



Validação do MiniReader – Teste de Progesterona por ELISA

Dr. Monika Esch, Minitüb GmbH

O MiniReader dosa os níveis de Progesterona em amostras de soro de cadelas e vacas pelo teste de ELISA.

ELISA é um método de análise para a detecção de substâncias específicas em uma amostra líquida. Isso ocorre com a formação de um complexo antígeno-anticorpo, onde o anticorpo se liga em uma enzima e entra em contato com uma amostra contendo o antígeno. A reação produzirá um sinal, neste caso uma modificação de cor, indicando a quantidade de antígeno (neste caso a Progesterona) na amostra. Esta modificação de cor é detectada pelo MiniReader por fotometria. O resultado é mostrado em ng/mL baseado na calibração usando os padrões incluídos no kit.

O kit usado no MiniReader inclui reagentes para a reação de ELISA, poços para amostras e três soluções padronizadas. Os padrões contêm uma concentração definida de progesterona sintética e são preparados usando um procedimento idêntico ao das amostras. As soluções padronizadas permitem um ajuste da calibração interna no MiniReader para eliminar influência de outros fatores diferentes à Progesterona, algo que poderia alterar o resultado.

Para o processo de validação do MiniReader a Minitube utilizou uma variedade de testes, incluindo a comparação com métodos de referência, uma avaliação do espectro da sensibilidade e testes para reações cruzadas. Precisão e linearidade dos resultados foram também testados como descrito abaixo.

Comparação do MiniReader com um método de referência

Amostras de soro (67) de cadelas foram enviadas para um laboratório de referência, enquanto as mesmas amostras foram avaliadas com o MiniReader e uma elevada conformidade em todas as amostras foi confirmada na comparação dos métodos (Figura 1). Na figura 2, o Coeficiente de Correlação da Concordância (CCC) como indicador de compatibilidade entre os métodos de mensuração é 0,922. Quanto mais próximo de 1 for este valor significa que os métodos são compatíveis. Um CCC de 0,922 significa uma compatibilidade quase total.

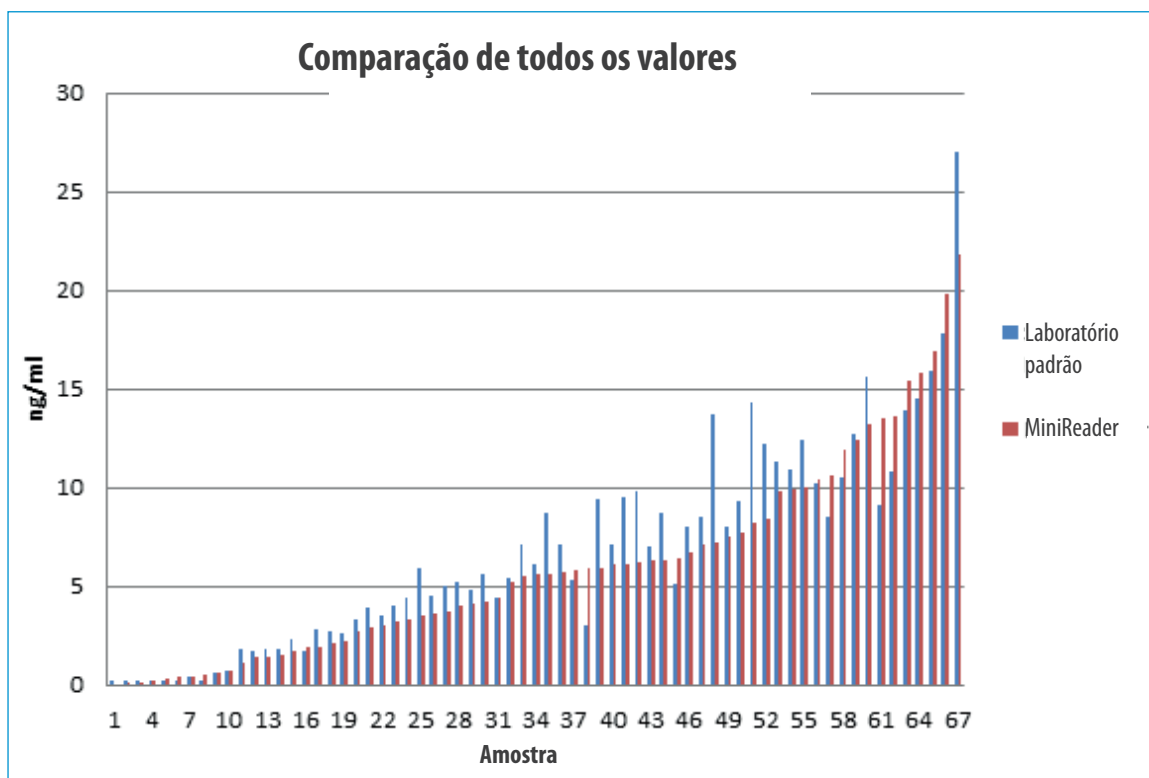


Fig. 1: Comparação do laboratório padrão vs Valores com o MiniReader para 67 amostras

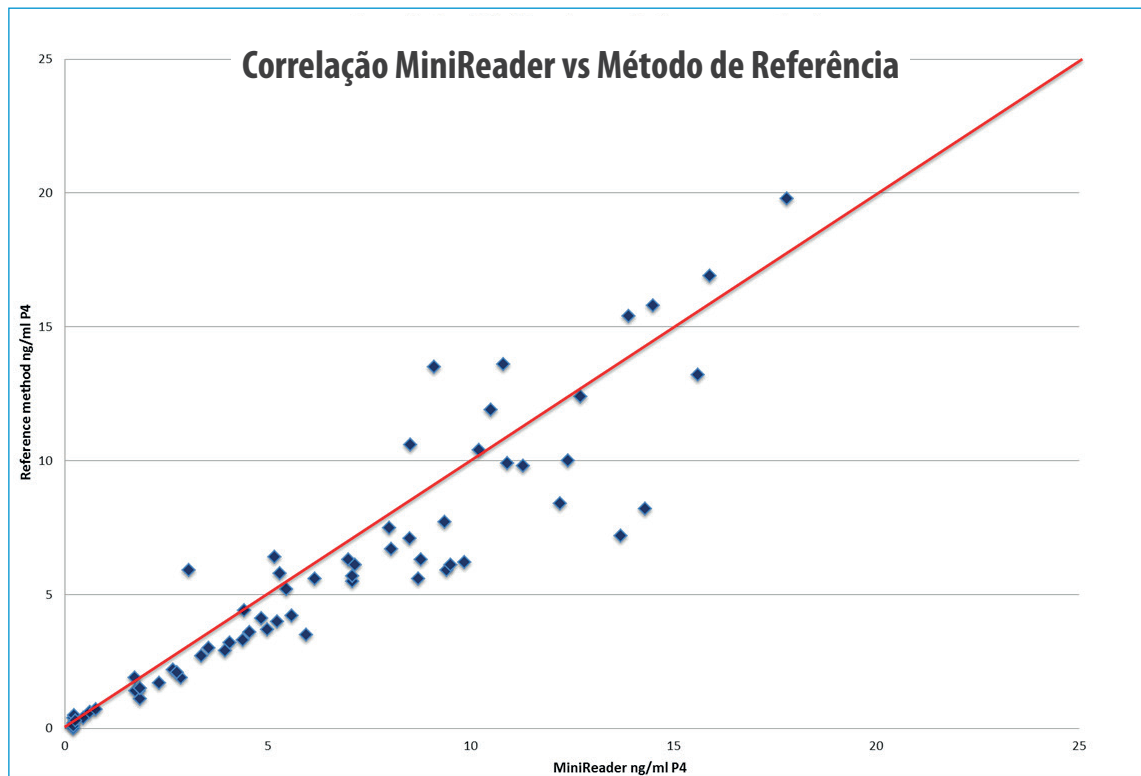


Fig. 2: Concordância dos métodos de mensuração: Todas as medições estão distribuídas próximas à linha de concordância perfeita (linha vermelha)

Faixa de Leitura

Amostras com concentração conhecida de Progesterona foram avaliadas com o MiniReader para a determinação da densidade ótica. A faixa de leitura da análise de Progesterona é compreendida entre 0 e 30 ng/mL (Figura 3). A sensibilidade da análise foi determinada em 0,3 ng/mL. Esta sensibilidade representa a performance do teste, sendo a mais baixa concentração detectável pelo MiniReader. Uma sensibilidade de 0,3 ng/mL é adequada para o teste, visto que os níveis séricos com relevância para a reprodução são bem mais elevados.

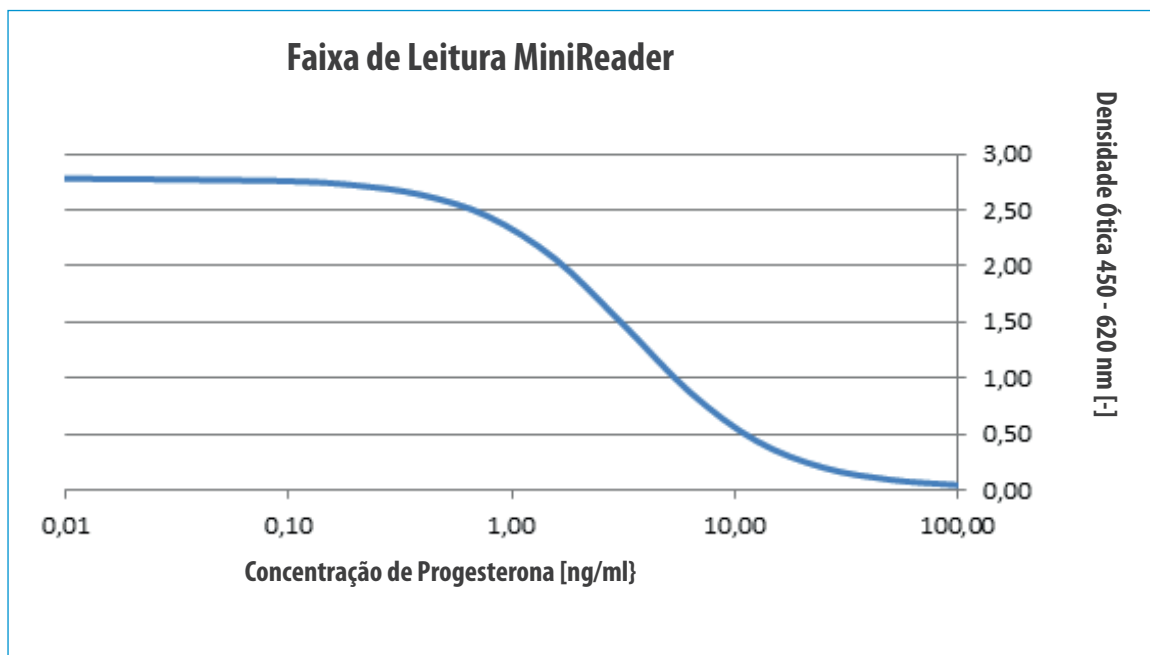


Fig. 3: Curva-padrão indicando a faixa de leitura do MiniReader

Reação Cruzada (Especificidade dos anticorpos)

Isso é importante para excluir a possibilidade de outras substâncias do soro reagirem como a Progesterona na avaliação. Desta forma, as substâncias mostradas na tabela 1 foram testadas para possíveis reações cruzadas. O resultado foi <0,1% para todos os hormônios testados.

Substância	Reação cruzada
Progesterona	100 %
17 H-Progesterona	< 0.1 %
Pregnenolona	< 0.1 %
Testosterona	< 0.1 %
β-Estradiol I	< 0.1 %
Cortisol	< 0.1 %

Tabela 1: Reação cruzada de outras substâncias comumente encontradas no soro

Precisão

Intra-análises e inter-análises foram feitas para determinar a precisão dos testes. Com este objetivo, os desvios de avaliações de 3 amostras foram determinados dentro de uma mesma bateria de avaliações (Intra-análise) e entre baterias distintas (inter-análise). A Tabela 2 mostra os resultados da intra-análise e a Tabela 3 mostra a inter-análise.

	Amostra 1	Amostra 2	Amostra 3
n	10	10	10
Valores médios (ng/mL)	0.99	2.90	13.54
Desvio padrão (ng/mL)	0.15	0.34	1.96
Coefficiente de Variação	15 %	12 %	14 %

Tabela 2: Intra-análise de três amostras de soro

	Amostra 1	Amostra 2	Amostra 3
n	5	5	5
Valores médios (ng/mL)	1.12	3.0	12.60
Desvio padrão (ng/mL)	0.08	0.27	1.21
Coefficiente de Variação	7 %	9 %	10 %

Tabela 3: Inter-análise de três amostras de soro

Para a intra-análise cada amostra foi avaliada 10 vezes. A média para a amostra 1 foi 1,0 ng/mL, para a amostra 2 foi 2,9 ng/mL e para a amostra 3 foi 13,5 ng/mL. Os desvios padrão foram 0,1, 0,3 e 2,0 ng/mL, respectivamente. O coeficiente de variação da amostra 1 foi 15%, para a amostra 2 foi 12% e para a 3 14%.

Para a inter-análise 5 medições foram realizadas em cada amostra. Os valores médios foram 1,1, 3,0 e 12,6 ng/mL para as amostras 1, 2 e 3, respectivamente. Os desvios padrão foram 0,1, 0,3 e 1,2 ng/mL, respectivamente. Os coeficientes de variação das três amostras de soro foram 7% para a amostra com menos Progesterona, 9% para a intermediária e 10% para a amostra com maior concentração (3).

O coeficiente de variação é definido como o valor do desvio padrão até o valor médio e deve ser <20%.

Obtenção do Resultado

O resultado foi determinado usando soluções com concentrações conhecidas de Progesterona sendo adicionadas às amostras. A amostra foi misturada 1:1 com diferentes soluções padrão. A concentração esperada foi calculada e a amostra foi avaliada com o MiniReader.

A concentração esperada resulta do valor da amostra inicial mais o valor conhecido da amostra padrão. O resultado em % foi calculado como a taxa da concentração de Progesterona medida vs a taxa de Progesterona esperada.

Concentração de P4 da solução padrão (ng/mL)	Concentração esperada de P4 (ng/mL)	Concentração de P4 medida (ng/mL)	Obtenção do Resultado
18.0	10.6	9.2	87 %
7.0	5.1	4.8	94 %
3.0	3.1	3.1	100 %
0.5	1.9	1.7	89 %

Tabela 4: Determinação do resultado após adição de soluções definidas de Progesterona

Um resultado entre 87% a 100% foi encontrado.

Linearidade

Para determinar a linearidade, uma amostra de soro foi diluída linearmente em solução tampão. As concentrações de Progesterona foram calculadas e comparadas com a leitura feita pelo MiniReader. O resultado em % foi calculado usando a razão entre a concentração esperada e a mensurada.

Diluição	Concentração esperada de P4 (ng/mL)	Concentração de P4 medida (ng/mL)	Obtenção do Resultado
1:2	8.8	8.2	93 %
1:4	4.4	4.9	111 %
1:8	2.2	2.5	114 %
1:16	1.1	1.2	109 %
1:32	0.6	0.5	91 %

Tabela 5: Determinação de linearidade da amostra de soro

Resumo

O MiniReader e o kit MiniReader são testados e compreendem um método muito confiável para a mensuração da Progesterona em amostras de soro de cadelas. Os resultados são mostrados em ng/mL no visor permitindo uma visualização imediata destes níveis, tornando o MiniReader uma valiosa ferramenta de diagnóstico para a decisão sobre o protocolo reprodutivo que deve ser adotado.

