

Instructions for use
Free Estriol ELISA

Please use only the valid version of the Instructions for Use provided with the kit

**FR E-2100**

1. INTENDED USE

The **Free Estriol ELISA** is an enzyme immunoassay for the quantitative *in vitro* diagnostic measurement of free estriol (unconjugated estriol) in serum during the second half of pregnancy.

This kit is NOT intended to be used for the risk evaluation of trisomy 21.

1.1 Summary and Explanation

Estriol (E3) is the major estrogen formed by the fetoplacental unit during pregnancy. Unconjugated E3 passes through the placenta into the maternal circulation, where it is rapidly converted into glucuronide and sulfate derivatives to facilitate its excretion. The half-life of estriol in the maternal bloodstream is only 20 – 30 minutes. Therefore, measurement of E3 offers a convenient and quick evaluation of current fetal status. Plasma estriol levels increase steadily throughout pregnancy and most rapidly during the third trimester (28 – 40 weeks). A sudden decrease in fetoplacental E3 production will result in a rapid decrease of unconjugated E3 in the maternal serum. There are several potential advantages to measuring unconjugated E3 rather than total serum or urinary E3. Unconjugated estriol levels are free from effects related to maternal renal or hepatic disease, and are not altered by the administration of certain antibiotics. Unconjugated E3 allows better prognosis in diabetic pregnancies - and since no hydrolysis of unconjugated E3 is required, a shorter time to first results.

2. PRINCIPLE OF THE TEST

The Free Estriol 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 on the Estriol molecule. Endogenous Estriol of a patient sample competes with an Estriol-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 Estriol in the sample. After addition of the substrate solution, the intensity of colour developed is inversely proportional to the concentration of Estriol 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 coloured. 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 microtiter plate 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 H₂SO₄. It may cause skin irritation and burns.
18. Some reagents contain Proclin 300, BND and/or 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 the manufacturer.

4. REAGENTS

4.1 Reagents provided

FR E-2131 96 **Microtiterwells**

Content: 12 x 8 (break apart) strips; 96 wells; Wells coated with anti-Estriol antibody (polyclonal).

Standards and Controls - Ready to use

Cat. no.	Component	Standard	Concentration	Volume/Vial
FR E-2101	STANDARD A	Standard A	0 ng/ml	1 ml
FR E-2102	STANDARD B	Standard B	0.3 ng/ml	1 ml
FR E-2103	STANDARD C	Standard C	1.2 ng/ml	1 ml
FR E-2104	STANDARD D	Standard D	4.0 ng/ml	1 ml
FR E-2105	STANDARD E	Standard E	15 ng/ml	1 ml
FR E-2106	STANDARD F	Standard F	40 ng/ml	1 ml
FR E-2151	CONTROL 1	Control 1	For control values and ranges please refer to vial label or QC-Report	1 ml
FR E-2152	CONTROL 2	Control 2		1 ml

Contain non-mercury preservative.

FR E-2140 **Enzyme Conjugate** - Ready to use

Content: Estriol conjugated to horseradish peroxidase; contains non-mercury preservative.
Volume: 1 x 14 ml

ME E-0055 **Substrate Solution** - Ready to use

Content: Tetramethylbenzidine (TMB)
Volume: 1 x 14 ml

FR E-0080 **Stop Solution** - Ready to use

Content: Contains 0.5 M H₂SO₄; avoid contact with the stop solution. It may cause skin irritations and burns.

Volume: 1 x 14 ml

Hazards identification:



H290 May be corrosive to metals.

H314 Causes severe skin burns and eye damage.

FR E-0030 **Wash Solution** - 40x concentrated

Volume: 1 x 30 ml
see "Preparation of Reagents".

Note: Additional Standard A for sample dilution is available upon request.

4.2 Materials required but not provided

- A calibrated microtiter plate reader (450 nm, with reference wavelength at 620 nm – 630 nm)
- Calibrated variable precision micropipettes
- Absorbent paper
- Distilled water
- Timer
- Semi logarithmic graph paper or software for data reduction

4.3 Storage Conditions

When stored at 2 °C to 8 °C unopened reagents will retain reactivity until expiration date. Do not use reagents beyond this date.

Opened reagents must be stored at 2 °C to 8 °C. Microtiter wells must be stored at 2 °C to 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 1 week 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, the manufacturer 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

Serum should be used in this assay.

Note: Samples containing sodium azide should not be used in the assay.

In general it should be avoided to use haemolytic, icteric or lipaemic specimens. For further information refer to chapter "*Interfering Substances*".

5.1 Specimen Collection

Serum:

Collect blood by venipuncture (e.g. Sarstedt Monovette for serum), allow to clot, and separate serum by centrifugation at room temperature. Do not centrifuge before complete clotting has occurred. Patients receiving anticoagulant therapy may require increased clotting time.

5.2 Specimen Storage and Preparation

Specimens should be capped and may be stored for up to 7 days at 2 °C to 8 °C prior to assaying.

Specimens held for a longer time (up to 19 months) should be frozen only once at -20 °C prior to assay.

Thawed samples 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 A* and reassayed 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 Serum + 90 µl *Standard A* (mix thoroughly)

b) dilution 1:100: 10 µl dilution a) 1:10 + 90 µl *Standard A* (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.
- Optical density 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 Test Procedure

Each run must include a standard curve.

1.	Secure the desired number of Microtiter wells in the frame holder.
2.	Dispense 10 µl of each Standard, Control and samples with <u>new disposable tips</u> into appropriate wells.
3.	Dispense 100 µl Enzyme Conjugate into each 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 4 times with 400 µl diluted <i>Wash Solution</i> per well, if a plate washer is used - or - rinse the wells 4 times with 300 µl diluted <i>Wash Solution</i> per well for manual washing. Strike the 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 100 µl of Substrate Solution to each well.
7.	Incubate for 30 minutes at room temperature.
8.	Stop the enzymatic reaction by adding 100 µl of Stop Solution to each well.
9.	Determine the optical density (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 <i>Stop Solution</i> .

6.3 Calculation of Results

1. Calculate the average optical density (OD) values for each set of standards, controls and patient samples.
2. Using semi-logarithmic graph paper, construct a standard curve by plotting the mean OD obtained from each standard against its concentration with OD value on the vertical (Y) axis and concentration on the horizontal (X) axis.
3. Using the mean OD 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 > 40 ng/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 generations at the time of assay.

Standard	Optical Density (450 nm)
Standard A (0.0 ng/ml)	1.79
Standard B (0.3 ng/ml)	1.48
Standard C (1.2 ng/ml)	1.18
Standard D (4.0 ng/ml)	0.81
Standard E (15.0 ng/ml)	0.52
Standard F (40.0 ng/ml)	0.38

7. EXPECTED NORMAL VALUES

It is strongly recommended that each laboratory should determine its own normal and abnormal values.

7.1 Normal healthy adults

In a study conducted with apparently normal healthy adults, using the Free Estriol ELISA the following values are observed:

Population	n	Mean [ng/ml]	Median [ng/ml]	5 th - 95 th Percentile [ng/ml]	2.5 th - 97.5 th Percentile [ng/ml]	Range (min. - max.) [ng/ml]
Males	42	0.359	0.367	0.146 - 0.573	0.077 - 0.878	0.075 - 0.987
Females (not pregnant)	43	0.348	0.286	0.057 - 0.822	0.038 - 1.027	0.009 - 1.307

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.

7.2 Values during pregnancy

(p.m. = post menstruationem)

Week of gestation p.m.	Expected range [ng/ml]	Week of gestation p.m.	Expected range [ng/ml]	Twin pregnancy [ng/ml]
12	0.3 - 1.0	22 - 23	2.7 - 16	3 - 18
13	0.3 - 1.1	24 - 25	2.9 - 17	3 - 20
14	0.4 - 1.6	26 - 27	3.0 - 18	4 - 21
15	1.0 - 4.4	28 - 29	3.2 - 20	4 - 22
16	1.4 - 6.5	30 - 31	3.6 - 22	5 - 25
17	1.5 - 6.6	32 - 33	4.6 - 23	6 - 39
18	1.6 - 8.5	34 - 35	5.1 - 25	7 - 39
19	1.9 - 11	36 - 37	7.2 - 29	9 - 38
20	2.1 - 13	38 - 39	7.8 - 37	13 - 40
21	2.6 - 14	40 - 42	8.0 - 39	---

CLINICAL SIGNIFICANCE

The measurement of Estriol (E3) in body fluids has routinely been used for the monitoring and management of fetal well-being, particularly in the high-risk pregnant patient. The concentration of E3 in plasma increases gradually during the first 20 weeks gestation and more rapidly during the third trimester. Since the ranges for normal and abnormal serum conjugated E3 are wide and overlap considerably, a single E3 determination is of little value. The patient should be monitored frequently to establish any individual trend.

Consistently low levels or a sudden and continual decrease of serum E3 during the third trimester is highly indicative of fetal distress and possibly intrauterine death. When such observations are made, the status of the fetus should be assessed by alternative methods.

Interpretation of serum unconjugated E3 levels should be made in conjunction with other clinical tests or diagnostic procedures such as amniocentesis and ultrasound. Subnormal E3 levels may also be observed in patients being administered certain antibiotics or corticosteroids or in patients with impaired maternal hepatic function.

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 the manufacturer directly.

9. PERFORMANCE CHARACTERISTICS

9.1 Assay Dynamic Range

The range of the assay is between 0.021 ng/ml – 40 ng/ml.

9.2 Specificity of Antibodies (Cross Reactivity)

The following substances were tested for cross reactivity of the assay:

Added steroid	Concentration of steroid	OD 450	Measured concentration
Estriol (E3)	40 ng/ml	0.39	39.67 ng/ml
Testosterone	16 ng/ml	1.758	n.d.
Estradiol (E2)	2 ng/ml	1.579	n.d.
Estrone (E1)	2 ng/ml	1.712	n.d.
Cortisol	800 ng/ml	1.775	n.d.

n.d. = non detectable

9.3 Sensitivity

The analytical sensitivity of the ELISA was calculated by subtracting 2 standard deviations from the mean of 20 replicate analyses of the Standard A and was found to be 0.021 ng/ml.

9.4 Reproducibility

9.4.1 Intra-Assay

The within-assay variability is shown below:

Sample	n	Mean [ng/ml]	CV (%)
1	20	2.1	4.7
2	20	6.2	3.2
3	20	14.6	3.0

9.4.2 Inter-Assay

The between-assay variability is shown below:

Sample	n	Mean [ng/ml]	CV (%)
1	12	2.1	4.6
2	12	5.7	8.5
3	12	13.3	9.5

9.5 Recovery

Recovery of the ELISA was determined by adding increasing amounts of the analyte to three different patient sera containing different amounts of endogenous analyte. Each sample (non-spiked 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
Concentration [ng/ml]	1.3	3.6	7.8
Average Recovery	100.8	101.8	106.9
Range of Recovery [%]	from	89.0	92.3
	to	103.8	109.8

9.6 Linearity

	Sample 1	Sample 2	Sample 3
Concentration [ng/ml]	2.6	7.2	15.6
Average Recovery	98.2	99.7	100.2
Range of Recovery [%]	from	86.3	90.4
	to	107.9	106.8

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

Haemoglobin (up to 4 mg/ml), bilirubin (up to 0.125 mg/ml) and triglyceride (up to 30 mg/ml) have no influence on the assay results.

10.2 Drug Interferences

Until today no substances (drugs) are known to us, which have an influence to the measurement of Estriol in a sample.

10.3 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 the manufacturer.

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.

12. REFERENCES/ LITERATURE

Bashore, R.A., Westlake, J.R. Plasma unconjugated estriol values in high risk pregnancy.
Am. J. Obstet. Gynecol., June 15, 1977, p371-380

Symbols:

	Storage temperature		Manufacturer		Contains sufficient for <n> tests
	Expiry date		Batch code		For in-vitro diagnostic use only!
	Consult instructions for use		Content		CE labelled
	Caution		Catalogue number		

1. ZWECKBESTIMMUNG

Der **Free Estriol ELISA** wird eingesetzt zur quantitativen Bestimmung von freiem Estriol (unkonjugiertem Estriol) in Serum während der zweiten Schwangerschaftshälfte.

Nur für In-vitro Diagnostik.

Dieser Kit ist NICHT für die Risikobewertung von Trisomie 21 vorgesehen.

1.1 Klinische Bedeutung

Estriol bildet den Hauptanteil der durch die fetoplazentale Einheit gebildeten Östrogene. Die Estriolbestimmung dient der Beurteilung der Funktionstüchtigkeit der fetoplazentalen Einheit. Diese kann gestört werden durch eine Verschlechterung der Plazentafunktion oder durch eine Notsituation des Feten. Hauptsymptom einer Funktionseinschränkung der fetoplazentalen Einheit ist die intrauterine Wachstumsretardierung des Feten. Erniedrigte Estriolwerte im Serum oder Urin weisen auf eine intrauterine Wachstumsretardierung hin. Plötzlich abfallende Estriolwerte sind das Symptom einer Notsituation des Feten.

Urin- und Serum-Estriolwerte steigen während der Schwangerschaft exponentiell an, die stärkste Zunahme erfolgt nach der 32. Schwangerschaftswoche. Die Streubreite der Estriolwerte gesunder Schwangerer ist groß, die Werte der einzelnen Schwangeren von Tag zu Tag sind jedoch relativ konstant (Schwankung etwa 20 %).

Estriolwerte im Referenzbereich sprechen mit einer Wahrscheinlichkeit von über 95 % gegen eine Störung der fetoplazentalen Einheit.

Bei einer Risikoschwangerschaft soll etwa ab der 33. Schwangerschaftswoche in ein- bis mehrtägigen Abständen eine Estriolbestimmung erfolgen. Niedrige Werte sprechen bei normalem Aufwärtstrend gegen eine Notsituation des Feten, sind jedoch häufig Anzeichen eines reduzierten fetalen Körpergewichts. Als ungünstig zu beurteilen ist ein Abfallen der Estriolwerte für länger als zwei Tage um 50 % und mehr oder ein Absinken unter die entsprechenden Referenzwertbereiche.

Bei der Interpretation niedriger Estriolwerte müssen sowohl rein fetale Ursachen (anenzephalie Missbildungen, Mongolismus) als auch plazentale Ursachen (Molenschwangerschaft) bedacht werden.

Hohe Estriolwerte werden bei Zwillingsschwangerschaften gemessen.

2. TESTPRINZIP

Der Free Estriol ELISA ist ein Festphasen-Enzymimmunoassay, der auf dem Prinzip der kompetitiven Bindung basiert.

Die Wells der Mikrotiterplatten sind mit einem polyklonalen Antikörper beschichtet, der gegen eine Antikörper-Bindungsstelle des Estriol-Moleküls gerichtet ist.

Die Proben werden in die beschichteten Wells gegeben und zusammen mit einem Estriol-Enzymkonjugat inkubiert. Während der Inkubation konkurriert das Estriol aus der Probe mit dem Estriol-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 Konzentration an freiem Estriol in der Probe. Die Extinktion wird bei 450 nm mit einem Mikrotiterplattenleser gemessen.

3. VORSICHTSMAßNAHMEN

1. Dieser Kit ist nur zum *in vitro* diagnostischen Gebrauch geeignet. Nur für den professionellen Gebrauch.
2. Alle Reagenzien dieses Testkits, die humanes Serum oder Plasma enthalten, wurden durch von der FDA zugelassene Verfahren auf HIV I/II, HBsAg und HCV getestet und als negativ bestätigt. Alle Reagenzien sollten jedoch im Gebrauch und bei der Entsorgung als potentielle biologische Gefahrenstoffe behandelt werden.
3. Vor Beginn des Tests ist die Gebrauchsanweisung vollständig und sorgfältig zu lesen. Verwenden Sie nur die gültige, im Testkit enthaltene, Gebrauchsanweisung. Stellen Sie sicher, dass alles verstanden wurde.
4. Die Mikrotiterplatte besteht aus einzeln herausnehmbaren und abbrechbaren Streifen. Ungenutzte Vertiefungen müssen bei 2 °C bis 8 °C im verschlossenen Folienbeutel gelagert und im mitgelieferten Rahmen verwendet werden.
5. Das Pipettieren der Proben und Reagenzien muss so schnell wie möglich und für jeden Schritt in der gleichen Reihenfolge erfolgen.

6. Behältnisse jeweils nur für ein einziges Reagenz verwenden. Dies gilt insbesondere für die Substrat-Behälter. Die Verwendung eines Behälters zum Pipettieren der Substratlösung, der zuvor für die Konjugatlösung verwendet wurde, kann zu einer Verfärbung der Lösung führen. Gießen Sie keine Reagenzien zurück in die originalen Fläschchen, da es zu einer Kontamination der Reagenzien kommen kann.
7. Mischen Sie den Inhalt der Mikrotiterplatten-Vertiefungen gründlich, um gute Testergebnisse zu gewährleisten. Mikrotiterplatten-Vertiefungen nicht wiederverwenden.
8. Kavitäten während des Assays nicht trocknen lassen; Reagenzien unmittelbar nach Ende des Waschschritts hinzufügen.
9. Lassen Sie die Reagenzien vor Testbeginn Raumtemperatur (20 °C bis 26 °C) erreichen. Die Temperatur wirkt sich auf die Messungen der optischen Dichte des Assays aus. Die Werte für die Patientenproben werden jedoch nicht beeinflusst.
10. Niemals mit dem Mund pipettieren und den Kontakt von Reagenzien und Proben mit Haut und Schleimhäuten vermeiden.
11. In Bereichen, in denen Proben oder Kit-Reagenzien verwendet werden, darf nicht geraucht, gegessen, getrunken oder Kosmetika aufgetragen werden.
12. Beim Umgang mit Proben und Reagenzien Einweg-Latexhandschuhe tragen. Eine mikrobielle Kontamination von Reagenzien oder Proben kann zu falschen Ergebnissen führen.
13. Die Handhabung sollte in Übereinstimmung mit den Verfahren erfolgen, die in einer entsprechenden nationalen Richtlinie oder Vorschrift zur Biogefährdung definiert sind.
14. Reagenzien nicht über das auf den Kit-Etiketten angegebene Verfallsdatum hinaus verwenden.
15. Alle im Kit-Protokoll angegebenen Volumina müssen genau eingehalten werden. Optimale Ergebnisse können nur durch Verwendung kalibrierter Pipetten und Mikrotiterplatten-Lesegeräte erreicht werden.
16. Komponenten aus Kits mit unterschiedlichen Chargennummern dürfen nicht gemischt oder zusammen verwendet werden. Es wird empfohlen, keine Wells von verschiedenen Platten zusammen zu verwenden, auch nicht, wenn es sich um die gleiche Charge handelt. Die Kits können unter unterschiedlichen Bedingungen versandt oder gelagert worden sein, so dass die Bindungscharakteristik der Platten leicht unterschiedlich ausfällt.
17. Kontakt mit der Stopplösung (*Stop Solution*) sollte vermieden werden, da sie 0,5 M H₂SO₄ enthält. Schwefelsäure kann Hautreizungen und Verbrennungen verursachen.
18. Einige Reagenzien enthalten ProClin 300, BND und/oder MIT als Konservierungsmittel. Bei Kontakt mit Augen oder Haut sofort mit Wasser spülen.
19. TMB-Substrat hat eine reizende Wirkung auf Haut und Schleimhäute. Bei möglichem Kontakt Augen mit reichlich Wasser und Haut mit Seife und reichlich Wasser spülen. Kontaminierte Gegenstände vor der Wiederverwendung waschen. Falls eingeatmet, die Person an die frische Luft bringen.
20. Die Reagenzien des Kits sind als gesundheitsgefährdende Abfälle zu betrachten und gemäß den nationalen Vorschriften zu entsorgen.
21. Informationen zu den im Kit enthaltenen gefährlichen Substanzen entnehmen Sie bitte dem Sicherheitsdatenblatt. Sicherheitsdatenblätter für dieses Produkt sind auf Anfrage direkt vom Hersteller erhältlich.

4. BESTANDTEILE DES KITS

4.1 Kitinhalt

FR E-2131

 96

Microtiterwells

Inhalt: 12 x 8 Wells (einzeln brechbar); 96 Wells; mit anti-Estriol-Antikörper (polyklonal) beschichtet

Standards und Controls - gebrauchsfertig

Artikel-nr.	Komponente	Standard	Konzentration	Volumen/ Fläschchen
FR E-2101	 STANDARD A	Standard A	0 ng/ml	1 ml
FR E-2102	 STANDARD B	Standard B	0,3 ng/ml	1 ml
FR E-2103	 STANDARD C	Standard C	1,2 ng/ml	1 ml
FR E-2104	 STANDARD D	Standard D	4 ng/ml	1 ml
FR E-2105	 STANDARD E	Standard E	15 ng/ml	1 ml
FR E-2106	 STANDARD F	Standard F	40 ng/ml	1 ml
FR E-2151	 CONTROL 1	Control 1	Kontrollwerte und -bereiche entnehmen Sie bitte dem Fläschchenetikett oder dem QC-Report	1 ml
FR E-2152	 CONTROL 2	Control 2		1 ml

Enthält quecksilberfreies Konservierungsmittel.

FR E-2140 **CONJUGATE** **Enzyme Conjugate** (Enzymkonjugat) - gebrauchsfertig

Inhalt: Estriol mit Meerrettichperoxidase konjugiert.
Enthält quecksilberfreies Konservierungsmittel.
Volumen: 1 x 14 ml

ME E-0055 **SUBSTRATE** **Substrate Solution** (Substratlösung) - gebrauchsfertig

Inhalt: Substratlösung TMB
Volumen: 1 x 14 ml

FR E-0080 **STOP-SOLN** **Stop Solution** (Stopplösung) - gebrauchsfertig

Inhalt: Enthält 0,5 M H₂SO₄. Kontakt mit der Stopplösung vermeiden! Kann Hautreizungen und Verbrennungen verursachen.
Volumen: 1 x 14 ml
Mögliche Gefahren: 

H290 Kann gegenüber Metallen korrosiv sein.

H314 Verursacht schwere Verätzungen der Haut und schwere Augenschäden.

FR E-0030 **WASH-CONC 40x** **Wash Solution** (Waschlösung) - 40x konzentriert

Volumen: 1 x 30 ml
Siehe „Vorbereitung der Reagenzien“.

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

4.2 Erforderliche aber nicht enthaltene Geräte und Materialien

- Kalibriertes Mikrotiterplattenlesegerät (450 nm, mit Referenzwellenlänge bei 620 nm – 630 nm)
- Kalibrierte variable Präzisions-Mikropipetten
- Saugfähiges Papier
- Destilliertes Wasser
- Laborwecker
- Millimeterpapier oder Software zur Datenauswertung

4.3 Lagerung und Haltbarkeit des Kits

Die ungeöffneten Reagenzien behalten bei Lagerung um 2 °C bis 8 °C ihre Reaktivität bis zum Verfallsdatum. Nach dem Verfallsdatum die Reagenzien nicht mehr verwenden.

Nach dem Öffnen sollten alle Reagenzien bei 2 °C bis 8 °C gelagert werden.

Die Mikrotiterwells sollten bei 2 °C bis 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 *Wash Solution* (30 ml) mit 1170 ml destilliertem Wasser auf ein Gesamtvolumen von 1200 ml verdünnen.

Die verdünnte Waschlösung ist bei Raumtemperatur für 1 Woche 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, Abschnitt 13.

4.6 Beschädigte Testkits

Im Falle einer starken Beschädigung des Testkits oder der Komponenten muss der Hersteller 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

Serum sollte in diesem Test als Probenmaterial eingesetzt werden.

Achtung: Proben, die Natriumazid enthalten, sollten nicht verwendet werden.

Generell sollte die Verwendung von hämolytischen, ikterischen oder lipämischen Proben vermieden werden. Weitere Informationen finden Sie im Kapitel „Interferenzen“.

5.1 Probenentnahme

Serum:

Blut durch Venenpunktion entnehmen (z.B. mit Sarstedt Monovette für Serum), gerinnen lassen und das Serum durch Zentrifugation bei Raumtemperatur abtrennen. Vor der Zentrifugation muss die Gerinnung vollständig abgeschlossen sein. Bei Patienten, die Antikoagulantien erhalten, kann die Gerinnungszeit länger dauern.

5.2 Probenaufbewahrung

Proben sollten stets gut verschlossen sein und können vor Testbeginn bis zu 7 Tage bei 2 °C bis 8 °C gelagert werden.

Für eine längere Aufbewahrung (bis zu 19 Monate) sollten die Proben eingefroren bei -20 °C bis zum Testbeginn gelagert werden. Nur einmal einfrieren. Aufgetaute Proben sollten vor Testbeginn vorsichtig durchmischt werden, ohne Schaumbildung.

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 A* weiter verdünnt und nochmals bestimmt werden. Die Verdünnung muss jedoch bei der Berechnung der Konzentration beachtet werden.

Beispiel:

- a) Verdünnung 1:10: 10 µl Serum + 90 µl *Standard A* (gründlich mischen)
- b) Verdünnung 1:100: 10 µl Verdünnung a) 1:10 + 90 µl *Standard A* (gründlich mischen).

6. TESTDURCHFÜHRUNG

6.1 Allgemeine Hinweise

- Alle Reagenzien und Proben müssen vor Gebrauch auf Raumtemperatur gebracht und gut durchmischt 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 10 µl Standard, Control und Proben mit neuen Plastikspitzen in die entsprechenden Wells geben.
3.	100 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 4-mal mit 400 µl verdünnter <i>Wash Solution</i> waschen, falls ein Waschautomat verwendet wird - oder - Wells 4-mal mit 300 µl verdünnter <i>Wash Solution</i> waschen bei manueller Durchführung. 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 Waschschrittes!
6.	100 µl Substrate Solution in jedes Well geben.
7.	30 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 Mikrotiterplatten-Lesegerät 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 Gebrauchsanweisung angegebenen Werte wurden automatisch mit Hilfe der 4 Parameter-Gleichung bestimmt. (4 Parameter Rodbard oder 4 Parameter Marquardt sind die bevorzugten Methoden.) 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 ELISA gezeigt. Diese Werte sollten **nicht** zur Berechnung von Patientendaten verwendet werden.

Standard	Optische Dichte (450 nm)
Standard A (0,0 ng/ml)	1,79
Standard B (0,3 ng/ml)	1,48
Standard C (1,2 ng/ml)	1,18
Standard D (4,0 ng/ml)	0,81
Standard E (15,0 ng/ml)	0,52
Standard F (40,0 ng/ml)	0,38

7. ERWARTETE WERTE

Es wird empfohlen, dass jedes Labor seine eigenen normalen und abnormalen Werte ermittelt.

7.1 Gesunde Erwachsene

In einer Studie wurden die Proben von gesunden Erwachsenen untersucht. Dabei ergaben sich mit dem Free Estriol ELISA folgende Werte:

Population	n	Mittelwert [ng/ml]	Median [ng/ml]	5. - 95. Perzentile [ng/ml]	2,5. - 97,5. Perzentile [ng/ml]	Bereich (min. - max.) [ng/ml]
Männer	42	0,359	0,367	0,146 - 0,573	0,077 - 0,878	0,075 - 0,987
Frauen (nicht schwanger)	43	0,348	0,286	0,057 - 0,822	0,038 - 1,027	0,009 - 1,307

7.2 Werte in der Schwangerschaft

(p.m. = post menstruationem)

Schwangerschaftswoche p.m.	Erwartete Werte [ng/ml]
12	0,3 - 1,0
13	0,3 - 1,1
14	0,4 - 1,6
15	1,0 - 4,4
16	1,4 - 6,5
17	1,5 - 6,6
18	1,6 - 8,5
19	1,9 - 11
20	2,1 - 13
21	2,6 - 14

Schwangerschaftswoche p.m.	Erwartete Werte [ng/ml]	Zwillings-schwangerschaft [ng/ml]
22 - 23	2,7 - 16	3 - 18
24 - 25	2,9 - 17	3 - 20
26 - 27	3,0 - 18	4 - 21
28 - 29	3,2 - 20	4 - 22
30 - 31	3,6 - 22	5 - 25
32 - 33	4,6 - 23	6 - 39
34 - 35	5,1 - 25	7 - 39
36 - 37	7,2 - 29	9 - 38
38 - 39	7,8 - 37	13 - 40
40 - 42	8,0 - 39	---

ACHTUNG:

Für die klinische Interpretation beachten Sie bitte Kapitel 7. „EXPECTED VALUES“, CLINICAL SIGNIFICANCE in der englischen Version.

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 wird ebenfalls empfohlen, an nationalen oder internationalen Qualitätssicherungs-Programmen teilzunehmen, um die Genauigkeit der Ergebnisse zu sichern.

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 dem Hersteller in Verbindung.

9. ASSAY CHARAKTERISTIKA

9.1 Messbereich

Der Messbereich des Testes liegt zwischen 0,021 ng/ml – 40 ng/ml.

9.2 Spezifität der Antikörper (Kreuzreaktivität)

Die Daten entnehmen Sie bitte der ausführlichen englischen Version der Gebrauchsanweisung.

9.3 Sensitivität

Die analytische Sensitivität, definiert als Mittelwert minus der zweifachen Standardabweichung des *Standards A* ($n = 20$), beträgt 0,021 ng/ml

Die Daten zu:

9.4 Reproduzierbarkeit (Präzision)

9.5 Wiederfindung

9.6 Linearität

entnehmen Sie bitte der ausführlichen englischen Version der Gebrauchsanweisung.

10. GRENZEN DES TESTS

Zuverlässige und reproduzierbare Ergebnisse werden erzielt, wenn das Testverfahren mit vollständigem Verständnis der Anweisungen in der Gebrauchsanleitung und unter Befolgung der GLP (Good Laboratory Practice)-Richtlinien durchgeführt wird.

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

10.1 Interferenzen

Hämoglobin (bis zu 4 mg/ml), Bilirubin (bis zu 0,125 mg/ml) und Triglyceride (bis zu 30 mg/ml) haben keinen Einfluss auf das Testergebnis.

10.2 Beeinflussung durch Medikamente

Uns sind bislang keine Stoffe (Medikamente) bekannt geworden, deren Einnahme die Messung des Gehaltes an freiem Estriol in 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 dem Hersteller 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. REFERENZEN / LITERATUR

Angaben zu den Referenzen entnehmen Sie bitte der ausführlichen englischen Arbeitsanleitung.

Symbole:

	Lagertemperatur		Hersteller		Enthält Testmaterial für <n> Tests
	Verwendbar bis		Chargennummer		In vitro Diagnostikum
	Vor Gebrauch Packungsbeilage lesen		Inhalt		CE gekennzeichnet
	Achtung		Katalog-Nummer		