

**Instructions for use**  
**Progesterone ELISA**

**REF** FR E-2500



**INTRODUCTION**

The **Progesterone Enzyme Immunoassay Kit** provides materials for the quantitative determination of Progesterone in serum and plasma.

**This assay is intended for in vitro diagnostic use only.**

Progesterone (pregn-4-ene-3, 20-dione) is a C21 steroid hormone containing a keto-group (at C-3) and a double bond between C-4 and C-5 ( $\Delta^4$ ).

This steroid hormone is a female sex hormone which, in conjunction with estrogens, regulates the accessory organs during the menstrual cycle and it is particularly important in preparing the endometrium for the implantation of the blastocyte and in maintaining pregnancy.

In non-pregnant women progesterone is mainly secreted by the corpus luteum whereas in pregnancy the placenta becomes the major source.

Minor sources are the adrenal cortex for both sexes and the testes for males.

Progesterone circulates in blood mainly bound to Corticosteroid Binding Globulin (CBG), Sex Hormone Binding Globulin (SHBG) and Albumin. Only 2-10% of the total concentration circulates as free hormone.

Blood progesterone concentrations vary widely according to the phases of menstrual cycle; they are lower than 1 ng/mL (3.2 nmol/L) in the follicular phase and around 10-20 ng/mL (32 -64 nmol/L) in the luteal phase.

The maximal levels are achieved 4-7 days after ovulation and remain elevated for 4-6 additional days prior to falling to the preovulatory levels 24 hours before the onset of menstruation.

Since the rise and fall of progesterone parallel the activity of ovarian follicle and corpus luteum, measurements of plasma progesterone are clinically used to confirm ovulation and normal function of the corpus luteum in non-pregnant women.

If ovulation does not occur the corpus luteum is not formed and no cyclical rise of progesterone in plasma is observed. Abnormal progesterone secretion has been implicated in premenstrual tension, irregular shedding of endometrium, dysmenorrhoea, and luteal insufficiency.

Progesterone concentration can vary not only from subject to subject but also in the same person from day to day or even from hour to hour. Consequently, in gynecological disorders or abnormal pregnancies serial measurements rather than single ones are recommended for a proper interpretation of results.

During pregnancy progesterone is widely produced by placenta, and plasma levels rise steadily achieving values as high as 200 ng/mL at term.

**PRINCIPLE OF THE TEST**

The Progesterone ELISA Kit is a solid phase enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA), based on the principle of competitive binding.

The microtiter wells are coated with a polyclonal antibody directed towards an antigenic site on the Progesterone molecule. Endogenous Progesterone of a patient sample competes with a Progesterone horseradish peroxidase conjugate for binding to the coated antibody. After incubation the unbound conjugate is washed off.

The amount of bound peroxidase conjugate is reverse proportional to the concentration of Progesterone in the sample. After addition of the substrate solution, the intensity of colour developed is reverse proportional to the concentration of Progesterone in the patient sample.

**PRECAUTIONS**

- This kit is for in vitro diagnostic use only.
- For information on hazardous substances included in the kit please refer to Material Safety Data Sheets.
- All reagents of this test kit which contain human serum or plasma have been tested and confirmed negative for HIV I/II, HBsAg and HCV by FDA approved procedures. All reagents, however, should be treated as potential biohazards in use and for disposal.
- Avoid contact with Stop Solution containing 0.5 M H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>. It may cause skin irritation and burns.
- Never pipet by mouth and avoid contact of reagents and specimens with skin and mucous membranes.
- Do not smoke, eat, drink or apply cosmetics in areas where specimens or kit reagents are handled.
- Wear disposable latex gloves when handling specimens and reagents. Microbial contamination of reagents or specimens may give false results.
- Handling should be in accordance with the procedures defined by an appropriate national biohazard safety guideline or regulation.
- Do not use reagents beyond expiry date as shown on the kit labels.
- All indicated volumes have to be performed according to the protocol. Optimal test results are only obtained when using calibrated pipettes and microtiter plate readers.
- Do not mix or use components from kits with different lot numbers. It is advised not to exchange wells of different plates even of the same lot. The kits may have been shipped or stored under different conditions and the binding characteristics of the plates may result slightly different.

- Chemicals and prepared or used reagents have to be treated as hazardous waste according the national biohazard safety guideline or regulation.
- Safety Data Sheets for this product are available upon request directly from the manufacturer.
- The Safety Data Sheets fit the demands of: EU-Guideline 91/155 EC.

## KIT COMPONENTS

### Contents of the Kit

**96**

#### FR E-2531 Microtiterwells

12x8 (break apart) strips, 96 wells; Wells coated with anti-Progesterone antibody (polyclonal)

#### Standards

ready to use

	Cat. no.	Standard	Concentration	Volume/Vial
STANDARD A	FR E-2501	Standard A (0)	0 ng/ml	1 ml
STANDARD B	FR E-2502	Standard B (1)	0.3 ng/ml	1 ml
STANDARD C	FR E-2503	Standard C (2)	1.25 ng/ml	1 ml
STANDARD D	FR E-2504	Standard D (3)	2.5 ng/ml	1 ml
STANDARD E	FR E-2505	Standard E (4)	5 ng/ml	1 ml
STANDARD F	FR E-2506	Standard F (5)	15 ng/ml	1 ml
STANDARD G	FR E-2507	Standard G (6)	40 ng/ml	1 ml

Conversion: 1 ng/mL = 3.18 nmol/L

contain 0.03% Proclin 300 + 0.005% gentamicin sulfate as a preservative.

**CONJUGATE**

#### FR E-2540 Enzyme Conjugate

1 vial, 25 ml, ready to use; Progesterone conjugated to horseradish Peroxidase;

\* contain 0.03% Proclin 300, 0.015% BND and 0.010% MIT as a preservative.

**SUBSTRATE**

#### SA E-0055 Substrate Solution

1 vial, 25 ml, ready to use; TMB

**STOP-SOLN**

#### FR E-0080 Stop Solution

1 vial, 14 ml, ready to use; contains 0.5 M H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>.

Avoid contact with the stop solution. It may cause skin irritations and burns.

**WASH-CONC 40x**

#### FR E-0030 Wash Solution

1 vial, 30 ml (40X concentrated); see „Preparation of Reagents“.

\* BND = 5-bromo-5-nitro-1,3-dioxane

MIT = 2-methyl-2H-isothiazol-3-one

**Note:** Additional *Standard A* for sample dilution is available on request.

### Equipment and material required but not provided

- A microtiter plate calibrated reader (450±10 nm)
- Calibrated variable precision micropipettes.
- Absorbent paper.
- Aqua dest.

### Storage and stability of the Kit

When stored at 2-8°C unopened reagents will retain reactivity until expiration date. Do not use reagents beyond this date.

Opened reagents must be stored at 2-8°C. Microtiter wells must be stored at 2-8°C. Once the foilbag has been opened, care should be taken to close it tightly again.

Opened kits retain activity for two months if stored as described above.

### Preparation of Reagents

Allow all reagents and required number of strips to reach room temperature prior to use.

## Wash Solution

Add deionized water to the 40X concentrated Wash Solution.  
Dilute 30 mL of concentrated Wash Solution with 1170 mL deionized water to a final volume of 1200 mL.  
*The diluted Wash Solution is stable for 2 weeks at room temperature.*

## Disposal of the Kit

The disposal of the kit must be made according to the national official regulations. Special information for this product is given in the Material Safety Data Sheets (see chapter 13).

## Damaged Test Kits

In case of any severe damage of the test kit or components, the manufacturer have to be informed written, latest one week after receiving the kit. Severely damaged single components should not be used for a test run. They have to be stored until a final solution has been found. After this, they should be disposed according to the official regulations.

## SPECIMEN

Serum or plasma (EDTA-, Heparin- or citrate plasma) can be used in this assay.  
Do not use haemolytic, icteric or lipaemic specimens.  
Please note: Samples containing sodium azide should not be used in the assay.

## Specimen Collection

### Serum:

Collect blood by venipuncture (e.g. Sarstedt Monovette # 02.1388.001), allow to clot, and separate serum by centrifugation at room temperature. Do not centrifuge before complete clotting has occurred. Patients receiving anticoagulant therapy may require increased clotting time.

### Plasma:

Whole blood should be collected into centrifuge tubes containing anti coagulant and centrifuged immediately after collection.

(E.g. for EDTA plasma Sarstedt Monovette – red cap - # 02.166.001; for Heparin plasma Sarstedt Monovette – orange cap - # 02.165.001; for Citrate plasma Sarstedt Monovette – green cap - # 02.167.001.)

## Specimen Storage

Specimens should be capped and may be stored for up to 24 hours at 2-8°C prior to assaying.  
Specimens held for a longer time should be frozen only once at -20°C prior to assay. Thawed samples should be inverted several times prior to testing.

## Specimen Dilution

If in an initial assay, a specimen is found to contain more than the highest standard, the specimens can be diluted 10-fold or 100 fold with *Standard A* and reassayed as described in Assay Procedure.  
For the calculation of the concentrations this dilution factor has to be taken into account.

### Example:

- a) Dilution 1:10: 10 µL Serum + 90 µL Standard A (mix thoroughly)
- b) Dilution 1:100: 10 µL dilution a) 1:10 + 90 µL Standard A (mix thoroughly).

## TEST PROCEDURE

### General Remarks

- All reagents and specimens must be allowed to come to room temperature before use. All reagents must be mixed without foaming.
- Once the test has been started, all steps should be completed without interruption.
- Use new disposal plastic pipette tips for each standard, control or sample in order to avoid cross contamination.
- Absorbance is a function of the incubation time and temperature. Before starting the assay, it is recommended that all reagents are ready, caps removed, all needed wells secured in holder, etc. This will ensure equal elapsed time for each pipetting step without interruption.
- As a general rule the enzymatic reaction is linearly proportional to time and temperature.

## Assay Procedure

Each run must include a standard curve.

<b>1.</b> Secure the desired number of Microtiter wells in the holder.
<b>2.</b> Dispense <b>25 µL</b> of each Standard, controls and samples <u>with new disposable tips</u> into appropriate wells.
<b>3.</b> Incubate for <b>5 minutes</b> at room temperature.
<b>4.</b> Dispense <b>200 µL</b> Enzyme Conjugate into each well. Thoroughly mix for 10 seconds. It is important to have a complete mixing in this step.
<b>5.</b> Incubate for <b>60 minutes</b> at room temperature.
<b>6.</b> Briskly shake out the contents of the wells. Rinse the wells 3 times with diluted Wash Solution (400 µL per well). Strike the wells sharply on absorbent paper to remove residual droplets. <b>Important note:</b> The sensitivity and precision of this assay is markedly influenced by the correct performance of the washing procedure!
<b>7.</b> Add <b>200 µL</b> of Substrate Solution to each well.
<b>8.</b> Incubate for <b>15 minutes</b> at room temperature.
<b>9.</b> Stop the enzymatic reaction by adding <b>100 µL</b> of Stop Solution to each well.
<b>10.</b> Determine the absorbance (OD) of each well at <b>450±10 nm</b> with a microtiter plate reader. It is recommended that the wells be read <b>within 10 minutes</b> after adding the <i>Stop Solution</i> .

## Calculation of Results

1. Calculate the average absorbance values for each set of standards, controls and patient samples.
2. Construct a standard curve by plotting the mean absorbance obtained from each standard against its concentration with absorbance value on the vertical(Y) axis and concentration on the horizontal (X) axis.
3. Using the mean absorbance value for each sample determine the corresponding concentration from the standard curve.
4. Automated method: The results in the IFU have been calculated automatically using a 4 PL (4 Parameter Logistics) curve fit. 4 Parameter Logistics is the preferred method. Other data reduction functions may give slightly different results.
5. The concentration of the samples can be read directly from this standard curve. Samples with concentrations higher than that of the highest standard have to be further diluted. For the calculation of the concentrations this dilution factor has to be taken into account.

## Example of Typical Standard Curve

The following data is for demonstration only and **cannot** be used in place of data generations at the time of assay.

Standard	Optical Units (450 nm)
Standard A (0 ng/mL)	1.52
Standard B (0.3 ng/mL)	1.17
Standard C (1.25 ng/mL)	0.88
Standard D (2.5 ng/mL)	0.69
Standard E (5.0 ng/mL)	0.55
Standard F (15 ng/mL)	0.35
Standard G (40 ng/mL)	0.13

## EXPECTED VALUES

It is strongly recommended that each laboratory should determine its own normal and abnormal values.

In a study conducted with apparently normal healthy adults, using the Progesterone ELISA the following values are observed:

### Normal Women

Follicular phase: 0.2 – 1.4 ng/mL  
Luteal phase: 4 - 25 ng/mL  
Menopause: 0.1 - 1 ng/mL

**Normal men** 0.1 – 1 ng/mL

## QUALITY CONTROL

Good laboratory practice requires that controls be run with each standard curve. A statistically significant number of controls should be assayed to establish mean values and acceptable ranges to assure proper performance.

It is recommended to use control samples according to state and federal regulations. The use of control samples is advised to assure the day to day validity of results. Use controls at both normal and pathological levels.

The controls and the corresponding results of the QC-Laboratory are stated in the QC certificate added to the kit. The values and ranges stated on the QC sheet always refer to the current kit lot and should be used for direct comparison of the results.

It is also recommended to make use of national or international Quality Assessment programs in order to ensure the accuracy of the results.

Employ appropriate statistical methods for analysing control values and trends. If the results of the assay do not fit to the established acceptable ranges of control materials patient results should be considered invalid.

In this case, please check the following technical areas: Pipetting and timing devices; photometer, expiration dates of reagents, storage and incubation conditions, aspiration and washing methods.

After checking the above mentioned items without finding any error contact your distributor or the manufacturer directly.

## ASSAY CHARACTERISTICS

### Assay Dynamic Range

The range of the assay is between 0 – 40 ng/mL.

### Specificity of Antibodies (Cross Reactivity)

The following substances were tested for cross reactivity of the assay:

Steroid	Cross Reaction (%)
Progesterone	100.00
17 $\alpha$ OH Progesterone	0.30
Estriol	< 0.10
Estradiol 17 $\beta$	< 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

### Analytical Sensitivity

The analytical sensitivity was calculated from the mean minus two standard deviations of twenty (20) replicate analyses of *Standard A* and was found to be 0.045 ng/mL.

### Precision

#### Intra Assay Variation

The within assay variability is shown below:

Sample	n	Mean (ng/mL)	CV (%)
1	20	0.62	5.4
2	20	4.67	6.99
3	20	10.80	6.86

#### Inter Assay Variation

The between assay variability is shown below:

Sample	n	Mean (ng/mL)	CV (%)
1	12	0.56	9.96
2	12	4.55	4.34
3	12	10.65	5.59

## Recovery

Samples have been spiked by adding Progesterone solutions with known concentrations in a 1:1 ratio. The expected values were calculated by addition of half of the values determined for the undiluted samples and half of the values of the known solutions. The % Recovery has been calculated by multiplication of the ratio of the measurements and the expected values with 100.

Sample	Added Concentration 1:1 (v/v) (ng/mL)	Measured Conc. (ng/mL)	Expected Conc. (ng/mL)	Recovery (%)
1	40.0	1.63 20.35	20.82	97.8
	15.0	8.45	8.32	101.6
	5.0	3.52	3.32	106.2
	2.5	2.31	2.07	112.0
2	40.0	4.17 22.69	22.09	102.7
	15.0	10.45	9.59	109.0
	5.0	4.42	4.59	96.3
	2.5	3.62	3.34	108.3
3	40.0	11.03 26.94	25.52	105.6
	15.0	12.44	13.02	95.6
	5.0	7.70	8.02	96.1
	2.5	6.15	6.77	90.9

## Linearity

Sample	Dilution	Measured Conc. (ng/mL)	Expected Conc. (ng/mL)	Recovery (%)
1	None	1.63	1.63	
	1:2	0.75	0.82	92.0
	1:4	0.46	0.41	111.9
	1:8	0.20	0.20	99.1
	1:16	0.11	0.10	107.0
2	None	4.17	4.17	
	1:2	2.30	2.09	110.3
	1:4	1.09	1.04	104.8
	1:8	0.49	0.52	93.3
	1:16	0.23	0.26	87.8
3	None	11.03	11.03	
	1:2	5.81	5.52	105.4
	1:4	2.96	2.76	107.2
	1:8	1.50	1.38	108.6
	1:16	0.72	0.69	104.7

## LIMITATIONS OF USE

### Interfering Substances

Any improper handling of samples or modification of this test might influence the results. Haemoglobin (up to 4 mg/mL), Bilirubin (up to 0.5 mg/mL) and Triglyceride (up to 1.8 mg/mL) have no influence on the assay results.

### Drug Interferences

Until today no substances (drugs) are known to us, which have an influence to the measurement of Progesterone in a sample.

### High-Dose-Hook Effect

No hook effect was observed in this test.

**LEGAL ASPECTS**

**Reliability of Results**

The test must be performed exactly as per the manufacturer’s instructions for use. Moreover the user must strictly adhere to the rules of GLP (Good Laboratory Practice) or other applicable national standards and/or laws. This is especially relevant for the use of control reagents. It is important to always include, within the test procedure, a sufficient number of controls for validating the accuracy and precision of the test.

The test results are valid only if all controls are within the specified ranges and if all other test parameters are also within the given assay specifications. In case of any doubt or concern please contact the manufacturer.

**Therapeutic Consequences**

Therapeutic consequences should never be based on laboratory results alone even if all test results are in agreement with the items as stated under point “Reliability of Results”. Any laboratory result is only a part of the total clinical picture of a patient.

Only in cases where the laboratory results are in acceptable agreement with the overall clinical picture of the patient should therapeutic consequences be derived.

The test result itself should never be the sole determinant for deriving any therapeutic consequences.

**Liability**













Any modification of the test kit and/or exchange or mixture of any components of different lots from one test kit to another could negatively affect the intended results and validity of the overall test. Such modification and/or exchanges invalidate any claim for replacement.

Claims submitted due to customer misinterpretation of laboratory results subject to point “Therapeutic Consequences” are also invalid. Regardless, in the event of any claim, the manufacturer’s liability is not to exceed the value of the test kit. Any damage caused to the test kit during transportation is not subject to the liability of the manufacturer.

**REFERENCES**

1. Filicori M, Butler JP, Crowley WF Jr. Neuroendocrine regulation of the corpus luteum in the human. J Clin Invest. 73:1638 1984.
2. Katt JA, Duncan JA, Herbon L, et al. The frequency of gonadotropin releasing hormone stimulation determines the number of pituitary gonadotropin releasing hormone receptors. Endocrinology 1985; 116:2113.
3. Csapo AI, Pulkkinen MO, Wiest WG: Effects of lutectomy and progesterone replacement therapy in early pregnancy patients. Am J Obstet Gynecol 115:759, 1973.
4. Thomas Labor und Diagnose

**Symbols:**

	Storage temperature		Manufacturer		Contains sufficient for <n> tests
	Expiry date		Batch code		For in-vitro diagnostic use only!
	Consult instructions for use		Content		CE labelled
	Caution		Catalogue number		For research use only!



## **EINLEITUNG**

Der **Progesterone ELISA** wird zur quantitativen Bestimmung von Progesteron in Serum und Plasma eingesetzt.

Deutsch

### **Nur für In-vitro Diagnostik.**

## **TESTPRINZIP**

Der Progesterone ELISA ist ein Festphasen-Enzymimmunoassay, der auf dem Prinzip der kompetitiven Bindung basiert.

Die Wells der Mikrotiterplatten sind mit einem polyklonalen Antikörper beschichtet, der gegen eine Antikörper-Bindungsstelle des Progesteron-Moleküls gerichtet ist.

Die Proben werden in die beschichteten Wells gegeben und zusammen mit einem Progesteron-Enzymkonjugat inkubiert. Während der Inkubation konkurriert das Progesteron aus der Probe mit dem Progesteron-Enzymkonjugat um die freien Bindungsstellen auf den beschichteten Wells.

Das nicht gebundene Konjugat wird durch Waschen der Wells entfernt. Anschließend wird die Substratlösung zugegeben und die Farbentwicklung nach einer definierten Zeit gestoppt.

Die Intensität der gebildeten Farbe ist umgekehrt proportional der Progesteron-Konzentration in der Probe. Die Extinktion wird bei 450 nm mit einem Mikrotiterplattenleser gemessen.

## **VORSICHTSMAßNAHMEN**

- Dieser Kit ist nur zum in vitro diagnostischen Gebrauch geeignet.
- Informationen zu im Kit enthaltenen gefährlichen Substanzen entnehmen Sie bitte dem Materialsicherheitsdatenblatt.
- Alle Bestandteile dieses Testkits, die humanes Serum oder Plasma enthalten, wurden mit FDA-geprüften Methoden auf HIV I/II, HbsAg und HCV getestet und als negativ bestätigt. Jedoch sollten alle Bestandteile im Umgang und bei der Entsorgung wie mögliche Gefahrenstoffe betrachtet werden.
- Der Kontakt mit der Stop Solution sollte vermieden werden, da sie 0.5 M H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> enthält. Schwefelsäure kann Hautreizungen und Verbrennungen verursachen.
- Nicht mit dem Mund pipettieren und den Kontakt von Kitbestandteilen und Proben mit Haut und Schleimhäuten vermeiden.
- In den Bereichen, in denen Proben oder Kitbestandteile verwendet werden, nicht rauchen, essen oder Kosmetika verwenden.
- Beim Umgang mit Proben oder Reagenzien Einweg-Latexhandschuhe tragen. Die Verunreinigung von Reagenzien oder Proben mit Mikroben kann zu falschen Ergebnissen führen.
- Der Gebrauch sollte gemäß der Vorschriften einer entsprechenden nationalen Gefahrenstoff-Sicherheitsrichtlinie erfolgen.
- Reagenzien nicht nach dem auf dem Kit-Etikett angegebenen Verfallsdatum verwenden.
- Alle im Kit-Protokoll angegebenen Mengen müssen genau eingehalten werden. Optimale Ergebnisse können nur durch Verwendung kalibrierter Pipetten und Mikrotiterplatten-Lesegeräte erreicht werden.
- Komponenten von Kits mit unterschiedlichen Lotnummern nicht untereinander vertauschen. Es wird empfohlen, keine Wells von verschiedenen Platten zu verwenden, auch nicht, wenn es sich um das gleiche Lot handelt. Die Kits können unter anderen Bedingungen gelagert oder versendet worden sein, so dass die Bindungscharakteristik der Platten leicht unterschiedlich ausfällt.
- Chemikalien und zubereitete oder bereits benutzte Reagenzien müssen gemäß den nationalen Gefahrenstoffvorschriften wie gefährlicher Abfall behandelt werden.
- Materialsicherheitsdatenblätter für dieses Produkt sind auf Anfrage direkt vom Hersteller erhältlich. Die Materialsicherheitsdatenblätter entsprechen den Verordnungen der EU-Richtlinie 91/155 EC.

## BESTANDTEILE DES KITS

### Kitinhalt

96

#### FR E-2531 Microtiterwells

96 Wells, 12x8 Wells (einzeln brechbar); Mit polyklonalen anti-Progesteron-Antikörper beschichtet.

#### Standards

ready to use

	Cat. no.	Standard	Konzentration	Volumen/Flasche
STANDARD A	FR E-2501	Standard A (0)	0 ng/ml	1 ml
STANDARD B	FR E-2502	Standard B (1)	0,3 ng/ml	1 ml
STANDARD C	FR E-2503	Standard C (2)	1,25 ng/ml	1 ml
STANDARD D	FR E-2504	Standard D (3)	2,5 ng/ml	1 ml
STANDARD E	FR E-2505	Standard E (4)	5 ng/ml	1 ml
STANDARD F	FR E-2506	Standard F (5)	15 ng/ml	1 ml
STANDARD G	FR E-2507	Standard G (6)	40 ng/ml	1 ml

Umrechnungsfaktor: 1 ng/mL = 3,18 nmol/L

Enthält 0.03% Proclin 300 + 0.005% Gentamicinsulfat als Konservierungsstoff.

#### CONJUGATE

#### FR E-1340 Enzyme Conjugate (Enzymkonjugat)

1 Fläschchen, 25 ml, gebrauchsfertig; Progesteron mit Meerrettichperoxidase konjugiert;

\* Enthält 0.03% Proclin 300, 0.015% BND und 0.010% MIT als Konservierungsstoff.

#### SUBSTRATE

#### SA E-0055 Substrate Solution (Substratlösung)

1 Fläschchen, 25 mL, gebrauchsfertig; Substratlösung TMB.

#### STOP-SOLN

#### FR E-0080 Stop Solution (Stopplösung)

1 Fläschchen, 14 mL, gebrauchsfertig; Enthält 0,5M H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>.

Kontakt mit der Stopplösung vermeiden! Kann Hautreizungen und Verbrennungen verursachen.

#### WASH-CONC 40x

#### FR E-0030 Wash Solution (Waschlösung)

**40X** konzentriert, 1 Fläschchen, 30 mL; Siehe „Vorbereitung der Reagenzien“.

\* BND = 5-bromo-5-nitro-1,3-dioxane

MIT = 2-methyl-2H-isothiazol-3-one

**Anmerkung:** Zusätzlicher *Standard A* zur Probenverdünnung ist auf Anfrage erhältlich.

### Nicht im Kit enthaltene aber erforderliche Geräte und Materialien

- Kalibriertes Mikrotiterplattenlesegerät mit 450±10 nm Filter)
- Kalibrierte variable Präzisions-Mikropipette
- Saugfähiges Papier
- Aqua dest.

### Lagerung und Haltbarkeit des Kits

Die ungeöffneten Reagenzien behalten bei Lagerung um 2-8°C ihre Reaktivität bis zum Verfallsdatum. Nach dem Verfallsdatum die Reagenzien nicht mehr verwenden.

Nach dem Öffnen sollten alle Reagenzien bei 2-8°C gelagert werden.

Die Mikrotiterwells sollten bei 2-8°C gelagert werden. Der einmal geöffnete Folienbeutel sollte stets sehr sorgfältig wieder verschlossen werden.

Unter den beschriebenen Lagerbedingungen behalten geöffnete Kits zwei Monate ihre Reaktivität.

### Vorbereitung der Reagenzien

Alle Reagenzien sowie die benötigte Anzahl von Wells sollen vor dem Gebrauch auf Raumtemperatur gebracht werden.

### Wash Solution

Die 40-fach konzentrierte Waschlösung (30 mL) mit 1170 mL destilliertem Wasser auf ein Gesamtvolumen von 1200 mL verdünnen.

*Die verdünnte Waschlösung ist bei Raumtemperatur für 2 Wochen stabil.*

## Entsorgung des Kits

Die Entsorgung des Kits muss gemäß den gesetzlichen Vorschriften erfolgen. Spezielle Informationen für dieses Produkt finden Sie im Material Sicherheitsdatenblatt, Kapitel 13.

## Beschädigte Testkits

Im Falle einer starken Beschädigung des Testkits oder der Komponenten muss dem Hersteller in schriftlicher Form spätestens eine Woche nach Erhalt des Kits informiert werden. Stark beschädigte Einzelkomponenten sollten nicht für den Testlauf verwendet werden. Sie müssen gelagert werden bis eine endgültige Lösung gefunden wurde. Danach sollten Sie gemäß den offiziellen Richtlinien entsorgt werden.

## PROBENVORBEREITUNG

Serum oder Plasma (EDTA-, Heparin- oder Zitratplasma) kann in diesem Test als Probenmaterial eingesetzt werden.

Lipämische, ikterische und/oder stark hämolysierte Proben sollten nicht verwendet werden.

Achtung: Proben, die Natriumazid enthalten, sollten für diesen Test nicht verwendet werden.

## Probenentnahme

### Serum:

Blut durch Venenpunktion entnehmen (z.B. mit Sarstedt Monovette # 02.1388.001), gerinnen lassen und das Serum durch Zentrifugation bei Raumtemperatur abtrennen. Vor der Zentrifugation muss die Gerinnung vollständig abgeschlossen sein. Bei Patienten, die Antikoagulantien erhalten, kann die Gerinnungszeit länger dauern.

### Plasma:

Die Blutentnahme erfolgt mit Röhrchen, die ein Antikoagulans enthalten. Das Plasma wird als Überstand nach einer Zentrifugation gewonnen.

(z.B. für EDTA-Plasma Sarstedt Monovette – roter Deckel - # 02.166.001;

für Heparinplasma Sarstedt Monovette – oranger Deckel - # 02.165.001;

für Zitratplasma Sarstedt Monovette – grüner Deckel - # 02.167.001.)

## Probenaufbewahrung

Proben sollten stets gut verschlossen sein und können vor Testbeginn bis zu 24 Stunden bei 2-8°C gelagert werden.

Für eine längere Aufbewahrung sollten die Proben eingefroren bei -20°C bis zum Testbeginn gelagert werden. Nur einmal einfrieren. Aufgetaute Proben sollten vor Testbeginn vorsichtig durchmischt werden, ohne Schaumbildung.

## Probenverdünnung

Wenn in einem ersten Testdurchlauf bei einer Probe eine Konzentration höher als der höchste Standard gefunden wird, kann diese Probe 1:10 oder 1:100 mit *Standard A* weiter verdünnt und nochmals bestimmt werden. Die Verdünnung muss jedoch bei der Berechnung der Konzentration beachtet werden.

### Beispiel:

a) Verdünnung 1:10: 10 µL Serum + 90 µL Standard A gründlich mischen)

b) Verdünnung 1:100: 10 µL Verdünnung a) 1:10 + 90 µL Standard A (gründlich mischen).

## TESTDURCHFÜHRUNG

### Allgemeine Hinweise

Alle Reagenzien und Proben müssen vor Gebrauch auf Raumtemperatur gebracht und gut durchgemischt werden. Dabei sollte Schaumbildung vermieden werden.

Wenn die Testdurchführung einmal begonnen wurde, muss sie ohne Unterbrechung zu Ende geführt werden.

Für jeden Standard, jede Kontrolle oder Probe eine neue Plastikspitze verwenden, um Verschleppungen zu vermeiden.

Die Optische Dichte ist abhängig von Inkubationszeit und Temperatur. Deshalb ist es notwendig, vor Beginn der Testdurchführung alle Reagenzien in einen arbeitsbereiten Zustand zu bringen, die Deckel der Fläschchen zu öffnen, alle benötigten Wells in den Halter zu setzen. Nur eine solche Vorbereitung garantiert gleiche Zeiten für jeden Pipettiervorgang ohne Pausen.

Als generelle Regel gilt, dass die enzymatische Reaktion linear proportional zu Zeit und Temperatur ist.

## Testdurchführung

Jeder Lauf muss eine Standardkurve beinhalten.

1.	Die benötigte Anzahl Wells in der Halterung befestigen.
2.	<b>Je 25 µL</b> Standards, Controls und Proben <u>mit neuen Plastikspitzen</u> in die entsprechenden Wells geben.
3.	<b>5 Minuten</b> bei Raumtemperatur inkubieren.
4.	<b>200 µL</b> Enzyme Conjugate in jedes Well geben. Für 10 Sekunden gut schütteln. Es ist sehr wichtig, in diesem Schritt eine komplette Durchmischung zu erreichen.
5.	<b>60 Minuten</b> bei Raumtemperatur inkubieren.
6.	Den Inhalt der Wells kräftig ausschütteln. Wells 3mal mit verdünnter Waschlösung waschen. Verbleibende Flüssigkeit durch Ausklopfen der Wells auf saugfähigem Papier entfernen. <b>Achtung:</b> Die Sensitivität und Präzision dieses Assays wird erheblich beeinflusst von der korrekten Durchführung des Waschschrilles!
7.	<b>200 µL</b> Substrate Solution in jedes Well geben.
8.	<b>15 Minuten</b> bei Raumtemperatur inkubieren.
9.	Die enzymatische Reaktion durch Zugabe von <b>100 µL</b> Stop Solution in jedes Well abstoppen.
10.	Die Optische Dichte bei <b>450±10 nm</b> mit einem Mikrotiterplatten-Lesegerät innerhalb von <b>10 Minuten</b> nach Zugabe der Stopplösung bestimmen.

## Ergebnisermittlung

- Die durchschnittlichen Werte der Optischen Dichte (OD) für jedes Set von Standards, Controls und Patientenproben bestimmen.
- Eine Standardkurve ermitteln durch Auftragen der mittleren Optischen Dichte jedes Standards gegen die Konzentration, wobei der OD-Wert auf der vertikalen (Y) Achse und die Konzentration auf der horizontalen (X) Achse eingetragen wird.
- Unter Verwendung der mittleren OD wird für jede Probe die entsprechende Konzentration aus der Standardkurve ermittelt.
- Automatische Methode: Die in der Arbeitsanleitung ermittelten Werte wurden automatisch mit Hilfe der 4 Parameter Gleichung (4PL, 4 Parameter Logistics, 4 Parameter Rodbard) bestimmt. Andere Auswertungsfunktionen können leicht abweichende Werte ergeben.
- Die Konzentration der Proben kann direkt von der Standardkurve abgelesen werden. Proben, die eine höhere Konzentration als die des höchsten Standards enthalten, müssen verdünnt werden. Dieser Verdünnungsfaktor muss bei der Berechnung der Konzentration beachtet werden.

## Beispiel für eine Standardkurve

Nachfolgend wird ein typisches Beispiel für eine Standardkurve mit dem Progesterone ELISA gezeigt. Diese Werte sollten **nicht** zur Berechnung von Patientendaten verwendet werden.

Standard	Optische Dichte (450nm)
Standard A (0 ng/mL)	1,52
Standard B (0.3 ng/mL)	1,17
Standard C (1.25 ng/mL)	0,88
Standard D (2.5 ng/mL)	0,69
Standard E (5.0 ng/mL)	0,55
Standard F (15 ng/mL)	0,35
Standard G (40 ng/mL)	0,13

## ERWARTETE WERTE

Es wird empfohlen, dass jedes Labor seine eigenen normalen und abnormalen Werte ermittelt.

In einer Studie wurden die Proben von gesunden Erwachsenen untersucht. Dabei ergaben sich mit dem Progesterone ELISA folgende Werte:

### Frauen

- Follikelphase 0,2 - 1,4 ng/mL
- Lutealphase 4 - 25 ng/mL
- Menopause 0,1 - 1 ng/mL

### Männer

0,1 - 1 ng/mL

## QUALITÄTS-KONTROLLE

Es wird empfohlen, die Kontrollproben gemäß den nationalen gesetzlichen Bestimmungen einzusetzen. Durch die Verwendung von Kontrollproben wird eine Tag-zu-Tag Überprüfung der Ergebnisse erzielt. Es sollten Kontrollen sowohl mit normalem als auch pathologischem Level eingesetzt werden.

Die Kontrollen mit den entsprechenden Ergebnissen des QC-Labors sind im QC-Zertifikat, das dem Kit beiliegt, aufgeführt. Die im QC-Blatt angegebenen Werte und Bereiche beziehen sich stets auf die aktuelle Kitcharge und sollten zum direkten Vergleich der Ergebnisse verwendet werden.

Es wird ebenfalls empfohlen, an nationalen oder internationalen Qualitätssicherungs-Programmen teilzunehmen, um die Genauigkeit der Ergebnisse zu sichern.

Es sollten geeignete statistische Methoden zur Analyse von Kontroll-Werten und Trends angewendet werden. Wenn die Ergebnisse des Assays nicht mit den angegebenen Akzeptanzbereichen des Kontrollmaterials übereinstimmen, sollten die Patientenergebnisse als ungünstig eingestuft werden.

In diesem Fall überprüfen Sie bitte die folgenden Bereiche: Pipetten und Zeitnehmer, Photometer, Verfallsdatum der Reagenzien, Lagerungs- und Inkubationsbedingungen, Absaug- und Waschmethode.

Sollten Sie nach Überprüfung der vorgenannten Bereiche keinen Fehler erkannt haben, setzen Sie sich bitte mit Ihrem Lieferanten oder direkt mit dem Hersteller in Verbindung.

## ASSAY CHARACTERISTIKA

### Messbereich

Der Messbereich des Testes liegt zwischen 0 – 40 ng/mL.

### Spezifität der Antikörper (Kreuzreaktivität)

Folgende Substanzen wurden auf mögliche Kreuzreaktion im Progesterone-ELISA geprüft:

Steroid	Kreuzreaktion (%)
Progesteron	100,00
17 $\alpha$ OH Progesteron	0,30
Estriol	< 0,10
Estradiol 17 $\beta$	< 0,10
Testosteron	< 0,10
11-Desoxycorticosteron	1,10
DHEA-S	< 0,02
Cortisol	< 0,02
Corticosteron	0,20
Pregnenolon	0,35
Cortison	< 0,10
11-Desoxycortisol	0,10

### Analytische Sensitivität

Die analytische Sensitivität, definiert als Mittelwert minus der zweifachen Standardabweichung des Standards A (n = 20), beträgt 0,045 ng/mL.

Die Daten zu:

### Präzision

### Wiederfindung

### Linearität

entnehmen Sie bitte der ausführlichen englischen Arbeitsanleitung.

## GRENZEN DES TESTS

### Interferenzen

Jede unsachgemäße Behandlung von Proben oder Modifikationen dieses Tests können die Ergebnisse beeinflussen.

Hämoglobin (bis zu 4 mg/mL), Bilirubin (bis zu 0,5 mg/mL) und Triglyceride (bis zu 1,8 mg/mL) haben keinen Einfluss auf das Testergebnis.

### Beeinflussung durch Medikamente

Uns sind bislang keine Stoffe (Medikamente) bekannt geworden, deren Einnahme die Messung des Progesteron-Gehaltes der Probe beeinflussen würde.

### High-Dose-Hook Effekt

Ein Hook Effekt tritt in diesem Test nicht auf.

## RECHTLICHE GRUNDLAGEN

### Zuverlässigkeit der Ergebnisse

Der Test muss exakt gemäß der Testanleitung des Herstellers abgearbeitet werden. Darüber hinaus muss der Benutzer sich strikt an die Regeln der GLP (Good Laboratory Practice) oder andere eventuell anzuwendende Regeln oder gesetzliche Vorgaben halten. Dies betrifft besonders den Gebrauch der Kontrollreagenzien. Es ist sehr wichtig, bei der Testdurchführung stets eine ausreichende Anzahl Kontrollen zur Überprüfung der Genauigkeit und Präzision mitlaufen zu lassen.

Die Testergebnisse sind nur gültig, wenn alle Kontrollen in den vorgegebenen Bereichen liegen, und wenn alle anderen Testparameter die vorgegebenen Spezifikationen für diesen Assay erfüllen. Wenn Sie bezüglich eines Ergebnisses Zweifel oder Bedenken haben, setzen Sie sich bitte mit dem Hersteller in Verbindung.

### Therapeutische Konsequenzen

Therapeutische Konsequenzen sollten keinesfalls nur aufgrund von Laborergebnissen erfolgen, selbst dann nicht, wenn alle Testergebnisse mit den in „Zuverlässigkeit der Ergebnisse“ genannten Voraussetzungen übereinstimmen. Jedes Laborergebnis ist nur ein Teil des klinischen Gesamtbildes eines Patienten.

Nur in Fällen, in denen die Laborergebnisse in akzeptabler Übereinstimmung mit dem allgemeinen klinischen Bild des Patienten stehen, sollten therapeutische Konsequenzen eingeleitet werden.

Das Testergebnis allein sollte niemals als alleinige Grundlage für die Einleitung therapeutischer Konsequenzen dienen.

### Haftung







Jegliche Veränderungen des Testkits und/oder Austausch oder Vermischung von Komponenten unterschiedlicher Chargen von einem Testkit zu einem anderen, können die gewünschten Ergebnisse und die Gültigkeit des gesamten Tests negativ beeinflussen. Solche Veränderungen und/oder Austausch haben den Ausschluss jeglicher Ersatzansprüche zur Folge.

Reklamationen, die aufgrund von Falschinterpretation von Laborergebnissen durch den Kunden gemäß Punkt „Therapeutische Konsequenzen“ erfolgen, sind ebenfalls abzuweisen. Im Falle jeglicher Reklamation ist die Haftung des Herstellers maximal auf den Wert des Testkits beschränkt. Jegliche Schäden, die während des Transports am Kit entstanden sind, unterliegen nicht der Haftung des Herstellers.

## REFERENZEN

Angaben zu den Referenzen entnehmen Sie bitte der ausführlichen englischen Arbeitsanleitung.

### Symbole:

	Lagertemperatur		Hersteller		Enthält Testmaterial für <n> Teste
	Verwendbar bis	<b>LOT</b>	Chargennummer	<b>IVD</b>	In vitro Diagnostikum
	Vor Gebrauch Packungsbeilage lesen	<b>CONT</b>	Inhalt	<b>CE</b>	CE gekennzeichnet
	Achtung	<b>REF</b>	Katalog-Nummer	<b>RUO</b>	Nur für Forschungszwecke