

**СОДЕРЖАНИЕ**

|                                                               |   |
|---------------------------------------------------------------|---|
| 1. НАЗНАЧЕНИЕ                                                 | 2 |
| 2. ПРИНЦИП РАБОТЫ НАБОРА                                      | 3 |
| 3. АНАЛИТИЧЕСКИЕ ХАРАКТЕРИСТИКИ                               | 3 |
| 4. СОСТАВ НАБОРА                                              | 4 |
| 5. МЕРЫ ПРЕДОСТОРОЖНОСТИ                                      | 5 |
| 6. ОБОРУДОВАНИЕ И МАТЕРИАЛЫ, НЕОБХОДИМЫЕ ПРИ РАБОТЕ С НАБОРОМ | 5 |
| 7. ПОДГОТОВКА РЕАГЕНТОВ ДЛЯ АНАЛИЗА                           | 5 |
| 8. УСЛОВИЯ ХРАНЕНИЯ И ЭКСПЛУАТАЦИИ НАБОРА                     | 6 |
| 9. ПРОВЕДЕНИЕ АНАЛИЗА                                         | 7 |
| 10. ОЖИДАЕМЫЕ ЗНАЧЕНИЯ И НОРМЫ                                | 8 |
| 11. ЛИТЕРАТУРА                                                | 9 |

**CONTENT**

|                                    |    |
|------------------------------------|----|
| 1. INTENDED USE                    | 10 |
| 2. SUMMARY AND EXPLANATION         | 10 |
| 3. PRINCIPLE OF THE TEST           | 11 |
| 4. WARNINGS AND PRECAUTIONS        | 11 |
| 5. KIT COMPONENTS                  | 12 |
| 6. SPECIMEN COLLECTION AND STORAGE | 13 |
| 7. TEST PROCEDURE                  | 13 |
| 8. QUALITY CONTROL                 | 15 |
| 9. CALCULATION OF RESULTS          | 15 |
| 10. EXPECTED VALUES                | 15 |
| 11. PERFORMANCE CHARACTERISTICS    | 16 |
| 12. LITERATURE                     | 16 |

Инструкция составлена Руководителем службы клиентского сервиса ООО «ХЕМА»,  
к. б. н. Д. С. Кострикиным

## **ИНСТРУКЦИЯ ПО ПРИМЕНЕНИЮ НАБОРА РЕАГЕНТОВ ДЛЯ ИММУНОФЕРМЕНТНОГО ОПРЕДЕЛЕНИЯ ПРОГЕСТЕРОНА В СЫВОРОТКЕ (ПЛАЗМЕ) КРОВИ «ПРОГЕСТЕРОН-ИФА»**

### **1. НАЗНАЧЕНИЕ**

**1.1.** Набор реагентов «ПРОГЕСТЕРОН-ИФА» предназначен для количественного определения концентрации прогестерона в сыворотке (плазме) крови методом твердофазного иммуноферментного анализа.

**1.2.** Прогестерон – гестаген с молекулярной массой 314.5 дальтон, секретируемый желтым телом, а также корой надпочечников и яичками; является предшественником для биосинтеза кортикостероидов и андрогенов. Являясь антагонистом эстрогенов, прогестерон вызывает характерные изменения эндометрия, необходимые для имплантации оплодотворенной яйцеклетки. В течение нормального менструального цикла концентрация прогестерона остается низкой до момента окончания пика ЛГ; одновременно с пиком ЛГ наблюдается небольшое, но достоверное повышение концентрации прогестерона с последующим снижением. Во вторую половину цикла уровень прогестерона вместе с эстрадиолом начинает снова подниматься, завершая лютеинизацию. К концу цикла уровень прогестерона снова падает до значений фолликулиновой фазы. Это резкое уменьшение уровня прогестерона вызывает менструальное кровотечение. В период беременности концентрация прогестерона нарастает, он вызывает пролиферацию и развитие молочных желез и способствует угнетению процесса овуляции. В первом триместре прогестерон секретируется в желтом теле беременности, а с 3–4 месяца – в митохондриях трофобласта. Содержание прогестерона в крови матери быстро увеличивается, повышаясь в 2 раза к 7–8 неделе, и продолжает постепенно расти до 37–38 недели. Снижение уровня прогестерона указывает на патологию беременности, а увеличение уровня гормона – на почечную недостаточность. Повышение концентрации прогестерона наблюдается при беременности; опухолях надпочечников и яичек; липидоклеточной опухоли яичника; хорионэпителиоме; приеме лекарственных препаратов прогестерона и его аналогов. Снижение концентрации прогестерона наблюдается при угрозе выкидыша; синдроме галактореи-аменореи; замершей беременности; приеме ампициллина, динопроста, трометацина, эстрадиола, пероральных контрацептивов.

## 2. ПРИНЦИП РАБОТЫ НАБОРА

Определение прогестерона основано на использовании конкурентного иммуноферментного анализа. На внутренней поверхности лунок планшета иммобилизованы мышиные моноклональные антитела к прогестерону. Прогестерон из образца конкурирует с конъюгированным прогестероном за связывание с антителами на поверхности лунки. В результате образуется связанный с пластиком «сэндвич», содержащий пероксидазу. Во время инкубации с раствором субстрата тетраметилбензидина (ТМБ) происходит окрашивание растворов в лунках. Интенсивность окраски обратно пропорциональна концентрации прогестерона в исследуемом образце. Концентрацию прогестерона в исследуемых образцах определяют по калибровочному графику зависимости оптической плотности от содержания прогестерона в калибровочных пробах.

## 3. АНАЛИТИЧЕСКИЕ ХАРАКТЕРИСТИКИ

**3.1. Специфичность.** Перекрестная реакция мышиных моноклональных антител к прогестерону с другими анализатами приведена в таблице:

| Аналит              | Перекрестная реакция, % |
|---------------------|-------------------------|
| Прогестерон         | 100                     |
| 17-ОН Прогестерон   | 1.0                     |
| 11-ОН Прогестерон   | 25                      |
| Кортикостерон       | 0.01                    |
| Прегненолон         | 0.9                     |
| Деоксикортикостерон | 0.3                     |
| Деоксикортизол      | 0.03                    |
| Кортизол            | 0.002                   |

### 3.2. Воспроизводимость.

Коэффициент вариации результатов определения содержания прогестерона в одном и том же образце сыворотки (плазмы) крови с использованием Набора «ПРОГЕСТЕРОН-ИФА» не превышает 8,0%.

### 3.3. Линейность.

Зависимость концентрации прогестерона в образцах сыворотки (плазмы) крови при разведении их сывороткой (плазмой) крови, не содержащей Прогестерон, имеет линейный характер в диапазоне концентраций 1–300 нмоль/л и составляет  $\pm 10,0\%$ .

### 3.4. Точность.

Данный аналитический параметр проверяется тестом на «открытие» – соответствие измеренной концентрации прогестерона предписанной, полученной путем смешивания равных объемов контрольной сыворотки и калибровочной пробы 3 нмоль/л. Процент «открытия» составляет 90–110%.

### 3.5. Чувствительность.

Минимальная достоверно определяемая Набором «ПРОГЕСТЕРОН-ИФА» концентрация прогестерона в сыворотке (плазме) крови не превышает 0,25 нмоль/л.

## 4. СОСТАВ НАБОРА

|    | Код компонента | Символ       | Наименование                                                                                                                                                                                                                                          | Кол-во | Ед. | Описание                                                                                      |
|----|----------------|--------------|-------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|--------|-----|-----------------------------------------------------------------------------------------------|
| 1  | P207Z          | SORB MTP     | <b>Планшет</b> 96-луночный полистироловый, стрипированный, готов к использованию                                                                                                                                                                      | 1      | шт. | -                                                                                             |
| 2  | C207Z          | CAL 1-7      | <b>Калибровочные пробы</b> на основе сыворотки крови человека, содержащие известные количества прогестерона – <b>0; 1; 3; 10; 30; 100; 300 нмоль/л</b> , готовые к использованию (калибровочная проба 0 нмоль/л – 2 мл, остальные – по 0.8 мл каждая) | 7      | шт. | прозрачные жидкости пурпурного цвета (калибровочная проба 0 – прозрачная бесцветная жидкость) |
| 3  | Q207Z          | CONTROL      | <b>Контрольная сыворотка</b> на основе сыворотки крови человека с известным содержанием прогестерона, готова к использованию (0.8 мл)                                                                                                                 | 1      | шт. | прозрачная бесцветная жидкость                                                                |
| 4  | T207Z          | CONJ HRP     | <b>Конъюгат</b> , готов к использованию (22 мл)                                                                                                                                                                                                       | 1      | шт. | прозрачная жидкость пурпурного цвета                                                          |
| 5  | R055Z          | SUBS TMB     | <b>Раствор субстрата тетраметилбензидина</b> (ТМБ), готов к использованию (11 мл)                                                                                                                                                                     | 1      | шт. | прозрачная бесцветная жидкость                                                                |
| 6  | S008Z          | BUF WASH 21X | <b>Концентрат отмывочного раствора</b> , 21х-кратный (22 мл)                                                                                                                                                                                          | 1      | шт. | прозрачная бесцветная жидкость                                                                |
| 7  | R050Z          | STOP         | <b>Стоп-реагент</b> , готов к использованию (11 мл)                                                                                                                                                                                                   | 1      | шт. | прозрачная бесцветная жидкость                                                                |
| 8  | N003           | -            | Бумага для заклеивания планшета                                                                                                                                                                                                                       | 2      | шт. | -                                                                                             |
| 9  | K207I          | -            | Инструкция по применению Набора реагентов «ПРОГЕСТЕРОН-ИФА»                                                                                                                                                                                           | 1      | шт. | -                                                                                             |
| 10 | K207Q          | -            | Паспорт контроля качества Набора реагентов «ПРОГЕСТЕРОН-ИФА»                                                                                                                                                                                          | 1      | шт. | -                                                                                             |

## 5. МЕРЫ ПРЕДОСТОРОЖНОСТИ

**5.1.** Потенциальный риск применения Набора – класс 2a (ГОСТ Р 51609-2000).

**5.2.** Все компоненты Набора, за исключением стоп-реагента (5,0% раствор серной кислоты), в используемых концентрациях являются нетоксичными.

Раствор серной кислоты обладает раздражающим действием. Избегать разбрызгивания и попадания на кожу и слизистые. При попадании на кожу и слизистые пораженный участок следует промыть большим количеством проточной воды.

**5.3.** При работе с Набором следует соблюдать «Правила устройства, техники безопасности, производственной санитарии, противоэпидемического режима и личной гигиены при работе в лабораториях (отделениях, отделах) санитарно-эпидемиологических учреждений системы Министерства здравоохранения СССР» (Москва, 1981 г.).

**5.4.** При работе с Набором следует надевать одноразовые резиновые или пластиковые перчатки, так как образцы крови человека следует рассматривать как потенциально инфицированный материал, способный длительное время сохранять и передавать ВИЧ, вирус гепатита или любой другой возбудитель вирусной инфекции.

## 6. ОБОРУДОВАНИЕ И МАТЕРИАЛЫ, НЕОБХОДИМЫЕ ПРИ РАБОТЕ С НАБОРОМ

- фотометр вертикального сканирования, позволяющий измерять оптическую плотность содержимого лунок планшета при длине волны 450 нм;
- термостат, поддерживающий температуру  $+37\text{ }^{\circ}\text{C} \pm 0,1\text{ }^{\circ}\text{C}$ ;
- дозаторы со сменными наконечниками, позволяющие отбирать объемы в диапазоне 25–250 мкл;
- цилиндр мерный вместимостью 500 мл;
- вода дистиллированная;
- перчатки резиновые или пластиковые;
- бумага фильтровальная.

## 7. ПОДГОТОВКА РЕАГЕНТОВ ДЛЯ АНАЛИЗА

**7.1.** Перед проведением анализа компоненты Набора и исследуемые образцы сыворотки (плазмы) крови следует выдержать при комнатной температуре ( $+18...+25\text{ }^{\circ}\text{C}$ ) не менее 30 мин.

### 7.2. Приготовление планшета.

Вскрыть пакет с планшетом и установить на рамку необходимое количество стрипов. Оставшиеся неиспользованными стрипы, чтобы предотвратить воздействие на них влаги, тщательно заклеить бумагой для заклеивания планшета и хранить при температуре  $+2...+8\text{ }^{\circ}\text{C}$  в течение всего срока годности Набора.

### 7.3. Приготовление отмывочного раствора.

Содержимое флакона с концентратом отмывочного раствора (22 мл), перенести в мерный цилиндр вместимостью 500 мл, добавить 440 мл дистиллированной воды и тщательно перемешать. В случае дробного использования Набора следует отобрать необходимое количество концентрата отмывочного раствора и развести дистиллированной водой в 21 раз (1 мл концентрата отмывочного раствора + 20 мл дистиллированной воды).

## 8. УСЛОВИЯ ХРАНЕНИЯ И ЭКСПЛУАТАЦИИ НАБОРА

**8.1.** Набор реагентов «ПРОГЕСТЕРОН-ИФА» должен храниться в упаковке предприятия-изготовителя при температуре +2...+8 °С в течение всего срока годности, указанного на упаковке Набора. Допускается хранение (транспортировка) Набора при температуре до +25 °С не более 5 суток. Не допускается замораживание целого набора.

**8.2.** Набор рассчитан на проведение анализа в дубликатах 40 исследуемых образцов, 7 калибровочных проб и 1 пробы контрольной сыворотки (всего 96 определений).

**8.3.** В случае дробного использования Набора компоненты следует хранить следующим образом:

- оставшиеся неиспользованными стрипы необходимо тщательно заклеить бумагой для заклеивания планшета и хранить при температуре +2...+8 °С в течение всего срока годности Набора;
- конъюгат, субстрат, стоп-реагент после вскрытия флаконов следует хранить при температуре +2...+8 °С в течение всего срока годности Набора;
- калибровочные пробы и контрольную сыворотку после вскрытия флаконов следует хранить при температуре +2...+8 °С не более 2 месяцев;
- оставшийся неиспользованным концентрат отмывочного раствора следует хранить при температуре +2...+8 °С в течение всего срока годности Набора;
- приготовленный отмывочный раствор следует хранить при комнатной температуре (+18...+25 °С) не более 5 суток или при температуре +2...+8 °С не более 30 суток;

Примечание. После использования реагента немедленно закрывайте крышку флакона. Закрывайте каждый флакон своей крышкой.

**8.4.** Для проведения анализа не следует использовать гемолизированную, мутную сыворотку (плазму) крови, а также сыворотку (плазму) крови, содержащую азид натрия. Если анализ производится не в день взятия крови, сыворотку (плазму) следует хранить при температуре -20 °С. Повторное замораживание-оттаивание образцов сыворотки (плазмы) крови не допускается.

**8.5.** Исключается использование для анализа образцов сыворотки (плазмы) крови людей, получавших в целях диагностики или терапии препараты, в состав которых входят мышинные антитела.

**8.6.** При использовании Набора для проведения нескольких независимых серий анализов следует иметь в виду, что для каждого независимого определения необходимо построение нового калибровочного графика; кроме этого, рекомендуется определение концентрации прогестерона в контрольной сыворотке.

**8.7.** Для получения надежных результатов необходимо строгое соблюдение Инструкции по применению Набора.

## 9. ПРОВЕДЕНИЕ АНАЛИЗА

|    |                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                              |
|----|--------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|
| 1  | Поместите в рамку необходимое количество стрипов – исследуемые образцы в 2 повторах и 16 лунок для калибровочных проб и контрольной сыворотки.                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                               |
| 2  | <b>Внесите в соответствующие лунки в дубликатах по 25 мкл калибровочной пробы и контрольной сыворотки (плазмы) крови.</b> Внесение калибровочных проб, контрольной сыворотки и исследуемых образцов необходимо произвести в течение 5-10 минут.                                                                                                                                                                                                                                                              |
| 3  | <b>Внесите во все лунки по 200 мкл конъюгата.</b>                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                            |
| 4  | Заклейте планшет бумагой для заклеивания планшета и <b>инкубируйте</b> его в течение <b>120 минут при температуре +37 °С.</b>                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                |
| 5  | По окончании инкубации удалите содержимое лунок и <b>отмойте лунки 5 раз.</b> При каждой отмывке добавляйте во все лунки по 250 мкл отмывочного раствора (см. п. 7.3), встряхните планшет круговыми движениями по горизонтальной поверхности с последующей аспирацией или декантированием. Задержка при отмывке (замачивание лунок) не требуется. При каждом декантировании необходимо тщательно удалить остатки жидкости из лунок постукиванием планшета в перевернутом положении по фильтровальной бумаге. |
| 6  | <b>Внесите во все лунки по 100 мкл раствора субстрата тетраметилбензидина.</b> Внесение раствора субстрата тетраметилбензидина в лунки необходимо произвести в течение 2–3 мин. <b>Инкубируйте планшет в темноте при комнатной температуре (+18...+25°C) в течение 10–20 минут</b> в зависимости от степени развития синего окрашивания.                                                                                                                                                                     |
| 7  | <b>Внесите во все лунки</b> с той же скоростью и в той же последовательности, как и раствор субстрата тетраметилбензидина, <b>по 100 мкл стоп-реактанта</b> , при этом содержимое лунок окрашивается в ярко-желтый цвет.                                                                                                                                                                                                                                                                                     |
| 8  | <b>Измерьте величину оптической плотности (ОП) содержимого лунок планшета на фотометре</b> вертикального сканирования <b>при длине волны 450 нм.</b> Измерение ОП содержимого лунок планшета необходимо произвести в течение 15 мин после внесения стоп-реактанта. Бланк фотометра выставьте по воздуху.                                                                                                                                                                                                     |
| 9  | Постройте в полулогарифмических координатах калибровочный график: ось абсцисс (х) – десятичный логарифм концентрации прогестерона в калибровочных пробах (нмоль/л), ось ординат (у) – оптическая плотность калибровочных проб (ОП 450 нм). Для алгоритма обсчета (аппроксимации) калибровочного графика используйте интервальный (кусочно-линейный, «от точки к точке») метод. Приравняйте концентрацию калибровочной пробы 0 нмоль/л к несущественно малой величине, например, 0.001 нмоль/л                |
| 10 | Определите по калибровочному графику содержание прогестерона в исследуемых образцах.                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                         |

## 10. ОЖИДАЕМЫЕ ЗНАЧЕНИЯ И НОРМЫ

**10.1.** Основываясь на результатах исследований, проведенных ООО «ХЕМА», рекомендуем пользоваться нормами, приведенными ниже. Вместе с тем, в соответствии с правилами GLP (Хорошей лабораторной практики), каждая лаборатория должна сама определить параметры нормы, характерные для исследуемой популяции.

**Примечание.** Значения концентраций прогестерона в исследуемых образцах, находящиеся ниже границы чувствительности Набора (0.5 нмоль/л), а также превышающие значение верхней калибровочной пробы (300 нмоль/л) следует приводить в следующей форме: в исследуемом образце X концентрация прогестерона ниже 0.5 нмоль/л или выше 300 нмоль/л.

**10.2.** В Наборе «ПРОГЕСТЕРОН-ИФА» значения концентраций калибровочных проб выражены в нмоль/л. Для пересчета концентраций в нг/мл, полученное значение концентрации в нмоль/л следует умножить на 0.318.

1 нмоль/л = 0.318 нг/мл

| Исследуемая группа | Единицы, нмоль/л |                | Единицы доп., нг/мл |                |
|--------------------|------------------|----------------|---------------------|----------------|
|                    | Нижний предел    | Верхний предел | Нижний предел       | Верхний предел |
| Мужчины            | -                | 4.0            | -                   | 1.27           |
| 12-17 лет          | 0.3              | 4.3            | 0.1                 | 1.37           |
| Женщины            |                  |                |                     |                |
| 12-17 лет          | 0.3              | 41             | 0.1                 | 13             |
| менопауза          | -                | 2.3            | -                   | 0.73           |
| Беременные:        |                  |                |                     |                |
| 1-й триместр       | 36               | 240            | 11.4                | 76.3           |
| 2-й триместр       | 60               | 240            | 19.1                | 76.3           |
| 3-й триместр       | 156              | 722            | 49.6                | 229.6          |
| Фазы цикла:        |                  |                |                     |                |
| фолликулярная      | 0.6              | 4.6            | 0.19                | 1.46           |
| лютеиновая         | 7.5              | 80             | 2.39                | 25.4           |
| овуляция           | 11               | 80             | 3.5                 | 25.4           |

## 11. ЛИТЕРАТУРА

1. Christian De Geyter, Maria De Geyter, Peter R. Huber, Eberhard Nieschlag, and Wolfgang Holzgreve – Progesterone serum levels during the follicular phase of the menstrual cycle originate from the crosstalk between the ovaries and the adrenal cortex. Hum. Reprod., Apr 2002; 17: 933 – 939.
2. J. Jaroslav Stern, F. Voss, and C. B. Coulam – Early diagnosis of ectopic pregnancy using receiver – operator characteristic curves of serum progesterone concentrations. Hum. Reprod., May 1993; 8: 775 – 779.
3. B. Gellersen, M. S. Fernandes, and J. J. Brosens – Non-genomic progesterone actions in female reproduction. Hum. Reprod. Update, Jan 2009; 15: 119 – 138.
4. J. Dinny Graham and Christine L. Clarke – Physiological Action of Progesterone in Target Tissues. Endocr. Rev., Aug 1997; 18: 502 – 519.

По вопросам, касающимся качества Набора **«ПРОГЕСТЕРОН-ИФА»**,  
следует обращаться в ООО «ХЕМА» по адресу:  
105043, Москва, а/я 58,  
тел./факс: (495) 737-39-36, 737-00-40, 510-57-07 (многоканальный)

электронная почта: [info@xema.ru](mailto:info@xema.ru); [rqc@xema.ru](mailto:rqc@xema.ru)  
интернет: [www.xema.ru](http://www.xema.ru); [www.xema-medica.com](http://www.xema-medica.com)

Руководитель службы клиентского сервиса ООО «ХЕМА»,  
к. б. н. Д. С. Кострикин

*Instruction for use*

## **A SOLID-PHASE ENZYME IMMUNOASSAY FOR THE QUANTITATIVE DETERMINATION OF PROGESTERONE IN HUMAN BLOOD SERUM OR PLASMA**

### **1. INTENDED USE**

A solid-phase enzyme immunoassay for the quantitative determination of progesterone in blood serum or plasma.

This kit is designed for measurement of progesterone in blood serum or plasma. For possibility of use with other sample types, please, refer to Application Notes (on request). The kit contains reagents sufficient for 96 determinations and allows to analyze 41 unknown samples in duplicates.

### **2. SUMMARY AND EXPLANATION**

Progesterone is a gestagen with a MW of 314.5 Dalton. Progesterone is secreted by corpus luteum, adrenals and testis; it plays a role of a precursor for corticosteroids and androgens. Being an estrogen antagonist, Progesterone induces characteristic changes in endometrium necessary for implantation of an impregnated ovum.

During normal menstrual cycle, Progesterone level remains low until LH peak level begins to drop: only slight but statistically significant elevation of Progesterone level occurs concomitantly with LH peak followed by a decrease of Progesterone concentration. During second stage of the cycle, Progesterone and Estradiol levels increase again to complete luteinization. By the end of the cycle, Progesterone level drops again up to levels seen during follicular phase. This quick drop causes menstrual bleeding.

During pregnancy, Progesterone concentration continuously increases, and it induces proliferation and development of mammary glands and inhibits ovulation. During the first trimester, Progesterone is secreted by corpus luteum while from month 3–4 – by mitochondria of the trophoblast. Progesterone level in maternal blood increases rapidly – by week 7–8 it increases 2-fold and continues to increase by week 37–38. Decreased Progesterone levels indicate pathology of pregnancy while elevated levels suggest renal insufficiency.

Elevated Progesterone levels are found in pregnancy, tumours of adrenals or testicles, chorionepithelioma, in lipid tumours of ovaries as well as after intake of preparations of Progesterone or its analogues.

Decreased Progesterone levels are seen in galactorrhea-amenorrhea syndrome, in pregnant women at risk of premature delivery, and in persons taking some drugs such as oral contraceptives, ampicilline, ethynilestradiol.

### 3. PRINCIPLE OF THE TEST

This test is based on competition enzyme immunoassay principle. Tested specimen is placed into the microwells coated by specific murine monoclonal to progesterone-antibodies simultaneously with conjugated Progesterone-peroxidase. Progesterone from the specimen competes with the conjugated Progesterone for coating antibodies. After washing procedure, the remaining enzymatic activity bound to the microwell surface is detected and quantified by addition of chromogen-substrate mixture, stop solution and photometry at 450 nm. Optical density in the microwell is inversely related to the quantity of the measured analyte in the specimen.

### 4. WARNINGS AND PRECAUTIONS

**4.1.** For professional use only.

**4.2.** This kit is intended for in vitro diagnostic use only.

**4.3. INFECTION HAZARD:** There is no available test methods that can absolutely assure that Hepatitis B and C viruses, HIV-1/2, or other infectious agents are not present in the reagents of this kit. All human products, including patient samples, should be considered potentially infectious. Handling and disposal should be in accordance with the procedures defined by an appropriate national biohazard safety guidelines or regulations.

**4.4.** Avoid contact with stop solution containing 5,0%  $H_2SO_4$ . It may cause skin irritation and burns.

**4.5.** Wear disposable latex gloves when handling specimens and reagents. Microbial contamination of reagents may give false results.

**4.6.** Do not use the kit beyond the expiration date.

**4.7.** All indicated volumes have to be performed according to the protocol. Optimal test results are only obtained when using calibrated pipettes and microplate readers.

**4.8.** Do not smoke, eat, drink or apply cosmetics in areas where specimens or kit reagents are handled.

**4.9.** Chemicals and prepared or used reagents have to be treated as hazardous waste according to the national biohazard safety guidelines or regulations.

**4.10.** Do not mix reagents from different lots.

**4.11.** Replace caps on reagents immediately. Do not swap caps.

**4.12.** Do not pipette reagents by mouth.

**4.13.** Specimens must not contain any AZIDE compounds – they inhibit activity of peroxidase.

**4.14.** Safety Data Sheet for this product is available upon request directly from XEMA Co., Ltd.

**4.15.** The Safety Data Sheet fit the requirements of EU Guideline 91/155 EC.

## 5.1. Contents of the Kit

## 5. KIT COMPONENTS

| Symbol         | Description                                                                                                             | Qty | Units | Colour code              | Stability of opened/diluted components                                                         |
|----------------|-------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|-----|-------|--------------------------|------------------------------------------------------------------------------------------------|
| 1 SORB MTP     | Progesterone EIA strips, 8x12 wells                                                                                     | 1   | pcs   |                          | until exp.date                                                                                 |
| 2 CAL 1-7      | Calibrator set, 0.8 ml each, zero calibrator C1 – 2 ml The set contains 6 calibrators: 0; 1; 3; 10; 30, 100, 300 nmol/l | 7   | pcs   | purple (C1 – colourless) | 2 months                                                                                       |
| 3 CONTROL      | Control serum (0.8 ml)                                                                                                  | 1   | pcs   | colourless               | 2 months                                                                                       |
| 4 CONJ HRP     | Conjugate, 22 ml                                                                                                        | 1   | pcs   | purple                   | until exp.date                                                                                 |
| 5 SUBS TMB     | Substrate solution, 11 ml                                                                                               | 1   | pcs   | colourless               | until exp.date                                                                                 |
| 6 BUF WASH 21X | Washing solution concentrate 21x, 22 ml                                                                                 | 1   | pcs   | colourless               | Concentrate – until exp.date<br>Diluted washing solution – 1 month at 2...+8°C or 5 days at RT |
| 7 STOP         | Stop solution, 11 ml                                                                                                    | 1   | pcs   | colourless               | until exp.date                                                                                 |
| 8 N003         | Plate sealing tape                                                                                                      | 2   | pcs   |                          | N/A                                                                                            |
| 9 K207I        | Instruction Progesterone EIA                                                                                            | 1   | pcs   |                          | N/A                                                                                            |
| 10 K207Q       | QC data sheet Progesterone EIA                                                                                          | 1   | pcs   |                          | N/A                                                                                            |

**5.2. Equipment and material required but not provided**

- Distilled or deionized water;
- Automatic or semiautomatic multichannel micropipettes, 100–250 µl, is useful but not essential;
- Calibrated micropipettes with variable volume, range volume 25–250 µl;
- Dry thermostat for +37 °C ±0,1 °C;
- Calibrated microplate photometer with 450 nm wavelength and OD measuring range 0–3.0.

**5.3. Storage and stability of the Kit**

Store the whole kit at +2...+8 °C upon receipt until the expiration date.

After opening the pouch keep unused microtiter wells TIGHTLY SEALED BY ADHESIVE TAPE (INCLUDED) to minimize exposure to moisture.

**6. SPECIMEN COLLECTION AND STORAGE**

This kit is intended for use with serum or plasma (ACD- or heparinized). Grossly hemolytic, lipemic, or turbid samples should be avoided.

Specimens may be stored for up to 48 hours at +2...+8 °C before testing. For a longer storage, the specimens should be frozen at -20 °C or lower. Repeated freezing/thawing should be avoided.

**7. TEST PROCEDURE****7.1. Reagent Preparation**

- All reagents (including unsealed microstrips) should be allowed to reach room temperature (+18...+25 °C) before use.
- All reagents should be mixed by gentle inversion or vortexing prior to use. Avoid foam formation.
- It is recommended to spin down shortly the tubes with calibrators on low speed centrifuge.
- Prepare washing solution from the concentrate BUF WASH 21X by 21 dilutions in distilled water.

**7.2. Procedural Note:**

It is recommended that pipetting of all calibrators and samples should be completed within 3 minutes.

**7.3. Assay flowchart**

See the example of calibration graphic in Quality Control data sheet.

**7.4. Alternative units:**

1 nmol/l = 0.318 ng/ml

**7.5. Assay procedure**

|    |                                                                                                                                                                                                                                |
|----|--------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|
| 1  | Put the desired number of microstrips into the frame; allocate 16 wells for the calibrators CAL 1-7 and control samples CONTROL and two wells for each unknown sample. DO NOT REMOVE ADHESIVE SEALING TAPE FROM UNUSED STRIPS. |
| 2  | Pipet 25 µl of calibrators CAL 1-7, control samples CONTROL and unknown samples into the wells.                                                                                                                                |
| 3  | Dispense 200 µl of CONJ HRP into the wells. Cover the wells by plate adhesive tape (included into the kit).                                                                                                                    |
| 4  | Incubate 120 minutes at 37 °C.                                                                                                                                                                                                 |
| 5  | Prepare washing solution by 21x dilution of washing solution concentrate (BUF WASH 21X) by distilled water. Wash the strips 5 times.                                                                                           |
| 6  | Dispense 100 µl of SUBS TMB into the wells                                                                                                                                                                                     |
| 7  | Incubate 10-20 minutes at +18...+25 °C                                                                                                                                                                                         |
| 8  | Dispense 100 µl of STOP into the wells.                                                                                                                                                                                        |
| 9  | Measure OD (optical density) at 450 nm.                                                                                                                                                                                        |
| 10 | Set photometer blank on air                                                                                                                                                                                                    |
| 11 | Apply lin-log method for data reduction.                                                                                                                                                                                       |

## 8. 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.

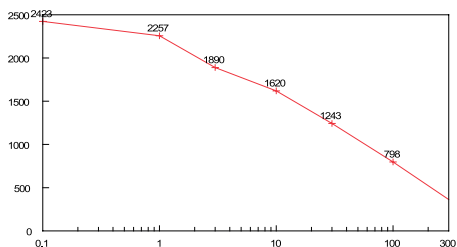
The test must be performed exactly as per the manufacturer's instructions for use. Moreover the user must strictly adhere to the rules of GLP (Good Laboratory Practice) or other applicable federal, state, and local standards and/or laws. This is especially relevant for the use of control reagents. It 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.

## 9. CALCULATION OF RESULTS

1. Calculate the mean absorbance values (OD450) for each pair of calibrators and samples.
2. Plot a calibration curve on graph paper: OD versus progesterone concentration.
3. Determine the corresponding concentration of progesterone in unknown samples from the calibration curve. Manual or computerized data reduction is applicable on this stage. Point-by-point or linear data reduction is recommended due to non-linear shape of curve.
4. Below is presented a typical example of a standard curve with the XEMA Co. Not for calculations!

| Calibrators | Value      | Absorbance Units<br>(450 nm) x 1000 |
|-------------|------------|-------------------------------------|
| CAL 1       | 0 nmol/l   | 2473                                |
| CAL 2       | 1 nmol/l   | 2315                                |
| CAL 3       | 3 nmol/l   | 2007                                |
| CAL 4       | 10 nmol/l  | 1769                                |
| CAL 5       | 30 nmol/l  | 1427                                |
| CAL 6       | 100 nmol/l | 942                                 |
| CAL 7       | 300 nmol/l | 464                                 |



## 10. EXPECTED VALUES

Therapeutical consequences should not be based on results of IVD methods alone – all available clinical and laboratory findings should be used by a physician to elaborate therapeutically measures. Each laboratory should establish its own normal range for Progesterone. Based on data obtained by XEMA, the following normal range is recommended (see below). NOTE: the patients that have received murine monoclonal antibodies for radioimaging or immunotherapy develop high titered anti-mouse antibodies (HAMA). The presence of these antibodies may cause false results in the present assay. Sera from HAMA positive patients should be treated with depleting adsorbents before assaying.

| Sex, age         | Units, nmol/l |             | Units alternative, ng/ml |             |
|------------------|---------------|-------------|--------------------------|-------------|
|                  | Lower limit   | Upper limit | Lower limit              | Upper limit |
| Males            | -             | 4.0         | -                        | 1.27        |
| 12-17 yrs        | 0.3           | 4.3         | 0.1                      | 1.37        |
| Females          |               |             |                          |             |
| 12-17 yrs        | 0.3           | 41          | 0.1                      | 13          |
| post menopausal  | -             | 2.3         | -                        | 0.73        |
| Pregnancy:       |               |             |                          |             |
| 1st trimester    | 36            | 240         | 11.4                     | 76.3        |
| 2nd trimester    | 60            | 240         | 19.1                     | 76.3        |
| 3rd trimester    | 156           | 722         | 49.6                     | 229.6       |
| Menstrual cycle: |               |             |                          |             |
| follicular phase | 0.6           | 4.6         | 0.19                     | 1.46        |
| luteinic phase   | 7.5           | 80          | 2.39                     | 25.4        |
| ovulation        | 11            | 80          | 3.5                      | 25.4        |

## 11. PERFORMANCE CHARACTERISTICS

### 11.1. Analytical specificity / Cross reactivity

| Analyte                | Cross-reactivity, % wt/wt |
|------------------------|---------------------------|
| Progesterone           | 100                       |
| 17-Hydroxyprogesterone | 1                         |
| 11-Hydroxyprogesterone | 25                        |
| Corticosterone         | 0.01                      |
| Pregnenolone           | 0.9                       |
| Deoxycorticosterone    | 0.3                       |
| Deoxycortisol          | 0.03                      |
| Cortisol               | 0.002                     |

**11.2.** Analytical sensitivity. Sensitivity of the assay was assessed as being 0.25 nmol/l.

**11.3.** Linearity. Linearity was checked by assaying dilution series of 5 samples with different progesterone concentrations. Linearity percentages obtained ranged within 90 to 110%.

**11.4.** Recovery. Recovery was estimated by assaying 5 mixed samples with known progesterone concentrations. The recovery percentages ranged from 90 to 110%.

## 12. LITERATURE

1. Christian De Geyter, Maria De Geyter, Peter R. Huber, Eberhard Nieschlag, and Wolfgang Holzgreve – Progesterone serum levels during the follicular phase of the menstrual cycle originate from the crosstalk between the ovaries and the adrenal cortex. Hum. Reprod., Apr 2002; 17: 933–939.
2. J. Jaroslav Stern, F. Voss, and C.B. Coulam – Early diagnosis of ectopic pregnancy using receiver – operator characteristic curves of serum progesterone concentrations. Hum. Reprod., May 1993; 8: 775 – 779.
3. B. Gellersen, M.S. Fernandes, and J.J. Brosens – Non-genomic progesterone actions in female reproduction. Hum. Reprod. Update, Jan 2009; 15: 119 – 138.
4. J. Dinny Graham and Christine L. Clarke – Physiological Action of Progesterone in Target Tissues. Endocr. Rev., Aug 1997; 18: 502 – 519.