

Product information

Information about other products is available at: www.demeditec.com



Estradiol rat ELISA

RUO

REF **DEV9999**

Σ **96**



Demeditec Diagnostics GmbH
Lise-Meitner-Strasse 2
24145 Kiel – Germany
www.demeditec.com

CONTENTS / INHALTSVERZEICHNIS

1	INTRODUCTION	3
2	PRINCIPLE	3
3	WARNINGS AND PRECAUTIONS	3
4	REAGENTS	4
5	SAMPLE COLLECTION AND STORAGE	5
6	ASSAY PROCEDURE	5
7	EXPECTED VALUES	6
8	QUALITY CONTROL	6
9	PERFORMANCE CHARACTERISTICS	7
10	LIMITATIONS OF PROCEDURE	8
11	LEGAL ASPECTS	9
12	REVISION HISTORY OF INSTRUCTION FOR USE	9
13	REFERENCES	9
1	EINLEITUNG	10
2	TESTPRINZIP	10
3	WARNUNGEN & VORSICHTSHINWEISE	10
4	BESTANDTEILE DES KITS	11
5	PROBENENTNAHME UND VORBEREITUNG	12
6	TESTDURCHFÜHRUNG	13
7	ERWARTETE WERTE	14
8	QUALITÄTSKONTROLLE	14
9	ASSAY CHARACTERISTIKA	14
10	GRENZEN DES TESTS	15
11	RECHTLICHE GRUNDLAGEN	15
12	ÄNDERUNGSHISTORIE DER ARBEITSANLEITUNG	15
13	REFERENZEN	15

1 INTRODUCTION

1.1 Intended Use

The **DEMEDITEC Estradiol rat ELISA** is a competitive immunoassay for the quantitative measurement of estradiol in rat serum. **For research use only – Not for use in diagnostic procedures.**

1.2 Summary and explanation

Estradiol (E2 or 17 β -estradiol) is an estrogenic hormone produced by the ovaries and in smaller amounts by the adrenal cortex and testes. It is the most potent female sexual hormone and is essential for maintaining normal female functions. During the oestrous cycle which can be divided into four phases (proestrus, estrus, metestrus, diestrus) estradiol concentrations rise gradually from metestrus to proestrus and fall to barely detectable levels in estrus. The maximum concentration is reached around mid-day of proestrus (1,2).

Apart from its effects on sexual characteristics it has important influence on the growth and development of the brain (3,4).

In female rodents, the determination of estradiol is a useful marker in evaluating and monitoring the state of the reproductive functions and pregnancy as well.

2 PRINCIPLE

The DEMEDITEC Estradiol rat ELISA Kit is a solid phase enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA), based on the principle of competitive binding.

The microtiter wells are coated with an anti-Estradiol antibody. An unknown amount of estradiol present in the sample competes with an Estradiol-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 Estradiol in the sample. After addition of the substrate solution, the intensity of color developed is inversely proportional to the concentration of free Estradiol in the sample.

3 WARNINGS AND PRECAUTIONS

1. This kit is intended for research only. Use by staff, who is specially informed and trained in methods which are carried out by use of immunoassays.
2. All blood components and biological materials should be handled as potentially hazardous in use and for disposal. Follow universal precautions when handling and disposing of infectious agents.
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 2-8°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 (18-25°C) before starting the test. Temperature will affect the absorbance readings of the assay.
10. Never pipet by mouth and avoid contact of reagents and samples with skin and mucous membranes.
11. Do not smoke, eat, drink or apply cosmetics in areas where samples or kit reagents are handled.
12. Wear disposable latex gloves when handling samples and reagents. Microbial contamination of reagents or samples may give false results.
13. Handling should be done in accordance with the procedures defined by an appropriate national biohazard safety guideline or regulation.
14. Do not use reagents beyond expiry date as shown on the kit labels.
15. All indicated volumes have to be performed according to the protocol. Optimal test results are only obtained when using calibrated pipettes and microtiterplate readers.
16. Do not mix or use components from kits with different lot numbers. It is advised not to exchange wells of different plates even of the same lot. The kits may have been shipped or stored under different conditions and the binding characteristics of the plates may result slightly different.
17. Avoid contact with Stop Solution. It may cause skin irritation and burns.
18. Some reagents contain Proclin 300, CMIT and/or MIT as preservatives. In case of contact with eyes or skin, flush immediately with water.
19. Chemicals and prepared or used reagents have to be treated as hazardous waste according to the national biohazard safety guideline or regulation.

20. For information please refer to Material Safety Data Sheets. Safety Data Sheets for this product are available upon request directly from Demeditec Diagnostics GmbH or on Demeditec homepage (www.demeditec.com).
21. If product information, including labeling, is incorrect or inaccurate, please contact the kit manufacturer or supplier.

4 REAGENTS

4.1 Reagents provided

1. **SORB** **MT** **Microtiter Plate**, 12 x 8 (break apart) strips with 96 wells; wells coated with anti-Estradiol antibody.
2. **CAL** **0 – 5** **LYO** **Calibrators (Calibrator 0-5)**, 6 vials, lyophilized; Concentrations: 0 – 5 – 20 – 80 – 320 – 1280 pg/mL
For reconstitution see “Reagent Preparation”.
3. **INC** **BUF** **Incubation Buffer**, 1 vial, 7 mL, ready to use.
4. **ENZ** **CONJ** **DIL** **Enzyme Conjugate Diluent**, 1 vial, 30 mL, ready to use.
5. **ENZ** **CONJ** **100x** **Enzyme Conjugate**, 1 vial, 0.3 mL (100X concentrated)
17 β -Estradiol labeled horseradish peroxidase in buffered matrix; see “Reagent Preparation” (4.4).
6. **SUB** **TMB** **Substrate Solution**, 1 vial, 22 mL, ready to use;
contains tetramethylbenzidine (TMB) and hydrogen peroxide in a buffered matrix.
7. **STOP** **SOLN** **Stop Solution**, 1 vial, 7 mL, ready to use; contains 2 N hydrochloric acid solution.
8. **WASH** **SOLN** **10x** **Wash Solution**, 1 vial, 50 mL (10X concentrated); see “Reagent Preparation” (4.4).

4.2 Materials required but not provided

- Microcentrifuge
- A microtiter plate reader capable for endpoint measurement at 450 nm
- Calibrated variable precision micropipettes (50 μ L, 75 μ L, 200 μ L, 300 μ L).
- Microplate mixer operating at 900 rpm
- Vortex mixer
- Absorbent paper
- Distilled or deionized 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 be stable until expiration date. Do not use reagents beyond this date. Opened reagents must be stored at 2°-8°C. After first opening the reagents are stable for 30 days if used and stored properly. Microtiter wells must be stored at 2°C to 8°C. Take care that the foil bag is sealed tightly. Protect TMB-Substrate Solution from light.

Store Calibrators refrigerated, they will be stable at 2-8°C for 7 days after reconstitution. For longer storage freeze at -20°C.

4.4 Reagent preparation

Allow the reagents and the required number of wells to reach room temperature (18-25°C) before starting the test.

Wash Solution:

Dilute 50 mL of 10X concentrated Wash Solution with 450 mL deionized water to a final volume of 500 mL. The diluted Wash Solution is stable for at least 3 months at room temperature (18-25°C). Precipitates may form when stored at 2-8°C, which should dissolve again by swirling at room temperature (18-25°C). The wash solution should only be used when the precipitates have completely dissolved.

Calibrators:

Reconstitute lyophilized calibrators with **0.5 mL deionized water** 30 min. before use.

Enzyme Conjugate:

Immediately before use dilute Enzyme Conjugate Concentrate 1:100 in Enzyme Conjugate Diluent, for example 0.1 mL concentrated Enzyme Conjugate Concentrate + 9.9 mL Enzyme Conjugate Diluent. Mix thoroughly.

Attention: Please prepare only immediately before use!

4.5 Disposal of the kits

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

4.6 Damaged test kits

In case of any severe damage of the test kit or components, DEMEDITEC have to be informed written, 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 SAMPLE COLLECTION AND STORAGE

For determination of rat estradiol **serum samples** can be used. The procedure calls for 75 µL sample per well. The samples should assay immediately or aliquot and stored at -20°C. Avoid repeated freeze-thaw cycles. Samples expected to contain estradiol concentrations higher than the highest calibrator (1280 pg/mL) should be diluted with the zero calibrator before assay. The additional dilution step has to be taken into account for the calculation of the results.

6 ASSAY PROCEDURE**6.1 General Remarks**

- All reagents and samples 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.
- Respect the incubation times as stated in this instructions for use.
- Duplicate determination of calibrators, controls and samples is recommended in order to identify potential pipetting errors.
- A calibrator curve must be established for every run.
- Microtiter plate washing is important. Improperly washed wells will give erroneous results. It is recommended to use a multichannel pipette or a multistepper, respectively, or an automatic microtiter plate washing system. Do not allow the wells to dry between incubations. Do not scratch coated wells during rinsing and aspiration. Rinse and fill all reagents with care. While rinsing, check that all wells are filled precisely with wash solution, and that there are no residues in the wells.
- For internal quality control we suggest to use **Rat Control Set coded DEV99RC. For more information please contact DEMEDITEC.**

6.2 Assay procedure

1. Prepare a sufficient number of microplate wells to accommodate calibrators, controls and samples in duplicates.
2. Dispense **75 µL** of each **Calibrator, Controls and Sample** with new disposable tips into appropriate wells.
3. Dispense **50 µL** of **Incubation Buffer** into each well.
4. Incubate for **120 minutes** at room temperature (18-25°C) on a plate shaker (900 rpm).
5. Immediately before use dilute the **Enzyme Conjugate Concentrate** 1:100 in **Enzyme Conjugate Diluent** (see chapter 4.4). Add **50 µL diluted Enzyme Conjugate** into each well.
6. Incubate for **60 minutes** at room temperature (18-25°C) on a plate shaker (900 rpm).

Important Note:

Optimal reaction in this assay is markedly dependent on shaking of the microplate!

7. Discard the content of the wells and rinse the wells **4 times** with diluted **Wash Solution** (300 µL per well). Remove as much Wash Solution as possible by beating the microplate on absorbent paper.
8. Add **200 µL** of **Substrate Solution** to each well.
9. Incubate without shaking for **30 minutes** in the dark.
10. Stop the reaction by adding **50 µL** of **Stop Solution** to each well.
11. Determine the absorbance of each well at 450 nm. It is recommended to read the wells within 15 minutes.

6.3 Calculation of results

1. Calculate the average absorbance values for each set of calibrators, controls and samples.
2. The obtained optical density of the standards (y-axis, linear) are plotted against their corresponding concentrations (x-axis, logarithmic) either on semilogarithmic paper or using an automated method.
3. Using the mean absorbance value for each sample, determine the corresponding concentration from the calibration curve.
4. Automated method: The results in the package insert have been calculated automatically using a 4 PL (4 Parameter Logistics) curve fit. 4 Parameter Logistics is the preferred calculation method. Other data reduction functions may give slightly different results.
5. The concentration of the samples can be determined directly from this calibrator curve. Samples with concentrations higher than that of the highest calibrator have to be further diluted. For the calculation of the concentrations, this dilution factor has to be taken into account.

Example of typical calibrator curve

Following data are intended for illustration only and should not be used to calculate results from another run.

Calibrator	Optical Units (450nm)
Calibrator 0 (0 pg/mL)	2.945
Calibrator 1 (5 pg/mL)	2.667
Calibrator 2 (20 pg/mL)	2.114
Calibrator 3 (80 pg/mL)	0.989
Calibrator 4 (320 pg/mL)	0.311
Calibrator 5 (1280 pg/mL)	0.129

7 EXPECTED VALUES

Each laboratory should establish its own normal ranges.

8 QUALITY CONTROL

Good laboratory practice requires that controls are 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. The use of control samples is advised to assure the day-to-day validity of results.

For internal quality control we suggest to use **Rat Control Set coded DEV99RC**.

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 results should be considered invalid. In this case, please check the following technical areas: Pipetting and timing devices, microtiter plate reader, expiration dates of reagents, storage and incubation conditions, aspiration and washing methods. After checking the above mentioned items without finding any error contact your distributor or Demeditec directly.

9 PERFORMANCE CHARACTERISTICS

9.1 Analytical Sensitivity

The lowest analytical detectable level of Estradiol that can be distinguished from the Zero Calibrator is 2.5 pg/mL at the 2SD confidence limit.

9.2 Specificity (Cross Reactivity)

The following materials have been evaluated for cross reactivity. The percentage indicates cross reactivity at 50% displacement compared to Estradiol.

Steroid	% Cross reaction
Androstenedione	< 0.1
17-Hydroxyprogesterone	< 0.1
Corticosterone	< 0.1
Estriol	0.4
Estrone	4.2
Pregnenolone	< 0.1
E2-3-Glucuronide	3.8
E2-3-Sulphate	3.6
E2-17-Glucuronide	< 0.1
Progesterone	< 0.1
Testosterone	< 0.1
Fulvestrant	9.5

9.3 Assay dynamic range

The range of the assay is between 2.5 – 1280 pg/mL.

9.4 Reproducibility

9.4.1 Intra-Assay

The intra-assay variation was determined by 20 replicate measurements of three serum samples within one run. The within-assay variability is shown below:

	Serum 1	Serum 2	Serum 3
Mean (pg/mL)	29.9	118.9	246.3
SD	1.8	3.6	7.8
CV (%)	6.1	3.0	3.2
n =	20	20	20

9.4.2 Inter-Assay

The inter-assay (between-run) variation was determined by duplicate measurements of three serum samples in 11 different tests.

	Serum 1	Serum 2	Serum 3
Mean (pg/mL)	23.6	104.7	226.8
SD	1.6	4.1	16.0
CV (%)	7.0	4.0	7.1
n =	11	11	11

9.5 Recovery

Using the Calibrator Matrix two spiking solutions of 100 ng/mL and 10 ng/mL were prepared. 1000 µL of one serum was spiked with 2, 3.5 and 5 µL of the 100 ng/mL solution, and 1000 µL of two sera spiked with 5, 10 and 15 µL of the 10 ng/mL solution, leaving the serum matrices intact. All samples were measured by the Estradiol rat ELISA procedure.

Sample	Spiking (pg/mL)	Measured (pg/mL)	Expected (pg/mL)	Recovery (%)
1	-	20.7	-	-
	200	211.1	220.7	96%
	350	298.7	370.7	81%
	500	444.8	520.7	85%
2	-	19.4	-	-
	50	68.6	69.4	99%
	100	111.9	119.4	94%
	150	143.4	169.4	85%
3	-	11.2	-	-
	50	71.6	61.2	117%
	100	128.4	111.2	115%
	150	156.3	161.2	97%

9.6 Linearity

Three serum samples were assayed undiluted and diluted with the zero calibrator.

Serum	Dilution	Measured (pg/mL)	Expected (pg/mL)	Linearity (%)
1	-	196,7	./.	./.
	1 in 2	80,3	98,4	82%
	1 in 4	44,1	49,2	90%
	1 in 8	25,7	24,6	104%
2	-	231,3	./.	./.
	1 in 2	124,2	115,7	107%
	1 in 4	67,6	57,8	117%
	1 in 8	33,6	28,9	116%
3	-	359,9	./.	./.
	1 in 2	182,1	180,0	101%
	1 in 4	95,4	90,0	106%
	1 in 8	49,4	50,0	99%

10 LIMITATIONS OF PROCEDURE

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

- Do not use any hemolytic, icteric or lipemic samples to avoid any interferences.
- Samples containing sodium azide should not be used in the assay.
- Non-specific interferences with this in vitro immunoassay cannot be excluded. If unplausible results are suspected, they should be considered invalid and verified by further testing.

10.2 Drug Interferences

Any medication containing Estradiol will significantly influence the measurement of this analyte. The Estradiol ELISA should not be used for subjects being treated with the drug fulvestrant (Faslodex®) which cross reacts in the Estradiol ELISA and could lead to falsely elevated test results.

11 LEGAL ASPECTS

11.1 Reliability of Results

The test must be performed exactly as per the manufacturer's instructions for use. Moreover the user must strictly adhere to the rules of GLP (Good Laboratory Practice) or other applicable national standards and/or laws. This is especially relevant for the use of control reagents. It is important to always include, within the test procedure, a sufficient number of controls for validating the accuracy and precision of the test.

The test results are valid only if all controls are within the specified ranges and if all other test parameters are also within the given assay specifications. In case of any doubt or concern please contact DEMEDITEC.

11.2 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.

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 REVISION HISTORY OF INSTRUCTION FOR USE

Changes from the previous version 4-04/17 to actual version 5-04/22

Cover page	Layout change
Chap. 3:	updated
Chap. 4.1	updated label symbol for calibrators
Chap. 4.2	updated (shaker needed at 900 rpm)
Chap. 6.1:	additions (notes on the washing procedure)
Chap. 6.2:	shaking speed at 900 rpm (previously >600 rpm)
Chap. 8:	added
Chap. 10:	updated
Room temperature	18-25 °C (previously 21-26 °C)
Layout and editorial changes	

13 REFERENCES

1. Abubakar A. Shaikh
Estrone and estradiol levels in the ovarian venous blood from rat during the estrous cycle and pregnancy; *Biology of Reproduction* (1971); 5, 297 - 307.
2. Hawkins, R.A, Freedman, A., Marshall, A., Killen, E.
Oestradiol-17 β and prolactin levels in rat peripheral plasma; *Br. J. Cancer* (1975); 32, 179.
3. Zamani, M.R, Desmond, N.L, Levy, W.B..
Estradiol modulates long term synaptic depression in female rat hippocampus.
J. Neurophysiol (2000); 84: 1800 - 1808.
4. McCarthy, M.M.
Estradiol and the developing brain; *Physiol. Rev.* (2008); 88: 91-134.

1 EINLEITUNG

Der DEMEDITEC Estradiol Ratte ELISA ist ein kompetitiver Enzymimmunoassay zur quantitativen Bestimmung von Estradiol in Serum von Ratten. Nur für Forschungszwecke!

Estradiol (E2 oder 17 β -estradiol) gehört zu den Estrogenen und wird in den Eierstöcken sowie in geringeren Mengen in der Nebennierenrinde und in den Hoden produziert. Es handelt sich um das potenteste weibliche Sexualhormon und das vorherrschende Hormon während des Reproduktionszyklus.

Während des Menstruationszyklus, der in vier Phasen (Proestrus, Estrus, Metestrus, Diestrus) unterteilt werden kann, steigt die Estradiol-Konzentration graduell vom Metestrus zum Proestrus an und fällt dann wieder ab. Die maximale Konzentration wird am Mittag der Proestrus-Phase erreicht (1,2).

Des Weiteren übt Estradiol einen wichtigen Einfluss auf das Wachstum und die Entwicklung des Gehirns aus (3,4). In weiblichen Ratten ist die Bestimmung von Estradiol ein wichtiger Marker zur Beobachtung der reproduktiven Funktion sowie der Trächtigkeit.

2 TESTPRINZIP

Der DEMEDITEC Estradiol Ratte ELISA ist ein Festphasen-Enzymimmunoassay, der auf dem Prinzip der kompetitiven Bindung basiert. Die Vertiefungen der Mikrotiterplatten sind mit einem Antikörper beschichtet, der gegen eine Antikörper-Bindungsstelle des Estradiol-Moleküls gerichtet ist.

Die Proben werden in die beschichteten Vertiefungen gegeben und zusammen mit einem Estradiol-Enzymkonjugat inkubiert. Während der Inkubation konkurriert das Estradiol aus der Probe mit dem Estradiol-Enzymkonjugat um die freien Bindungsstellen auf den beschichteten Vertiefungen. Das nicht gebundene Konjugat wird durch Waschen der Vertiefungen entfernt. Anschließend wird die Substratlösung zugegeben und die Farbentwicklung nach einer definierten Zeit gestoppt. Die Intensität der gebildeten Farbe ist umgekehrt proportional der Estradiol-Konzentration in der Probe. Die Extinktion wird bei 450 nm mit einem Mikrotiterplatten-Lesegerät gemessen.

3 WARNUNGEN & VORSICHTSHINWEISE

1. Dieser Kit darf ausschließlich zur Forschungszwecken verwendet werden. Die Anwendung sollte durch Personal erfolgen, das speziell in Immunoassay-Verfahren unterrichtet und ausgebildet wurde.
2. Alle Blutbestandteile und biologischen Materialien sollten als potenziell gefährlich bei der Verwendung und Entsorgung behandelt werden. Befolgen Sie bei der Handhabung und Entsorgung von Infektionserregern die allgemeinen Vorsichtsmaßnahmen.
3. Lesen Sie vor dem Testansatz sorgfältig die Packungsbeilage. Verwenden Sie nur die gültige, im Testkit enthaltene Arbeitsanleitung.
4. Die Mikrotiterplatte enthält teilbare, einzeln brechbare Mikrotiterstreifen. Unbenutzte Mikrotiterstreifen sollten im verschlossenen Folienbeutel bei 2-8°C aufbewahrt werden und im mitgelieferten Rahmen verwendet werden.
5. Proben und Reagenzien sollten so schnell wie möglich und in einer gleichbleibenden Sequenz pipettiert werden.
6. Verwenden Sie für jedes Reagenz einen separaten Behälter. Das gilt besonders für die Substratlösung. Wenn der Behälter der Substratlösung vorher z.B. für das Konjugat verwendet wurde, kommt es zu einem Farbumschlag der Substratlösung. Gießen Sie Reagenzien nie zurück ins Fläschchen, da so Reagenz-Kontaminationen verursacht werden können.
7. Mischen Sie den Inhalt der Mikrotiterplatte sorgfältig, um gute Testergebnisse zu gewährleisten. Mikrotiterplatten nicht wiederverwenden!
8. Mikrotiterstreifen nicht austrocknen lassen während des Testlaufes. Nach jedem Waschschrift zügig im Testprotokoll fortfahren.
9. Bringen sie die Reagenzien vor dem Testansatz auf Raumtemperatur (18-25°C). Die Temperatur wirkt sich auf die Optische Dichte des Assays aus.
10. Nicht mit dem Mund pipettieren und den Kontakt von Kitbestandteilen und Proben mit Haut und Schleimhäuten vermeiden.
11. In den Bereichen, in denen Proben oder Kitbestandteile verwendet werden, nicht rauchen, essen oder Kosmetika verwenden.
12. Beim Umgang mit Proben oder Reagenzien Einweg-Latexhandschuhe tragen. Die Verunreinigung von Reagenzien oder Proben mit Mikroben kann zu falschen Ergebnissen führen.
13. Der Gebrauch sollte in Übereinstimmung mit den Verfahren erfolgen, welche durch eine nationale Gefahrenstoff-Sicherheitsrichtlinie festgelegt sind.
14. Reagenzien nicht nach dem auf dem Kit-Etikett angegebenen Verfallsdatum verwenden.

15. Alle in der Packungsbeilage angegebenen Mengen müssen genau eingehalten werden. Optimale Ergebnisse können nur durch Verwendung kalibrierter Pipetten und Mikrotiterplatten-Lesegeräte erreicht werden.
16. Komponenten von Kits mit unterschiedlichen Lotnummern nicht untereinander vertauschen oder mischen. 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 Bindungscharakteristika der Platten leicht unterschiedlich ausfallen.
17. Der Kontakt mit der Stopplösung sollte vermieden werden, da sie Hautreizungen und Verbrennungen verursachen kann.
18. Die Entsorgung aller Bestandteile sollte gemäß der Vorschriften einer entsprechenden nationalen Gefahrenstoff-Sicherheitsrichtlinie erfolgen.
19. Einige Reagenzien enthalten ProClin 300, CMIT und/oder MIT als Konservierungsmittel. Bei Kontakt mit Augen oder Haut sofort mit Wasser spülen.
20. Informationen zu im Kit enthaltenen gefährlichen Substanzen entnehmen Sie bitte dem Material Sicherheitsdatenblatt. Material Sicherheitsdatenblätter für dieses Produkt sind auf Anfrage direkt von der Firma Demeditec Diagnostics GmbH oder auf der Demeditec Homepage (www.demeditec.de) erhältlich.
21. Sollten Produktinformationen, einschließlich Etikettierung falsch oder ungenau sein, bitte den Hersteller oder den Lieferanten des Kits kontaktieren.

4 BESTANDTEILE DES KITS

4.1 Kitinhalt

1. **SORB** **MT** **Mikrotiterplatte**, 12 x 8 (einzeln brechbare) Mikrotiterstreifen mit 96 Vertiefungen beschichtet mit einem anti-Estradiol-Antikörper.
2. **CAL** **0** – **5** **LYO** **Standard (Standard 0-5)**, 6 Fläschchen, je 0,5 ml, lyophilisiert; Konzentrationen: 0 – 5 – 20 – 80 – 320 – 1280 pg/ml
3. **INC** **BUF** **Inkubationspuffer**, 1 Fläschchen, 7 ml, gebrauchsfertig.
4. **ENZ** **CONJ** **DIL** **Enzymkonjugat-Verdünnungspuffer**, 1 Fläschchen, 30 ml, gebrauchsfertig.
5. **ENZ** **CONJ** **100x** **Enzymkonjugat**, 1 Fläschchen, 0,3 ml (100x konzentriert), Estradiol mit Meerrettichperoxidase konjugiert; siehe „Vorbereitung der Reagenzien“ (4.4)
6. **SUB** **TMB** **Substratlösung**, 1 Fläschchen, 22 ml, gebrauchsfertig; enthält Tetramethylbenzidin (TMB)
7. **STOP** **SOLN** **Stopplösung**, 1 Fläschchen, 7 ml, gebrauchsfertig; enthält 2 N Salzsäure.
8. **WASH** **SOLN** **10x** **Waschlösung**, 1 Fläschchen, 50 ml (10x konzentriert); siehe „Vorbereitung der Reagenzien“ (4.4)

4.2 Nicht im Kit enthaltene aber erforderliche Geräte und Materialien

- Zentrifuge
- Kalibriertes Mikrotiterplatten-Lesegerät mit 450±10 nm Filter
- Kalibrierte variable Präzisions-Mikropipetten (50 µl, 75 µl, 200 µl, 300 µl)
- Mikrotiterplatten-Schüttler mit 900 rpm
- Vortex-Mixer
- Saugfähiges Papier
- Aqua dest.
- Zeitnahmegerät
- Semilogarithmisches Papier oder Software zur Datenverarbeitung

4.3 Lagerung und Haltbarkeit des Kits

Die ungeöffneten Reagenzien behalten bei Lagerung um 2-8 °C ihre Reaktivität bis zum Verfallsdatum. Nach dem Verfallsdatum die Reagenzien nicht mehr verwenden. Nach dem Öffnen sollten alle Reagenzien bei 2-8°C gelagert werden. Nach dem ersten Öffnen sind die Reagenzien bei sachgemäßer Abarbeitung und Lagerung 30 Tage stabil.

Die Mikrotiterstreifen sollten bei 2-8°C gelagert werden. Der einmal geöffnete Folienbeutel sollte stets sehr sorgfältig wieder verschlossen werden. Schützen Sie die Substratlösung vor Licht.

Lagern Sie die Standards tiefgefroren. Nach dem Auflösen sind diese bei 2-8 °C bis zu 7 Tage haltbar; für längere Aufbewahrung aliquotieren und bei -20 °C aufbewahren.

4.4 Vorbereitung der Reagenzien

Alle Reagenzien sowie die benötigte Anzahl von Mikrotiterstreifen sollen vor dem Gebrauch auf Raumtemperatur (18-25°C) gebracht werden.

Waschlösung

Die 10-fach konzentrierte Waschlösung (50 ml) mit 450 ml deionisiertem Wasser auf ein Gesamtvolumen von 500 ml verdünnen. Die verdünnte Waschlösung ist bei Raumtemperatur (18-25 °C) für mindestens 12 Wochen stabil. Bei einer Lagerung bei 2-8°C können sich Präzipitate bilden, die sich durch Schwenken bei Raumtemperatur wieder auflösen sollten (18-25°C). Die Waschlösung darf erst verwendet werden, wenn sich die Präzipitate komplett aufgelöst haben.

Standards

Die lyophilisierten Standards mit **0,5 mL deionisiertem Wasser** 30 Minuten vor Gebrauch rekonstituieren.

Enzymkonjugat

Das 100-fach konzentrierte Enzymkonjugat mit dem Enzymkonjugat-Verdünnungspuffer verdünnen, z.B. 0,1 ml des Enzymkonjugat-Konzentrats mit Verdünnungspuffer auf ein Gesamtvolumen von 10 ml verdünnen. Gründlich mischen.

Achtung: Bitte erst unmittelbar vor dem Gebrauch herstellen!

4.5 Entsorgung des Kits

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

4.6 Beschädigte Testkits

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

5 PROBENENTNAHME UND VORBEREITUNG

Zur Bestimmung von Estradiol in der Ratte sind **Serumproben** geeignet. Für eine Bestimmung werden 75 µl Probenvolumen benötigt. Die Proben sollten unverzüglich verwendet werden oder aliquotiert bei -20°C gelagert werden. Wiederholte Gefrierzyklen sollten vermieden werden. Proben mit einer erwarteten Estradiol-Konzentration höher als der höchste Standard (1280 pg/ml) sollten vor Durchführung des Tests mit Nullstandard verdünnt werden. Die zusätzliche Verdünnung muss in der Kalkulation der Ergebnisse mit berücksichtigt werden.

6 TESTDURCHFÜHRUNG

6.1 Allgemeine Hinweise

- Alle Reagenzien und Proben müssen vor Gebrauch auf Raumtemperatur (21-26°C) 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 sollte eine neue Pipettenspitze verwendet werden, 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 Vertiefungen 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.
- Die in der Gebrauchsanweisung angegebenen Inkubationszeiten müssen eingehalten werden.
- Standards, Kontrollen und Proben sollten mindestens in Doppelansätzen bestimmt werden.
- Die korrekte Durchführung der Waschschriffe ist entscheidend. Ungenügend gewaschene Wells ergeben falsche Ergebnisse. Die Verwendung einer Multikanalpipette bzw. Multistepers oder eines automatischen Waschgerätes für Mikrotiterplatten wird empfohlen. Zwischen den Inkubationen die Wells nicht austrocknen lassen. Beim Waschen und Ausschütteln dürfen die beschichteten Wells nicht beschädigt werden. Alle Reagenzien müssen daher mit Vorsicht pipettiert werden. Beim Waschvorgang ist es wichtig, dass alle Vertiefungen vollständig und gleichmäßig mit Waschlösung gefüllt werden und nach dem Ausschütteln kein Rückstand an Flüssigkeit zurückbleibt.
- Jeder Testlauf muss eine eigene Standardkurve beinhalten.
- Als interne Kontrolle empfehlen wir das **Ratten Kontroll-Set (Kat.-Nr. DEV99RC)** zu verwenden. Für weitere Informationen kontaktieren Sie bitte DEMEDITEC.

6.2 Testdurchführung

1. Die benötigte Anzahl an **Mikrotiterstreifen** in der Halterung befestigen.
2. Je **75 µl Standards, Kontrollen und Proben mit neuen Plastikspitzen** in die entsprechenden Vertiefungen geben.
3. **50 µl Inkubationspuffer** in jede Vertiefung geben.
4. **120 Minuten** bei Raumtemperatur (18-25 °C) auf einem Mikrotiterplatten-Schüttler (900 rpm) inkubieren.
Achtung:
Eine optimale Reaktion wird erheblich beeinflusst durch das Schütteln der Mikrotiterplatte!
5. Unmittelbar vor Gebrauch das konzentrierte Enzymkonjugat 1:100 in Enzymkonjugat-Verdünnungspuffer verdünnen. **50 µl** des verdünnten **Enzymkonjugates** in jede Vertiefung geben.
6. **60 Minuten** bei Raumtemperatur (18-25 °C) auf einem Mikrotiterplatten-Schüttler (900 rpm) inkubieren.
7. Den Inhalt der Vertiefungen kräftig ausschütten. Vertiefungen **4mal** mit verdünnter **Waschlösung** (300 µl pro Vertiefung) waschen. Restliche Flüssigkeit durch Ausklopfen der Mikrotiterplatte auf saugfähigem Papier entfernen.
8. **200 µl Substratlösung** in jede Vertiefung geben.
9. **30 Minuten** bei Raumtemperatur (18-25 °C) ohne Schütteln im Dunkeln inkubieren.
10. Die enzymatische Reaktion durch Zugabe von **50 µl Stopplösung** in jede Vertiefung abstoppen.
11. Die Optische Dichte bei **450±10 nm** mit einem Mikrotiterplatten-Lesegerät innerhalb von 15 Minuten nach Zugabe der Stopp-Lösung bestimmen.

6.3 Ergebnisermittlung

1. Die durchschnittlichen Werte der Optischen Dichte (OD) für jedes Set von Standards und Proben bestimmen.
2. Die erhaltenen OD-Werte der Standards (y-Achse, linear) gegen ihre Konzentration (x-Achse, logarithmisch) entweder auf semi-logarithmischem Papier oder mit einer automatisierten Methode auswerten.
3. Unter Verwendung der mittleren OD wird für jede Probe die entsprechende Konzentration aus der Standardkurve ermittelt.
4. Automatische Methode: Die in der Arbeitsanleitung ermittelten Werte wurden automatisch mit Hilfe der 4 Parameter Gleichung (4PL, 4 Parameter Logistics) bestimmt. Andere Auswertungsfunktionen können leicht abweichende Werte ergeben.
5. Die Konzentration der Proben kann direkt von der Standardkurve abgelesen werden. Proben, die eine höhere Konzentration als die des höchsten Standards enthalten, müssen verdünnt werden. Dieser Verdünnungsfaktor muss bei der Berechnung der Konzentration beachtet werden.

Beispiel für eine Standardkurve

Nachfolgend wird ein typisches Beispiel für eine Standardkurve mit dem DEMEDITEC Estradiol Ratte ELISA gezeigt. Diese darf aber nicht zur Kalkulation eines anderen Testlaufes verwendet werden.

Standard	Optische Dichte (450nm)
Standard 0 (0 pg/ml)	2.945
Standard 1 (5 pg/ml)	2.667
Standard 2 (20 pg/ml)	2.114
Standard 3 (80 pg/ml)	0.989
Standard 4 (320 pg/ml)	0.311
Standard 5 (1280 pg/ml)	0.129

7 ERWARTETE WERTE

Jedes Labor sollte seine eigenen zu erwartenden Werte ermitteln.

8 QUALITÄTSKONTROLLE

Es wird empfohlen, Kontrollproben in jedem Lauf einzusetzen. Durch die Verwendung von Kontrollproben wird eine Tag-zu-Tag-Überprüfung der Ergebnisse erzielt. Es sollten Kontrollen sowohl mit normalen als auch pathologischen Werten eingesetzt werden. Zur internen Qualitätskontrolle empfehlen wir die Verwendung des **Ratten Kontroll-Sets (DEV99RC)**.

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 Ergebnisse als ungültig eingestuft werden. In diesem Fall überprüfen Sie bitte die folgenden Bereiche: Pipetten und Zeitnehmer, Photometer, Verfallsdatum der Reagenzien, Lagerungs- und Inkubationsbedingungen, Absaug- und Waschmethode. Sollten Sie nach Überprüfung der vorgenannten Bereiche keinen Fehler erkannt haben, setzen Sie sich bitte mit Ihrem Lieferanten oder direkt mit der Firma Demeditec in Verbindung.

9 ASSAY CHARACTERISTIKA**9.1 Analytische Sensitivität**

Die analytische Sensitivität, definiert als Mittelwert minus der zweifachen Standardabweichung des Standards 0, beträgt 2,5 pg/ml.

9.2 Spezifität der Antikörper (Kreuzreaktivität)

Die Daten entnehmen Sie bitte der ausführlichen englischen Arbeitsanleitung.

9.3 Messbereich

Der Messbereich des Testes liegt zwischen 2.5 – 1280 pg/ml.

Die Daten zu:

9.4 Präzision**9.5 Wiederfindung****9.6 Linearität**

entnehmen Sie bitte der ausführlichen englischen Arbeitsanleitung.

10 GRENZEN DES TESTS

Zuverlässige und reproduzierbare Ergebnisse werden erzielt, wenn das Testverfahren mit Verständnis der Packungsbeilage und die Einhaltung der Guten Laborpraxis durchgeführt wird. Jede unsachgemäße Behandlung von Proben oder Modifikationen dieses Tests können die Ergebnisse beeinflussen.

10.1 Interferenzen

- Keine hämolytische, lipämische oder ikterische Proben in dem Assay verwenden.
- Proben, die Natriumazid enthalten, sollten nicht für den Assay verwendet werden.
- Unspezifische Interferenzen mit diesem In-vitro-Immunoassay können nicht ausgeschlossen werden. Bei Verdacht auf unplausible Ergebnisse sollten diese als ungültig betrachtet und durch weitere Tests überprüft werden.

10.2 Beeinflussung durch Medikamente

Medikationen, die Estradiol enthalten, haben einen entsprechenden Einfluss auf die Bestimmung des Analyten. Der Estradiol ELISA sollte bei Proben, die mit Fulvestrant (Faslodex®) behandelt werden, nicht eingesetzt werden, da Fulvestrant im Estradiol ELISA kreuzreagiert. Dadurch kann es zu falsch erhöhten Testergebnissen kommen.

11 RECHTLICHE GRUNDLAGEN

11.1 Zuverlässigkeit der Ergebnisse

Der Test muss exakt gemäß der Testanleitung des Herstellers abgearbeitet werden. Darüber hinaus muss der Benutzer sich strikt an die Regeln der GLP (Good Laboratory Practice) oder andere eventuell anzuwendende Regeln oder nationale gesetzliche Vorgaben halten. Dies betrifft besonders den Gebrauch der Kontrollreagenzien. Es ist sehr wichtig, bei der Testdurchführung stets eine ausreichende Anzahl Kontrollen zur Überprüfung der Genauigkeit und Präzision mitlaufen zu lassen.

Die Testergebnisse sind nur gültig, wenn alle Kontrollen in den vorgegebenen Bereichen liegen, und wenn alle anderen Testparameter die vorgegebenen Spezifikationen für diesen Assay erfüllen. Wenn Sie bezüglich eines Ergebnisses Zweifel oder Bedenken haben, setzen Sie sich bitte mit der Firma DEMEDITEC in Verbindung.

11.2 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.

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 ÄNDERUNGSHISTORIE DER ARBEITSANLEITUNG


Änderungen gegenüber der Vorgängerversion 4-04/17 zur aktuellen Version 5-04/22:

Deckblatt	Anpassung des Layouts
Kap. 3:	Aktualisierung
Kap. 4.1:	Aktualisierung Etikettensymbol der Standards
Kap. 4.2:	Aktualisierung (Schüttler bei 900 rpm benötigt)
Kap. 6.1:	Ergänzungen (Hinweise zur Waschprozedur)
Kap. 6.2:	Schüttelgeschwindigkeit bei 900 rpm (vorher >600 rpm)
Kap. 8:	eingefügt
Kap. 10:	aktualisiert
Raumtemperatur:	18-25 °C (vorher 21-26 °C)
Layout und redaktionelle Änderungen	

13 REFERENZEN

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

SYMBOLS USED WITH DEMEDITEC ASSAYS

Symbol	English	Deutsch	Française	Espanol	Italiano
	European Conformity	CE-Konformitäts-kennzeichnung	Conforme aux normes européennes	Conformidad europea	Conformità europea
	Consult instructions for use	Gebrauchsanweisung beachten	Consulter les instructions d'utilisation	Consulte las Instrucciones	Consultare le istruzioni per l'uso
	In vitro diagnostic device	In-vitro-Diagnostikum	utilisation Diagnostic in vitro	Diagnóstico in vitro	Per uso Diagnostica in vitro
	For research use only	Nur für Forschungszwecke	Seulement dans le cadre de recherches	Sólo para uso en investigación	Solo a scopo di ricerca
	Catalogue number	Katalog-Nr.	Référence	Número de catálogo	No. di catalogo
	Lot. No. / Batch code	Chargen-Nr.	No. de lot	Número de lote	Lotto no
	Contains sufficient for <n> tests/	Ausreichend für "n" Ansätze	Contenu suffisant pour "n" tests	Contenido suficiente para <n> ensayos	Contenuto sufficiente per "n" saggi
	Note warnings and precautions	Warnhinweise und Vorsichtsmaßnahmen beachten	Avertissements et mesures de précaution font attention	Tiene en cuenta advertencias y precauciones	Annoti avvisi e le precauzioni
	Storage Temperature	Lagerungstemperatur	Température de conservation	Temperatura de conservacion	Temperatura di conservazione
	Expiration Date	Mindesthaltbarkeitsdatum	Date limite d'utilisation	Fecha de caducidad	Data di scadenza
	Legal Manufacturer	Hersteller	Fabricant	Fabricante	Fabbricante
<i>Distributed by</i>	Distributed by	Vertrieb durch	Distribution par	Distribución por	Distribuzione da parte di
	Version	Version	Version	Versión	Versione
	Single-use	Einmalverwendung	À usage unique	Uso único	Uso una volta