

Progesterone kit

ELISA Testkit zur quantitativen Bestimmung
 der Progesteron-Konzentration in humanem Blutserum
(Gebrauchsanweisung: Seite 4)

Enzyme immunoassay for quantitative
 determination of progesterone in human serum
(Instructions for use: page 29)

Manueller Test / Manual test
 Automatisierter Test / Automated test

Abschnitt / Section 13
Abschnitt / Section 14



Progesterone Kit
 (Manueller Test)
 Progesterone kit
 (manual test)



96 Untersuchungen
 96 tests

21-03



Progesterone Kit
 (Automatisierter Test für
 "Alisei")
 Progesterone kit
 (automated test for "Alisei")













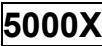














96 Untersuchungen
 96 tests

21-03 A



1.KENNZEICHEN / SYMBOLS LEGEND

	In-vitro Diagnostika In vitro diagnostic medical device		EG-Konformitätserklärung EC Declaration of conformity
	Bestellnummer Catalogue number		Chargenbezeichnung Batch code
	Verwendbar bis Use by		Hersteller Manufacturer
	Herstellungsdatum Date of manufacture		Gebrauchsanweisung beachten Consult operating instructions
	Temperaturbegrenzung Temperature limitation		Biogefährdung Biological risks
	Trial-Lösung, 5000x konzentriert Trial, 5000X concentrated		Konjugat Conjugate
			
	Beschichtete Mikrotiterplatte (96 Kavitäten) Coated microplate (96 wells)		Substrat Substrate
	Waschlösung, 20x konzentriert Wash solution, 20X concentrated		Stopplösung Stop solution
			
	Kalibratoren Calibrators		Optische Dichte Optical density
	Kontrolle Control		Ausreichend für < n > Prüfungen Contains sufficient for <n> tests
	Auflösen mit angegebenem Volumen Reconstitute with specified volume of liquid		Deionisiertes, destilliertes Wasser Deionized or distilled water
			Reizend Irritant
		Warning	

2. VERWENDUNGSZWECK

Der **Progesterone Testkit** ist für die **quantitative Bestimmung** von Progesteron in **humanem Blutserum** bestimmt.

Der Testkit ist in zwei Variationen erhältlich:

REF 21-03 Für den manuellen Gebrauch

REF 21-03 A Für den Gebrauch mit ELISA-Automat "Alisei", hergestellt durch die Firma Next Level S.r.l.

Die Gebrauchsanweisungen befinden sich:

Abschnitt 13 Manueller Test

Abschnitt 14 Automatisierter Test "Alisei"

Anmerkung 1: *Die Konzentrationswerte der Kalibratoren können bei manuellem und automatisiertem Testkit variieren.*

Anmerkung 2: *Wir garantieren verlässliche Testergebnisse bei folgender Anwendung der Testkits:*

REF 21-03 A *nur für ELISA-Automat "Alisei"*

REF 21-03 *nur für den manuellen Gebrauch.*

Bei Verwendung einer nicht vordefinierten Methode ist der Anwender dafür verantwortlich, sicherzustellen, dass diese für ELISA-Kits angemessen getestet wurde.

Das Progesteron ist ein Steroidhormon mit einer Molekularmasse von 314 Da. Die quantitative Bestimmung der Progesteron-Konzentration im Serum ist ein wichtiges Werkzeug bei der Beurteilung des Funktionszustandes des *Corpus Luteum* (Gelbkörper). Es wird ebenfalls zur Überwachung der Schwangerschaft verwendet und kann zu Forschungszwecken durchgeführt werden.

3. TESTPRINZIP

Der **Progesterone Testkit** ist ein kompetitiver Festphasen-Immunoassay. Während der Inkubation binden sowohl das Progesteron der zu testenden Probe als auch das Progesteron-HRP-Konjugat an die Antikörper, die an der festen Phase der Mikrotiterplatten gekoppelt sind, bis sich ein Gleichgewicht einstellt. Beim Leeren der Kavitäten wird freies Progesteron von dem an die Antikörper gebundenem Progesteron und Progesteron-HRP-Konjugat getrennt. Dabei ist die Menge des gebundenen Konjugates umgekehrt proportional zur Menge des Progesteron in der Probe (Abb.1).

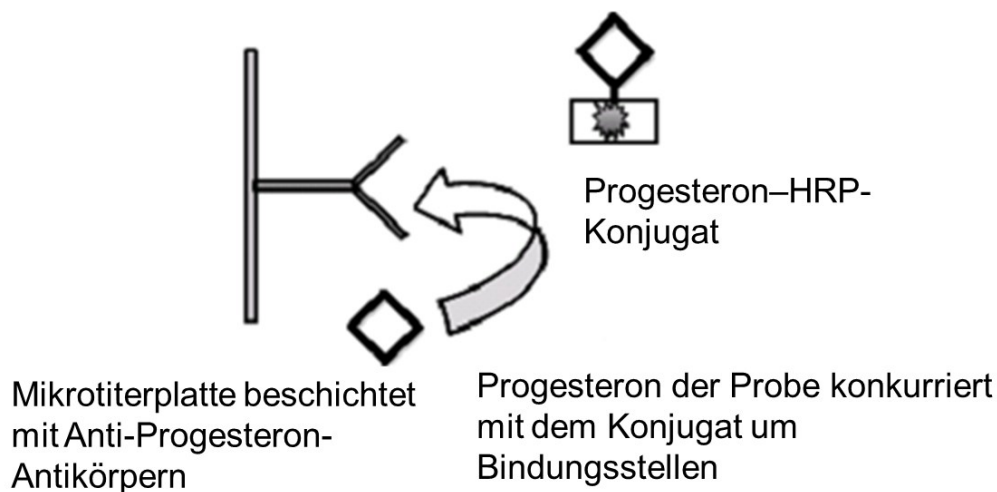


Abb.1 Testschema

Während der Inkubation mit der TMB-Lösung entwickelt sich die Farbreaktion. Die Farbintensität ist indirekt proportional zur Progesteron-Konzentration in der Probe. Die Progesteron-Konzentration in der Patientenprobe wird mit einer Standardkurve, die mit dem Testkit erarbeitet wird, ausgelesen.

4. LAGERUNG UND STABILITÄT DES TESTKITS

Das Verfallsdatum des kompletten Testkits ist auf dem Außenetikett angegeben; das Verfallsdatum jeder einzelnen Testkomponente ist auf dem jeweiligen Etikett angegeben.

Der **Progesterone Testkit** ist nach dem Empfang bei +2...+8 °C in der Originalverpackung des Herstellers bis zum Ablauf der Haltbarkeit zu lagern. Eine Lagerung bei Temperaturen bis +25 °C ist maximal für 5 Tage zulässig.

Die Haltbarkeitsdauer des Kits beträgt 18 Monate.

Nach dem Öffnen ist der Testkit bei einer Lagerung bei +2...+8 °C bis zu 12 Monate haltbar.

Wenn der Testkit in mehreren getrennten Experimenten verwendet wird, ist der Inhalt nach dem Öffnen wie folgt zu lagern aber die Komponenten dürfen nie länger als bis zu ihrem Ablaufdatum verwendet werden:

- Die ungenutzten Mikrotiterplatten-Streifen: in einem fest verschlossenen Druckverschlussbeutel bei von +2...+8 °C bis zu Verfallsdatum;
- Fläschchen mit Konjugat, Kalibratoren und Kontrolle (gebrauchsfertig): bei +2...+8 °C für 12 Monate;
- Fläschchen Kalibratoren und Kontrolle (gelöst aus Lyophilisat) bei +2...+8 °C für maximal 1 Monat nach dem Öffnen;
- Fläschchen mit Substrat-Lösung: bei einer Temperatur von +2...+8 °C bis zum Haltbarkeitsdatum, **lichtgeschützt**;
- Fläschchen des Trial- und Waschlösung-Konzentrates und der Stopplösung: bei +2...+8 °C bis zum Verfallsdatum;
- Gebrauchsfertige Waschlösung: in einem dicht verschlossenen Behälter bei Raumtemperatur (+18...+25

°C) für maximal 5 Tage oder bei +2...+8°C für maximal 4 Wochen;

- Gebrauchsfertige Trial-Lösung: in einem dicht verschlossenen Behälter bei Raumtemperatur (+18...+25 °C) für maximal 5 Tage.

Beschädigte Testkits

Im Falle einer schweren Beschädigung des Testkits oder der Komponenten muss Astra Biotech GmbH schriftlich innerhalb einer Woche nach dem Empfang der Ware informiert werden. Der Gebrauch stark beschädigter Komponenten für einen Testlauf wird nicht empfohlen.

5. PROBENGEWINNUNG UND -LAGERUNG

Blut durch Venenpunktion entnehmen. Nach der Gerinnung wird das Serum durch Zentrifugation abgetrennt.

Es ist nicht zulässig, für eine Analyse Blutplasma, hämolysiertes (hell rot) oder lipämisches (milchig) Serum sowie Natriumazid-haltige Serumproben zu benutzen.

Die Proben sind bei der Temperatur von +2...+8 °C nicht länger als 2 Tage zu lagern. Bei Notwendigkeit einer dauerhaften Aufbewahrung wird empfohlen, die Probe zu aliquotieren und bei Temperatur von ≤ -20 °C gefroren zu lagern. Ein wiederholtes Einfrieren ist zu vermeiden.

6. REFERENZWERTE

Mit Hilfe des **Progesterone Testkits** wurden 60 Blutserumproben (n), die von 9 bis 11 Uhr bei gesunden 21-45 jährigen Männern und Frauen entnommen wurden, untersucht.

Die ermittelten Konzentrationswerte sind in folgender Tabelle dargestellt. Der angegebene Bereich dient jedoch nur als eine Orientierungshilfe.

Es wird ausdrücklich empfohlen, dass jedes Labor einen eigenen Referenzbereich für die Progesteron-Normkonzentrationen bestimmt.

Gruppe	n	Progesteron-Konzentrationsbereich (nmol/l)
Frauen	60	
Follikelphase		<0,5- 6
Lutealphase		10- 89
Männer		<0,5- 5,2

7. QUALITÄTSKONTROLLE

Es wird empfohlen, Kontrollproben entsprechend der nationalen und regionalen Vorschriften zu benutzen. Der Einsatz der Kontrollproben sichert die Tag-zu-Tag Gültigkeit der Ergebnisse.

8. REAGENZIVORBEREITUNG

Vor dem Gebrauch müssen alle Reagenzien auf Raumtemperatur (+18...+25 °C) gebracht und gründlich gemischt werden.

MP Mikrotiterplatte

Die Verpackung der **Mikrotiterplatte** vor dem Öffnen mindestens 30 Minuten bei Raumtemperatur (+18...+25 °C) lagern und anschließend wie folgt vorbereiten:

- Notwendige Anzahl der Streifen in den Rahmen einsetzen. Die unbenutzten Streifen in einen Druckverschlussbeutel legen und gut verschließen.

CAL CONTROL Kalibratoren und Kontrolle

Flüssige Kalibratoren und die flüssige Kontrolle sind gebrauchsfertig.

Die lyophilisierten Kalibratoren und die Kontrolle wie folgt vorbereiten:

- Durch leichtes Klopfen auf den Deckel wird der Feststoff vom Flaschenrand gelöst.
- Die Fläschchen werden vorsichtig geöffnet und die Deckelkappen umgedreht auf eine trockene und saubere Oberfläche gelegt.
- 0,5 ml destilliertes oder deionisiertes Wasser wird jeweils in die lyophilisierten Kalibratoren und die Kontrolle pipettiert, diese wieder mit dem jeweiligen Deckel verschlossen und 10 Minuten bei Raumtemperatur ohne Mischen inkubiert.
- Danach unter Vermeidung einer Schaumbildung sorgsam rühren bis der Feststoff komplett gelöst ist. Weitere 10 Minuten bei Raumtemperatur (+18...+25°C) unter periodischem Schütteln inkubieren. Es darf kein Feststoff im Deckel oder an den Wänden der Fläschchen zurückbleiben.

WASH P Waschlösung

Zubereitung der benötigten Menge der **Waschlösung** durch 20fache Verdünnung des Konzentrates mit destilliertem oder deionisiertem Wasser:

5 ml **WASH P 20X** + 95 ml Wasser

Sorgfältig mischen, Schaumbildung vermeiden.

SUB Substrat vor direktem Licht schützen.

9. PROBENVORBEREITUNG

Proben auf Raumtemperatur (+18...+25 °C) bringen und sorgfältig mischen, um Homogenität zu erreichen.

10. TESTCHARAKTERISTIKA

10.1 Kalibrierung:

Der **Progesterone Testkit** wurde gegen einen nach gravimetrischer Methode hergestellten Arbeitsstandard kalibriert. Die gravimetrische Methode basiert auf dem Abwiegen von aufgereinigtem, synthetischem Progesteron in einer analytenfreien Matrix.

10.2 Spezifität:

Die Kreuzreaktivität der monoklonalen Anti-Progesteron-Antikörpern mit unterschiedlichen Steroiden ist in folgender Tabelle dargestellt:

Steroid	Kreuzreaktivität, %
Progesteron	100
5- α -Pregnan-3,20-Dion	10,5
17-OH-Progesteron	1,0
Corticosteron	0,01
Pregnenolon	0,90
11-Desoxycorticosteron	0,30
11-Desoxycortisol	0,03
Cortisol	0,005

10.3 Analytische Sensitivität:

Die analytische Sensitivität des **Progesterone Testkits**, d.h. die minimale Konzentration, die sich vom Kalibrator 0 sicher unterscheiden lässt, beträgt 0,5 nmol/l beim manuellen Gebrauch und 5,5 nmol/l beim automatisierten Test mit „Alisei“.

Zur Ermittlung wurde der Mittelwert einer 10fach-Bestimmung der OD des Kalibrators 0 unter Berücksichtigung der Standardabweichung (minus 2 SD) gebildet.

10.4 Messbereich:

Der **Progesterone Testkit** ist validiert für die Detektion einer Progesteron-Konzentration innerhalb eines Bereiches von 0,5 bis 100 nmol/l für den manuellen Test und von 5,5 bis 300 nmol/l für den Alisei Test.

10.5 Messeinheit:

Die Konzentrationen der Kalibratoren im **Progesterone Testkit** sind in nmol/l angegeben. Zur Umrechnung in ng/ml, wird die Konzentration (nmol/l) mit 0,314 multipliziert.

10.6 Intra-Assay und Inter-Assay Varianz (Präzision):

Um einen **Intra-Assay Variationskoeffizienten** festzulegen, wurden 8 Blutserumproben, jeweils in 9fach-Bestimmung untersucht. Die Testresultate sind in der Tabelle dargestellt:

Manuelles Testkit

Probe	Mittlere Progesteron- Konzentration, nmol/l	Intra-Assay VK	
		SD	VK, %
1	2,3	0,20	8,8
2	4,5	0,34	7,5
3	7,5	0,34	4,5
4	12,4	0,26	2,1
5	19,3	0,54	2,8
6	26,3	0,88	3,3
7	59,3	2,37	4,0
8	59,0	2,24	3,8

Alisei Testkit

Probe	Mittlere Progesteron- Konzentration, nmol/l	Intra-Assay VK	
		SD	VK, %
1	7,8	0,48	6,1
2	12,5	0,96	7,7
3	20,2	1,48	7,3
4	33,7	1,58	4,7
5	50,6	1,67	3,3
6	61,4	1,42	2,3
7	77,1	1,54	2,0
8	85,2	1,72	2,0

Um einen **Inter-Assay Variationskoeffizient** festzulegen, wurden 5 Blutserumproben dreimal mit einem Intervall von 1 Woche von verschiedenen Anwendern untersucht.

Jede Probe wurde 9 Mal gemessen. Die Testergebnisse sind in der Tabelle dargestellt:

Manuelles Testkit

Probe	Mittlere Progesteron-Konzentration, nmol/l			Inter-Assay VK	
	1. Test	2. Test	3. Test	SD	VK, %
1	1,2	1,5	1,3	0,15	11,5
2	3,7	4,4	4,0	0,35	8,7
3	13,2	15,2	14,1	1,00	7,1
4	44,2	46,1	48,4	2,10	4,5
5	52,0	55,5	58,7	3,35	6,0

Alisei Testkit

Probe	Mittlere Progesteron-Konzentration, nmol/l			Inter-Assay VK	
	1. Test	2. Test		1. Test	2. Test
1	7,8	8,5	8,7	0,47	5,7
2	12,5	11,3	12,0	0,60	5,0
3	20,2	23,1	22,0	1,46	6,7
4	33,7	32,5	36,1	1,83	5,4
5	50,6	49,9	51,4	0,75	1,5
6	61,4	70,8	62,9	5,05	7,8
7	77,1	86,0	82,4	4,48	5,5
8	85,2	88,6	94,2	4,54	5,1

11. GRENZEN DER METHODE

Eine klinische Diagnose sollte nicht allein mit Hilfe der Ergebnisse einer einzelnen diagnostischen Methode erhoben werden. Zur Diagnosestellung sollten vom Arzt alle verfügbaren klinischen und Laborbefunde berücksichtigt werden.

12. VORSICHTSMAßNAHMEN



- **Der Testkit ist ausschließlich zum in vitro–Gebrauch bestimmt.** Um zuverlässige Testergebnisse zu erhalten, ist die Arbeitsanleitung strikt einzuhalten. Diese Gebrauchsanweisung ist nur für den vorliegenden Testkit mit dem aufgeführten Packungsinhalt gültig. Jeglicher

Austausch der Kitkomponenten ist durch die CE-Regularien nicht gestattet.



- Der Testkit oder einzelne Kit-Komponenten dürfen nach Ablauf des auf der Verpackung angegebenen Verfallsdatums nicht mehr verwendet werden. Die Haltbarkeit der verdünnten Komponenten muss ebenfalls berücksichtigt werden.
- Das Mischen oder die gleichzeitige Verwendung von Reagenzien verschiedener Testchargen, ausgenommen Substrat, Stopp- und Waschlösung, ist nicht gestattet.
- Substrat, Stopplösung und Waschlösung anderer Hersteller nicht verwenden.
- Nur "P"-gekennzeichnete Astra Biotech Waschlösung benutzen.
- Die Stopplösung ist eine 1 N Salzsäure (HCl-Lösung). Vermeiden Sie Haut- und Schleimhautkontakt.

Bei Haut- oder Schleimhautkontakt den betroffenen Bereich mit fließendem Wasser spülen und gegebenenfalls einen Arzt aufsuchen.

- Bitte folgende bekannte Verfahrensregeln beachten:
 - Reagenzien unmittelbar nach dem Waschen in die Kavitäten pipettieren;
 - Kontamination der Lösungen vermeiden;
 - Bei teilweiser Nutzung des Testkits nur benötigtes Volumen in ein gesonderten Behälter geben;
 - Nicht benutzte Reagenzien NICHT zurück in die ursprünglichen Original-Fläschchen füllen;
 - Direkte Sonneneinstrahlung während der Inkubation vermeiden;

- Reagenzien in gleicher Reihenfolge pipettieren, um Unterschiede in den Reaktionszeiten zwischen den Kavitäten zu vermeiden. Die gesamte Pipettierzeit für Kalibratoren, Kontrolle und Proben darf 15 Minuten nicht überschreiten;
 - Die Temperatur der Inkubation aller immunologischen Reaktionen muss bei +37 °C liegen;
 - Den Boden der Kavitäten nicht berühren;
 - Kalibratoren müssen bei jedem Testlauf gemessen werden. Es wird außerdem empfohlen, die Progesteron-Konzentration der Kontrolle zu bestimmen;
 - Entfernen Sie die Klebeschutzfolie vorsichtig um eine Kontamination zu vermeiden und verwenden Sie dieselbe Klebeschutzfolie nicht erneut.
- Die TMB-Lösung sollte farblos sein. Eine helle Färbung der Lösung ist zulässig. Vermeiden Sie direkte Sonneneinstrahlung des Substrates.
 -  Alle Reagenzien dieses Testkits, die humanen Ursprungs sind, ergaben bei der Prüfung auf HBsAg (Hepatitis B surface Antigen) bzw. Antikörper gegen HIV („Human Immunodeficiency Virus“) und HCV (Hepatitis C Virus) ein negatives Ergebnis. Dennoch kann das Vorhandensein infektiöser Erreger durch keinen Test mit absoluter Sicherheit ausgeschlossen werden. Die Reagenzien und Proben sollten deshalb immer wie potentiell infektiöses Material behandelt werden.
 -  Nach dem Gebrauch werden Streifen, Kalibratoren, Kontrollen, Proben und alle Verbrauchsmittel (Reaktionsgefäße, Fläschchen, Handschuhe,

Pipettenspitzen), die mit den Proben während der Bearbeitung oder Lagerung in Kontakt kamen, separat gesammelt und autoklaviert. Pipettenspitzen können anstelle des Autoklavierens durch Inkubation in desinfizierenden Substanzen sterilisiert werden. Nach der Sterilisation können alle Komponenten und Einmal-Artikel als nicht gefährlicher Müll behandelt werden. Andere Kitbestandteile werden auf konventionelle Weise entsorgt.

-  Während der manuellen Waschprozedur Überstände nicht in den Abfluss geben, sondern in einen Behälter mit Desinfektionsmittel.
-  Beim Umgang mit potentiell infektiösem Material müssen die folgenden Vorsichtsmaßnahmen beachtet werden:
 - Im Laborraum nicht rauchen, nicht trinken und nicht essen;
 - Schutzhandschuhe verwenden;
 - Nie mit dem Mund pipettieren;
 - Verspritzen von Flüssigkeiten vermeiden. Sollte doch Flüssigkeit vergossen worden sein, diese sofort aufnehmen und die verschmutzte Oberfläche desinfizieren.
- Bei der Verwendung des Testkits müssen die Anforderungen der guten Laborpraxis (GLP) inklusive aller Richtlinien beachtet werden.



Der Testkit beinhaltet Reizstoffe (**CONJ**, **CAL**, **CONTROL**). Daher sollten folgende Vorsichtsmaßnahmen beachtet werden:

- P261 - Einatmen von Staub / Rauch / Gas / Nebel / Dampf / Aerosol vermeiden;
- P272 - Kontaminierte Arbeitskleidung nicht außerhalb des Arbeitsplatzes tragen;
- P280 - Schutzhandschuhe / Schutzkleidung / Augenschutz / Gesichtsschutz tragen;
- P302+P352 - Bei Berührung mit der Haut: Mit viel Wasser und Seife waschen;
- P333+P313 - Bei Hautreizung oder -ausschlag: Ärztlichen Rat einholen / ärztliche Hilfe hinzuziehen;
- P363 - Kontaminierte Kleidung vor erneutem Tragen waschen;
- P501 - Inhalt/Behälter den nationalen Vorschriften entsprechend der Entsorgung zuführen.

Die Vorsichtsmaßnahmen entsprechen der Verordnung EG Nr. 1272/2008.

13. MANUELLER TEST (REF 21-03)

13.1 Packungsinhalt

MP	Mikrotiterplatte: Zwölf Streifen mit acht Kavitäten (insgesamt 96 Kavitäten), beschichtet mit monoklonalen Anti-Progesteron-Antikörpern	1 Platte
CONJ	Konjugat: Lösung aus Progesteron konjugiert mit Meerrettich Peroxidase (HRP)	18 ml, gebrauchsfertig
0-5 CAL	Progesteron Kalibratoren: Protein-basierter Puffer oder Lyophilisate mit definierter Progesteron-Konzentration - 0; 1; 3; 10; 30; 100 nmol/l (ungefähre Werte - verwenden Sie die Daten nicht für die Auswertung des Assays). Die Konzentrationen der Kalibratoren können sich zwischen Protokoll 1 und 2 unterscheiden. Die exakten Lot spezifischen Progesteron-Konzentrationen sind im Quality Control Sheet angegeben.	6 Fläschchen, je 0,5 ml gebrauchsfertig oder lyophilisiert
CONTROL	Progesteron Kontrolle: Protein - basierter Puffer oder Lyophilisate mit definierter Progesteron-Konzentration. Der Konzentrationsbereich kann sich zwischen Protokoll 1 und 2 unterscheiden. Der Lot spezifische Progesteron-Konzentrationsbereich ist im Quality Control Sheet angegeben.	0,5 ml, gebrauchsfertig oder lyophilisiert
SUB	Substrat (TMB-Lösung): 3,3',5,5'-Tetramethylbenzidin in Citrat-Puffer, mit Wasserstoffperoxid	14 ml, gebrauchsfertig

WASH P 20X	Waschlösung P, 20x konzentriert, Tensid in Salzlösung, ausreichend für die Vorbereitung von 560 ml Lösung.	2x14 ml konzentriert
STOP	Stopplösung: 1 N HCl - Lösung	14 ml, gebrauchsfertig
	Klebeschutzfolie	2x1 Folie (optional)

13.2 Erforderliche, aber nicht mitgelieferte Materialien und Equipment

- geeichte, verstellbare Einkanal-Pipetten mit Einweg-Pipettenspitzen
- geeichte, verstellbare 8-Kanal-Pipette mit Einweg-Pipettenspitzen
- Mikrotiterplatten-Inkubator (+37 °C) oder Mikrotiterplatten/Inkubator-Schüttler (+37 °C, 500-800 rpm);
- Equipment zum manuellen oder automatischen Waschen
- Spektralphotometer für Mikrotiterplatten (450 nm)
- Vortexer
- Destilliertes oder entionisiertes Wasser
- Messzylinder, Becherglas
- Labor-Handschuhe
- Behälter zum Pipettieren mit 8-Kanal-Pipette
- Desinfektionsmittel
- Absorbierendes Material (zum manuellen Waschen)

13.3 Testablauf

Der **Progesterone Testkit** ist für 96 Untersuchungen bestimmt. Vorbehaltlich einer gleichzeitigen Anwendung aller Streifen reicht ein Testkit für eine quantitative

Doppelbestimmung von 40 Serumproben, 6 Kalibratoren, 1 Kontrolle und 1x Blank (=OD der TMB-Lösung).

13.3.1 Assay-Durchführung

Anmerkung: Bitte überprüfen Sie auf dem mit dem Kit gelieferten Quality Control Sheet, für welches Assay-Protokoll Ihr Kit validiert wurde. Wenn Ihr Kit für das Assay Protocol 1 validiert wurde, folgen Sie bitte dem unten beschriebenen Assay Protocol 1. Wenn Ihr Kit zusätzlich für das Assay Protocol 2 validiert wurde, beachten Sie bitte die Ergänzung 1 zu der mit dem Kit gelieferten Gebrauchsanweisung.

Assay-Protokoll 1

(siehe auch Assay-Schema für Assay-Protokoll 1, Abschnitt 13.5)

Anmerkung: Dazugehörige Konzentrationen der Kalibratoren und Kontrollbereiche für das Assay-Protokoll 1 sind im Quality Control Sheet enthalten.

- A. 20 µl Kalibratoren CAL (0-5), Kontrolle CONTROL und vorbereitete Serumprobe in Zweifachbestimmung in entsprechende Kavitäten pipettieren. Kavitäten A1-A2 bleiben frei («Blank»)!**
- B. 150 µl Konjugat CONJ in alle Kavitäten, außer Kavitäten A1-A2, pipettieren.**

Anmerkung: Die Gesamtzeit der Pipettiertschritte darf 15 Minuten nicht überschreiten, da es somit zu einer erheblichen Variation der Inkubationszeit zwischen den Proben kommt und das Testergebnis somit unzuverlässig sein kann.

Anmerkung: *Wenn eine Klebeschutzfolie verwendet wird, nutzen sie diese jetzt um die Mikrotiterplatten zu verschließen.*

C. 60 Minuten bei **+37 °C** unter Schütteln (**500 bis 800 rpm**) inkubieren.

Anmerkung: *Wenn eine Klebeschutzfolie verwendet wird, entfernen sie diese nun vorsichtig von der Mikrotiterplatte.*

D. 4x, wie unten beschrieben, waschen.

E. 100 µl Substrat SUB in jede Kavität pipettieren (auch Blank); Streifen entweder **bei Raumtemperatur** (+18...+25 °C) **im Dunkeln** für **15–30 Minuten** (abhängig von der Farbintensität) oder für **10 Minuten bei +37 °C** unter Schütteln (**500-800 rpm**) inkubieren.

F. 100 µl Stopplösung STOP in alle Kavitäten (auch Blank) in selber Reihenfolge und Geschwindigkeit wie das Substrat pipettieren und für **1-2 Minuten** bei **Raumtemperatur schütteln**.

G. Messen der **Optischen Dichte** bei **450 nm innerhalb von 20 Minuten**.

13.3.2 Waschen

Es wird empfohlen, ein automatisches Mikroplatten-Waschgerät mit 4 Waschzyklen und einem jeweiligen Waschvolumen von 300 µl pro Kavität und Zyklus zu benutzen.

Die Waschprozedur kann ebenso manuell durchgeführt werden:

- Überstand aus den Kavitäten in einen Behälter mit Desinfektionsmittel werfen.

- 300 µl der vorbereiteten Waschlösung (Abschnitt 8) in jede Kavität geben, die Platte für 5 bis 10 Sekunden sorgfältig schütteln und den Überstand verwerfen. 4 Mal wiederholen.
- Ausklopfen der Kavitäten auf einer saugfähigen Unterlage bis alle Flüssigkeit entfernt ist.

13.4 Datenverarbeitung

Bei Benutzung eines Photometers, welcher keine Nullstellung erlaubt, wird der OD-Wert der Kavitäten A1-A2 (Blank) von allen anderen OD-Werten vor weiterer Kalkulation subtrahiert. *Beispiel:*

OD (Kalibrator 0) gemessen = 2,28 und OD (Blank) = 0,06;
OD (Kalibrator 0) berechnet = $2,28 - 0,06 = \underline{2,22}$

13.4.1 Datenverlässlichkeit (OD gemessen bei 450 nm)

Die Daten sollten folgende Kriterien erfüllen:

- Mittelwert der OD des Blank (der Kavitäten A1-A2) $\leq 0,100$;
- Mittelwert der OD des Kalibrators 0 $\geq 1,00$ (nach Blank Subtraktion);
- Konzentration der Kontrolle muss innerhalb des Bereiches liegen, welcher auf dem Quality Control Sheet angegebenen ist.

Sollten die gemessenen Daten die Bedingungen nicht erfüllen, werden die Resultate als unzulässig betrachtet und der Test sollte wiederholt werden.

13.4.2 Quantitative Bestimmung

Eine spezialisierte Software zur quantitativen Bestimmung wird empfohlen. Die Mittelwerte der OD der Kalibratoren

werden gegen deren jeweilige Progesteron-Konzentration mittels **4PL Näherung** (Abb. 2 Typische Standardkurve) aufgetragen. Die Progesteron-Konzentration der Probe wird mit der Standardkurve ermittelt.

Eine Extrapolation der Standardkurve für Progesteron-Konzentrationswerte, die die Konzentration in Kalibrator 5 überschreiten, ist nicht zulässig.

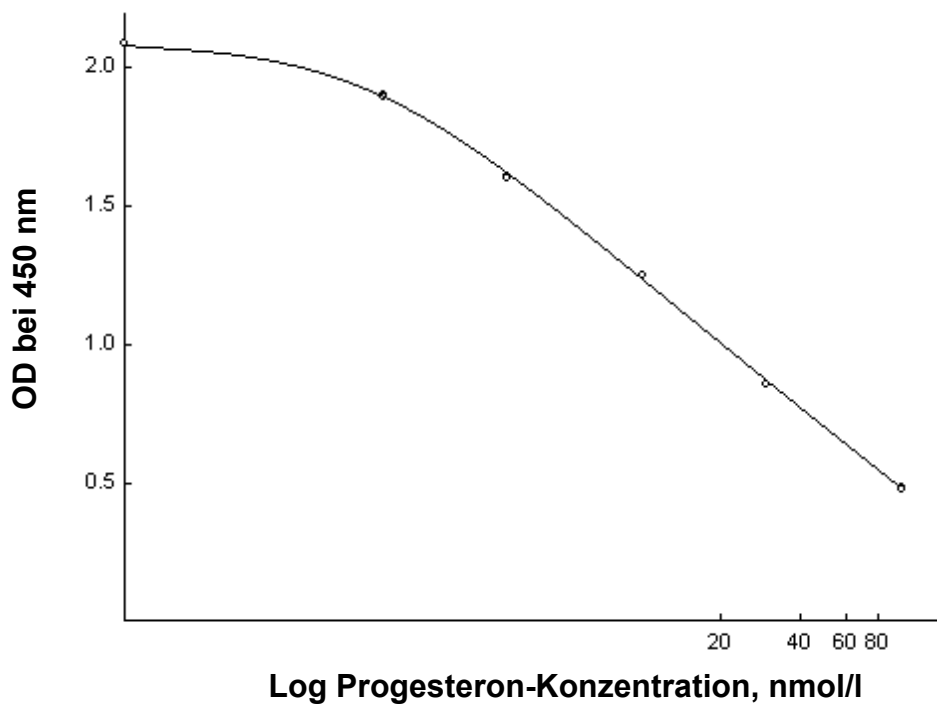


Abb. 2 Typische Standardkurve

Beispielstandardkurve! Nicht zur Auswertung benutzen

13.5 Assay-Schema zum Assay-Protokoll 1

Kavität \ Reagenzien	«Blank»	CAL CONTROL	Proben
CAL CONTROL	–	20 µl	–
Proben	–	–	20 µl
CONJ	–	150 µl	150 µl
Inkubation No. 1	60 Min, +37 °C, 500–800 rpm		
WASH P (verdünnt)	4 x 300 µl		
SUB	100 µl	100 µl	100 µl
Inkubation No. 2	15–30 Min, +18...+25 °C, im Dunkeln		
	10 Min, +37 °C, 500–800 rpm		
STOP	100 µl	100 µl	100 µl
Rühren	1–2 Min, +18...+25 °C		
OD-Messung	450 nm		
Berechnung	Spezielle Software		

14. AUTOMATISIERTER TEST (REF 21-03 A)

14.1 Packungsinhalt

MP	Mikrotiterplatte: Zwölf Streifen mit acht Kavitäten (insgesamt 96 Kavitäten), beschichtet mit monoklonalen Anti-Progesteron-Antikörpern.	1 Platte
CONJ	Konjugat: Lösung aus Progesteron konjugiert mit HRP.	18 ml, gebrauchsfertig
0-5 CAL	Progesteron Kalibratoren: Proteinbasierte- Lösung oder Lyophilisate mit definierter Progesteron-Konzentration: 0; 3; 10; 30; 100; 300 nmol/l (ungefähre Werte- bitte nicht für die Auswertung von realen Testdaten verwenden). Für Lot spezifische Progesteron-Konzentrationen siehe Werte im Quality Control Sheet..	8 Fläschchen, je 0,5 ml CAL 2,3- 2×0,5ml; CAL 0,1, 4, 5 – 1 × 0,5 ml; gebrauchsfertig oder lyophilisiert
CONTRO L	Progesteron Kontrolle: Proteinbasierte-Lösung oder Lyophilisat mit definierter Progesteron-Konzentration. Der Konzentrationsbereich ist im Quality Control Sheet angegeben.	2x 0,5 ml, gebrauchsfertig oder lyophilisiert
WASH P 20X	Waschlösung P, 20x konzentriert: Tensid in Salzlösung, ausreichend für die Vorbereitung von 1000 ml Lösung.	50 ml, konzentriert
SUB	Substrat (TMB-Lösung): 3,3',5,5'-Tetramethylbenzidin in Citrat-Puffer mit Wasserstoffperoxid.	14 ml, gebrauchsfertig
TRIAL 5000X	Trial-Lösung, 5000x konzentriert: Reinigungslösung	Muss separat bestellt werden
STOP	Stopplösung: 1 N HCl-Lösung	19 ml, gebrauchsfertig

Anmerkung: Extra Fläschchen der **CAL** 2 und 3 sowie **CONTROL** werden zur Rekalibrierung der Referenz-Standardkurve bereitgestellt.

Genauere Informationen sind in der Gebrauchsanleitung des ELISA-Automaten "Alisei" zu finden.

14.2 Erforderliche, aber nicht mitgelieferte Materialien und Equipment

- ELISA-Automat "Alisei"
- Polypropylen Röhren 12 x 75, Volumen: 5,5 ml
- **TRIAL 5000X** Trial-Lösung, 5000x konzentriert **
- Deionisiertes oder destilliertes Wasser
- Laborhandschuhe

14.3 Testverfahren

Der **Progesterone Testkit** ist für 96 Untersuchungen bestimmt. Vorbehaltlich einer gleichzeitigen Anwendung aller Streifen reicht ein Testkit für eine Einzelbestimmung von 88 Serumproben, 6 Kalibratoren, 1 Kontrolle und für die Bestimmung des Blank (=OD der TMB-Lösung).

14.3.1 Reagenzienvorbereitung

Vor dem Gebrauch müssen alle Reagenzien auf Raumtemperatur (+18...+25 °C) gebracht und gründlich gemischt werden.

Anmerkung: *Vorbereitung der anderen Reagenzien siehe Abschnitt 8.*

TRIAL Trial-Lösung zum Reinigen der gerät-internen Hydraulikleitungen und Nadeln des ELISA-Automaten.

Zubereitung der benötigten Menge der Trial-Lösung vor der Analyse durch 5000fache Verdünnung des Konzentrates mit

* Reagenz ist nicht Teil des Kits und kann separat bezogen werden.

destilliertem oder deionisiertem Wasser:

2 ml **TRIAL** **5000X** + 9998 ml Wasser

Sorgfältig mischen, Schaumbildung vermeiden.

14.3.2 Testablauf des automatisierten Tests

Bei Benutzung des ELISA-Automaten „Alisei“ ist die entsprechende Gebrauchsanweisung des Gerätes zu verwenden.

Die Durchführung des Enzymassays mit „Alisei“ ist komplett automatisch: Pipettieren der Reagenzien, Waschschritte, Inkubation, OD-Messung und Analyse der Testergebnisse. Das Programm zur Berechnung der Progesteron-Konzentration ist im Gerät ebenfalls enthalten.

14.4 Datenverarbeitung

14.4.1 Daten Verlässlichkeit (OD gemessen bei 450 nm)

Siehe Kriterien des Abschnittes **13.4.1**.

14.5 Vorsichtsmaßnahmen

- Bei mehrfacher Nutzung des Testkit in einem ELISA-Automaten müssen die Reagenzien aufgrund der Verdunstung unmittelbar nach Beenden des Pipettiervorganges aus dem Automaten genommen werden, um einen möglichen Verlust durch Verdunstung zu vermeiden. Die Reagenzien sind in den Kühlschrank zu stellen.
- Die Rekalibrierung anhand der Standardkurve eines Testkits mit anderer Lotnummer ist nicht zulässig.

2. INTENDED USE

The **Progesterone kit** is provided for the **quantitative** determination of progesterone in human serum.

This test has 2 complete sets:

REF 21-03 for manual use,

REF 21-03 A must be used with ELISA automatic instrument “Alisei” manufactured by NEXT Level S.r.l. hereinafter referred to as analyser “Alisei”.

Instructions for use:

Section 13 for manual test,

Section 14 for *analyser*.

Note 1: *Take into account that calibrators’ nominals can be different for manual and automatic test kits.*

Note 2: *We guarantee applications of test:*

REF 21-03 A only on analyser “Alisei”,

REF 21-03 only for manual use.

While using non predefined methods of use, it is under end user responsibility, to make sure that it was appropriately tested for ELISA kits.

Progesterone is a steroid hormone with a molecular mass of 314 Da. The quantitative measurement of serum progesterone is a valuable tool for evaluation of corpus luteus functional status. It is also used in pregnancy surveillance and may be performed for investigational purposes.

3. PRINCIPLE OF TEST

The **Progesterone kit** is a competitive solid phase enzyme immunoassay. During the incubation progesterone of the tested samples and horseradish peroxidase (HRP) labeled Progesterone bind to the antibodies coated onto the inner surface of the microplate wells until the balance between them occurs. Separation of free and bound to antibodies progesterone as well as conjugate progesterone - peroxidase occurs while extracting the contents of the wells. The amount of bound conjugate is inversely proportional to the quantity of progesterone in the sample (Fig. 1).

During the incubation with TMB solution the colour is developing. The intensity of the colour is inversely proportional to the progesterone concentration in specimens. Progesterone concentration in the patient sample is read from a standard curve that is processed in each assay.

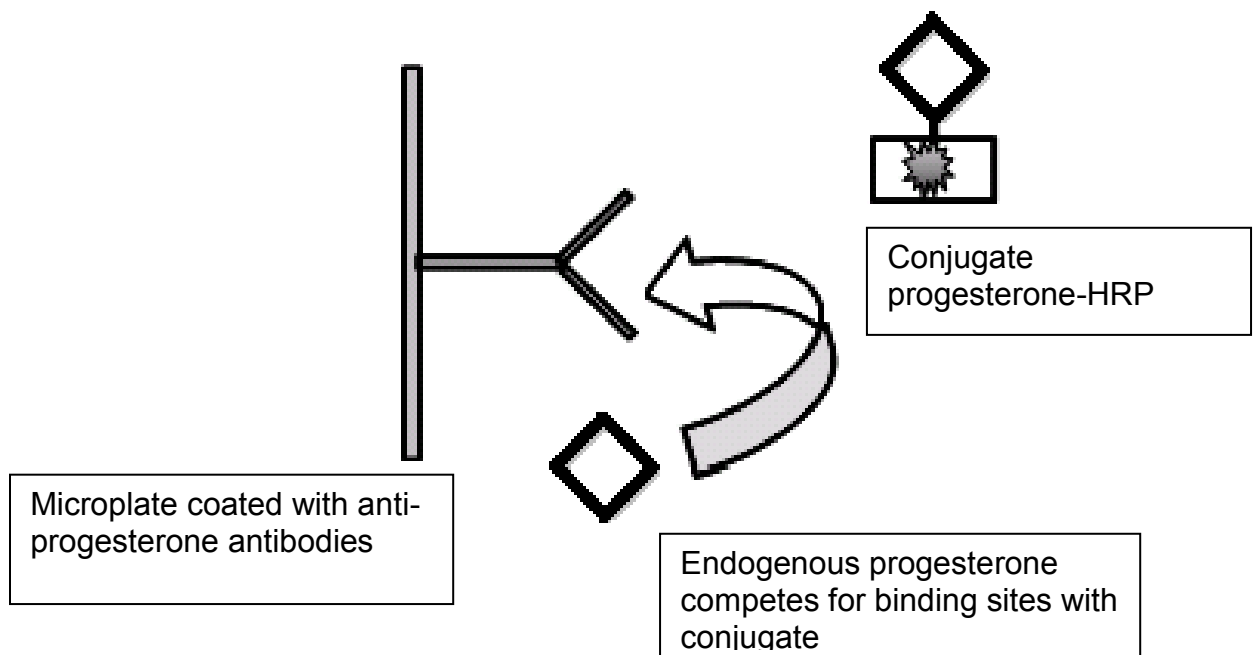


Fig. 1 Assay scheme

4. STORAGE AND STABILITY OF THE KIT

Expiration date of the kit is printed on the box label; expiration date for each component is printed on the respective label.

The **Progesterone kit** should be stored at +2...+8 °C upon receipt, preferably in the original kit box, until the expiration date. Storage at +25 °C is allowed but for no more than 5 days.

Shelf life of the kit is 18 months.

After initial opening, the kit is stable for 12 months if stored at +2...+8 °C.

If used in several separate experiments, after initial opening kit contents should be stored as follows but never used longer than the expiration date:

- unused strips: in a firmly closed resealable zipper bag at +2...+8 °C until the expiration date;
- vials with conjugate, calibrators and control (ready-to-use),: at +2...+8 °C for 12 months; vials with calibrators and control (reconstituted): at +2...+8 °C for no more than 1 month after opening;
- vial with substrate: at +2...+8 °C until expiration date, protected from light;
- vials with concentrated Trial, concentrated wash solution, and stop solution: at +2...+8 °C until expiry date;
- wash solution prepared for use: at room temperature (+18...+25 °C) for no more than 5 days or at +2...+8°C for no more than 4 weeks in a firmly closed bottle;
- Trial solution prepared for use: at room temperature (+18...+25 °C) for no more than 5 days, in a firmly closed bottle.

Damaged Test Kits

In case of any severe damage of the test kit or components, Astra Biotech GmbH has to be informed in writing, during one week after receiving the kit. Usage of severely damaged single components for a test run is not recommended.

5. SAMPLE COLLECTION AND STORAGE

Collect blood by venipuncture. After clotting, the serum is separated by centrifugation.

Do not use plasma, haemolyzed (bright red) or lipemic (milky) serum samples as well as samples containing sodium azide as preservative.

Store serum samples at +2...+8 °C for no more than 2 days. Aliquot and freeze the samples for longer storage (≤ -20 °C). Avoid repeated freezing.

6. EXPECTED VALUES

Serum samples collected between 9 and 11 a.m. from 60 apparently healthy people (both males and females) between the ages of 21–45, were assayed with Progesterone kit. The results are listed below. These limits should be considered as guidelines only.

Group	n	Progesterone concentration range (nmol/L)
<i>Female</i>	60	
Follicular phase		<0.5-6
Luteal phase		10-89
<i>Male</i>		<0.5-5.2

It is highly recommended each laboratory to determine its own reference range of progesterone concentrations.

7. QUALITY CONTROL

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.

8. REAGENT PREPARATION

Allow all the reagents to reach room temperature (+18...+25 °C), and then thoroughly stir.

MP Microplate

Keep the **microplate** at room temperature for at least 30 minutes before opening the bag. Place required number of strips onto strip holder. Place unused strips into the resealable zipper bag and reseal duly.

CAL **CONTROL** Calibrators and Control

Liquid calibrators and control are ready to use.

Prepare lyophilized calibrators and control as follows. Gently tap on the vial caps to knock off all the dry matter. Open the vials and carefully place the caps upside down on the clean dry surface. Add 0.5 mL of distilled or deionized water to each vial with lyophilized calibrators and control, close vials with the corresponding caps and leave for 10 min at room temperature (+18...+25 °C) without stirring. Then stir gently avoiding foaming, until the dry matter is completely dissolved. Leave for another 10 minutes at room temperature stirring gently

periodically. Make sure that no dry matter is left on the caps and walls of the vials.

WASH P Wash solution

Prepare required volume of **wash solution** by dilution of the concentrate 20-fold with distilled or deionized water.

For example:

5 mL **WASH P** **20X** + 95 mL water

Mix thoroughly, avoid foaming.

SUB Substrate

Protect **substrate** from direct light.

9. SAMPLE PREPARATION

Allow samples to reach room temperature. Stir samples gently in order to ensure homogeneity.

10. PERFORMANCE CHARACTERISTICS OF THE ASSAY

10.1. Calibration-Traceability:

Progesterone kit was calibrated against the Working Standard, which had been manufactured by gravimetric method based on weighing purified synthetic progesterone into analyte-free matrix.

10.2. Specificity:

Cross-reaction of anti-progesterone monoclonal antibodies with different steroids is shown below.

Steroid	Cross-reaction, %
Progesterone	100
5- α -pregnan-3,20-dione	10.5
17-hydroxyprogesterone	1.0
Corticosterone	0.01
Pregnenolone	0.90
11-Deoxycorticosterone	0.30
11-Deoxycortisol	0.03
Cortisol	0.005

10.3. Analytical Sensitivity:

Analytical sensitivity of **Progesterone kit**, i.e. concentration, which can be distinguished from zero calibrator is 0.5 nmol/L (manual test) and 5.5 nmol/L (Alisei). It was defined as mean of 10 replicates of calibrator 0 minus 2 SD.

10.4. Measurement Range:

The **Progesterone kit** was validated for measurement of progesterone concentration within the concentration diapason of 0.5 - 100 nmol/L (for manual test) and 5.5 - 300 nmol/L (for analyser "Alisei").

10.5. Measurement Units:

In **Progesterone kit** the concentrations of calibrators are specified in nmol/L. To convert into ng/mL, multiply the concentration in nmol/L by 0.314.

10.6. Intra- and Inter-Assay Variation (Precision):

For Intra-Assay CV determination, 8 serum samples were run, each in 9 replicates. The results are shown below.

Manual kit

Sample	Mean progesterone concentration, nmol/L	Intra-Assay CV	
		SD	CV, %
1	2.3	0.20	8.8
2	4.5	0.34	7.5
3	7.5	0.34	4.5
4	12.4	0.26	2.1
5	19.3	0.54	2.8
6	26.3	0.88	3.3
7	59.3	2.37	4.0
8	59.0	2.24	3.8

Alisei kit

Sample	Mean progesterone concentration, nmol/L	Intra-Assay CV	
		SD	CV, %
1	7.8	0.48	6.1
2	12.5	0.96	7.7
3	20.2	1.48	7.3
4	33.7	1.58	4.7
5	50.6	1.67	3.3
6	61.4	1.42	2.3
7	77.1	1.54	2.0
8	85.2	1.72	2.0

For **Inter-Assay CV** determination, 5 serum samples were assayed 3 times by different operators with 1-week interval. Each specimen was run in 9 replicates. The results are shown below.

Manual kit

Sample	Mean progesterone concentration, nmol/L			Inter-Assay CV	
	1 assay	2 assay	3 assay	SD	CV, %
1	1.2	1.5	1.3	0.15	11.5
2	3.7	4.4	4.0	0.35	8.7
3	13.2	15.2	14.1	1.00	7.1
4	44.2	46.1	48.4	2.10	4.5
5	52.0	55.5	58.7	3.35	6.0

Alisei kit

Sample	Mean progesterone concentration, nmol/L			Inter-Assay precision	
	1 assay	2 assay	3 assay	SD	CV, %
1	7.8	8.5	8.7	0.47	5.7
2	12.5	11.3	12.0	0.60	5.0
3	20.2	23.1	22.0	1.46	6.7
4	33.7	32.5	36.1	1.83	5.4
5	50.6	49.9	51.4	0.75	1.5
6	61.4	70.8	62.9	5.05	7.8
7	77.1	86.0	82.4	4.48	5.5
8	85.2	88.6	94.2	4.54	5.1





11. LIMITATION OF THE METHOD

Any clinical diagnosis should not be based on the results of in vitro diagnostic methods alone. For diagnosis establishment, a physician is supposed to consider all available clinical and laboratory findings.

12. SAFETY PRECAUTIONS

- **This kit is for in vitro diagnostic use only.** Operator should follow the manual closely in order to ensure reliable data. The manual is valid for the present kit only, within the listed composition. Any substitution of kit components is not allowed by CE regulations.

- Do not use kit or its components after the expiration date indicated on the label. Take into account stability period for reconstituted reagents.
- Do not mix or use together reagents from different lots of the kit except substrate, stop solution and wash solution.
- Do not use substrate, stop solution and wash solution supplied by other vendors.
- Use only “P”-labeled Astra Biotech wash solution.
- Note that stop solution is 1 N HCl solution. Avoid contacts with skin and mucosa. In case of contact rinse affected area thoroughly with plenty of water and seek medical advice.
- Take into account the following common procedural notes:
 - always pipette reagents into wells immediately after washing procedure;
 - avoid contamination of the solutions;
 - in case of partial use of the kit, dispense only required volume of the reagent into the tray;
 - do not pour unused reagents back into the original vials;
 - avoid exposure to direct sunlight during incubations;
 - always pipette reagents in the same order to minimize reaction time differences between wells; the total dispensing time for the calibrators, control and samples must not exceed 15 min;
 - the incubation temperature for all the immunological reactions must be kept at +37 °C;
 - do not touch the bottom of the wells;
 - calibrators should be measured in each separate assay. It is also recommended to measure each time progesterone concentration in the control;

- remove the adhesive foil carefully to avoid contamination and don't use the adhesive foil repeatedly.
- TMB solution should be colourless. Light colouring of solution is admissible. Avoid direct exposure of substrate to sunlight.
-  Source materials of human origin used for kit components preparation were tested and found negative for HBsAg, anti-HIV and anti-HCV antibodies. However, none of known laboratory test guarantees absence of these viral agents. Therefore, all kit components and patient's samples should be handled as potentially hazardous.
-  After usage strips, calibrators, control, specimens, and all consumables which contacted with specimens during handling, storage or assay (tubes, vials, gloves, pipette tips etc.) should be collected separately and sterilized by autoclaving. Instead of autoclaving pipette tips may be sterilized by disinfectant treatment. After sterilization all components and expendable materials may be utilized as non-dangerous garbage. Other components of the kit should be discarded into conventional garbage.
-  During manual washing procedure do not discard the contents of the wells directly to drainage. Use a container with disinfectant solution.
-  As the kit contains potentially hazardous material, the following precautions should be taken:
 - do not smoke, eat or drink while performing the assay;
 - always use protective gloves;
 - never pipette material by mouth;

- in case of spilling, wipe up the spills promptly and wash affected area thoroughly using decontaminant.
- GLP including all general and individual regulations should be applied for the kit usage.



As the kit contains irritant (**CONJ**, **CAL**, **CONTROL**), the following precautions should be observed:

- P261- Avoid breathing spray;
- P272- Contaminated work clothing should not be allowed out of the workplace;
- P280- Wear protective gloves/protective clothing/eye protection;
- P302+P35 - IF ON SKIN: Wash with plenty of soap and water;
- P333+P313 - If skin irritation or rash occurs: Get medical advice/attention;
- P363 - Wash contaminated clothing before reuse;
- P501 - Dispose of contents/container in accordance with national regulation.

Precautionary statements according to Regulation EC No 1272/2008.

13. MANUAL TEST (REF 21-03)

13.1. Material Provided

MP	Microplate: 12 breakable 8-well strips (total 96 wells) coated with anti-Progesterone monoclonal antibodies	1 pcs
CONJ	Conjugate: containing progesterone conjugated with HRP	18 mL, ready to use
0-5 CAL	Progesterone Calibrators: protein-based solution or lyophilized preparations containing known progesterone concentrations - 0; 1; 3; 10; 30; 100 nmol/L (approximate values - do not use for evaluation of real assay data). The concentrations of calibrators may be different for Assay Protocol 1 and 2. For lot specific progesterone concentrations see values for respective Assay Protocol provided in the Quality Control Sheet.	6 vials, 0.5 mL each; ready to use or lyophilized
CONTROL	Progesterone Control: protein - based solution or lyophilized preparation containing known progesterone concentration. The range of progesterone concentration may be different for Assay Protocol 1 and 2. For lot specific ranges of progesterone concentration see values for respective Assay Protocol provided in the Quality Control Sheet.	0.5 mL, ready to use or lyophilized
SUB	Substrate (TMB solution): 3,3',5,5'-tetramethylbenzidine solution in citrate buffer containing hydrogen	14 mL, ready to use

	peroxide	
WASH P 20X	Wash solution P, 20X concentrated: surfactant in buffered saline, sufficient for preparation of 560 mL of solution	2x14 mL, concentrated
STOP	Stop solution: 1 N HCl solution	14 mL, ready to use
	Adhesive foil	2x1 foil (optional)

13.2. Equipment and Materials Required but not provided

- 1-channel calibrated variable precision pipettes, with disposable tips;
- 8-channel calibrated variable precision pipette, with disposable tips;
- microplate incubator (+37 °C) or microplate incubator-shaker (+37 °C, shaking speed 500–800 rpm);
- manual or automatic equipment for rinsing wells;
- calibrated microplate reader (450 nm);
- vortex tube mixer;
- deionized or distilled water;
- graduated beaker and cylinder of appropriate volume;
- latex or plastic gloves;
- trays for pipetting reagents with 8-channel pipette;
- disinfectant;
- absorbent material (for manual wash).

13.3. Test procedure

The **Progesterone kit** is designed for 96 tests. This is sufficient for 40 unknowns, 6 calibrators, 1 control and 1 blank (OD of TMB solution) in duplicates, provided that all the strips are used simultaneously.

13.3.1 Assay Procedure

Note: *Please check in the Quality Control Sheet supplied with the kit for which Assay Protocol your kit has been validated. If your kit has been validated for Assay Protocol 1, please follow the Assay Protocol 1 described below. If your kit has been additionally validated for Assay Protocol 2, please consider the Supplement 1 to the Instructions for use provided with the kit.*

Assay Protocol 1

(see also Assay scheme to Assay Protocol 1, section 13.5)

Note: *Consider concentrations of calibrators and control range for Assay Protocol 1 provided in the Quality Control Sheet.*

- A.** Pipette **20 μ L** calibrators **CAL** (0-5), control **CONTROL** and **patient's samples in duplicates** into the respective wells; **leave wells A1-A2 empty for blank!**
- B.** Pipette **150 μ L** conjugate **CONJ** into each well, **except wells A1-A2.**

Note: *total time of dispensing must not exceed 15 minutes, otherwise the test result may be unreliable, because the time of incubation will substantially vary for different samples.*

Note: *If an adhesive foil is used, put it now onto the plate to seal the cavities.*

C. Incubate strips for **60 minutes while shaking (500–800 rpm) at +37 °C.**

Note: *If an adhesive foil is used, remove it now from the plate.*

D. Wash **4 times**, as described below.

E. Pipette **100 µL substrate** **SUB** into each well (including blank); incubate **at room temperature (+18...+25 °C) in the dark for 15-30 minutes**, depending on the colour intensity, or **10 minutes while shaking (500-800 rpm) at +37 °C.**

F. Pipette **100 µL stop solution** **STOP** into each well (including blank) in the same sequence and at the same speed as used for dispensing TMB substrate. Shake for 1–2 min at room temperature.

G. Read OD at **450 nm within 20 min.**

13.3.2 Wash Procedure

It is advisable to use an automatic microplate washer set at 4 wash cycles and a volume of 300 µL of wash solution per well per cycle.

If an automatic washer is not available, the wash procedure can be carried out manually as follows:

- remove the contents of the wells into a container with disinfectant;
- dispense 300 µL of wash solution (section 8) into each well, shake the plate carefully for 5–10 sec and remove the contents of the wells; repeat 4 times;
- strike the wells sharply on absorbent material to remove any liquid residue.

13.4. Data Processing

If the reader cannot be adjusted to zero using the substrate blank in wells A1-A2, subtract mean OD value of wells A1-A2 from all OD values before further calculations.

Example:

OD (Cal 0) measured = 2.28 and OD (blank) = 0.06;

OD (Cal 0) calculated = $2.28 - 0.06 = \underline{2.22}$

13.4.1. Data Reliability (for OD measured at 450 nm)

The data should meet the following criteria:

- average blank OD (in wells A1-A2) ≤ 0.100 ;
- average OD of Cal 0 ≥ 1.00 (after blank subtraction);
- control's concentration must fall within the acceptability range that is shown in the Quality Control Sheet .

If the data obtained do not meet the criteria, the results are considered unreliable and the test should be repeated.

13.4.2. Quantitative Determination

Specialized software for quantitative determination is recommended. Mean OD of calibrators are plotted versus their respective progesterone concentrations using **4PL fit** (Fig. 2 Typical standard curve). Calculate concentration of progesterone in samples using standard curve.

Any extrapolation of the standard curve to progesterone above the nominal value of the Calibrator 5 is forbidden.

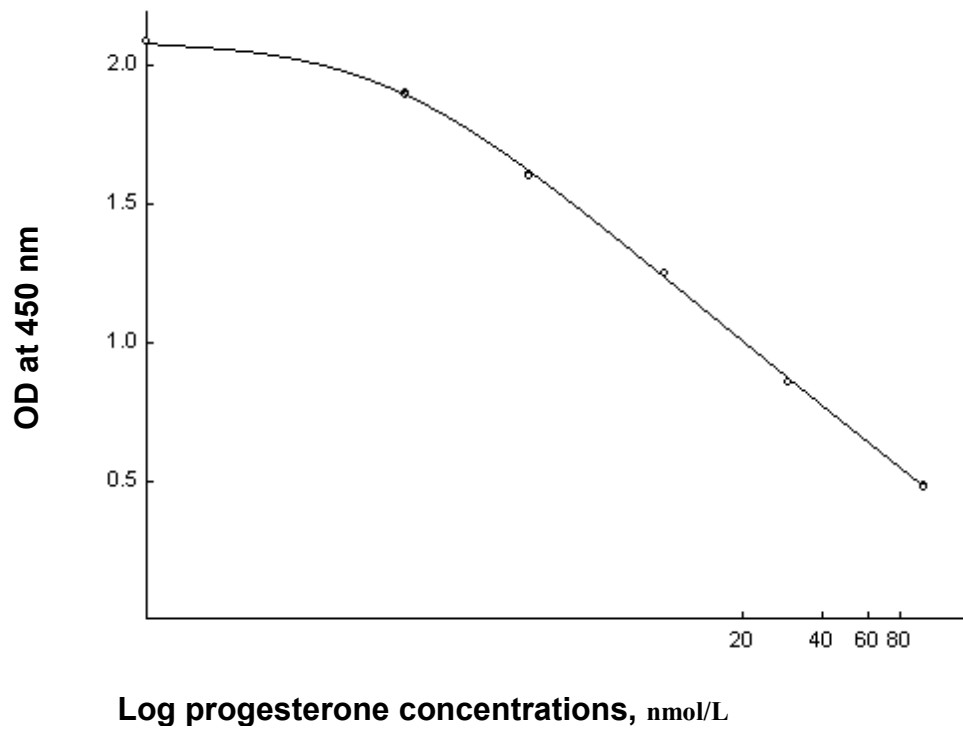


Fig. 2 Example of typical standard curve.
Do not use for evaluation of real assay data!

13.5 Assay scheme to Assay Protocol 1

Reagents \ Wells	«Blank»	CAL CONTROL	Samples
CAL CONTROL	–	20 µL	–
Samples	–	–	20 µL
CONJ	–	150 µL	150 µL
Incubation No. 1	60 min, +37 °C, 500–800 rpm		
WASH P (diluted)	4 x 300 µL		
SUB	100 µL	100 µL	100 µL
Incubation No. 2	15–30 min, +18...+25 °C, in the dark		
	10 min, +37 °C, 500–800 rpm		
STOP	100 µL	100 µL	100 µL
Stirring	1–2 min, +18...+25 °C		
OD measuring	450 nm		
Calculations	Corresponding software		

14. AUTOMATIC TEST (REF 21-03 A)

14.1. Material Provided

MP	Microplate: 12 breakable 8-well strips (total 96 wells) coated with anti-Progesterone monoclonal antibodies	1 pcs
CONJ	Conjugate: containing progesterone conjugated with HRP	18 mL, ready to use
0-5 CAL	Progesterone Calibrators: protein - based solution or lyophilized preparations containing known progesterone concentrations - 0; 3; 10; 30; 100; 300 nmol/L (approximate values - do not use for evaluation of real assay data). For lot specific progesterone concentrations see values provided in the Quality Control Sheet	8 vials, 0.5 mL each; CAL 2, 3 – 2 × 0.5 mL; CAL 0, 1, 4, 5 – 1 × 0.5 mL; ready to use or lyophilized
CONTROL	Progesterone Control: protein -based solution or lyophilized preparation containing known progesterone concentration. For lot specific ranges of progesterone concentration see Quality Control Sheet	2×0.5 mL, ready to use or lyophilized
WASH P 20X	Wash solution P, 20X concentrated: surfactant in buffered saline, sufficient for preparation of 1000 mL of solution	50 mL, concentrated
SUB	Substrate (TMB solution): 3,3',5,5'-tetramethylbenzidine solution in citrate buffer containing hydrogen peroxide	14 mL, ready to use
TRIAL 5000X	Trial solution, 5000X concentrated: solution of detergent	It is delivered by separate order
STOP	Stop solution: 1 N HCl solution	19 mL, ready to use

Note: Extra vials of **CAL** 2, 3 and **CONTROL** are provided for recalibration on reference calibration curve. For detailed information see instructions for use for analyser “Alisei”.

14.2. Equipment and Materials Required but not provided

- Automatic analyser for ELISA kits on microplate (analyser “Alisei”);
- multipurpose polypropylene tubes 12x75 volume 5.5 mL;
- **TRIAL** **5000X** Trial solution, 5000X concentrated*;
- deionized or distilled water;
- latex or plastic gloves.

14.3. Test Procedure

The **Progesterone kit** is designed for 96 tests. This is sufficient for 88 unknowns, 6 calibrators, 1 control and 1 blank (OD of TMB solution) in monoplicates, provided that all the strips are used simultaneously.

14.3.1. Reagent Preparation

Allow all the reagents to reach room temperature (+18...+25 °C), and then thoroughly stir.

Note: Preparation of other reagents see in section 8.

TRIAL Working solution of Trial for washing internal hydraulic lines and needles of analyser “Alisei”. Prepare required volume of **Trial solution** by dilution of the concentrate 5000-fold with distilled or deionized water before analysis:

2 mL **TRIAL** **5000X** + 9998 mL water

Mix thoroughly, avoid foaming.

* Reagent is not included in the kit, it is delivered by separate order.

14.3.2. Assay Procedure for Automatic Test

While using for the procedure analyser “Alisei”, refer to its relative manual.

The analysis on analyser “Alisei” is completely automatic: pipetting of reagents, washing, incubation, OD measurement, analysis of results. The program of calculation progesterone concentration is hardwired in analyser memory.

14.4. Data Processing

14.4.1. Data Reliability (OD_{450 nm})

See criteria in section 13.4.1.

14.5. Safety precautions

- If kit for analyser “Alisei” is used in several separate experiments it is necessary to take reagents from analyser “Alisei” immediately after pipetting them in the wells of all plates because liquid evaporates from vials. Put the reagents in refrigerator;
- Recalibration using calibration curve, obtained with a kit of any other lot, is not permitted.

August 26, 2019



Astra Biotech GmbH
Rudower Chaussee 29,
12489 Berlin, Germany
Telefon: +49 (0)30 74696509
E-Mail: info@astrabiotech.de
www.astrabiotech.de