



DCM025-12
Ed. 01/2015

PROGESTERONE SALIVA ELISA

per analisi di routine

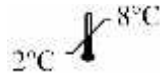
Determinazione immunoenzimatica diretta del Progesterone nella saliva.

IVD



LOT

Vedere etichetta esterna



$\Sigma = 96$ test

REF DKO025

DESTINAZIONE D'USO

Metodo competitivo immunoenzimatico colorimetrico per la determinazione quantitativa del Progesterone nella saliva.

Il kit Progesterone Saliva ELISA è destinato al solo uso di laboratorio.

1. SIGNIFICATO CLINICO

Il progesterone (C21) è un ormone steroideo addetto al ciclo mestruale, alla gravidanza (sostegno alla gestazione) ed all'embriogenesi degli esseri umani e di altre specie. Il progesterone è importante per la sintesi dell'aldosterone (mineralcorticoide).

Il progesterone è prodotto nelle ghiandole adrenali, nelle gonadi (specificamente dopo ovulazione nel corpus luteum), nel cervello e, durante la gravidanza, nella placenta.

I livelli del progesterone sono relativamente bassi nei bambini e nelle donne in postmenopausa. I maschi adulti hanno livelli simili a quelli delle donne durante la fase follicolare del ciclo mestruale.

Nelle donne, i livelli del progesterone sono relativamente bassi durante la fase preovulatoria del ciclo mestruale, aumentano dopo ovulazione e sono elevati durante la fase luteale. In caso di gravidanza, i livelli del progesterone sono simili ai livelli luteali. Dopo il parto e durante la lattazione, i livelli del progesterone sono molto bassi. La caduta nei livelli di progesterone che seguono il parto è uno degli inneschi per produzione di latte.

Il progesterone è necessario per la "conversione" dell'endometrio in fase secretiva per preparare l'utero per impianto. Se la gravidanza non accade, i livelli del progesterone diminuiranno, conducendo, nell'essere umano, al periodo mestruale.

Il progesterone appartiene al gruppo dei neurosteroidi, presenti in determinate zone nel cervello. Il progesterone è coinvolto nel funzionamento sinaptico, ha effetti neuroprotettivi ed interessa il processo di mielinizzazione.

Il progesterone ha numerosi effetti anche fuori dal sistema riproduttivo. Il progesterone è termogenico, riduce lo spasmo e distende il muscolo liscio. I bronchi sono dilatati e viene regolata la secrezione di muco. Il progesterone è un agente antinfiammatorio e regola la risposta immunitaria. È coinvolto nella funzione della tiroide, nell'osteogenesi.

2. PRINCIPIO DEL METODO

Il Progesterone (antigene) presente nel campione, compete con il Progesterone marcato con perossidasi di rafano (HRP) nei confronti dell'anticorpo anti-Progesterone adsorbito su micropiastra (fase solida). Dopo l'incubazione, la separazione libero-legato si ottiene mediante semplice lavaggio della fase solida. Infine, l'enzima HRP presente nella frazione legata, catalizza la reazione tra il Substrato (H_2O_2) ed il TMB-Substrate, sviluppando una colorazione blu che vira al giallo dopo aggiunta dello Stop solution (H_2SO_4). L'intensità del colore sviluppato è inversamente proporzionale alla concentrazione del Progesterone presente nel campione.

La concentrazione di Progesterone nel campione è calcolata sulla base di una curva di calibrazione.

3. REATTIVI, MATERIALI E STRUMENTAZIONE

3.1. Reattivi e materiali forniti nel kit

1. Calibrators (7 flaconi, 1 mL ciascuno)

CAL0	REF DCE002/2506-0
CAL1	REF DCE002/2507-0
CAL2	REF DCE002/2508-0
CAL3	REF DCE002/2509-0
CAL4	REF DCE002/2510-0
CAL5	REF DCE002/2511-0
CAL6	REF DCE002/2512-0

2. Controlli (2 flaconi, 1 mL ciascuno)

Low Control	REF DCE045/2504-0
High Control	REF DCE045/2505-0

3. Conjugate (1 flacone, 26 mL)

Progesterone coniugato con perossidasi di rafano (HRP) REF DCE002/2502-0

4. Coated Microplate (1 micropiastra breakable)

Anticorpo policlonale anti progesterone adsorbito su micropiastra REF DCE002/2503-0

5. TMB Substrate (1 flacone, 25 mL)

H_2O_2 -TMB (0,26 g/L) (evitare il contatto con la pelle) REF DCE004/2504-0

6. Stop solution (1 flacone, 14 mL)

Acido Solforico 0,15 mol/L (evitare il contatto con la pelle) REF DCE005/2505-0

7. 40X Conc. Wash Solution (1 flacone, 30 mL)

Soluzione tamponata REF DCE057/2557-0

3.2. Reattivi necessari non forniti nel kit

Acqua distillata.

3.3. Materiale e strumentazione ausiliare

Dispensatori automatici.

Letto per micropiastre (450 nm, 620-630 nm)

Saliva Collection Device **REF DKO063**

Note

Conservare i reattivi a $2\pm 8^{\circ}\text{C}$, al riparo dalla luce.
Aprire la busta del Reattivo 4 (Coated Microplate) solo dopo averla riportata a temperatura ambiente e chiuderla subito dopo il prelievo delle strip da utilizzare. Evitare di staccare la sheet adesiva dalle strips che non vengono utilizzate nella seduta analitica.

4. AVVERTENZE

- Questo test kit è per uso in vitro, da eseguire da parte di personale esperto. Non per uso interno o esterno su esseri Umani o Animali.
- Usare i previsti dispositivi di protezione individuale mentre si lavora con i reagenti forniti.
- Seguire le Buone Pratiche di Laboratorio (GLP) per la manipolazione di prodotti derivati da sangue.
- Tutti i reattivi di origine umana usati nella preparazione dei reagenti sono stati testati e sono risultati negativi per la presenza di anticorpi anti-HIV 1&2, per HbsAg e per anticorpi anti-HCV. Tuttavia nessun test offre la certezza completa dell'assenza di HIV, HBV, HCV o di altri agenti infettivi. Pertanto, i reagenti devono essere maneggiati come materiali potenzialmente infettivi.
- Alcuni reagenti contengono piccole quantità di Proclin 300^R come conservante. Evitare il contatto con la pelle e le mucose.
- Il TMB Substrato contiene un irritante, che può essere dannoso se inalato, ingerito o assorbito attraverso la cute. Per prevenire lesioni, evitare l'inalazione, l'ingestione o il contatto con la cute e con gli occhi.
- La Stop Solution è costituita da una soluzione di acido solforico diluito. L'acido solforico è velenoso e corrosivo e può essere tossico se ingerito. Per prevenire possibili ustioni chimiche, evitare il contatto con la cute e con gli occhi.
- Evitare l'esposizione del reagente TMB/H₂O₂ a luce solare diretta, metalli o ossidanti. Non congelare la soluzione.
- Questo metodo consente di determinare concentrazioni di Progesterone da 10 pg/mL a 5000 pg/mL.
- La somministrazione di steroidi naturali o sintetici può alterare i livelli salivari di Progesterone.

5. PRECAUZIONI

- Si prega di attenersi rigorosamente alla sequenza dei passaggi indicata in questo protocollo. I risultati presentati qui sono stati ottenuti usando specifici reagenti elencati in queste Istruzioni per l'Uso.
- Tutti i reattivi devono essere conservati a temperatura controllata di $2-8^{\circ}\text{C}$ nei loro contenitori originali. Eventuali eccezioni sono chiaramente indicate. I reagenti sono stabili fino

alla data di scadenza se conservati e trattati seguendo le istruzioni fornite. I kit aperti mantengono la loro attività per due mesi se conservati come indicato.

- Prima dell'uso lasciare tutti i componenti dei kit e i campioni a temperatura ambiente ($22-28^{\circ}\text{C}$) e mescolare accuratamente.
- Non scambiare componenti dei kit di lotti diversi. Devono essere osservate le date di scadenza riportate sulle etichette della scatola e di tutte le fiale. Non utilizzare componenti oltre la data di scadenza.
- Qualora si utilizzi strumentazione automatica, è responsabilità dell'utilizzatore assicurarsi che il kit sia stato opportunamente validato.
- Un lavaggio incompleto o non accurato dei pozzetti può causare una scarsa precisione e/o un'elevato background.
- Per la riproducibilità dei risultati, è importante che il tempo di reazione di ogni pozzetto sia lo stesso. Per evitare il time shifting durante la dispensazione degli reagenti, il tempo di dispensazione dei pozzetti non dovrebbe estendersi oltre i 10 minuti. Se si protrae oltre, si raccomanda di seguire lo stesso ordine di dispensazione. Se si utilizza più di una piastra, si raccomanda di ripetere la curva di calibrazione in ogni piastra.
- L'aggiunta del TMB Substrato dà inizio ad una reazione cinetica, la quale termina con l'aggiunta della Stop Solution. L'aggiunta del TMB Substrato e della Stop Solution deve avvenire nella stessa sequenza per evitare tempi di reazione differenti.
- Osservare le linee guida per l'esecuzione del controllo di qualità nei laboratori clinici testando controlli e/o pool di salive.
- Osservare la massima precisione nella ricostituzione e dispensazione dei reagenti.
- I lettori di micropiastre leggono l'assorbanza verticalmente. Non toccare il fondo dei pozzetti.

6. PROCEDIMENTO

6.1. Preparazione dei Calibratori (C₀...C₆)

I Calibratori sono pronti all'uso ed hanno le seguenti concentrazioni:

	C ₀	C ₁	C ₂	C ₃	C ₄	C ₅	C ₆
pg/mL	0	10	50	100	500	1000	5000

SI Units: pg/mL x 3,18 = pmol/L

6.2. Preparazione della Wash Solution

Prima dell'uso, diluire il contenuto di ogni fiala di "40X Wash Solution" con acqua distillata fino al volume di 1200 mL. Per preparare volumi minori rispettare il rapporto di diluizione di 1:40. La soluzione di lavaggio diluita è stabile a temperatura ambiente per 2 settimane.

6.3. Preparazione del Coniugato

Il Coniugato è pronto all'uso.

6.4. Preparazione del campione

Questo kit permette la determinazione di Progesterone in campioni di saliva.

Per la raccolta del campione si consiglia l'utilizzo di tubi in vetro da centrifuga e di una cannuccia in plastica, o dei *Saliva Collection Device* Diametra (DKO063). Altri tipi di dispositivi di raccolta commercialmente disponibili non sono stati testati.

6.4.1. Metodo e limitazioni

Raccogliere i campioni di saliva nei tempi indicati. Se non vengono date indicazioni specifiche per la raccolta delle salive, è possibile raccogliere i campioni in qualsiasi momento ma tenendo conto dei seguenti fattori:

- Se la raccolta della saliva viene effettuata al mattino, questa deve essere prelevata prima di lavarsi i denti.
- Durante la giornata attendere almeno un'ora dopo aver mangiato, aver assunto farmaci per via orale o essersi lavati i denti.
- E' molto importante ottenere un campione limpido – non contaminato da cibo, cosmetici, sangue, chewing gum od altri materiali estranei.

6.4.2. Processazione delle salive con il metodo *Saliva Collection Device* Diametra

- Far defluire la saliva attraverso la cannuccia nel tubo di vetro.
- Centrifugare il campione per 15 minuti a 3000 rpm
- Porlo a – 20°C per almeno 1 ora
- Centrifugare ancora per 15 minuti a 3000 rpm
- Il campione di saliva è così pronto per essere testato.
- Conservare il campione a 2÷8°C per una settimana o a – 20°C per un tempo maggiore.

6.5. Procedimento

- Portare tutti i reagenti a temperatura ambiente (22-28°C).** Al termine del dosaggio riporre immediatamente tutti i reagenti a 2-8°C: evitare lunghi periodi a temperatura ambiente.
- Le strisce di pozzetti non utilizzate devono essere rimesse immediatamente nella busta richiudibile contenente il materiale essicante e conservate a 2-8°C.
- Per evitare potenziali contaminazioni microbiche e/o chimiche non rimettere i reagenti inutilizzati nei flaconi originali.
- Al fine di aumentare l'accuratezza dei risultati del test è necessario operare in doppio, allestendo due pozzetti per ogni punto della curva di calibrazione (C₀-C₆), due per ogni Controllo, due per ogni Campione ed uno per il Bianco.

Reagente	Calibratori	Campione	Bianco
Campione		100 µL	
Calibratori C ₀ -C ₆	100 µL		
Coniugato	200 µL	200 µL	
Agitare delicatamente la micropiastra per 10 secondi ed incubare per 1h a temperatura ambiente (22÷28°C). Allontanare la miscela di reazione; lavare i pozzetti 3 volte aggiungendo in ogni pozzetto 400 µL di wash solution diluita. Invertire la piastra e sbattere delicatamente su un foglio di carta assorbente per eliminare le gocce residue. Nota importante: la sensibilità e la precisione di questo dosaggio sono fortemente influenzate dal corretto svolgimento della procedura di lavaggio!			
TMB Substrate	200 µL	200 µL	200 µL
Incubare 15 minuti a temperatura ambiente 22÷28°C, al riparo dalla luce.			
Stop Solution	100 µL	100 µL	100 µL
Agitare delicatamente la micropiastra. Leggere l'assorbanza (E) a 450 nm contro una lunghezza d'onda di riferimento di 620-630 nm oppure contro il Bianco entro 5 minuti.			

7. CONTROLLO QUALITA'

Ogni laboratorio dovrebbe analizzare i campioni nella gamma dei livelli elevati, normali e bassi di Progesterone per il controllo delle prestazioni dell'analisi. Questi campioni dovrebbero essere trattati come ignoti ed i valori determinati in ogni test effettuato. Le tabelle di controllo qualità dovrebbero essere effettuate per seguire le prestazioni dei reagenti forniti. Metodi statistici adeguati dovrebbero essere impiegati per accertare il trend. Il laboratorio dovrebbe fissare i limiti di accettabilità di prestazioni dell'analisi. Altri parametri che dovrebbero essere controllati includono le intercette di 80, 50 e 20% della curva di calibrazione per valutare la riproducibilità. In più, la capacità di assorbimento massima dovrebbe essere costante con l'esperienza precedente. La deviazione significativa dalle prestazioni stabilite può indicare il cambiamento inosservato negli stati o nella degradazione sperimentali dei reagenti del kit. Reagenti freschi dovrebbero essere usati per determinare il motivo delle variazioni.

8. RISULTATI

8.1. Calcolo dei risultati

- Calcolare la media dei valori di assorbanza per ogni set di Calibratori, controlli e campioni dei pazienti.
- Usando carta millimetrata, costruire una curva di calibrazione riportando l'assorbanza media ottenuta da ogni Calibratore contro la sua concentrazione, con il valore di assorbanza

sull'asse verticale (Y) e la concentrazione sull'asse orizzontale (X).

- Utilizzando il valore medio di assorbanza per ciascun campione, determinare la concentrazione corrispondente dalla curva di calibrazione.
- Metodo automatico: i risultati nella IFU sono stati calcolati automaticamente utilizzando una curva 4 PL (4 parametri logistici). Il metodo 4 parametri logistici è il più idoneo. Altre funzioni di analisi dei dati possono dare risultati leggermente diversi.
- La concentrazione dei campioni possono essere lette direttamente da questa curva di calibrazione. I campioni con concentrazione superiore a quella del calibratore più alto devono essere diluiti o refertati come > 5000 pg/mL. Per il calcolo della concentrazione deve essere preso in considerazione anche il fattore di diluizione.

8.2. Esempio di una tipica curva di calibrazione

I dati seguenti sono solo illustrativi e non devono essere utilizzati al posto dei dati ottenuti in laboratorio.

Calibratore	Assorbanza (450 nm)
Calibratore 0	1.890
Calibratore 1	1.710
Calibratore 2	1.540
Calibratore 3	1.390
Calibratore 4	0.950
Calibratore 5	0.710
Calibratore 6	0.440

9. VALORI NORMALI ATTESI

Al fine di determinare i valori normali di Progesterone nella saliva, 80 campioni di saliva da soggetto adulto di sesso maschile e 120 campioni di saliva da soggetto di sesso femminile apparentemente sani, di età compresa tra 21 e 75 anni, sono stati raccolti al mattino e analizzati utilizzando il kit Progesterone saliva ELISA Diametra.

	Gruppo	Progesterone saliva (pg/mL)
Donne	21 - 50 anni; n = 40 Fase follicolare n = 40	19,6 - 86,5
	21 - 50 anni; n = 40 Fase luteale	99,1 - 332,6
	21 - 50 anni; n = 40 Post-menopausa	6,0 - 56,4
Uomini	21 - 50 anni; n = 40	12,7 - 57,4
	41 - 75 anni; n = 40	15,2 - 65,1

È importante tenere presente che la determinazione di un range di valori attesi in un dato metodo per una popolazione "normale" è dipendente da molteplici fattori, quali la specificità e sensibilità del metodo in uso, e la popolazione in esame. Perciò ogni laboratorio dovrebbe considerare i range indicati dal Fabbricante come un'indicazione generale e produrre range di valori attesi propri basati sulla popolazione indigena dove il laboratorio risiede.

10. PARAMETRI CARATTERISTICI

10.1. Precisione

10.1.1. Intra-Assay

La variabilità all'interno dello stesso kit è stata determinata replicando (20x) la misura di 5 campioni salivari in un unico dosaggio.

Media (pg/mL)	1328.7	650.1	293.8	186.9	23.3
SD	75.9	30.4	15.8	10.6	1.8
CV %	5.7	4.7	5.4	5.7	7.6
n =	20	20	20	20	20

10.1.2. Inter-Assay

La variabilità tra lotti differenti è stata determinata con misure in triplicato di 6 campioni di saliva in 3 differenti lotti.

Media (pg/mL)	60.4	630.3	1574.8	360.3	635.1
SD	4.3	37.6	64.1	28.7	33.4
CV %	7.1	6.0	4.1	8.0	5.3
n =	9	9	9	9	9

10.2. Recupero

Il recupero del kit Diametra Progesterone saliva ELISA è stato determinato aggiungendo quantità progressive di analita a 5 differenti campioni di saliva contenenti differenti quantità di analita endogeno. Ogni campione è stato dosato e la concentrazione di analita è stata calcolata tramite curva di calibrazione. La percentuale di recupero è stata determinata comparando il valore atteso del dosaggio con il valore misurato.

	1	2	3	4	5
Conc.	13.9	87.9	147.8	283.0	386.8
% Recupero	96.4	103.2	100.3	97.3	102.2
Range Recupero	91.1 101.6	101.1 104.8	94.9 103.8	92.7 106.6	97.8 105.7

10.3. Linearità

In totale sei campioni di saliva contenenti diverse quantità di analita sono stati diluiti con il calibratore 0 e analizzati con il kit Diametra Progesterone saliva ELISA. Tre di questi campioni sono stati diluiti direttamente, e gli altri 3 campioni sono stati dapprima arricchiti con progesterone e successivamente diluiti fino a 1:128.

La percentuale di recupero è stata calcolata confrontando i valori attesi e i valori misurati. L'intervallo di utilizzo per questo dosaggio è stato identificato in 3,8 - 4600 pg/mL. I campioni con concentrazioni superiori all'intervallo devono essere diluiti prima del dosaggio.

	1	2	3	4	5	6
Conc.	58.3	98.7	1073	2802	6000	5000
% Recovery	104.1	97.5	95.79	98.96	102.6	103.5
Range Recovery	99.9 106.7	89.9 100.8	91.2 105.5	93.6 107.3	99.1 106.5	94.4 107.7

10.4. Sensibilità

La concentrazione minima di Progesterone misurabile che può essere distinta dal Calibratore 0 è 3,8 pg/mL con un limite di confidenza del 95%.

10.5. Specificità

L'anticorpo impiegato presenta le seguenti reazioni crociate, calcolate al 50% secondo Abraham:

Steroidi	% cross-reattività
Progesterone	100
Desoxycorticosterone	1.1
Pregnenolone	0.35
17a-Hydroxyprogesterone	0.3
Corticosterone	0.2
11-Desoxycortisol	0.1
Estriol	< 0.1
17b Estradiol	< 0.1
Testosterone	< 0.1
Cortisone	< 0.1
DHEA-S	< 0.02
Cortisol	< 0.02

10.6. Correlazione

Il kit Diametra progesterone saliva ELISA è stato comparato con un kit disponibile in commercio. Sono stati testati campioni di saliva di 306 soggetti adulti, uomini e donne, di età compresa tra 20 e 75 anni.

La curva di regressione è :

$$Y = 0,912 * X + 6,066$$

$$r^2 = 0,937$$

È stato condotto uno studio aggiuntivo con campioni di saliva di 101 soggetti adulti, uomini e donne, di età compresa tra 20 e 75 anni

$$Y = 0,934 * X + 2,233$$

$$r^2 = 0,992$$

10.7. Sostanze interferenti

- Una contaminazione di sangue nella saliva superiore allo 0,16%, generalmente visibile ad occhio nudo, genera falsi risultati.
- Concentrazioni di Sodio-Azide 0,02% interferisce con il dosaggio e può portare a falsi risultati.

11. DISPOSIZIONI PER LO SMALTIMENTO

I reagenti devono essere smaltiti in accordo con le leggi locali.

BIBLIOGRAFIA

- Wisdom, G.B. *Clin. Chem.* 22 (8), 1243- 1255 (1976)
- De Villa, G.O., et al *J. Clin. Endocr. Metab.* 35, 458 (1972)
- Joyce, B.G., et al *Steroids* 29, no 6, 761, (1977)
- Winkel P., et al *Clin. Chem.* 22 (4), 422 1976
- Rajkowski K. N., et al *Steroids* 29, no 5 (1977)
- Y. Lu, et al *Fertility and Sterility* Vol.71 N.5 863 (1999)
- Miller W.L. (1988): Molecular biology of steroid hormone synthesis, *Endocrin. Rev.* 9, 295-318
- Filicori M., Butler J.P., Crowley W.F. Jr. (1984): Neuroendocrine regulation of the corpus luteum in the human, *J.Clin. Invest.* 73, 1638
- Csapol Al., Pulkkinen M. O., Wiest W.G. (1973): Effects of lutectomy and progesterone replacement therapy in early pregnancy patients. *Am J. Obstet. Gynecol.* 115, 759
- Henson M.C. (1998): Pregnancy maintenance and the regulation of placental progesterone biosynthesis in the baboon. *Human Reproduction Update*, 4, 389-405

Ed. 01/2015

DCM025-12

DiaMetra S.r.l. Headquater: Via Calabria 15,
20090 SEGRATE (MI) Italy
Tel. +39-02-2139184
Fax +39-02-2133354

Manufactory: Via Pozzuolo 14,
06038 SPELLO (PG) Italy
Tel. +39-0742-24851
Fax +39-0742-316197
E-mail: info@diametra.com



DCM025-12
Ed. 01/2015

PROGESTERONE SALIVA ELISA

for routine analysis

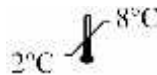
Direct immunoenzymatic determination of Progesterone in saliva.

IVD



LOT

See external label



Σ = 96 tests

REF DKO025

INTENDED USE

Competitive immunoenzymatic colorimetric method for quantitative determination of Progesterone concentration in saliva.

Progesterone Saliva ELISA kit is intended for laboratory use only.

1. CLINICAL SIGNIFICANCE

Progesterone is a C-21 steroid hormone involved in the female menstrual cycle, pregnancy (supports *gestation*) and embryogenesis of humans and other species. Progesterone is the major naturally occurring human progestagen. Progesterone is important for aldosterone (mineralocorticoid) synthesis, as 17-hydroxyprogesterone is for cortisol (glucocorticoid).

Progesterone levels are relatively low in children and postmenopausal women. Adult males have levels similar to those in women during the follicular phase of the menstrual cycle. In women, progesterone levels are relatively low during the preovulatory phase of the menstrual cycle, rise after ovulation, and are elevated during the luteal phase. If pregnancy occurs, progesterone levels are maintained at luteal levels initially. After delivery of the placenta and during lactation, progesterone levels are very low. The fall in progesterone levels following delivery is one of the triggers for milk production. Progesterone is produced in the adrenal glands, the gonads (specifically after ovulation in the corpus luteum), the brain, and, during pregnancy, in the placenta. Progesterone converts the endometrium to its secretory stage to prepare the uterus for implantation. If pregnancy does not occur, progesterone levels will decrease, leading, in the human, to menstruation. Progesterone belongs to the group of neurosteroids that are found in high concentrations in certain areas in the brain and are synthesized there. Neurosteroids affect synaptic functioning, are neuroprotective, and affect myelination. Progesterone has multiple effects outside of the reproductive system. Progesterone is thermogenic, it reduces spasm and relaxes smooth muscle. Bronchi are widened and mucus regulated. Progesterone acts as an antiinflammatory agent and regulates the immune response. Progesterone also assists in thyroid function, in bone building by osteoblasts. Measurement of serum progesterone concentrations have been used in evaluating ovarian function.

2. PRINCIPLE

Progesterone (antigen) in the sample competes with progesterone conjugated with horseradish peroxidase (enzyme-labelled antigen) for binding to the limited number of anti-progesterone antibody sites on the microplates (solid phase).

After incubation, the bound/free separation is performed by a simple solid-phase washing.

The enzyme in the bound-fraction reacts with the Substrate (H_2O_2) and the TMB Substrate and develops a blu color that changes into yellow when the Stop Solution (H_2SO_4) is added.

The colour intensity is inversely proportional to the Progesterone concentration in the sample.

Progesterone concentration in the sample is calculated through a calibration curve.

3. REAGENT, MATERIAL AND INSTRUMENTATION

3.1. Reagent and material supplied in the kit

1. Calibrators (7 vials, 1 mL each)

CAL0	REF DCE002/2506-0
CAL1	REF DCE002/2507-0
CAL2	REF DCE002/2508-0
CAL3	REF DCE002/2509-0
CAL4	REF DCE002/2510-0
CAL5	REF DCE002/2511-0
CAL6	REF DCE002/2512-0

2. Controls (2 vials, 1 mL each)

Low Control	REF DCE045/2504-0
High Control	REF DCE045/2505-0

3. Conjugate (1 vial, 26 mL)

Progesterone conjugated with horseradish peroxidase (HRP) REF DCE002/2502-0

4. Coated Microplate (1 microplate breakable)

Policlonal anti Progesterone antibody adsorbed on microplate REF DCE002/2503-0

5. TMB Substrate (1 vial, 25 mL)

H_2O_2 -TMB (0,26 g/L) (avoid any skin contact) REF DCE004/2504-0

6. Stop Solution (1 vial, 14 mL)

Sulphuric acid 0.5 mol/L (avoid any skin contact) REF DCE005/2505-0

7. 40X Conc. Wash Solution (1 vial, 30 mL)

Buffered solution REF DCE057/2557-0

3.2. Reagents necessary not supplied

Distilled water.

3.3. Auxiliary materials and instrumentation

Automatic dispenser.

Microplates reader (450 nm, 620-630 nm)

Saliva Collection Device REF DKO063

Note

Store all reagents at 20^o8°C in the dark.

Open the bag of reagent 4 (Coated Microplate) only when it is at room temperature and close it immediately after use; once opened the microplate is stable until the expiry date of the kit.

Do not remove the adhesive sheets on the unutilised strips.

4. WARNINGS

- This kit is intended for in vitro use by professional persons only. Not for internal or external use in Humans or Animals.
- Use appropriate personal protective equipment while working with the reagents provided.
- Follow Good Laboratory Practice (GLP) for handling blood products.
- All human source material used in the preparation of the reagents has been tested and found negative for antibody to HIV 1&2, HbsAg, and HCV. No test method however can offer complete assurance that HIV, HBV, HCV or other infectious agents are absent. Therefore, the reagent should be handled in the same manner as potentially infectious material.
- Some reagents contain small amounts of Proclin 300^R as preservative. Avoid the contact with skin or mucosa.
- The TMB Substrate contains an irritant, which may be harmful if inhaled, ingested or absorbed through the skin. To prevent injury, avoid inhalation, ingestion or contact with skin and eyes.
- The Stop Solution consists of a diluted sulphuric acid solution. Sulphuric acid is poisonous and corrosive and can be toxic if ingested. To prevent chemical burns, avoid contact with skin and eyes.
- Avoid the exposure of reagent TMB/H₂O₂ to directed sunlight, metals or oxidants. Do not freeze the solution.
- This method allows the determination of Progesterone from 10 pg/mL to 5000 ng/mL.
- The clinical significance of the Progesterone determination can be invalidated if the patient was treated with cortisone or natural or synthetic steroids.

5. PRECAUTIONS

- Please adhere strictly to the sequence of pipetting steps provided in this protocol. The performance data represented here were obtained using specific reagents listed in this Instruction For Use.
- All reagents should be stored refrigerated at 2-8°C in their original container. Any exceptions are clearly indicated. The reagents are stable until the expiry date when stored and handled as indicated. Opened kits retain activity for two months if stored as described above.

- Allow all kit components and specimens to reach room temperature (22-28°C) and mix well prior to use.
- Do not interchange kit components from different lots. The expiry date printed on box and vials labels must be observed. Do not use any kit component beyond their expiry date.
- If you use automated equipment, the user has the responsibility to make sure that the kit has been appropriately tested.
- The incomplete or inaccurate liquid removal from the wells could influence the assay precision and/or increase the background.
- It is important that the time of reaction in each well is held constant for reproducible results. Pipetting of samples should not extend beyond ten minutes to avoid assay drift. If more than 10 minutes are needed, follow the same order of dispensation. If more than one plate is used, it is recommended to repeat the dose response curve in each plate
- Addition of the TMB Substrate solution initiates a kinetic reaction, which is terminated by the addition of the Stop Solution. Therefore, the TMB Substrate and the Stop Solution should be added in the same sequence to eliminate any time deviation during the reaction.
- Observe the guidelines for performing quality control in medical laboratories by assaying controls and/or pooled saliva samples.
- Maximum precision is required for reconstitution and dispensation of the reagents.
- Plate readers measure vertically. Do not touch the bottom of the wells.

6. PROCEDURE

6.1. Preparation of the Calibrators (C₀...C₆)

The Calibrators are ready to use and have the following concentration:

	C ₀	C ₁	C ₂	C ₃	C ₄	C ₅	C ₆
pg/mL	0	10	50	100	500	1000	5000

For SI Units: pg/mL x 3.18 = pmol/L

6.2. Preparation of Wash Solution

Dilute the content of each vial of the "40X Wash Solution" with distilled water to a final volume of 1200 mL prior to use. For smaller volumes respect the 1:40 dilution ratio. The diluted wash solution is stable for 2 weeks at room temperature.

6.3. Preparation of Conjugate

The Conjugate is ready for use.

6.4. Preparation of the Sample

This kit allows determination of Progesterone in saliva samples.

It is recommended to collect saliva samples with a centrifuge glass tube and a plastic straw, or with the Diametra *Saliva Collection Device* (DKO063). Other commercially available sample collector devices have not been tested.

6.4.1. Method and Limitations

Collect saliva samples at the times indicated.

If no specific instructions have been given the saliva samples may be collected at any time; for saliva collection, the following should be noted:

- a) If saliva collection is carried out in the morning ensure that this is carried out prior to brushing teeth
- b) During the day allow 1 hour after a meal, oral intake of pharmaceutical drugs or tooth cleaning.
- c) It is very important that a good clear sample is received – i.e. no contamination with food, lipstick, blood (bleeding gums) or other extraneous materials.

6.4.2. Saliva Processing Instructions with Saliva Collection Device Diametra

- 1) Let the saliva flow down through the straw into the centrifuge glass tube.
- 2) Centrifuge the sample for 15 minutes at 3000 rpm
- 3) Store at – 20°C for at least 1 hour
- 4) Centrifuge again for 15 minutes at 3000 rpm
- 5) The saliva sample is now ready to be tested.
- 6) Store the sample at 2-8°C for one week or at – 20°C for longer time.

6.5. Procedure

- **Allow all reagents to reach room temperature (22-28°C).** At the end of the assay, store immediately the reagents at 2-8°C: avoid long exposure to room temperature.
- Unused coated microwell strips should be released securely in the foil pouch containing desiccant and stored at 2-8°C.
- To avoid potential microbial and/or chemical contamination, unused reagents should never be transferred into the original vials.
- As it is necessary to perform the determination in duplicate in order to improve accuracy of the test results, prepare two wells for each point of the calibration curve (C₀-C₆), two for each Control, two for each sample, one for Blank.

Reagent	Calibrator	Sample	Blank
Sample		100 µL	
Calibrator C ₀ -C ₅	100 µL		
Conjugate	200 µL	200 µL	
Gently mix the plate for 10 seconds and incubate at room temperature (22±28°C) for 1 hour. Remove the content from each well; wash the wells 3 times with 400 µL of diluted wash solution. Strike the inverted well sharply on absorbent paper towel to remove residual droplets. Important note: the sensitivity and precision of this assay is markedly influenced by the correct performance of the washing procedure!			
TMB Substrate	200 µL	200 µL	200 µL
Incubate at room temperature (22±28°C) for 15 minutes in the dark			
Stop Solution	100 µL	100 µL	100 µL
Shake the microplate gently. Read the absorbance (E) at 450 nm against a reference wavelength of 620-630 nm or against Blank within 5 minutes.			

7. QUALITY CONTROL

Each laboratory should assay controls at normal, high and low levels range of Progesterone for monitoring assay performance. These controls should be treated as unknowns and values determined in every test procedure performed. Quality control charts should be maintained to follow the performance of the supplied reagents. Pertinent statistical methods should be employed to ascertain trends. The individual laboratory should set acceptable assay performance limits. Other parameters that should be monitored include the 80, 50 and 20% intercepts of the calibration curve for run-to-run reproducibility. In addition, maximum absorbance should be consistent with past experience. Significant deviation from established performance can indicate unnoticed change in experimental conditions or degradation of kit reagents. Fresh reagents should be used to determine the reason for the variations.

8. RESULTS

8.1. Calculation of Results

1. Calculate the average absorbance values for each set of Calibrators, Controls and patient samples.
2. Using linear graph paper, construct a calibration curve by plotting the mean absorbance obtained from each Calibrator against its concentration with absorbance value on the vertical (Y) axis and concentration on the horizontal (X) axis.
3. Using the mean absorbance value for each sample determine the corresponding concentration from the calibration curve.
4. Automated method: the results in the IFU have been calculated automatically using a 4 PL (4 Parameter Logistics) curve fit. 4 Parameter Logistics is the preferred calculation method. Other data reduction functions may give slightly different results.
5. The concentration of the samples can be read directly from this calibration curve. Samples with concentrations higher than that of the highest Calibrator have to be further diluted or reported as > 5000 pg/mL. For the calculation of the concentrations this dilution factor has to be taken into account.

8.2. Example of a typical calibration curve

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

Calibrator	Absorbance Units (450 nm)
Calibrator 0	1.890
Calibrator 1	1.710
Calibrator 2	1.540
Calibrator 3	1.390
Calibrator 4	0.950
Calibrator 5	0.710
Calibrator 6	0.440

9. EXPECTED NORMAL VALUES

In order to determine the normal range of Progesterone in saliva, saliva samples from 80 adult male and 120 female apparently healthy subjects, ages 21 to 75 years, were collected in the morning and analyzed using the Diametra Progesterone ELISA kit.

	Age group	Progesterone saliva (pg/mL)
Women	21 - 50 years; n = 40 Follicular phase n = 40	19,6 - 86,5
	21 - 50 years; n = 40 Luteal phase	99,1 - 332,6
	21 - 50 years; n = 40 Postmenopausal	6,0 - 56,4
Men	21 - 50 years; n = 40	12,7 - 57,4
	41 - 75 years; n = 40	15,2 - 65,1

Please pay attention to the fact that the determination of a range of expected values for a "normal" population in a given method is dependent on many factors, such as specificity and sensitivity of the method used and type of population under investigation. Therefore each laboratory should consider the range given by the Manufacturer as a general indication and produce their own range of expected values based on the indigenous population where the laboratory works.

10. PERFORMANCE AND CHARACTERISTICS

10.1. Precision

10.1.1. Intra Assay Variation

The intra-assay variation was determined by 20 replicate measurements of 5 saliva samples within one run.

Mean (pg/mL)	1328.7	650.1	293.8	186.9	23.3
SD	75.9	30.4	15.8	10.6	1.8
CV %	5.7	4.7	5.4	5.7	7.6
n =	20	20	20	20	20

10.1.2. Inter Assay Variation

The inter-assay (between-day) variation was determined by duplicate measurements of 5 saliva samples over 10 days.

Mean (pg/mL)	60.4	630.3	1574.8	360.3	635.1
SD	4.3	37.6	64.1	28.7	33.4
CV %	7.1	6.0	4.1	8.0	5.3
n =	9	9	9	9	9

10.2. Recovery

Recovery of the Diametra Progesterone ELISA was determined by adding increasing amounts of the analyte to 5 different saliva samples containing different amounts of endogenous analyte. Each sample (native and spiked) was assayed and analyte concentrations of the samples were calculated from the calibration curve. The percentage recoveries were determined by comparing expected and measured values of the samples.

	1	2	3	4	5
Conc.	13.9	87.9	147.8	283.0	386.8
% Recovery	96.4	103.2	100.3	97.3	102.2
Range Recovery	91.1 101.6	101.1 104.8	94.9 103.8	92.7 106.6	97.8 105.7

10.3. Linearity

In total six saliva samples containing different amounts of analyte were serially diluted with the Calibrator 0 and assayed with the Diametra Progesterone saliva ELISA. Three of these samples were serially diluted directly, and the other 3 samples at first were spiked with Progesterone and the serially diluted up to 1:128. The percentage recovery was calculated by comparing the expected and measured values for Progesterone. A linearity of 3,8 - 4600 pg/mL has been identified as

the usable range for this assay. Samples above this range must be diluted and re-run.

	1	2	3	4	5	6
Conc.	58.3	98.7	1073	2802	6000	5000
% Recovery	104.1	97.5	95.79	98.96	102.6	103.5
Range Recovery	99.9	89.9	91.2	93.6	99.1	94.4
	106.7	100.8	105.5	107.3	106.5	107.7

10.4. Sensitivity

The lowest detectable concentration of Progesterone that can be distinguished from the Calibrator 0 is 3.8 pg/mL at the 95% confidence limit.

10.5. Specificity

The following materials have been evaluated for cross reactivity. The percentage indicates cross reactivity at 50% displacement compared to Progesterone.

Steroid	% cross reactivity
Progesterone	100
Desoxycorticosterone	1.1
Pregnenolone	0.35
17a-Hydroxyprogesterone	0.3
Corticosterone	0.2
11-Desoxycortisol	0.1
Estriol	< 0.1
17b Estradiol	< 0.1
Testosterone	< 0.1
Cortisone	< 0.1
DHEA-S	< 0.02
Cortisol	< 0.02

10.6. Comparison studies

Diametra Progesterone saliva ELISA kit was compared to a commercially available LIA Progesterone saliva assay. 306 saliva samples were collected from adult men and women ages 20-75.

The linear regression curve was calculated:

$$y = 0,912x + 6,066$$

$$r^2 = 0,937$$

An additional study was performed using 101 saliva samples from adult men and women ages 20-75. These samples were compared to the LIA method and the linear regression curve was calculated:

$$y = 0,934x + 2,233$$

$$r^2 = 0,992$$

10.7. Interfering substances

- Blood contamination of more than 0,16% in saliva samples will affect results, and usually can be seen by eye.
- Concentrations of Sodium Azide 0,02% interferes in this assay and may lead to false results.

11. WASTE MANAGEMENT

Reagents must be disposed off in accordance with local regulations.

BIBLIOGRAPHY

- Wisdom, G.B. *Clin. Chem.* 22 (8), 1243- 1255 (1976)
- De Villa, G.O., et al *J. Clin. Endocr. Metab.* 35, 458 (1972)
- Joyce, B.G., et al *Steroids* 29, no 6, 761, (1977)
- Winkel P., et al *Clin. Chem.* 22 (4), 422 1976
- Rajkowski K. N., et al *Steroids* 29, no 5 (1977)
- Y. Lu, et al *Fertility and Sterility* Vol.71 N.5 863 (1999)
- Miller W.L. (1988): Molecular biology of steroid hormone synthesis, *Endocrin. Rev.* 9, 295-318
- Filicori M., Butler J.P., Crowley W.F. Jr. (1984): Neuroendocrine regulation of the corpus luteum in the human, *J.Clin. Invest.* 73, 1638
- Csapol Al., Pulkkinen M. O., Wiest W.G. (1973): Effects of lutectomy and progesterone replacement therapy in early pregnancy patients. *Am J. Obstet. Gynecol.* 115, 759
- Henson M.C. (1998): Pregnancy maintenance and the regulation of placental progesterone biosynthesis in the baboon. *Human Reproduction Update*, 4, 389-405

Ed. 01/2015

DCM025-12

DiaMetra S.r.l. Headquarter: Via Calabria 15,
20090 SEGRATE (MI) Italy

Tel. +39-02-2139184

Fax +39-02-2133354

Manufactory: Via Pozzuolo 14

06038 SPELLO (PG) Italy






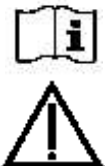




Tel. +39-0742-24851

Fax +39-0742-316197

E-mail: info@diametra.com

	DIA.METRA SRL	
Mod. PIS	PACKAGING INFORMATION SHEET	

IT*Spiegazione dei simboli***GB***Explanation of symbols***FR***Explication des symboles***ES***Significado de los simbolos***DE***Verwendete Symbole***PT***Explicação dos simbolos*

	DE In vitro Diagnostikum ES Producto sanitario para diagnóstico In vitro FR Dispositif medical de diagnostic in vitro GB In vitro Diagnostic Medical Device IT Dispositivo medico-diagnostico in vitro PT Dispositivos medicos de diagnostico in vitro		DE Hergestellt von ES Elaborado por FR Fabriqué par GB Manufacturer IT Produttore PT Produzido por
REF	DE Bestellnummer ES Número de catálogo FR Références du catalogue GB Catalogue number IT Numero di Catalogo PT Número do catálogo	 yyyy-mm	DE Herstellungs datum ES Fecha de fabricacion FR Date de fabrication GB Date of manufacture IT Data di produzione PT Data de produção
 yyyy-mm-dd	DE Verwendbar bis ES Estable hasta (usar antes de último día del mes) FR Utiliser avant (dernier jour du mois indiqué) GB Use by (last day of the month) IT Utilizzare prima del (ultimo giorno del mese) PT Utilizar (antes ultimo dia do mês)		DE Biogefährdung ES Riesco biológico FR Risque biologique GB Biological risk IT Rischio biologico PT Risco biológico
	DE Gebrauchsanweisung beachten ES Consultar las instrucciones FR Consulter le mode d'emploi GB Consult instructions for use IT Consultare le istruzioni per l'uso PT Consultar instruções para uso		DE Chargenbezeichnung ESCodigo de lote FR Numero de lot GB Batch code IT Codice del lotto PT Codigo do lote
 = xx	DE Ausreichend für "n" Tests ES Contenido suficiente para "n" tests FR Contenu suffisant pour "n" tests GB Contains sufficient for "n" tests IT Contenuto sufficiente per "n" saggi PT Contém o suficiente para "n" testes		DE Inhalt ES Contenido del estuche FR Contenu du coffret GB Contents of kit IT Contenuto del kit PT Conteúdo do kit
 Max Min	DE Temperaturbereich ES Límitación de temperatura FR Limites de température de conservation GB Temperature limitation IT Limiti di temperatura PT Temperaturas limites de conservação		

	DIA.METRA SRL	
Mod. PIS	PACKAGING INFORMATION SHEET	

SUGGERIMENTI PER LA RISOLUZIONE DEI PROBLEMI/TROUBLESHOOTING

ERRORE CAUSE POSSIBILI/ SUGGERIMENTI

Nessuna reazione colorimetrica del saggio

- mancata dispensazione del coniugato
- contaminazione del coniugato e/o del Substrato
- errori nell'esecuzione del saggio (es. Dispensazione accidentale dei reagenti in sequenza errata o provenienti da flaconi sbagliati, etc.)

Reazione troppo blanda (OD troppo basse)

- coniugato non idoneo (es. non proveniente dal kit originale)
- tempo di incubazione troppo breve, temperatura di incubazione troppa bassa

Reazione troppo intensa (OD troppo alte)

- coniugato non idoneo (es. non proveniente dal kit originale)
- tempo di incubazione troppo lungo, temperatura di incubazione troppa alta
- qualità scadente dell'acqua usata per la soluzione di lavaggio (basso grado di deionizzazione)
- lavaggi insufficienti (coniugato non completamente rimosso)

Valori inspiegabilmente fuori scala

- contaminazione di pipette, puntali o contenitori- lavaggi insufficienti (coniugato non completamente rimosso)

CV% intrasaggio elevato

- reagenti e/o strip non portate a temperatura ambiente prima dell'uso
- il lavatore per micropiastre non lava correttamente (suggerimento: pulire la testa del lavatore)

CV% intersaggio elevato

- condizioni di incubazione non costanti (tempo o temperatura)
- controlli e campioni non dispensati allo stesso tempo (con gli stessi intervalli) (controllare la sequenza di dispensazione)
- variabilità intrinseca degli operatori

ERROR POSSIBLE CAUSES / SUGGESTIONS

No colorimetric reaction

- no conjugate pipetted reaction after addition
- contamination of conjugates and/or of substrate
- errors in performing the assay procedure (e.g. accidental pipetting of reagents in a wrong sequence or from the wrong vial, etc.)

Too low reaction (too low ODs)

- incorrect conjugate (e.g. not from original kit)
- incubation time too short, incubation temperature too low

Too high reaction (too high ODs)

- incorrect conjugate (e.g. not from original kit)
- incubation time too long, incubation temperature too high
- water quality for wash buffer insufficient (low grade of deionization)
- insufficient washing (conjugates not properly removed)

Unexplainable outliers

- contamination of pipettes, tips or containers
- insufficient washing (conjugates not properly removed) too high within-run
- reagents and/or strips not pre-warmed to CV% Room Temperature prior to use
- plate washer is not washing correctly (suggestion: clean washer head)
- too high between-run - incubation conditions not constant (time, CV % temperature)
- controls and samples not dispensed at the same time (with the same intervals) (check pipetting order)
- person-related variation