



DCM025-12  
Ed. 01/2015

# PROGESTERONE SALIVA ELISA

per analisi di routine

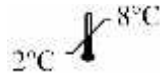
Determinazione immunoenzimatica diretta del Progesterone nella saliva.

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.

Lettoce 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<sup>R</sup> 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/H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 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 (C<sub>0</sub>...C<sub>6</sub>)

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

	C <sub>0</sub>	C <sub>1</sub>	C <sub>2</sub>	C <sub>3</sub>	C <sub>4</sub>	C <sub>5</sub>	C <sub>6</sub>
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 (C<sub>0</sub>-C<sub>6</sub>), due per ogni Controllo, due per ogni Campione ed uno per il Bianco.

Reagente	Calibratori	Campione	Bianco
Campione		100 µL	
Calibratori C <sub>0</sub> -C <sub>6</sub>	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)
<b>Donne</b>	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
<b>Uomini</b>	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.

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

<b>Media (pg/mL)</b>	60.4	630.3	1574.8	360.3	635.1
<b>SD</b>	4.3	37.6	64.1	28.7	33.4
<b>CV %</b>	7.1	6.0	4.1	8.0	5.3
<b>n =</b>	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
<b>Conc.</b>	13.9	87.9	147.8	283.0	386.8
<b>% Recupero</b>	96.4	103.2	100.3	97.3	102.2
<b>Range Recupero</b>	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
<b>Conc.</b>	58.3	98.7	1073	2802	6000	5000
<b>% Recovery</b>	104.1	97.5	95.79	98.96	102.6	103.5
<b>Range Recovery</b>	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](mailto:info@diametra.com)



DCM025-12  
Ed. 01/2015

# PROGESTERONE SALIVA ELISA

for routine analysis

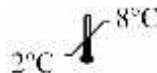
Direct immunoenzymatic determination of Progesterone in saliva.

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±8°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<sup>R</sup> 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/H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 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 (C<sub>0</sub>...C<sub>6</sub>)

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

	C <sub>0</sub>	C <sub>1</sub>	C <sub>2</sub>	C <sub>3</sub>	C <sub>4</sub>	C <sub>5</sub>	C <sub>6</sub>
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 (C<sub>0</sub>-C<sub>6</sub>), two for each Control, two for each sample, one for Blank.

Reagent	Calibrator	Sample	Blank
Sample		100 µL	
Calibrator C <sub>0</sub> -C <sub>5</sub>	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
<b>Conc.</b>	58.3	98.7	1073	2802	6000	5000
<b>% Recovery</b>	104.1	97.5	95.79	98.96	102.6	103.5
<b>Range Recovery</b>	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](mailto:info@diametra.com)



DCM025-12  
Ed. 01/2015

# PROGESTERONE SALIVA ELISA

para análisis de rutina

Determinación inmunoenzimática directa de progesterona en la saliva.

IVD



LOT

Ver etiqueta externa



Σ = 96 ensayos

REF DKO025

## USO PREVISTO

Método competitivo inmunoenzimático colorimétrico para la determinación cuantitativa de progesterona en la saliva.

El kit Progesterona Saliva ELISA está destinado al uso en laboratorio exclusivamente.

## 1. SIGNIFICADO CLÍNICO

La progesterona (C21) es una hormona esteroidea que participa en el ciclo menstrual, el embarazo (ayuda a la gestación) y la embriogénesis de los seres humanos y de otras especies. La progesterona es importante para la síntesis de aldosterona (mineralocorticoide). La progesterona se produce en las glándulas suprarrenales, en las gónadas (específicamente después de la ovulación en el cuerpo lúteo), en el cerebro y, durante el embarazo, en la placenta. Los niveles de progesterona son relativamente bajos en niños y en mujeres en postmenopausia. Los varones adultos tienen niveles similares a los de las mujeres durante la fase folicular del ciclo menstrual.

En las mujeres, los niveles de progesterona son relativamente bajos durante la fase preovulatoria del ciclo menstrual, aumentan tras la ovulación y son altos durante la fase lútea. En caso de embarazo, los niveles de progesterona son similares a los niveles lúteos. Tras el parto y durante la lactancia, los niveles de progesterona son muy bajos. La caída de los niveles de progesterona tras el parto es uno de los factores desencadenantes de la producción de leche. La progesterona es necesaria para la "conversión" del endometrio en fase secretora para preparar el útero para la implantación. Si no se produce el embarazo, los niveles de progesterona disminuyen y conducen, en los seres humanos, al período menstrual. La progesterona pertenece a un grupo de neuroesteroides, presentes en determinadas zonas del cerebro. La progesterona está implicada en la función sináptica, tiene efectos neuroprotectores y afecta al proceso de mielinización. La progesterona también tiene numerosos efectos fuera del sistema reproductor. La progesterona es termogénica, reduce los espasmos y relaja el músculo liso. Los bronquios se dilatan y se regula la secreción de moco. La progesterona es un agente antiinflamatorio y regula la respuesta inmunitaria. Está involucrada en la función de la tiroides, en la osteogénesis.

## 2. PRINCIPIO DEL MÉTODO

La progesterona (antígeno) presente en la muestra compete con el antígeno marcado con peroxidasa de rabano (HRP) frente al anticuerpo anti-progesterona absorbido en la microplaca (fase sólida). Después de la incubación, la separación libre-unido se obtiene mediante un simple lavado de la fase sólida. Por último, la enzima HRP presente en la fracción unida cataliza la reacción entre el sustrato ( $H_2O_2$ ) y el sustrato TMB (TMB), desarrollando una coloración azul que cambia a amarillo tras la adición de la solución de parada ( $H_2SO_4$ ). La intensidad del color desarrollado es inversamente proporcional a la concentración de progesterona presente en la muestra. La concentración de Progesterona en la muestra se calcula a partir de una curva de calibración.

## 3. REACTIVOS, MATERIALES E INSTRUMENTACIÓN

### 3.1. Reactivos y materiales suministrados en el kit

#### 1. Calibradores (7 frascos, 1 mL cada uno)

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. Controles (2 frascos, 1 mL cada uno)

Control bajo	REF DCE045/2504-0
Control alto	REF DCE045/2505-0

#### 3. Conjugado (1 frasco, 26 mL)

Progesterona conjugado con peroxidasa de rabano (HRP)

REF DCE002/2502-0

#### 4. Microplaca recubierta (1 microplaca rompible)

Anticuerpo anti-progesterona absorbido en la microplaca

REF DCE002/2503-0

#### 5. Sustrato TMB (1 frasco, 25 mL)

$H_2O_2$ -TMB (0,26 g/L) (evitar el contacto con la piel)

REF DCE004-0

#### 6. Solución de parada (1 frasco, 14 mL)

Ácido sulfúrico 0,15 mol/L (evitar el contacto con la piel)

REF DCE005-0

7. Solución de lavado conc. 40X (1 frasco, 30 mL)  
Solución tamponada **REF DCE057/2557-0**

### 3.2. Reactivos necesarios no suministrados en el kit

Agua destilada.

### 3.3. Material e instrumentación auxiliares

Dispensadores automáticos.

Lector de microplacas (450 nm, 620-630 nm)

Dispositivo para la obtención de saliva (*Saliva Collection Device*) **REF DKO063**

#### Nota

*Conservar los reactivos a 2-8 °C, protegidos de la luz. Abrir la bolsa del reactivo 4 (microplaca recubierta) solo cuando se encuentre a temperatura ambiente y cerrarla inmediatamente después de extraer las tiras que se vayan a utilizar; una vez abierta, permanece estable hasta la fecha de caducidad del kit. No retirar las hojas adhesivas de las tiras que no se vayan a usar en la sesión de análisis.*

#### 4. ADVERTENCIAS

- Este kit de ensayo está previsto para usarse in vitro y por personal experto. No es para uso interno o externo en humanos o animales.
- Usar los equipos de protección individual previstos al trabajar con los reactivos suministrados.
- Siga las Buenas Prácticas de Laboratorio (GLP) en el manejo de las muestras sanguíneas y sus derivados.
- Todos los reactivos de origen humano usados en la preparación de los reactivos se han comprobado y han resultado negativos para la presencia de anticuerpos anti-VIH, para HbsAg y para anticuerpos anti-VHC. Sin embargo, ningún ensayo ofrece seguridad absoluta de la ausencia de VIH, VHB, VHC o de otros agentes infecciosos. Por lo tanto, los Calibradores y los Controles deben manipularse como material potencialmente infeccioso.
- Algunos reactivos contienen pequeñas cantidades de Proclin 300<sup>R</sup> como conservante. Evite el contacto con la piel y las mucosas.
- El cromógeno TMB contiene un irritante que puede ser dañino si se inhala, se ingiere o se absorbe a través de la piel. Para prevenir lesiones, evitar la inhalación, la ingestión o el contacto con la piel y con los ojos.
- La solución de parada está formada por una solución de ácido sulfúrico diluido. El ácido sulfúrico es venenoso y corrosivo, y puede ser tóxico si se ingiere. Para prevenir posibles quemaduras químicas, evitar el contacto con la piel y con los ojos.
- Evite la exposición de los reactivos TMB/H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> a la luz solar directa, metales u oxidantes. No congelar la solución.
- Este método permite determinar concentraciones de progesterona de 10 pg/mL a 3000 pg/mL.
- El suministro de esteroides naturales o sintéticos puede alterar los niveles salivales de progesterona.

#### 5. PRECAUCIONES

- Respetar rigurosamente la secuencia de los pasos indicados en este protocolo. Los resultados aquí presentados se han obtenido utilizando los reactivos específicos que figuran en estas instrucciones de uso.
- Todos los reactivos deben conservarse a una temperatura controlada de 2-8°C en sus recipientes originales. Todas las excepciones están claramente marcados. Los reactivos son estables hasta la fecha de caducidad cuando se almacenan y manipulan de acuerdo con las instrucciones proporcionadas.
- Antes del uso, esperar hasta que todos los componentes del kit y las muestras se encuentren a temperatura ambiente (22-28°C) y mezclar cuidadosamente.
- No mezclar componentes de kits de lotes distintos. Se debe observar la fecha de caducidad indicada en la etiqueta de la caja y de todas las ampollas. No usar componentes después de la fecha de caducidad.
- Si utiliza un equipo automático, es responsabilidad del usuario asegurar que la metodología aplicada ha sido debidamente validada.
- Un lavado incompleto o impreciso y la aspiración insuficiente del líquido de los micropozos ELISA pueden causar una precisión pobre y/o un elevado fondo.
- Para la reproducibilidad de los resultados, es importante que el tiempo de reacción sea igual para cada pocillo. El tiempo de dispensación de los pocillos no debe superar los 10 minutos; si se prolongara más allá de los 10 minutos, respétese el orden de dispensación. Si utiliza más de una placa, se recomienda repetir la curva de calibración en cada placa.
- Al añadir el sustrato TMB inicia una reacción cinética que termina al agregar la solución de parada. Tanto el sustrato como la solución de parada deben agregarse en la misma secuencia para evitar diferentes tiempos de reacción.
- Observar las directrices para la ejecución del control de calidad en los laboratorios clínicos al comprobar controles y/o pool de sueros.
- Observar la máxima precisión en la reconstitución y dispensación de los reactivos.
- Los lectores de microplacas leen las DO verticalmente, por tanto no debe tocarse el fondo de los pocillos.

#### 6. PROCEDIMIENTO

##### 6.1. Preparación de los Calibradores (C<sub>0</sub>...C<sub>6</sub>)

Los Calibradores son listo para usar y tienen las siguientes concentraciones:

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

UNIDADES DEL S.I.: pg/mL x 3,18 = pmol/L

##### 6.2. Preparación de la solución de lavado

Antes del uso, diluir el contenido de cada ampolla de solución de lavado tamponada concentrada (40X) con agua destilada hasta un volumen de 1200 mL. Para preparar volúmenes menores, respetar la

relación de dilución de 1:40. La solución de lavado diluida se mantiene estable a 2-8°C durante al menos 15 días.

### 6.3. Preparación del conjugado diluido

El conjugado está listo para usar.

### 6.4. Preparación de la muestra

Este kit permite la determinación de progesterona en las muestras de saliva.

Para la obtención de la muestra se recomienda usar tubos de vidrio de centrifuga y una cánula de plástico, o el dispositivo para la obtención de saliva (*Saliva Collection Device*) de Diametra. Los otros tipos de dispositivos de obtención disponibles en el mercado no se han comprobado.

#### 6.4.1. Método y limitaciones

Obtener las muestras de saliva en los tiempos indicados.

Si no se dan indicaciones específicas para la obtención de saliva, es posible obtener las muestras en cualquier momento, pero teniendo en cuenta los siguientes factores:

- Si la obtención de saliva debe realizarse por la mañana, deberá realizarse antes de lavarse los dientes.
- Durante el día para las siguientes condiciones, antes de tomar una muestra de saliva, esperar por lo menos una hora si ha comido, si ha tomado medicamentos por vía oral o si se ha cepillado los dientes.
- Es muy importante obtener una muestra limpia (no contaminada con comida, cosméticos, sangre, chicle u otros materiales extraños).

#### 6.4.2. Procesamiento de la saliva con el equipo *Saliva Collection Device Diametra*

- Hacer fluir la saliva a través de la cánula hasta el tubo de vidrio.
- Centrifugar la muestra durante 15 minutos a 3000 rpm
- Dejar a -20°C durante al menos 1 hora
- Centrifugar durante otros 15 minutos a 3000 rpm
- La muestra de saliva está lista para el ensayo.
- Conservar la muestra a 2÷8°C durante una semana o a -20°C para periodos más largos.

### 6.5. Procedimiento

- Esperar hasta que todos los reactivos se encuentren a temperatura ambiente (22-28°C).** Al final del ensayo inmediatamente poner todos los reactivos a 2-8°C para evitar largos periodos a temperatura ambiente.
- Las tiras de pocillos no utilizados se deben guardar de inmediato en la bolsa desechable que contiene desecantes y almacenarse a 2-8°C.
- Para evitar la contaminación microbiana y/o química no regrese porciones de reactivos no usados en los viales originales.
- Para aumentar la precisión de los resultados de la prueba es necesario trabajar en duplicado: preparar dos pocillos para cada punto de la curva de calibración (C<sub>0</sub>-C<sub>6</sub>), dos para cada control, dos para cada muestra, uno para el blanco.

Reactivo	Calibrador	Muestra	Blanco
Muestra		100 µL	
Calibrador C <sub>0</sub> -C <sub>5</sub>	100 µL		
Conjugado	200 µL	200 µL	
Agitar la microplaca con cuidado. Incubar 1 h a temperatura ambiente (22÷28°C). Retirar la mezcla de reacción, lavar los pocillos 3 veces añadiendo 0,4 mL de solución de lavado diluida. <b>Nota importante:</b> agite suavemente la placa durante 5 segundos en cada paso del lavado. Después del último lavado asegúrese haber eliminado completamente la solución de lavado de los pozos, invierta la placa y golpéela repetidas veces contra una servilleta de papel absorbente.			
TMB Substrato	200 µL	200 µL	200 µL
Incubar 15 minutos a temperatura ambiente 22÷28°C, protegida de la luz.			
Solución de parada	100 µL	100 µL	100 µL
Agitar la microplaca con cuidado. Leer la absorbancia (E) a 450 nm frente una segunda lectura de referencia a 620-630 nm o frente al blanco entre 5 minutos.			

## 7. CONTROL DE CALIDAD

Cada laboratorio debe analizar las muestras a niveles de controles para los rangos bajo, medio y alto de progesterona para supervisar el rendimiento del análisis. Estas muestras deben tratarse como desconocidas y los valores deben determinarse en cada ensayo realizado. Se deben mantener los gráficos de control de calidad para seguir el rendimiento de los reactivos suministrados. Se deben emplear métodos estadísticos adecuados para determinar las tendencias. El laboratorio debe establecer los límites de aceptabilidad del rendimiento del análisis. Entre otros parámetros que se deben controlar, se incluyen las intersecciones de 80, 50 y 20% de la curva de calibración para evaluar la reproducibilidad. Además, la capacidad de absorción máxima debe ser constante con la experiencia anterior. Una desviación significativa del rendimiento establecido puede indicar un cambio inadvertido en las condiciones experimentales o la degradación de los reactivos del kit. Se deben usar reactivos frescos para determinar la causa de las variaciones.

## 8. RESULTADOS

### 8.1. Absorbancia media

Calcular la absorbancia media (Em) de cada punto de la curva de calibración (C<sub>0</sub>-C<sub>6</sub>) y de cada muestra.

### 8.2. Curva de calibración

Trazar en el gráfico de las absorbancias los valores calculados de las absorbancias medias (Em) de cada Calibrador (C<sub>0</sub>-C<sub>6</sub>) en función de las concentraciones. Trazar la curva de ajuste óptimo para los puntos Calibrador (p. ej.: Logística de cuatro parámetros).

### 8.3. Cálculo de los resultados

Interpolar del gráfico los valores de absorbancia relativos a cada muestra y leer la concentración correspondiente en pg/mL.

## 9. VALORES DE REFERENCIA

Para determinar los valores normales de progesterona en la saliva, muestras de saliva de 80 adultos sanos masculinos y 120 muestras de saliva tomadas sujeto femenino aparentemente sanos, de edades comprendidas entre 21 y 75 años, fueron recogidos por la mañana y analizados utilizando el kit ELISA progesterona saliva Diametra.

	Grupo	Progesterone saliva (pg/mL)
Mujeres	21 - 50 años; n = 40 Fase folicular n = 40	19,6 - 86,5
	21 - 50 años; n = 40 Fase lútea	99,1 - 332,6
	21 - 50 años; n = 40 Posmenopáusica	6,0 - 56,4
Hombre	21 - 50 años; n = 40	12,7 - 57,4
	41 - 75 años; n = 40	15,2 - 65,1

Es importante señalar que la determinación de un rango de valores esperados en un método dado para una población "normal" depende de muchos factores, tales como la especificidad y sensibilidad del método en uso, y la población en estudio. Por lo tanto, cada laboratorio debe considerar el intervalo especificado por el fabricante como una guía general y producir su propio rango de valores calculados en base al estadístico obtenido por el laboratorio, donde reside la población local.

## 10. PARÁMETROS CARACTERÍSTICOS

### 10.1. Precisión

#### 10.1.1. Intraensayo

La variabilidad dentro del mismo kit se ha determinado replicando (20x) la medición de 5 controles salivales distintos.

Promedio (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. Interensayo

La variabilidad entre distintos kits se ha determinado replicando la medición de 6 controles salivales distintos con 3 kits pertenecientes a lotes distintos.

Promedio (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. Recuperación

La recuperación se determinó mediante la adición de cantidades progresivas de analito a 5 muestras de saliva diferentes que contienen diferentes cantidades de analito endógeno. Cada muestra se ensayó y la concentración del analito se calcula a partir de la curva de calibración. El porcentaje de recuperación se determinó comparando el valor esperado de la prueba con el valor medido.

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

### 10.3. Linealidad

En total, seis muestras de saliva que contienen diferentes cantidades de analito se diluyeron con calibrador 0 y se analizaron con el Diametra Progesterona saliva ELISA. Tres de estas muestras se diluyeron directamente, y las otras 3 muestras fueron enriquecidos primero con progesterona y posteriormente diluido hasta 1:128. El porcentaje de recuperación se calculó mediante la comparación de los valores esperados y los valores medidos. El rango utilizable para este ensayo fue identificado en 3,8 hasta 4600 pg/mL. Las muestras con concentraciones que exceden el rango deben diluirse antes de su administración.

	1	2	3	4	5	6
Conc.	58.3	98.7	1073	2802	6000	5000
% recup.	104.1	97.5	95.79	98.96	102.6	103.5
Rango recup.	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. Sensibilidad

La concentración mínima de progesterona detectable que puede distinguirse del Calibrador 0 es de 3.8 pg/mL con un límite de confianza del 95%.

### 10.5. Especificidad

El anticuerpo empleado presenta las siguientes reacciones cruzadas, calculadas al 50% según Abraham:

Esteroides	% reactividad cruzada
Progesterona	100
Desoxycorticosterona	1.1
Pregnenolona	0.35
17a-Hydroxyprogesterona	0.3
Corticosterona	0.2
11-Desoxycortisol	0.1
Estriol	< 0.1
17b Estradiol	< 0.1
Testosterona	< 0.1
Cortisona	< 0.1
DHEA-S	< 0.02
Cortisol	< 0.02

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](mailto:info@diametra.com)

### 10.6. Correlación

El kit Progesterona Saliva Diametra se ha comparado con un kit disponible en el mercado. Se han comprobado 306 muestras de saliva. La curva de regresión es:

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

$$r^2 = 0,937$$

En otro estudio se han comprobado 101 muestras de saliva. La curva de regresión es:

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

$$r^2 = 0,992$$

### 10.7. Interferencia

- Una contaminación de la sangre en la saliva superior a 0,16%, generalmente visibles a simple vista, genera resultados falsos.
- Las concentraciones de 0,02% de azida de sodio interfiere con el ensayo y pueden conducir a resultados falsos.

## 11. DISPOSICIONES PARA LA ELIMINACIÓN

Los reactivos deben eliminarse de acuerdo con las leyes locales.

## BIBLIOGRAFÍA

- 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

	DE ES FR GB IT PT	In vitro Diagnostikum Producto sanitario para diagnóstico In vitro Dispositif medical de diagnostic in vitro In vitro Diagnostic Medical Device Dispositivo medico-diagnostico in vitro Dispositivos medicos de diagnostico in vitro		DE ES FR GB IT PT	Hergestellt von Elaborado por Fabriqué par Manufacturer Produttore Produzido por
	DE ES FR GB IT PT	Achtung, Begleitdokumente Precaución, consulte los documentos adjuntos Attention, veuillez consulter les documents d'accompagnement Caution, consult accompanying documents Attenzione, consultare la documentazione allegata Atenção, consultar os documentos de acompanhamento	 yyyy-mm	DE ES FR GB IT PT	Herstellungs datum Fecha de fabricacion Date de fabrication Date of manufacture Data di produzione Data de produção
 yyyy-mm-dd	DE ES FR GB IT PT	Verwendbar bis Establa hasta (usar antes de último día del mes) Utiliser avant (dernier jour du mois indiqué) Use by (last day of the month) Utilizzare prima del (ultimo giorno del mese) Utilizar (antes ultimo dia do mês)		DE ES FR GB IT PT	Biogefährdung Riesco biológico Risque biologique Biological risk Rischio biologico Risco biológico
	DE ES FR GB IT PT	Gebrauchsanweisung beachten Consultar las instrucciones Consulter le mode d'emploi Consult instructions for use Consultare le istruzioni per l'uso Consultar instruções para uso	<b>LOT</b>	DE ES FR GB IT PT	Chargenbezeichnung Codigo de lote Numero de lot Batch code Codice del lotto Codigo do lote
 $\Sigma = xx$	DE ES FR GB IT PT	Ausreichend für "n" Tests Contenido suficiente para "n" tests Contenu suffisant pour "n" tests Contains sufficient for "n" tests Contenuto sufficiente per "n" saggi Contém o suficiente para "n" testes	<b>CONT</b>	DE ES FR GB IT PT	Inhalt Contenido del estuche Contenu du coffret Contents of kit Contenuto del kit Conteúdo do kit
 Max Min	DE ES FR GB IT PT	Temperaturbereich Límitación de temperatura Limites de température de conservation Temperature limitation Limiti di temperatura Temperaturas limites de conservação	<b>REF</b>	DE ES FR GB IT PT	Bestellnummer Número de catálogo Références du catalogue Catalogue number Numero di Catalogo Número do catálogo
	DE ES FR GB IT PT	Vor direkter Sonneneinstrahlung schützen Mantener alejado de la luz solar Tenir à l'écart de la lumière du soleil Keep away from sunlight Tenere lontano dalla luce solare Mantenha longe da luz solar			



**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

**ERROR / POSIBLES CAUSAS / SUGERENCIAS****No se produce ninguna reacción colorimétrica del ensayo**

- no se ha dispensado el conjugado
- contaminación del conjugado y/o del sustrato
- errores en la ejecución del ensayo (p. ej., dispensación accidental de los reactivos en orden incorrecto o procedentes de frascos equivocados, etc.)

**Reacción escasa (DO demasiado bajas)**

- conjugado no idóneo (p. ej., no procedente del kit original)
- tiempo de incubación demasiado corto, temperatura de incubación demasiado baja

**Reacción demasiado intensa (DO demasiado altas)**

- conjugado no idóneo (p. ej., no procedente del kit original)
- tiempo de incubación demasiado largo, temperatura de incubación demasiado alta
- calidad escasa del agua usada para la solución de lavado (bajo grado de desionización)
- lavados insuficientes (el conjugado no se ha retirado completamente)

**Valores inexplicablemente fuera de escala**

- contaminación de pipetas, puntas o contenedores- lavados insuficientes (el conjugado no se ha retirado completamente)

**CV% intraensayo elevado**

- los reactivos y/o tiras no se encontraban a temperatura ambiente antes del uso
- el lavador de microplacas no funciona correctamente (sugerencia: limpiar el cabezal del lavador)

**CV% interensayo elevado**

- condiciones de incubación no constantes (tiempo o temperatura)
- controles y muestras no dispensados al mismo tiempo (con los mismos intervalos) (controlar la secuencia de dispensación)
- variación en función de los operadores

**ERREUR CAUSES POSSIBLES / SUGGESTIONS****Aucune réaction colorimétrique de l'essai**

- non distribution du conjugué
- contamination du conjugué et/ou du substrat
- erreurs dans l'exécution du dosage (par ex., distribution accidentelle des réactifs dans le mauvais ordre ou en provenance des mauvais flacons, etc.)

**Réaction trop faible (DO trop basse)**

- conjugué non approprié (par ex., ne provenant pas du coffret original)
- temps d'incubation trop court, température d'incubation trop basse

**Réaction trop intense (DO trop élevée)**

- conjugué non approprié (par ex., ne provenant pas du coffret original)
- temps d'incubation trop long, température d'incubation trop élevée
- mauvaise qualité de l'eau utilisée pour la solution de lavage (bas degré de déionisation)
- lavages insuffisants (conjugué non entièrement éliminé)

**Valeurs inexplicablement hors plage**

- contamination des pipettes, embouts ou récipients - lavages insuffisants (conjugué non entièrement éliminé)

**CV% intra-essai élevé**

- les réactifs et/ou les bandes n'ont pas atteint la température ambiante avant usage
- le laveur de microplaques ne lave pas correctement (suggestion : nettoyer la tête du laveur)

**CV% inter-essai élevé**

- conditions d'incubation non constantes (temps ou température)
- contrôles et échantillons non distribués en même temps (avec les mêmes intervalles) (contrôler l'ordre de distribution)
- variabilité intrinsèque des opérateurs