




Instructions for Use

Salivary Free Estriol ELISA

IVD



REF SLV-3653

 96



DRG 

DRG Instruments GmbH, Germany
Frauenbergstraße. 18, 35039 Marburg
Phone: +49 (0)6421-1700 0, Fax: +49 (0)6421-1700 50
Website: www.drg-diagnostics.de
E-mail: drg@drg-diagnostics.de

Distributed by:

DRG 

DRG International, Inc., USA
841 Mountain Ave., Springfield, NJ 07081
Phone: (973) 564-7555, Fax: (973) 564-7556
Website: www.drg-international.com
E-mail: corp@drg-international.com

**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	INTENDED USE.....	2
2	PRINCIPLE	2
3	REAGENTS, MATERIALS AND INSTRUMENTATION	2
4	WARNINGS	3
5	PRECAUTIONS	3
6	PROCEDURE	4
7	QUALITY CONTROL	6
8	RESULTS.....	6
9	REFERENCE VALUES	6
10	PERFORMANCE AND CHARACTERISTICS	7
11	WASTE MANAGEMENT.....	7
12	BIBLIOGRAPHY.....	7
1	VERWENDUNGSZWECK.....	8
2	TESTPRINZIP	8
3	REAGENZIEEN, MATERIALIEN UND GERÄTEAUSSTATTUNG	8
4	WARNHINWEISE.....	9
5	VORSICHTSMASSNAHMEN.....	9
6	TESTDURCHFÜHRUNG	10
7	QUALITÄTSKONTROLLE.....	12
8	ERGEBNISSE	12
9	REFERENZWERTE	12
10	TESTCHARAKTERISTIKA.....	13
11	ENTSORGUNG.....	13
12	LITERATUR	13
	SYMBOLS USED	14

1 INTENDED USE

Competitive immunoenzymatic colorimetric method for quantitative determination of Estriol concentration in saliva. Salivary Free Estriol ELISA is intended for laboratory use only.

1.1 Clinical Significance

Estriol (also Oestriol) is one of the three main estrogens produced by the human body. It is only produced in significant amounts during pregnancy as it is made by the fetus. During pregnancy the production of estriol depends on an intact maternal-placental-fetal unit. Fetal-placental production of estriol leads to a progressive rise in maternal circulating levels reaching a late-gestational peak several orders of magnitude greater than non-pregnant levels. In the maternal circulation, estriol undergoes a rapid conjugation in the liver followed by urinary excretion with a half-life of about 20 minutes. Since normal estriol production depends on an intact maternal-placental-fetal circulation and functional fetal metabolism, maternal estriol levels have been used to monitor fetal status during pregnancy, particularly during the third trimester. DHEA-S is produced by the adrenal cortex of the fetus, this is converted to estriol by the placenta. If levels are abnormally low in a pregnant woman, this may indicate a problem with the development in the child.

Levels of estriol in non-pregnant women do not change much after menopause, and levels are not significantly different from levels in men.

2 PRINCIPLE

The Estriol (antigen) in the sample competes with the antigenic Estriol conjugated with horseradish peroxidase (HRP) for binding to the limited number of antibodies anti Estriol coated on the microplate (solid phase).

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

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

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

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

3 REAGENTS, MATERIALS AND INSTRUMENTATION

3.1 Reagents and materials supplied in the kit

1. **Standard**, (6 vials, 1 mL each)
S0 - S5
2. **Control** (2 vial, 1 mL each)
Control L
Control M
3. **Incubation Buffer**, (1 vial, 30 mL)
Phosphate buffer pH 7.5, BSA 1 g/L
4. **Enzyme Conjugate concentrate**, (1 vial, 1 mL)
Estriol conjugated to horseradish peroxidase (HRP),
5. **Microtiterwells**, (1 microplate breakable)
Anti-estriol antibody adsorbed on microplate
6. **Substrate Solution**, (1 vial, 15 mL)
 H_2O_2 -TMB 0.26 g/L (avoid any skin contact)
7. **Stop Solution**, (1 vial, 15 mL);
Sulphuric acid 0.15 M (avoid any skin contact)
8. **Wash Solution**, (1 vial, 20 mL) (50X concentrated);
NaCl 45 g/L; Tween-20 55 g/L

3.2 Reagents necessary not supplied

Distilled water

3.3 Auxiliary materials and instrumentation

Automatic dispenser

Microplate reader (450 nm, 620-630 nm)

Saliva Collection Device (e.g. DRG SALI-TUBES (SLV-4158))

Note

Store all reagents at 2 °C - 8 °C in the dark.

Open the bag of reagent 5 (Coated Microplate) only when it is at room temperature and close it immediately after use.

Once opened, the microplate is stable until the expiry date of the kit. Do not remove the adhesive sheets on the unused strips

4 WARNINGS

- This kit is intended for in vitro use by professional persons only. Not for internal or external use in Humans or Animals.
- Use appropriate personal protective equipment while working with the reagents provided.
- Follow Good Laboratory Practice (GLP) for handling blood products.
- Some reagents contain small amounts of Proclin 300 as preservative. Avoid the contact with skin or mucosa.
- The TMB Substrate contains an irritant, which may be harmful if inhaled, ingested or absorbed through the skin. To prevent injury, avoid inhalation, ingestion or contact with skin and eyes.
- The Stop Solution consists of a diluted sulphuric acid solution. Sulphuric acid is poisonous and corrosive and can be toxic if ingested. To prevent chemical burns, avoid contact with skin and eyes.
- Avoid the exposure of reagent TMB/H₂O₂ to directed sunlight, metals or oxidants. Do not freeze the solution.
- This method allows the determination of Estriol from 2.5 pg/mL to 4000 pg/mL.
- The clinical significance of Estriol determination can be invalidated if the patient was treated with natural or synthetic steroids.

5 PRECAUTIONS

- Please adhere strictly to the sequence of pipetting steps provided in this protocol. The performance data represented here were obtained using specific reagents listed in this Instruction For Use.
- All reagents should be stored refrigerated at 2 °C - 8 °C in their original container. Any exceptions are clearly indicated. The reagents are stable until the expiry date when stored and handled as indicated.
- Allow all kit components and specimens to reach room temperature (22 °C - 28 °C) and mix well prior to use.
- Do not interchange kit components from different lots. The expiry date printed on box and vials labels must be observed. Do not use any kit component beyond their expiry date.
- If you use automated equipment, the user has the responsibility to make sure that the kit has been appropriately tested.
- The incomplete or inaccurate liquid removal from the wells could influence the assay precision and/or increase the background.
To improve the performance of the kit on automatic systems is recommended to increase the number of washes.
- It is important that the time of reaction in each well is held constant for reproducible results. Pipetting of samples should not extend beyond ten minutes to avoid assay drift. If more than 10 minutes are needed, follow the same order of dispensation. If more than one plate is used, it is recommended to repeat the dose response curve in each plate
- Addition of the TMB Substrate solution initiates a kinetic reaction, which is terminated by the addition of the Stop Solution. Therefore, the TMB Substrate and the Stop Solution should be added in the same sequence to eliminate any time deviation during the reaction.
- Observe the guidelines for performing quality control in medical laboratories by assaying controls and/or pooled sera.
- Maximum precision is required for reconstitution and dispensation of the reagents.
- Samples microbiologically contaminated, highly lipemic or haemolysed should not be used in the assay.
- Plate readers measure vertically. Do not touch the bottom of the wells.

6 PROCEDURE

6.1 Preparation of Standards (S0 - S5)

Before using, mix for 5 min with a rotating mixer.

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

	S0	S1	S2	S3	S4	S5
pg/mL	0	2,5	15	100	600	4000

Once opened, the Calibrators are stable at 2 °C - 8 °C for 6 months.

For SI UNITS: pg/mL x 3.5 = pmol/L

6.2 Preparation of the Wash solution

Dilute the contents of each vial of the buffered wash solution concentrate (50x) with distilled water to a final volume of 1000 ml prior to use.

For smaller volumes respect the 1:50 dilution ratio.

The diluted wash solution is stable for 30 days at 2 °C - 8 °C.

6.3 Preparation of Diluted Conjugate

Prepare immediately before use.

Add 10 µL Conjugate (reagent 4) to 1.0 mL of Incubation Buffer (reagent 3). Mix gently.

Stable 3 hours at room temperature (22 °C - 28 °C).

6.4 Preparation of the Sample

The determination of Estriol with this kit should be performed in saliva samples.

It is recommended to collect saliva samples with a centrifuge glass tube and a plastic straw or with DRG Saliva Collection Device, e.g. SALI TUBES 100, (Ref. SLV-4158).

Other commercially available sample collector devices have not been tested.

6.4.1 Method and Limitations

Collect saliva samples at the times indicated. In order to have high reproducibility and accuracy, it is advisable to collect at least 3 samples in a period of not less than 2 hours and pooling the samples before testing.

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

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

6.4.2 Saliva Processing Instructions with glass tubes

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

6.5 Procedure

Allow all reagents to reach room temperature (22 °C - 28 °C). At the end of the assay, store immediately the reagents at 2 °C - 8 °C: avoid long exposure to room temperature.

Unused coated microwell strips should be released securely in the foil pouch containing desiccant and stored at 2 °C - 8 °C.

To avoid potential microbial and/or chemical contamination, unused reagents should never be transferred into the original vials.

As it is necessary to perform the determination in duplicate in order to improve accuracy of the test results, prepare two wells for each point of the standard curve (S0-S5), two for each Control, two for each sample, one for Blank.

Reagent	Calibrator	Sample/ Controls	Blank
Calibrator S0 - S5	50 µL		
Sample/Control L-M		50 µL	
Diluted Conjugate	100 µL	100 µL	
<p>Incubate 1 h at room temperature (22 °C - 28 °C). Remove the contents from each well; wash the wells 3 times with 300 µL of diluted wash solution.</p> <p>Important note: during each washing step, gently shake the plate for 5 seconds and remove excess solution by tapping the inverted plate on an absorbent paper towel.</p> <p>Automatic washer: if you use automated equipment, wash the wells at least 5 times</p>			
TMB Substrate	100 µL	100 µL	100 µL
<p>Incubate at room temperature (22±28°C) for 15 minutes in the dark.</p>			
Stop Solution	100 µL	100 µL	100 µL
<p>Shake the microplate gently. Read the absorbance (E) at 450 nm against a reference wavelength of 620-630 nm or against Blank within 5 minutes.</p>			

7 QUALITY CONTROL

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

8 RESULTS

8.1 Mean Absorbance

Calculate the mean of the absorbance (E_m) for each point of the standard curve (S0-S5) and of each sample.

8.2 Calibration curve

Plot the mean value of absorbance (E_m) of the Calibrators (S0-S5) against concentration. Draw the best-fit curve through the plotted points. (e.g.: Four Parameter Logistic).

8.3 Calculation of Results

Interpolate the values of the samples on the Calibration curve to obtain the corresponding values of the concentrations expressed in pg/mL.

9 REFERENCE VALUES

As the Estriol Saliva values follow a circadian pattern we suggest to collect the samples at the same time (8 A.M.).

The following values should be used as preliminary guide until each laboratory has got his own reference range.

Group	Time	N	Range +/- SD's (pg/mL)	Absolute Range (pg/mL)
Women	8 AM	21	0 - 21.0	0 - 32.0
Premenopausal	5 AM	21	0 - 6.8	0 - 8.9
Pregnancy weeks		Saliva (pg/mL)		
22°		(700 ± 500)		
24°		(900 ± 600)		
26°		(1200 ± 700)		
28°		(1500 ± 800)		
30°		(1800 ± 800)		
32°		(2200 ± 1100)		
34°		(3200 ± 1300)		
36°		(4100 ± 1600)		
37°		(4500 ± 1700)		
38°		(5000 ± 2000)		
39°		(5300 ± 2000)		
40°		(5700 ± 2000)		

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

10 PERFORMANCE AND CHARACTERISTICS

10.1 Precision

Intra Assay Variation

Within run variation was determined by replicate (16x) the measurement of two different saliva control in one assay. The within assay variability is $\leq 9.7\%$.

Inter Assay Variation

Between run variation was determined by replicate (10x) the measurement of two different saliva control with different lots of kit. The between assay variability is $\leq 13.7\%$.

10.2 Accuracy

The recovery of 50 – 300 – 2000 pg/mL of Estriol added to “saliva-free” sample gave an average value (\pm SD) of 100.6% \pm 14.6% with reference to the original concentrations.

10.3 Sensitivity

The lowest detectable concentration of Estriol that can be distinguished from the Calibrator 0 is 1.0 pg/mL at the 95 % confidence limit.

10.4 Specificity

The cross reaction of the antibody calculated at 50% according to Abraham are shown in the table:

Estriol saliva	100 %
16 epi-estriol	10.5 %
15 α -OH-estriol	7.0 %
Estriol 3-Sulfate	2.0 %
Estradiol	0.1 %
17 epi-estriol	$< 1 \times 10^{-2} \%$
Estriol 3 α -Glucoronide	$< 1 \times 10^{-2} \%$
Estriol 16 α -Glucoronide	$< 1 \times 10^{-2} \%$
Prednisone	$< 1 \times 10^{-2} \%$
Estrone	$< 1 \times 10^{-4} \%$

10.5 Correlation

Salivary Free Estriol ELISA (SLV-3653) was compared to another commercially available Estriol saliva assay. 30 saliva samples were analysed according to both test systems. The linear regression curve was calculated:

$$y = 1.03 x + 0.68$$

$$r^2 = 0.988$$

$$y = \text{Estriol saliva SLV-3653}$$

$$x = \text{Estriol saliva Salimetrics ELISA kit}$$

11 WASTE MANAGEMENT

Reagents must be disposed off in accordance with local regulations.

12 BIBLIOGRAPHY

1. Fisher-Rasmussen, W., et al Acta Obstet. Gynecol Scand 60: 417 -420 (1981)
2. Truran, P. L., et al Clin. Chem. 28/12, 2393 (1982)
3. Vining, R. F., et al J.Clin.Endoc.Metab. 56, 454 (1983)
4. Bagger, P. V., et al Acta Obstet Gynecol Scand 60: 187 (1981)
5. Osterman, T. M., et al Clin. Chem. 25 (5) 716 (1979)
6. Wisdom, G.B. Clin Chem. 22 (8) 1243-1255 (1976)

1 VERWENDUNGSZWECK

Kompetitives immunenzymatisches kolorimetrisches Verfahren zur quantitativen Bestimmung der Estriol-Konzentration im Speichel.

Der Salivary Free Estriol ELISA ist nur für Laborzwecke bestimmt.

1.1 Klinische Bedeutung

Estriol (auch Östriol) ist eines der drei wichtigsten Östrogene, die im menschlichen Körper gebildet werden. Nur während der Schwangerschaft wird es in größeren Mengen produziert, da es vom Fetus gebildet wird. Die Produktion von Estriol in der Schwangerschaft ist von einer intakten *funktionellen Einheit von Uterus, Fetus und Plazenta* (fetoplazentomaternalen *Einheit*) *abhängig*. Aufgrund der fetoplazentaren Produktion steigt der Estriolspiegel im mütterlichen Blutkreislauf zunehmend an und erreicht gegen Ende der Schwangerschaft Spitzenkonzentrationen, die mehrere Größenordnungen über den Spiegeln bei nicht schwangeren Frauen liegen. Im mütterlichen Blutkreislauf werden in der Leber schnell Estriolkonjugate gebildet, die mit einer Halbwertszeit von ungefähr 20 Minuten mit dem Urin ausgeschieden werden. Da die normale Estriolbildung von einem intakten fetoplazentomaternalen Blutkreislauf und einem funktionierenden Stoffwechsel des Fetus abhängt, werden die mütterlichen Estriolspiegel verwendet, um den Zustand des Fetus während der Schwangerschaft und insbesondere im dritten Trimester zu überwachen. DHEAS wird in der Nebennierenrinde des Fetus gebildet und in der Plazenta zu Estriol umgewandelt. Wenn der Blutspiegel bei einer schwangeren Frau ungewöhnlich niedrig ist, kann das auf Probleme bei der Entwicklung des Kindes hindeuten.

Die Blutspiegel bei nicht schwangeren Frauen verändern sich nach der Menopause kaum, und die Werte unterscheiden sich nicht wesentlich von denen bei Männern.

2 TESTPRINZIP

Das Estriol (Antigen) in der Probe konkurriert mit an Meerrettich-Peroxidase (HRP) gebundenem Estriol-Antigen um die Anlagerung an eine begrenzte Anzahl von Anti-Estriol-Antikörpern auf der Mikrotiterplatte (feste Phase).

Nach der Inkubation werden gebundenes und freies Antigen durch einfach durchzuführendes Waschen der festen Phase getrennt. Dann reagiert das Enzym HRP in der gebundenen Fraktion mit dem Substrat (H_2O_2) und dem TMB-Substrat und entwickelt eine blaue Färbung, die sich nach gelb verändert, wenn die Stopplösung (H_2SO_4) hinzugefügt wird.

Die Intensität der Färbung ist umgekehrt proportional zur Estriol-Konzentration in der Probe.

Die Estriol-Konzentration in der Probe wird mit einer Kalibrierungskurve berechnet.

3 REAGENZIEN, MATERIALIEN UND GERÄTEAUSSTATTUNG

3.1 Im Testkit enthaltene Reagenzien und Materialien

1. **Standard (Standard)** S0 - S5 (6 Fläschchen, jeweils 1 mL)
2. **Control (Kontrolle)** (2 Fläschchen, jeweils 1 mL)
Control L
Control M
3. **Incubation Buffer (Inkubationspuffer)** (1 Fläschchen, 30 mL)
Phosphatpuffer pH 7,5, BSA 1 g/L
4. **Enzyme Conjugate concentrate (Enzymkonjugatkonzentrat)** (1 Fläschchen, 1 mL)
Estriol konjugiert mit Meerrettich-Peroxidase (HRP)
5. **Microtiterwells** (1 Mikrotiterplatte zum Auseinanderbrechen)
Anti-Estriol-Antikörper an die Mikrotiterplatte gebunden
6. **Substrate Solution (Substratlösung)** (1 Fläschchen, 15 mL)
 H_2O_2 -TMB 0,26 g/L (Hautkontakt vermeiden)
7. **Stop Solution (Stopplösung)** (1 Fläschchen, 15 mL)
Schwefelsäure 0,15 M (Hautkontakt vermeiden)
8. **Wash Solution (Waschlösung)** (1 Fläschchen, 20 mL) (50-fach konzentriert)
NaCl 45 g/L; Tween 20 55 g/L

3.2 Nicht im Testkit enthaltene erforderliche Reagenzien

Destilliertes Wasser

3.3 Erforderliche Hilfsmittel und Geräteausstattung

Pipetten

Mikrotiterplatten-Lesegerät (450 nm, 620-630 nm)

Sammelgefäß für Speichelproben (z.B. DRG SALI-TUBES (SLV-4158))

Wichtige Hinweise

Alle Testkit-Reagenzien bei 2 °C - 8 °C im Dunkeln lagern.

Den Beutel mit Reagenz 5 (Beschichtete Mikrotiterplatte) erst öffnen, wenn er Raumtemperatur angenommen hat und sofort nach Gebrauch wieder verschließen.

Geöffnet ist die Mikrotiterplatte bis zum Ablauf des Verfalldatums des Testkits haltbar. Klebestreifen auf unbenutzten Streifen nicht entfernen.

4 WARNHINWEISE

- Dieses Testkit ist nur für In-vitro-Diagnostik zur Anwendung durch Fachpersonal bestimmt. Nicht zur inneren oder äußeren Anwendung bei Mensch oder Tier geeignet.
- Beim Arbeiten mit den enthaltenen Reagenzien geeignete persönliche Schutzausrüstung verwenden.
- Beim Arbeiten mit Blutprodukten die GLP- („Good laboratory practice“) Richtlinien befolgen.
- Manche Reagenzien enthalten kleine Mengen an Proclin 300 als Konservierungsmittel. Kontakt mit der Haut oder Schleimhaut vermeiden.
- Das TMB-Substrat enthält eine reizende Substanz, die beim Einatmen, Verschlucken oder der Aufnahme über die Haut gesundheitsschädlich sein kann. Um eine Schädigung zu verhindern, Einatmen, Verschlucken oder Kontakt mit der Haut oder den Augen vermeiden.
- Die Stopplösung besteht aus verdünnter Schwefelsäure. Schwefelsäure ist giftig und ätzend und kann bei Einnahme toxisch sein. Um Verätzungen zu verhindern, Kontakt mit der Haut oder den Augen vermeiden.
- Reagenz TMB/H₂O₂ keinem direkten Sonnenlicht, Metallen oder Oxidationsmitteln aussetzen. Die Lösung nicht einfrieren.
- Mit diesem Verfahren können Estriolkonzentrationen von 2,5 pg/mL bis 4000 pg/mL bestimmt werden.
- Die Estriol-Bestimmung hat möglicherweise keine klinische Aussagekraft, wenn der Patient mit natürlichen bzw. synthetischen Steroiden behandelt wurde.

5 VORSICHTSMASSNAHMEN

- Die Reihenfolge der Pipettierschritte muss genau wie in dieser Anleitung angegeben eingehalten werden. Die hier dargestellten Daten zur Performance wurden unter Verwendung der in dieser Gebrauchsanweisung genannten spezifischen Reagenzien ermittelt.
- Alle Reagenzien im Originalbehälter kühl bei 2 °C - 8 °C lagern. Ausnahmen werden deutlich gekennzeichnet. Bei sachgemäßer Lagerung und Verwendung sind die Reagenzien bis zum Verfalldatum haltbar.
- Vor der Verwendung müssen alle Testkit-Komponenten und Proben Raumtemperatur (22 °C - 28 °C) annehmen und gut gemischt werden.
- Die Testkit-Komponenten zwischen unterschiedlichen Chargen nicht austauschen. Das auf dem Karton und den Fläschchen aufgedruckte Verfalldatum muss eingehalten werden. Die Testkit-Komponenten nach Ablauf ihres Verfalldatums nicht mehr verwenden.
- Wenn Sie automatische Geräte verwenden, unterliegt es Ihrer Verantwortung zu überprüfen, ob die Tests mit dem Kit ordnungsgemäß durchgeführt wurden.
- Unvollständige oder ungenaue Entfernung der Flüssigkeit aus den Vertiefungen kann die Testpräzision beeinträchtigen und/oder den Hintergrund verstärken.
Bei Verwendung von automatischen Systemen wird empfohlen die Anzahl der Waschschriffe zu erhöhen, um die Test-Performance zu verbessern.
- Die Reaktionszeit muss für alle Vertiefungen konstant gehalten werden, damit die Ergebnisse reproduzierbar sind. Das Pipettieren der Proben sollte nicht länger als 10 Minuten dauern, um Testabweichungen zu vermeiden. Falls mehr als 10 Minuten benötigt werden, muss die Reihenfolge des Pipettierens eingehalten werden. Bei Verwendung von mehreren Platten wird empfohlen, die Dosis-Wirkungs-Kurve für jede Platte zu wiederholen.
- Durch die Zugabe der TMB-Substratlösung wird eine kinetische Reaktion gestartet, die durch das Hinzufügen der Stopplösung beendet wird. Deshalb müssen die TMB-Substrat- und die Stopplösung jeweils in derselben Reihenfolge pipettiert werden, um Zeitabweichungen während der Reaktion zu vermeiden.
- Die Richtlinien zur Qualitätskontrolle im medizinischen Labor müssen befolgt werden, indem Kontrollen und/oder vereinigte Serumproben mit untersucht werden.
- Beim Lösen und Pipettieren der Reagenzien ist größte Genauigkeit erforderlich.
- Mikrobiell kontaminierte, stark lipämische oder hämolysierte Proben nicht im Test verwenden.
- Mikrotiterplatten-Lesegeräte lesen vertikal ab. Nicht die Unterseite der Vertiefungen berühren.

6 TESTDURCHFÜHRUNG

6.1 Vorbereitung der Standards (S0 – S5)

Vor der Verwendung 5 min mit einem rotierenden Schüttelgerät mischen.

Die Kalibratoren sind gebrauchsfertig und haben die folgenden Estriol-Konzentrationen:

	S0	S1	S2	S3	S4	S5
pg/mL	0	2,5	15	100	600	4000

Nach dem Öffnen sind die Kalibratoren 6 Monate bei 2 °C - 8 °C haltbar.

Umrechnung in SI-Einheiten: pg/mL x 3,5 = pmol/L

6.2 Vorbereitung der Waschlösung

Der Inhalt jeder Flasche der gepufferten konzentrierten Waschlösung (50x) muss vor der Verwendung mit destilliertem Wasser auf ein Endvolumen von 1000 mL aufgefüllt werden.

Bei kleineren Volumina entsprechend im Verhältnis 1:50 verdünnen.

Die verdünnte Waschlösung ist 30 Tage bei 2 °C - 8 °C haltbar.

6.3 Herstellung des verdünnten Konjugats

Erst direkt vor der Verwendung herstellen.

10 µL Konjugat (Reagenz 4) zu 1,0 mL Inkubationspuffer (Reagenz 3) hinzufügen. Vorsichtig mischen.

3 Stunden bei Raumtemperatur (22 °C - 28 °C) haltbar.

6.4 Sammlung von Speichelproben

Mit diesem Testkit wird die Estriolkonzentration in Speichelproben bestimmt.

Es wird empfohlen, Speichelproben mit einem Zentrifugenröhrchen aus Glas und einem Kunststoff-Trinkhalm oder mit einem DRG Speichelsammelgefäß, z.B. SALI TUBES 100 (Ref. SLV-4158) zu sammeln.

Andere kommerziell erhältliche Probensammelgefäße wurden nicht getestet.

6.4.1 Verfahren und Bedingungen für die Probensammlung

Speichelproben zu den angegebenen Zeiten sammeln. Um hohe Reproduzierbarkeit und Genauigkeit zu erreichen, sollten mindestens 3 Proben in einem Zeitraum von nicht weniger als 2 Stunden gesammelt und vor dem Testen vereinigt werden.

Wenn keine besonderen Anweisungen gegeben sind, können die Speichelproben jederzeit gesammelt werden; dabei bitte Folgendes beachten:

- Wenn der Speichel morgens gesammelt wird, soll dies vor dem Zähneputzen durchgeführt werden.
- Tagsüber vor dem Sammeln von Speichelproben 1 Stunde lang nichts essen oder trinken, keine Medikamente einnehmen und nicht Zähne putzen.
- Es ist sehr wichtig, eine gute klare Probe zu erhalten, d.h. sie darf nicht mit Essen, Lippenstift, Blut (Zahnfleischbluten) oder anderen fremden Materialien verunreinigt sein.

6.4.2 Vorbereitung der Speichelproben in Glasröhrchen

- Den Speichel durch den Halm in das Zentrifugenröhrchen aus Glas fließen lassen.
- Die Probe 15 Minuten bei 3000 rpm zentrifugieren.
- Mindestens 1 Stunde bei -20 °C einfrieren.
- Die Probe nochmals 15 Minuten bei 3000 rpm zentrifugieren.
- Die Speichelprobe ist nun testbereit.
- Die Probe kann eine Woche lang bei 2 °C - 8 °C oder bei -20 °C für längere Zeit gelagert werden.

6.5 Test-Verfahrensweise

Alle Reagenzien müssen vor Gebrauch Raumtemperatur annehmen (22 °C - 28 °C). Am Ende der Testdurchführung die Reagenzien sofort wieder bei 2 °C - 8 °C lagern, längere Zeiten bei Raumtemperatur möglichst vermeiden.

Nicht verwendete beschichtete Mikrotiter-Streifen müssen wieder zusammen mit dem beigefügten Trockenmittel in den Folienbeutel zurückgelegt werden, der Beutel muss fest verschlossen und bei 2 °C - 8 °C gelagert werden.

Damit keine mikrobielle oder chemische Kontamination auftreten kann, nicht verwendete Chemikalien nicht wieder in das Originalfläschchen zurückfüllen.

Da der Test zur Erhöhung der Genauigkeit der Testergebnisse als Doppelbestimmung durchgeführt wird, für jeden Punkt der Standardkurve (S0-S5) zwei Vertiefungen, für jede Kontrolle und jede Probe ebenfalls zwei Vertiefungen und für den Nullwert eine Vertiefung vorbereiten.

Reagenz	Kalibrator	Probe / Kontrollen	Nullwert
Kalibrator S0 - S5	50 µL		
Probe / Kontrolle L-M		50 µL	
Verdünntes Konjugat	100 µL	100 µL	
1 Stunde bei Raumtemperatur (22 °C - 28 °C) inkubieren. Inhalt der Vertiefungen entfernen; die Vertiefungen dreimal mit 300 µL verdünnter Waschlösung waschen. Wichtiger Hinweis: bei jedem Waschschrift die Platte 5 Sekunden vorsichtig schütteln. Überschüssige Flüssigkeit durch Aufschlagen der umgedrehten Platte auf saugfähigem Papier entfernen. Waschautomat: Bei Verwendung eines Waschautomaten die Vertiefungen mindestens 5-mal waschen.			
TMB-Substrat	100 µL	100 µL	100 µL
15 Minuten im Dunkeln bei Raumtemperatur (22 °C - 28 °C) inkubieren.			
Stopplösung	100 µL	100 µL	100 µL
Die Mikrotiterplatte vorsichtig schütteln. Die Extinktion (E) innerhalb von 5 min bei 450 nm gegen die Referenzwellenlänge von 620 - 630 nm oder gegen den Nullwert messen.			

7 QUALITÄTSKONTROLLE

Jedes Labor sollte zur Überprüfung der Test-Performance Kontrollen mit normalen, hohen und niedrigen Estriol-Spiegeln testen. Diese Kontrollen sollten wie unbekannte Proben behandelt und die Werte in jedem durchgeführten Testlauf bestimmt werden. Die Aufzeichnungen der Qualitätskontrolle sollten aufbewahrt werden, um die Performance der Testkit-Reagenzien verfolgen zu können. Angemessene statistische Methoden sollten zur Ermittlung von Trends angewendet werden. Jedes Labor sollte Grenzwerte für eine ausreichende Test-Performance festlegen. Die Achsenabschnitte der Kalibrierungskurve bei 80 %, 50 % und 20 % sollten zur Überprüfung der Reproduzierbarkeit zwischen den verschiedenen Durchläufen als weitere Parameter ebenfalls überwacht werden. Außerdem sollte die maximale Extinktion mit den bisher gesammelten Werten übereinstimmen. Treten deutliche Abweichungen gegenüber der bisherigen Performance auf, so kann das auf unbemerkte Änderungen der Testbedingungen oder verdorbene Testkit-Reagenzien hinweisen. Um die Ursache der Abweichungen zu ermitteln, sollten frische Reagenzien verwendet werden.

8 ERGEBNISSE

8.1 Mittlere Extinktion

Für jeden Punkt auf der Standardkurve (S0-S5) und für jede Probe jeweils die mittlere Extinktion (E_m) berechnen.

8.2 Kalibrierungskurve

Die mittlere Extinktion (E_m) der Standards (S0-S5) gegen die Konzentration auftragen. Dann eine Ausgleichskurve durch die aufgetragenen Punkte zeichnen (z. B. Vier-Parameter-Funktion).

8.3 Ermittlung der Ergebnisse

Mit den Werten für die Proben die entsprechenden Werte für die Konzentration in pg/mL aus der Kalibrierungskurve ablesen.

9 REFERENZWERTE

Da sich die Konzentrationen von Estriol im Speichel im Tagesverlauf verändern (circadiane Schwankungen), wird empfohlen, die Proben immer zur selben Uhrzeit zu sammeln (8 Uhr morgens):

Die folgenden Werte sollten als vorläufige Richtlinie verwendet werden, bis das Labor jeweils seinen eigenen Wertebereich etabliert hat.

Gruppe	Zeit	N	Bereich +/- SDs (pg/mL)	Absoluter Bereich (pg/mL)
Frauen	8 Uhr	21	0 - 21,0	0 - 32,0
Frauen vor der Menopause	5 Uhr	21	0 - 6,8	0 - 8,9
Schwangerschaftswoche		Speichel (pg/mL)		
22.		(700 ± 500)		
24.		(900 ± 600)		
26.		(1200 ± 700)		
28.		(1500 ± 800)		
30.		(1800 ± 800)		
32.		(2200 ± 1100)		
34.		(3200 ± 1300)		
36.		(4100 ± 1600)		
37.		(4500 ± 1700)		
38.		(5000 ± 2000)		
39.		(5300 ± 2000)		
40.		(5700 ± 2000)		

Bitte beachten, dass die Ermittlung des zu erwartenden Wertebereichs für eine „normale“ Population mit einer bestimmten Methode von vielen Faktoren, wie der Spezifität und Sensitivität der verwendeten Methode und der Zusammensetzung der untersuchten Population, abhängt. Deshalb sollten die Labors den vom Hersteller etablierten Wertebereich nur als allgemeine Orientierung verwenden und jeweils einen eigenen zu erwartenden Wertebereich mit der Bevölkerung im Einzugsbereich des Labors erstellen.

10 TESTCHARAKTERISTIKA

10.1 Präzision

Variation innerhalb eines Testlaufs (Intra-Assay-Präzision)

Die Abweichung innerhalb eines Testlaufs wurde durch die wiederholte Bestimmung (16x) von zwei verschiedenen Kontroll-Speichelproben in einem Testdurchlauf ermittelt. Die Intra-Assay-Variabilität beträgt $\leq 9,7\%$.

Variation zwischen verschiedenen Testläufen (Inter-Assay-Präzision)

Die Abweichung zwischen verschiedenen Testläufen wurde durch die wiederholte Bestimmung (10x) von zwei verschiedenen Kontroll-Speichelproben mit verschiedenen Testkit-Chargen ermittelt. Die Inter-Assay-Variabilität beträgt $\leq 13,7\%$.

10.2 Richtigkeit

Die Untersuchung der Wiederfindung von 50, 300 und 2000 pg/mL zu speichelfreien Proben hinzugefügtem Estriol ergab einen Durchschnittswert (\pm SD) von $100,6\% \pm 14,6\%$ bezogen auf die ursprüngliche Konzentration.

10.3 Sensitivität

Die niedrigste nachweisbare Estriolkonzentration, die sich vom Kalibrator 0 signifikant unterscheidet, beträgt 1,0 pg/mL (Konfidenzintervall 95 %).

10.4 Spezifität

Die folgende Tabelle zeigt die nach Abraham mit 50 % berechnete Kreuzreaktion des Antikörpers:

Estriol im Speichel	100 %
16-Epiestriol	10,5 %
15 α -OH-Estriol	7,0 %
Estriol-3-sulfat	2,0 %
Estradiol	0,1 %
17-Epiestriol	$< 1 \times 10^{-2}\%$
Estriol-3 α -glucuronid	$< 1 \times 10^{-2}\%$
Estriol-16 α -glucuronid	$< 1 \times 10^{-2}\%$
Prednison	$< 1 \times 10^{-2}\%$
Estron	$< 1 \times 10^{-4}\%$

10.5 Korrelation

Der Salivary Free Estriol ELISA (SLV-3653) wurde mit einem anderen kommerziell erhältlichen Estriol-Speicheltest verglichen.

In beiden Testsystemen wurden entsprechend 30 Speichelproben analysiert. Die lineare Regressionskurve wurde berechnet:

$$y = 1,03 x + 0,68$$

$$r^2 = 0,988$$

$$y = \text{Estriol saliva SLV-3653}$$

$$x = \text{Estriol saliva Salimetrics ELISA Testkit}$$

11 ENTSORGUNG

Bei der Entsorgung der Reagenzien sind die örtlichen Vorschriften zu beachten.

12 LITERATUR

1. Fisher-Rasmussen, W., et al Acta Obstet. Gynecol Scand 60: 417 -420 (1981)
2. Truran, P. L., et al Clin. Chem. 28/12, 2393 (1982)
3. Vining, R. F., et al J.Clin.Endoc.Metab. 56, 454 (1983)
4. Bagger, P. V., et al Acta Obstet Gynecol Scand 60: 187 (1981)
5. Osterman, T. M., et al Clin. Chem. 25 (5) 716 (1979)
6. Wisdom, G.B. Clin Chem. 22 (8) 1243-1255 (1976)

SYMBOLS USED

Symbol	English	Deutsch	Italiano	Español	Français
	European Conformity	CE-Konformitäts-kennzeichnung	Conformità europea	Conformidad europea	Conformité normes européennes
	Consult instructions for use *	Gebrauchsanweisung beachten *	Consultare le istruzioni per l'uso	Consulte las instrucciones de uso	Consulter les instructions d'utilisation
	<i>In vitro</i> diagnostic medical device *	<i>In-vitro</i> -Diagnostikum *	Dispositivo medico-diagnostico in vitro	Producto sanitario para diagnóstico In vitro	Dispositif médical de diagnostic in vitro
	Catalogue number *	Artikelnummer *	Numero di Catalogo	Número de catálogo	Référence de catalogue
	Batch code *	Chargencode *	Codice del lotto	Código de lote	Numéro de lot
	Contains sufficient for <n> tests *	Ausreichend für <n> Prüfungen *	Contenuto sufficiente per "n" saggi	Contenido suficiente para <n> ensayos	Contenu suffisant pour "n" tests
	Temperature limit *	Temperaturbegrenzung *	Temperatura di conservazione	Temperatura de conservacion	Température de conservation
	Use-by date *	Verwendbar bis *	Utilizzare prima del	Establa hasta	Utiliser jusque
	Manufacturer *	Hersteller *	Fabbricante	Fabricante	Fabricant
	Caution *	Achtung *			
	For research use only	Nur für Forschungszwecke	Solo a scopo di ricerca	Sólo para uso en investigación	Seulement dans le cadre de recherches
<i>Distributed by</i>	Distributed by	Vertreiber	Distributore	Distribuidor	Distributeur
<i>Content</i>	Content	Inhalt	Contenuto	Contenido	Contenu
<i>Volume/No.</i>	Volume / No.	Volumen/Anzahl	Volume/Quantità	Volumen/Número	Volume/Quantité