

Product information

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



Estrone-3-Sulfate equine ELISA

REF **DEV9933**

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	SAMPLES	5
6	ASSAY PROCEDURE	6
7	EXPECTED NORMAL VALUES	8
8	QUALITY CONTROL	9
9	PERFORMANCE CHARACTERISTICS	9
10	LIMITATIONS OF PROCEDURE	11
11	LEGAL ASPECTS	11
12	REVISION HISTORY OF INSTRUCTION FOR USE	11
13	REFERENCES	12
14	SHORT INSTRUCTION	13
1	EINLEITUNG	14
2	METHODIK UND TESTPRINZIP	14
3	HINWEISE UND VORSICHTSMASSNAHMEN	14
4	KITBESTANDTEILE	15
5	PROBENENTNAHME UND -VORBEREITUNG	16
6	TESTDURCHFÜHRUNG	17
7	NORMALWERTE	20
8	QUALITÄTSKONTROLLE	21
9	TESTCHARAKTERISTIKA	21
10	LIMITATIONEN	23
11	RECHTLICHE GRUNDLAGEN	23
12	ÄNDERUNGSHISTORIE DER ARBEITSANLEITUNG	23
13	LITERATUR	24
14	KURZANLEITUNG	25

1 INTRODUCTION

1.1 Intended Use

The Demeditec Estrone-3-Sulfate equine ELISA is a competitive enzyme immunoassay for the quantitative determination of Estrone-3-Sulfate in mare serum.

1.2 Description of the analyte

Estrone-3-Sulfate (E3S) is the predominant conjugated estrogen during pregnancy. It is produced by the fetus, possibly in association with the endometrium in the pregnant mare.

Different hormones are important for the complex events that occur during pregnancy in all mammals. In the mare these events include the maintenance of the corpus luteum function, formation of endometrial cups and development of secondary corpora lutea. Progesterone and PMSG (Pregnant Mare Serum Gonadotropine, eCG) and also free Estrogens, e.g. Estrone, are associated with these processes. It has been shown, that Estrone is rapidly conjugated after secretion and the ratio between conjugated and unconjugated estrogens is 100:1 in mare serum.

The conjugated estrogens, especially Estrone-3-Sulfate, provide the opportunity to improve the accuracy of pregnancy diagnosis, to monitor the pregnancy and to distinguish whether the fetal development is normal or impaired. The diagnosis of embryonic death is usually made by using techniques of palpation of the uterus per rectum or ultrasound echography. The determination of Estrone-3-Sulfate is an aid in the non-invasive diagnosis which allows monitoring of the feto-placental unit during pregnancy. Only in mares with normal fetal development the values of Estrone-3-Sulfate show a tremendous increase between day 75 and 100 of gestation.

2 PRINCIPLE

The Demeditec Estrone-3-Sulfate equine ELISA test kit is a solid phase enzyme immunoassay (ELISA) in the microplate format, designed for the quantitative measurement of Estrone-3-Sulfate. The microplate is coated with a polyclonal antibody specific for Estrone-3-Sulfate.

Calibrators and samples as well as a biotin-labeled Estrone-3-Sulfate are pipetted into the antibody coated microplate. During one hour incubation the Estrone-3-Sulfate of the calibrator/sample competes with the biotin-labeled Estrone-3-Sulfate for the binding sites of the antibody fixed on the inner surface of the wells.

Afterwards, horseradish peroxidase-labeled streptavidine is added. During a 30 minutes incubation, this enzyme-labeled streptavidine binds to the biotinylated Estrone-3-Sulfate. All wells are washed to remove excess of non-bound enzyme-labeled streptavidine.

A chromogenic substrate, TMB (3,3',5,5'-Tetra-Methyl-Benzidine), is added to all wells. During a 30 minutes incubation, the substrate is converted to a colored end product (blue) by the fixed enzyme. Enzyme reaction is stopped by dispensing of hydrochloric acid as stop solution (change from blue to yellow). The color intensity is inversely related to the concentration of Estrone-3-Sulfate present in the sample. The optical density of the color solution is measured with a microplate reader at 450 nm.

3 WARNINGS AND PRECAUTIONS

1. This kit is intended for laboratory use. Use by staff, who is specially informed and trained in methods which are carried out by use of immunoassays.
2. 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.
3. 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.
4. Pipetting of samples and reagents must be done as quickly as possible and in the same sequence for each step.
5. 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.
6. Mix the contents of the microplate wells thoroughly to ensure good test results. Do not reuse microwells.
7. Do not let wells dry during assay; add reagents immediately after completing the rinsing steps.
8. Allow the reagents to reach room temperature (18-25°C) before starting the test. Temperature will affect the absorbance readings of the assay.
9. Never pipet by mouth and avoid contact of reagents and samples with skin and mucous membranes.
10. Do not smoke, eat, drink or apply cosmetics in areas where samples or kit reagents are handled.
11. Wear disposable latex gloves when handling specimens and reagents. Microbial contamination of reagents or specimens may give false results.

12. Do not use reagents beyond expiry date as shown on the kit labels.
13. All indicated volumes have to be performed according to the protocol. Optimal test results are only obtained when using calibrated pipettes and microtiterplate readers.
14. 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.
15. 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.
16. Handling should be done in accordance with the procedures defined by an appropriate national biohazard safety guideline or regulation.
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** **Divisible Microplate**, 12 x 8 (break apart) strips with 96 wells, ready to use; coated with a polyclonal anti Estrone-3-Sulfate antibody
2. **CAL** **0-6** **LYO** **Calibrators**, 7 vials, lyophilized, for reconstitution see "Reagent preparation" (4.4). The Calibrators contain 0, 5, 10, 50, 100, 300 and 1000 ng/ml, respectively, in equine serum.
3. **BIOTIN** **CONJ** **Biotin-Labeled Estrone-3-Sulfate**, 1 vial, 11 ml, ready to use, clear; in a buffered solution.
4. **ENZ** **CONJ** **Enzyme-Labeled Streptavidine**, 1 vial, 3 ml, ready to use, blue; containing horseradish peroxidase-labeled streptavidine in a buffered matrix.
5. **SAM** **BUF** **Sample Buffer**, 1 vial, 11 ml, ready to use, yellow.
6. **SUB** **TMB** **TMB-Substrate Solution**, 1 vial, 22 ml, ready to use, clear.
3,3',5,5'-Tetramethyl-benzidine and hydrogen peroxide in a buffered solution.
7. **STOP** **SOLN** **Stop Solution**, 1 vial, 7 ml, ready to use; contains 2 M hydrochloric acid; clear.
Avoid contact with the Stop Solution. It may cause skin irritations and burns.
8. **WASH** **SOLN** **10x** **Wash Solution**, 1 vial, 50 ml, 10x concentrated; clear;
see „Reagent preparation“.

4.2 Materials required but not provided

- Microplate reader capable for endpoint measurements at 450 nm
- Vortex mixer
- Microplate mixer operating at 900 rpm
- Distilled or deionized water
- Graduated cylinders for 500 ml
- Plastic container for storage of the wash solution
- Calibrated variable precision micropipettes
- Semi logarithmic graph paper or software for data reduction
- Absorbant paper and timer

4.3 Storage conditions

When stored at 2-8°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. Keep away from heat and direct sunlight.

Microtiter wells must be stored at 2-8°C. Take care that the foil bag is sealed tightly.

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

Protect TMB-Substrate Solution from light.

4.4 Reagent preparation

Calibrators:

Reconstitute lyophilized Calibrator 0 with 2.0 ml dist. water and Calibrator 1 through Calibrator 6 with 1.0 ml dist. water 30 min. before use. Mix gently.

Wash Solution:

Dilute 50 ml of 10x concentrated Wash Solution with 450 ml dist. water to a final volume of 500 ml. The diluted Wash Solution is stable for at least 12 weeks 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).

4.5 Disposal of the kit

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

4.6 Damaged test kit

In case of any severe damage of the test kit or components, Demeditec Diagnostics GmbH has to be informed in writing within 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 SAMPLES

For determination of Estrone-3-Sulfate equine serum is the preferred sample matrix. The procedure calls for 20 µl matrix per well. Blood collection should be as stress-free as possible. The samples may be stored refrigerated at 2-8°C for one week, or up to 6 months frozen at -20°C. To avoid repeated thawing and freezing the samples should be aliquoted.

Samples expected to contain Estrone-3-Sulfate concentrations higher than the highest calibrator (1000 ng/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.

Do not use hemolytic, icteric or lipemic specimens. Samples containing sodium azide should not be used in the assay. This assay shows interferences with biotin which could result in false positive results. This must be taken into account when adding biotin, e.g. in the form of food additives.

6 ASSAY PROCEDURE

6.1 General Remarks

- Do not interchange components of different lots.
- All components of the test kit supplied as concentrate should be diluted to their final concentration at least 30 minutes prior to use. Mix well, but prevent of foam formation.
- All reagents and specimens must be allowed to come to room temperature (18-25°C) 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.
- Calibrators, controls and samples should at least be assayed in duplicates.
- 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 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.
- A calibrator curve must be established for every test run.
- For internal quality control we suggest to use **Estrone-3-Sulfate equine Control coded DEV9933C**. For more information please contact Demeditec.

6.2 Assay Procedure

1. Preparation of calibrators:

The calibrators are supplied lyophilized. At least 30 minutes before use, reconstitute the calibrator 0 with 2.0 ml of distilled water, and each of the remaining calibrators 1 through 6 with 1.0 ml of distilled water. Use volumetric pipettes and mix by gentle inversion.

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
a	0	4	P2	P..								
b	0	4	P2	P..								
c	1	5	P3									
d	1	5	P3									
e	2	6	P4									
f	2	6	P4									
g	3	P1	P5									
h	3	P1	P5									

2. Pipet **20 µl** of each **Calibrators, Controls** and **Samples** into the wells prepared.
3. Add **100 µl** of **Biotin-Labeled Estrone-3-Sulfate** to every well.
4. Add **100 µl** of **Sample Buffer** to every well.
5. Incubate for **1 hour** at room temperature (18-25°C) on a plate shaker (900 rpm).
Afterwards do not wash or discard!
6. Add **25 µl** of **Enzyme-Labeled Streptavidine** to every well.
7. Incubate for **30 minutes** at room temperature (18-25°C) on a plate shaker (900 rpm).
8. Discard the content of the wells and wash each well **4 times** with **300 µl** buffered **Wash Solution**.
9. Remove as much as possible Wash Solution by beating the microplate carefully.
10. Add **200 µl** of **TMB-Substrate Solution** to all wells.
11. Incubate without shaking for **30 minutes** at room temperature (18-25°C) in the dark.
12. Add **50 µl** of **Stop Solution** to each well and mix carefully.
13. 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 Calibrators (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 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.

6.4 Example of Typical Calibrator Curve

The figure below shows typical results for Demeditec Estrone-3-Sulfate equine ELISA tests. These data are intended for illustration only and should not be used to calculate results from another run.

Standard	Optical Density (450nm)
Calibrator 0 (0 ng/ml)	3.084
Calibrator 1 (5 ng/ml)	1.858
Calibrator 2 (10 ng/ml)	1.275
Calibrator 3 (50 ng/ml)	0.547
Calibrator 4 (100 ng/ml)	0.351
Calibrator 5 (300 ng/ml)	0.181
Calibrator 6 (1000 ng/ml)	0.100

7 EXPECTED NORMAL VALUES

In a reference range study equine serum samples were collected in the morning between 8 and 9 a.m. and in the evening between 5 and 6 p.m. Diurnal variations have not been observed. Analysis by the Demeditec Estrone-3-Sulfate equine test kit yielded the following results:

Group	Absolute Range (ng/ml)	n
Normal, non-pregnant mares	nondetectable - 10	22

During the course of pregnancy in 26 mares the Estrone-3-Sulfate serum concentrations were measured using the Demeditec Estrone-3-Sulfate equine ELISA.

Gestation Week	N	mean ng/ml	min ng/ml	max ng/ml
3	12	2.6	0.4	9.2
4	20	1.8	0.4	4.9
5	21	2.1	0.2	6.5
6	18	2.8	0.4	7.1
7	17	3.2	0.4	9.1
8	16	4.5	0.9	14.0
9	19	5.1	0.9	14.1
10	11	9.7	2.8	34.7
11	18	11	2.1	54.9
12	13	23	2.7	109
13	20	34	3.1	161
14	9	94	7.8	232
15	17	80	4.8	262
16	10	185	30.9	340
17	16	186	11.6	421
18	11	367	67.5	577
19	16	374	22.2	863
20	10	575	289	905
21	12	516	71.5	1233
22	9	497	247	889
23	11	571	106	861
24	12	634	263	1621
25	13	577	184	1229
26	9	528	255	949
27	12	523	213	1258
28	12	464	267	795
29	11	473	245	778
30	7	336	209	590
31	5	385	206	478
32	4	349	184	504
33	11	302	180	510
34	10	316	131	523
35	7	215	84	506
36	8	233	113	349
37	10	189	85	358
38	11	207	85	305
39	6	93	77	123
40	7	157	52	252
41	5	145	88	227
42	8	147	58	239
43	2	106	86	126
44	6	168	101	210
45	4	80	74	85
46	9	112	32	192
47	5	101	43	214
48	5	94	66	129

Because of differences which may exist between laboratories with respect of population, laboratory technique and selection of reference groups, it is recommended that each laboratory establishes its own normal and pathological ranges of equine Estrone-3-Sulfate. The reference ranges should be regarded as guidelines only.

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.

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 included in the kit. The values and ranges stated on the QC certificate always refer to the current kit lot and should be used for direct comparison of the results.

Employ appropriate statistical methods for analyzing 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 analytical sensitivity was calculated by subtracting 2 standard deviations from the mean OD of 22 replicate analyses of Standard 0 and was found to be 0.424 ng/mL.

9.2 Specificity

The following materials have been evaluated for cross reactivity. The percentage indicates cross reactivity at 50% displacement compared to Estrone-3-Sulfate.

Compound	Concentration range (ng/ml)	Crossreactivity (%) at 50% binding
Estrone	1 – 10,000	10.44%
Estriol	1 – 10,000	<0.08%
Corticosterone	1 – 10,000	<0.08%
Equilin	1 – 10,000	<0.08%
Equilenin	1 – 10,000	0.70%
17-Hydroxyprogesterone	1 – 10,000	<0.08%
Androstendione	1 – 10,000	0.85%
5 α -Dihydrotestosterone	1 – 10,000	0.12%
Testosterone	1 – 10,000	0.08%
Progesterone	1 – 10,000	<0.08%
Androsterone	1 – 10,000	<0.08%
17 β -Estradiol	1 – 10,000	<0.08%
Pregnenolone	1 – 10,000	<0.08%
β -Estradiol-3-sulfate	1 – 10,000	0.68%
DHEA-S	1 – 10,000	0.10%
Cortisone	1 – 10,000	<0.08%

9.3 Reproducibility

9.3.1 Intra-Assay

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

	Serum 1	Serum 2	Serum 3
Mean (ng/mL)	30.1	176.4	472.6
SD	2.93	11.56	34.35
CV (%)	9.8	6.6	7.3
n =	20	20	20

9.3.2 Inter-Assay

The inter-assay variation was determined by duplicate measurements of three serum samples in ten different runs.

	Serum 1	Serum 2	Serum 3
Mean (ng/mL)	28.2	161.4	424.7
SD	3.58	18.22	59.64
CV (%)	12.7	11.3	14.0
n =	10	10	10

9.4 Recovery

Recovery was determined by adding increasing amounts of the analyte to three different samples containing different amounts of endogenous analyte. Each sample (non-spiked and spiked) was measured by the Demeditec Estrone-3-Sulfate equine ELISA. The percentage recoveries were determined by comparing observed and expected results of the samples.

Serum	Spiking (ng/ml)	Observed (ng/ml)	Expected (ng/ml)	Recovery (%)
1	-	0.3	-	-
	50	59.4	50.3	118
	250	265.2	250.3	106
	500	416.7	500.3	83
2	-	0.3	-	-
	50	40.7	50.3	81
	250	224.9	250.3	90
	500	364.7	500.3	73
3	-	43.1	-	-
	50	85.7	93.1	92
	250	287.8	293.1	98
	500	422.7	543.1	78

9.5 Linearity

Three serum samples were assayed both undiluted and diluted with Estrone-3-Sulfate Zero Calibrator. The observed and expected values are presented below in ng/ml.

Serum	Dilution	Observed (ng/ml)	Expected (ng/ml)	Linearity (%)
1	Native	201.6	-	-
	1 : 2	109.0	100.8	108
	1 : 4	56.4	50.4	112
	1 : 8	30.5	25.2	121
2	Native	401.0	-	-
	1 : 2	198.1	200.5	99
	1 : 4	101.4	100.3	101
	1 : 8	44.6	50.1	89
3	Native	476.2	-	-
	1 : 2	252.1	238.1	106
	1 : 4	147.5	119.0	124
	1 : 8	75.7	59.5	127

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 specimens to avoid any interferences.
- Samples containing sodium azide should not be used in the assay.
- This assay shows interferences with biotin which could result in false positive results. This must be taken into account when adding biotin, e.g. in the form of food additives.
- Non-specific interferences with this 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 (cream, oil, pill, etc.) containing hormones could influence the measurement of this analyte. Clinically significant interactions cannot be ruled out with structurally similar drugs.

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 a sufficient number of controls within the test procedure for validating the accuracy and precision of the test. The test results are valid only if all controls are within the specified ranges and if all other test parameters are also within the given assay specifications. In case of any doubt or concern please contact Demeditec.

11.2 Therapeutic Consequences

Therapeutic consequences should never be based on laboratory results alone even if all test results are in agreement with the items as stated under point 11.1. Any laboratory result is only a part of the total clinical picture. Only in cases where the laboratory results are in acceptable agreement with the overall clinical picture of the therapeutic consequences should 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 REVISION HISTORY OF INSTRUCTION FOR USE

Changes from the previous version 05-02/22 to actual version 6-06/23

Cover Letter	VET symbol removed
Chap. 3	updated
Chap.6.1	Additional information
Chap. 5 & 10.2	Additional information about interferences with biotin.
General	Editorial changes

13 REFERENCES

1. Bouhamidi R, Gaillard JL, Silberzahn P, Martin B
Binding of Estrogen-3-Sulfates to stallion plasma and equine serum albumine.
J Steroid Biochem 1992, 42: 345-349
2. Cox JE
Oestrone and equilin in the plasma of pregnant mare
J Reprod Fert 1975, Suppl 23: 463-468
3. Darenius K, Kindahl H, Knudsen O, Madej A, Edqvist LE
PMSG, progesterone and oestrone sulfate during normal pregnancy and early fetal death.
Departments of Obstetrics and Gynecology and Clinical Chemistry, Swedish University of
Agricultural Sciences, Uppsala, Sweden
4. Hearp RB, Hamon M, Allen WR.
Studies on oestrogen synthesis by the preimplantation equine conceptus
J Reprod Fert 1982: Suppl 32: 343-352
5. Hughes JP, Stabenfeldt GH, Warren EJ
Estrous cycle and ovulation in the mare
JAVMA 1972 161:1367-1374
6. Hyland JH, Wright PJ, Manning SJ.
An investigation of the use of plasma oestrone sulfate concentrations for the diagnosis of
pregnancy in mares.
Australian Vet J 1984, 61: 123
7. Jeffcott LB, Hyland JH, MacLean AA, Dyke T, Robertson-Smith G.
Changes in maternal hormone concentrations associated with induction of fetal death at day
45 of gestation in mares.
J Reprod Fert 1987, Suppl 35: 461-467
8. Hyland JH, Langsford DA.
Changes in urinary and plasma oestrone sulfate concentrations after induction foetal death
in mares at 45 days of gestation
Australian Vet J 1990, 67: 349-351
9. Kasman LH, Hughes JP, Stabenfeldt GH, Starr MD, Lasley BL
Estrone sulfate concentrations as an indicator of fetal demise in horses
Am J Vet Res 1988, 49: 184-187
10. Kindahl H, Knudsen O, Madej A, Edqvist LE.
Progesterone, prostaglandin F-2 α , PMSG and oestrone sulfate during early pregnancy in the mare.
J Reprod Fert 1982, Suppl 32: 353-359
11. Makawiti DW, Allen WE, Kilpatrick MJ
Changes in oestrone sulfate concentrations in peripheral plasma of pony mares associated with follicular
growth, ovulation and early pregnancy.
J Reprod Fert 1983, 68: 481-487
12. Muyan M, Roser JF, Dybal N, Baldwin DM.
Modulation of gonadotropin-releasing hormone-stimulated luteinizing hormone release in cultured male
equine anterior pituitary cells by gonadal steroids
Biol of Reprod 1993, 49: 340-345
13. Möstl E
The horse feto-placental unit.
Exp Clin Endocrin 1994, 102: 166-168
14. Ousey JC, Rossdale PD, Cash RSG, Worthy K.
Plasma concentrations of progestagens, oestrone sulfate and prolactin in pregnant mares
subjected to natural challenge with equid herpesvirus-1.
J Reprod Fert 1987, Suppl 35: 519-528
15. Parkes RD, Blackmore DJ, Rance DA, Park BK, Dean PDG
Plasma concentrations of equilin and oestrone in the assessment of fetoplacental function in the mare.
Vet Rec 1977, 100: 511-512
16. Sanchi EM, LeBlanc MM, Weston PG.
Progestagen, oestrone sulfate and cortisol concentrations in pregnant mares during medical
and surgical disease
J Reprod Fert 1991, Suppl 44: 627-634
17. Setchell BP, Cox JE.
Secretion of free and conjugated steroids by the horse testis into lymph and venous blood
J Reprod Fert 1982, Suppl 32: 123-127
18. Terqui M, Palmer E.
Oestrogen pattern during early pregnancy in the mare
J Reprod Fert 1979, Suppl 27: 441-446
19. Marks V.: False-Positive Immunoassay Results: A Multicenter Survey of Erroneous Immunoassay Results
from Assays of 74 Analytes in 10 Donors from 66 Laboratories in Seven Countries
Clinical Chemistry 2002, 48:11: 2008-2016
20. Tate & Ward (2004) Interferences in Immunoassays, *Clin. Biochem Rev* Vol 25, May 2004
21. Selby (1999): Interference in immunoassays; *Ann. Clin. Biochem* 1999, 36: 704-721

14 SHORT INSTRUCTION

(all sample sizes given in µl)

MP Well Steps	ng/ml Solution	0	1	2	3	4	5	6	Sample
		0	5	10	50	100	300	1000	
Pipet	Calibrator	20	20	20	20	20	20	20	-
Pipet	Sample	-	-	-	-	-	-	-	20
Pipet	Biotin-Labeled Estrone-3-Sulfate	100	100	100	100	100	100	100	100
Pipet	Sample Buffer	100	100	100	100	100	100	100	100
Incubate for 1 hour at RT (18-25°C) on a shaker (900 rpm) Afterwards do <u>not</u> wash!									
Pipet	Enzyme-labeled streptavidine	25	25	25	25	25	25	25	25
Incubate for 30 minutes at RT (18-25°C) on a shaker (900 rpm)									
Decant Wash 4x with 300 µl of buffered wash solution									
Pipet	Substrate Solution	200	200	200	200	200	200	200	200
Incubate for 30 min at RT (18-25°C) in the dark									
Pipet	Stop Solution	50	50	50	50	50	50	50	50
Read at $\lambda = 450 \text{ nm}$									

1 EINLEITUNG

1.1 Zweckbestimmung

Der Demeditec Estrone-3-Sulfate equine ELISA ist ein kompetitiver Enzymimmunoassay zur quantitativen Bestimmung von Estron-3-Sulfat in Pferdeserum.

1.2 Beschreibung des Analyten

Estron-3-Sulfat ist das vorherrschende konjugierte Östrogen der trächtigen Stute. Es wird durch den Feten, eventuell in Assoziation mit dem Endometrium, gebildet.

Unterschiedliche Hormone sind für die komplexen Vorgänge während der Gravidität bei der Stute wie bei allen Säugern verantwortlich. Progesteron, PMSG (Pregnant Mare Serum Gonadotropine) und auch freie Östrogene wie Estron sind mit diesen Prozessen assoziiert. Es konnte gezeigt werden, dass Estron kurz nach der Sekretion konjugiert wird. Die konjugierte Form kann im Vergleich zur unkonjugierten Form in einem Verhältnis von 100:1 im Serum der Stute nachgewiesen werden.

Die konjugierten Östrogene, insbesondere Estron-3-Sulfat, geben die Möglichkeit, die Genauigkeit der Diagnose der Gravidität zu verbessern, den Verlauf der Gravidität zu kontrollieren und zu beurteilen, ob eine normale oder gestörte fetale Entwicklung vorliegt. Bisher wurde durch eine rektale Palpation des Uterus oder mittels Ultraschall die Diagnose des fetalen Todes gestellt. Mit der Bestimmung des Estron-3-Sulfates steht jetzt eine nicht-invasive Methode zur Beurteilung der fetoplazentaren Einheit bei der trächtigen Stute zur Verfügung. Nur bei einer normalen fetalen Entwicklung ist ein starker Anstieg der Estron-3-Sulfat Konzentrationen im Serum zwischen dem 75. und 100. Tag nach Befruchtung nachzuweisen.

2 METHODIK UND TESTPRINZIP

Der vorliegende Demeditec Estrone-3-Sulfate equine ELISA Test ist ein Enzymimmunoassay zur quantitativen Bestimmung von Estron-3-Sulfat im Pferdeserum.

Serumproben, Kontrollen oder Standards werden zusammen mit Biotin-markiertem Estron-3-Sulfat in die mit polyklonalen anti-Estron-3-Sulfat-Antikörpern beschichteten Wells gegeben. Während der ersten einstündigen Inkubation konkurrieren das Biotin-markierte Estron-3-Sulfat und das Estron-3-Sulfat aus der Probe um die Bindungsplätze des spezifischen Antikörpers.

Nach Zugabe des Enzym-markierten Streptavidins bildet sich während der anschließenden 30-minütigen Inkubation zwischen dem an der Innenwand der Wells immobilisierten Biotin-markierten Estron-3-Sulfat und dem Enzym-markierten Streptavidin ein Komplex aus. Ungebundene Reaktionspartner werden in dem anschließenden Waschschrift entfernt.

Zugegebenes Substrat, 3',3',5',5'-Tetramethylbenzidin (TMB) wird vom gebundenen Enzym zu einem farbigen Endprodukt umgesetzt (blau). Durch Zugabe der Stopplösung nach 30 Minuten wird die enzymatische Reaktion gestoppt (Farbwechsel von gelb nach blau).

Die bei einer Wellenlänge von 450 nm gemessene Optische Dichte der Lösung ist zu der Konzentration an Estron-3-Sulfat in der Serumprobe umgekehrt proportional.

3 HINWEISE UND VORSICHTSMASSNAHMEN

1. Dieser Kit darf ausschließlich zur Gebrauch im Labor verwendet werden. Die Anwendung sollte durch Personal erfolgen, das speziell in Immunoassay-Verfahren unterrichtet und ausgebildet wurde.
2. Lesen Sie vor dem Testansatz sorgfältig die Packungsbeilage. Verwenden Sie nur die gültige, im Testkit enthaltene Arbeitsanleitung.
3. 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.
4. Proben und Reagenzien sollten so schnell wie möglich und in einer gleichbleibenden Sequenz pipettiert werden.
5. Verwenden Sie für jedes Reagenz einen separaten Pipettenaufsatz. Das gilt besonders für die Substratlösung. Wenn der Pipettenaufsatz der Substrat-Lösung 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.
6. Mischen Sie den Inhalt der Mikrotiterplatte sorgfältig, um gute Testergebnisse zu gewährleisten. Mikrotiterplatten nicht wiederverwenden!
7. Mikrotiterstreifen nicht austrocknen lassen während des Testlaufes. Nach jedem Waschschrift zügig im Testprotokoll fortfahren.
8. Bringen sie die Reagenzien vor dem Testansatz auf Raumtemperatur (18-25°C). Die Temperatur wirkt sich auf die Optische Dichte des Assays aus.

9. Nicht mit dem Mund pipettieren und den Kontakt von Kitbestandteilen und Proben mit Haut und Schleimhäuten vermeiden.
10. In den Bereichen, in denen Proben oder Kitbestandteile verwendet werden, nicht rauchen, essen oder Kosmetika verwenden.
11. Beim Umgang mit Proben oder Reagenzien Einweg-Latexhandschuhe tragen. Die Verunreinigung von Reagenzien oder Proben mit Mikroben kann zu falschen Ergebnissen führen.
12. Reagenzien nicht nach dem auf dem Kit-Etikett angegebenen Verfallsdatum verwenden.
13. Alle in der Packungsbeilage angegebenen Mengen müssen genau eingehalten werden. Optimale Ergebnisse können nur durch Verwendung kalibrierter Pipetten und Mikrotiterplatten-Lesegeräte erreicht werden.
14. 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.
15. 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.
16. Der Gebrauch sollte in Übereinstimmung mit den Verfahren erfolgen, welche durch eine nationale Gefahrenstoff-Sicherheitsrichtlinie festgelegt sind.
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 inkorrekt sein, bitte den Hersteller oder den Lieferanten des Kits kontaktieren.

4 KITBESTANDTEILE

4.1 Mitgelieferte Komponenten

1. **SORB MT** Teilbare Mikrotiterplatte, 12 x 8 (teilbar) Streifen mit 96 Vertiefungen, gebrauchsfertig **beschichtet mit einem polyklonalen anti-Estron-3-Sulfat-Antikörper.**
2. **CAL 0-6 LYO** Standards, 7 Flaschen, lyophilisiert, Rekonstitution erforderlich (siehe „Vorbereitung der Reagenzien“ (4.4)). Die Standards enthalten jeweils 0, 5, 10, 50, 100, 300 und 1000 ng/ml in Pferdeserum.
3. **BIOTIN CONJ** Biotin-markiertes Estron-3-Sulfat, 1 Flasche, 11 ml, gebrauchsfertig, farblos.
4. **ENZ CONJ** Enzym-markiertes Streptavidin, 1 Flasche, 3 ml, gebrauchsfertig, blau. Enthält Meerrettichperoxidase-markiertes Streptavidin in einer Puffermatrix.
5. **SAM BUF** Probenpuffer, 1 Flasche, 11 ml, gebrauchsfertig, gelb.
6. **SUB TMB** TMB-Substratlösung, 1 Flasche, 22 ml, gebrauchsfertig, farblos. 3,3',5,5'-Tetra-Methylbenzidin und Wasserstoffperoxid in gepufferter Lösung.
7. **STOP SOLN** Stopplösung, 1 Flasche, 7 ml, gebrauchsfertig; enthält 2 M Salzsäure. Kontakt mit der Stopplösung vermeiden! Kann Hautreizungen und Verbrennungen verursachen.
8. **WASH SOLN 10x** Waschlösung, 1 Flasche, 50 ml, 10x konzentriert, farblos; siehe „Vorbereitung der Reagenzien“ (4.4).

4.2 Erforderliche Hilfsmittel

- Mikrotiterplatten-Photometer mit optischem Filter für 450 nm
- Vortex-Mischer
- Mikrotiterplattenschüttler mit 900 rpm
- destilliertes Wasser
- Messzylinder für 500 ml
- Plastikgefäße zur Aufbewahrung des Waschpuffers
- Kalibrierte variable Mikropipetten, Dispenser, Mehrkanalpipetten
- Semilogarithmisches Papier oder Software zur Datenverarbeitung
- Zeitnahmegerät, Papiertücher

4.3 Lagerung der Komponenten

Die ungeöffneten Reagenzien behalten bei Lagerung bei 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. Vor Hitze und direkter Sonneneinstrahlung schützen.

Die Mikrotiterstreifen sollten bei 2-8°C gelagert werden. Der einmal geöffnete Folienbeutel sollte stets sehr sorgfältig wieder verschlossen werden.

Standards müssen gekühlt gelagert werden, nach dem Auflösen sind diese bis zu 7 Tage bei 2-8°C haltbar; für längere Aufbewahrung aliquotieren und bei $\leq -20^{\circ}\text{C}$ aufbewahren.

TMB-Substratlösung vor Licht schützen.

4.4 Vorbereitung der Reagenzien

Standards:

Standard 0 mit 2 ml dest. Wasser, Standards 1 bis 6 mit je 1 ml dest. Wasser 30 min. vor Gebrauch auflösen. Gut mischen.

Waschlösung:

Die 10x konzentrierte Waschlösung (50 ml) mit 450 ml dest. Wasser auf ein Gesamtvolumen von 500 ml verdünnen. Die verdünnte Waschlösung ist bei Raumtemperatur (18-25°C) für mindestens 12 Wochen stabil. Bei der Lagerung bei 2-8°C können sich Präzipitate bilden, die sich durch Schwenken bei Raumtemperatur (18-25°C) wieder auflösen.

4.5 Entsorgung des Kits

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

4.6 Beschädigte Testkits

Im Falle einer starken Beschädigung des Testkits oder der Komponenten muss die Firma Demeditec Diagnostics GmbH in schriftlicher Form spätestens eine Woche nach Erhalt des Kits informiert werden. 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

Die Bestimmung des equinen Estron-3-Sulfats wird bevorzugt im Serum durchgeführt. Es werden 20 μl Probe pro Einzelbestimmung benötigt. Die Proben können für eine Woche gekühlt bei 2-8°C oder bis zu 6 Monaten gefroren bei $\leq -20^{\circ}\text{C}$ gelagert werden. Die Proben sollten vor dem Einfrieren aliquotiert werden. Wiederholtes Einfrieren und Auftauen sollte vermieden werden.

Proben, deren Konzentration höher als der höchste Standardwert (1000 ng/ml) liegen könnte, sollten vor der Abarbeitung mit Nullstandard vorverdünnt werden. Die zusätzliche Verdünnungsstufe ist bei der Auswertung der Ergebnisse zu berücksichtigen.

Hämolytische, ikterische oder lipämische Proben sollten nicht verwendet werden. Proben, die Natriumazid enthalten, sollten nicht verwendet werden. Der Test zeigt Interferenzen mit Biotin, welche zu falsch positiven Ergebnissen führen können. Dies muss bei der Zugabe von Biotin z.B. in Form von Nahrungsmittelzusätzen berücksichtigt werden.

6 TESTDURCHFÜHRUNG

6.1 Allgemeine Anmerkungen

- Die Komponenten aus Kits verschiedener Chargen nicht austauschen.
- Alle Reagenzien und Proben müssen vor Gebrauch auf Raumtemperatur (18-25°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 zumindest in Doppelansätzen bestimmt werden.
- Die korrekte Durchführung der Waschschriffe ist entscheidend. Ungenügend gewaschene Wells ergeben falsche Ergebnisse. Die Verwendung einer Multikanalpipette bzw. eines Multistepers oder eines automatischen Waschgerätes für Mikrotiterplatten wird empfohlen. Zwischen den Inkubationen die Wells nicht austrocknen lassen. Beim Waschen und Ausklopfen dürfen die beschichteten Wells nicht beschädigt werden. Alle Reagenzien müssen daher mit Vorsicht pipettiert werden. Beim Waschvorgang ist es wichtig, dass alle Wells vollständig und gleichmäßig mit Waschlösung gefüllt werden und nach dem Ausklopfen kein Rückstand an Flüssigkeit zurückbleibt
- Jeder Testlauf muss eine eigene Standardkurve beinhalten.
- Zur internen Qualitätskontrolle empfehlen wir die Verwendung des **Estrone-3-Sulfate equine Control -Sets** mit der Kat.-Nr. DEV9933C. Für weitere Informationen kontaktieren Sie Demeditec.

6.2 Testdurchführung

- Vorbereitung der Standards: Die Standards werden lyophilisiert geliefert. Mindestens 30 Minuten vor Gebrauch werden Standard 0 mit 2,0 ml und Standards 1 bis 6 mit 1,0 ml dest. Wasser rekonstituiert. Während des Rekonstitutionsvorganges sollten die Fläschchen durch leichtes Schwenken gemischt werden.
Eine ausreichende Anzahl Mikrotiterplatten-Streifen zum Ansatz von Standards, Kontrollen und Proben in Doppelbestimmung vorbereiten; z. B.:

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
a	0	4	P2	P..								
b	0	4	P2	P..								
c	1	5	P3									
d	1	5	P3									
e	2	6	P4									
f	2	6	P4									
g	3	P1	P5									
h	3	P1	P5									

- Jeweils **20 µl der Standards, Kontrollen und Proben** entsprechend der Plattenbelegung auf den Boden der Wells pipettieren.
- 100 µl Biotin-markiertes Estron-3-Sulfat in jedes Well pipettieren.**
- 100 µl Probenpuffer** in jedes Well pipettieren.
- Platte **1 Stunde** bei Raumtemperatur (18-25°C) auf einem Mikrotiterplattenschüttler (900 rpm) inkubieren. **Danach nicht waschen oder abkippen!**
- 25 µl Enzym-markierte Streptavidin Lösung** in jedes Well pipettieren.
- Platte **30 Minuten** bei Raumtemperatur (18-25°C) auf dem Schüttler (900 rpm) inkubieren.
- Platte dekantieren und jedes Well 4-mal jeweils mit 300 µl Waschpuffer waschen. Restliche Flüssigkeit sorgfältig durch Ausklopfen der Platte entfernen.
- 200 µl TMB-Substratlösung** in jedes Well pipettieren.
- 30 Minuten bei Raumtemperatur (18-25°C) im Dunkeln** inkubieren.
- 50 µl Stopplösung** in jedes Well pipettieren.
- Die Optische Dichte bei 450 nm mit einem Mikrotiterplatten-Lesegerät innerhalb von 15 Minuten nach Zugabe der Stopplösung bestimmen.

6.3 Auswertung der Ergebnisse

- Die durchschnittlichen Werte der Optischen Dichte (OD) für jedes Set von Standards und Proben bestimmen.
- Die erhaltenen OD-Werte der Standards (y-Achse, linear) werden gegen ihre Konzentration (x-Achse, logarithmisch) entweder auf semi-logarithmischem Papier aufgetragen oder mit einer automatisierten Methode ausgewertet.
- Unter Verwendung der mittleren OD wird für jede Probe die entsprechende Konzentration aus der Standardkurve ermittelt.
- Automatische Methode: Die in der Arbeitsanleitung ermittelten Werte wurden automatisch mit Hilfe der 4 Parameter-Gleichung (4PL, 4 Parameter Logistics) bestimmt. Andere Auswertungsfunktionen können abweichende Werte ergeben.
- 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 berücksichtigt werden.

6.3.1 AUSWERTEBEISPIEL

Die folgende Tabelle zeigt typische Messwerte für den Demeditec Estrone-3-Sulfate equine ELISA. Die Daten dienen nur der Illustration und sind nicht dazu bestimmt, die Ergebnisse eines anderen Testansatzes danach zu berechnen.

Standard	Optische Dichte (450nm)
Calibrator 0 (0 ng/ml)	3,084
Calibrator 1 (5 ng/ml)	1,858
Calibrator 2 (10 ng/ml)	1,275
Calibrator 3 (50 ng/ml)	0,547
Calibrator 4 (100 ng/ml)	0,351
Calibrator 5 (300 ng/ml)	0,181
Calibrator 6 (1000 ng/ml)	0,100

7 NORMALWERTE

Im Rahmen einer Studie wurden mit dem Demeditec Estrone-3-Sulfate equine ELISA Test die folgenden Werte in Serumproben, die zwischen 8 und 9 Uhr morgens bzw. 5 und 6 Uhr abends entnommen wurden, bestimmt: Schwankungen während des Tagesverlaufes wurden nicht beobachtet

Gruppe	Absoluter Bereich (ng/ml)	n
Normale, nichtträchtige Stuten	nicht nachweisbar -10	22

In 26 Stuten wurde das Estron-3-Sulfat während der Trächtigkeit bestimmt:

Trächtigkeits- Woche	n	Mittelwert ng/ml	min ng/ml	max ng/ml
3	12	2.6	0.4	9.2
4	20	1.8	0.4	4.9
5	21	2.1	0.2	6.5
6	18	2.8	0.4	7.1
7	17	3.2	0.4	9.1
8	16	4.5	0.9	14.0
9	19	5.1	0.9	14.1
10	11	9.7	2.8	34.7
11	18	11	2.1	54.9
12	13	23	2.7	109
13	20	34	3.1	161
14	9	94	7.8	232
15	17	80	4.8	262
16	10	185	30.9	340
17	16	186	11.6	421
18	11	367	67.5	577
19	16	374	22.2	863
20	10	575	289	905
21	12	516	71.5	1233
22	9	497	247	889
23	11	571	106	861
24	12	634	263	1621
25	13	577	184	1229
26	9	528	255	949
27	12	523	213	1258
28	12	464	267	795
29	11	473	245	778
30	7	336	209	590
31	5	385	206	478
32	4	349	184	504
33	11	302	180	510
34	10	316	131	523
35	7	215	84	506
36	8	233	113	349
37	10	189	85	358
38	11	207	85	305
39	6	93	77	123
40	7	157	52	252
41	5	145	88	227
42	8	147	58	239
43	2	106	86	126
44	6	168	101	210
45	4	80	74	85
46	9	112	32	192
47	5	101	43	214
48	5	94	66	129

Da Faktoren wie Population, Labortechnik und Auswahl der Referenzgruppen diese Werte beeinflussen können, wird empfohlen, dass jeder Anwender seinen eigenen Normalbereich bezüglich seines Kollektivs festlegt. Die angegebenen Werte dienen nur zur Orientierung.

8 QUALITÄTSKONTROLLE

Es wird empfohlen, 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 normalen als auch pathologischen Werten eingesetzt werden.

Die Kontrollen mit den entsprechenden Ergebnissen des QC-Labors sind im QC-Zertifikat, das dem Kit beiliegt, aufgeführt. Die im QC-Zertifikat angegebenen Werte und Bereiche beziehen sich stets auf die aktuelle Kit-Lot und sollten zum direkten Vergleich der Ergebnisse verwendet werden.

Es sollten geeignete statistische Methoden zur Analyse von Kontroll-Werten und Trends angewendet werden. Wenn die Ergebnisse des Assays nicht mit den angegebenen Akzeptanzbereichen des Kontrollmaterials übereinstimmen, sollten die Patientenergebnisse als ungültig eingestuft werden.

In diesem Fall sollten die folgenden Bereiche überprüft werden: 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 TESTCHARAKTERISTIKA

9.1 Analytische Sensitivität

Die analytische Sensitivität, definiert als Mittelwert abzüglich der zweifachen Standardabweichung des Standards 0, beträgt 0,424 ng/ml.

9.2 Spezifität

Die folgenden Materialien wurden auf Kreuzreaktivität untersucht. Der Prozentsatz gibt die Kreuzreaktivität bei 50% Verdrängung im Vergleich zu Estron-3-Sulfat an.

Substanz	Konzentrationsbereich (ng/ml)	Kreuzreaktivität (%) bei 50% Bindung
Estron	1 – 10.000	10,44%
Estriol	1 – 10.000	<0,08%
Corticosteron	1 – 10.000	<0,08%
Equilin	1 – 10.000	<0,08%
Equilenin	1 – 10.000	0,70%
17-Hydroxyprogesteron	1 – 10.000	<0,08%
Androstendion	1 – 10.000	0,85%
5 α -Dihydrotestosteron	1 – 10.000	0,12%
Testosteron	1 – 10.000	0,08%
Progesteron	1 – 10.000	<0,08%
Androsteron	1 – 10.000	<0,08%
17 β -Estradiol	1 – 10.000	<0,08%
Pregnenolon	1 – 10.000	<0,08%
β -Estradiol-3-sulfat	1 – 10.000	0,68%
DHEA-S	1 – 10.000	0,10%
Cortison	1 – 10.000	<0,08%

9.3 Reproduzierbarkeit

9.3.1 Intra-Assay

Die Intra-Assay-Variation wurde ermittelt durch die Bestimmung von 20 Wiederholungsmessungen von drei Serumproben in einem Testansatz. Die Variation innerhalb des Assays ist nachfolgend dargestellt:

	Serum 1	Serum 2	Serum 3
Mittelwert (ng/ml)	30,1	176,4	472,6
SD	2,93	11,56	34,35
CV (%)	9,8	6,6	7,3
n =	20	20	20

9.3.2 Inter-Assay

Die Inter-Assay-Variation wurde durch Doppelbestimmungen von drei Serumproben in 10 verschiedenen Tests bestimmt.

	Serum 1	Serum 2	Serum 3
Mittelwert (ng/ml)	28,2	161,4	424,7
SD	3,58	18,22	59,64
CV (%)	12,7	11,3	14,0
n =	10	10	10

9.4 Wiederfindung

Die Wiederfindungsrate wurde durch Zugabe zunehmender Mengen des Analyten zu drei verschiedenen Proben, die unterschiedliche Mengen an endogenem Analyten enthielten, bestimmt. Jede Probe (nativ und nach Zugabe von definierten Mengen) wurde mit dem Demeditec Estrone-3-Sulfate equine ELISA gemessen. Die prozentualen Wiederfindungen wurden durch Vergleich der erwarteten und beobachteten Ergebnisse der Proben ermittelt.

Serum	Zugegebenes Estron-3-Sulfat (ng/ml)	Gemessen (ng/ml)	Erwartet (ng/ml)	Wiederfindung (%)
1	-	0,3	-	-
	50	59,3	50,3	118
	250	265,2	250,3	106
	500	416,7	500,3	83
2	-	0,3	-	-
	50	40,7	50,3	81
	250	224,9	250,3	90
	500	364,7	500,3	73
3	-	43,1	-	-
	50	85,7	93,1	92
	250	287,8	293,1	98
	500	422,7	543,1	78

9.5 Linearität

Drei Serumproben wurden unverdünnt und mit Nullstandard verdünnt untersucht. Die prozentuale Linearität wurde durch Vergleich der erwarteten und beobachteten Werte berechnet.

Serum	Verdünnung	Gemessen (ng/ml)	Erwartet (ng/ml)	Linearität (%)
1	nativ	201.6	-	-
	1 : 2	109.0	100.8	108
	1 : 4	56.4	50.4	112
	1 : 8	30.5	25.2	121
2	nativ	401.0	-	-
	1 : 2	198.1	200.5	99
	1 : 4	101.4	100.3	101
	1 : 8	44.6	50.1	89
3	nativ	476.2	-	-
	1 : 2	252.1	238.1	106
	1 : 4	147.5	119.0	124
	1 : 8	75.7	59.5	127

10 LIMITATIONEN

Zuverlässige und reproduzierbare Ergebnisse werden erzielt, wenn das Testverfahren unter vollständiger Beachtung der Anweisungen in der Packungsbeilage und unter Einhaltung der guten Laborpraxis durchgeführt wird. Jede unsachgemäße Handhabung von Proben oder Modifikation dieses Tests kann die Ergebnisse beeinflussen.

10.1 Interferierende Substanzen

- Keine hämolytischen, ikterischen oder lipämischen Proben verwenden, um Interferenzen zu vermeiden.
- Proben, die Natriumazid enthalten, sollten nicht in dem Test verwendet werden.
- Der Test zeigt Interferenzen mit Biotin, welche zu falsch positiven Ergebnissen führen können. Dies muss bei der Zugabe von Biotin z.B. in Form von Nahrungsmittelzusätzen berücksichtigt werden.
- Unspezifische Interferenzen mit diesem Immunoassay können nicht ausgeschlossen werden. Bei Verdacht auf unplausible Ergebnisse sollten diese als ungültig betrachtet und durch weitere Tests überprüft werden.

10.2 Interferenz von Medikamenten

Jedes Medikament (Creme, Öl, Pille, etc.), das Hormone enthält, könnte die Messung dieses Analyten beeinflussen. Klinisch bedeutsame Wechselwirkungen können mit strukturell ähnlichen Medikamenten nicht ausgeschlossen werden.

11 RECHTLICHE GRUNDLAGEN

11.1 Zuverlässigkeit der Ergebnisse

Der Test muss exakt gemäß der Arbeitsanleitung 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 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 Diagnostics GmbH 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. Ansprüche, die aufgrund einer Fehlinterpretation von Laborergebnissen durch den Kunden vorbehaltlich Punkt 11.2. geltend gemacht werden, sind ebenfalls ungültig.

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 05-05/22	zur aktuellen Version 6-06/23.
Deckblatt	VET-Symbol entfernt
Kap.3	Aktualisierung
Kap. 6.1	zusätzliche Information
Kap. 5 & 10.2	Information zu Interferenzen von Biotin
Allgemein	Redaktionelle Änderungen

13 LITERATUR






1. Bouhamidi R, Gaillard JL, Silberzahn P, Martin B
Binding of Estrogen-3-Sulfates to stallion plasma and equine serum albumine.
J Steroid Biochem 1992, 42: 345-349
2. Cox JE
Oestrone and equilin in the plasma of pregnant mare
J Reprod Fert 1975, Suppl 23: 463-468
3. Darenius K, Kindahl H, Knudsen O, Madej A, Edqvist LE
PMSG, progesterone and oestrone sulfate during normal pregnancy and early fetal death.
Departments of Obstetrics and Gynecology and Clinical Chemistry, Swedish University of
Agricultural Sciences, Uppsala, Sweden
4. Hearp RB, Hamon M, Allen WR.
Studies on oestrogen synthesis by the preimplantation equine conceptus
J Reprod Fert 1982: Suppl 32: 343-352
5. Hughes JP, Stabenfeldt GH, Warren EJ
Estrous cycle and ovulation in the mare
JAVMA 1972 161:1367-1374
6. Hyland JH, Wright PJ, Manning SJ.
An investigation of the use of plasma oestrone sulfate concentrations for the diagnosis of
pregnancy in mares.
Australian Vet J 1984, 61: 123
7. Jeffcott LB, Hyland JH, MacLean AA, Dyke T, Robertson-Smith G.
Changes in maternal hormone concentrations associated with induction of fetal death at day
45 of gestation in mares.
J Reprod Fert 1987, Suppl 35: 461-467
8. Hyland JH, Langsford DA.
Changes in urinary and plasma oestrone sulfate concentrations after induction foetal death
in mares at 45 days of gestation
Australian Vet J 1990, 67: 349-351
9. Kasman LH, Hughes JP, Stabenfeldt GH, Starr MD, Lasley BL
Estrone sulfate concentrations as an indicator of fetal demise in horses
Am J Vet Res 1988, 49: 184-187
10. Kindahl H, Knudsen O, Madej A, Edqvist LE.
Progesterone, prostaglandin F-2 α , PMSG and oestrone sulfate during early pregnancy in the mare.
J Reprod Fert 1982, Suppl 32: 353-359
11. Makawiti DW, Allen WE, Kilpatrick MJ
Changes in oestrone sulfate concentrations in peripheral plasma of pony mares associated with follicular
growth, ovulation and early pregnancy.
J Reprod Fert 1983, 68: 481-487
12. Muyan M, Roser JF, Dybal N, Baldwin DM.
Modulation of gonadotropin-releasing hormone-stimulated luteinizing hormone release in cultured male
equine anterior pituitary cells by gonadal steroids
Biol of Reprod 1993, 49: 340-345
13. Möstl E
The horse feto-placental unit.
Exp Clin Endocrin 1994, 102: 166-168
14. Ousey JC, Rossdale PD, Cash RSG, Worthy K.
Plasma concentrations of progestagens, oestrone sulfate and prolactin in pregnant mares
subjected to natural challenge with equid herpesvirus-1.
J Reprod Fert 1987, Suppl 35: 519-528
15. Parkes RD, Blackmore DJ, Rance DA, Park BK, Dean PDG
Plasma concentrations of equilin and oestrone in the assessment of fetoplacental function in the mare.
Vet Rec 1977, 100: 511-512
16. Sanchi EM, LeBlanc MM, Weston PG.
Progestagen, oestrone sulfate and cortisol concentrations in pregnant mares during medical
and surgical disease
J Reprod Fert 1991, Suppl 44: 627-634
17. Setchell BP, Cox JE.
Secretion of free and conjugated steroids by the horse testis into lymph and venous blood
J Reprod Fert 1982, Suppl 32: 123-127
18. Terqui M, Palmer E.
Oestrogen pattern during early pregnancy in the mare
J Reprod Fert 1979, Suppl 27: 441-446
19. Marks V.: False-Positive Immunoassay Results: A Multicenter Survey of Erroneous Immunoassay Results
from Assays of 74 Analytes in 10 Donors from 66 Laboratories in Seven Countries
Clinical Chemistry 2002, 48:11: 2008-2016
20. Tate & Ward (2004) Interferences in Immunoassays, Clin. Biochem Rev Vol 25, May 2004
21. Selby (1999): Interference in immunoassays; Ann. Clin. Biochem 1999, 36: 704-721

14 KURZANLEITUNG

(alle Volumenangaben in µl)

MT-Platten-Well	ng/ml	0	1	2	3	4	5	6	Probe
		0	5	10	50	100	300	1000	
Schritte	Lösung								
Pipettieren	Standard	20	20	20	20	20	20	20	-
Pipettieren	Probe	-	-	-	-	-	-	-	20
Pipettieren	Biotin-markiertes Estron-3-Sulfat	100	100	100	100	100	100	100	100
Pipettieren	Probenpuffer	100	100	100	100	100	100	100	100
1 Stunde bei RT (18-25°C) auf einem Schüttler (900 rpm) inkubieren Anschließend nicht waschen!									
Pipettieren	Enzym-markiertes Streptavidin	25	25	25	25	25	25	25	25
30 Minuten bei RT (18-25°C) auf einem Schüttler (900 rpm) inkubieren									
Dekantieren 4x mit 300 µl Waschlösung waschen									
Pipettieren	Substratlösung	200	200	200	200	200	200	200	200
30 min bei RT (18-25°C) im Dunkeln inkubieren									
Pipettieren	Stopplösung	50	50	50	50	50	50	50	50
Messen bei $\lambda = 450 \text{ nm}$									

SYMBOLS USED WITH DEMEDITEC ASSAYS

Symbol	English	Deutsch	Française	Espanol	Italiano
	European Conformity	CE-Konformitätskennzeichnung	Conforme aux normes européennes	Conformidad europea	Conformità europea
	Consult instructions for use	Gebrauchsanweisung beachten	Consulter les instructions d'utilisation	Consulte las Instrucciones	Consultare le istruzioni per l'uso
	In vitro diagnostic device	In-vitro-Diagnostikum	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 conservación	Temperatura di conservazione
	Expiration Date	Mindesthaltbarkeitsdatum	Date limite d'utilisation	Fecha de caducidad	Data di scadenza
	Legal Manufacturer	Hersteller	Fabricant	Fabricante	Fabbricante
<i>Distributed by</i>	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