diseñado para uso de investigación solamente.
3. Los resultados óptimos se obtendrán mediante una estricta adhesión al protocolo de prueba. Es esencial pipetear con precisión, así como seguir los requisitos exactos de tiempo y temperatura.
4. No pipetee por vía oral. No fume, coma ni beba en las áreas en las que se manipulan muestras o reactivos del kit.
5. Los componentes de este kit están diseñados para su uso como unidad integral. Los componentes de diferentes lotes no deben mezclarse.

MANEJO Y RECOLECCIÓN DE LA MUESTRA

1. Recoger muestras de sangre y separar el suero inmediatamente.
2. Las muestras pueden almacenarse refrigeradas a (2-8°C) durante 5 días. Si el tiempo de almacenamiento supera los 5 días, almacene congelado a (-20°C) hasta un máximo de un mes.
3. Evite varios ciclos de congelación y descongelación.
4. Antes del ensayo, los sueros congelados deben descongelarse y mezclarse bien.
5. No utilice muestras altamente lipémicas.

PREPARACIÓN DE REACTIVOS

1. **Conjugado Enzimático Funcional:** Preparar 1X de dilución funcional a 1:20 con diluyentes de ensayo según sea necesario, por ejemplo, 0,1 ml del conjugado base en 1,9 ml de diluyente de ensayo para 40 pozos. El conjugado diluido debe utilizarse el mismo día.
2. **Búfer de lavado:** Preparar 1X búfer de lavado añadiendo el contenido de la botella (25ml, 20X) a 475ml de agua destilada. Conservar a temperatura ambiente (20-25°C).

PROCEDIMIENTO DE ENSAYO

1. Colocar el número deseado de tiras recubiertas en el soporte.
2. Dispensar 25µl de estándares, controles y muestras 17-OHP en los pozos apropiados.
3. Añadir 50µl de dilución funcional de conjugado enzimático 17-OHP a todos los pocillos.
4. Añadir 50µl de reactivo de anticuerpos 17-OHP a todos los pocillos.
5. Agitar suavemente la microplaca durante 20-30 segundos para mezclar.
6. Incubar durante 60 minutos a temperatura ambiente.
7. Agitar vigorosamente el contenido de los pozos. Enjuague los pozos 3 veces con el búfer de lavado 1X. Golpear los pozos fuertemente en papel absorbente para eliminar las gotas de agua residuales.
8. Añadir 100µl de sustrato de TMB a cada pocillo.
9. Cubrir la microplaca e incubar durante 15 minutos a temperatura ambiente.
10. Añadir 50µl de solución de stop a cada pozo y mezclar hasta obtener un color uniforme en cada pozo.
11. Leer la absorbancia en cada pozo a 450 nm dentro de 15 min. una vez agregada la solución de stop.

CÁLCULO DE RESULTADOS

Una curva estándar se construye de la siguiente manera:

1. Calcular los valores medios de absorbancia para cada conjunto de estándares y muestras de pacientes
2. Para construir la curva estándar, trazar la absorbancia media de cada estándar de 17-OHP (eje vertical) contra su concentración en ng/ml (eje horizontal)
3. Dibujar la curva a través de los puntos trazados.
4. Leer la absorbancia de cada muestra desconocida de la curva para determinar la concentración correspondiente de 17-OHP.

Ejemplo de una curva estándar típica

	OD450nm	Conc. (ng/mL)
Est. 1	2.378	0
Est. 2	1.804	0.1
Est. 3	0.670	0.5
Est. 4	0.400	1
Est. 5	0.180	2.5
Est. 6	0.053	10

VALORES ESPERADOS

Recomendamos a cada laboratorio establecer sus propios rangos normales, para la población a la que sirve. Hasta entonces, los valores de la literatura se pueden utilizar como pautas.

1. Sensibilidad

La sensibilidad se determinó calculando la media más 2DE del punto estándar cero probado 20 veces en la misma ejecución.

Suero	No. de réplicas	Media (ng/mL)	Desviación Estándar	Media + 2DE (Sensibilidad)
Estándar Cero	24	0.024	0.01	0.04

2. Correlación con un kit ELISA de referencia:

Las muestras de suero fueron probadas por este kit ELISA y un kit ELISA de referencia. Los resultados son los siguientes:

Correlación	Pendiente	Intercepción
0.985	1.02	0.22

3. Precisión

Intra-Ensayo

Suero	No. de réplicas	Media (ng/mL)	Desviación Estándar	Coefficiente de variación (%)
1	24	0.4	0.01	2.93
2	24	2.0	0.07	3.60
3	24	7.8	0.27	3.41

Inter-Ensayo

Suero	No. de réplicas	Media (ng/mL)	Desviación Estándar	Coefficiente de variación (%)
1	24	0.4	0.01	4.68
2	24	2.0	0.11	5.45
3	24	8.0	0.29	3.67

4. Linealidad

Dos muestras de pacientes diferentes se diluyeron con el diluyente de la muestra a 1/2, 1/4 y 1/8. Se calcularon los valores de 17-OHP y se corrigieron los resultados con el factor de dilución.

Suero	Valor original	Porcentaje de recuperación		
	ng/ml	1/2	1/4	1/8
1	7.8	90%	92%	92%
2	4.6	95%	101%	97%