

# Product information

Information about other products is available at: [www.demeditec.com](http://www.demeditec.com)

---



User's Manual

# Estradiol free in Saliva ELISA

Enzyme immunoassay for the in vitro diagnostic quantitative measurement of active free Estradiol in saliva



**DESLV4188**



**96 wells**

**Contents / Inhaltsverzeichnis**

1	INTRODUCTION.....	3
2	PRINCIPLE OF THE TEST .....	3
3	WARNINGS AND PRECAUTIONS .....	4
4	REAGENTS.....	5
5	SPECIMEN COLLECTION AND PREPARATION.....	6
6	ASSAY PROCEDURE .....	7
7	EXPECTED NORMAL VALUES.....	8
8	QUALITY CONTROL .....	8
9	PERFORMANCE CHARACTERISTICS.....	9
10	LIMITATIONS OF USE .....	10
11	LEGAL ASPECTS.....	11
12	REFERENCES / LITERATURE.....	11
1	EINLEITUNG.....	12
2	TESTPRINZIP .....	12
3	VORSICHTSMAßNAHMEN .....	12
4	BESTANDTEILE DES KITS .....	13
5	PROBENVORBEREITUNG.....	14
6	TESTDURCHFÜHRUNG .....	15
7	ERWARTETE WERTE.....	16
8	QUALITÄTSKONTROLLE.....	16
9	ASSAY CHARACTERISTIKA.....	17
10	GRENZEN DES TESTS.....	17
11	RECHTLICHE GRUNDLAGEN .....	18
12	REFERENZEN /LITERATUR .....	18
	SYMBOLS USED WITH DEMEDITEC ASSAYS.....	20

## 1 INTRODUCTION

### 1.1 Intended Use

Enzyme immunoassay for the *in vitro diagnostic* quantitative measurement of active free Estradiol, an estrogenic steroid, in saliva. Results may be used to assess fertility problems in women; to diagnose menopause, and to monitor hormone replacement therapy.

### 1.2 Summary and Explanation

Estradiol (1,3,5(10)-estratriene-3,17 $\beta$ -diol; 17 $\beta$ -estradiol; E2) is a C18 steroid hormone with a phenolic A ring. This steroid hormone has a molecular weight of 272.4. It is the most potent natural Estrogen, produced mainly by the Graafian follicle of the female ovary and the placenta, and in smaller amounts by the adrenals, and the male testes (1--3)

Estradiol (E2) is secreted into the blood stream where 98% of it circulates bound to sex hormone binding globulin (SHBG) and to a lesser extent to other serum proteins such as albumin. Only a small fraction circulates as free hormone or in the conjugated form (4,5). Estrogenic activity is effected via estradiol-receptor complexes which trigger the appropriate response at the nuclear level in the target sites. These sites include the follicles, uterus, breast, vagine, urethra, hypothalamus, pituitary and to a lesser extent the liver and skin.

In non-pregnant women with normal menstrual cycles, estradiol secretion follows a cyclic, biphasic pattern with the highest concentration found immediately prior to ovulation (6,7). The rising estradiol concentration is understood to exert a positive feedback influence at the level of the pituitary where it influences the secretion of the gonadotropins, follicle stimulating hormone (FSH), and luteinizing hormone (LH), which are essential for follicular maturation and ovulation, respectively (8). Following ovulation, estradiol levels fall rapidly until the luteal cells become active resulting in a secondary gentle rise and plateau of estradiol in the luteal phase. During pregnancy, maternal serum Estradiol levels increase considerably, to well above the pre-ovulatory peak levels and high levels are sustained throughout pregnancy (9).

## 2 PRINCIPLE OF THE TEST

The Demeditec Estradiol free in Saliva ELISA kit is based on the competition principle and the microplate separation. An unknown amount of Estradiol present in the sample and a fixed amount of Estradiol conjugated with horse-radish peroxidase compete for the binding sites of a polyclonal Estradiol antiserum coated onto the wells. After two hours incubation the microtiter plate is washed to stop the competition reaction. Having added the substrate solution the concentration of Estradiol is inversely proportional to the optical density measured.

### 3 WARNINGS AND PRECAUTIONS

1. This kit is for in vitro diagnostic use only. For professional use only.
2. All reagents of this test kit which contain human serum or plasma have been tested and confirmed negative for HIV I/II, HBsAg and HCV by FDA approved procedures. All reagents, however, should be treated as potential biohazards in use and for disposal.
3. Before starting the assay, read the instructions completely and carefully. Use the valid version of the package insert provided with the kit. Be sure that everything is understood.
4. The microplate contains snap-off strips. Unused wells must be stored at 2 °C to 8 °C in the sealed foil pouch and used in the frame provided.
5. Pipetting of samples and reagents must be done as quickly as possible and in the same sequence for each step.
6. Use reservoirs only for single reagents. This especially applies to the substrate reservoirs. Using a reservoir for dispensing a substrate solution that had previously been used for the conjugate solution may turn solution colored. Do not pour reagents back into vials as reagent contamination may occur.
7. Mix the contents of the microplate wells thoroughly to ensure good test results. Do not reuse microwells.
8. Do not let wells dry during assay; add reagents immediately after completing the rinsing steps.
9. Allow the reagents to reach room temperature (21 °C to 26 °C) before starting the test. Temperature will affect the absorbance readings of the assay. However, values for the patient samples will not be affected.
10. Never pipet by mouth and avoid contact of reagents and specimens with skin and mucous membranes.
11. Do not smoke, eat, drink or apply cosmetics in areas where specimens or kit reagents are handled.
12. Wear disposable latex gloves when handling specimens and reagents. Microbial contamination of reagents or specimens may give false results.
13. Handling should be done in accordance with the procedures defined by an appropriate national biohazard safety guideline or regulation.
14. Do not use reagents beyond expiry date as shown on the kit labels.
15. All indicated volumes have to be performed according to the protocol. Optimal test results are only obtained when using calibrated pipettes and 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* containing 0.5 M H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>. It may cause skin irritation and burns.
18. Some reagents contain Proclin, BND and MIT as preservatives. In case of contact with eyes or skin, flush immediately with water.
19. TMB substrate has an irritant effect on skin and mucosa. In case of possible contact, wash eyes with an abundant volume of water and skin with soap and abundant water. Wash contaminated objects before reusing them. If inhaled, take the person to open air.
20. Chemicals and prepared or used reagents have to be treated as hazardous waste according to the national biohazard safety guideline or regulation.
21. For information on hazardous substances included in the kit please refer to Safety Data Sheets. Safety Data Sheets for this product are available upon request directly from Demeditec.

## 4 REAGENTS

### 4.1 Reagents provided

1. **SORB MT** Microtiterwells, 12x8 (break apart) strips, 96 wells;  
Wells coated with a anti-Estradiol antibody (polyclonal).
2. **CAL 0 – 5** Standard (Standard 0-5), 6 vials, 1 mL each, ready to use;  
Concentration: 0, 1, 5, 10, 50, 100 pg/mL  
Contain non-mercury preservative.
3. **CONTROL low & high** Control Low & High, 2 vials, 1.0 mL each, ready to use;  
Control values and ranges please refer to vial label or QC-Datasheet.  
Contain non-mercury preservative.
4. **ENZ CONJ** Enzyme Conjugate, 1 vial, 26 mL, ready to use;  
Estradiol conjugated to horseradish peroxidase;  
Contain non-mercury preservative.
5. **SUB TMB** Substrate Solution, 1 vial, 25 mL, ready to use;  
Tetramethylbenzidine (TMB).
6. **STOP SOLN** Stop Solution, 1 vial, 14 mL, ready to use;  
contains 0.5 M H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>.  
Avoid contact with the stop solution. It may cause skin irritations and burns.
7. **WASH SOLN 40x** Wash Solution, 1 vial, 30 mL; Concentrate for 1200 mL.

### 4.2 Material required but not provided

- Calibrated EIA reader adjusted to read at 450 nm
- Calibrated variable precision micropipettes (100 µL and 200 µL)
- Distilled or Deionized water
- 0.9% NaCl solution
- Timer (60 min. range)
- Reservoirs (disposable)
- Test tube or microtube rack in a microplate configuration
- Semi-logarithmic graph paper or software for data reduction

### 4.3 Storage Conditions

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

Opened reagents must be stored at 2 °C to 8 °C. Microtiter wells must be stored at 2 °C to 8 °C. Once the foil bag has been opened, care should be taken to close it tightly again.

Opened kits retain activity for two months if stored as described above.

### 4.4 Reagent Preparation

Bring all reagents to room temperature before use.

### Wash Solution

Add deionized water to the 40X concentrated Wash Solution.

Dilute 30 mL of concentrated *Wash Solution* with 1170 mL deionized water to a final volume of 1200 mL. *The diluted Wash Solution is stable for 2 weeks at room temperature.*

### 4.5 Disposal of the Kit

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

### 4.6 Damaged Test Kits

In case of any severe damage to the test kit or components, DEMEDITEC has to be informed in writing, at the latest, one week after receiving the kit. Severely damaged single components should not be used for a test run. They have to be stored until a final solution has been found. After this, they should be disposed according to the official regulations.

## 5 SPECIMEN COLLECTION AND PREPARATION

Samples containing sodium azide should not be used in the assay. The saliva samples should be completely colorless. Even the slightest red color shows blood contamination. Such blood contamination will give falsely elevated concentration values. In case of visible blood contamination the patient should discard the sample, rinse the sampling device with tap water, also rinse the mouth with (preferably) cold water, wait for 10 minutes and take a new sample. Do not chew anything during the sampling period. Any pressure on the teeth may result in falsely elevated measurements due to an elevated content of gingival liquid in the saliva sample.

### 5.1 Specimen Collection

For the correct collection of saliva we are recommending to only use appropriate devices made from ultra-pure polypropylene. Do not use any PE devices or Salivettes for sampling; this in most cases will result in significant interferences. Glass tubes can be used as well, but in this case special attention is necessary for excluding any interference caused by the stopper. Please contact Demeditec Diagnostics for more details. As food might contain significant amounts of steroid hormones samples preferably should be taken while fasting. If fasting should be a problem at least any food of animal origin (meat or dairy products) should be avoided prior to finalizing the collection. In the morning breakfast should be done only after finalizing the collection procedure. During the day the collection period should be timed just before an anticipated meal. As the steroid hormone secretion in saliva as well in serum shows an obvious dynamic secretion pattern throughout the day it is important to always collect 5 samples during a 2 hour period; this means every 30 minutes one sample. If possible the volume of each single sample should be a minimum of 0.5 ml (better 1 ml). Saliva flow may be stimulated by drinking water. This is allowed and even recommended before and during the collection period. Drinking of water is not allowed during the last 5 minutes before taking the single samples. The typical timing for a morning collection period would be as follows. Wake-up at 6:00 AM, drinking water and brushing teeth, 1<sup>st</sup> sample at 6:15 AM, followed by samples at 6:45 AM, 7:15 AM, 7:45 AM, and 8:15 AM, followed by breakfast at 8:25 AM. The typical timing for an afternoon collection period would be like: 1<sup>st</sup> sample at 5:00 PM, followed by samples at 5:30 PM, 6:00 PM, 6:30 PM, 7:00 PM, followed by dinner at 7:10 PM. Modest variation in the collection timing will not be critical, and the collection time-frame can be extended up to 3 hours.

### 5.2 Specimen Storage and Preparation

Saliva samples in general are stable at ambient temperature for several days. Therefore mailing of such samples by ordinary mail without cooling will not create a problem. Storage at 4°C can be done for a period of up to one week. Whenever possible samples preferable should be kept at a temperature of -20°C. Even repeated thawing and freezing is no problem. Each sample has to be frozen, thawed, and centrifuged at least once anyhow in order to separate the mucins by centrifugation. Upon arrival of the samples in the lab the samples have to stay in the deep freeze at least overnight. Next morning the frozen samples are warmed up to room temperature and mixed carefully. Then the samples have to be centrifuged for 5 to 10 minutes. Now the clear colorless supernatant is easy to pipette. If the sample should show even a slight reddish tinge it should be discarded. Otherwise the concentration value most probably will be falsely elevated. Due to the episodic variations of the steroid secretion we highly recommend the strategy of multiple sampling. If such a set of multiple samples has to be tested the lab (after at least one freezing, thawing, and centrifugation cycle) has to mix the aliquots of the 5 single samples in a separate sampling device and perform the testing from this mixture.

### 5.3 Specimen Dilution

If in an initial assay, a specimen is found to contain more than the highest standard, the specimens can be diluted with 0.9 % NaCl and re-assayed as described in Assay Procedure.

For the calculation of the concentrations this dilution factor has to be taken into account.

Example:

- a) Dilution 1:10: 10 µL saliva + 90 µL 0.9 % NaCl (mix thoroughly)
- b) Dilution 1:100: 10 µL of dilution a + 90 µL 0.9 % NaCl (mix thoroughly).

## 6 ASSAY PROCEDURE

### 6.1 General Remarks

- All reagents and specimens must be allowed to come to room temperature before use. All reagents must be mixed without foaming.
- Once the test has been started, all steps should be completed without interruption.
- Use new disposal plastic pipette tips for each standard, control or sample in order to avoid cross contamination.
- Absorbance is a function of the incubation time and temperature. Before starting the assay, it is recommended that all reagents are ready, caps removed, all needed wells secured in holder, etc. This will ensure equal elapsed time for each pipetting step without interruption.
- As a general rule the enzymatic reaction is linearly proportional to time and temperature.

### 6.2 Test Procedure

Each run must include a standard curve.

All standards, samples, and controls should be run in duplicate. All standards, samples, and controls should be run concurrently so that all conditions of testing are the same.

1. Secure the desired number of Microtiter wells in the holder.
2. Dispense **100 µL** of each *Standard*, *Control* and samples with new disposable tips into appropriate wells.
3. Incubate for **30 minutes** at room temperature
4. Dispense **200 µL** of *Enzyme Conjugate* into each sample and standard well  
Mix the plate thoroughly for 10 seconds. It is important to have a complete mixing in this step.
5. Incubate for **120 minutes** at room temperature.
6. Briskly shake out the contents of the wells.  
Rinse the wells **3 times** with diluted Wash Solution (400 µL per well). Strike the wells sharply on absorbent paper to remove residual droplets.  
**Important note:** The sensitivity and precision of this assay is markedly influenced by the correct performance of the washing procedure!
7. Add **200 µL** of *Substrate Solution* to each well.
8. Incubate for **30 minutes** at room temperature.
9. Stop the enzymatic reaction by adding **100 µL** of *Stop Solution* to each well.
10. Determine the absorbance (OD) of each well at **450±10 nm** with a microtiter plate reader.  
It is recommended that the wells be read **within 10 minutes** after adding the *Stop Solution*.

### 6.3 Calculation of Results

1. Calculate the average absorbance values for each set of standards, controls and patient samples.
2. Using semi-logarithmic graph paper, construct a standard curve by plotting the mean absorbance obtained from each standard against its concentration with absorbance value on the vertical (Y) axis and concentration on the horizontal (X) axis.
3. Using the mean absorbance value for each sample, determine the corresponding concentration from the standard curve.
4. Automated method: The results in the IFU have been calculated automatically using a 4 PL (4 Parameter Logistics) curve fit. 4 Parameter Logistics is the preferred method. Other data reduction functions may give slightly different results.
5. The concentration of the samples can be read directly from this standard curve. Samples with concentrations higher than that of the highest standard have to be further diluted or reported as > 100 pg/mL. For the calculation of the concentrations this dilution factor has to be taken into account.

### 6.3.1 Example of Typical Standard Curve

The following data is for demonstration only and **cannot** be used in place of data generations at the time of assay.

Standard	Absorbance Units
Standard 0 (0 pg/mL)	1.89
Standard 1 (1 pg/mL)	1.71
Standard 2 (5 pg/mL)	1.48
Standard 3 (10 pg/mL)	1.20
Standard 4 (50 pg/mL)	0.46
Standard 5 (100 pg/mL)	0.32

## 7 EXPECTED NORMAL VALUES

In order to determine the normal range of salivary Estradiol, 18 saliva samples from adult male and 54 female apparently healthy subjects, ages 19 to 75 years, were collected in the morning and analyzed using the Demeditec salivary Estradiol ELISA kit. The following ranges were calculated from this study.

	Age group	Salivary Estradiol [pg/mL]
<b>Women</b>	19 - 50 years	n = 41 0.6 – 6.3
	51 - 75 years	Postmenopausal: n = 13 0.6 – 3.1
<b>Men</b>	18 - 75 years	n = 18 0.6 – 3.1

Therapy should not be decided based on results alone. The results should be correlated to other clinical observations and diagnostic tests. Salivary Estradiol values show a clear circadian rhythm. We therefore recommend the saliva samples be obtained the same hour each day.

Furthermore, we recommend that each laboratory establish its own range for the population tested, because the values differ between age, new born, children, adolescents and adults.

## 8 QUALITY CONTROL

Good laboratory practice requires that controls be run with each calibration curve. A statistically significant number of controls should be assayed to establish mean values and acceptable ranges to assure proper performance. It is recommended to use control samples according to state and federal regulations. The use of control samples is advised to assure the day to day validity of results. Use controls at both normal and pathological levels.

The controls and the corresponding results of the QC-Laboratory are stated in the QC certificate added to the kit. The values and ranges stated on the QC sheet always refer to the current kit lot and should be used for direct comparison of the results.

It is also recommended to make use of national or international Quality Assessment programs in order to ensure the accuracy of the results. Employ appropriate statistical methods for analysing control values and trends. If the results of the assay do not fit to the established acceptable ranges of control materials patient results should be considered invalid. In this case, please check the following technical areas: Pipetting and timing devices; photometer, expiration dates of reagents, storage and incubation conditions, aspiration and washing methods. After checking the above mentioned items without finding any error contact your distributor or DEMEDITEC directly.



## 9 PERFORMANCE CHARACTERISTICS

### 9.1 Assay Dynamic Range

The range of the assay is between 0.6 – 100 pg/mL.

### 9.2 Specificity

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

Compound	% Cross reactivity	Compound	% Cross reactivity
Estradiol-17 $\beta$	100	11-Deoxycortisol	0
Androstenedione	0	21-Deoxycortisol	0
Androsterone	0	Dihydrotestosterone	0
Corticosterone	0	Dihydroepiandrosterone	0
Cortisone	0	20-Dihydroprogesterone	0
Epiandrosterone	0	11-Hydroxyprogesterone	0
16-Epiestriol	0	17 $\alpha$ -Hydroxyprogesterone	0.003
Estradiol-3-sulfate	0	17 $\alpha$ -Pregnenolone	0
Estradiol-3-glucuronide	0	17 $\alpha$ -Progesterone	0
Estradiol-17 $\alpha$	0	Pregnanediol	0
Estriol	2.27	Pregnanetriol	0
Estriol-16-glucuronide	0	Pregnenolone	0
Estrone	6.86	Progesterone	0
Estrone-3-sulfate	0	Testosterone	0.033
Dehydroepiandrosterone	0	Fulvestrant	0.9

### 9.3 Sensitivity

The lowest detectable level of Estradiol that can be distinguished from the Zero Standard is 0.6 pg/mL at the 95 % confidence limit.

### 9.4 Reproducibility

#### 9.4.1 Intra Assay

The intra-assay variation was determined by 20 replicate measurements of three saliva samples using Demeditec ELISA kit.

The within assay variability is shown below:

	Sample 1	Sample 2	Sample 3
Mean (pg/mL)	8.3	30.5	21.4
SD (pg/mL)	0.7	0.7	0.7
CV (%)	8.3	2.4	3.2
n =	20	20	20

#### 9.4.2 Inter Assay

The inter-assay (between-run) variation was determined by duplicate measurements of four saliva samples over 10 different days runs.

The between assay variability is shown below:

	Sample 1	Sample 2	Sample 3	Sample 4
Mean (pg/mL)	6.6	29.9	65.0	20.4
SD (pg/mL)	0.8	1.5	1.8	1.3
CV (%)	12.0	4.9	2.8	6.5
n =	40	40	40	40

### 9.5 Recovery

Recovery of the Demeditec ELISA was determined by adding increasing amounts of the analyte to three different saliva samples containing different amounts of endogenous analyte. Each sample (non-spiked and spiked) was assayed and analyte concentrations of the samples were calculated from the standard curve. The percentage recoveries were determined by comparing expected and measured values of the samples.

	Sample 1	Sample 2	Sample 3
<b>Concentration (pg/mL)</b>	0.6	19.8	20.8
<b>Average % recovery</b>	98.9	90.1	106.3
<b>Range of Recovery %</b>	<b>from</b> 86.6	<b>from</b> 85.4	<b>from</b> 102.4
	<b>to</b> 112.0	<b>to</b> 96.1	<b>to</b> 111.0

### 9.6 Linearity

Three samples (saliva) containing different amounts of analyte were serially diluted up to 1:16 with 0.9% NaCl and assayed with the Demeditec ELISA. The percentage recovery was calculated by comparing the expected and measured values for salivary estradiol.

	Sample 1	Sample 2	Sample 3
<b>Concentration (pg/mL)</b>	75.6	62.9	31.7
<b>Average % recovery</b>	104.8	95.7	91.6
<b>Range of Recovery %</b>	<b>from</b> 96.0	<b>from</b> 88.5	<b>from</b> 90
	<b>to</b> 112.8	<b>to</b> 106.7	<b>to</b> 93.3

## 10 LIMITATIONS OF USE

Reliable and reproducible results will be obtained when the assay procedure is performed with a complete understanding of the package insert instruction and with adherence to good laboratory practice. Any improper handling of samples or modification of this test might influence the results. The patient should not eat, drink, chew gum or brush teeth for 30 minutes before sampling. Otherwise rinse mouth thoroughly with cold water 5 min prior to sample collection. Do not collect samples when oral diseases, inflammation or lesions exist (blood contamination).

### 10.1 Interfering Substances

Blood contamination of more than 0.16% in saliva samples will affect results, and usually can be seen by eye. Therefore, samples containing any visible blood should not be used. Concentrations of Sodium Azide  $\geq$  0.02% interferes in this assay and may lead to false results.

### 10.2 Drug Interferences

The Estradiol free in Saliva ELISA should not be used for patients being treated with the drug fulvestrant (Faslodex<sup>®</sup>) which cross reacts in the Estradiol free in Saliva ELISA and could lead to falsely elevated test results.

### 10.3 High-Dose-Hook Effect

No hook effect was observed in this test.

## 11 LEGAL ASPECTS

**Only for countries where the declaration of European Conformity (CE mark) is applicable.**

### 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 Therapeutic Consequences

Therapeutic consequences should never be based on laboratory results alone even if all test results are in agreement with the items as stated under point 11.1. Any laboratory result is only a part of the total clinical picture of a patient. Only in cases where the laboratory results are in acceptable agreement with the overall clinical picture of the patient should therapeutic consequences be derived. The test result itself should never be the sole determinant for deriving any therapeutic consequences.

### 11.3 Liability

Any modification of the test kit and/or exchange or mixture of any components of different lots from one test kit to another could negatively affect the intended results and validity of the overall test. Such modification and/or exchanges invalidate any claim for replacement. Claims submitted due to customer misinterpretation of laboratory results subject to point 11.2. are also invalid. Regardless, in the event of any claim, the manufacturer's liability is not to exceed the value of the test kit. Any damage caused to the test kit during transportation is not subject to the liability of the manufacturer.

## 12 REFERENCES / LITERATURE

1. Tsang B.K., et al. (1980) Steroid biosyntheses by isolated human ovarian follicular cells in vitro, *J. Clin. Endocrinol. Metab.* 51, 1407 – 11
2. Gore-Langton R. E. et al. (1988): Follicular steroidogenesis and its control. In: *The physiology of Reproduction*. Ed.: Knobil et al. pp.331-385, Raven press, New York
3. Hall, P.F. (1988): Steroid synthesis: Organization and Regulation. In: *The Physiology of Reproduction*. Ed.: Knobil et al., pp 975 – 988, Raven press, New York
4. Siiteri P.K. et al. (1982): The serum transport of steroid hormones. *Rec. Progr. Horm. Res.* 38, 457 – 510
5. Martin B. et al. (1981): Binding of steroids by proteins in follicular fluid of the human ovary. *J. Clin. Endocrinol. Metab.* 35, 443 – 447
6. Baird D.T. (1976): Ovarian steroid secretion and metabolism in women. In: *The Endocrine function of the human ovary*. Eds.: James V.H.T., Serio M. and Guisti G., pp. 125 – 33, Academic press, New York
7. McNitty K.P. et al. (1976): Concentration of estrogens and androgens in human ovarian venous plasma and follicular fluid throughout the menstrual cycle. *J. Endocrinol.* 71, 77 –85
8. March C.M. et al. (1979): Roles of estradiol and progesterone in eliciting mid-cycle luteinizing hormone and follicle stimulating hormone surges. *J. Clin. Endocrinol. Metab.* 49, 507 – 12
9. Simpson E.R. and McDonald P.C. (1981): Endocrinology of pregnancy. In: *Textbook of Endocrinology*, Ed.: Williams R.H. pp. 412 – 22, Saunders Company, Philadelphia

## 1 EINLEITUNG

Der **Demeditec Estradiol free in Saliva ELISA** wird zur quantitativen Bestimmung von Estradiol in Speichel eingesetzt.

Die Ergebnisse können eingesetzt werden bei der Beurteilung von Fertilitätsstörungen bei der Frau, zur Diagnose der Menopause und zur Überwachung bei Hormonersatztherapie.

**Nur für In-vitro Diagnostik.**

## 2 TESTPRINZIP

Der Demeditec Estradiol free in Saliva ELISA ist ein Festphasen-Enzymimmunoassay, der auf dem Prinzip der kompetitiven Bindung basiert.

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

Die Proben werden in die beschichteten Wells 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 Wells.

Das nicht gebundene Konjugat wird durch Waschen der Wells entfernt. Anschließend wird die Substratlösung zugegeben und die Farbentwicklung nach einer definierten Zeit gestoppt.

Die Intensität der gebildeten Farbe ist umgekehrt proportional der Estradiol-Konzentration in der Probe. Die Extinktion wird bei 450 nm mit einem Mikrotiterplattenleser gemessen.

## 3 VORSICHTSMAßNAHMEN

- Dieser Kit ist nur zum in vitro diagnostischen Gebrauch geeignet.
- Informationen zu im Kit enthaltenen gefährlichen Substanzen entnehmen Sie bitte dem Material Sicherheitsdatenblatt.
- Alle Bestandteile dieses Testkits, die humanes Serum oder Plasma enthalten, wurden mit FDA-geprüften Methoden auf HIV I/II, HbsAg und HCV getestet und als negativ bestätigt. Jedoch sollten alle Bestandteile im Umgang und bei der Entsorgung wie mögliche Gefahrenstoffe betrachtet werden.
- Der Kontakt mit der *Stop Solution* sollte vermieden werden, da sie 0.5 M H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> enthält. Schwefelsäure kann Hautreizungen und Verbrennungen verursachen.
- Nicht mit dem Mund pipettieren und den Kontakt von Kitbestandteilen und Proben mit Haut und Schleimhäuten vermeiden.
- In den Bereichen, in denen Proben oder Kitbestandteile verwendet werden, nicht rauchen, essen oder Kosmetika verwenden.
- Beim Umgang mit Proben oder Reagenzien Einweg-Latexhandschuhe tragen. Die Verunreinigung von Reagenzien oder Proben mit Mikroben kann zu falschen Ergebnissen führen.
- Der Gebrauch sollte gemäß der Vorschriften einer entsprechenden nationalen Gefahrenstoff-Sicherheitsrichtlinie erfolgen.
- Reagenzien nicht nach dem auf dem Kit-Etikett angegebenen Verfallsdatum verwenden.
- Alle im Kit-Protokoll angegebenen Mengen müssen genau eingehalten werden. Optimale Ergebnisse können nur durch Verwendung kalibrierter Pipetten und Mikrotiterplatten-Lesegeräte erreicht werden.
- Komponenten von Kits mit unterschiedlichen Lotnummern nicht untereinander vertauschen. Es wird empfohlen, keine Wells von verschiedenen Platten zu verwenden, auch nicht, wenn es sich um das gleiche Lot handelt. Die Kits können unter anderen Bedingungen gelagert oder versendet worden sein, so dass die Bindungscharakteristik der Platten leicht unterschiedlich ausfällt.
- Chemikalien und zubereitete oder bereits benutzte Reagenzien müssen gemäß den nationalen Gefahrenstoffvorschriften wie gefährlicher Abfall behandelt werden.
- Sicherheitsdatenblätter für dieses Produkt sind auf Anfrage direkt von der Firma Demeditec Diagnostics GmbH

## 4 BESTANDTEILE DES KITS

### 4.1 Kitinhalt

1. **SORB MT** Microtiterwells, 96 Wells, 12x8 Wells (einzeln brechbar); mit anti-Estradiol-Antikörper (polyklonal) beschichtet.
2. **CAL 0 – 5** Standard (Standard 0-5), 6 Fläschchen, je 1 mL, gebrauchsfertig; Konzentrationen: 0,0; 1, 5, 10, 50, 100 pg/mL Enthält quecksilberfreies Konservierungsmittel.
3. **CONTROL low & high** Control Low & High (Kontrollen), 2 Fläschchen, je 1,0 mL; gebrauchsfertig; enthält quecksilberfreies Konservierungsmittel. Kontrollwerte und -bereiche entnehmen Sie bitte dem Fläschchenetikett oder dem QC-Datenblatt.
4. **ENZ CONJ** Enzyme Conjugate (Enzymkonjugat), 1 Fläschchen, 26 mL, gebrauchsfertig; Estradiol mit Meerrettichperoxidase konjugiert. Enthält quecksilberfreies Konservierungsmittel.
5. **SUB TMB** Substrate Solution (Substratlösung), 1 Fläschchen, 25 mL, gebrauchsfertig; Substratlösung TMB.
6. **STOP SOLN** Stop Solution (Stopplösung), 1 Fläschchen, 14 mL, gebrauchsfertig; Enthält 0,5 M H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>. Kontakt mit der Stopplösung vermeiden! Kann Hautreizungen und Verbrennungen verursachen.
7. **WASH SOLN 40x** Wash Solution (Waschlösung), **40X** konzentriert, 1 Fläschchen, 30 mL; Siehe „Vorbereitung der Reagenzien“.

### 4.2 Nicht im Kit enthaltene aber erforderliche Geräte und Materialien

- Kalibriertes Mikrotiterplattenlesegerät mit 450 ± 10 nm Filter)
- Kalibrierte variable Präzisions-Mikropipette (100 µL, 200 µL)
- Saugfähiges Papier
- Aqua dest.
- 0,9% NaCl-Lösung

### 4.3 Lagerung und Haltbarkeit des Kits

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

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

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

Unter den beschriebenen Lagerbedingungen behalten geöffnete Kits zwei Monate ihre Reaktivität.

### 4.4 Vorbereitung der Reagenzien

Alle Reagenzien sowie die benötigte Anzahl von Wells sollen vor dem Gebrauch auf Raumtemperatur gebracht werden.

#### **Wash Solution**

Die 40-fach konzentrierte Waschlösung (30 mL) mit 1170 mL destilliertem Wasser auf ein Gesamtvolumen von 1200 mL verdünnen.

*Die verdünnte Waschlösung ist bei Raumtemperatur für 2 Wochen stabil.*

### 4.5 Entsorgung des Kits

Die Entsorgung des Kits muss gemäß den nationalen gesetzlichen Vorschriften erfolgen. Spezielle Informationen für dieses Produkt finden Sie im Material Sicherheitsdatenblatt, Kapitel 13.

### 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 PROBENVORBEREITUNG

Proben, die Natriumazid enthalten, sollten nicht verwendet werden. Die Proben sollten vollkommen farblos sein. Selbst die geringste Rotfärbung weist eine unzulässige Kontamination mit Blut hin. Jegliche Rotfärbung wird bei dieser Bestimmungsmethode zu einem erhöhten Messwert führen. Bereits die geringste rötliche Färbung sollte Anlass dafür sein, dass die Probe verworfen wird. In diesem Fall sollte das Gefäß kurz mit Wasser ausgespült werden. Auch den Mund kurz mit möglichst kaltem Wasser ausspülen, 10 Minuten warten und dann eine neue Probe entnehmen. Während der Sammelperiode darf nichts gekaut werden. Jeder erhöhte Druck auf die Zähne kann zu unerwünschten Einschwemmungen von (unsichtbaren) Blutbestandteilen und damit erhöhten Messwerten führen.

### 5.1 Probenentnahme

Für die korrekte Speichelsammlung empfehlen wir geeignete Sammelgefäße aus ultra reinem Polypyrolen zu verwenden. Salivetten oder andere PE enthaltende Behältnisse sind zum Sammeln von Speichelproben für diesen Test ungeeignet. Glasgefäße sind ebenfalls geeignet; hier muß allerdings darauf geachtet werden, dass der verwendete Stopfen keine Interferenzen zeigt, was bei den häufig verwendeten PE-Stopfen aber zu erwarten ist. Da die Sekretion der Steroidhormone eine ausgeprägte episodische Dynamik zeigt, ist es erforderlich eine Sammelstrategie anzuwenden, die Zufallsergebnisse vermeidet. Wir empfehlen daher, stets mehrfach Proben zu sammeln. Und zwar sollte man sich dazu einen Zeitraum von 2 Stunden im Laufe eines Tages aussuchen, in dem dann 5 Proben im Abstand von jeweils 30 Minuten genommen werden können. Vor und während dieser Sammelperiode darf keine Nahrung (fest oder flüssig) aufgenommen werden. Wenn ein Fasten vor der Sammelperiode zu schwierig sein sollte, darf in begrenzten Mengen voll vegetarische Nahrung gegessen werden. Milch- und Fleischprodukte sind aber in jedem Fall zu vermeiden. Das Trinken von Wasser ist jederzeit erlaubt und sogar empfohlen, um den Speichelfluss anzuregen. Das Wassertrinken ist in den letzten 5 Minuten vor dem eigentlichen Speichelsammeln zu unterlassen. Die Sammelperiode sollte möglichst in einer 2-Stunden-Periode vor einer geplanten Mahlzeit gelegt werden. Eine typische Sammelperiode am Morgen sieht ungefähr wie folgt aus: Aufstehen um 6:00 Uhr, Wasser trinken und Zähne putzen, die erste Speichelprobe wird dann um 6:15 Uhr gesammelt. Die nachfolgenden Proben werden gesammelt um 6:45 Uhr, 7:15 Uhr, 7:45 Uhr, und 8:15 Uhr. Danach kann dann ganz normal gefrühstückt werden. Die angegebenen Zeiten sind möglichst auf +/- 10 Minuten einzuhalten. Beim Verwerfen einer rötlich gefärbten Probe (und der nachfolgenden neuen Probennahme) darf vom vorgegebenen Zeitrahmen auch noch weiter abgewichen werden. Die Sammelperiode kann im Bedarfsfall aber auch ausgedehnt werden bis auf 3 Stunden. Eine typische Sammelperiode am späten Nachmittag sieht dann wie folgt aus: 17:00, 17:30 Uhr, 18:00 Uhr; 18:30: 19:00 Uhr. Danach kann dann das Abendessen eingenommen werden.

### 5.2 Probenaufbewahrung

Die Proben können falls erforderlich mehrere Tage bei Raumtemperatur aufbewahrt werden. Daher kann man diese Proben auch problemlos und ohne Kühlung per Post versenden. Eine Aufbewahrung bei 4°C ist aber vorzuziehen und kann bis zu einer Woche lang vorgenommen werden. Wenn immer möglich sollte man aber die Proben sicherheitshalber bei -20°C aufbewahren, wobei mehrfache Gefrier- und Auftauzyklen unbedenklich sind. In jedem Falle muss jede Speichelprobe ohnehin zumindest einmal einen Gefrier- und Auftauzyklus durchlaufen, um die Mucine durch Zentrifugation entfernen zu können. Daher sollten die Speichelproben nach der Ankunft im Labor erst einmal eingefroren werden. Zur eigentlichen Messung der Hormonkonzentration werden dann alle Speichelproben wieder aufgetaut und 5 bis 10 Minuten lang zentrifugiert. Der Überstand sollte nun klar und farblos sein. Schon bei der leichtesten Rotfärbung sollte die Probe verworfen und eine neue Probe angefordert werden. Auch nur leicht rötlich gefärbte Proben zeigen immer zu hohe Konzentrationswerte. Wegen der episodischen Sekretionsmuster sollten in der Routine immer Mehrfachproben eingesetzt werden (siehe oben). Die 5 zu einer Abnahmeserie gehörenden Proben werden wie oben beschrieben vorbereitet. Sodann werden Aliquots aus jeder Einzelprobe in einem separaten Probengefäß gemischt. Aus dieser Mischung wird dann die eigentliche Messung vorgenommen.

### 5.3 Probenverdünnung

Wenn in einem ersten Testdurchlauf bei einer Probe eine Konzentration höher als der höchste Standard gefunden wird, kann diese Probe mit 0,9 % NaCl weiter verdünnt und nochmals bestimmt werden. Die Verdünnung muss jedoch bei der Berechnung der Konzentration beachtet werden.

#### Beispiel:

- a) Verdünnung 1:10: 10 µL Speichelprobe + 90 µL 0,9% NaCl gründlich mischen)  
 b) Verdünnung 1:100: 10 µL Verdünnung a) 1:10 + 90 µL 0,9% NaCl (gründlich mischen).

## 6 TESTDURCHFÜHRUNG

### 6.1 Allgemeine Hinweise

Alle Reagenzien und Proben müssen vor Gebrauch auf Raumtemperatur gebracht und gut durchgemischt werden. Dabei sollte Schaumbildung vermieden werden. Wenn die Testdurchführung einmal begonnen wurde, muss sie ohne Unterbrechung zu Ende geführt werden. Für jeden Standard, jede Kontrolle oder Probe eine neue Plastikspitze verwenden, um Verschleppungen zu vermeiden.

Die Optische Dichte ist abhängig von Inkubationszeit und Temperatur. Deshalb ist es notwendig, vor Beginn der Testdurchführung alle Reagenzien in einen arbeitsbereiten Zustand zu bringen, die Deckel der Fläschchen zu öffnen, alle benötigten Wells in den Halter zu setzen. Nur eine solche Vorbereitung garantiert gleiche Zeiten für jeden Pipettiervorgang ohne Pausen.

Als generelle Regel gilt, dass die enzymatische Reaktion linear proportional zu Zeit und Temperatur ist.

### 6.2 Testdurchführung

Jeder Lauf muss eine Standardkurve beinhalten.

1. Die benötigte Anzahl Wells in der Halterung befestigen.
2. **Je 100 µL Standards, Controls** und Proben mit neuen Plastikspitzen in die entsprechenden Wells geben.
3. **30 Minuten** bei Raumtemperatur inkubieren.
4. **200 µL Enzyme Conjugate** in jedes Well geben.
5. **120 Minuten** bei Raumtemperatur inkubieren.
6. Den Inhalt der Wells kräftig ausschütteln. Wells 3mal mit verdünnter Waschlösung waschen. Verbleibende Flüssigkeit durch Ausklopfen der Wells auf saugfähigem Papier entfernen.  
**Achtung:** Die Sensitivität und Präzision dieses Assays wird erheblich beeinflusst von der korrekten Durchführung des Waschschruttes!
7. **200 µL Substrate Solution** in jedes Well geben.
8. **30 Minuten** bei Raumtemperatur inkubieren.
9. Die enzymatische Reaktion durch Zugabe von **100 µL Stop Solution** in jedes Well abstoppen.
10. Die Optische Dichte bei **450±10 nm** mit einem Mikrotiterplatten-Lesegerät innerhalb von **10 Minuten** nach Zugabe der *Stop Solution* bestimmen.

### 6.3 Ergebnisermittlung

1. Die durchschnittlichen Werte der Optischen Dichte (OD) für jedes Set von Standards, Controls und Patientenproben bestimmen.
2. Eine Standardkurve ermitteln durch Auftragen der mittleren Optischen Dichte jedes Standards gegen die Konzentration, wobei der OD-Wert auf der vertikalen (Y) Achse und die Konzentration auf der horizontalen (X) Achse eingetragen wird.
3. Unter Verwendung der mittleren OD wird für jede Probe die entsprechende Konzentration aus der Standardkurve ermittelt.
4. Automatische Methode: Die in der Arbeitsanleitung ermittelten Werte wurden automatisch mit Hilfe der 4 Parameter Gleichung (4PL, 4 Parameter Logistics, 4 Parameter Rodbard) 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.

### 6.3.1 Beispiel für eine Standardkurve

Nachfolgend wird ein typisches Beispiel für eine Standardkurve mit dem Demeditec ELISA gezeigt. Diese Werte sollten **nicht** zur Berechnung von Patientendaten verwendet werden.

Standard	Optische Dichte (450nm)
Standard 0 (0 pg/mL)	1.89
Standard 1 (1 pg/mL)	1.71
Standard 2 (5 pg/mL)	1.48
Standard 3 (10 pg/mL)	1.20
Standard 4 (50 pg/mL)	0.46
Standard 5 (100 pg/mL)	0.32

## 7 ERWARTETE WERTE

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

Zur Ermittlung der Normwerte wurden Speichelproben von 18 erwachsenen Männer und 54 Frauen (scheinbar gesunden Individuen) im Alter von 19 bis 75 Jahren untersucht.

Die Proben wurden morgens gesammelt und mit dem Demeditec Estradiol free in Saliva ELISA gemessen.

In der Studie ergaben sich folgende Werte.

	Alter (Jahre)	Salivary Estradiol [pg/mL]	
<b>Frauen</b>	19 - 50 yrs.	n = 41	0.6 – 6.3
	51 - 75 yrs.	Postmenopausal: n = 13	0.6 – 3.1
<b>Männer</b>	18 - 75 yrs	n = 18	0.6 – 3.1

Estradiol-Werte im Speichel zeigen einen klaren zirkadianen Rhythmus. Aus diesem Grund sollten Proben immer zur selben Zeit gewonnen werden. Jedes Labor sollte seinen eigenen Normbereich ermitteln, da die Werte altersabhängig sind und sich unterscheiden bei Neugeborenen, Kindern, Jugendlichen und Erwachsenen.

## 8 QUALITÄTSKONTROLLE

Es wird empfohlen, die Kontrollproben gemäß den nationalen gesetzlichen Bestimmungen einzusetzen. Durch die Verwendung von Kontrollproben wird eine Tag-zu-Tag Überprüfung der Ergebnisse erzielt. Es sollten Kontrollen sowohl mit normalem als auch pathologischem Level eingesetzt werden. Die Kontrollen mit den entsprechenden Ergebnissen des QC-Labors sind im QC-Zertifikat, das dem Kit beiliegt, aufgeführt. Die im QC-Blatt angegebenen Werte und Bereiche beziehen sich stets auf die aktuelle Kitcharge und sollten zum direkten Vergleich der Ergebnisse verwendet werden.

Es wird ebenfalls empfohlen, an nationalen oder internationalen Qualitätssicherungs-Programmen teilzunehmen, um die Genauigkeit der Ergebnisse zu sichern. Es sollten geeignete statistische Methoden zur Analyse von Kontroll-Werten und Trends angewendet werden. Wenn die Ergebnisse des Assays nicht mit den angegebenen Akzeptanzbereichen des Kontrollmaterials übereinstimmen, sollten die Patientenergebnisse als ungültig eingestuft werden. In diesem Fall überprüfen Sie bitte die folgenden Bereiche: Pipetten und Zeitnehmer, Photometer, Verfallsdatum der Reagenzien, Lagerungs- und Inkubationsbedingungen, Absaug- und Waschmethode. Sollten Sie nach Überprüfung der vorgenannten Bereiche keinen Fehler erkannt haben, setzen Sie sich bitte mit Ihrem Lieferanten oder direkt mit der Firma DEMEDITEC in Verbindung.



## 9 ASSAY CHARACTERISTIKA

### 9.1 Messbereich

Der Messbereich des Testes liegt zwischen 0,6 – 100 pg/mL.

### 9.2 Spezifität der Antikörper (Kreuzreaktivität)

Die Daten entnehmen Sie bitte der ausführlichen englischen Arbeitsanleitung.

### 9.3 Sensitivität

Die analytische Sensitivität, definiert als Mittelwert minus der zweifachen Standardabweichung des Standards 0 (n = 20), beträgt 0,6 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

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

### 10.1 Interferenzen

Eine Kontamination der Speichelproben mit Blut von mehr als 0,16 % beeinflusst das Ergebnis. Eine solche Verunreinigung kann bereits mit den Augen wahrgenommen werden.

Konzentrationen von Natriumazid  $\geq 0,02$  % beeinflussen den Test und können zu falschen Ergebnissen führen.

### 10.2 Beeinflussung durch Medikamente

Der Estradiol free in Saliva ELISA sollte bei Patienten, die mit Fulvestrant (Faslodex<sup>®</sup>) behandelt werden, nicht eingesetzt werden, da Fulvestrant im Estradiol free in Saliva ELISA kreuzreagiert. Dadurch kann es zu falsch erhöhten Testergebnissen kommen.

### 10.3 High-Dose-Hook Effekt

Ein Hook Effekt tritt in diesem Test nicht auf.

## 11 RECHTLICHE GRUNDLAGEN

### 11.1 Zuverlässigkeit der Ergebnisse

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

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

### 11.2 Therapeutische Konsequenzen

Therapeutische Konsequenzen sollten keinesfalls nur aufgrund von Laborergebnissen erfolgen, selbst dann nicht, wenn alle Testergebnisse mit den in 11.1. genannten Voraussetzungen übereinstimmen.

Jedes Laborergebnis ist nur ein Teil des klinischen Gesamtbildes eines Patienten.

Nur in Fällen, in denen die Laborergebnisse in akzeptabler Übereinstimmung mit dem allgemeinen klinischen Bild des Patienten stehen, sollten therapeutische Konsequenzen eingeleitet werden.

Das Testergebnis allein sollte niemals als alleinige Grundlage für die Einleitung therapeutischer Konsequenzen dienen.

### 11.3 Haftung

Jegliche Veränderungen des Testkits und/oder Austausch oder Vermischung von Komponenten unterschiedlicher Chargen von einem Testkit zu einem anderen, können die gewünschten Ergebnisse und die Gültigkeit des gesamten Tests negativ beeinflussen. Solche Veränderungen und/oder Austausch haben den Ausschluss jeglicher Ersatzansprüche zur Folge.

Reklamationen, die aufgrund von Falschinterpretation von Laborergebnissen durch den Kunden gemäß Punkt 11.2. erfolgen, sind ebenfalls abzuweisen. Im Falle jeglicher Reklamation ist die Haftung des Herstellers maximal auf den Wert des Testkits beschränkt. Jegliche Schäden, die während des Transports am Kit entstanden sind, unterliegen nicht der Haftung des Herstellers.

## 12 REFERENZEN /LITERATUR

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



**SYMBOLS USED WITH DEMEDITEC ASSAYS**

Symbol	English	Deutsch	Français	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	Usage 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 Cat.
	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	Temperature 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>	Distributor	Vertreiber	Distributeur	Distribuidor	Distributore