

Instructions for use / Gebrauchsanweisung**Estrone Saliva ELISA**

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

1. INTRODUCTION

1.1 Intended Use

The **Estrone Saliva ELISA** is an enzyme immunoassay for the quantitative *in vitro diagnostic* measurement of Estrone in saliva.

1.2 Summary and Explanation

Estrone (3-hydroxy-1,3,5 (10)-estratrien-17-one) is beside estradiol and estriol one of the three major naturally occurring estrogens. The estrogens are involved in the development of female sex organs and secondary sex characteristics. Bioassay data indicate that the estrogenic activity of estrone is considerably lower in comparison to estradiol (1). However, the physiological role of endogenous estrone is not well defined. Estrone is produced primarily from androstenedione. In premenopausal women, more than 50% of the estrone is secreted by the ovary. In prepubertal children, men and postmenopausal women, the major portion of estrone is derived from peripheral tissue conversion (2). During the follicular phase of the menstrual cycle the estrone level increases with a clear peak around day 13. The peak is of short duration and by day 16 of the cycle levels will be low again. A second peak during the luteal phase occurs around day 21 of the cycle. If fertilization does not occur production of estrone decreases again. These changes of estrone concentration are in parallel to that of estradiol (3). Until the 4th to 6th week of pregnancy, estrone originates primarily from maternal sources such as the ovaries, adrenals, or peripheral conversion thus remaining within the normal values (4). After week 6 to 10 of pregnancy the values increase gradually due to placental secretion of estrone. After menopause, estrone levels do not decline as dramatically as estradiol levels. In postmenopausal women estrone is the major estrogen. In males the concentration of E1 has been reported to rise up with age inversely to that of 17-OH-progesterone (5). In premenopausal women excessive estrone levels can result from the conversion of large amounts of androstenedione produced in polycystic ovary syndrome (6) and ovarian tumors.

2. PRINCIPLE OF THE TEST

The Estrone Saliva ELISA 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 a unique antigenic site of the estrone molecule.

Endogenous estrone of a patient sample competes with an estrone-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 estrone in the sample.

Having added the substrate solution, the intensity of colour developed is inversely proportional to the concentration of estrone 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 instructions for use 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 – 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 – 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

SA E-7131 **96** **Microtiterwells**
 Content: 12x8 (break apart) strips, 96 wells;
 Wells coated with estrone antibody (polyclonal).

Standards and Controls – ready to use

Cat. no	Component	Standard	Concentration	Volume/Vial
SA E-7101	STANDARD A	Standard A	0 pg/ml	1 ml
SA E-7102	STANDARD B	Standard B	3 pg/ml	1 ml
SA E-7103	STANDARD C	Standard C	12.3 pg/ml	1 ml
SA E-7104	STANDARD D	Standard D	37 pg/ml	1 ml
SA E-7105	STANDARD E	Standard E	111 pg/ml	1 ml
SA E-7106	STANDARD F	Standard F	333 pg/ml	1 ml
SA E-7151	CONTROL 1	Control 1	For control values and ranges please refer to vial label or QC-Datasheet.	1 ml
SA E-7152	CONTROL 2	Control 2		1 ml

The standards are calibrated against the following reference material: *Estrone solution (Certified Reference Material; E-075; Cerilliant)*.

Conversion: pg/ml x 3.69 = pmol/l
 Content: Contain non-mercury preservative.

SA E-7140 **CONJUGATE** **Enzyme Conjugate** – ready to use
 Content: Estrone conjugated to horseradish peroxidase.
 Contains non-mercury preservative.
 Volume: 1 x 14 ml

SA E-0055 **SUBSTRATE** **Substrate Solution** – ready to use
 Content: Tetramethylbenzidine (TMB)
 Volume: 1 x 25 ml

FR E-0080 **STOP-SOLN** **Stop Solution** – ready to use
 Content: 0.5 M H₂SO₄;
 Avoid contact with the stop solution. It may cause skin irritations and burns.
 Volume: 1 x 14 ml

FR E-0030 **WASH-CONC 40x** **Wash Solution** – 40X concentrated
 Volume: 1 x 30 ml
 See "Reagent Preparation".

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

4.2 Materials required but not provided

- A microtiter plate calibrated reader (450 ± 10 nm)
- Calibrated variable precision micropipettes
- Absorbent paper
- Distilled or deionized water
- Timer
- Graph paper or software for data reduction

4.3 Storage Conditions

When stored at 2 °C – 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 – 8 °C. Microtiter wells must be stored at 2 °C – 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 deionized water to the 40X concentrated Wash Solution.

Dilute 30 ml of concentrated *Wash Solution* with 1170 ml deionized 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, section 13.

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

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 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 a suitable collection system.

Due to the cyclic secretion pattern of steroid hormones it is important to care for a proper timing of the sampling.

In order to avoid arbitrary results we recommend that 5 samples always 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.

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

Saliva samples in general are stable at ambient temperature for several days.

Therefore mailing of such samples by ordinary mail without cooling will not create a problem.

The saliva samples may be stored at 2 °C to 8 °C for up to 7 days, but should be stored frozen at -20 °C as soon as possible. Longtime storage at -20 °C is possible for up to 12 months. Repeated thawing and freezing is no problem.

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

Freeze samples over night at -20 °C. Then thaw samples, vortex, centrifuge for 10 minutes at approx. 10,000 × g, and carefully transfer the supernatants to fresh vials.

If a set of multiple samples is to be tested, the lab (after at least one freezing, thawing, and centrifugation cycle) has to mix the 5 single samples in a separate sampling device and perform the testing from this mixture.

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 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 sample + 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.
- 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 Test Procedure

Each run must include a standard curve.

1.	Secure the desired number of Microtiter wells in the frame holder.
2.	Dispense 100 µl of each Standard, Control and samples <u>with new disposable tips</u> into appropriate wells.
3.	Incubate for 30 minutes at room temperature.
4.	Dispense 100 µl Enzyme Conjugate into each well. Thoroughly mix for 10 seconds. It is important to have a complete mixing in this step.
5.	Incubate for 30 minutes at room temperature.
6.	Briskly shake out the contents of the wells. Rinse the wells 5 times with 400 µl diluted <i>Wash Solution</i> per well. 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!
7.	Add 150 µl of Substrate Solution to each well.
8.	Incubate for 15 minutes at room temperature.
9.	Stop the enzymatic reaction by adding 100 µl of Stop Solution to each well.
10.	Determine the absorbance (OD) of each well at 450 ± 10 nm 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 absorbance values for each set of standards, controls and patient samples.
2. Using scale paper or 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 > 333 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 generations at the time of assay.

Standard		Optical Units (450 nm)
Standard A	0.0 pg/ml	2.07
Standard B	3.0 pg/ml	1.81
Standard C	12.3 pg/ml	1.61
Standard D	37.0 pg/ml	1.37
Standard E	111.0 pg/ml	1.04
Standard F	333.0 pg/ml	0.63

7. EXPECTED NORMAL VALUES

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

In a study conducted with apparently healthy individuals, using the Estrone Saliva ELISA the following data were observed:

Population	n	Age (years)	Mean (pg/ml)	Median (pg/ml)	2.5 th – 97.5 th Percentile (pg/ml)	Range (min. – max.) (pg/ml)
Males	50	16 – 57	7.69	6.17	2.09 – 20.43	1.46 – 22.02
Females	50	19 – 58	7.37	5.04	2.61 – 23.03	1.68 – 29.25

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 standard 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 0.12 pg/ml – 333.0 pg/ml.

9.2 Specificity of Antibodies (Cross Reactivity)

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

Compound	Spiked concentration (pg/ml)	% Cross-reactivity
Estrone 3-sulfate	250	52.88
Estradiol	100	8.65
Estriol	1000	0.32
Progesterone	2400	0.08
17-OH Progesterone	1000	0.05
DHEA-S	1000	0.15
Androstenedione	1000	0.09
4-Androstene-3,17-dione	250	1.66
Cortisol	30000	ND
DHEA	1440	ND
Testosterone	1000	ND
Cortisone	250	1.06
Tetrahydrocortisone	1000	0.23
Ethisterone	250	0.32

ND = none detected (< 0.08 pg/ml)

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 0.12 pg/ml.

The Limit of Blank (LoB) is 0.08 pg/ml.

The Limit of Detection (LoD) is 1.073 pg/ml.

The Limit of Quantification (LoQ) is 3.104 pg/ml.

9.4 Reproducibility

9.4.1 Intra Assay

The within assay variability is shown below:

Sample	n	Mean (pg/ml)	CV (%)
1	10	9.28	8.5
2	10	37.85	9.4
3	10	59.17	2.4
4	10	126.80	8.8

9.4.2 Inter Assay

The between assay variability is shown below:

Sample	n	Mean (pg/ml)	CV (%)
1	30	9.64	14.1
2	30	38.57	8.2
3	30	56.58	4.2
4	30	131.11	7.1

9.5 Recovery

Recovery of the ELISA was determined by adding increasing amounts of the analyte to 4 different patient samples containing different amounts of endogenous analyte. Each sample (non-spiked and spiked) were 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	Sample 4
Concentration (pg/ml)	33.60	49.19	107.21	298.68
Average Recovery (%)	97.7	97.2	107.8	96.6
Range of Recovery (%)	from	86.6	86.3	102.9
	to	107.2	110.6	112.2

9.6 Linearity

4 samples containing different amounts of analyte were serially diluted with *Standard A*. The percentage recovery was calculated by comparing the expected and measured values for the analyte.

	Sample 1	Sample 2	Sample 3	Sample 4
Concentration (pg/ml)	66.00	100.00	122.21	174.27
Average Recovery (%)	98.5	96.4	106.7	99.5
Range of Recovery (%)	from	93.9	92.8	97.8
	to	109.1	104.0	113.9

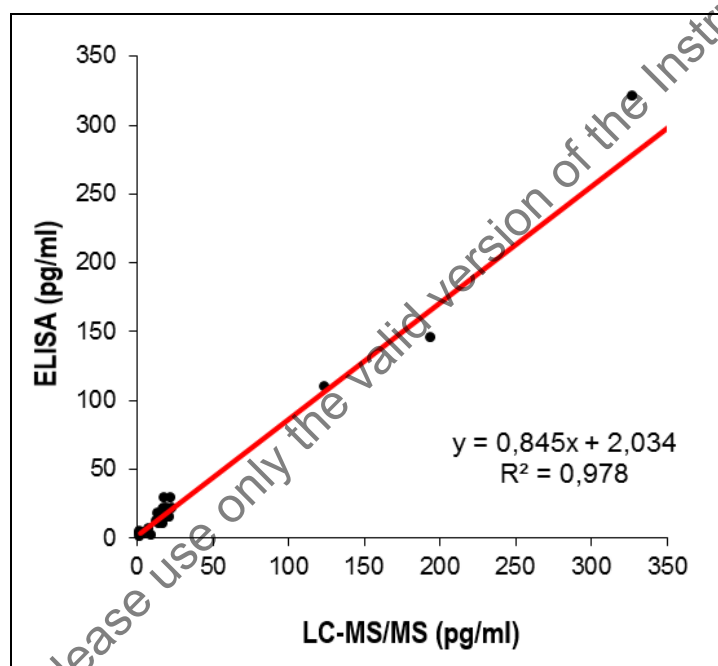
9.7 Comparison Studies

A comparison of Estrone Saliva ELISA (y) and the Reference Method LC-MS/MS (x) using clinical samples gave the following correlation:

$$n = 26$$

$$r = 0.989$$

$$y = 0.845x + 2.034$$



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

Visible blood contamination in saliva samples will affect results.

10.2 Drug Interferences

Until today no substances (drugs) are known to us, which have an influence to the measurement of Estrone 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

1. Resnik R, Killam AP, Battaglia FC et al: The stimulation of uterine blood flow by various estrogens. Endocrinology 94:1192, 1974.

2. Fayman C, Winter JSD, Reyes FI. Patterns of gonadotropins and gonadal steroids throughout life. Clin. Obstet. Gynecol. 3: 467-483, 1976.

4. Baird DT, Fraser IS. Blood production and ovarian secretion rates of estradiol-17β and estrone in women throughout the menstrual cycle. J Clin Endocrinol Metab 38: 1009-1017. 1974

5. Lindbert BS, Johansson EDB, Nilsson BA: Plasma levels of non-conjugated oestrone, oestradiol-17β and oestriol during uncomplicated pregnancy. Acta Obstet Gynecol Scand 32:21, 1974.

6. Drafta D, Schindler AE, Stroe EW, Neacsu E. Age-related changes of plasma steroids in normal adult males. J. Steroid Biochem. 17: 683-687, 1982

7. DeVane GW, Czekala NM, Judd HL, Yen SSC. Circulating gonadotropins, estrogens, and androgens in polycystic ovarian disease. Am J Obstet Gynecol 1975; 121:496.

Symbols:

	Storage temperature		Manufacturer		Contains sufficient for <n> tests
	Use-by date		Batch code		For in-vitro diagnostic use only!
	Consult instructions for use		Content		CE marking of conformity
	Caution		Catalogue number		Distributor
	Date of manufacture				

1. EINLEITUNG

Der **Estrone Saliva ELISA** wird zur quantitativen Bestimmung von Estron in Speichelproben eingesetzt.

Nur für In-vitro Diagnostik.

2. TESTPRINZIP

Der Estrone Saliva 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 definierte Antikörper-Bindungsstelle des Estron-Moleküls gerichtet ist.

Die Proben werden in die beschichteten Wells gegeben und zusammen mit einem Estron-Enzymkonjugat inkubiert. Während der Inkubation konkurriert das Estron aus der Probe mit dem Estron-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 Estron-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, Gebrauchsanweisung verwenden.
- Informationen zu im Kit enthaltenen gefährlichen Substanzen entnehmen Sie bitte dem 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 H₂SO₄ 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 dem Hersteller erhältlich.

4. BESTANDTEILE DES KITS

4.1 Kitinhalt

SA E-7131



Microtiterwells

Inhalt: 96 Wells, 12x8 Wells (einzeln brechbar);
Mit anti-Estron-Antikörper (polyklonal) beschichtet.

Standards und Kontrollen – gebrauchsfertig

Artikelnr.	Komponente	Standard	Konzentration	Volumen/Fläschchen
SA E-7101	STANDARD A	Standard A	0 pg/ml	1 ml
SA E-7102	STANDARD B	Standard B	3 pg/ml	1 ml
SA E-7103	STANDARD C	Standard C	12,3 pg/ml	1 ml
SA E-7104	STANDARD D	Standard D	37 pg/ml	1 ml
SA E-7105	STANDARD E	Standard E	111 pg/ml	1 ml
SA E-7106	STANDARD F	Standard F	333 pg/ml	1 ml
SA E-7151	CONTROL 1	Kontrolle 1	Kontrollwerte und -bereiche entnehmen Sie bitte dem Fläschchenetikett oder dem QC-Datenblatt.	1 ml
SA E-7152	CONTROL 2	Kontrolle 2		1 ml

Die Standards sind gegen das folgende Referenzmaterial kalibriert: *Estrone-Lösung (Certified Reference Material; E-075; Cerilliant)*.

Umrechnungs- pg/ml x 3,69 = pmol/l
faktor:

Inhalt: Enthält quecksilberfreies Konservierungsmittel.

SA E-7140

CONJUGATE

Enzyme Conjugate (Enzymkonjugat) – gebrauchsfertig

Inhalt: Estron mit Meerrettichperoxidase konjugiert;
Enthält quecksilberfreies Konservierungsmittel.

Volumen: 1 x 14 ml

SA E-0055

SUBSTRATE

Substrate Solution (Substratlösung) – gebrauchsfertig

Inhalt: Substratlösung TMB

Volumen: 1 x 25 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

FR E-0030

WASH-CONC 40x

Wash Solution (Waschlösung) – 40X konzentriert

Volumen: 1 x 30 ml

Siehe "Vorbereitung der Reagenzien".

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

4.2 Erforderliche aber nicht enthaltene Geräte und Materialien

- Kalibriertes Mikrotiterplattenlesegerät mit 450 ± 10 nm Filter
- 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 – 8 °C ihre Reaktivität bis zum Verfallsdatum. Nach dem Verfallsdatum die Reagenzien nicht mehr verwenden.

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

Die Mikrotiterwells sollten bei 2 °C – 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 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, 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

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 gespült 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

Speichelproben sollten mit einem geeigneten Entnahmesystem gesammelt werden.

Da die Steroidhormone ein deutliches zyklisches Sekretionsmuster zeigen, ist es wichtig auf den richtigen Zeitpunkt der Probenentnahme zu achten.

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

Speichelproben sind normalerweise bei Raumtemperatur mehrere Tage stabil. Aus diesem Grund stellt das Versenden solcher Proben mit normalem Versand ohne Kühlung kein Problem dar.

Die Proben können bis zu 7 Tage bei 2 °C – 8 °C gelagert werden. Trotzdem sollten Proben so schnell wie möglich bei -20 °C eingefroren werden. Bei -20 °C ist eine Langzeitlagerung bis zu 12 Monaten möglich.

Mehrfaches Auftauen und erneutes Einfrieren ist möglich.

Um Muzine aus der Probe zu entfernen, muss jede Probe mindestens einmal eingefroren, aufgetaut und anschließend zentrifugiert werden.

Frieren Sie die Proben über Nacht bei -20 °C ein. Dann die Proben auftauen, schütteln, 10 Minuten lang bei etwa 10.000 × g zentrifugieren, und den Überstand vorsichtig in neue Fläschchen überführen.

Wird ein solches Set an Mehrfach-Proben getestet (nach mindestens einem Einfrier- Auftau- und Zentrifugations-Zyklus) muss im Labor in einem separaten Probengefäß eine Mischprobe aus Aliquots aller 5 Einzelproben hergestellt werden. Diese Mischprobe wird im Test eingesetzt.

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 Speichelprobe + 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 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 <i>Standard, Kontrolle</i> und <i>Proben</i> mit neuen Plastikspitzen in die entsprechenden Wells geben.
3.	30 Minuten bei Raumtemperatur inkubieren.
4.	100 µl <i>Enzyme Conjugate</i> in jedes Well geben. Für 10 Sekunden gut schütteln. Es ist sehr wichtig, in diesem Schritt eine komplette Durchmischung zu erreichen.
5.	30 Minuten bei Raumtemperatur inkubieren.
6.	Den Inhalt der Wells kräftig ausschütteln. Wells 5-mal mit 400 µl verdünnter <i>Wash Solution</i> 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!
7.	150 µl <i>Substrate Solution</i> in jedes Well geben.
8.	15 Minuten bei Raumtemperatur inkubieren.
9.	Die enzymatische Reaktion durch Zugabe von 100 µl <i>Stop Solution</i> in jedes Well abstoppen.
10.	Die Optische Dichte bei 450 ± 10 nm mit einem Mikrotiterplatten-Lesegerät innerhalb von 10 Minuten nach Zugabe der <i>Stop Solution</i> bestimmen.

6.3 Ergebnisermittlung

1. Die durchschnittlichen Werte der Optischen Dichte (OD) für jedes Set von Standards, Kontrollen 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 pg/ml	2,07
Standard B	3,0 pg/ml	1,81
Standard C	12,3 pg/ml	1,61
Standard D	37,0 pg/ml	1,37
Standard E	111,0 pg/ml	1,04
Standard F	333,0 pg/ml	0,63

7. ERWARTETE WERTE

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

In einer Studie mit dem Estrone Saliva ELISA wurden die Proben von scheinbar gesunden Probanden untersucht. Dabei ergaben sich folgende Werte:

Population	n	Alter (Jahre)	Mittelwert (pg/ml)	Median (pg/ml)	2,5. – 97,5. Perzentile (pg/ml)	Bereich (min. – max.) (pg/ml)
Männer	50	16 – 57	7,69	6,17	2,09 – 20,43	1,46 – 22,02
Frauen	50	19 – 58	7,37	5,04	2,61 – 23,03	1,68 – 29,25

Die mit diesem Testkit erzielten Ergebnisse sollten niemals als alleinige Grundlage für therapeutische Konsequenzen dienen. Die Ergebnisse müssen zusammen mit anderen klinischen Befunden und diagnostischen Tests des Patienten interpretiert werden.

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 0,12 pg/ml – 333,0 pg/ml.

9.2 Spezifität der Antikörper (Kreuzreaktivität)

Die Daten entnehmen Sie bitte der ausführlichen englischen Arbeitsanleitung.

9.3 Sensitivität

Die analytische Sensitivität, definiert als Mittelwert, abzüglich der zweifachen Standardabweichung, des *Standard A* (n = 20), beträgt 0,12 pg/ml.

Der „Limit of Blank“ (LoB) ist 0,08 pg/ml.

Die Nachweisgrenze (LoD) ist 1,073 pg/ml.

Die Quantifizierungsgrenze (LoQ) ist 3,104 pg/ml.

Die Daten zu:

9.4 Reproduzierbarkeit (Präzision)

9.5 Wiederfindung

9.6 Linearität

9.7 Vergleichsstudien

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 Modifikation dieses Tests können die Ergebnisse beeinflussen.

10.1 Interferenzen

Eine sichtbare Kontamination der Speichelprobe mit Blut hat Einfluss auf das Testergebnis.

10.2 Beeinflussung durch Medikamente

Bislang sind uns keine Substanzen (Medikamente) bekannt geworden, die einen Einfluss auf die Bestimmung von Estron in einer Probe haben.

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

1. Resnik R, Killam AP, Battaglia FC et al: The stimulation of uterine blood flow by various estrogens. Endocrinology 94:1192, 1974.

2. Fayman C, Winter JSD, Reyes FI. Patterns of gonadotropins and gonadal steroids throughout life. Clin. Obstet. Gynecol. 3: 467-483, 1976.

4. Baird DT. Fraser IS. Blood production and ovarian secretion rates of estradiol-17 β and estrone in women throughout the menstrual cycle. J Clin Endocrinol. Metab 38: 1009-1017. 1974

5. Lindbert BS, Johansson EDB, Nilsson BA: Plasma levels of non-conjugated oestrone, oestradiol-17 β and oestriol during uncomplicated pregnancy. Acta Obstet Gynecol Scand 32:21, 1974.

6. Drafta D, Schindler AE, Stroe EW, Neacsu E. Age-related changes of plasma steroids in normal adult males. J. Steroid Biochem. 17: 683-687, 1982.

7. DeVane GW, Czekala NM, Judd HL, Yen SSC. Circulating gonadotropins, estrogens, and androgens in polycystic ovarian disease. Am J Obstet Gynecol 1975; 121:496.

Symbole:

	Lagertemperatur		Hersteller		Enthält Testmaterial für <n> Teste
	Verwendbar bis		Chargennummer		In vitro Diagnostikum
	Gebrauchsanweisung beachten		Inhalt		CE-Kennzeichnung
	Achtung		Katalognummer		Vertriebspartner
	Herstellungsdatum				