

# Product information

Information about other products is available at: [www.demeditec.com](http://www.demeditec.com)



User's Manual

# Progesterone free in Saliva HS ELISA

Enzyme Immunoassay for the determination of progesterone in saliva



**DESLV5911**



**96 wells**

***Please use only the valid version of the Instructions for Use provided with the kit.  
Verwenden Sie nur die jeweils gültige, im Testkit enthaltene, Gebrauchsanweisung.  
Si prega di usare la versione valida delle istruzioni per l'uso a disposizione con il kit.  
Por favor, se usa solo la version valida de la metodico técnico incluido aqui en el kit.  
Utilisez seulement la version valide des Instructions d'utilisation fournies avec le kit.***

**Table of Contents / Inhaltsverzeichnis**

1	INTRODUCTION.....	3
2	PRINCIPLE OF THE TEST .....	3
3	WARNINGS AND PRECAUTIONS.....	3
4	REAGENTS.....	4
5	SPECIMEN COLLECTION AND PREPARATION.....	5
6	ASSAY PROCEDURE .....	6
7	EXPECTED NORMAL VALUES .....	7
8	QUALITY CONTROL.....	7
9	PERFORMANCE CHARACTERISTICS .....	8
10	LIMITATIONS OF USE .....	9
11	LEGAL ASPECTS.....	9
1	EINLEITUNG.....	11
2	TESTPRINZIP .....	11
3	VORSICHTSMAßNAHMEN .....	11
4	BESTANDTEILE DES KITS.....	12
5	PROBENVORBEREITUNG .....	13
6	TESTDURCHFÜHRUNG .....	14
7	ERWARTETE WERTE.....	15
8	QUALITÄTSKONTROLLE.....	15
9	ASSAY-CHARAKTERISTIKA.....	16
10	GRENZEN DES TESTS.....	16
11	RECHTLICHE GRUNDLAGEN.....	16
12	REFERENCES / LITERATURE .....	17
	SYMBOLS USED WITH DEMEDITEC ASSAYS.....	20

## 1 INTRODUCTION

### 1.1 Intended Use

Enzyme immunoassay for the *in vitro diagnostic* quantitative measurement of active free progesterone (a female hormone) in saliva. Measurements obtained by this device may be used in the diagnosis and treatment of disorders of the ovaries or placenta and can be used as an aid for prediction of ovulation.

### 1.2 Summary and Explanation

Progesterone (4-pregnene-3, 20-dione) is a C21 steroid hormone containing a keto-group (at C-3) and a double bond between C-4 and C-5. Like other steroids, it is synthesized from cholesterol via a series of enzyme-mediated steps (1) The steroid hormone Progesterone is a female sex hormone which, in conjunction with estrogens, regulates the accessory organs during the menstrual cycle and it is particularly important in preparing the endometrium for the implantation of the blastocyte and in maintaining pregnancy (2) In non-pregnant women progesterone is mainly secreted by the corpus luteum whereas in pregnancy the placenta becomes the major source (3,4). Minor sources for progesterone are the adrenal cortex for both sexes and the testes for males. The Progesterone level in saliva represents the concentration of the active free Progesterone.

## 2 PRINCIPLE OF THE TEST

The Demeditec Progesterone free in Saliva HS ELISA Kit is a solid phase enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA), based on the principle of competitive binding. The microtiter wells are coated with a polyclonal (rabbit) antibody directed towards an antigenic site of the Progesterone molecule. Endogenous Progesterone of a patient sample competes with a Progesterone-horseradish peroxidase conjugate for binding to the coated antibody. After incubation the unbound conjugate is washed off. The amount of bound peroxidase conjugate is inversely proportional to the concentration of Progesterone in the sample. After addition of the substrate solution, the intensity of colour developed is inversely proportional to the concentration of Progesterone in the patient sample.

## 3 WARNINGS AND PRECAUTIONS

1. This kit is for *in vitro* diagnostic use only. For professional use only.
2. All reagents of this test kit which contain human serum or plasma have been tested and confirmed negative for HIV I/II, HBsAg and HCV by FDA approved procedures. All reagents, however, should be treated as potential biohazards in use and for disposal.
3. Before starting the assay, read the instructions completely and carefully. Use the valid version of the package insert provided with the kit. Be sure that everything is understood.
4. The microplate contains snap-off strips. Unused wells must be stored at 2 °C to 8 °C in the sealed foil pouch and used in the frame provided.
5. Pipetting of samples and reagents must be done as quickly as possible and in the same sequence for each step.
6. Use reservoirs only for single reagents. This especially applies to the substrate reservoirs. Using a reservoir for dispensing a substrate solution that had previously been used for the conjugate solution may turn solution colored. Do not pour reagents back into vials as reagent contamination may occur.
7. Mix the contents of the microplate wells thoroughly to ensure good test results. Do not reuse microwells.
8. Do not let wells dry during assay; add reagents immediately after completing the rinsing steps.
9. Allow the reagents to reach room temperature (21 °C to 26 °C) before starting the test. Temperature will affect the absorbance readings of the assay. However, values for the patient samples will not be affected.
10. Never pipet by mouth and avoid contact of reagents and specimens with skin and mucous membranes.
11. Do not smoke, eat, drink or apply cosmetics in areas where specimens or kit reagents are handled.
12. Wear disposable latex gloves when handling specimens and reagents. Microbial contamination of reagents or specimens may give false results.
13. Handling should be done in accordance with the procedures defined by an appropriate national biohazard safety guideline or regulation.

14. Do not use reagents beyond expiry date as shown on the kit labels.
15. All indicated volumes have to be performed according to the protocol. Optimal test results are only obtained when using calibrated pipettes and microtiterplate readers.
16. Do not mix or use components from kits with different lot numbers. It is advised not to exchange wells of different plates even of the same lot. The kits may have been shipped or stored under different conditions and the binding characteristics of the plates may result slightly different.
17. Avoid contact with *Stop Solution* containing 0.5 M H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>. It may cause skin irritation and burns.
18. Some reagents contain Proclin, BND and MIT as preservatives. In case of contact with eyes or skin, flush immediately with water.
19. TMB substrate has an irritant effect on skin and mucosa. In case of possible contact, wash eyes with an abundant volume of water and skin with soap and abundant water. Wash contaminated objects before reusing them. If inhaled, take the person to open air.
20. Chemicals and prepared or used reagents have to be treated as hazardous waste according to the national biohazard safety guideline or regulation.
21. For information on hazardous substances included in the kit please refer to Safety Data Sheets. Safety Data Sheets for this product are available upon request directly from Demeditec.

## 4 REAGENTS

### 4.1 Reagents provided

1. **SORB** **MT** **Microtiterwells**, 12 x 8 (break apart) strips, 96 wells; Wells coated with anti-Progesterone antibody (polyclonal).
2. **CAL** **0 – 5** **Standard (Standard 0-5)**, 6 vials, 1 mL each, ready to use; Concentrations: 0; 10; 50; 150; 600; 2400 pg/mL; Conversion: pg/mL x 3.18 = pmol/L. Contain non-mercury preservative.
3. **CONTROL** **low & high** **Control Low & High**, 2 vials, 1.0 mL each, ready to use; Control values and ranges please refer to QC-Datasheet. Contain non-mercury preservative.
4. **ENZ** **CONJ** **Enzyme Conjugate**, 1 vial, 26 mL, ready to use; Progesterone conjugated to horseradish peroxidase; Contain non-mercury preservative.
5. **SUB** **TMB** **Substrate Solution**, 1 vial, 25 mL, ready to use; Tetramethylbenzidine (TMB).
6. **STOP** **SOLN** **Stop Solution**, 1 vial, 14 mL, ready to use; contains 0.5M H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>. Avoid contact with the stop solution. It may cause skin irritations and burns.
7. **WASH** **SOLN** **40x** **Wash Solution**, 1 vial, 30 mL (40X concentrated); see „Preparation of Reagents“.

### 4.2 Materials required but not provided

- A microtiter plate calibrated reader (450 nm / 620 - 630 nm)
- Calibrated variable precision micropipettes (100 µL and 200 µL)
- Absorbent paper
- Distilled water
- Timer (60 min range)
- Semi logarithmic graph paper or software for data reduction

### 4.3 Storage Conditions

When stored at 2-8 °C unopened reagents will retain reactivity until expiration date. Do not use reagents beyond this date. Opened reagents must be stored at 2-8 °C. Microtiter wells must be stored at 2-8 °C. Once the foil bag has been opened, care should be taken to close it tightly again. Opened kits retain activity for 8 weeks if stored as described above.

### 4.4 Reagent Preparation

Bring all reagents and required number of strips to room temperature prior to use.

#### Wash Solution

Add distilled water to the 40X concentrated *Wash Solution*.

Dilute 30 mL of concentrated *Wash Solution* with 1170 mL distilled water to a final volume of 1200 mL. *The diluted Wash Solution is stable for 2 weeks at room temperature.*

#### 4.5 Disposal of the Kit

The disposal of the kit must be made according to the national regulations. Special information for this product is given in the Safety Data Sheet.

#### 4.6 Damaged Test Kits

In case of any severe damage to the test kit or components, Demeditec has to be informed in writing, at the latest, one week after receiving the kit. Severely damaged single components should not be used for a test run. They have to be stored until a final solution has been found. After this, they should be disposed according to the official regulations.

### 5 SPECIMEN COLLECTION AND PREPARATION

Saliva can be used in this assay.

Eating, drinking, chewing gums or brushing teeth should be avoided for 30 minutes before sampling. Otherwise, it is recommended to rinse mouth thoroughly with cold water 5 minutes prior to sampling. Do not collect samples when oral diseases, inflammation or lesions exist (blood contamination). If there is visible blood contamination of the patient specimen, it should be discarded, rinse the sampling device with water, wait for 10 minutes and take a new sample. *Note:* Samples containing sodium azide should not be used in the assay.

#### 5.1 Specimen Collection

Saliva samples should be collected using polypropylene devices.

Do not use Salivette® tubes for sampling; this in most cases will result in significant interferences.

Other saliva sampling devices have not been tested and should be validated under the responsibility of the user.

At least during the luteal phase of females there is a significant episodic excretion pattern of Progesterone. Due to this episodic variation of the steroid secretion we highly recommend the strategy of multiple sampling. In order to avoid arbitrary results we recommend that always 5 samples be taken within a period of 2 - 3 hours (*multiple sampling*) preferably before a meal. As food might contain significant amounts of steroid hormones samples preferably should be taken while fasting. If fasting should be a problem the collection period should be timed just before lunch or before dinner.

#### 5.2 Specimen Storage and Preparation

##### Fresh saliva samples

**Immediately after arrival** in the lab fresh saliva samples should be **frozen at least overnight at -20 °C.**

Each saliva sample has to be frozen, thawed, and centrifuged in order to separate the mucins by centrifugation.

Storage: immediately at -20 °C.

Then samples must be thawed and centrifuged for 5 to 10 minutes 10 000 *g*.

Thereafter, the clear supernatant must be transferred into a fresh tube.

**Only this clear supernatant can be used as sample for the ELISA.**

If a set of multiple samples has to be tested, the lab has to **mix aliquots of the supernatant** of the 5 single samples in a separate sampling device and perform the testing from this mixture.

##### Supernatant

Storage: 5 days at 2-8 °C

at least 5 days at -20 °C, in aliquots

The supernatant should be frozen only once.

Thawed supernatant should be inverted several times prior to testing!

### 5.3 Specimen Dilution

If in an initial assay, a specimen is found to contain more than the highest standard, the specimens can be diluted with *Standard 0* solution and re-assayed as described in Assay Procedure. For the calculation of the concentrations this dilution factor has to be taken into account.

Example:

- a) Dilution 1:10: 10 µL saliva + 90 µL *Standard 0* (mix thoroughly)
- b) Dilution 1:100: 10 µL of dilution a) + 90 µL *Standard 0* (mix thoroughly).

## 6 ASSAY PROCEDURE

### 6.1 General Remarks

- All reagents and specimens must be allowed to come to room temperature before use. All reagents must be mixed without foaming.
- Once the test has been started, all steps should be completed without interruption.
- Use new disposal plastic pipette tips for each standard, control or sample in order to avoid cross contamination.
- Absorbance is a function of the incubation time and temperature. Before starting the assay, it is recommended that all reagents are ready, caps removed, all needed wells secured in holder, etc. This will ensure equal elapsed time for each pipetting step without interruption.
- As a general rule the enzymatic reaction is linearly proportional to time and temperature.

### 6.2 Assay Procedure

Each run must include a standard curve.

1. Secure the desired number of coated strips in the frame holder.
2. Dispense **100 µL** of each **Standard, Control** and **samples** with new disposable tips into appropriate wells.
3. Dispense **200 µL** of **Enzyme Conjugate** into each sample and standard well. Thoroughly mix for 10 seconds. It is important to have a complete mixing in this step.
4. Incubate for **60 minutes** at room temperature.
5. Briskly shake out the contents of the wells. Rinse the wells **5 times** with diluted Wash Solution (400 µL per well). Strike the inverted wells sharply on absorbent paper to remove residual droplets.

**Important note:**

The sensitivity and precision of this assay is markedly influenced by the correct performance of the washing procedure!

6. Add **200 µL** of **Substrate Solution** to each well.
7. Incubate for **15 minutes** at room temperature.
8. Stop the enzymatic reaction by adding **100 µL** of **Stop Solution** to each well.
9. Determine the absorbance (OD) of the solution in each well at **450 nm (reading) and at 620 - 630 nm (background subtraction, recommended)** with a microtiter plate reader. It is recommended that the wells be read **within 10 minutes** after adding the *Stop Solution*.

### 6.3 Calculation of Results

1. Calculate the average absorbance values for each set of standards, controls and patient samples.
2. Using semi-logarithmic graph paper, construct a standard curve by plotting the mean absorbance obtained from each standard 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 standard curve.
4. Automated method: The results in the Instructions for Use have been calculated automatically using a 4 Parameter curve fit. (4 Parameter Rodbard or 4 Parameter Marquardt are the preferred methods.) Other data reduction functions may give slightly different results.
5. The concentration of the samples can be read directly from this standard curve. Samples with concentrations higher than that of the highest standard have to be further diluted or reported as > 2400 pg/mL. For the calculation of the concentrations this dilution factor has to be taken into account.

### 6.3.1 Example of Typical Standard Curve

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

Standard	Optical Units (450 nm)
Standard 0 (0 pg/mL)	1.96
Standard 1 (10 pg/mL)	1.72
Standard 2 (50 pg/mL)	1.41
Standard 3 (150 pg/mL)	1.05
Standard 4 (600 pg/mL)	0.58
Standard 5 (2400 pg/mL)	0.23

## 7 EXPECTED NORMAL VALUES

It is strongly recommended that each laboratory should determine its own normal and abnormal values. In order to determine the normal range of Progesterone free in Saliva HS ELISA, saliva samples from 50 adult male and 120 female apparently healthy subjects, ages 21 to 75 years, were collected in the morning and analyzed using the Demeditec Progesterone free in Saliva HS ELISA kit. The following ranges were calculated from this study.

	Age group	Salivary progesterone pg/mL
<b>Women</b>	21 - 50 years Follicular phase n = 40	19.6 - 86.5 pg/mL
	21 - 50 years Luteal phase n = 40	99.1 - 332.6 pg/mL
	51 - 75 years Postmenopausal n = 40	6.0 - 56.4 pg/mL
<b>Men</b>	n = 50	1.1 - 44.4 pg/mL

The values differ between age, new born, children, adolescents and adults.

The results alone should not be the only reason for any therapeutic consequences. The results should be correlated to other clinical observations and diagnostic tests.

## 8 QUALITY CONTROL

Good laboratory practice requires that controls be run with each calibration curve. A statistically significant number of controls should be assayed to establish mean values and acceptable ranges to assure proper performance. It is recommended to use control samples according to state and federal regulations. The use of control samples is advised to assure the day to day validity of results. Use controls at both normal and pathological levels. The controls and the corresponding results of the QC-Laboratory are stated in the QC certificate added to the kit. The values and ranges stated on the QC sheet always refer to the current kit lot and should be used for direct comparison of the results. It is also recommended to make use of national or international Quality Assessment programs in order to ensure the accuracy of the results. Employ appropriate statistical methods for analysing control values and trends. If the results of the assay do not fit to the established acceptable ranges of control materials patient results should be considered invalid. In this case, please check the following technical areas: Pipetting and timing devices; photometer, expiration dates of reagents, storage and incubation conditions, aspiration and washing methods. After checking the above mentioned items without finding any error contact your distributor or Demeditec directly.

## 9 PERFORMANCE CHARACTERISTICS

### 9.1 Assay Dynamic Range

The range of the assay is between 1.1 – 2400 pg/mL.

### 9.2 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	100.0
Desoxycorticosterone	1.1
Pregnenolone	0.35
17 $\alpha$ -Hydroxyprogesterone	0.9
Corticosterone	0.2
11-Desoxycortisol	0.1
Estriol	0.0
Estradiol 17 $\beta$	0.0
Testosterone	0.2
Cortisone	< 0.1
DHEA-S	0.0
Cortisol	2.6
Androstendione	0.4
DHEA	0.0
Estron	0.0

### 9.3 Sensitivity

The analytical sensitivity of the Demeditec ELISA was calculated by subtracting 2 standard deviations from the mean of 20 replicate analyses of the Zero Standard (S0) and was found to be 1.1 pg/mL

### 9.4 Reproducibility

#### Intra-Assay

The within assay variability is shown below:

Sample	n	Mean (pg/mL)	CV (%)
1	20	185.7	8.1
2	20	353.6	5.5
3	20	625.3	5.3

#### Inter-Assay

The between assay variability is shown below:

Sample	n	Mean (pg/mL)	CV (%)
1	20	109.7	10.7
2	20	137.8	10.1
3	20	1945.8	6.7

#### Inter-Lot

The inter-assay (between-lots) variation was determined by repeated measurements of 3 samples in 3 different kit lots. The between lot variability is shown below:

Sample	n	Mean (pg/mL)	CV (%)
1	18	196.6	5.4
2	18	346.9	3.4
3	18	612.4	3.9



### 9.5 Recovery

Recovery of the Demeditec Progesterone HS ELISA was determined by adding increasing amounts of the analyte to three 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 standard curve. The percentage recoveries were determined by comparing expected and measured values of the samples.

	Sample 1	Sample 2	Sample 3
<b>Concentration (pg/mL)</b>	28.6	261.0	378.0
<b>Average Recovery (%)</b>	102.8	98.6	99.7
<b>Range of Recovery (%)</b>	from	89.1	93.8
	to	113.1	107.5

### 9.6 Linearity

In total six saliva samples containing different amounts of analyte were serially diluted with Standard 0 and assayed with the Demeditec ELISA. Three of these samples were serially diluted directly, and the other 3 samples at first were spiked with progesterone and then serially diluted up to 1:128. The percentage recovery was calculated by comparing the expected and measured values for progesterone. Samples above this range must be diluted and re-run.

	Sample 1	Sample 2	Sample 3	Sample 4	Sample 5	Sample 6
<b>Concentration (pg/mL)</b>	130.5	321.0	378.7	501.6	580.0	1000.0
<b>Average Recovery (%)</b>	98.9	107.1	104.6	100.0	98.0	90.6
<b>Range of Recovery (%)</b>	from	85.7	102.9	95.3	89.3	86.9
	to	111.6	112.1	109.8	105.3	109.7

### 9.7 Comparison Studies

A study was performed that evaluated 24 saliva samples collected from adult men and women. The samples were analyzed with the Demeditec ELISA and a LC-MS/MS mass spectrometer to determine the concentration of free progesterone in the saliva samples. A correlation of 0.997 and regression formula of  $y = 0.9612x - 11.071$  were obtained.

## 10 LIMITATIONS OF USE

Reliable and reproducible results will be obtained when the assay procedure is performed with a complete understanding of the package insert instruction and with adherence to good laboratory practice. Any improper handling of samples or modification of this test might influence the results.

### 10.1 Interfering Substances

Blood contamination  $\geq 0.16\%$  in saliva samples will affect results, and usually can be seen by eye. Concentrations of Sodium Azide  $\geq 0.02\%$  interferes in this assay and may lead to false results.

### 10.2 High-Dose-Hook Effect

No hook effect was observed in this test.

## 11 LEGAL ASPECTS

### 11.1 Reliability of Results

The test must be performed exactly as per the manufacturer's instructions for use. Moreover the user must strictly adhere to the rules of GLP (Good Laboratory Practice) or other applicable national standards and/or laws. This is especially relevant for the use of control reagents. It is important to always include, within the test procedure, a sufficient number of controls for validating the accuracy and precision of the test. The test results are valid only if all controls are within the specified ranges and if all other test parameters are also within the given assay specifications. In case of any doubt or concern please contact Demeditec.

### 11.2 Therapeutic Consequences

Therapeutic consequences should never be based on laboratory results alone even if all test results are in agreement with the items as stated under point 11.1. Any laboratory result is only a part of the

total clinical picture of a patient. Only in cases where the laboratory results are in acceptable agreement with the overall clinical picture of the patient should therapeutic consequences be derived. The test result itself should never be the sole determinant for deriving any therapeutic consequences.

### **11.3 Liability**

Any modification of the test kit and/or exchange or mixture of any components of different lots from one test kit to another could negatively affect the intended results and validity of the overall test. Such modification and/or exchanges invalidate any claim for replacement. Claims submitted due to customer misinterpretation of laboratory results subject to point 11.2. are also invalid. Regardless, in the event of any claim, the manufacturer's liability is not to exceed the value of the test kit. Any damage caused to the test kit during transportation is not subject to the liability of the manufacturer.

## 1 EINLEITUNG

Der **Demeditec Progesterone free in Saliva HS ELISA** wird zur quantitativen Bestimmung von Progesteron in Speichel eingesetzt.

**Nur für In-vitro Diagnostik.**

## 2 TESTPRINZIP

Der Demeditec Progesterone free in Saliva HS ELISA ist ein Festphasen-Enzymimmunoassay, der auf dem Prinzip der kompetitiven Bindung basiert. Die Wells der Mikrotiterplatten sind mit einem polyclonalen Antikörper beschichtet, der gegen eine Antikörper-Bindungsstelle des Progesteron-Moleküls gerichtet ist. Die Proben werden in die beschichteten Wells gegeben und zusammen mit einem Progesteron-Enzymkonjugat inkubiert. Während der Inkubation konkurriert das Progesteron aus der Probe mit dem Progesteron-Enzymkonjugat um die freien Bindungsstellen auf den beschichteten Wells. Das nicht gebundene Konjugat wird durch Waschen der Wells entfernt. Anschließend wird die Substratlösung zugegeben und die Farbentwicklung nach einer definierten Zeit gestoppt. Die Intensität der gebildeten Farbe ist umgekehrt proportional der Progesteron-Konzentration in der Probe. Die Extinktion wird bei 450 nm mit einem Mikrotiterplattenleser gemessen.

## 3 VORSICHTSMAßNAHMEN

- Dieser Kit ist nur zum in vitro diagnostischen Gebrauch geeignet.
- Nur die gültige, im Testkit enthaltene, Arbeitsanleitung verwenden.
- Informationen zu im Kit enthaltenen gefährlichen Substanzen entnehmen Sie bitte dem Material Sicherheitsdatenblatt.
- Alle Bestandteile dieses Testkits, die humanes Serum oder Plasma enthalten, wurden mit FDA-geprüften Methoden auf HIV I/II, HbsAg und HCV getestet und als negativ bestätigt. Jedoch sollten alle Bestandteile im Umgang und bei der Entsorgung wie mögliche Gefahrenstoffe betrachtet werden.
- Der Kontakt mit der *Stop Solution* sollte vermieden werden, da sie 0.5 M H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> enthält. Schwefelsäure kann Hautreizungen und Verbrennungen verursachen.
- Nicht mit dem Mund pipettieren und den Kontakt von Kitbestandteilen und Proben mit Haut und Schleimhäuten vermeiden.
- In den Bereichen, in denen Proben oder Kitbestandteile verwendet werden, nicht rauchen, essen oder Kosmetika verwenden.
- Beim Umgang mit Proben oder Reagenzien Einweg-Latexhandschuhe tragen. Die Verunreinigung von Reagenzien oder Proben mit Mikroben kann zu falschen Ergebnissen führen.
- Der Gebrauch sollte gemäß der Vorschriften einer entsprechenden nationalen Gefahrenstoff-Sicherheitsrichtlinie erfolgen.
- Reagenzien nicht nach dem auf dem Kit-Etikett angegebenen Verfallsdatum verwenden.
- Alle im Kit-Protokoll angegebenen Mengen müssen genau eingehalten werden. Optimale Ergebnisse können nur durch Verwendung kalibrierter Pipetten und Mikrotiterplatten-Lesegeräte erreicht werden.
- Komponenten von Kits mit unterschiedlichen Lotnummern nicht untereinander vertauschen. Es wird empfohlen, keine Wells von verschiedenen Platten zu verwenden, auch nicht, wenn es sich um das gleiche Lot handelt. Die Kits können unter anderen Bedingungen gelagert oder versendet worden sein, so dass die Bindungscharakteristik der Platten leicht unterschiedlich ausfällt.
- Chemikalien und zubereitete oder bereits benutzte Reagenzien müssen gemäß den nationalen Gefahrenstoffvorschriften wie gefährlicher Abfall behandelt werden.
- Sicherheitsdatenblätter für dieses Produkt sind auf Anfrage direkt von der Firma Demeditec Diagnostics GmbH erhältlich.

## 4 BESTANDTEILE DES KITS

### 4.1 Kitinhalt

1. **SORB** **MT** **Microtiterwells**, 96 Wells, 12 x 8 Wells (einzeln brechbar); mit anti-Progesteron-Antikörper (polyklonal) beschichtet.
2. **CAL** **0** – **5** **Standard (Standard 0-5)**, 6 Fläschchen, je 1 mL, gebrauchsfertig; Konzentrationen: 0; 10; 50; 150; 600; 2400 pg/mL. Umrechnungsfaktor: pg/mL x 3,18 = pmol/L. Enthält quecksilberfreies Konservierungsmittel.
3. **CONTROL** **low** & **high** **Control Low & High** (Kontrolle), 2 Fläschchen, je 1,0 mL; gebrauchsfertig; Kontrollwerte und –bereiche entnehmen Sie bitte dem QC-Datenblatt. Enthält quecksilberfreies Konservierungsmittel.
4. **ENZ** **CONJ** **Enzyme Conjugate** (Enzymkonjugat), 1 Fläschchen, 26 mL, gebrauchsfertig; Progesteron mit Meerrettichperoxidase konjugiert. Enthält quecksilberfreies Konservierungsmittel.
5. **SUB** **TMB** **Substrate Solution** (Substratlösung), 1 Fläschchen, 25 mL, gebrauchsfertig; Substratlösung TMB.
6. **STOP** **SOLN** **Stop Solution** (Stopplösung), 1 Fläschchen, 14 mL, gebrauchsfertig; Enthält 0,5M H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>.  
Kontakt mit der Stopplösung vermeiden! Kann Hautreizungen und Verbrennungen verursachen.
7. **WASH** **SOLN** **40x** **Wash Solution** (Waschlösung), **40X** konzentriert, 1 Fläschchen, 30 mL. Siehe „Vorbereitung der Reagenzien“.

**Anmerkung:** Zusätzlicher *Standard 0* zur Probenverdünnung ist auf Anfrage erhältlich.

### 4.2 Nicht im Kit enthaltene aber erforderliche Geräte und Materialien

- Kalibriertes Mikrotiterplattenlesegerät mit (450 nm / 620 - 630 nm-Filter)
- Kalibrierte variable Präzisions-Mikropipetten (100 µL, 200 µL)
- Saugfähiges Papier
- Destilliertes Wasser
- Laborkurzzeitwecker
- Semi-logarithmisches Millimeterpapier oder Kalkulationssoftware

### 4.3 Lagerung und Haltbarkeit des Kits

Die ungeöffneten Reagenzien behalten bei Lagerung um 2-8 °C ihre Reaktivität bis zum Verfallsdatum. Nach dem Verfallsdatum die Reagenzien nicht mehr verwenden. Nach dem Öffnen sollten alle Reagenzien bei 2-8 °C gelagert werden. Die Mikrotiterwells sollten bei 2-8 °C gelagert werden. Der einmal geöffnete Folienbeutel sollte stets sehr sorgfältig wieder verschlossen werden. Unter den beschriebenen Lagerbedingungen behalten geöffnete Kits 8 Wochen ihre Reaktivität.

### 4.4 Vorbereitung der Reagenzien

Alle Reagenzien sowie die benötigte Anzahl von Wells sollen vor dem Gebrauch auf Raumtemperatur gebracht werden.

### Wash Solution

Die 40-fach konzentrierte Waschlösung (30 mL) mit 1170 mL destilliertem Wasser auf ein Gesamtvolumen von 1200 mL verdünnen. *Die verdünnte Waschlösung ist bei Raumtemperatur für 2 Wochen stabil.*

### 4.5 Entsorgung des Kits

Die Entsorgung des Kits muss gemäß den nationalen gesetzlichen Vorschriften erfolgen. Spezielle Informationen für dieses Produkt finden Sie im Sicherheitsdatenblatt.

### 4.6 Beschädigte Testkits

Im Falle einer starken Beschädigung des Testkits oder der Komponenten muss die Firma Demeditec in schriftlicher Form spätestens eine Woche nach Erhalt des Kits informiert werden. Stark beschädigte Einzelkomponenten sollten nicht für den Testlauf verwendet werden. Sie müssen gelagert werden bis eine endgültige Lösung gefunden wurde. Danach sollten Sie gemäß den offiziellen Richtlinien entsorgt werden.

## 5 PROBENVORBEREITUNG

Speichelproben werden in diesem Test als Probenmaterial eingesetzt.

Der Patient sollte vor der Probenahme 30 Minuten nicht essen, trinken, Kaugummi kauen oder Zähne putzen. Andernfalls 5 Minuten vor der Probenahme den Mund gründlich mit kaltem Wasser spülen. Speichelproben sollten nicht bei Krankheiten, Entzündungen oder Verletzungen der Mundhöhle entnommen werden (Blutkontamination). Im Falle einer sichtbaren Kontamination mit Blut sollte die Probe verworfen werden. Das Probenbesteck wird mit Wasser gewaschen und nach 10 Minuten kann eine neue Probe genommen werden. *Achtung:* Proben, die Natriumazid enthalten, sollten in diesem Assay nicht verwendet werden.

### 5.1 Probenentnahme

Die Speichelproben müssen mit Gefäßen aus Polypropylen gesammelt werden. Es sollte kein Besteck mit Watterolle verwendet werden, wie z.B. Salivette®, da dies in den meisten Fällen zu deutlichen Interferenzen führt. Andere Sammelsysteme wurden nicht getestet. Diese müssen in Verantwortung des Anwenders validiert werden.

Bei Frauen kommt es mindestens während der Lutealphase zu einem bedeutenden episodischen Sekretionsmuster des Progesterons. Aus diesem Grund wird ausdrücklich empfohlen eine mehrfache Probeentnahme durchzuführen. Um arbiträre (willkürliche) Ergebnisse zu vermeiden, empfehlen wir 5 Proben in einem Zeitraum von 2 bis 3 Stunden zu sammeln (mehrfache Probeentnahme). Dies sollte vorzugsweise vor einer Mahlzeit durchgeführt werden. Da Lebensmittel eine bedeutende Menge an Steroidhormonen enthalten können, sollten die Proben möglichst nüchtern entnommen werden. Ist dies nicht möglich, sollte die Sammelperiode auf jeden Fall vor einer Mahlzeit liegen.

### 5.2 Probenaufbewahrung und -vorbereitung

#### Frische Speichelproben

**Sofort nach der Ankunft** im Labor müssen frische Speichelproben **mindestens über Nacht bei -20 °C** tiefgefroren werden.

Jede Speichelprobe muss eingefroren, aufgetaut und anschließend zentrifugiert werden, um Muzine aus der Probe zu entfernen.

Lagerung: sofort bei -20 °C

Die eingefrorene Probe muss aufgetaut und 5 bis 10 Minuten bei 10 000 g zentrifugiert werden. Anschließend muss der klare Überstand in ein frisches Röhrchen überführt werden.

**Nur dieser klare Überstand darf als Probe im ELISA eingesetzt werden.**

Wird ein Set an Mehrfach-Proben getestet, muss im Labor in einem separaten Probengefäß eine **Mischprobe aus Aliquots der Überstände** der 5 Einzelproben hergestellt werden. Diese Mischprobe wird im Test eingesetzt.

#### Überstand

Lagerung: 5 Tage bei 2 °C bis 8 °C  
mindestens 5 Tage bei -20 °C, in Aliquots

Der Überstand sollte nur einmal eingefroren werden.

Vor dem Einsatz im Test muss der aufgetaute Überstand durch hin und her schwenken gemischt werden.

### 5.3 Probenverdünnung

Wenn in einem ersten Testdurchlauf bei einer Probe eine Konzentration höher als der höchste Standard gefunden wird, kann diese Probe mit *Standard 0* weiter verdünnt und nochmals bestimmt werden. Die Verdünnung muss jedoch bei der Berechnung der Konzentration beachtet werden.

#### Beispiel:

a) Verdünnung 1:10: 10 µL Speichelprobe + 90 µL Standard 0 (gründlich mischen)

b) Verdünnung 1:100: 10 µL Verdünnung a) 1:10 + 90 µL Standard 0 (gründlich mischen).

## 6 TESTDURCHFÜHRUNG

### 6.1 Allgemeine Hinweise

- Alle Reagenzien und Proben müssen vor Gebrauch auf Raumtemperatur gebracht und gut durchgemischt werden. Dabei sollte Schaumbildung vermieden werden.
- Wenn die Testdurchführung einmal begonnen wurde, muss sie ohne Unterbrechung zu Ende geführt werden.
- Für jeden Standard, jede Kontrolle oder Probe eine neue Plastikspitze verwenden, um Verschleppungen zu vermeiden.
- Die Optische Dichte ist abhängig von Inkubationszeit und Temperatur. Deshalb ist es notwendig, vor Beginn der Testdurchführung alle Reagenzien in einen arbeitsbereiten Zustand zu bringen, die Deckel der Fläschchen zu öffnen, alle benötigten Wells in den Halter zu setzen. Nur eine solche Vorbereitung garantiert gleiche Zeiten für jeden Pipettiervorgang ohne Pausen.
- Als generelle Regel gilt, dass die enzymatische Reaktion linear proportional zu Zeit und Temperatur ist.

### 6.2 Testdurchführung

Jeder Lauf muss eine Standardkurve beinhalten.

1. Die benötigte Anzahl Wells in der Halterung befestigen.
2. **Je 100 µL Standard, Control** und Proben mit neuen Plastikspitzen in die entsprechenden Wells geben.
3. **200 µL Enzyme Conjugate** in jedes Well geben.  
Für 10 Sekunden gut schütteln. Es ist sehr wichtig, in diesem Schritt eine komplette Durchmischung zu erreichen.
4. **60 Minuten** bei Raumtemperatur inkubieren.
5. Den Inhalt der Wells kräftig ausschütteln. Wells **5-mal** mit verdünnter Waschlösung (400 µL pro Well) waschen. Verbleibende Flüssigkeit durch Ausklopfen der Wells auf saugfähigem Papier entfernen.  
**Achtung:** Die Sensitivität und Präzision dieses Assays wird erheblich beeinflusst von der korrekten Durchführung des Waschschrilles!
6. **200 µL Substrate Solution** in jedes Well geben.
7. **15 Minuten** bei Raumtemperatur inkubieren.
8. Die enzymatische Reaktion durch Zugabe von **100 µL Stop Solution** in jedes Well abstoppen.
9. Die Optische Dichte (OD) bei **450 nm (Messung) und 620 - 630 nm (Abzug des Hintergrundes, empfohlen)** mit einem Mikrotiterplattenleser innerhalb von **10 Minuten** nach Zugabe der *Stop Solution* bestimmen.

### 6.3 Ergebnisermittlung

1. Die durchschnittlichen Werte der Optischen Dichte (OD) für jedes Set von Standards, Controls und Patientenproben bestimmen.
2. Eine Standardkurve ermitteln durch Auftragen der mittleren Optischen Dichte jedes Standards gegen die Konzentration, wobei der OD-Wert auf der vertikalen (Y) Achse und die Konzentration auf der horizontalen (X) Achse eingetragen wird.
3. Unter Verwendung der mittleren OD wird für jede Probe die entsprechende Konzentration aus der Standardkurve ermittelt.
4. Automatische Methode: Die in der Arbeitsanleitung ermittelten Werte wurden automatisch mit Hilfe der 4 Parameter Gleichung (4PL, 4 Parameter Logistics, 4 Parameter Rodbard) bestimmt. Andere Auswertungsfunktionen können leicht abweichende Werte ergeben.
5. Die Konzentration der Proben kann direkt von der Standardkurve abgelesen werden. Proben, die eine höhere Konzentration als die des höchsten Standards enthalten, müssen verdünnt werden. Dieser Verdünnungsfaktor muss bei der Berechnung der Konzentration beachtet werden.

**6.3.1 Beispiel für eine Standardkurve**

Nachfolgend wird ein typisches Beispiel für eine Standardkurve mit dem Demeditec ELISA gezeigt. Diese Werte sollten **nicht** zur Berechnung von Patientendaten verwendet werden.

Standard	Optische Dichte (450 nm)
Standard 0 (0 pg/mL)	1,96
Standard 1 (10 pg/mL)	1,72
Standard 2 (50 pg/mL)	1,41
Standard 3 (150 pg/mL)	1,05
Standard 4 (600 pg/mL)	0,58
Standard 5 (2400 pg/mL)	0,23

**7 ERWARTETE WERTE**

Es wird empfohlen, dass jedes Labor seine eigenen normalen und abnormalen Werte ermittelt. In einer Studie wurden die Speichelproben von 50 Männern und 120 Frauen, im Alter von 21 bis 75 Jahren, untersucht. Die Proben wurden morgens gesammelt. Dabei ergaben sich mit dem Demeditec Progesterone free in Saliva HS ELISA folgende Werte:

	Alter		Progesteron im Speichel pg/mL
<b>Frauen</b>	21 - 50 Jahre	Follikularphase n = 40	19,6 - 86,5
	21 - 50 Jahre	Lutealphase n = 40	99,1 - 332,6
	51 - 75 Jahre	Postmenopausal n = 40	6,0 - 56,4
<b>Männer</b>	n = 50		1,1 - 44,4 pg/mL

Die Werte sind altersabhängig und unterscheiden sich bei Neugeborenen, Kindern, Jugendlichen und Erwachsenen.

**8 QUALITÄTSKONTROLLE**

Es wird empfohlen, die Kontrollproben gemäß den nationalen gesetzlichen Bestimmungen einzusetzen. Durch die Verwendung von Kontrollproben wird eine Tag-zu-Tag Überprüfung der Ergebnisse erzielt. Es sollten Kontrollen sowohl mit normalem als auch pathologischem Level eingesetzt werden. Die Kontrollen mit den entsprechenden Ergebnissen des QC-Labors sind im QC-Zertifikat, das dem Kit beiliegt, aufgeführt. Die im QC-Blatt angegebenen Werte und Bereiche beziehen sich stets auf die aktuelle Kitcharge und sollten zum direkten Vergleich der Ergebnisse verwendet werden. Es sollten geeignete statistische Methoden zur Analyse von Kontroll-Werten und Trends angewendet werden. Wenn die Ergebnisse des Assays nicht mit den angegebenen Akzeptanzbereichen des Kontrollmaterials übereinstimmen, sollten die Patientenergebnisse als ungültig eingestuft werden. In diesem Fall überprüfen Sie bitte die folgenden Bereiche: Pipetten und Zeitnehmer, Photometer, Verfallsdatum der Reagenzien, Lagerungs- und Inkubationsbedingungen, Absaug- und Waschmethode. Sollten Sie nach Überprüfung der vorgenannten Bereiche keinen Fehler erkannt haben, setzen Sie sich bitte mit Ihrem Lieferanten oder direkt mit der Firma Demeditec in Verbindung.

## 9 ASSAY-CHARAKTERISTIKA

### 9.1 Messbereich

Der Messbereich des Testes liegt zwischen 1,1 – 2400 pg/mL.

### 9.2 Spezifität der Antikörper (Kreuzreaktivität)

Die Daten entnehmen Sie bitte der ausführlichen englischen Arbeitsanleitung.

### 9.3 Analytische Sensitivität

Die analytische Sensitivität, definiert als Mittelwert minus der zweifachen Standardabweichung des Standards 0 (n = 20), beträgt 1,1 pg/mL.

Die Daten zu:

### 9.4 Präzision

### 9.5 Wiederfindung

### 9.6 Linearität

entnehmen Sie bitte der ausführlichen englischen Gebrauchsanweisung.

## 10 GRENZEN DES TESTS

Jede unsachgemäße Behandlung von Proben oder Modifikationen dieses Tests können die Ergebnisse beeinflussen.

### 10.1 Interferenzen

Eine Kontamination der Speichelproben mit Blut  $\geq 0,16$  % beeinflusst das Ergebnis. Eine solche Verunreinigung kann bereits mit den Augen wahrgenommen werden. Natriumazidkonzentrationen  $\geq 0,02$  % beeinflussen den Test und können zu falschen Ergebnissen führen.

### 10.2 Beeinflussung durch Medikamente

Uns sind bislang keine Stoffe (Medikamente) bekannt geworden, deren Einnahme die Messung des Progesteron-Gehaltes der Probe beeinflussen würde.

### 10.3 High-Dose-Hook-Effekt

Ein Hook Effekt tritt in diesem Test nicht auf.

## 11 RECHTLICHE GRUNDLAGEN

### 11.1 Zuverlässigkeit der Ergebnisse

Der Test muss exakt gemäß der Testanleitung des Herstellers abgearbeitet werden. Darüber hinaus muss der Benutzer sich strikt an die Regeln der GLP (Good Laboratory Practice) oder andere eventuell anzuwendende Regeln oder nationale gesetzliche Vorgaben halten. Dies betrifft besonders den Gebrauch der Kontrollreagenzien. Es ist sehr wichtig, bei der Testdurchführung stets eine ausreichende Anzahl Kontrollen zur Überprüfung der Genauigkeit und Präzision mitlaufen zu lassen. Die Testergebnisse sind nur gültig, wenn alle Kontrollen in den vorgegebenen Bereichen liegen, und wenn alle anderen Testparameter die vorgegebenen Spezifikationen für diesen Assay erfüllen. Wenn Sie bezüglich eines Ergebnisses Zweifel oder Bedenken haben, setzen Sie sich bitte mit der Firma Demeditec in Verbindung.

### 11.2 Therapeutische Konsequenzen

Therapeutische Konsequenzen sollten keinesfalls nur aufgrund von Laborergebnissen erfolgen, selbst dann nicht, wenn alle Testergebnisse mit den in 11.1. genannten Voraussetzungen übereinstimmen. Jedes Laborergebnis ist nur ein Teil des klinischen Gesamtbildes eines Patienten. Nur in Fällen, in denen die Laborergebnisse in akzeptabler Übereinstimmung mit dem allgemeinen klinischen Bild des Patienten stehen, sollten therapeutische Konsequenzen eingeleitet werden. Das Testergebnis allein sollte niemals als alleinige Grundlage für die Einleitung therapeutischer Konsequenzen dienen.



### 11.3 Haftung

Jegliche Veränderungen des Testkits und/oder Austausch oder Vermischung von Komponenten unterschiedlicher Chargen von einem Testkit zu einem anderen, können die gewünschten Ergebnisse und die Gültigkeit des gesamten Tests negativ beeinflussen. Solche Veränderungen und/oder Austausch haben den Ausschluss jeglicher Ersatzansprüche zur Folge. Reklamationen, die aufgrund von Falschinterpretation von Laborergebnissen durch den Kunden gemäß Punkt 11.2. erfolgen, sind ebenfalls abzuweisen. Im Falle jeglicher Reklamation ist die Haftung des Herstellers maximal auf den Wert des Testkits beschränkt. Jegliche Schäden, die während des Transports am Kit entstanden sind, unterliegen nicht der Haftung des Herstellers.












### 12 REFERENCES / LITERATURE

1. Miller W.L. (1988): Molecular biology of steroid hormone synthesis, *Endocrin. Rev.* 9, 295-318
2. Filicori M., Butler J.P., Crowley W.F. Jr. (1984): Neuroendocrine regulation of the corpus luteum in the human, *J. Clin. Invest.* 73, 1638
3. 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
4. Henson M.C. (1998): Pregnancy maintenance and the regulation of placental progesterone biosynthesis in the baboon. *Human Reproduction Update*, 4, 389-405





**SYMBOLS USED WITH DEMEDITEC ASSAYS**

Symbol	English	Deutsch	Français	Espanol	Italiano
	European Conformity	CE-Konformitätskennzeichnung	Conforme aux normes européennes	Conformidad europea	Conformità europea
	Consult instructions for use	Gebrauchsanweisung beachten	Consulter les instructions d'utilisation	Consulte las Instrucciones	Consultare le istruzioni per l'uso
	In vitro diagnostic device	In-vitro-Diagnostikum	Usage Diagnostic in vitro	Diagnóstico in vitro	Per uso Diagnostica in vitro
	For research use only	Nur für Forschungszwecke	Seulement dans le cadre de recherches	Sólo para uso en investigación	Solo a scopo di ricerca
	Catalogue number	Katalog-Nr.	Référence	Número de catálogo	No. di Cat.
	Lot. No. / Batch code	Chargen-Nr.	No. de lot	Número de lote	Lotto no
	Contains sufficient for <n> tests/	Ausreichend für "n" Ansätze	Contenu suffisant pour "n" tests	Contenido suficiente para <n> ensayos	Contenuto sufficiente per "n" saggi
	Note warnings and precautions	Warnhinweise und Vorsichtsmaßnahmen beachten	Avertissements et mesures de précaution font attention	Tiene en cuenta advertencias y precauciones	Annoti avvisi e le precauzioni
	Storage Temperature	Lagerungstemperatur	Temperature de conservation	Temperatura de conservación	Temperatura di conservazione
	Expiration Date	Mindesthaltbarkeitsdatum	Date limite d'utilisation	Fecha de caducidad	Data di scadenza
	Legal Manufacturer	Hersteller	Fabricant	Fabricante	Fabbricante
<i>Distributed by</i>	Distributor	Vertreiber	Distributeur	Distribuidor	Distributore