



# **PROG-EASIA**

*KAP1451*

---

**LOT** : 160309/1

Read entire protocol before use.

# PROG-EASIA

## *I. INTENDED USE*

Enzyme Immunoassay for the quantitative measurement of Progesterone in serum and plasma (96 determinations).

## *II. GENERAL INFORMATION*

- A. Proprietary name :** DIAsource PROG-EASIA Kit
- B. Catalogue number :** KAP1451 : 96 tests
- C. Manufactured by :** DIAsource ImmunoAssays S.A.  
Rue du Bosquet, 2, B-1348 Louvain-la-Neuve, Belgium.

**For technical assistance or ordering information contact :**  
**Tel : +32 (0)10 84.99.11                      Fax : +32 (0)10 84.99.91**

## *III. INTRODUCTION*

### **A. Progesterone**

Progesterone is a C-21 steroid hormone (molecular weight: 314.5) which is synthesized from cholesterol via pregnenolone in the granulosa and theca cells of the corpus luteum under the influence of LH. The major production sites are ovary and placenta and somewhat the adrenal cortex in both men and women.

Progesterone is rapidly metabolized in the liver. Blood levels are very low during the follicular phase whereas one does observe a sharply increase during the luteal phase of menstrual cycles reaching a maximum 5 to 10 days after the midcycle LH peak.

### **B. Clinical applications of the dosage of Progesterone**

Serum Progesterone levels, which are low during the follicular phase, increase during the luteal phase of menstrual cycle. Unless pregnancy occurs, the Progesterone level declines 4 days before the next menstrual period. Thus, the measurement of Progesterone levels constitutes a well-established method for detection of ovulation.

But there are many cases where the progesterone measurements are also of Interest :

- to check the effectiveness of ovulation induction;
- to monitor the embryo transfer and Progesterone replacement therapy;
- to detect the patients at risk for abortion during the beginning of pregnancy;
- to aid in the diagnostic of ectopic pregnancy;
- to detect all ovarian tumor (benign and malignant) in postmenopausal women;
- to diagnose luteinized unruptured follicle by the dosage of 17 beta.-Estradiol and Progesterone levels in peritoneal fluid;
- the steroid profiles of follicles fluids and the ratio of E2/PROG allow to detect a normal or a dysfunctional ovulation induction. (The empty follicular syndrome may reflect a dysfunctional ovulation induction).





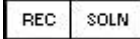
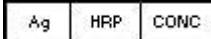
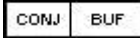
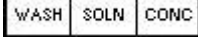
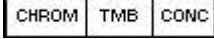
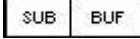

### **C. Principle of the test**

DIAsource PROG-EASIA is a direct Enzyme Immunoassay performed in microtiter plate. A fixed amount of Progesterone labelled with horseradish peroxidase (HRP) competes with unlabelled Progesterone present in calibrators or samples for a limited number of specific antibody binding sites.

After 3 hours Incubation at RT, the plate is washed to stop the reaction.

The revelation solution (tetramethylbenzidine (TMB)-H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>) is added and incubated for 30 min. The reaction is stopped with H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> and the microtiter plate is read at the appropriate wavelength. The amount of substrate turnover is determined colorimetrically by measuring the absorbance which is inversely proportional to the Progesterone concentration. Progesterone levels of the samples are extrapolated from the plotted calibration curve.

## V. REAGENTS PROVIDED

Reagents	Quantity	Color Code	Reconstitution
 Microtiterplate with 96 anti-progesterone coated wells	96 wells	blue	Ready for use
 Calibrator 0 ng/ml in human serum and preservatives	1 vial	yellow	Reconstitute with 2 ml reconstitution solution
 Calibrator in human serum and preservatives (see exact values on vial labels)	5 vials	yellow	Reconstitute with 0.5 ml reconstitution solution
 Controls 1 and 2 in human serum and preservatives	2 vials	silver	Reconstitute with 0.5 ml reconstitution solution
 Reconstitution solution with preservatives	1 vial 8 ml	yellow	Ready for use
 Concentrated Progesterone-HRP conjugate in phosphate buffer with preservatives	1 vial 1 ml	red	Add 0.2 ml into 1 vial of conjugate buffer
 Conjugate buffer for dilution of Progesterone Conjugate	3 vials 21 ml	red	Ready for use
 Washing solution	1 vial 10 ml	brown	Dilute 2 ml in 400 ml distilled water or the vial content in 2000 ml distilled water
 Chromogen TMB (Tetramethylbenzidine)	1 vial 1 ml	green	Add 0.20 ml into 1 vial of substrate buffer
 Substrate buffer H2O2 in acetate/citrate buffer	3 vials 21 ml	white	Ready for use
 H2SO4 1.8 N Stopping reagent	1 vial 6 ml	black	Ready for use

**Note:** Calibrator 0 ng/ml is recommended for samples dilutions.

## VI. STORAGE AND STABILITY

- Store the kit at 2°C to 8°C until expiration date mentioned on the kit label
- Once opened, the HRP-Progesterone vial must be stored at 2° to 8°C.
- After reconstitution with the special solution provided, calibrators and controls may be stored at 4°C for one week. For longer storage, they have to be frozen. Three freezing-thawing cycles do not affect calibrators quality.
- Store the unused strips at 2°C to 8°C in the closed bag containing the dessicant until expiration date.
- In order to avoid obstructions of the washerheads, it is recommended to prepare every day a fresh diluted washing solution.

## VII. MATERIAL REQUIRED BUT NOT PROVIDED

- Distilled water
- Pipettes : 50 µl, 100 µl, 200 µl, 500 µl and 2 ml
- Vortex mixer and magnetic stirrer
- Shaker at 700 rpm

## VIII. WARNINGS

### Safety

- For In vitro diagnostic use only
- The human blood components included in this kit have been tested and found non reactive for HBsAg and anti-HIV. Nevertheless, no known method can offer complete assurance that human blood derivatives will not transmit hepatitis, AIDS or other Infections. Therefore, handling of reagents serum or plasma specimens should be in accordance with local safety procedures, e.g.CDC/HHI Health Manual : 'Biosafety in Microbiological and Biomedical Laboratories" 1984.
- Avoid any skin contact with H2SO4, H2O2 and TMB. In case of contact, wash thoroughly with water.
- Do not eat, drink, smoke or apply cosmetics where kit reagents are used.
- Do not pipet liquids by mouth.

### Handling

- Do not use kit components beyond the expiration date.
- Do not mix materials from different kit lots.
- Do not mix strips from different plates.
- Bring all the reagents and specimens to room temperature (18°C to 30°C) prior to use.
- Thoroughly mix the reagents and samples before use by gentle agitation or swirling.
- Use a clean disposable plastic pipette tip for each reagent, calibrator, control or specimen addition in order to avoid cross-contamination; for the dispensing of H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> and the substrate solution, avoid pipettes with metal parts.
- Use a clean plastic container to prepare the washing solution.
- The TMB solution in substrate buffer should be colourless. If a dark blue colour develops within a few minutes after preparation, this indicates that the reagent is unusable and must be discarded.
- During incubation with revelation solution, avoid direct sunlight on the microtiter plate.
- Respect the incubation times described in the assay procedure.
- Dispense the revelation solution immediately after the washing of the microtiter plate.

## IX. SAMPLE COLLECTION AND PREPARATION

- No special pre-treatment of the sample is necessary. Samples suspected to contain Progesterone concentration higher than the highest calibrator are to be diluted with the zero calibrator.
- Prior to use, all the samples and reagents must be at room temperature. It's recommended to vortex the samples before use.
- Hemolysis has to be avoided.

Samples may be stored for 24 hours at 2° to 8°C prior to testing. Samples held for longer time must be frozen at -20°C prior to assaying.

- Serum, heparinized plasma or EDTA plasma provide similar results.  
 $Y(\text{serum}) = 0.93 \times (\text{EDTA plasma}) + 0.11 \quad R=0.97 \quad n=57$   
 $Y(\text{serum}) = 0.94 \times (\text{hep. plasma}) + 0.27 \quad R=0.97 \quad n=57$

## X. REAGENTS PREPARATION

- HRP-Progesterone conjugate : pipette 0.2 ml of the concentrated HRP-Progesterone conjugate into one vial of conjugate buffer. Extemporaneous preparation is mandatory. Maximum stability is 4 hours at room temperature or 24 hours at 2°C to 8°C., avoiding direct exposure to sunlight.
- Washing solution : dilute 2 ml in 400 ml distilled water or all the content of the vial in 2000 ml distilled water (use a magnetic stirrer). The washing solution is common to all DIASource EASIA kits.

Revelation solution: pipette 0.2 ml of the chromogen TMB into one of the vials of substrate buffer. Extemporaneous preparation is recommended. Maximum stability before use is 15 min. at room temperature avoiding direct exposure to sunlight and the excess must be discarded afterwards.

## XI. ASSAY PROCEDURE

It's recommended to perform the assays in duplicate and to follow the Instruction of the assay procedure to obtain reliable results.

- Select sufficient strips to accommodate calibrators, controls and samples.
- Fit the strips into the holding frame.
- Dispense 50 µl of each calibrator, control or sample into the appropriate wells. Time between distribution of the first calibrator and the last sample can be up to 40 minutes without affecting the results. Vertical alignment is recommended.
- Dispense 200 µl of Progesterone-HRP-conjugate in each well.
- Incubate for 3 hours at 18-26°C on an horizontal shaker set at 700 +/- 100 RPM.

6. Wash the plate by :
  - a) aspirating the liquid from each well,
  - b) dispensing 0.4 ml of washing solution into each well,
  - c) aspirating the contents of each well.
 Repeat steps b) and c) 2 times.
7. Dispense 200 µl of the freshly prepared revelation solution in each well. Immediately after the washing step is completed.
8. Incubate the plate for 30 min. at 18-26°C, avoiding direct sunlight, on an horizontal shaker set at 700 +/- 100RPM.
9. Dispense 50 µl of stopping reagent into each well.
10. Read the absorbance within 1 hour at 450 nm and calculate the results as described in the section 9.

## XII. READING AND RESULTS INTERPRETATION

- Read the microtiter plate at 450 nm (reference filter : 630 or 650 nm).
  - Calculate the mean of duplicate determinations, rejecting obvious outliers.
  - For each calibrator or sample calculate
 
$$B/BO \cdot 100 = \frac{OD \text{ (calibrator or samples)} \times 100}{OD \text{ (zero calibrator)}}$$
  - Using either linear-linear or semi log graph paper, plot the (B/BO x 100) values for each calibrator point as a function of the Progesterone concentration of each calibrator point.
  - By interpolation of the samples (B/BO x 100) values, determine the Progesterone concentration of the samples from the reference curve.
- The 4 parameters logistic curve-fit is recommended.

## XIII. EXAMPLE OF TYPICAL REFERENCE CURVE

The following data are for demonstration purpose only and cannot be used in place of data generated at the time of assay.

CALIBRATORS	OD units	B/BO x 100
0 ng/ml	1.767	100
0.20 ng/ml	1.569	88.8
0.75 ng/ml	1.236	69.9
2.00 ng/ml	0.813	46.1
7.50 ng/ml	0.442	25.1
20.00 ng/ml	0.233	13.2

## XIV. EXPECTED VALUES

The normal values provided below are given for guidance. Each laboratory should establish its own normal range of values.

	Range (ng/ml)		Number of subjects
MALES	0.18	0.90	51
FEMALES			
- follicular phase	0.19	0.90	57
- luteal phase	1.6	18.6	57
- menopause	0.09	0.73	50
- pregnancy 1 <sup>st</sup> trimester	4.4	33	40
- pregnancy 2 <sup>nd</sup> trimester	18.5	107	40
- pregnancy 3 <sup>rd</sup> trimester	50	224	43

Conversion factor : ng/ml x 3.18 = nmol/L  
nmol/L x 0.314 = ng/ml

## XV. PERFORMANCE CHARACTERISTICS

- Minimum detectable concentration (MDC)  
Minimum detectable Concentration of Progesterone in 20 different assays was 0.08 +/- 0.03 ng/ml.
- Specificity  
The percentage of cross-reactivity was estimated under physiological conditions in serum by comparison of the concentration yielding a 50 % binding inhibition :

Compound	Cross-reactivity (%)
Progesterone	100
17-α OH-Progesterone	0.95
20-α OH-Progesterone	0.056
5β-Pregnan-3α, 20α diol	0.046
5β-Pregnan-3,20 dione	0.30
Pregnenolone	0.16
Cortisol	0.005
Deoxycorticosterone	1.08
DHEA-SO4	0.009
Estrone	0.013
Norethisterone	0.011
Norgestrel	0.007

## Precision

INTRA ASSAY				INTER ASSAY			
Serum	N	<X> ± SD (ng/ml)	CV (%)	Serum	N	<X> ± SD (ng/ml)	CV (%)
1	16	1.51 ± 0.16	10.7	1	12	0.60 ± 0.05	12.5
2	16	6.43 ± 0.68	10.5	2	12	3.3 ± 0.29	8.8
3	16	10.30 ± 1.0	9.7	3	12	8.3 ± 0.90	15.5
				4	12	16.2 ± 1.54	9.6

## Accuracy

RECOVERY				DILUTION TEST			
Sample	Added (ng/ml)	Reco- vered (ng/ml)	Reco- very (%)	Serum Dilution	Theori- Tical Conc. (ng/ml)	Measu- red Conc. (ng/ml)	Reco- very (%)
Serum	20.0	22.3	111	1/1	16.8	16.8	100
	10.0	12.1	121	1/2	8.4	8.3	99
	5.0	5.3	106	1/4	4.2	4.3	102
	1.67	1.9	114	1/8	2.1	2.2	100
				1/16	1.05	1.13	108
Serum	20.0	17.2	86	1/1	4.0	4.0	100
	10.0	11.2	112	1/2	2.0	2.3	115
	5.0	4.8	96	1/4	1.0	1.1	110
	1.67	1.83	110	1/8	0.5	0.55	110

## XVI. BIBLIOGRAPHY

1. ALPER M. et al (1987) Comparison of follicular fluid hormones in patients with one or two ovaries participating in a program of in vitro fertilization. *Fertil. and Steril.*, **48**, 1, 94-97.
2. GIDLEY-BAIRD A. et al. (1986) Failure of implantation in human in vitro fertilization and embryo transfer patients : the effects of altered progesterone/estrogen ratios in humans and mice. *Fertil. Steril.*, **45**, 1, 69-74.
3. HEINONEN P. et al (1985) Elevated progesterone levels in serum and ovarian venous blood in patients with ovarian tumors. *Acta Obstet. Gynecol. Scand.*, **64**, 649-652.
4. JANSSEN-CASPERS H. et al. (1986) Diagnosis of luteinized unruptured follicle by ultrasound and steroid hormone assays in peritoneal fluid : a comparative study. *Fertil. Steril.*, **46**, 5, 823-827.
5. KO-ENHUANG et al. (1986) Serum progesterone levels in women treated with human menopausal gonadotropin and human chorionic gonadotropin for in vitro fertilization. *Fertil. Steril.*, **46**, 5, 903-906.
6. KRUITWAGEN R. et al. (1987) Oestradiol-17b and progesterone level changes in peritoneal fluid around the time of ovulation. *British Journal of Obstetrics and Gynecology*, **94**, 548-553.
7. MATTHEWS C. (1986) Serum progesterone levels as an aid in the diagnosis of ectopic pregnancy. *Obstetrics and Gynecology*, **68**, 390-394.
8. OSKOWITZ S. et al (1986) Luteal phase serum progesterone levels after follicle aspiration with and without clomiphene citrate treatment. *Fertil. Steril.*, **46**, 3, 461-465.

## SUMMARY OF ASSAY PROCEDURE

	Calibrators (µl)	Controls-Samples (µl)
Calibrators (0-5)	50	-
Controls-samples	-	50
Progesterone-HRP	200	200
Incubate for 3 hours at 18-26°C with continuous shaking (700 RPM)		
Aspirate the content of each well		
Wash 3 times with 0.4 ml of wash solution and aspirate		
Substrate solution	200	200
Incubate 30 min. at 18-26°C with continuous shaking (700 RPM)		
H <sub>2</sub> SO <sub>4</sub>	50	50
Read the microtiter plate at 450 nm (versus 630 or 650 nm)		

DIAsource Catalogue Nr : KAP1451	P.I. Number : 1700498/en	Revision nr : 160309/1
-------------------------------------	-----------------------------	---------------------------

Leer todo el protocolo antes de utilizar.

# PROG-EASIA

## I. USO PREVISTO

Inmunoensayo enzimático para la medición cuantitativa de progesterona en suero y plasma (96 determinaciones).

## II. INFORMACIÓN GENERAL

- A. Nombre registrado :** DIAsource PROG-EASIA Kit
- B. Número de catálogo :** KAP1451 : 96 pruebas
- C. Fabricado por:** DIAsource ImmunoAssays S.A.  
Rue du Bosquet, 2, B-1348 Louvain-la-Neuve, Bélgica.

**Para obtener asistencia técnica o información sobre pedidos póngase en contacto con :**

**Teléfono : +32 (0)10 84.99.11      Fax : +32 (0)10 84.99.91**

## III. INTRODUCCIÓN

### A. Progesterona

La progesterona es una hormona esteroidal C-21 (peso molecular: 314,5) sintetizada a partir del colesterol via pregnenolona en las células tecaes y granulosa en el cuerpo lúteo bajo la influencia de LH. Los sitios principales de producción son los ovarios y la placenta y una menor cantidad en la corteza suprarrenal tanto en hombres como en mujeres.

La progesterona se metaboliza rápidamente en el hígado. Los niveles sanguíneos son muy bajos durante la fase folicular mientras que se observa un aumento marcado durante la fase lútea del ciclo menstrual, alcanzando los valores máximos entre 5 y 10 días después del tope de HL en la mitad del ciclo.

### B. Aplicaciones clínicas de las dosis de progesterona

Los niveles de progesterona sérica que están disminuidos durante la fase folicular, aumentan durante la fase lútea del ciclo menstrual. A no ser que haya un embarazo, el nivel de progesterona disminuye 4 días antes del período menstrual siguiente. Así, la medición de los niveles de progesterona constituye un método bien establecido para la detección de la ovulación. Sin embargo hay muchos otros casos en que la medición de progesterona también resulta interesante:

- Para comprobar cuán efectiva es la inducción de ovulación;
- Para controlar la transferencia del embrión y la terapia de reemplazo de progesterona;
- Para detectar pacientes con riesgo de aborto al principio del embarazo;
- Para ayudar al diagnóstico de embarazo ectópico;
- Para detectar todos los tumores ováricos (benignos y malignos) en mujeres post-menopáusicas;
- Para diagnosticar un folículo luteinizado sin ruptura por los niveles de la dosis de 17 beta estradiol y progesterona en el líquido peritoneal;
- Los perfiles esteroideos de fluidos foliculares y la proporción de E2/PROG permiten la detección de una inducción a la ovulación normal o disfuncional. (El síndrome de folículo vacío puede reflejar una inducción disfuncional de la ovulación).




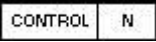


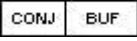
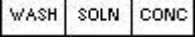
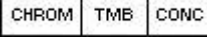

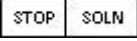
### C. Principio de la prueba

DIAsource PROG-EASIA es un inmunoensayo enzimático directo realizado en una microplaca. Una cantidad fija de progesterona marcada con peroxidasa de rábano picante (HRP), compete con la progesterona no marcada que está presente en los calibradores o las muestras, por un número limitado de sitios de unión específicos para los anticuerpos.

Después de tres horas de incubación a temperatura ambiente, la placa se lava para detener la reacción.

La solución de revelado (tetrametilbencidina (TMB)-H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>) se añade y se incuba por 30 min. La reacción se detiene con H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> y la microplaca se lee a una longitud de onda adecuada. La cantidad de sustrato utilizado se determina en forma colorimétrica midiendo la absorbancia que es inversamente proporcional a la concentración de progesterona. Los niveles de progesterona de las muestras se determinan extrapolándolos de la curva de calibración dibujada.

## V. REACTIVOS SUMINISTRADOS

Reactivos	Cantidad	Código color	Reconstitución
 Microplaca con 96 pocillos recubiertos con anti progesterona	96 pocillos	azul	Listo para usar
 Calibrador 0 ng/ml en suero humano y conservantes	1 vial	amarillo	Reconstituir con 2 ml de solución de reconstitución
 Calibrador en suero humano y conservantes (ver los valores exactos en las etiquetas de los viales)	5 viales	amarillo	Reconstituir con 0,5 ml de solución de reconstitución
 Controles 1 y 2 en suero humano y conservantes	2 viales	plata	Reconstituir con 0,5 ml de solución de reconstitución
 Solución de reconstitución y conservantes	1 vial 8 ml	amarillo	Listo para usar
 Concentrado de conjugado HRP con progesterona en tampón fosfato con conservantes	1 vial 1 ml	rojo	Añadir 0,2 ml en 1 vial de tampón del conjugado
 Tampón del conjugado para diluir el conjugado de progesterona	3 viales 21 ml	rojo	Listo para usar
 Solución de lavado	1 vial 10 ml	marrón	Diluir 2 ml en 400 ml de agua destilada o todo el contenido de vial en 2000 ml de agua destilada
 Cromógeno TMB (Tetrametilbencidina)	1 vial 1 ml	verde	Añadir 0,20 ml en 1 vial de tampón del sustrato
 Tampón del sustrato H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> en tampón de citrato/acetato	3 viales 21 ml	blanco	Listo para usar
 H <sub>2</sub> SO <sub>4</sub> 1,8 N Reactivo de parada	1 vial 6 ml	negro	Listo para usar

**Nota:** Se recomienda utilizar el calibrador 0 ng/ml para diluir las muestras.

## VI. ALMACENAJE Y ESTABILIDAD

- Almacenar el kit a 2 – 8°C hasta la fecha de caducidad impresa en la etiqueta del kit.
- Una vez abierto, almacenar el vial de conjugado HRP con progesterona a 2 – 8°C.
- Después de reconstituir con la solución especial suministrada, los calibradores y los controles se pueden almacenar a 4°C por una semana. Para almacenaje prolongado se deben congelar. Tres ciclos de congelación y descongelación no afectan la calidad de los calibradores.
- Almacenar las tiras no utilizadas a 2 – 8°C en la bolsa cerrada que contiene el desecante, hasta la fecha de caducidad.
- Para evitar obstrucciones en los tubos de lavado, se recomienda preparar la solución de lavado fresca diariamente.

## VII. MATERIAL NECESARIO PERO NO SUMINISTRADO

- Agua destilada
- Pipetas : 50 µl, 100 µl, 200 µl, 500 µl y 2 ml
- Agitador Vortex y agitador magnético
- Agitador a 700 rpm

## VIII. ADVERTENCIAS

### Seguridad

- Solo para uso en diagnóstico *in vitro*
- Los componentes de sangre humana incluidos en este kit han sido analizados y han resultado no reactivos para HBsAg y anti-VIH. Sin embargo, no existe un método conocido que pueda ofrecer seguridad absoluta de que los derivados de la sangre humana no transmitirán hepatitis, SIDA u otras infecciones. Por lo tanto, el manejo de reactivos, muestras de suero o plasma se debe hacer de acuerdo con los procedimientos de seguridad locales, p. ej. CDC/HHI Health Manual: "Biosafety in Microbiological and Biomedical Laboratories" 1984.
- Evitar el contacto de la piel con H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>, H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> y TMB. En caso de contacto, lavar con abundante agua.
- No comer, beber, fumar o aplicarse cosméticos en el lugar donde se utilizan los reactivos del kit.
- No pipetear líquidos con la boca.

### Manejo

- No utilizar los componentes del kit después de la fecha de caducidad.
- No mezclar materiales de kits de diferentes lotes.
- No mezclar tiras de diferentes placas.
- Dejar que todos los reactivos alcancen temperatura ambiente (18°C a 30°C) antes de utilizar.
- Mezclar muy bien todos los reactivos y muestras agitando o girando suavemente.
- Utilizar una punta de pipeta plástica desechable limpia cada vez que deba añadir reactivo, calibrador, control o muestra para evitar contaminación cruzada. Al dispensar H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> y solución de sustrato evitar pipetas con partes metálicas.
- Utilizar un contenedor de plástico limpio para preparar la solución de lavado.
- La solución TMB en un tampón de sustrato debe ser incolora. Un color azul oscuro indica que el reactivo no se puede utilizar y se debe eliminar.
- Durante la incubación con la solución de revelado, evitar la luz solar directa sobre la microplaca.
- Adherirse a los tiempos de incubación detallados en el procedimiento del ensayo.
- Dispensar la solución de revelado inmediatamente después de lavar la microplaca.

## IX. TOMA DE MUESTRA Y PREPARACIÓN

- No es necesario tratar las muestras antes del ensayo. Las muestras que se sospecha que contienen concentraciones de progesterona superiores al calibrador más concentrado deben diluirse con el calibrador cero.
- Antes de utilizarlas todas las muestras y reactivos deben estar a temperatura ambiente. Se recomienda agitar las muestras en un Vortex antes de utilizar.
- Evitar la hemólisis.

Las muestras pueden almacenarse por 24 horas a 2° a 8°C antes de la prueba. Las muestras almacenadas por más tiempo deben congelarse a -20°C antes de analizar.

- El suero, el plasma heparinizado o plasma con EDTA dan resultados similares.  
 $Y(\text{suero}) = 0,93 \times (\text{EDTA plasma}) + 0,11$      $R=0,97$      $n=57$   
 $Y(\text{suero}) = 0,94 \times (\text{hep. plasma}) + 0,27$      $R=0,97$      $n=57$

## X. PREPARACIÓN DE REACTIVOS

- Conjugado HRP-Progesterona : pipetear 0,2 ml del concentrado del conjugado HRP-Progesterona en un vial de tampón del conjugado. Se debe preparar inmediatamente antes de utilizar. La estabilidad máxima es de 4 horas a temperatura ambiente o 24 horas a 2 – 8°C cuando está protegida de la luz solar directa
- Solución de lavado : Diluir 2 ml en 400 ml de agua destilada o el contenido total del vial en 2000 ml agua destilada (utilizar un agitador magnético). La solución de lavado en la misma para todos los kits de DIASource EASIA.

- Solución de revelado: Pipetear 0,2 ml del cromógeno (TMB) en uno de los viales de tampón de sustrato. Se recomienda preparar inmediatamente antes de utilizar. La estabilidad máxima es de 15 minutos a temperatura ambiente cuando está protegida de la luz solar directa y lo que sobre debe eliminarse.

## XI. PROCEDIMIENTO DEL ENSAYO

Se recomienda realizar los ensayos en duplicado y seguir las instrucciones del procedimiento del ensayo fielmente para obtener resultados confiables.

1. Seleccionar suficientes tiras para acomodar los controles, los calibradores y todas las muestras.
2. Colocar las tiras en el marco de sostén.
3. Dispensar 50 µl de cada calibrador, control o muestra en los pocillos adecuados. El tiempo transcurrido en la distribución del primer calibrador y la última muestra puede ser de hasta 40 minutos sin que se afecten los resultados. Se recomienda la alineación vertical.
4. Dispensar 200 µl de conjugado progesterona-HRP en cada pocillo
5. Incubar por tres horas a 18-26°C en un agitador horizontal colocado a 700 +/- 100 RPM.
6. Lavar la placa :
  - a) aspirar el líquido de cada pocillo;
  - b) dispensar 0,4 ml de solución de lavado en cada pocillo;
  - c) aspirar el contenido de cada pocillo.
 Repetir los pasos b) y c) 2 veces.
7. Dispensar 200 µl de la solución de revelado recién preparada en cada pocillo inmediatamente después terminado el paso de lavado.
8. Incubar la placa durante 30 minutos a 18-26°C, protegiéndola de la luz solar directa en un agitador horizontal a 700 +/- 100 RPM.
9. Dispensar 50 µl de solución de parada en cada pocillo.
10. Leer la absorbancia dentro de una hora a 450 nm y calcular los resultados como se describe en la sección 9.

### XII. LECTURA E INTERPRETACIÓN DE RESULTADOS

- Leer la microplaca a 450 nm (filtro de referencia : 630 o 650 nm).
- Calcular la absorbancia promedio de las muestras en duplicado, eliminando los valores extremos.
- Por cada calibrador o muestra calcular
 
$$B/BO \times 100 = \frac{DO \text{ (calibrador o muestras)} \times 100}{DO \text{ (calibrador cero)}}$$
- Utilizando un papel de gráfico lineal-lineal o semi-log, trazar los valores (B/BO x 100) para cada punto de calibrador como una función de la concentración de progesterona para cada punto de calibrador.
- Interpolando los valores de las muestras (B/BO x 100), determinar las concentraciones de progesterona de las muestras a partir de la curva de referencia

Se recomienda el ajuste de la curva logística de 4 parámetros.

### XIII. EJEMPLO DE CURVA DE REFERENCIA TÍPICA

Los siguientes datos son solo como ejemplo y no pueden utilizarse en lugar de los datos generados en el ensayo.

CALIBRADORES	Unidades de DO	B/BO x 100
0 ng/ml	1,767	100
0,20 ng/ml	1,569	88,8
0,75 ng/ml	1,236	69,9
2,00 ng/ml	0,813	46,1
7,50 ng/ml	0,442	25,1
20,00 ng/ml	0,233	13,2

### XIV. VALORES ESPERADOS

Los valores normales suministrados a continuación son solo una guía. Cada laboratorio debe establecer su propio rango de valores normales.

	Rango (ng/ml)		Número de sujetos
<b>HOMBRES</b>	0,18	0,90	51
<b>MUJERES</b>			
- fase folicular	0,19	0,90	57
- fase lútea	1,6	18,6	57
- menopausia	0,09	0,73	50
- embarazo 1 <sup>st</sup> trimestre	4,4	33	40
- embarazo 2 <sup>nd</sup> trimestre	18,5	107	40
- embarazo 3 <sup>rd</sup> trimestre	50	224	43

Factor de conversión : ng/ml x 3,18 = nmol/l  
nmol/l x 0,314 = ng/ml

### XV. CARACTERÍSTICAS DEL RENDIMIENTO

- La mínima concentración detectable (MDC)
- La mínima concentración detectable de progesterona en 20 ensayos diferentes fue de 0,08 +/- 0,03 ng/ml.
- Especificidad  
Se estimó que el porcentaje de reacción cruzada, en condiciones fisiológicas en suero comparando con la concentración, produjo un 50% de inhibición de la unión:

Compuesto	Reactividad cruzada(%)
Progesterona	100
17-α OH-Progesterona	0,95
20-α OH-Progesterona	0,056
5β-Pregnan-3α, 20α diol	0,046
5β-Pregnan-3,20 diona	0,30
Pregnenolona	0,16
Cortisol	0,005
Desoxicorticoesterona	1,08
DHEA-SO4	0,009
Estrona	0,013
Noretisterona	0,011
Norgestrel	0,007

#### • Precisión

INTRA ENSAYO				ENTRE ENSAYOS			
Suero	N	<X> ± SD (ng/ml)	CV (%)	Suero	N	<X> ± SD (ng/ml)	CV (%)
1	16	1,51 ± 0,16	10,7	1	12	0,60 ± 0,05	12,5
2	16	6,43 ± 0,68	10,5	2	12	3,3 ± 0,29	8,8
3	16	10,30 ± 1,0	9,7	3	12	8,3 ± 0,90	15,5
				4	12	16,2 ± 1,54	9,6

#### • Exactitud

Muestra	RECUPERACIÓN			PRUEBA DE DILUCIÓN			
	Añadido (ng/ml)	Recuperado (ng/ml)	Recuperado (%)	Dilución Del suero	Conc. teórica (ng/ml)	Conc. medida (ng/ml)	Recuperación (%)
Suero	20,0	22,3	111	1/1	16,8	16,8	100
	10,0	12,1	121	1/2	8,4	8,3	99
	5,0	5,3	106	1/4	4,2	4,3	102
	1,67	1,9	114	1/8	2,1	2,2	100
				1/16	1,05	1,13	108
Suero	20,0	17,2	86	1/1	4,0	4,0	100
	10,0	11,2	112	1/2	2,0	2,3	115
	5,0	4,8	96	1/4	1,0	1,1	110
	1,67	1,83	110	1/8	0,5	0,55	110

### XVI. BIBLIOGRAFÍA

1. ALPER M. et al (1987) Comparison of follicular fluid hormones in patients with one or two ovaries participating in a program of in vitro fertilization. *Fertil. and Steril.*, **48**, 1, 94-97.
2. GIDLEY-BAIRD A. et al. (1986) Failure of implantation in human in vitro fertilization and embryo transfer patients : the effects of altered progesterone/estrogen ratios in humans and mice. *Fertil. Steril.*, **45**, 1, 69-74.
3. HEINONEN P. et al (1985) Elevated progesterone levels in serum and ovarian venous blood in patients with ovarian tumors. *Acta Obstet. Gynecol. Scand.*, **64**, 649-652.
4. JANSSEN-CASPERS H. et al. (1986) Diagnosis of luteinized unruptured follicle by ultrasound and steroid hormone assays in peritoneal fluid : a comparative study. *Fertil. Steril.*, **46**, 5, 823-827.
5. KO-ENHUANG et al. (1986) Serum progesterone levels in women treated with human menopausal gonadotropin and human chorionic gonadotropin for in vitro fertilization. *Fertil. Steril.*, **46**, 5, 903-906.
6. KRUITWAGEN R. et al. (1987) Oestradiol-17b and progesterone level changes in peritoneal fluid around the time of ovulation. *British Journal of Obstetrics and Gynecology*, **94**, 548-553.
7. MATTHEWS C. (1986) Serum progesterone levels as an aid in the diagnosis of ectopic pregnancy. *Obstetrics and Gynecology*, **68**, 390-394.
8. OSKOWITZ S. et al (1986) Luteal phase serum progesterone levels after follicle aspiration with and without clomiphene citrate treatment. *Fertil. Steril.*, **46**, 3, 461-465.



## RESUMEN DEL PROCEDIMIENTO DEL ENSAYO

	Calibradores (µl)	Controles-Muestras (µl)
Calibradores (0-5)	50	-
Controles-muestras	-	50
Progesterona-HRP	200	200
Incubar por 3 horas a 18-26°C agitando continuamente (700 RPM)		
Aspirar el contenido de cada pocillo		
Lavar 3 veces con 0,4 ml de solución de lavado y aspirar		
Solución del sustrato	200	200
Incubar 30 min. a 18-26°C agitando continuamente (700 RPM)		
H <sub>2</sub> SO <sub>4</sub>	50	50
Leer la microplaca a 450 nm (versus 630 o 650 nm)		

DIAsource Catálogo Nr : KAP1451	P.I. Número : 1700498/es	Revisión nr : 160309/1
------------------------------------	-----------------------------	---------------------------

Fecha de revisión : 2016-03-09