

Product information

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



Estradiol free in Saliva ELISA



DESLV4188



96



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

Please use only the valid version of the Instructions for Use provided with the kit.
Verwenden Sie nur die jeweils gültige, im Testkit enthaltene, Gebrauchsanweisung.

Introduced modifications / Durchgeführte Änderungen	
The following changes have been made in comparison to the previous version: Im Vergleich zur Vorgängerversion wurden folgende Änderungen vorgenommen:	
Detailed editorial revision. Changed wording in several chapters. Ausführliche redaktionelle Überarbeitung. Geänderter Wortlaut in mehreren Kapiteln.	
1 INTENDED USE:	added: "The device is not intended to be used as a biomarker for the diagnosis of the breast cancer."
1.1 Scientific Validity Report	updated, (previous 1.1 Summary and Explanation):
4.4 Reagent Preparation	Stability of wash solution changed to 1 week at 20 °C to 26 °C (old: 2 weeks at 20 °C to 26 °C)
5. Sample Collection, Storage and Preparation	updated
5.2 Sample Storage and Preparation:	more detailed information, sample stability updated
7 REFERENCE VALUES:	Changed data with differentiation between menstrual cycles and additional data for pregnancy.
9.2 Sensitivity:	Updated with LoB, LoD and LoQ, LoD (0.72 pg/mL) is now given as lowest value for the measuring range, instead of previous listed analytical sensitivity (0.6 pg/mL).
9.3.3 Between-lot Precision:	data added
9.6 Method Comparison:	added
10.2 Drug Interferences:	additional data
12 LITERATURE:	updated

Content / Inhaltsverzeichnis

1	INTENDED USE	4
2	PRINCIPLE OF THE TEST	4
3	WARNINGS AND PRECAUTIONS	5
4	MATERIALS	6
5	SAMPLE COLLECTION, STORAGE AND PREPARATION	7
6	ASSAY PROCEDURE	8
7	REFERENCE VALUES	10
8	QUALITY CONTROL	10
9	PERFORMANCE CHARACTERISTICS	11
10	LIMITATIONS OF THE PROCEDURE	12
11	LEGAL ASPECTS	13
1	ZWECKBESTIMMUNG	14
2	TESTPRINZIP	14
3	WARNUNGEN UND VORSICHTSMAßNAHMEN	14
4	MATERIALIEN	16
5	ENTNAHME, LAGERUNG UND VORBEREITUNG DER PROBEN	17
6	TESTDURCHFÜHRUNG	18
7	REFERENZWERTE	20
8	QUALITÄTSKONTROLLE	20
9	LEISTUNGSMERKMALE	21
10	GRENZEN DES VERFAHRENS	21
11	RECHTLICHE GRUNDLAGEN	21
12	LITERATURE	22

1 INTENDED USE

The **Demeditec Estradiol free in Saliva ELISA** is a manual enzyme immunoassay for the **quantitative** measurement of active free Estradiol, an estrogenic steroid, in human saliva.

For *in vitro* diagnostic use. For laboratory professional use.

The device is **intended to be used** to assess fertility problems in women; to diagnose menopause, and to monitor hormone replacement therapy.

The device is **not intended** to be used as a biomarker for the diagnosis of the breast cancer.

1.1 Scientific Validity Report

Estradiol (1,3,5(10)-estratriene-3,17 β -diol; 17 β -estradiol; E2) is a C18 steroid hormone with a molecular weight of 272.4 Dalton. It is the most potent natural estrogen, produced mainly by granulosa cells of the female ovary and the placenta by the aromatization of androstenedione to estrone, followed by conversion of estrone to estradiol by 17 β HSD. Estradiol is also synthesized in other tissues including testicles, adrenal gland, fat tissue, liver, breast, and brain (1-5).

Estradiol promotes cell proliferation and inhibits apoptosis in tumors (6-8). For this reason, estradiol plays important roles in the development of breast cancer especially in premenopausal and postmenopausal women (9-10). The plasma and saliva estradiol concentrations are significantly increased in breast cancer patients compared to those in healthy women (11-12).

In plasma, estradiol is largely bound to SHBG and albumin. Only a fraction of 2.21% is free and biologically active, the percentage remaining constant throughout the menstrual cycle (13-15). Estradiol acts primarily as an agonist of the estrogen receptor (ER) subtypes ER α and ER β , nuclear steroid hormone receptors which trigger the appropriate response at the nuclear level in the target sites. These sites include follicles, uterus, breast, vagina, urethra, hypothalamus, pituitary and to a lesser extent liver and skin.

In the female, estradiol acts as a growth hormone for tissue of the reproductive organs. During the menstrual cycle, estradiol secretion follows a cyclic, biphasic pattern with the highest concentration found immediately prior to ovulation. This estradiol peak stimulates the hypothalamic-pituitary axis to secrete the gonadotropins follicle stimulating hormone (FSH) and luteinizing hormone (LH), which are essential for follicular maturation and ovulation. In the luteal phase, estradiol, in conjunction with progesterone, prepares the endometrium for implantation (16-22). During pregnancy, estradiol concentration increases due to placental production and high levels are sustained throughout pregnancy (23).

Salivary steroid levels can reflect the circulating level of free steroid rather than total levels in serum, which is explained by the absence of circulating estradiol binding proteins. Therefore, saliva provides an excellent specimen for monitoring estradiol levels across the menstrual cycle or during hormone replacement therapy (24-26).

2 PRINCIPLE OF THE TEST

The Estradiol free in Saliva ELISA is a solid phase enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) based on the **principle of competitive binding**.

The microtiter wells are coated with a polyclonal antibody (rabbit) directed towards antigenic sites of the estradiol molecule.

During incubation, estradiol in the added sample competes with the added enzyme conjugate, which is estradiol conjugated to horseradish peroxidase, for binding to the coated antibody. After a washing step to remove all unbound substances, the solid phase is incubated with the substrate solution. The colorimetric reaction is stopped by addition of stop solution, and optical density (OD) of the resulting yellow product is measured. The intensity of color is inversely proportional to the concentration of the analyte in the sample.

A standard curve is constructed by plotting OD values against concentrations of standards, and concentrations of unknown samples are determined using this standard curve.

3 WARNINGS AND PRECAUTIONS

- This kit is for *in vitro* diagnostic use only. For laboratory professional use only.
- Before starting the assay, read the instructions for use completely and carefully. Use the valid version of instructions for use provided with the kit. Be sure that everything is understood.
- Do not mix or use components from kits with different lot numbers. It is advised not to interchange 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.
- Do not use reagents beyond expiry date as shown on the kit labels.
- Do not reuse microtiter wells.
- Reagents of other manufacturers must not be used together with the reagents of this test kit.
- All reagents in this kit are clear liquids, substrate solution is clear and colorless. Changes in its appearance may affect the performance of the test. In that case, contact Demeditec Diagnostics.
- Microbial contamination of reagents or samples may give false results.
- Allow the reagents to reach room temperature (20 °C to 26 °C) before starting the test. Temperature will affect the optical density readings of the assay.
- All indicated volumes must be performed according to the protocol. Optimal test results are only obtained when using calibrated pipettes and microtiter plate readers.
- 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 coloured. Do not pour reagents back into original vials as reagent contamination may occur.

General precautions

- Follow laboratory quality assurance and laboratory safety guidelines.
- Never pipet by mouth and avoid contact of reagents and samples with skin and mucous membranes.
- Do not smoke, eat, drink, or apply cosmetics in areas where samples or kit reagents are handled.
- Wear lab coats and disposable latex gloves when handling samples and reagents and where necessary safety glasses.

Biohazard information

- 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. However, no known test method can offer total assurance that no infectious agent is present.
- The device contains material of animal origin, which is certified apparently free of infectious or contagious diseases and injurious parasites.
- Bovine components originate from countries where BSE (Bovine spongiform encephalopathy) has not been reported.
- All materials and samples of human or animal origin must be handled as if capable of transmitting infectious diseases.
- Handling must be done in accordance with the procedures defined by appropriate national biohazard and safety guideline or regulation. Waste must be discarded according to local rules and regulations.

Information to chemical hazards and hazard classification

- Some reagents contain preservatives in non-declarable concentrations. Nevertheless, in case of contact with eyes or skin, flush immediately with water.
- Substrate Solution contains an ingredient in non-declarable concentrations which causes serious eye irritation. In case of possible contact with eyes, rinse immediately carefully and thoroughly with eye wash or water. After contact with skin, wash with plenty of water. Take-off contaminated clothing and wash it before reuse.
- Avoid contact with Stop Solution containing < 5 % H₂SO₄. It may cause skin irritation and burns.
- Chemicals and prepared or used reagents must be treated as hazardous waste according to the national safety guideline or regulation.
- This product does not contain substances which have carcinogenic, mutagenic or toxic for reproduction (CMR) properties.

All reagents of this test kit do NOT contain hazardous substances in concentrations to be declared, a classification and labelling is not required.

For detailed information, please refer to the Safety Data Sheet, which is available upon request directly from Demeditec.

4 MATERIALS

4.1 Materials provided with the kit

Symbol	Quantity	Description	Preparation
SORB MT	12 x 8 wells (break apart)	Microtiter plate Coated with anti-estradiol antibody (poly-clonal).	Ready to use
CAL 0 – 5	6 x 1 mL	Standards 0-5 * Concentrations: 0 – 1 – 5 – 10 – 50 – 100 pg/mL	Ready to use
CONTROL low & high	2 x 1 mL	Controls Low & High * <i>For control values and ranges please refer to Certificate of Analysis.</i>	Ready to use
ENZ CONJ	1 x 26 mL	Enzyme Conjugate * Estradiol conjugated to horseradish peroxidase Colored red.	Ready to use
SUB TMB	1 x 25 mL	Substrate Solution Contains 3,3',5,5'-tetramethylbenzidine (TMB). <i>Keep away from direct sun light.</i>	Ready to use
STOP SOLN	1 x 14 mL	Stop Solution Contains < 5 % H ₂ SO ₄ . <i>Avoid contact with the stop solution. It may cause skin irritations and burns.</i>	Ready to use
WASH SOLN 40x	1 x 30 mL	Wash Solution, 40X concentrate *	See "Reagent Preparation".
	1 x	Instructions for Use	
	1 x	Certificate of Analysis (CoA)	
		* Contains non-mercury preservative.	

4.2 Materials required but not provided

- A calibrated microtiter plate reader (450 nm, with reference wavelength at 620 nm to 630 nm)
- Calibrated variable precision micropipettes
- Manual or automatic equipment for rinsing microtiter plate wells
- Absorbent paper
- Distilled water
- 0.9% NaCl
- Timer
- Graph paper or software for data reduction

4.3 Storage and Stability of the Kit

Unopened kits and reagents as well as **opened reagents** must be stored at 2 °C to 8 °C.

The microplate must always be stored in the resealable aluminum pouch containing a desiccant. Do not open the pouch until it has reached room temperature. The microtiter plate consists of 12 individual strips. Each strip can be divided into 8 individual wells.

Unused wells must be immediately returned to the aluminum pouch with the desiccant and stored again tightly resealed at 2 °C to 8 °C.

Once opened, reagent vials must be closed tightly again.

	Storage Temperature	Stability
Unopened kits and unopened reagents	2 °C to 8 °C	Until the expiration date printed on the label. Do not use reagents beyond this date!
Opened kit	2 °C to 8 °C	8 weeks

4.4 Reagent Preparation

Bring all reagents and required number of strips to room temperature (20 °C to 26 °C) prior to use.

Wash Solution

Add distilled water to the 40X concentrated Wash Solution. Dilute 30 mL of concentrated *Wash Solution* with 1170 mL distilled water to a final volume of 1200 mL.

Stability after dilution:	at 20 °C to 26 °C	1 week
---------------------------	-------------------	--------

4.5 Disposal of the Kit

The disposal of the kit and all used materials/reagents must be performed according to the national regulations. Special information for this product is given in the Safety Data Sheet, section 13.

4.6 Damaged Test Kits

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

5 SAMPLE COLLECTION, STORAGE AND PREPARATION

Human saliva can be used in this assay.

The sampling must be done in the morning **before** food intake, drinking or smoking. It is recommended to rinse mouth thoroughly with cold water 5 minutes prior to sampling.

If sampling must be done during the day, eating, drinking, smoking, chewing gums or brushing teeth should be avoided at least 2 hours before sampling.

Do not collect samples when oral diseases, inflammation or lesions exist (blood contamination).

Note: Samples containing sodium azide should not be used in the assay.

Please refer to chapters “Interfering Substances” and “Drug Interferences”.

5.1 Sample Collection

For the correct collection of saliva we are recommending to only use appropriate devices made from ultra-pure polypropylene. Do not use any cotton swab for sampling, such as Salivette® tubes; this in most cases will result in significant interferences. Other saliva sampling devices have not been tested and should be validated under the responsibility of the user.

Due to the episodic secretion pattern of steroid hormones, it is important to care for a proper timing of the sampling. In order to avoid arbitrary results, we recommend that always 5 samples be taken within a period of 2 – 3 hours (*multiple sampling*) preferably before a meal.

As food might contain significant amounts of steroid hormones samples preferably should be taken while fasting. If fasting should be a problem the collection period should be timed just before lunch or before dinner.

5.2 Sample Storage and Preparation

Fresh saliva samples

Immediately after arrival in the lab, fresh saliva samples should be **frozen at least overnight at -20 °C**.

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

Storage: immediately at -20 °C

Then samples must be thawed and centrifuged for 5 to 10 minutes at 10 000 *g*.

Thereafter, the clear supernatant must be transferred into a fresh tube.

Only this clear supernatant can be used as sample for the ELISA.

If a set of multiple samples has to be tested, the lab has to **mix aliquots of the supernatant** of the 5 single samples in a separate sampling device and perform the testing from this mixture.

Supernatant

Stability	at 2 °C to 8 °C	5 days
	at -20 °C (in aliquots)	at least 24 months

The supernatant should be frozen only once.

Thawed supernatant should be inverted several times prior to testing!

6 ASSAY PROCEDURE

6.1 Procedural Notes

- All reagents and samples must be allowed to come to room temperature (20 °C to 26 °C) before use.
- All reagents must be mixed without foaming.
- Do not interchange caps of reagent vials to avoid cross-contamination.
- Use new disposal plastic pipette tips for each standard, control, or sample in order to avoid carry-over.
- To avoid cross-contamination and falsely elevated results pipette patient samples and dispense conjugate without splashing accurately to the bottom of wells.
- Mix the contents of the microtiter plate wells thoroughly to ensure good test results.
- Do not let wells dry during assay; add reagents immediately after completing the rinsing steps.
- Once the test has been started, all steps must be completed without interruption and in the same sequence for each step.
- The enzymatic reaction is linearly proportional to time and temperature.
- Optical density is a function of the incubation time and temperature. Respect the incubations times and temperatures as given in chapter “Test Procedure”.
- 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.
- **Important note to wash procedure:** Washing is critical. Improperly washed wells will give erroneous results. The sensitivity and precision of this assay is markedly influenced by the correct performance of the washing procedure!
- **Test performance using fully automated analysis devices:** Automated test performance using fully automated, open-system analysis devices is possible. However, the combination must be validated by the user.

6.2 Test Procedure

Each run must include a standard curve.

The controls serve as internal controls for the reliability of the test procedure. They must be assayed with each test run.

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

The given test procedure describes manual processing.

Important note: The accuracy of this assay is markedly influenced by the correct incubation temperature.

1. Secure the desired number of microtiter wells in the frame holder.
2. Pipette **100 µL** of each **Standard, Control, and sample** with new disposable tips into appropriate wells.
3. Incubate for **30 minutes** at room temperature.
4. Add **200 µL Enzyme Conjugate** into each well. Thoroughly mix for 10 seconds. It is important to have a complete mixing in this step.
5. Incubate for **120 minutes** at room temperature.
6. Wash the wells as follows: If the wash step is performed manually: Briskly shake out the contents of the wells. Rinse the wells **3 times** with **300 µL** diluted *Wash Solution* per well. If an automated plate washer is used: Rinse the wells **3 times** with **400 µL** diluted *Wash Solution* per well. At the end of the washing step, always strike the wells sharply on absorbent paper to remove residual droplets!
7. Pipette **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. Measure the optical density (OD) of the solution in each well at **450 nm (reading) and at 620 nm to 630 nm (background subtraction, recommended)** 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. The concentration of the samples can be read directly from the standard curve.
2. For duplicate determinations, the mean of the two optical density (OD) values for each standard, control, and patient sample must be taken. If the two values deviate substantially from one another, Demeditec recommends retesting the samples.
3. Samples with concentrations exceeding the highest standard can be further diluted with 0.9% NaCl and re-assayed as described in "Test Procedure", or must be reported as > 100 pg/mL. For the calculation of the concentrations, this dilution factor must be considered. (*Example*: dilution 1:10: 20 µL supernatant + 180 µL 0.9% NaCl)
4. Automated method:
The results in the instructions for use have been calculated automatically using a four-parameter logistic (4PL) curve fit. (4PL Rodbard or 4PL Marquardt are the preferred methods.) Other data reduction functions may give slightly different results.
5. Manual method:
Using semi-logarithmic graph paper, construct a standard curve by plotting the (mean) OD obtained from each standard against its concentration with OD value on the vertical (Y) axis and concentration on the horizontal (X) axis. Determine the corresponding sample concentration from the standard curve by using the (mean) OD value for each sample.

6.3.1 Example of Typical Standard Curve

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

Standard	Optical Density (450 nm)
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 REFERENCE VALUES

It is strongly recommended that each laboratory determine its own reference values.

In a study conducted with apparently healthy adults, using the Demeditec Estradiol free in Saliva ELISA the following data were observed:

Population	n	Mean (pg/mL)	Median (pg/mL)	2.5 th - 97.5 th Percentile (pg/mL)	Range (min. - max.) (pg/mL)
Males	28	1.11	1.00	0.72 – 3.30	0.72 – 4.78
Females					
Pre-menopausal					
follicular phase	10	3.78	3.64	1.90 – 6.90	1.78 – 6.99
luteal phase	10	2.47	2.63	1.20 – 3.60	1.05 – 3.75
Post-menopausal	22	2.12	2.19	0.72 – 4.4	0.72 – 4.56
Stages of pregnancy					
1.Trimester	10	4.48	4.29	2.26 – 6.83	1.97 – 6.96
2.Trimester	10	15.17	15.32	3.43 – 28.13	2.54 – 28.81
3.Trimester	10	101.64	108.90	35.05 – 172.23	31.87 – 178.47

The results alone should not be the only reason for any therapeutic consequences. The results must 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, newborn, children, adolescents and adults.

8 QUALITY CONTROL

Good quality assurance in the laboratory 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 Quality Control Laboratory are stated in the Certificate of Analyses (CoA) added to the kit. The values and ranges stated on the CoA always refer to the current kit lot and must be used for direct comparison of the results.

If available, it is also recommended to make use of national or international Quality Assessment programs in order to ensure the accuracy of the results.

Apply appropriate statistical methods for analyzing control values and trends. If the results of the assay do not agree with 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 Specificity of Antibodies (Cross-Reactivity)

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

Compound	% Cross reactivity	Compound	% Cross reactivity
Estradiol-17 β	100	11-Deoxycortisol	0.00
Androstenedione	0.00	21-Deoxycortisol	0.00
Androsterone	0.00	Dihydrotestosterone	0.00
Corticosterone	0.00	Dihydroepiandrosterone	0.00
Cortisone	0.00	20-Dihydroprogesterone	0.00
Epiandrosterone	0.00	11-Hydroxyprogesterone	0.00
16-Epiestriol	0.00	17 α -Hydroxyprogesterone	0.003
Estradiol-3-sulfate	0.00	17 α -Pregnenolone	0.00
Estradiol-3-glucuronide	0.00	17 α -Progesterone	0.00
Estradiol-17 α	0.00	Pregnanediol	0.00
Estriol	2.27	Pregnanetriol	0.00
Estriol-16-glucuronide	0.00	Progesterone	0.00
Estrone	6.86	Testosterone	0.033
Estrone-3-sulfate	0.00	Dehydroepiandrosterone	0.00

9.2 Sensitivity

Limit of Blank (LoB)	0.028 pg/mL
Limit of Detection (LoD)	0.716 pg/mL
Limit of Quantification (LoQ)	2.364 pg/mL
Measuring range	0.716 pg/mL – 100 pg/mL
Linear range	0.919 pg/mL – 100 pg/mL

9.3 Reproducibility

9.3.1 Within-run Precision

The within-run precision was determined with 3 samples covering the complete measuring range within 20 measurements. CV was calculated as mean CV of 20 replicates.

Sample	n	Mean (pg/mL)	CV (%)
1	20	8.27	8.3
2	20	21.39	3.2
3	20	30.51	2.4

9.3.2 Between-run Precision

The between-run precision was determined with 4 samples covering the complete measuring range within 20 days in 1 run per day and with 2 replicates per run (20 x 1 x 2). CV was calculated from 40 determinations.

Sample	n	Mean (pg/mL)	CV (%)
1	40	6.60	12.0
2	40	20.44	6.5
3	40	29.88	4.9
4	40	65.01	2.8

9.3.3 Between-lot Precision

The between-lot variation was determined by 6 measurements of different samples with 3 different kit lots.

Sample	n	Mean (pg/mL)	CV (%)
1	18	1.84	8.5
2	18	12.50	12.0
3	18	7.02	10.8
4	18	51.73	9.2

9.4 Recovery

Recovery was determined by adding increasing amounts of the analyte to different patient samples containing different amounts of endogenous analyte. The percentage recoveries were determined by comparing expected and measured values of the samples.

		Sample 1	Sample 2	Sample 3
Concentration (pg/mL)		0.56	19.81	20.84
Average Recovery (%)		98.9	90.1	106.3
Range of Recovery (%)	from	86.6	85.4	102.4
	to	112.0	96.1	111.0

9.5 Linearity

Samples containing different amounts of analyte were serially diluted with 0,9% NaCl. The percentage recovery was calculated by comparing the expected and measured values for the analyte.

		Sample 1	Sample 2	Sample 3
Concentration (pg/mL)		31.74	62.89	75.63
Average Recovery (%)		91.6	95.7	104.8
Range of Recovery (%)	from	90.0	88.5	96.0
	to	93.3	106.7	112.8

9.6 Method Comparison

A comparison of Demeditec Estradiol free in Saliva ELISA (DESLV4188) (y) and LC-MS measurements (x) using clinical samples gave the following correlation:

$$n = 68$$

$$r = 0.988$$

$$y = 0.9659x + 0.7306$$

10 LIMITATIONS OF THE PROCEDURE

Reliable and reproducible results will be obtained when the assay procedure is performed with a complete understanding of the instructions for use and in compliance with the laboratory quality assurance guidelines. Any improper handling of samples or modification of this test might influence the results.

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 ≥ 0.02 % interferes in this assay and may lead to false results.

10.2 Drug Interferences

Substance	Conc. Range of spiked substance (ng/mL)	Mean Bias (%)
Secoisolariciresinol	0.5 – 5000	0.30
Genistein	0.5 – 5000	0.42
Daidzein	0.5 – 5000	0.27
Fulvestrant	0.5 – 5000	0.93
Coumesterol	0.5 – 5000	0.33
Dydrogesterone	10 – 1000	0.002
Pregnenolone Acetate	10 – 1000	0.002

10.3 High-Dose Hook Effect

A high-dose hook effect is not known for competitive assays.

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 laboratory quality assurance guidelines and 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. If there is any doubt or concern regarding a result, 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.

11.4 Reporting of Serious Incident

Any serious incident that has occurred in relation to the device shall be reported to the manufacturer and the competent authority of the Member State in which the user and/or the patient is established.

1 ZWECKBESTIMMUNG

Der **Demeditec Estradiol free in Saliva ELISA** ein manueller Enzymimmunoassay zur **quantitativen** Messung von aktivem freiem Estradiol, einem östrogenen Steroid in humanem Speichel.

Für den Einsatz in der In-vitro Diagnostik. Für den beruflichen Gebrauch in Laboratorien.

Weitere Informationen zur bestimmungsgemäßen Verwendung finden Sie in der englischen Version der Gebrauchsanweisung.

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 (Kaninchen) beschichtet, der gegen definierte Antikörper-Bindungsstellen des Estradiol-Moleküls gerichtet ist.

Während der Inkubation konkurriert das Estradiol in der zugegebenen Probe mit dem zugegebenen Enzymkonjugat (Estradiol, konjugiert mit Meerrettichperoxidase) um die Bindung an den immobilisierten Antikörper.

Nach einem Waschschrift, um alle ungebundenen Substanzen zu entfernen, wird die feste Phase mit der Substratlösung inkubiert. Die Farbreaktion wird durch die Zugabe der Stopplösung beendet und die optische Dichte (OD) des resultierenden gelben Produktes gemessen. Die Intensität der Farbe ist umgekehrt proportional zur Konzentration des Analyten in der Probe.

Durch Auftragen der OD-Werte gegen die Konzentrationen der Standards wird eine Standardkurve erstellt, und die Konzentrationen der unbekannten Proben werden anhand dieser Standardkurve bestimmt.

3 WARNUNGEN UND VORSICHTSMAßNAHMEN

- Dieser Kit ist nur für den Einsatz in der In-vitro Diagnostik bestimmt. Nur für den professionellen Gebrauch in Laboratorien.
- Bevor Sie mit dem Test beginnen, lesen Sie die Gebrauchsanweisung vollständig und sorgfältig durch. Verwenden Sie nur die gültige, im Testkit enthaltene, Gebrauchsanweisung. Stellen Sie sicher, dass Sie alles verstanden haben.
- Komponenten aus Kits mit unterschiedlichen Chargennummern dürfen nicht gemischt oder zusammen verwendet werden. Vertiefungen verschiedener Platten, auch aus derselben Charge, sollten nicht untereinander ausgetauscht werden. Die Kits können unter unterschiedlichen Bedingungen transportiert oder gelagert worden sein, so dass die Bindungscharakteristik der Platten leichte Unterschiede aufweisen kann.
- Reagenzien nicht über das auf den Kit-Etiketten angegebene Verfallsdatum hinaus verwenden.
- Mikrotitervertiefungen nicht wiederverwenden.
- Reagenzien anderer Hersteller dürfen nicht zusammen mit den Reagenzien dieses Testkits verwendet werden.
- Alle Reagenzien dieses Kits sind klare Lösungen, die Substratlösung ist klar und farblos. Veränderungen des Aussehens können die Durchführung des Tests beeinträchtigen. In diesem Fall wenden Sie sich bitte an Demeditec.
- Eine mikrobielle Kontamination von Reagenzien oder Proben kann zu falschen Ergebnissen führen.
- Lassen Sie die Reagenzien vor Testbeginn Raumtemperatur (20 °C bis 26 °C) erreichen. Die Temperatur wirkt sich auf die Messungen der optischen Dichte des Assays aus.
- Alle im Kit-Protokoll angegebenen Volumina müssen genau eingehalten werden. Optimale Ergebnisse können nur durch Verwendung kalibrierter Pipetten und Mikrotiterplatten-Lesegeräte erreicht werden.
- Behältnisse jeweils nur für ein einziges Reagenz verwenden. Dies gilt insbesondere für die Substrat-Behälter. Die Verwendung eines Behälters zum Pipettieren der Substratlösung, der zuvor für die Konjugatlösung verwendet wurde, kann zu einer Verfärbung der Lösung führen. Geben Sie keine Reagenzien zurück in die Originalfläschchen, da es zu einer Kontamination der Reagenzien kommen kann.

Allgemeine Vorsichtsmaßnahmen

- Befolgen Sie die Richtlinien zur Qualitätssicherung und zur Sicherheit im Labor.
- Niemals mit dem Mund pipettieren und den Kontakt von Reagenzien und Proben mit Haut und Schleimhäuten vermeiden.
- In Bereichen, in denen mit Kitbestandteilen oder Proben gearbeitet wird, nicht rauchen, essen, trinken oder Kosmetika verwenden.
- Beim Umgang mit Proben und Reagenzien sind Laborkittel und Einweg-Latexhandschuhe sowie, falls erforderlich, eine Schutzbrille zu tragen.

Informationen zur biologischen Gefährdung

- 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. Kein bekanntes Testverfahren kann jedoch mit absoluter Sicherheit ausschließen, dass kein Infektionserreger vorhanden ist.
- Das Produkt enthält Material tierischen Ursprungs, das nachweislich frei von infektiösen oder ansteckenden Krankheiten und schädigenden Parasiten ist.
- Komponenten von Rindern stammen aus Ländern, in denen keine BSE (Bovine Spongiforme Enzephalopathie) gemeldet wurde.
- Alle Materialien und Proben menschlichen oder tierischen Ursprungs müssen so behandelt werden, als ob sie ansteckende Krankheiten übertragen könnten.
- Die Handhabung muss in Übereinstimmung mit den Verfahren erfolgen, die in den entsprechenden nationalen Richtlinien oder Vorschriften für Biogefährdung und Sicherheit festgelegt sind. Abfälle müssen gemäß den lokalen Regeln und Vorschriften entsorgt werden.

Informationen zu chemischen Gefahren und zur Gefahreinstufung

- Einige Reagenzien enthalten Konservierungsmittel in nicht kennzeichnungspflichtiger Konzentration. Bei Kontakt der Reagenzien mit den Augen oder der Haut dennoch sofort mit ausreichend Wasser spülen.
- Die Substratlösung enthält einen Inhaltsstoff in nicht kennzeichnungspflichtiger Konzentration, der schwere Augenreizungen verursacht. Bei möglichem Kontakt mit den Augen sofort sorgfältig und gründlich mit Augenspülung oder Wasser spülen. Bei Berührung mit der Haut mit reichlich Wasser abwaschen. Kontaminierte Kleidung ausziehen und vor Wiederverwendung waschen.
- Kontakt mit der Stopplösung (*Stop Solution*) vermeiden, da sie < 5 % H₂SO₄ enthält. Schwefelsäure kann Hautreizungen und Verbrennungen verursachen.
- Chemikalien und zubereitete oder gebrauchte Reagenzien müssen als gefährlicher Abfall gemäß den nationalen Sicherheitsrichtlinien oder -vorschriften behandelt werden.
- Dieses Produkt enthält keine Stoffe, die krebserregende, erbgutverändernde oder fortpflanzungsgefährdende Eigenschaften (CMR) haben.

Alle Reagenzien dieses Testkits enthalten KEINE gefährlichen Stoffe in deklarationspflichtigen Konzentrationen, eine Einstufung und Kennzeichnung ist nicht erforderlich.

Ausführliche Informationen entnehmen Sie bitte dem Sicherheitsdatenblatt, das Sie auf Anfrage direkt bei Demeditec erhalten.

4 MATERIALIEN

4.1 Im Kit mitgelieferte Materialien

Symbol	Anzahl/ Menge	Beschreibung	Vorbereitung
SORB MT	12 x 8 Wells (einzeln brechbar)	Mikrotiterplatte Mit anti-Estradiol-Antikörper (polyklonal) be- schichtet.	Gebrauchsfertig
CAL 0 – 5	6 x 1 mL	Standards 0-5 * Konzentrationen: 0 – 1 – 5 – 10 – 50 – 100 pg/mL	Gebrauchsfertig
CONTROL low & high	2 x 1 mL	Kontrollen Low und High * <i>Kontrollwerte und -bereiche entnehmen Sie bitte dem CoA.</i>	Gebrauchsfertig
ENZ CONJ	1 x 26 mL	Enzymkonjugat * Estradiol mit Meerrettichperoxidase konju- giert; Rot gefärbt	Gebrauchsfertig
SUB TMB	1 x 25 mL	Substratlösung Enthält 3,3',5,5'-Tetramethylbenzidin (TMB). <i>Von direktem Sonnenlicht fernhalten.</i>	Gebrauchsfertig
STOP SOLN	1 x 14 mL	Stopplösung Enthält < 5 % H ₂ SO ₄ . <i>Kontakt mit der Stopplösung vermeiden! Kann Hautreizungen und Verbrennungen verursachen.</i>	Gebrauchsfertig
WASH SOLN 40x	1 x 30 mL	Waschlösung, 40X-Konzentrat *	<i>Siehe "Vorbereitung der Reagenzien".</i>
	1 x	Gebrauchsanweisung (IFU)	
	1 x	Analysenzertifikat (CoA)	
		* Enthält quecksilberfreies Konservierungs- mittel.	

4.2 Erforderliche, aber nicht enthaltene Materialien

- Kalibriertes Mikrotiterplattenlesegerät (450 nm, mit Referenzwellenlänge bei 620 nm bis 630 nm)
- Kalibrierte variable Präzisions-Mikropipetten
- Manuelle oder automatische Waschvorrichtung für Mikrotiterplatten
- Saugfähiges Papier
- Destilliertes Wasser
- 0,9% NaCl
- Laborwecker
- Millimeterpapier oder Software zur Datenauswertung

4.3 Lagerung und Haltbarkeit des Kits

Ungeöffnete Kits und Reagenzien sowie **geöffnete Reagenzien** müssen bei 2 °C bis 8 °C gelagert werden.

Die Mikrotiterplatte muss immer in dem wiederverschließbaren Aluminiumbeutel, der ein Trockenmittel enthält, gelagert werden. Öffnen Sie den Beutel erst, wenn er Raumtemperatur erreicht hat. Die Mikrotiterplatte besteht aus 12 einzelnen Streifen. Jeder Streifen kann in 8 einzelne Kavitäten (Wells) unterteilt werden.

Nicht benötigte Kavitäten müssen sofort in den Aluminiumbeutel mit dem Trockenmittel zurückgegeben und wieder dicht verschlossen bei 2 °C bis 8 °C gelagert werden.

Einmal geöffnete Reagenzfläschchen müssen wieder fest verschlossen werden.

	Lagerungstemperatur	Stabilität
Ungeöffneter Kit und ungeöffnete Reagenzien	2 °C bis 8 °C	Bis zu dem auf dem Etikett aufgedruckten Verfallsdatum. Reagenzien nach Ablauf dieses Datums nicht mehr verwenden!
Geöffneter Kit	2 °C bis 8 °C	8 Wochen

4.4 Vorbereitung der Reagenzien

Alle Reagenzien und die benötigte Anzahl der Mikrotiterstreifen vor dem Gebrauch auf Raumtemperatur (20 °C bis 26 °C) bringen.

Wash Solution

Fügen Sie der 40-fach konzentrierten Waschlösung (*Wash Solution*) destilliertes Wasser hinzu.

30 mL der konzentrierten Waschlösung mit 1170 mL destilliertem Wasser auf ein Endvolumen von 1200 mL verdünnen.

Stabilität nach Verdünnung:	bei 20 °C bis 26 °C	1 Woche
-----------------------------	---------------------	---------

4.5 Entsorgung des Kits

Die Entsorgung des Kits und aller verwendeten Materialien / Reagenzien muss gemäß den nationalen gesetzlichen Vorschriften erfolgen. Spezielle Informationen für dieses Produkt finden Sie im Sicherheitsdatenblatt, Abschnitt 13.

4.6 Beschädigte Testkits

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

5 ENTNAHME, LAGERUNG UND VORBEREITUNG DER PROBEN

Humaner Speichel kann in diesem Test als Probenmaterial eingesetzt werden.

Die Probenentnahme muss am Morgen **vor** der Nahrungsaufnahme, dem Trinken oder Rauchen erfolgen. Es wird empfohlen, den Mund 5 Minuten vor der Probenentnahme gründlich mit kaltem Wasser auszuspülen.

Falls die Probenentnahme im Laufe des Tages erfolgen muss, sollte Essen, Trinken, Rauchen, Kaugummi kauen oder Zähne putzen mindestens 2 Stunden vor der Entnahme vermieden werden.

Speichelproben sollten nicht bei Krankheiten, Entzündungen oder Verletzungen der Mundhöhle entnommen werden (Blutkontamination).

Achtung: Proben, die Natriumazid enthalten, sollten nicht verwendet werden.

Weitere Informationen finden Sie in den Kapiteln „Interferenzen“ und „Beeinflussung durch Medikamente“.

5.1 Probenentnahme

Für die korrekte Speichelsammlung empfehlen wir geeignete Sammelgefäße aus ultra reinem Polypropylen zu verwenden. Es sollte kein Besteck mit Watterolle verwendet werden, wie z.B. Salivette®, da dies in den meisten Fällen zu deutlichen Interferenzen führt. Andere Speichel-Sammelsysteme wurden nicht getestet. Diese müssen in Verantwortung des Anwenders validiert werden.

Aufgrund des episodischen Sekretionsmusters von Steroidhormonen ist es wichtig, auf den richtigen Zeitpunkt der Probenahme zu achten.

Um arbiträre (willkürliche) Ergebnisse zu vermeiden, empfehlen wir 5 Proben in einem Zeitraum von 2 bis 3 Stunden zu sammeln (mehrfache Probeentnahme). Dies sollte vorzugsweise vor einer Mahlzeit durchgeführt werden.

Da Lebensmittel eine bedeutende Menge an Steroidhormonen enthalten können, sollten die Proben möglichst nüchtern entnommen werden. Ist dies nicht möglich, sollte die Sammelperiode auf jeden Fall vor einer Mahlzeit liegen.

5.2 Probenlagerung und -vorbereitung

Frische Speichelproben

Sofort nach der Ankunft im Labor müssen frische Speichelproben **mindestens über Nacht bei -20 °C** tiefgefroren werden.

Jede Speichelprobe muss eingefroren, aufgetaut und anschließend zentrifugiert werden, um Muzine aus der Probe zu entfernen.

Lagerung: sofort bei -20 °C

Danach müssen die eingefrorenen Proben aufgetaut und 5 bis 10 Minuten bei 10 000 g zentrifugiert werden. Anschließend muss der klare Überstand in ein frisches Röhrchen überführt werden.

Nur dieser klare Überstand darf als Probe im ELISA eingesetzt werden.

Wird ein Set an Mehrfach-Proben getestet, muss im Labor in einem separaten Probengefäß eine **Mischprobe aus Aliquoten der Überstände** der 5 Einzelproben hergestellt werden. Diese Mischprobe wird im Test eingesetzt.

Überstand

Stabilität	bei 2 °C bis 8 °C	5 Tage
	bei -20 °C (in Aliquoten)	mindestens 24 Monate

Der Überstand sollte nur einmal eingefroren werden.

Vor dem Einsatz im Test muss der aufgetaute Überstand durch Hin- und Herschwenken gemischt werden.

6 TESTDURCHFÜHRUNG

6.1 Hinweise zur Durchführung

- Alle Reagenzien und Proben müssen vor Gebrauch auf Raumtemperatur (20 °C bis 26 °C) gebracht werden.
- Alle Reagenzien müssen ohne Schaumbildung gemischt werden.
- Die Kappen der Reagenzfläschchen dürfen nicht vertauscht werden, um Kreuzkontaminationen zu vermeiden.
- Für jeden Standard, jede Kontrolle oder Probe eine neue Einweg-Plastikspitze verwenden, um Verschleppungen zu vermeiden.
- Mischen Sie den Inhalt der Mikrotiterplatten-Vertiefungen gründlich, um gute Testergebnisse zu gewährleisten.
- Kavitäten während der Testdurchführung nicht trocknen lassen; Reagenzien unmittelbar nach Ende des Waschschriffs hinzufügen.
- Sobald der Test begonnen wurde, müssen alle Schritte ohne Unterbrechung und in der gleichen Reihenfolge für jeden Schritt abgeschlossen werden.
- Die enzymatische Reaktion ist linear proportional zu Zeit und Temperatur.
- Die optische Dichte ist eine Funktion der Inkubationszeit und -temperatur. Die in Kapitel "Testverfahren" angegebenen Inkubationszeiten und -temperaturen müssen eingehalten werden.
- Es wird empfohlen, 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, usw. Nur eine solche Vorbereitung garantiert für jeden Pipettierschritt gleiche Zeiten ohne Unterbrechung.
- **Wichtiger Hinweis zum Waschvorgang:** Das Waschen ist entscheidend. Unsachgemäß gewaschene Kavitäten führen zu fehlerhaften Ergebnissen. Die Sensitivität und Präzision dieses Assays wird erheblich beeinflusst von der korrekten Durchführung des Waschschriffs!
- **Testdurchführung mit vollautomatischen Analysegeräten:** Eine automatisierte Testdurchführung mit vollautomatischen, systemoffenen Analysegeräten ist möglich. Die Kombination muss jedoch vom Anwender validiert werden.

6.2 Testdurchführung

Jeder Lauf muss eine Standardkurve beinhalten.

Die Kontrollen dienen der internen Überprüfung der Zuverlässigkeit des Testverfahrens. Sie müssen bei jedem Testdurchlauf gemessen werden. Das angegebene Testverfahren beschreibt die manuelle Abarbeitung.

Wichtiger Hinweis: Die Genauigkeit dieses Tests wird maßgeblich durch die korrekte Inkubationstemperatur beeinflusst!

1. Die benötigte Anzahl der Mikrotiter-Wells in der Halterung befestigen.
2. **Je 100 µL *Standard*, *Control* und *Probe* mit neuen Plastikspitzen** in die entsprechenden Wells pipettieren.
3. **30 Minuten** bei Raumtemperatur inkubieren.
4. **200 µL *Enzyme Conjugate*** in jedes Well zugeben. Für 10 Sekunden gut schütteln. Es ist sehr wichtig, in diesem Schritt eine komplette Durchmischung zu erreichen.
5. **120 Minuten** bei Raumtemperatur inkubieren.
6. Die Vertiefungen folgendermaßen waschen: Wenn der Waschschriff manuell durchgeführt wird: Den Inhalt der Wells kräftig ausschütteln. Wells **3-mal** mit **300 µL** verdünnter *Wash Solution* pro Well waschen. Bei Verwendung eines Waschautomaten: Wells **3-mal** mit **400 µL** verdünnter *Wash Solution* pro Well waschen. Am Ende des Waschschriffs die Vertiefungen immer kräftig auf saugfähigem Papier ausklopfen, um verbliebene Flüssigkeit zu entfernen.
7. **200 µL *Substrate Solution*** in jedes Well pipettieren.
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 (OD) der Lösung in jedem Well bei **450 nm (Messung) und 620 nm bis 630 nm (Abzug des Hintergrundes, empfohlen)** mit einem Mikrotiterplattenleser bestimmen. Es wird empfohlen, die Vertiefungen **innerhalb von 10 Minuten** nach Zugabe der Stopplösung abzulesen.

6.3 Berechnung der Ergebnisse

1. Die Konzentration der Proben kann direkt von der Standardkurve abgelesen werden.
2. Bei Doppelbestimmungen muss für jeden Standard, jede Kontrolle und Patientenproben der Mittelwert der beiden OD-Werte verwendet werden. Weichen die beiden Werte erheblich voneinander ab, empfiehlt Demeditec, die Proben erneut zu testen.
3. Proben mit Konzentrationen, die den höchsten Standard überschreiten, können mit 0,9% NaCl weiter verdünnt und wie unter "Testdurchführung" beschrieben erneut gemessen werden oder müssen als > 100 pg/mL angegeben werden. Bei der Berechnung der Konzentrationen muss dieser Verdünnungsfaktor berücksichtigt werden. (Beispiel: Verdünnung 1:10: 20 µL Überstand + 180 µL 0,9% NaCl)
4. Automatische Methode:
Die in der Gebrauchsanweisung angegebenen Ergebnisse wurden automatisch mit Hilfe der 4-Parameter-Gleichung bestimmt. (4-Parameter-Rodbard oder 4-Parameter-Marquardt sind die bevorzugten Methoden.) Andere Auswertungsfunktionen können leicht abweichende Werte ergeben.
5. Manuelle Methode:
Erstellen Sie unter Verwendung von halblogarithmischem Millimeterpapier eine Standardkurve, indem Sie die (mittlere) OD jedes Standards gegen seine Konzentration auftragen, wobei der OD-Wert auf der vertikalen (Y) Achse und die Konzentration auf der horizontalen (X) Achse liegt. Bestimmen Sie die entsprechende Probenkonzentration anhand der Standardkurve, indem Sie den (mittleren) OD-Wert für jede Probe verwenden.

6.3.1 Beispiel einer typischen Standardkurve

Die folgenden Daten dienen nur zur Orientierung und dürfen **nicht** anstelle der Datengenerierung zum Zeitpunkt des Tests verwendet werden.

Standard	Optische Dichte (450 nm)
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 REFERENZWERTE

Es wird dringend empfohlen, dass jedes Labor seine eigenen Referenzwerte ermittelt.

In einer Studie mit dem Demeditec Estradiol free in Saliva ELISA wurden die Proben von scheinbar gesunden Erwachsenen untersucht. Dabei ergaben sich folgende Werte:

Population	n	Mittelwert (pg/mL)	Median (pg/mL)	2,5. - 97,5. Perzentile (pg/mL)	Bereich (min. - max.) (pg/mL)
Männer	28	1,11	1,00	0,72 – 3,30	0,72 – 4,78
Frauen					
Pre-menopausal					
Follikelphase	10	3,78	3,64	1,90 – 6,90	1,78 – 6,99
Lutealphase	10	2,47	2,63	1,20 – 3,60	1,05 – 3,75
Post-meno-pausal	22	2,12	2,19	0,72 – 4,4	0,72 – 4,56
Stadium der Schwangerschaft					
1.Trimester	10	4,48	4,29	2,26 – 6,83	1,97 – 6,96
2.Trimester	10	15,17	15,32	3,43 – 28,13	2,54 – 28,81
3.Trimester	10	101,64	108,90	35,05 – 172,23	31,87 – 178,47

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

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

Eine gute Qualitätssicherung im Labor erfordert, dass mit jeder Standardkurve Kontrollen mitgeführt werden. Eine statistisch signifikante Anzahl von Kontrollen sollte gemessen werden, um Mittelwerte und Akzeptanzbereiche zu ermitteln und damit eine korrekte Testdurchführung zu gewährleisten.

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 Analysenzertifikat (CoA), das dem Kit beiliegt, aufgeführt. Die im CoA angegebenen Werte und Bereiche beziehen sich stets auf die aktuelle Kitcharge und sollen zum direkten Vergleich der Ergebnisse verwendet werden.

Falls verfügbar, wird ebenfalls empfohlen, an nationalen oder internationalen Qualitätssicherungsprogrammen teilzunehmen, um die Genauigkeit der Ergebnisse zu sichern.

Es sollten geeignete statistische Methoden zur Analyse von Kontrollwerten 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, Verfallsdaten der Reagenzien, Lagerungs- und Inkubationsbedingungen, Absaug- und Waschmethode.

Sollten nach Überprüfung der vorgenannten Bereiche keine Fehler erkennbar sein, setzen Sie sich bitte mit Ihrem Lieferanten oder direkt mit der Firma Demeditec Diagnostics in Verbindung.

9 LEISTUNGSMERKMALE

9.1 Spezifität der Antikörper (Kreuzreaktivität)

Ausführliche Informationen zu den getesteten Substanzen finden Sie in der englischen Version der Gebrauchsanweisung.

9.2 Sensitivität

„Limit of Blank“ (LoB)	0,028 pg/mL
Nachweisgrenze (LoD)	0,716 pg/mL
Quantifizierungsgrenze (LoQ)	2,364 pg/mL
Messbereich	0,716 pg/mL – 100 pg/mL
Linearer Bereich	0,919 pg/mL – 100 pg/mL

Die Daten zu:

9.3 Reproduzierbarkeit (Präzision)

9.4 Wiederfindung

9.5 Linearität

9.6 Methodenvergleich

entnehmen Sie bitte der ausführlichen englischen Version der Gebrauchsanweisung.

10 GRENZEN DES VERFAHRENS

Zuverlässige und reproduzierbare Ergebnisse werden erzielt, wenn das Testverfahren mit vollständigem Verständnis der Gebrauchsanweisung und unter Einhaltung der Richtlinien zur Qualitätssicherung im Labor durchgeführt wird. Jede unsachgemäße Handhabung der Proben oder eine Modifikation dieses Tests kann die Ergebnisse beeinflussen.

10.1 Störsubstanzen

Eine Kontamination der Speichelproben mit Blut von mehr als 0,16 % beeinflusst das Ergebnis und ist in der Regel mit dem Auge zu erkennen. Daher sollten Proben, die sichtbar Blut enthalten, nicht verwendet werden. Konzentrationen von Natriumazid $\geq 0,02$ % beeinflussen den Test und können zu falschen Ergebnissen führen.

10.2 Beeinflussung durch Medikamente

Informationen zu den getesteten Substanzen (Medikamente) entnehmen Sie bitte der ausführlichen englischen Gebrauchsanweisung.

10.3 High-Dose-Hook-Effekt

Ein Hook-Effekt ist für kompetitive Assays nicht bekannt.

11 RECHTLICHE GRUNDLAGEN

11.1 Zuverlässigkeit der Ergebnisse

Der Test muss exakt gemäß der Testanleitung des Herstellers abgearbeitet werden. Darüber hinaus muss der Anwender die Richtlinien zur Qualitätssicherung im Labor und anwendbare nationale Normen und/oder Gesetze strikt einhalten. 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 mitzuführen. 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 bezüglich eines Ergebnisses Zweifel oder Bedenken bestehen, 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.

11.4 Meldung von schwerwiegenden Vorkommnissen

Jedes schwerwiegende Vorkommnis im Zusammenhang mit dem Produkt ist dem Hersteller und der zuständigen Behörde des Mitgliedstaats, in dem der Anwender und/oder der Patient niedergelassen ist, zu melden.

12 LITERATURE

1. Tsang BK et al. Steroid biosynthesis by isolated human ovarian follicular cells in vitro. *J Clin Endocrinol Metab* 1980, 51, 1407 – 11.
2. Gore-Langton RE et al. Follicular steroidogenesis and its control. In: *The physiology of Reproduction*. 1988, Ed.: Knobil et al., 331-385, Raven press, New York.
3. Hall, PF. Steroid synthesis: Organization and Regulation. In: *The Physiology of Reproduction*. 1988, Ed.: Knobil et al., 975 – 988, Raven press, New York
4. Saldanha CJ, Remage-Healey L, and Schlinger BA. "Synaptocrine signaling: steroid synthesis and action at the synapse." *Endocrine reviews* 32.4, 2011, 532–549.
5. Wu CH et al. Free and protein-bound plasma estradiol-17 beta during the menstrual cycle". *The Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism*. 1976, 43 (2), 436–45.
6. Fox EM et al. Novel actions of estrogen to promote proliferation: integration of cytoplasmic and nuclear pathways. *Steroids*, 2009, 74(7), 622-627.
7. Fernando RI et al. Estradiol abrogates apoptosis in breast cancer cells through inactivation of BAD: Ras-dependent nongenomic pathways requiring signaling through ERK and Akt. *Mol Biol Cell*. 2004, 15(7), 3266-3284.
8. Bovenkerk S et al. Induction of p53 expression and function by estrogen in osteoblasts. *Calcif Tissue Int*. 2003, 73(3), 274-280.
9. Vazquez Rodriguez G et al. Estradiol promotes breast cancer cell migration via recruitment and activation of neutrophils. *Cancer Immunol Res*. 2017, 5(3), 234-247.
10. Linton L et al. Associations of serum levels of sex hormones in follicular and luteal phases of the menstrual cycle with breast tissue characteristics in young women. *PLoS One*. 2016, 11(10), e0163865.
11. Kim JY et al. Prognostic effect of preoperative serum estradiol level in postmenopausal breast cancer. *BMC Cancer*. 2013, 13:503.
12. Farahani H et al. Serum and Saliva Levels of Cancer Antigen 15-3, Carcinoembryonic Antigen, Estradiol, Vaspin, and Obestatin as Biomarkers for the Diagnosis of Breast Cancer in Postmenopausal Women. *Laboratory Medicine*. 2020, 51, 620-627.
13. Siiteri PK et al. The serum transport of steroid hormones. *Rec Progr Horm Res* 1982, 38, 457 – 510
14. Martin B. et al. Binding of steroids by proteins in follicular fluid of the human ovary. *J Clin Endocrinol Metab* 1982, 35, 443 – 447.
15. Celec P et al. Salivary Sex Hormones during the Menstrual Cycle. *Endocrine Journal* 2009, 56 (3), 521-523.
16. Gandara BK, Leresche L, and Mancl L. Patterns of Salivary Estradiol and Progesterone across the Menstrual Cycle. *Ann N Y Acad Sci*. 2007, 1098, 446–450.

17. Baird DT 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.,1976, 125 – 33, Academic press, New York
18. McNtly KP et al. Concentration of estrogens and androgens in human ovarian venous plasma and follicular fluid throughout the menstrual cycle.
J. Endocrinol. 1976, 71, 77 –85.
19. Gruhn JG, Kazer RR. Hormonal Regulation of the Menstrual Cycle: The Evolution of Concepts. Springer Science & Business Media.2013, 69–73. ISBN 978-1-4899-3496-3.
20. March CM et al. Roles of estradiol and progesterone in eliciting mid-cycle luteinizing hormone and follicle stimulating hormone surges.
J. Clin. Endocrinol. Metab.1979, 49, 507 – 12.
21. Stricker R et al. Establishment of detailed reference values for luteinizing hormone, follicle stimulating hormone, estradiol, and progesterone during different phases of the menstrual cycle on the Abbott ARCHITECT analyzer".
Clinical Chemistry and Laboratory Medicine. 2006, 44 (7), 883–7.
22. Simpson ER and McDonald PC. Endocrinology of pregnancy. In: Textbook of Endocrinology,
Ed.: Williams R.H. 1981, 412 – 22, Saunders Company, Philadelphia.
23. Lipson, SF and Ellison, PT. Comparison of salivary steroid profiles in naturally occurring conception and non-conception cycles.
Hum Reprod, 1996, 11(10), 2090-96.
24. Choe, JK, Khan-Dawood, FS, and Dawood, MY. Progesterone and estradiol in saliva and plasma during the menstrual cycle.
Am J Obstet Gynecol, 1983, 147(5), 557-62.
25. Lewis JG. Steroid Analysis in Saliva: An overview.
Clin Biochem Rev 2006,27 August 139-146.
26. Gameiro, CM, Romão, F, and Castelo-Branco, C. Menopause and aging: Changes in the immune system –A review.
Maturitas, 2010, 67(4), 316-20.

SYMBOLS USED WITH DEMEDITEC ASSAYS

Symbol	English	Deutsch	Française	Espanol	Italiano
	European Conformity	CE-Konformitäts-kennzeichnung	Conforme aux normes européennes	Conformidad europea	Conformità europea
	Consult instructions for use	Gebrauchsanweisung beachten	Consulter les instructions d'utilisation	Consulte las Instrucciones	Consultare le istruzioni per l'uso
	In vitro diagnostic device	In-vitro-Diagnostikum	utilisation Diagnostic in vitro	Diagnóstico in vitro	Per uso Diagnostica in vitro
	For research use only	Nur für Forschungszwecke	Seulement dans le cadre de recherches	Sólo para uso en investigación	Solo a scopo di ricerca
	Catalogue number	Katalog-Nr.	Référence	Número de catálogo	No. di catalogo
	Lot. No. / Batch code	Chargen-Nr.	No. de lot	Número de lote	Lotto no
	Contains sufficient for <n> tests/	Ausreichend für "n" Ansätze	Contenu suffisant pour "n" tests	Contenido suficiente para <n> ensayos	Contenuto sufficiente per "n" saggi
	Note warnings and precautions	Warnhinweise und Vorsichtsmaßnahmen beachten	Avertissements et mesures de précaution font attention	Tiene en cuenta y advertencias 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