

# Product information

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



User's Manual

## Estriol free in Saliva ELISA

*Enzyme immunoassay for the quantitative determination of free active Estriol in saliva*

IVD



REF

DES6644



96 Wells

## CONTENTS / INHALTSVERZEICHNIS

1	INTRODUCTION .....	3
2	PRINCIPLE.....	3
3	WARNINGS AND PRECAUTIONS.....	4
4	REAGENTS.....	4
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 PROCEDURE.....	10
11	LEGAL ASPECTS.....	11
12	REFERENCES.....	11
1	EINLEITUNG .....	12
2	TESTPRINZIP .....	12
3	VORSICHTSMAßNAHMEN.....	13
4	BESTANDTEILE DES KITS .....	13
5	PROBENVORBEREITUNG.....	15
6	TESTDURCHFÜHRUNG.....	16
7	ERWARTETE WERTE .....	17
8	QUALITÄTSKONTROLLE .....	18
9	ASSAY CHARACTERISTIKA .....	18
10	GRENZEN DES TESTS .....	18
11	RECHTLICHE GRUNDLAGEN.....	19
12	REFERENZEN .....	19
	SYMBOLS USED WITH DEMEDITEC ELISA.....	20

## 1 INTRODUCTION

### 1.1 Intended Use

The **DEMEDIATEC Estriol free in Saliva ELISA** is an enzyme immunoassay for the quantitative *in vitro diagnostic* measurement of free estriol in saliva.

### 1.2 Summary and explanation

Estriol (also Oestriol) is one of the three main estrogens produced by the human body. It is only produced in significant amounts during pregnancy as it is made by the fetus.

During pregnancy the production of estriol depends on an intact maternal-placental-fetal unit. Fetal-placental production of estriol leads to a progressive rise in maternal circulating levels reaching a late-gestational peak several orders of magnitude greater than non-pregnant levels. In the maternal circulation, estriol undergoes a rapid conjugation in the liver followed by urinary excretion with a half-life of about 20 minutes. Since normal estriol production depends on an intact maternal-placental-fetal circulation and functional fetal metabolism, maternal estriol levels have been used to monitor fetal status during pregnancy, particularly during the third trimester.

Dehydroepiandrosterone-Sulfate (DHEA-S) is produced by the adrenal cortex of the fetus, this is converted to estriol by the placenta. If levels are abnormally low in a pregnant woman, this may indicate a problem with the development in the child. Levels of estriol in non-pregnant women do not change much after menopause, and levels are not significantly different from levels in men.

## 2 PRINCIPLE

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

The microtiter wells are coated with an anti-Estriol antibody. Endogenous unconjugated ("free") Estriol of a patient sample competes with an Estriol-horseradish peroxidase conjugate for binding to the coated antibody. After incubation the unbound conjugate is washed off. The amount of bound peroxidase conjugate is inversely proportional to the concentration of Estriol in the sample. After addition of the substrate solution, the intensity of color developed is inversely proportional to the concentration of free Estriol in the patient sample.

### 3 WARNINGS AND PRECAUTIONS

1. This kit is for in vitro diagnostic use only. For professional use only.
2. Before starting the assay, read the instructions completely and carefully. Use the valid version of the package insert provided with the kit. Be sure that everything is understood.
3. The microplate contains snap-off strips. Unused wells must be stored at 2 °C to 8 °C in the sealed foil pouch and used in the frame provided.
4. Pipetting of samples and reagents must be done as quickly as possible and in the same sequence for each step.
5. Use reservoirs only for single reagents. This especially applies to the substrate reservoirs. Using a reservoir for dispensing a substrate solution that had previously been used for the conjugate solution may turn solution colored. Do not pour reagents back into vials as reagent contamination may occur.
6. Mix the contents of the microplate wells thoroughly to ensure good test results. Do not reuse microwells.
7. Do not let wells dry during assay; add reagents immediately after completing the rinsing steps.
8. Allow the reagents to reach room temperature (18-25°C) before starting the test. Temperature will affect the absorbance readings of the assay. However, values for the patient samples will not be affected.
9. Never pipet by mouth and avoid contact of reagents and specimens with skin and mucous membranes.
10. Do not smoke, eat, drink or apply cosmetics in areas where specimens or kit reagents are handled.
11. Wear disposable latex gloves when handling specimens and reagents. Microbial contamination of reagents or specimens may give false results.
12. Handling should be done in accordance with the procedures defined by an appropriate national biohazard safety guideline or regulation.
13. Do not use reagents beyond expiry date as shown on the kit labels.
14. All indicated volumes have to be performed according to the protocol. Optimal test results are only obtained when using calibrated pipettes and microtiterplate readers.
15. 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.
16. Avoid contact with Stop Solution. It may cause skin irritation and burns.
17. Chemicals and prepared or used reagents have to be treated as hazardous waste according to the national biohazard safety guideline or regulation.
18. For information please refer to Material Safety Data Sheets. Safety Data Sheets for this product are available upon request directly from Demeditec Diagnostics GmbH.

## 4 REAGENTS

### 4.1 Reagents provided

1. **SORB MT Microtiterplate**, 12 x 8 (break apart) strips with 96 wells;  
Wells coated with an anti-Estriol antibody
2. **CAL 0-5 Calibrator (Calibrator 0-5)**, 6 vials, 1 ml each, ready to use;  
Concentrations: 0 – 2.5 – 15 – 100 – 600 – 4000 pg/ml  
Conversion: Estriol (pg/ml) x 3.5 = pmol/l
3. **CONTROL 1-2 Control 1 (low) / Control 2 (high)**, 2 vials, 1.0 ml each, ready to use;  
For control values and ranges please refer to QC-Datasheet
4. **ENZ CONJ 100x Enzyme Conjugate concentrate**, 1 vial, 0.5 ml (100X concentrated); see  
“Preparation of reagents”; Estriol conjugated to horseradish peroxidase
5. **DIL BUF Enzyme Conjugate Dilution Buffer**, 1 vial, 30 ml, ready to use;
6. **SUB TMB Substrate Solution**, 1 vial, 22 ml, ready to use;  
contains tetramethylbenzidine (TMB)
7. **STOP SOLN Stop Solution**, 1 vial, 7 ml, ready to use;  
contains 2 N Hydrochloric Acid solution
8. **WASH SOLN 10x Wash Solution**, 1 vial, 50 ml (10X concentrated);  
see “Preparation of Reagents“

### 4.2 Materials required but not provided

- Microcentrifuge
- A microtiter plate reader capable for endpoint measurement at 450 nm
- Calibrated variable precision micropipettes (10 µl, 50 µl, 100 µl, 200 µl).
- Microplate mixer operating more than 600 rpm
- Vortex mixer
- Absorbent paper
- Distilled or deionized water
- Timer
- Semi logarithmic graph paper or software for data reduction

### 4.3 Storage conditions

When stored at 2°C to 8°C unopened reagents will be stable until expiration date. Do not use reagents beyond this date. Opened reagents must be stored at 2°-8°C. After first opening the reagents are stable for 30 days if used and stored properly.

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

### 4.4 Reagent preparation

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

#### Wash Solution:

Dilute 50 ml of 10X concentrated *Wash Solution* with 450 ml deionized water to a final volume of 500 ml.  
*The diluted Wash Solution is stable for at least 3 months at room temperature (18-25°C).*

#### Enzyme Conjugate:

Dilute the 100X concentrated *Enzyme Conjugate* with *Dilution Buffer*, i.e. 0.1 ml *Enzyme Conjugate concentrate* to a final volume of 10 ml with *Enzyme Conjugate Dilution Buffer*. Mix gently.

*Stability of the prepared Enzyme-Conjugate: Stable for 3 hours at 18°C - 25°C*

**Prepare immediately before use.**

### 4.5 Disposal of the kits

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

#### 4.6 Damaged test kits

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

### 5 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 resulting in falsely elevated concentration values. In case of visible blood contamination the patient should discard the sample, rinse the sampling device with water, wait for 10 minutes and take a new 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 cotton based Salivettes for sampling. False readings will result. 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. Drinking of coffee is not allowed during the last 3 hours before taking the samples.

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.

#### 5.2 Specimen Storage and Preparation

Saliva samples in general are stable at ambient temperature for up to seven days. Therefore mailing of such samples by ordinary mail without cooling will not create any problem. Storage at 2-8°C can be done for a period of up to one month. Whenever possible, samples should preferably be kept at a temperature of -20°C. Even repeated thawing and freezing is not a problem.

Each sample has to be frozen, thawed, and centrifuged at least once anyhow in order to precipitate the mucins by centrifugation. Upon arrival of the samples at the lab the samples have to be kept frozen at least overnight. Next morning the samples are thawed and mixed carefully. The samples have to be centrifuged for 5 to 10 minutes. The clear colorless supernatant is easy to pipette. If the sample should show even a slightly red color it should be discarded. Otherwise the 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 staff of lab (after at least one freezing, thawing, and centrifugation cycle) should mix aliquots of the 5 single samples and perform the determination using the mixture.

## 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.
- Respect the incubation times as stated in this instruction for use.

### 6.2 Assay procedure

Each run must include a standard curve.

1. Prepare a sufficient number of microplate wells to accommodate calibrators, controls and patient samples.
2. Dispense **50 µl** of each **calibrator, control and sample** with new disposable tips into appropriate wells.
3. Dispense **100 µl** of diluted **Enzyme Conjugate** into each well.
4. Incubate for **60 minutes** at room temperature on a Microplate shaker ( $\geq 600$  rpm).  
**Important Note:**  
Optimal reaction in this assay is markedly dependent on shaking of the microplate!
5. Discard the content of the wells and rinse the wells **4 times** with diluted **Wash Solution** (300 µl per well). Remove as much Wash Solution as possible by beating the microplate on absorbent paper.
6. Add **200 µl** of **Substrate Solution** to each well.
7. Incubate without shaking for **30 minutes** at room temperature in the dark.
8. Stop the reaction by adding **50 µl** of **Stop Solution** to each well.
9. Determine the absorbance of each well at **450±10 nm**. It is recommended to read the wells within 15 minutes.

### 6.3 Calculation of results

1. Calculate the average absorbance values for each set of calibrators, controls and 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 calibration 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 calculation method. Other data reduction functions may give slightly different results.
5. The concentration of the samples can be determined directly from this calibrator curve.

#### Conversion to SI units:

Estriol (pg/ml) x 3.5 = pmol/l

#### 6.3.1 Example of typical calibrator curve

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

Standard	Optical Units (450nm)
Calibrator 0 (0 pg/ml)	2.592
Calibrator 1 (2.5 pg/ml)	2.258
Calibrator 2 (15 pg/ml)	1.963
Calibrator 3 (100 pg/ml)	1.504
Calibrator 4 (600 pg/ml)	0.975
Calibrator 5 (4000 pg/ml)	0.549

## 7 EXPECTED NORMAL VALUES

In order to determine the normal range of Estriol free in Saliva, samples from adult male and female apparently healthy subjects, were collected in the first hours after awaking and analyzed using the DEMEDITEC Estriol free in Saliva ELISA kit. The following range was calculated from this study.

	Age group	N	Range (5-95 percentile) pg/ml
Men	≥ 20 years	40	< 1.4 - 49,8
Women	20 – 35 years	47	1,6 - 33,6
	40 – 50 years (premenopausal)	90	< 1.4 - 24,9
	≥ 55 years (postmenopausal)	61	< 1.4 - 35,7

Pregnancy week	Free Estriol (pg/ml) in saliva
22	200 – 1200
24	300 - 1500
26	500 – 1900
28	700 - 2300
30	1000 - 2600
32	1100 - 3300
34	1900 - >4000
36	2500 - >4000
37	2800 - >4000
38	3000 - >4000
39	3300 - >4000
40	3700 - >4000

The results alone should not be the only reason for therapy. The results should be correlated to other clinical observations and diagnostic tests. Since estriol levels show diurnal cycles, we recommend that the samples should be obtained at the same time each day. Because of differences which may exist between laboratories and location with respect to population, laboratory technique and selection of reference group, it is important for each laboratory to establish the appropriateness of adopting the reference range suggested here.

## 8 QUALITY CONTROL

Good laboratory practice requires that controls should 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 national 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 at 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 analyzing 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 Analytical Sensitivity

The lowest analytical detectable level of Estriol that can be distinguished from the Zero Calibrator is 1.4 pg/ml at the 2SD confidence limit.

### 9.2 Specificity (Cross Reactivity)

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

Steroid	% Cross reaction
Androstenedione	< 0.1
Cortisol	< 0.1
11-Desoxycortisol	< 0.1
Estradiol	0.1
Estrone	< 0.1
Pregnenolone	< 0.1
Prednisolon	< 0.1
Prednison	< 0.1
Progesterone	< 0.1
Testosterone	< 0.1

### 9.3 Assay dynamic range

The range of the assay is between 2.5 – 4000 pg/ml.

### 9.4 Reproducibility

#### 9.4.1 Intra-Assay

The intra-assay variation was determined by 15 replicate measurements of 3 saliva samples within one run. The within-assay variability is shown below:

<b>Mean (pg/ml)</b>	79.3	307.3	850.7
<b>SD</b>	7.4	24.4	69.8
<b>CV (%)</b>	9.4	7.9	8.2
<b>n =</b>	15	15	15

#### 9.4.2 Inter-Assay

The inter-assay (between-run) variation was determined by duplicate measurements of 3 saliva samples in 10 different tests.

<b>Mean (pg/ml)</b>	63.2	393.3	553.1
<b>SD</b>	5.4	19.1	35.9
<b>CV (%)</b>	8.6	4.8	6.5
<b>n =</b>	10	10	10

## 9.5 Recovery

Using the Calibrator Matrix spiking solutions were prepared. Aliquots of these solutions were spiked into 500 µl of three saliva samples. All samples were measured by the Demeditec Estriol free in Saliva assay.

Sample	Spiking (pg/ml)	Measured (pg/ml)	Expected (pg/ml)	Recovery (%)
1	-	14.9	-	-
	550	575.6	565	102%
	600	673.6	615	109%
	700	734.6	715	103%
2	-	2.2	-	-
	550	447.8	552	81%
	600	626.1	602	104%
	700	746.5	702	106%
3	-	10.4	-	-
	500	408	510	80%
	600	516.5	610	85%
	700	700.4	710	99%

## 10 LIMITATIONS OF PROCEDURE

Reliable and reproducible results will be obtained when the assay procedure is performed with a complete understanding of the package insert instruction and with adherence to good laboratory practice. Any improper handling of samples or modification of this test might influence the results.

### 10.1 Interfering Substances

Blood contamination in saliva samples will affect results, and usually can be seen by eye.

### 10.2 Drug Interferences

The clinical significance of Estriol determination can be invalidated if the patient was treated with natural or synthetic steroids.

---

## 11 LEGAL ASPECTS

### 11.1 Reliability of Results

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

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

### 11.2 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

1. Fisher-Rasmussen, W., Gabrielsen, M. V., and Wisborg, Acta Obstet. Gynecol Scand 60: 417-420 (1981)
2. Truran, P. L., Read, G.F., and Walker, S. Clin. Chem. 28/12, 2393 (1982)
3. Vining, R. F., Mc Ginley, R., and Rice B. J. Clin. Endoc. Metab. 56, 454 (1983)
4. Bagger, P. V., Jacobsson, K., and Gullberg, B. Acta Obstet Gynecol Scand 60: 187 (1981)
5. Osterman, T. M., Juntunen, K.O., and Gothoni, G.D. Clin. Chem. 25 (5) 716 (1979)
6. Wisdom, G.B. Clin Chem. 22 (8) 1243-1255 (1976)

## 1 EINLEITUNG

**Nur für In-vitro Diagnostik.** Der DEMEDITEC Estriol free in Saliva ELISA ist eine Methode zur quantitativen Bestimmung des freien Estriols in Speichelproben.

Estriol (auch als Oestriol bezeichnet) bildet den Hauptanteil der durch die fetoplazentale Einheit gebildeten Estrogene. In bedeutenden Mengen wird es nur während einer Schwangerschaft durch den Fötus erzeugt. Während der Schwangerschaft hängt die Produktion von Estriol von einer intakten fetoplazentomaternalen Einheit ab. Die fetoplazentale Produktion von Estriol führt zu einem progressiven Anstieg des mütterlichen zirkulierenden Estriols, welches sein Maximum zum Schwangerschaftsende erreicht und signifikant höher liegt als bei nicht Schwangeren.

Im mütterlichen Kreislauf durchlebt Estriol eine schnelle Konjugation in der Leber, gefolgt von einer Harnausscheidung mit einer Halbwertszeit von ungefähr 20 Minuten. Da eine normale Estriol Produktion von einem intakten fetoplazentomaternalen Kreislauf und einem funktionellem fetalem Metabolismus abhängig ist, werden mütterliche Estriol Werte verwendet, um den fetalen Status während der Schwangerschaft, besonders während des dritten Trimesters, zu kontrollieren.

Dehydroepiandrosterone-Sulfat (DHEA-S) wird durch die Nebennierenrinde des Fötus erzeugt, welches in Estriol durch die Plazenta umgewandelt wird. Wenn die Estriol-Werte einer schwangeren Frau abnormal niedrig sind, könnte dies ein Anzeichen für eine intrauterine Wachstumsretardierung sein. Estriol-Werte von nichtschwangeren Frauen bleiben nach dem Klimakterium relativ unverändert und unterscheiden sich nicht signifikant von den Estriol-Werten der Männer.

## 2 TESTPRINZIP

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

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

### 3 VORSICHTSMAßNAHMEN

1. Dieser Kit ist nur zum in vitro diagnostischen Gebrauch geeignet und sollte nur von medizinischem Fachpersonal durchgeführt werden.
2. Lesen Sie vor dem Testansatz sorgfältig die Packungsbeilage. Verwenden Sie nur die gültige, im Testkit enthaltene Arbeitsanleitung.
3. Die Mikrotiterplatte enthält teilbare einzeln brechbare Mikrotiterstreifen. Unbenutzte Mikrotiterstreifen sollten im verschlossenen Folienbeutel bei 2-8°C aufbewahrt werden und im mitgelieferten Rahmen verwendet werden.
4. Proben und Reagenzien sollten so schnell wie möglich und in einer gleichbleibenden Sequenz pipettiert werden.
5. Verwenden Sie für jedes Reagenz einen separaten Pipettenaufsatz. Das gilt besonders für die Substrat-Lösung. Wenn der Pipettenaufsatz der Substrat-Lösung vorher z.B. für das Konjugat verwendet wurde, kommt es zu einem Farbumschlag der Substrat-Lösung. Gießen Sie Reagenzien nie zurück ins Fläschchen, da so Reagenz-Kontaminationen verursacht werden können.
6. Mischen Sie den Inhalt der Mikrotiterplatte sorgfältig um gute Testergebnisse zu gewährleisten. Mikrotiterplatten nicht wiederverwenden!
7. Mikrotiterstreifen nicht austrocknen lassen während des Testlaufes. Nach jedem Waschschrift zügig im Testprotokoll fortfahren.
8. Bringen sie die Reagenzien vor dem Testansatz auf Raumtemperatur (18-25°C).
9. Nicht mit dem Mund pipettieren und den Kontakt von Kitbestandteilen und Proben mit Haut und Schleimhäuten vermeiden.
10. In den Bereichen, in denen Proben oder Kitbestandteile verwendet werden, nicht rauchen, essen oder Kosmetika verwenden.
11. Beim Umgang mit Proben oder Reagenzien Einweg-Latexhandschuhe tragen. Die Verunreinigung von Reagenzien oder Proben mit Mikroben kann zu falschen Ergebnissen führen.
12. Der Gebrauch sollte in Übereinstimmung mit den Verfahren erfolgen, welche durch eine nationale Gefahrenstoff-Sicherheitsrichtlinie festgelegt sind.
13. Reagenzien nicht nach dem auf dem Kit-Etikett angegebenen Verfallsdatum verwenden.
14. Alle im Kit-Protokoll angegebenen Mengen müssen genau eingehalten werden. Optimale Ergebnisse können nur durch Verwendung kalibrierter Pipetten und Mikrotiterplatten-Lesegeräte erreicht werden.
15. Komponenten von Kits mit unterschiedlichen Lotnummern nicht untereinander vertauschen oder mischen. Es wird empfohlen, keine Wells von verschiedenen Platten zu verwenden, auch nicht, wenn es sich um das gleiche Lot handelt. Die Kits können unter anderen Bedingungen gelagert oder versendet worden sein, so dass die Bindungscharakteristika der Platten leicht unterschiedlich ausfallen.
16. Der Kontakt mit der Stop Solution sollte vermieden werden, da sie Hautreizungen und Verbrennungen verursachen kann.
17. Die Entsorgung aller Bestandteile sollte gemäß der Vorschriften einer entsprechenden nationalen Gefahrenstoff-Sicherheitsrichtlinie erfolgen.
18. Informationen zu im Kit enthaltenen gefährlichen Substanzen entnehmen Sie bitte dem Materialsicherheitsdatenblatt. Materialsicherheitsdatenblätter für dieses Produkt sind auf Anfrage direkt von der Firma Demeditec Diagnostics GmbH erhältlich.

## 4 BESTANDTEILE DES KITS

### 4.1 Kitinhalt

1. **SORB MT Mikrotiterplatte**, 12 x 8 (einzeln brechbare) Mikrotiterstreifen mit 96 Vertiefungen beschichtet mit einem anti-Estriol-Antikörper.
2. **CAL 0-5 Standard (Standard 0-5)**, 6 Fläschchen, je 1 ml, gebrauchsfertig;  
Konzentrationen: 0 – 2.5 – 15 – 100 – 600 – 4000 pg/ml  
Umrechnungsfaktor: Estriol (pg/ml) x 3.5 = pmol/l.
3. **CONTROL 1-2 Kontrolle 1 (niedrig) / Kontrolle 2 (hoch)**, 2 Fläschchen, je 1 ml, gebrauchsfertig;  
Kontrollwerte und –bereiche entnehmen Sie bitte dem QC-Datenblatt.
4. **ENZ CONJ 100x Enzymkonjugat**, 1 Fläschchen, 0,5 ml (100X konzentriert), siehe „Vorbereitung der Reagenzien“; Estriol mit Meerrettichperoxidase konjugiert.
5. **DIL BUF Enzymkonjugat-Verdünnungspuffer**, 1 Fläschchen, 30 ml, gebrauchsfertig;
6. **SUB TMB Substratlösung**, 1 Fläschchen, 22 ml, gebrauchsfertig;  
enthält Tetramethylbenzidin (TMB)
7. **STOP SOLN Stopplösung**, 1 Fläschchen, 7 ml, gebrauchsfertig;  
Enthält 2 N Salzsäure.
8. **WASH SOLN 10x Waschlösung**, 1 Fläschchen, 50 ml (10X konzentriert);  
Siehe „Vorbereitung der Reagenzien“.

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

- Zentrifuge
- Kalibriertes Mikrotiterplatten-Lesegerät mit 450±10 nm Filter
- Kalibrierte variable Präzisions-Mikropipetten (10 µl, 50 µl, 100 µl, 200 µl)
- Mikrotiterplatten-Schüttler mit mehr als 600 rpm
- Vortex-Mixer
- Saugfähiges Papier
- Aqua dest.
- Zeitnahmegerät
- Semilogarithmisches Papier oder Software zur Datenverarbeitung

### 4.3 Lagerung und Haltbarkeit des Kits

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

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

### 4.4 Vorbereitung der Reagenzien

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

#### Waschlösung

Die 10-fach konzentrierte Waschlösung (50 ml) mit 450 ml destilliertem Wasser auf ein Gesamtvolumen von 500 ml verdünnen. *Die verdünnte Waschlösung ist bei Raumtemperatur (18-25°C) für mindestens 3 Monate stabil.*

#### Enzymkonjugat

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

*Stabilität des verdünnten Enzymkonjugats: Stabil für 3 Stunden bei 18°C - 25°C*

**Achtung: Bitte erst unmittelbar vor dem Gebrauch herstellen!**

#### 4.5 Entsorgung des Kits

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

#### 4.6 Beschädigte Testkits

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

### 5 PROBENVORBEREITUNG

Proben, die Natriumazid enthalten, sollten nicht verwendet werden. Die Speichelproben sollten vollkommen farblos sein und keine geringfügige Rotfärbung durch eine Blutkontamination aufweisen. Eine Rotfärbung wird bei dieser Bestimmungsmethode immer einen zu hohen Wert ergeben. Bereits die geringste rötliche Färbung sollte Anlass dafür sein, dass der Patient die Probe verwirft, 10 Minuten wartet und dann eine neue Probe nimmt. Während der Sammelperiode darf nichts gekaut werden. Jeder erhöhte Druck auf die Zähne kann zu unerwünschten Einschwemmungen von (unsichtbaren) Blutbestandteilen aus dem Zahnfleisch und damit erhöhten Messwerten führen.

#### 5.1 Probenentnahme

Für die korrekte Speichelsammlung empfehlen wir geeignete Sammelgefäße aus ultra reinem Polypropylen zu verwenden. PE-enthaltende Behältnisse oder Salivetten sind wegen möglicher Interferenzen zum Sammeln von Speichelproben für diesen Test ungeeignet. Glasgefäße sind ebenfalls geeignet, allerdings muss darauf geachtet werden, dass verwendete Stopfen keine Interferenzen zeigen, was bei PE-Stopfen aber zu erwarten ist. Bitte kontaktieren Sie Demeditec Diagnostics für weitere Details.

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. Insbesondere auf das Konsumieren von Kaffee sollte mindestens bis 3 Stunden vor der Probenentnahme verzichtet werden. Wenn ein Fasten vor der Sammelperiode zu schwierig sein sollte, darf in begrenzten Mengen 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. Bezüglich einer eventuellen Rotfärbung der Proben siehe Anfang des Kapitels 5.

#### 5.2 Probenaufbewahrung und Vorbereitung

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 2-8°C ist aber vorzuziehen und kann bis zu einem Monat lang vorgenommen werden. Wenn möglich sollte man aber die Proben sicherheitshalber bei -20°C aufbewahren, wobei mehrfache Gefrier- und Auftauzyklen unbedenklich sind. In jedem Fall muss jede Speichelprobe ohnehin zumindest einmal einen Gefrier- und Auftauzyklus durchlaufen, um die Muzine 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.

## 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 sollte eine neue Pipettenspitze verwendet werden, um Verschleppungen zu vermeiden.
- Die Optische Dichte ist abhängig von Inkubationszeit und Temperatur. Deshalb ist es notwendig, vor Beginn der Testdurchführung alle Reagenzien in einen arbeitsbereiten Zustand zu bringen, die Deckel der Fläschchen zu öffnen, alle benötigten Vertiefungen in den Halter zu setzen. Nur eine solche Vorbereitung garantiert gleiche Zeiten für jeden Pipettiervorgang ohne Pausen.
- Als generelle Regel gilt, dass die enzymatische Reaktion linear proportional zu Zeit und Temperatur ist.
- Die in der Gebrauchsanweisung angegebenen Inkubationszeiten müssen eingehalten werden.

### 6.2 Testdurchführung

Jeder Lauf muss eine Standardkurve beinhalten.

1. Die benötigte Anzahl an **Mikrotiterstreifen** in der Halterung befestigen.
2. Je **50 µl Standards, Kontrollen und Proben mit neuen Plastikspitzen** in die entsprechenden Vertiefungen geben.
3. **100 µl** des verdünnten **Enzymkonjugats** in jede Vertiefung geben.
4. **60 Minuten** bei Raumtemperatur auf einem Mikrotiterplatten-Schüttler inkubieren ( $\geq 600$  rpm).  
**Achtung:**  
Eine optimale Reaktion wird erheblich beeinflusst durch das Schütteln der Mikrotiterplatte!
5. Den Inhalt der Vertiefungen kräftig ausschütten. Vertiefungen **4mal** mit verdünnter **Waschlösung** (300 µl pro Vertiefung) waschen. Restliche Flüssigkeit durch Ausklopfen der Mikrotiterplatte auf saugfähigem Papier entfernen.
6. **200 µl Substratlösung** in jede Vertiefung geben.
7. **30 Minuten** ohne Schütteln bei Raumtemperatur im Dunkeln inkubieren.
8. Die enzymatische Reaktion durch Zugabe von **50 µl Stopplösung** in jede Vertiefung abstoppen.
9. Die Optische Dichte bei **450±10 nm** mit einem Mikrotiterplatten-Lesegerät innerhalb von 15 Minuten nach Zugabe der Stopp-Lösung bestimmen.

### 6.3 Ergebnisermittlung

1. Die durchschnittlichen Werte der Optischen Dichte (OD) für jedes Set von Standards, Kontrollen 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 (4 Parameter Logistics) bestimmt. Andere Auswertungsfunktionen können leicht abweichende Werte ergeben.
5. Die Konzentration der Proben kann direkt von der Standardkurve abgelesen werden.

#### Umrechnung in SI Einheiten:

Estriol (pg/ml) x 3.5 = pmol/l



### 6.3.1 Beispiel für eine Standardkurve

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

Standard	Optische Dichte (450nm)
Standard 0 (0 pg/ml)	2.592
Standard 1 (2,5 pg/ml)	2.258
Standard 2 (15 pg/ml)	1.963
Standard 3 (100 pg/ml)	1.504
Standard 4 (600 pg/ml)	0.975
Standard 5 (4000 pg/ml)	0.549

## 7 ERWARTETE WERTE

Zur Ermittlung der Normalbereiche von freiem Estriol in Speichel wurden Speichelproben von gesunden erwachsenen Männern und Frauen in den ersten Stunden nach dem Erwachen gesammelt und mit dem Demeditec Estriol free in Saliva ELISA gemessen. Diese Studie ergab folgende Bereiche:

	Alter	Anzahl	Bereich (5-95 Perzentile) pg/ml
Männer	≥ 20 Jahre	40	< 1,4 - 49,8
Frauen	20 – 35 Jahre	47	1,6 - 33,6
	40 – 50 Jahre (Prämenopause)	90	< 1,4 - 24,9
	≥ 55 Jahre (Postmenopause)	61	< 1,4 - 35,7

Schwangerschaftswoche	Freies Estriol im Speichel (pg/ml)
22	200 – 1200
24	300 - 1500
26	500 – 1900
28	700 - 2300
30	1000 - 2600
32	1100 - 3300
34	1900 - >4000
36	2500 - >4000
37	2800 - >4000
38	3000 - >4000
39	3300 - >4000
40	3700 - >4000

Da Estriol im Speichel einem zirkadianen Rhythmus unterliegt, sollten Proben immer zur selben Tageszeit gewonnen werden. Es wird empfohlen, dass jedes Labor seine eigenen normalen und abnormalen Werte ermittelt. Therapeutische Konsequenzen sollten nicht allein auf Basis der mit diesem Test ermittelten Werte getroffen werden, sondern unter Berücksichtigung klinischer Beobachtungen und weiterer diagnostischer Tests.

## 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 normalen als auch pathologischen Werten eingesetzt werden.

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

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

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

## 9 ASSAY CHARACTERISTIKA

### 9.1 Analytische Sensitivität

Die analytische Sensitivität, definiert als Mittelwert minus der zweifachen Standardabweichung des Standards 0 beträgt 1,4 pg/ml.

### 9.2 Spezifität der Antikörper (Kreuzreaktivität)

Die Daten entnehmen Sie bitte der ausführlichen englischen Arbeitsanleitung.

### 9.3 Messbereich

Der Messbereich des Testes liegt zwischen 2,5 – 4000 pg/ml.

Die Daten zu:

### 9.4 Präzision

### 9.5 Wiederfindung

entnehmen Sie bitte der ausführlichen englischen Arbeitsanleitung.

## 10 GRENZEN DES TESTS

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

### 10.1 Interferenzen

Eine Kontamination der Speichelproben mit Blut beeinflusst das Ergebnis. Eine solche Verunreinigung kann bereits mit den Augen wahrgenommen werden.

### 10.2 Beeinflussung durch Medikamente

Werden Patienten mit natürlichen oder synthetischen Steroiden behandelt, kann die Aussagekraft einer Estriolbestimmung beeinträchtigt werden.

## **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**

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

**SYMBOLS USED WITH DEMEDITEC ELISA**

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	Ussage 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