



SensioScreen

Progesteron (Rind) ELISA Kit

Enzym-Immunoassay zur quantitativen Bestimmung von
Progesteron in bovinen Milch-, Serum- und Plasmaproben

REF P101.096

96 Tests



*For research use only.
Not for use in diagnostic procedures.*



Sension

Biologische Detektions- und
Schnelltestsysteme

Sension GmbH
Provinostr. 52 / B14
86153 Augsburg
GERMANY

Tel.: +49 (0)821 / 455 799 - 0
Fax: +49 (0)821 / 455 799 - 22

sensioscreen@sension.eu
www.sension.eu

Inhaltsverzeichnis

Testprinzip	3
Einführung	3
Anwendungsgebiete	4
Material	5
Enthaltene Materialien	5
Weitere benötigte Materialien	6
Vorbereitung der Reagenzien	6
Warnungen und Hinweise	6
Probenvorbereitung	6
Milch	6
Serum/Plasma	6
Testdurchführung	7
Allgemeine Anmerkungen	7
Testablauf	7
Ergebnisse	8
Semiquantitatives Protokoll	8
Quantitatives Protokoll	8
Testcharakteristika	8
Messbereich und Standardkurve	8
Spezifität	9
Präzision	9
Wiederfindung	9
Linearität	10
Literatur	10
Plattenlayout	12

Der SensioScreen Progesteron ELISA ist ein kompetitiver Immunoassay zur Bestimmung von Progesteron (P4) in bovinen Milch-, Serum- oder Plasmaproben, welche auch parallel im selben Messdurchlauf analysiert werden können. Der SensioScreen Progesteron ELISA kann anhand von zwei unterschiedlichen Protokollen durchgeführt werden:

Quantitatives Protokoll: bis zu 42 Proben im Doppelansatz mit 6 Standards.

Semiquantitatives Protokoll: bis zu 94 Proben im Einzelansatz mit 2 Kontrollen.

Testprinzip

Der Test basiert auf einer spezifischen Erkennung von Progesteron mittels monoklonalen Antikörpern, die auf der Oberfläche der Mikrotiterplatte immobilisiert sind. Das in der Probe oder Standardlösung enthaltene Progesteron konkurriert mit einer konstanten Menge eines Progesteron-Enzym-Konjugats um die freien Bindungsstellen der immobilisierten Antikörper. Bei niedriger Progesteronkonzentration der Probe bindet vornehmlich das Progesteron-Enzym-Konjugat an die Antikörper, bei hohen Progesteronkonzentrationen der Probe entsprechend weniger. Daraus ergibt sich, je weniger freies Progesteron in der Probe vorhanden ist, desto intensiver verläuft die Farbreaktion.

Einführung

Die Bestimmung des Progesteronspiegels beim Rind ist ein wertvolles Instrument für effektives Herdenmanagement. Im Verlauf des bovinen Brustzyklus verändert sich der Progesteronspiegel kontinuierlich (Abbildung 1) [1]. An Tag 0 des Zyklus kann aufgrund des inaktiven Gelbkörpers (Corpus Luteum) nur wenig bis gar kein Progesteron nachgewiesen werden. Der Gelkörper entsteht während des Eisprungs aus einem Ovarialfollikel und beginnt mit der Produktion von Progesteron, welches im Folgenden ansteigt. Bei tragenden Tieren bleibt der Progesteronspiegel bis zum Abkalben auf einem hohen Niveau, während ein Abfall des Progesteronspiegels nach etwa 20 Tagen den Beginn eines neuen Brustzyklus anzeigen, welcher sofort wieder für eine erneute Befruchtung (KB) genutzt werden kann. Die Bestimmung des Progesteronspiegels kommt somit enorme Bedeutung im erfolgreichen Fruchtbarkeitsmanagement der Herde zu.

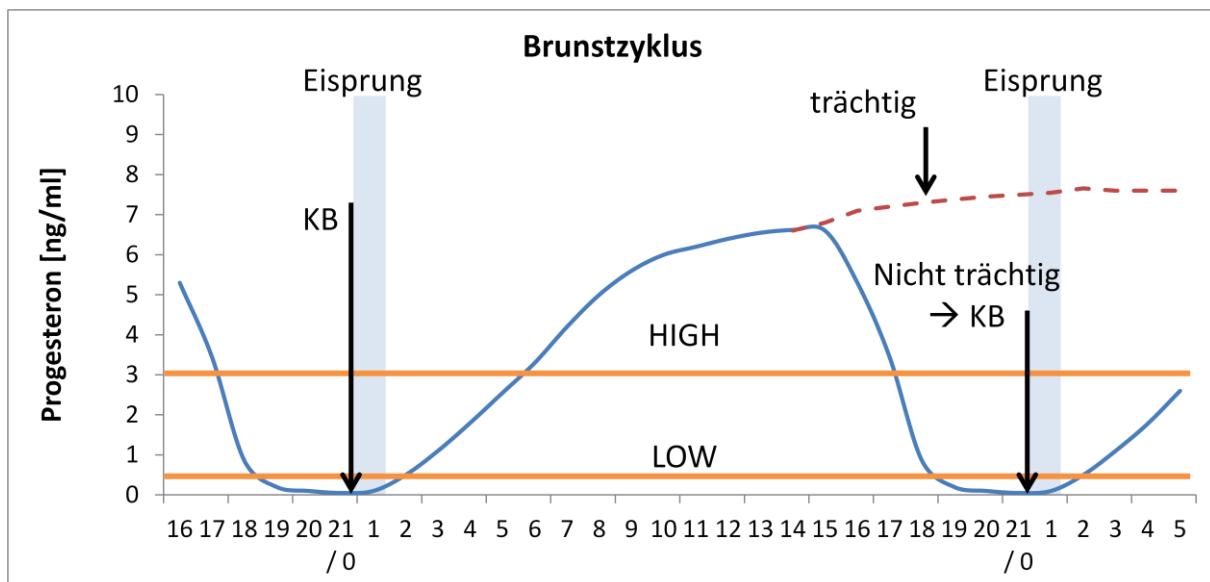


Abbildung 1: Der Progesteronspiegel während des bovinen Brustzyklus. Eine erfolgreiche Befruchtung (KB) kann nur bei niedrigem Progesteronspiegel erfolgen

Anwendungsgebiete

Anwendung	Beschreibung	P4 Gehalt	Interpretation
Brunsterkennung	Künstliche Befruchtung (KB) kann nur während der Brunst bei inaktivem Gelbkörper und somit bei einem niedrigem Progesteronspiegel erfolgen	< LOW —	Tier brünstig
Zykluserkennung	Bei unbekanntem Zyklusverlauf sollte im Abstand von 4 Tagen eine Probe analysiert werden. Nach 20-24 Tagen stellt sich der Zyklus des Tieres dar.		
Erkennung von stiller Brunst und Scheinbrunst [2]	Da auch Tiere ohne eindeutige Brunstsymptome in der Brunst einen niedrigen Progesteronspiegel aufweisen (< LOW), können diese erfolgreich einer KB unterzogen werden. Scheinbrüntige Tiere mit aktivem Gelbkörper (> LOW) können nicht erfolgreich befruchtet werden und sollten im Abstand von 4 Tagen nachgetestet werden, bis ein niedriger Progesteronspiegel (< LOW) den Östrus anzeigen.		
Früherkennung von nicht-trächtigen Tieren [3][4]	Um keinen Zyklus für die KB zu verlieren, kann an Tag 21 nach der KB der Progesterongehalt untersucht werden.	< LOW — > LOW +	100% nicht trächtig Brunst kann für neue KB genutzt werden. > LOW > 85% trächtig
Bestätigung oder Ausschluss von Ovarialzysten / Therapiekontrolle [5]	Probenahme an Zyklustagen 0, 7 und 14. Bei einem normalen Zyklusverlauf steigt der Progesteronspiegel stetig an und verbleibt auf einem hohen Niveau. Verändert sich der Progesteronspiegel nicht, sollte das Tier auf Ovarialzysten untersucht werden.	< LOW — > LOW + > LOW + < LOW —	Follikelzysten: andauernd tiefe Progesteronwerte deuten auf Follikelzysten hin. 6 Tage nach der Zystenbehandlung kann der Neustart des Zyklus anhand steigender Progesteronwerte beobachtet werden. Gelbkörperzysten: Andauernd hohe Progesteronwerte deuten auf eine Gelbkörperzyste hin. 2-4 Tage nach erfolgreicher Behandlung zeigen niedrige Progesteronwerte den Start eines neuen Brunstzyklus.

Kontrolle bei Synchronisations-protokollen	Eine erfolgreiche Behandlung mit Prostaglandin kann nur bei aktivem Gelbkörper erfolgen (> LOW) und kann durch einen tiefen Progesteronwert an Tag 4 (< LOW) nach Behandlung bestätigt werden.	> LOW > HIGH +	Aktiver Gelbkörper. Prostaglandin-Behandlung kann verfolgt werden.
Ausschluss fehlerhafter Brunsterkennung	Bei schlechter Herdenfruchtbarkeit sollte die Qualität der Brunsterkennung überprüft werden. Hierzu sollte der Progesteronspiegel von 20 Tieren unmittelbar nach der KB (Tag 0) und 4 Tage danach bestimmt werden. Weichen bei mehr als einem Tier die erwarteten Werte von den gemessenen ab, ist die Fehlerquote bei der Brunsterkennung zu hoch (> 5%). Andere Ursachen für geringe Herdenfruchtbarkeit können z.B. Stress oder Fütterung sein.	Tag 0 < LOW — Tag 4 > LOW + Tag 0 + 4 > LOW + Tag 4 < LOW —	Pünktliche KB KB erfolgte zu spät KB erfolgte zu früh

Material

Enthaltene Materialien

1. **MTP** **Mikrotiterplatte mit Deckel:** 12x8 (teilbare) Streifen
Mit einem monokonalen Anti-Progesteron-Antikörper beschichtete Kavitäten
2. **STD** **Standard (1-6):** 6 Fläschchen, 1 mL
Konzentrationen 0, 0.23, 0.47, 0.94, 3.75, 20 ng/mL
Standard **STD 3** dient als Kontrolle **LOW**,
Standard **STD 5** dient als Kontrolle **HIGH**
3. **CONJ** **Enzymkonjugat:** 1 Fläschchen, 11 mL
An Peroxidase gekoppeltes Progesteron
4. **TMB** **TMB-Substrat:** 1 Fläschchen, 11 mL
5. **STOP** **Stopplösung:** 1 Fläschchen, 6 mL
9.9 % H₃PO₄. Kontakt mit Haut und Augen vermeiden!
6. **15x WASH** **Waschlösung (15x Konzentrat):** 1 Fläschchen, 33 mL
Vor Benutzung bitte verdünnen. Inhalt ist ausreichend zur Herstellung von 500 ml 1x Waschlösung.
7. **Testanleitung**

Weitere benötigte Materialien

1. Entionisiertes oder destilliertes Wasser
2. Mikroliterpipetten für die Volumina 20-200 µl und 100-1000 µl
3. Bechergläser für die Verdünnung von Puffern
4. Ein Mikrotiterplattenwascher (alternative: waschen mit einer Mehrkanalpipette)
5. Ein Mikrotiterplatten-Photometer zur Messung bei einer Wellenlänge von 450 nm (idealerweise mit Referenzmessung bei Wellenlänge 620 nm)

Vorbereitung der Reagenzien

- Alle Reagenzien vor Benutzung auf Raumtemperatur bringen
- Unmittelbar nach Benutzung alle Reagenzien wieder bei 2-8 °C lagern

Waschlösung (15x Konzentrat):

Das 15x Waschlösungskonzentrat (33 mL) mit 467 ml entionisiertem Wasser auf ein Endvolumen von 500 mL verdünnen.

Die verdünnte Waschlösung ist bei Raumtemperatur zwei Wochen stabil.

Warnungen und Hinweise

- Vermeiden Sie den Kontakt mit der Stopplösung. Es könnte zu Hautirritationen führen.
- Benutzen Sie keine Reagenzien nach Ablauf des Haltbarkeitsdatums.
- Vermischen Sie keine Reagenzien aus verschiedenen Kits.
- Lagern Sie die Reagenzien kühl (2-8 °C). **Nicht einfrieren!**
- Entsorgen Sie die Kit-Bestandteile entsprechend den in Ihrem Land geltenden Vorschriften.

Probenvorbereitung

Milch

Es können Proben aus der Vollmilch oder aus dem Vorgemelk gemessen werden. Die Proben sind bei 2-8°C für mindestens 24 h stabil. Für längere Aufbewahrung sollten die Proben bei -20°C eingefroren werden. Durchmischen Sie die Probe jeweils unmittelbar vor der Analyse durch 2-3 maliges Schütteln, um eine homogene Emulsion zu erhalten.

Serum/Plasma

Setzen Sie keine hämolytischen, ikterischen oder lipämischen Proben ein.

Für Plasma: Blutproben sollten in Heparin-Röhrchen gewonnen werden (EDTA stört im ELISA) und zentrifugieren Sie die Proben innerhalb von 30 min. Überführen Sie den Plasma-Überstand in ein frisches Probengefäß.

Für Serum: Blutproben sollten in Serum-Röhrchen gewonnen werden. Lassen Sie das Blut gerinnen und überführen Sie den Serum-Überstand in ein frisches Probengefäß.

Die Proben sind bei 2-8°C für mindestens 24 h stabil. Für längere Aufbewahrung sollten die Proben bei -20°C eingefroren werden.

Testdurchführung

Der SensioScreen Progesteron ELISA kann anhand von zwei unterschiedlichen Protokollen durchgeführt werden:

Quantitatives Protokoll: bis zu 42 Proben im Doppelansatz mit 6 Standards.

Semiquantitatives Protokoll: bis zu 94 Proben im Einzelansatz mit 2 Kontrollen.

Allgemeine Anmerkungen

- Alle Reagenzien vor Benutzung auf Raumtemperatur bringen
- Alle Proben und Reagenzien sollten vor Verwendung gut durchmischt werden.
- Benutzen Sie jeweils eine frische Pipettenspitze für jeden Standard, Kontrolle oder Probe um eine Kreuzkontamination zu vermeiden.
- Pipettieren Sie den ELISA möglichst ohne Unterbrechung.

Testablauf

Für das quantitative Protokoll werden alle Standards und Proben im Doppelansatz aufgetragen.

Für das semiquantitative Protokoll werden lediglich die beiden Kontrollen **LOW** und **HIGH**, sowie die Proben im Einzelansatz aufgetragen. Die restlichen Standards werden hier nicht benötigt.

1. Entfernen Sie die nicht benötigten Kavitäten aus dem Plattenrahmen und lagern Sie diese im verschlossenen Aluminiumbeutel bis zur nächsten Verwendung.
2. Es werden jeweils **25 µl** der **Standards** und **Proben** im Doppelansatz in die Kavitäten pipettiert.
*(für das semiquantitative Protokoll: es werden nur die beiden Kontrollen **LOW** und **HIGH**, sowie die Proben im Einzelansatz pipettiert)*
3. Geben Sie in jede Kavität **100 µl** des **Enzymkonjugats**
4. Durchmischen Sie den Messansatz vorsichtig
5. Decken Sie die Platte mit dem beiliegendem Deckel ab
6. Inkubieren Sie die Platte für **20 min** bei Raumtemperatur
7. Waschen Sie die Kavitäten **3 mal** mit je **300 µl** verdünnter **Waschlösung**
8. Entfernen Sie Flüssigkeitsreste durch vorsichtiges Ausklopfen auf einem saugfähigen Papier
9. Geben Sie **100 µl TMB-Substrat** in jede Kavität
10. Inkubieren Sie die Platte für **10 min bei Raumtemperatur**.
11. Stoppen Sie die Farbreaktion durch Zugabe von **50 µl Stopplösung**
12. Messen Sie die Extinktion bei **450 nm** (idealerweise mit einer Referenzmessung bei 620 nm) innerhalb von 30 min

Ergebnisse

Semiquantitatives Protokoll

Anstelle eines Abstoppens der Farbreaktion mit Stopplösung und der Ermittlung der Extinktion mittels einer photometrischen Messung, kann die Blaufärbung der Proben mit denen der Kontrollen **LOW** und **HIGH** verglichen werden und der Progesterongehalt somit semiquantitativ bestimmt werden:

OD-Werte	P4-Gehalt	Klassifizierung
> LOW (dunkleres Blau)	niedrig	-
ODs zwischen LOW und HIGH	mittel	+
ODs < HIGH (helleres Blau)	hoch	++

Quantitatives Protokoll

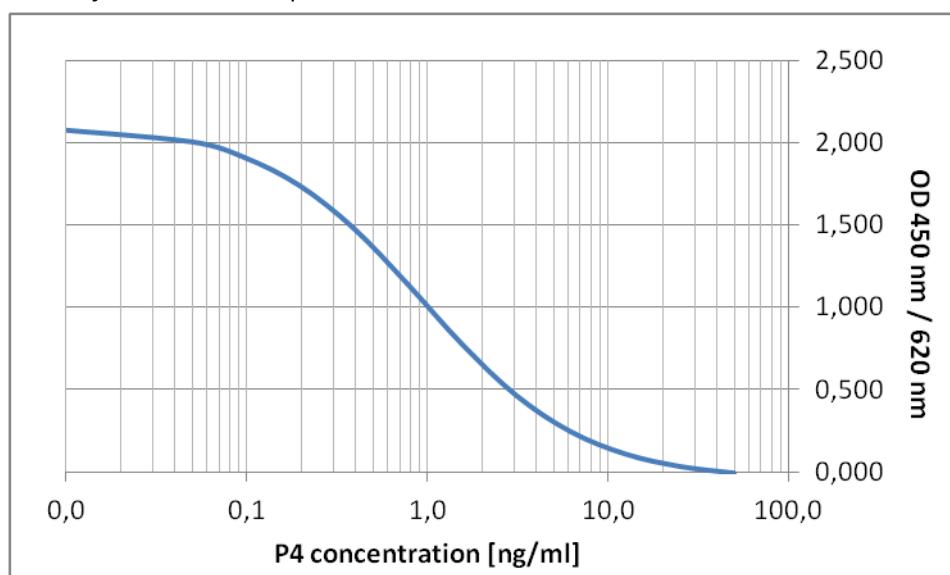
Ermitteln Sie die OD-Werte der Kavitäten mittels eines Spektrophotometers bei einer Wellenlänge von 450 nm (mit einer Referenzmessung bei 620 nm) und errechnen Sie die Mittelwerte der Doppelansätze. Die Auswertung des ELISA kann mittels kommerzieller ELISA-Software erfolgen, oder mittels unseres EXCEL-Auswertformulars, welches von unserer Internetseite heruntergeladen werden kann (www.sension.eu/downloads/kits/ELISA/SpreadsheetP4bov.xlsx).

Für eine manuelle Auswertung tragen Sie die ermittelten OD-Werte auf halblogarithmisches Papier auf und lesen Sie die Progesteronkonzentration der Proben aus dem Diagramm ab.

Testcharakteristika

Messbereich und Standardkurve

Der Messbereich des ELISA liegt zwischen 0-20 ng/ml bei einer analytischen Sensitivität von 0.06 ng/ml. Eine typische Standardkurve welche mit diesem Kit erzielt werden kann ist unten abgebildet. Die abgebildete Kurve darf nicht für die Auswertung der Proben verwendet werden, sondern muss bei jedem Lauf des quantitativen Protokolls neu erstellt werden.



Spezifität

Die folgenden strukturell verwandten Substanzen wurden auf deren Kreuzreaktivität im ELISA hin untersucht.

Substanz	Kreuzreaktion %
Progesteron	100
17-α-OH-Progesteron	< 0.1
Pregnenolon	< 0.1
Cortisol	< 0.1
Testosteron	< 0.1
17-β-Estradiol	< 0.1

Präzision

Die Intra- und Inter-Assay–Varianzen wurden ermittelt, indem drei verschiedene Milchproben analysiert wurden.

Intra-Assay	Probe 1	Probe 2	Probe 3
n	16	16	16
Mittelwert [ng/ml]	9,60	1,75	4,86
SD	0,59	0,21	0,52
VK	6%	12%	11%

Inter-Assay	Probe 1	Probe 2	Probe 3
n	8	8	8
Mittelwert [ng/ml]	9,55	1,81	4,92
SD	0,96	0,27	0,28
VK	10%	15%	6%

Wiederfindung

Zu fettarmer H-Milch (0,1% Fett) wurden Standardlösungen mit definierten Progesteronkonzentrationen gegeben. Die Wiederfindung des zugesetzten Progesterons wurde aus dem Verhältnis von gemessenem und erwartetem Progesterongehalt errechnet.

Erwartete P4-Konzentration [ng/ml]	Gemessene P4-Konzentration [ng/ml]	Wiederfindung
8,6	9,2	107%
2,8	2,9	104%
0,9	0,9	100%

Linearität

Drei verschiedene Milchproben wurden mit fettarmer H-Milch (0.1% Fett) seriell verdünnt. Der Progesterongehalt in der fettarmen H-Milch wurde mit 1.3 ng/ml ermittelt. Die Linearitäten in % wurden aus dem Verhältnis von gemessenem und erwartetem Progesterongehalt errechnet.

	Verdünnung	Erwartete P4-Konzentration [ng/ml]	Gemessene P4-Konzentration [ng/ml]	Linearität
Probe 1	unverdünnt		10,40	
	1:2	5,85	6,71	115%
	1:4	4,01	5,14	128%
	1:8	3,22	3,51	109%
	1:16	2,41	2,59	108%
	1:32	1,95	1,68	86%
	1:64	1,49	1,58	106%
<hr/>				
Probe 2	unverdünnt		1,53	
	1:2	1,42	1,44	102%
	1:4	1,37	1,11	81%
	1:8	1,21	1,20	100%
Probe 3	unverdünnt		4,79	
	1:2	3,05	2,99	98%
	1:4	2,15	1,91	89%
	1:8	1,61	1,37	85%
	1:16	1,34	1,34	100%
	1:32	1,32	1,15	87%

Literatur

- [1] P. Rioux and D. Rajotte, "Progesterone in milk: a simple experiment illustrating the estrous cycle and enzyme immunoassay," *Adv. Physiol. Educ.*, vol. 28, no. 1–4, pp. 64–67, Dec. 2004.
- [2] R. M. S. B. K. Ranasinghe, T. Nakao, K. Yamada, and K. Koike, "Silent ovulation, based on walking activity and milk progesterone concentrations, in Holstein cows housed in a free-stall barn," *Theriogenology*, vol. 73, no. 7, pp. 942–949, Apr. 2010.
- [3] M. Shemesh, N. Ayalon, and H. R. Lindner, "Early pregnancy diagnosis based upon plasma progesterone levels in the cow and ewe," *J. Anim. Sci.*, vol. 36, no. 4, pp. 726–729, Apr. 1973.
- [4] J. A. Pennington, L. H. Schultz, and W. F. Hoffman, "Comparison of pregnancy diagnosis by milk progesterone on day 21 and day 24 postbreeding: field study in dairy cattle," *J. Dairy Sci.*, vol. 68, no. 10, pp. 2740–2745, Oct. 1985.
- [5] M. D. Calder, B. E. Salfen, B. Bao, R. S. Youngquist, and H. A. Garverick, "Administration of progesterone to cows with ovarian follicular cysts results in a reduction in mean LH and LH pulse frequency and initiates ovulatory follicular growth," *J. Anim. Sci.*, vol. 77, no. 11, pp. 3037–3042, Nov. 1999.

Plattenlayout

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A												
B												
C												
D												
E												
F												
G												
H												

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A												
B												
C												
D												
E												
F												
G												
H												