

Product information

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



Estrone-3-Sulfate equine ELISA

REF

DEV9933



96



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

CONTENTS / INHALTSVERZEICHNIS

1	INTRODUCTION	3
2	PRINCIPLE	3
3	WARNINGS AND PRECAUTIONS	3
4	REAGENTS	4
5	SAMPLE COLLECTION AND PREPARATION.....	5
6	ASSAY PROCEDURE	5
7	EXPECTED NORMAL VALUES	7
8	QUALITY CONTROL	7
9	PERFORMANCE CHARACTERISTICS.....	8
10	LIMITATIONS OF PROCEDURE	9
11	LEGAL ASPECTS.....	10
12	REVISION HISTORY OF INSTRUCTION FOR USE.....	10
13	REFERENCES	11
14	SHORT INSTRUCTION.....	12
1	EINLEITUNG	13
2	METHODIK UND TESTPRINZIP.....	13
3	HINWEISE UND VORSICHTSMASSNAHMEN	13
4	KITBESTANDTEILE	14
5	PROBENENTNAHME UND -VORBEREITUNG	15
6	TESTDURCHFÜHRUNG.....	16
7	NORMALWERTE.....	18
8	QUALITÄTSKONTROLLE	18
9	LEISTUNGSSCHARAKTERISTIKA.....	19
10	LIMITATIONEN.....	21
11	RECHTLICHE GRUNDLAGEN	21
12	ÄNDERUNGSHISTORIE DER PACKUNGSBEILAGE	22
13	LITERATUR	22
14	KURZANLEITUNG.....	23

1 INTRODUCTION

1.1 Intended Use

The Demeditec Estrone-3-Sulfate equine ELISA is a competitive enzyme immunoassay for the quantitative determination of estrone-3-sulfate in horse serum and EDTA plasma.

1.2 Description of the analyte

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

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

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

2 PRINCIPLE

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

Calibrators and samples as well as a Biotin-Labeled Estrone-3-Sulfate and Incubation Buffer are pipetted into the wells of an antibody-coated microtiterplate. During one hour incubation the estrone-3-sulfate of the Calibrator/sample competes with the Biotin-Labeled Estrone-3-Sulfate for the binding sites of the antibody fixed on the inner surface of the wells.

Afterwards, all wells are washed and the Enzyme-Labeled Conjugate - horseradish peroxidase conjugated to Streptavidine - is added. During a 30 minutes incubation, this Enzyme-Labeled Streptavidine binds to the biotinylated Estrone-3-Sulfate. All wells are washed again to remove excess of non-bound Enzyme-Labeled Conjugate.

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

3 WARNINGS AND PRECAUTIONS

1. This kit is intended for laboratory use. Use by staff, who is specially informed and trained in methods which are carried out by use of immunoassays.
2. Before starting the assay, read the instructions completely and carefully. Use the valid version of the instructions for use provided with the kit. Be sure that everything is understood.
3. The microtiterplate contains break apart strips. Unused wells must be stored at 2-8°C in the sealed foil pouch and used in the frame provided.
4. Pipetting of samples and reagents must be done as quickly as possible and in the same sequence for each step.
5. Use reservoirs only for single reagents. This especially applies to the substrate reservoirs. Using a reservoir for dispensing a substrate solution that had previously been used for the conjugate solution may turn solution colored. Do not pour reagents back into vials as reagent contamination may occur.
6. Mix the contents of the microplate wells thoroughly to ensure good test results. Do not reuse microwells.
7. Do not let wells dry during assay; add reagents immediately after completing the rinsing steps.
8. Allow the reagents to reach room temperature (18-25°C) before starting the test. Temperature will affect the absorbance readings of the assay.
9. Never pipet by mouth and avoid contact of reagents and samples with skin and mucous membranes.
10. Do not smoke, eat, drink or apply cosmetics in areas where samples or kit reagents are handled.

11. Wear disposable latex gloves when handling specimens and reagents. Microbial contamination of reagents or specimens may give false results.
12. Do not use reagents beyond expiry date as shown on the kit labels.
13. All indicated volumes have to be performed according to the protocol. Optimal test results are only obtained when using calibrated pipettes and microtiterplate readers.
14. Do not mix or use components from kits with different lot numbers. It is advised not to exchange wells of different plates even of the same lot. The kits may have been shipped or stored under different conditions and the binding characteristics of the plates may result slightly different.
15. All blood components and biological materials should be handled as potentially hazardous in use and for disposal. Follow universal precautions when handling and disposing of infectious agents.
16. Handling should be done in accordance with the procedures defined by an appropriate national biohazard safety guideline or regulation.
17. Avoid contact with Stop Solution. It may cause skin irritation and burns.
18. Some reagents contain Proclin 300, CMIT and/or MIT as preservatives. In case of contact with eyes or skin, flush immediately with water.
19. Chemicals and prepared or used reagents have to be treated as hazardous waste according to the national biohazard safety guideline or regulation.
20. For information, please refer to Safety Data Sheets. Safety Data Sheets for this product are available upon request directly from Demeditec Diagnostics GmbH or on Demeditec homepage (www.demeditec.com).
21. If product information, including labeling, is incorrect or inaccurate, please contact the kit manufacturer or supplier.

4 REAGENTS

4.1 Reagents Provided

1. **SORB MT Microtiterplate**, 12 x 8 (break-apart) strips with 96 wells, ready to use; coated with a polyclonal anti Estrone-3-Sulfate antibody.
2. **CAL 0-5 LYO Calibrators**, 6 vials, lyophilized, for reconstitution see 4.4 "Reagent preparation". The Calibrators contain 0, 5, 10, 50, 100 and 500 ng/ml, respectively, in equine serum.
3. **BIOTIN CONJ Biotin-Labeled Estrone-3-Sulfate**, 1 vial, 6 ml in a buffered matrix; ready to use, clear; contains a non-mercury preservative.
4. **INC BUF Incubation Buffer**, 1 vial, 6 ml, ready to use, yellow; contains a non-mercury preservative.
5. **ENZ CONJ Enzyme-Labeled Streptavidine**, 1 vial, 11 ml, ready to use, pale red; horseradish peroxidase conjugated to Streptavidine in a buffered matrix; contains a non-mercury preservative.
6. **SUB TMB TMB-Substrate Solution**, 1 vial, 22 ml, ready to use, clear. 3,3',5,5'-Tetramethylbenzidine and hydrogen peroxide in a buffered solution; contains 1-3% 2-Pyrrolidon as preservative.
7. **STOP SOLN Stop Solution**, 1 vial, 7 ml, ready to use; contains 2 M hydrochloric acid; clear. Avoid contact with the Stop Solution. It may cause skin irritations and burns.
8. **WASH SOLN 10x Wash Solution**, 1 vial, 50 ml, 10x concentrated; clear; contains a non-mercury preservative; see „Reagent preparation“.

4.2 Materials required but not provided

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

4.3 Storage conditions

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

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

Store Calibrators refrigerated, they will be stable at 2-8°C for 7 days after reconstitution. For longer storage aliquot and freeze at <-20°C. Protect TMB-Substrate Solution from light.

4.4 Reagent preparation

Calibrators:

Reconstitute lyophilized Calibrator 0 **CAL 0 LYO** with 2.0 ml dist. water and Calibrator 1 through Calibrator 5 **CAL 1-5 LYO** with 0.5 ml dist. water 30 min. before use. Mix gently.

Wash Solution:

Dilute 50 ml of 10x concentrated Wash Solution **WASH SOLN 10x** with 450 ml dist. water to a final volume of 500 ml. The diluted Wash Solution **WASH SOLN 1x** is stable for at least 12 weeks at room temperature (18-25°C). Precipitates may form when stored at 2-8°C, which should dissolve again by swirling at room temperature (18-25°C).

4.5 Disposal of the kit

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

4.6 Damaged test kit

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

5 SAMPLE COLLECTION AND PREPARATION

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

Samples expected to contain Estrone-3-Sulfate concentrations higher than the highest Calibrator (500 ng/ml) should be diluted with the Zero Calibrator before assay. The additional dilution step has to be taken into account for the calculation of the results.

Do not use hemolytic, icteric or lipemic specimens. Samples containing sodium azide should not be used in the assay.

6 ASSAY PROCEDURE

6.1 General Remarks

- Do not interchange components of different lots.
- All components of the test kit supplied as concentrate should be diluted to their final concentration at least 30 minutes prior to use. Mix well, but prevent of foam formation.
- All reagents and specimens must be allowed to come to room temperature (18-25°C) before use. All reagents must be mixed without foaming.
- Once the test has been started, all steps should be completed without interruption.
- Use new disposal plastic pipette tips for each Calibrator, 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 these instructions for use.
- Calibrators, controls and samples should be assayed at least in duplicates.
- Microtiterplate washing is important. Improperly washed wells will give erroneous results. It is recommended to use a multichannel pipette or a multistepper, respectively, or an automatic microtiter plate washing system. Do not allow wells to dry between incubations. Do not scratch coated wells during rinsing and aspiration. Rinse and fill all reagents with care. While rinsing,

check that all wells are filled precisely with Wash Solution, and that there are no residues in the wells.

- A Calibrator curve must be established for every test run.
- For internal quality control we suggest to use **Estrone-3-Sulfate equine Control coded DEV9933C**. For more information, please contact Demeditec.

6.2 Assay Procedure

1. **Preparation of Calibrators:** The Calibrators are supplied lyophilized. At least 30 minutes before use, reconstitute the Calibrator 0 **CAL 0 LYO** with 2.0 ml of distilled water, and each of the remaining Calibrators 1 through 5 **CAL 1- 5 LYO** with 0.5 ml of distilled water. Use volumetric pipettes and mix by gentle inversion.
2. Prepare a sufficient number of microplate wells to accommodate Calibrators, controls and samples in duplicates.

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	0	4	P3	P..								
B	0	4	P3	P..								
C	1	5	P4									
D	1	5	P4									
E	2	P1	P5									
F	2	P1	P5									
G	3	P2	P6									
H	3	P2	P6									

0-5: Calibrator 0-5, P1-P.. Sample

3. Pipet **20 µl** of **Calibrators** **CAL 0- 5**, **Controls** and **Samples** with new disposable tips into the appropriate wells of the microplate.
4. Add **50 µl** of **Biotin-Labeled Estrone-3-Sulfate** **BIOTIN CONJ** to each well.
5. Add **50 µl** of **Incubation Buffer** **INC BUF** to every well.
6. Incubate for **1 hour** at room temperature (18-25°C) on a plate shaker (900 rpm).
7. Discard the content of the wells and rinse the wells **4 times** with diluted **1x Wash Solution** **WASH SOLN 1x** (300 µl per well). Remove as much **Wash Solution** as possible by beating the microplate on absorbent paper.
8. Add **100 µl** of **Enzyme-Labeled Streptavidine** **ENZ CONJ** to each well.
9. Incubate for **30 minutes** at room temperature (18-25°C) on a plate shaker (900 rpm).
10. Discard the content of the wells and wash each well **4 times** with diluted **1x Wash Solution** **WASH SOLN 1x** (300 µl per well). Remove as much **Wash Solution** as possible by beating the microplate on absorbent paper.
11. Add **200 µl** of **TMB-Substrate Solution** **SUB TMB** to each well.
12. Incubate without shaking for **30 minutes** at room temperature (18-25°C) in the dark.
13. Add **50 µl** of **Stop Solution** **STOP SOLN** to each well and mix carefully.
14. Determine the optical density (OD) of each well at 450 nm. It is recommended to read the wells within 15 minutes.

6.3 Calculation of Results

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

6.4 Example of Representative Calibrator Curve

OD results of a representative Calibrator curve for the Demeditec Estrone-3-Sulfate equine ELISA are given in the table below. These data are intended for illustration only and should not be used to calculate results from another run.

Calibrator	Optical Density (450nm)
Calibrator 0 (0 ng/ml)	2.963
Calibrator 1 (5 ng/ml)	2.121
Calibrator 2 (10 ng/ml)	1.661
Calibrator 3 (50 ng/ml)	0.677
Calibrator 4 (100 ng/ml)	0.425
Calibrator 5 (500 ng/ml)	0.163

7 EXPECTED NORMAL VALUES

In a reference range study twenty native mare serum samples were analyzed by Demeditec Estrone-3-Sulfate equine ELISA which were classified as non-gestating by LC-MS. The Upper Cut Off for non-gestating mares is found at 5.45 ng/ml Estrone-3-Sulfate.

Because of differences which may exist between laboratories with respect of population, laboratory technique, and selection of reference groups, it is recommended that each laboratory defines their own normal range with regard to their collective. The reference ranges should be regarded as guidelines only.

8 QUALITY CONTROL

Good laboratory practice requires that controls are run with each Calibrator curve. A statistically significant number of controls should be assayed to establish mean values and acceptable ranges to assure proper performance.

The use of control samples is advised to assure the day-to-day validity of results. Use controls at both normal and pathological levels. Corresponding results of the external Estrone-3-Sulfate equine Control Set (product code. DEV9933C) are stated in the instructions for use respectively on the QC datasheet (Certificate of Analysis) included in the Estrone-3-Sulfate equine ELISA.

Employ appropriate statistical methods for analyzing control values and trends. If the results of the assay do not meet the established acceptable ranges of control materials, results should be considered invalid. In this case, check the following technical areas: Pipetting and timing devices, microtiter plate reader, expiration dates of reagents, storage and incubation conditions, aspiration and washing methods. After checking the above-mentioned items without finding any error contact your distributor or Demeditec directly.

9 PERFORMANCE CHARACTERISTICS

9.1 Limit of Blank (LoB)

The Limit of Blank (LoB) was found to be 0.36 ng/ml.

9.2 Specificity

The following materials have been evaluated for cross-reactivity used up to a concentration of 10,000 ng/ml. The percentage indicates cross-reactivity at 50% displacement compared to Estrone-3-Sulfate.

Compound	Cross-Reactivity (%) at 50% Binding
Estrone	0.45%
Estriol	< 0.13%
Corticosterone	< 0.13%
Equilin	< 0.13%
Equilenin	< 0.13%
17-OH-Progesterone	< 0.13%
Androstenedione	< 0.13%
5 α -Dihydrotestosterone	0.41%
Testosterone	< 0.13%
Progesterone	< 0.13%
Androsterone	< 0.13%
17 β -Estradiol	< 0.13%
β -Estradiol-3-Sulfate	0.29%
Pregnenolone	< 0.13%
DHEA-S	< 0.13%
Cortisone	< 0.13%

9.3 Reproducibility

9.3.1 Intra-Assay

The intra-assay variation was determined by 20 replicate measurements of three samples within one run.

	Sample 1	Sample 2	Sample 3
Mean (ng/ml)	224.1	69.2	24.1
SD	6.37	4.00	1.07
CV (%)	2.8	5.8	4.4
n =	20	20	20

9.3.2 Inter-Assay

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

	Sample 1	Sample 2	Sample 3
Mean (ng/ml)	224.4	75.0	24.6
SD	13.97	6.20	0.81
CV (%)	6.2	8.3	3.3
n =	11	11	11

9.4 Recovery

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

Sample	Spiking (ng/ml)	Observed (ng/ml)	Expected (ng/ml)	Recovery (%)
1	native	26.9	-	-
	25	56.4	51.9	109
	100	139.7	126.9	110
	200	227.9	226.9	100
2	native	144.8	-	-
	25	193.3	169.8	114
	100	242.6	244.8	99
	200	310.3	344.8	90
3	native	30.8	-	-
	25	59.6	55.8	107
	100	161.1	130.8	123
	200	238.9	230.8	103

9.5 Linearity

Three samples were assayed both undiluted and diluted with Zero Calibrator. The percentage linearities were determined by comparing observed and expected results of the samples.

Sample	Dilution	Observed (ng/ml)	Expected (ng/ml)	Linearity (%)
1	native	263.2	-	-
	1 : 2	137.8	131.6	105
	1 : 4	66.7	65.8	101
	1 : 8	34.9	32.9	106
2	native	462.6	-	-
	1 : 2	254.4	231.3	110
	1 : 4	136.6	115.7	118
	1 : 8	68.8	57.8	119
3	native	260.5	-	-
	1 : 2	138.8	130.2	107
	1 : 4	64.5	65.1	99
	1 : 8	28.2	32.6	87

10 LIMITATIONS OF PROCEDURE

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

10.1 Interfering Substances

- Do not use any hemolytic, icteric, or lipemic specimens to avoid any interferences.
- Samples containing sodium azide should not be used.
- There is no significant interference of Biotin on the assay results up to 3000 ng/ml.
- Unspecific interferences with this immunoassay cannot be excluded (19-21). If unplausible results are suspected, they should be considered invalid and verified by further testing.

10.2 Drug Interferences

Any medication (cream, oil, pill, etc.) containing steroid hormones could influence the measurement of this analyte. Clinically significant interactions cannot be ruled out with structurally similar drugs.

10.3 High Dose Hook Effect

Up to a tested concentration of 25,000 ng/ml Estrone-3-Sulfate no High Dose Hook Effect could be observed for the Estrone-3-Sulfate equine ELISA.

11 LEGAL ASPECTS**11.1 Reliability of Results**

The test must be performed exactly as per the manufacturer's instructions for use. Moreover, the user must strictly adhere to the rules of GLP (Good Laboratory Practice) or other applicable national standards and/or laws. This is especially relevant for the use of control reagents. It is important to always include a sufficient number of controls within the test procedure for validating the accuracy and precision of the test. The test results are valid only if all controls are within the specified ranges and if all other test parameters are also within the given assay specifications. In case of any doubt or concern regarding results please contact Demeditec Diagnostics GmbH.

11.2 Therapeutic Consequences

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

The test result itself should never be the sole determinant for deriving any therapeutic consequences.

11.3 Liability

Any modification of the test kit and/or exchange or mixture of any components of different lots from one test kit to another could negatively affect results and validity of the overall test. Such modification and/or exchanges invalidate any claim for replacement.

Claims submitted due to customer misinterpretation of laboratory results subject to point 11.2. are also invalid. Regardless, in the event of any claim, the manufacturer's liability is not to exceed the value of the test kit. Any damage caused to the test kit during transportation is not subject to the liability of the manufacturer.

12 REVISION HISTORY OF INSTRUCTION FOR USE

Changes from the previous version 6-06/23 to actual version 7-11/25

Chap. 1	EDTA samples can also be used
Chap. 2	updated
Chap. 4	updated (Calibrators up to 500 ng/ml), updated volumes (4.1, 4.4)
Chap. 5	updated; EDTA samples can also be used. Information about limited use of Biotin due to interferences removed
Chap. 6.2	assay procedure updated
Chap. 7	expected normal values updated
Chap. 9	updated
Chap. 10.1	updated information about interferences with Biotin.
Chap. 14	updated
General	Editorial changes

13 REFERENCES

1. Bouhamidi R, Gaillard JL, Silberzahn P, Martin B: Binding of Estrogen-3-Sulfates to stallion plasma and equine serum albumine. *J Steroid Biochem* 1992, 42: 345-349
2. Cox JE: Oestrone and equilin in the plasma of pregnant mare. *J Reprod Fert* 1975, Suppl 23: 463-468
3. Darenius K, Kindahl H, Knudsen O, Madej A, Edqvist LE: PMSG, progesterone and oestrone sulfate during normal pregnancy and early fetal death. Departments of Obstetrics and Gynecology and Clinical Chemistry, Swedish University of Agricultural Sciences, Uppsala, Sweden
4. Hearp RB, Hamon M, Allen WR: Studies on oestrogen synthesis by the preimplantation equine conceptus. *J Reprod Fert* 1982: Suppl 32: 343-352
5. Hughes JP, Stabenfeldt GH, Warren EJ: Estrous cycle and ovulation in the mare. *JAVMA* 1972 161:1367-1374
6. Hyland JH, Wright PJ, Manning SJ: An investigation of the use of plasma oestrone sulfate concentrations for the diagnosis of pregnancy in mares. *Australian Vet J* 1984, 61: 123
7. Jeffcott LB, Hyland JH, MacLean AA, Dyke T, Robertson-Smith G: Changes in maternal hormone concentrations associated with induction of fetal death at day 45 of gestation in mares. *J Reprod Fert* 1987, Suppl 35: 461-467
8. Hyland JH, Langsford DA: Changes in urinary and plasma oestrone sulfate concentrations after induction foetal death in mares at 45 days of gestation. *Australian Vet J* 1990, 67: 349-351
9. Kasman LH, Hughes JP, Stabenfeldt GH, Starr MD, Lasley BL: Estrone sulfate concentrations as an indicator of fetal demise in horses. *Am J Vet Res* 1988, 49: 184-187
10. Kindahl H, Knudsen O, Madej A, Edqvist LE: Progesterone, prostaglandin F-2 α , PMSG and oestrone sulfate during early pregnancy in the mare. *J Reprod Fert* 1982, Suppl 32: 353-359
11. Makawiti DW, Allen WE, Kilpatrick MJ: Changes in oestrone sulfate concentrations in peripheral plasma of pony mares associated with follicular growth, ovulation and early pregnancy. *J Reprod Fert* 1983, 68: 481-487
12. Muyan M, Roser JF, Dybal N, Baldwin DM: Modulation of gonadotropin-releasing hormone-stimulated luteinizing hormone release in cultured male equine anterior pituitary cells by gonadal steroids. *Biol of Reprod* 1993, 49: 340-345
13. Möstl E: The horse feto-placental unit. *Exp Clin Endocrin* 1994, 102: 166-168
14. Ousey JC, Rossdale PD, Cash RSG, Worthy K: Plasma concentrations of progestagens, oestrone sulfate and prolactin in pregnant mares subjected to natural challenge with equid herpesvirus-1. *J Reprod Fert* 1987, Suppl 35: 519-528
15. Parkes RD, Blackmore DJ, Rance DA, Park BK, Dean PDG: Plasma concentrations of equilin and oestrone in the assessment of fetoplacental function in the mare. *Vet Rec* 1977, 100: 511-512
16. Sanchi EM, LeBlanc MM, Weston PG: Progestagen, oestrone sulfate and cortisol concentrations in pregnant mares during medical and surgical disease. *J Reprod Fert* 1991, Suppl 44: 627-634
17. Setchell BP, Cox JE: Secretion of free and conjugated steroids by the horse testis into lymph and venous blood. *J Reprod Fert* 1982, Suppl 32: 123-127
18. Terqui M, Palmer E: Oestrogen pattern during early pregnancy in the mare. *J Reprod Fert* 1979, Suppl 27: 441-446
19. Marks V.: False-Positive Immunoassay Results: A Multicenter Survey of Erroneous Immunoassay Results from Assays of 74 Analytes in 10 Donors from 66 Laboratories in Seven Countries. *Clinical Chemistry* 2002, 48:11: 2008-2016
20. Tate J, Ward G: Interferences in Immunoassays. *Clin. Biochem Rev* 2004, 25(2) : 105-120
21. Selby C: Interference in immunoassays. *Ann. Clin. Biochem* 1999, 36: 704-721

14 SHORT INSTRUCTION

all steps at room temperature (18-25°C)

all sample sizes given in µl

Steps	CAL 0-5 (0 - 500 ng/ml)	Sample
pipet CAL 0-5	20	-
pipet Samples	-	20
pipet BIOTIN CONJ	50	
pipet INC BUF	50	
incubate for 1 h on a shaker (900 rpm)		
decant wash 4x with WASH SOLN 1x	300	
pipet ENZ CONJ	100	
incubate for 30 min on a shaker (900 rpm)		
decant wash 4x with WASH SOLN 1x	300	
pipet SUB TMB	200	
incubate without shaking for 30 min in the dark		
pipet STOP SOLN	50	
read at $\lambda = 450 \text{ nm}$		

1 EINLEITUNG

1.1 Zweckbestimmung

Der Demeditec Estrone-3-Sulfate equine ELISA ist ein kompetitiver Enzymimmunoassay zur quantitativen Bestimmung von Estron-3-Sulfat in Serum und EDTA-Plasma von Pferden.

1.2 Beschreibung des Analyten

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

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

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

2 METHODIK UND TESTPRINZIP

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

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

Nach einem Waschschritt und anschließender Zugabe des Enzym-markierten Streptavidins bildet sich während der anschließenden 30-minütigen Inkubation zwischen dem an der Innenwand der Wells immobilisierten Biotin-markierten Estron-3-Sulfat und dem Enzym-markierten Konjugat - Meerrettich-Peroxidase konjugiert an Streptavidin - ein Komplex aus. Ungebundene Reaktionspartner werden in einem weiteren angeschlossenen Waschschritt entfernt.

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

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

3 HINWEISE UND VORSICHTSMASSNAHMEN

1. Dieses Kit darf ausschließlich zum Gebrauch im Labor verwendet werden. Die Anwendung sollte durch Personal erfolgen, das speziell in Immunoassay-Verfahren unterrichtet und ausgebildet wurde.
2. Vor dem Testansatz sorgfältig die Packungsbeilage lesen. Nur die gültige, im Testkit enthaltene Packungsbeilage verwenden.
3. Die Mikrotiterplatte enthält teilbare, einzeln brechbare Mikrotiterstreifen. Unbenutzte Mikrotiterstreifen im verschlossenen Folienbeutel bei 2-8°C aufbewahren und im mitgelieferten Rahmen verwenden.
4. Proben und Reagenzien so schnell wie möglich und in einer gleichbleibenden Sequenz pipettieren.
5. Für jedes Reagenz einen separaten Pipettenaufsatz verwenden. Das gilt besonders für die Substratlösung. Wenn der Pipettenaufsatz der Substrat-Lösung vorher z. B. für das Konjugat verwendet wurde, kommt es zu einem Farbumschlag der Substratlösung. Reagenzien nie zurück ins Fläschchen gießen, da so Reagenz-Kontaminationen verursacht werden können.
6. Inhalt der Mikrotiterplatte sorgfältig mischen, um gute Testergebnisse zu gewährleisten. Mikrotiterplatten nicht wiederverwenden!
7. Mikrotiterstreifen nicht austrocknen lassen während des Testlaufes. Nach jedem Waschschritt zügig im Testprotokoll fortfahren.
8. Reagenzien vor dem Testansatz auf Raumtemperatur (18-25°C) bringen. Die Temperatur wirkt sich auf die Optische Dichte des Assays aus.

9. Nicht mit dem Mund pipettieren und den Kontakt von Kitbestandteilen und Proben mit Haut und Schleimhäuten vermeiden.
10. In den Bereichen, in denen Proben oder Kitbestandteile verwendet werden, nicht rauchen, essen oder Kosmetika verwenden.
11. Beim Umgang mit Proben oder Reagenzien Einweg-Latexhandschuhe tragen. Die Verunreinigung von Reagenzien oder Proben mit Mikroben kann zu falschen Ergebnissen führen.
12. Reagenzien nicht nach dem auf dem Kit-Etikett angegebenen Verfallsdatum verwenden.
13. Alle in der Packungsbeilage angegebenen Mengen müssen genau eingehalten werden. Optimale Ergebnisse können nur durch Verwendung kalibrierter Pipetten und Mikrotiterplatten-Lesegeräte erreicht werden.
14. Komponenten aus unterschiedlichen Kitlots nicht untereinander austauschen oder mischen. Keine Wells von verschiedenen Platten verwenden, auch nicht, wenn es sich um die gleiche Lot handelt. Die Kits können unter anderen Bedingungen gelagert oder versendet worden sein, so dass die Bindungscharakteristika der Platten leicht unterschiedlich ausfallen.
15. Alle Blutbestandteile und biologischen Materialien sollten als potenziell gefährlich bei der Verwendung und Entsorgung behandelt werden. Bei der Handhabung und Entsorgung von Infektionserregern die allgemeinen Vorsichtsmaßnahmen befolgen.
16. Der Gebrauch sollte in Übereinstimmung mit den Verfahren erfolgen, welche durch eine nationale Gefahrenstoff-Sicherheitsrichtlinie festgelegt sind.
17. Der Kontakt mit der Stopplösung sollte vermieden werden, da sie Hautreizungen und Verbrennungen verursachen kann.
18. Die Entsorgung aller Bestandteile sollte gemäß den Vorschriften einer entsprechenden nationalen Gefahrenstoff-Sicherheitsrichtlinie erfolgen.
19. Einige Reagenzien enthalten ProClin 300, CMIT und/oder MIT als Konservierungsmittel. Bei Kontakt mit Augen oder Haut sofort mit Wasser spülen.
20. Informationen zu im Kit enthaltenen gefährlichen Substanzen bitte dem Sicherheitsdatenblatt entnehmen. Materialsicherheitsdatenblätter für dieses Produkt sind auf Anfrage direkt von der Firma Demeditec Diagnostics GmbH oder auf der Demeditec Homepage (www.demeditec.de) erhältlich.
21. Sollten Produktinformationen, einschließlich Etikettierung falsch oder inkorrekt sein, bitte den Hersteller oder den Lieferanten des Kits kontaktieren.

4 KITBESTANDTEILE

4.1 Mitgelieferte Komponenten

1. **SORB** **MT** Mikrotiterplatte, 12 x 8 (teilbare) Streifen mit 96 Vertiefungen, gebrauchsfertig beschichtet mit polyklonalen anti-Estron-3-Sulfat-Antikörpern.
2. **CAL** **0** - **5** **LYO** Standards, 6 Flaschen, lyophilisiert, Rekonstitution siehe 4.4 „Vorbereitung der Reagenzien“. Die Standards enthalten jeweils 0, 5, 10, 50, 100 und 500 ng/ml in Pferdeserum.
3. **BIOTIN** **CONJ** Biotin-markiertes Estron-3-Sulfat, 1 Flasche, 6 ml, gebrauchsfertig, farblos; enthält quecksilberfreies Konservierungsmittel.
4. **INC** **BUF** Inkubationspuffer, 1 Flasche, 6 ml, gebrauchsfertig, gelb; enthält quecksilberfreies Konservierungsmittel.
5. **ENZ** **CONJ** Enzym-markiertes Streptavidin, 1 Flasche, 11 ml, gebrauchsfertig, hellrot; Meerrettichperoxidase-markiertes Streptavidin in einer Puffermatrix; enthält quecksilberfreies Konservierungsmittel.
6. **SUB** **TMB** TMB-Substratlösung, 1 Flasche, 22 ml, gebrauchsfertig, farblos. 3,3',5,5'-Tetramethylbenzidin und Wasserstoffperoxid in gepufferter Lösung; enthält 1-3% 2-Pyrrolidon als Konservierungsmittel.
7. **STOP** **SOLN** Stopplösung, 1 Flasche, 7 ml, gebrauchsfertig; enthält 2 M Salzsäure. Kontakt mit der Stopplösung vermeiden! Kann Hautreizungen und Verbrennungen verursachen.
8. **WASH** **SOLN** **10x** Waschlösung, 1 Flasche, 50 ml, 10x konzentriert, farblos; enthält quecksilberfreies Konservierungsmittel.; siehe 4.4 „Vorbereitung der Reagenzien“.

4.2 Erforderliche nicht mitgelieferte Hilfsmittel

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

4.3 Lagerung der Komponenten

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

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

Standards müssen gekühlt gelagert werden, nach dem Auflösen sind diese bis zu 7 Tage bei 2-8°C haltbar; für längere Aufbewahrung aliquotieren und bei <-20°C aufbewahren.

TMB-Substratlösung vor Licht schützen.

4.4 Vorbereitung der Reagenzien**Standards:**

Standard 0 **CAL** 0 **LYO** mit 2 ml dest. Wasser, Standards 1 bis 5 **CAL** 1- 5 **LYO** mit je 0.5 ml dest. Wasser 30 min vor Gebrauch auflösen. Gut mischen.

Waschlösung:

Die 10x konzentrierte Waschlösung **WASH** **SOLN** 10x (50 ml) mit 450 ml dest. Wasser auf ein Gesamtvolumen von 500 ml verdünnen. Die verdünnte Waschlösung **WASH** **SOLN** 1x ist bei Raumtemperatur (18-25°C) für mindestens 12 Wochen stabil. Bei der Lagerung bei 2-8°C können sich Präzipitate bilden, die sich durch Schwenken bei Raumtemperatur (18-25°C) wieder auflösen.

4.5 Entsorgung des Kits

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

4.6 Beschädigte Testkits

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

5 PROBENENTNAHME UND -VORBEREITUNG

Die Bestimmung des equinen Estron-3-Sulfats wird bevorzugt in Serum und EDTA-Plasma durchgeführt. Es werden 20 µl Probe pro Einzelbestimmung benötigt. Die Proben können für eine Woche gekühlt bei 2-8°C oder bis zu 6 Monaten gefroren bei <-20°C gelagert werden. Die Proben sollten vor dem Einfrieren aliquotiert werden. Wiederholtes Einfrieren und Auftauen sollte vermieden werden.

Proben, deren Konzentration höher als der höchste Standardwert (500 ng/ml) liegen könnten, sollten vor der Abarbeitung mit Nullstandard vorverdünnt werden. Die zusätzliche Verdünnungsstufe ist bei der Auswertung der Ergebnisse zu berücksichtigen.

Hämolytische, ikterische oder lipämische Proben sollten nicht verwendet werden. Proben, die Natriumazid enthalten, sollten nicht verwendet werden.

6 TESTDURCHFÜHRUNG

6.1 Allgemeine Anmerkungen

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

6.2 Testdurchführung

1. Vorbereitung der Standards: Die Standards werden lyophilisiert geliefert. Mindestens 30 Minuten vor Gebrauch Standard 0 **CAL** 0 mit 2,0 ml und Standards 1 bis 5 **CAL** 1 - 5 **LYO** mit 0,5 ml dest. Wasser rekonstituieren. Während des Rekonstitutionsvorganges sollten die Fläschchen durch leichtes Schwenken gemischt werden.
2. Eine ausreichende Anzahl Mikrotiterplatten-Streifen zum Ansatz von Standards, Kontrollen und Proben in Duplikaten.

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	0	4	P3	P..								
B	0	4	P3	P..								
C	1	5	P4									
D	1	5	P4									
E	2	P1	P5									
F	2	P1	P5									
G	3	P2	P6									
H	3	P2	P6									

0-5: Calibrator 0-5, P1-P.. Sample

3. Jeweils **20 µl der Standards, Kontrollen und Proben** entsprechend der Plattenbelegung in die Wells pipettieren.
4. **50 µl Biotin-markiertes Estron-3-Sulfat** **BIOTIN** **CONJ** in jedes Well pipettieren.
5. **50 µl Inkubationspuffer** **INC** **BUF** in jedes Well pipettieren.
6. Platte **1 Stunde** bei Raumtemperatur (18-25°C) auf einem Mikrotiterplattenschüttler (900 rpm) inkubieren.
7. Platte dekantieren und jedes Well **viermal** mit verdünnter **1x Waschlösung** **WASH** **SOLN** **1x** (300 µl pro Well). Restliche Flüssigkeit sorgfältig durch Ausklopfen der Platte entfernen.
8. **100 µl Enzym-markierte Streptavidin Lösung** **ENZ** **CONJ** in jedes Well pipettieren.
9. Platte **30 Minuten** bei Raumtemperatur (18-25°C) auf dem Schüttler (900 rpm) inkubieren.
10. Platte dekantieren und jedes Well **viermal** jeweils mit **1x Waschlösung** **WASH** **SOLN** **1x** (300 µl pro Well) waschen. Restliche Flüssigkeit sorgfältig durch Ausklopfen der Platte entfernen.
11. **200 µl TMB-Substratlösung** **SUB** **TMB** in jedes Well pipettieren.
12. **30 Minuten** bei **Raumtemperatur (18-25°C) im Dunkeln** inkubieren.
13. **50 µl Stopplösung** **STOP** **SOLN** in jedes Well pipettieren.
14. Die Optische Dichte bei 450 nm mit einem Mikrotiterplatten-Lesegerät innerhalb von 15 Minuten nach Zugabe der Stopplösung bestimmen.

6.3 Auswertung der Ergebnisse

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

6.4 Auswertebispiel

OD-Ergebnisse einer repräsentativen Standardkurve für den Demeditec Estrone-3-Sulfate equine ELISA sind in untenstehender Tabelle gezeigt. Die Daten dienen nur der Illustration und sind nicht dazu bestimmt, die Ergebnisse eines anderen Testansatzes zu berechnen.

Standard	Optische Dichte (450nm)
Calibrator 0 (0 ng/ml)	2,963
Calibrator 1 (5 ng/ml)	2,121
Calibrator 2 (10 ng/ml)	1,661
Calibrator 3 (50 ng/ml)	0,677
Calibrator 4 (100 ng/ml)	0,425
Calibrator 5 (500 ng/ml)	0,163

7 NORMALWERTE

In einer Referenzbereichsstudie wurden zwanzig native Serumproben von Stuten mit dem Demeditec Estrone-3-Sulfate equine ELISA analysiert, die mittels LC-MS als nicht trächtig eingestuft wurden. Der obere Grenzwert für nicht trächtige Stuten liegt bei 5,45 ng/ml Estron-3-Sulfat.

Da Faktoren wie Population, Labortechnik und Auswahl der Referenzgruppen diese Werte beeinflussen können, wird empfohlen, dass jedes Labor einen eigenen Normalbereich bezüglich des Kollektivs festlegt. Die angegebenen Werte dienen nur zur Orientierung.

8 QUALITÄTSKONTROLLE

Die gute Laborpraxis verlangt, bei jeder Standardkurve Kontrollen mitzuführen. Eine statistisch signifikante Anzahl von Kontrollen sollte untersucht werden, um Mittelwerte und akzeptable Bereiche zur Sicherstellung einer ordnungsgemäßen Leistung zu ermitteln.

Die Verwendung von Kontrollproben sowohl im normalen als auch pathologischen Bereich wird auch zur Gewährleistung der täglichen Validität der Ergebnisse empfohlen. Entsprechende Ergebnisse des externen Estrone-3-Sulfate equine-Kontrollsatzes (Artikelnr. DEV9933C) sind in der Packungsbeilage sowie im QC-Datenblatt (Analysezertifikat) angegeben, das im Estrone-3-Sulfate equine ELISA enthalten ist.

Geeignete statistische Methoden zur Analyse der Kontrollwerte und Trends sollten verwendet werden. Wenn die Ergebnisse des Assays nicht die festgelegten akzeptablen Bereiche der Kontrollmaterialien treffen, sollten die Ergebnisse als ungültig betrachtet werden. In diesem Fall sollten die folgenden technischen Bereiche überprüft werden: Pipettier- und Zeitmessgeräte, Mikrotiterplatten-Lesegerät, Verfallsdaten der Reagenzien, Lagerungs- und Inkubationsbedingungen, Aspirations- und Waschmethoden. Wenn nach Überprüfung der oben genannten Punkte kein Fehler gefunden wurde, sollte der Händler oder direkt Demeditec kontaktiert werden.

9 LEISTUNGSSCHARAKTERISTIKA

9.1 Limit of Blank (LoB)

Der Limit of Blank (LoB) beträgt 0,36 ng/ml.

9.2 Spezifität

Die folgenden Materialien wurden bis zu einer Konzentration von 10.000 ng/ml auf Kreuzreaktivität untersucht. Der Prozentsatz gibt die Kreuzreaktivität bei 50% Verdrängung im Vergleich zu Estron-3-Sulfat an.

Substanz	Kreuzreaktivität (%) bei 50% Bindung
Estron	0,45%
Estriol	< 0,13%
Corticosteron	< 0,13%
Equilin	< 0,13%
Equilenin	< 0,13%
17-OH-Progesteron	< 0,13%
Androstendion	< 0,13%
5 α -Dihydrotestosteron	0,41%
Testosteron	< 0,13%
Progesteron	< 0,13%
Androsteron	< 0,13%
17 β -Estradiol	< 0,13%
β -Estradiol-3-Sulfat	0,29%
Pregnenolon	< 0,13%
DHEA-S	< 0,13%
Cortison	< 0,13%

9.3 Reproduzierbarkeit

9.3.1 Intra-Assay

Die Intra-Assay-Variation wurde ermittelt durch die Bestimmung von drei Proben in 20 Wiederholungsmessungen in einem Testansatz.

	Probe 1	Probe 2	Probe 3
Mittelwert (ng/ml)	224,1	69,2	24,1
SD	6,37	4,00	1,07
CV (%)	2,8	5,8	4,4
n =	20	20	20

9.3.2 Inter-Assay

Die Inter-Assay-Variation wurde durch Doppelbestimmungen von drei Proben in elf verschiedenen Tests bestimmt.

	Probe 1	Probe 2	Probe 3
Mittelwert (ng/ml)	224,4	75,0	24,6
SD	13,97	6,20	0,81
CV (%)	6,2	8,3	3,3
n =	11	11	11

9.4 Wiederfindung

Die Wiederfindungsrate wurde durch Zugabe zunehmender Mengen des Analyten zu drei verschiedenen Proben mit unterschiedlichen endogenen Analytkonzentrationen bestimmt. Jede Probe (nativ und nach Zusatz des Analyten) wurde mit dem Demeditec Estrone-3-Sulfate equine ELISA gemessen. Die prozentuale Wiederfindungsrate wurde durch Vergleich der beobachteten und erwarteten Ergebnisse der Proben ermittelt.

Probe	Zusatz (ng/ml)	Gemessen (ng/ml)	Erwartet (ng/ml)	Wiederfindung (%)
1	nativ	26,9	-	-
	25	56,4	51,9	109
	100	139,7	126,9	110
	200	227,9	226,9	100
2	nativ	144,8	-	-
	25	193,3	169,8	114
	100	242,6	244,8	99
	200	310,3	344,8	90
3	nativ	30,8	-	-
	25	59,6	55,8	107
	100	161,1	130,8	123
	200	238,9	230,8	103

9.5 Linearität

Drei Proben wurden unverdünnt und mit Nullstandard verdünnt untersucht. Die prozentuale Linearität wurde durch Vergleich der beobachteten und erwarteten Ergebnisse der Proben ermittelt.

Probe	Verdünnung	Gemessen (ng/ml)	Erwartet (ng/ml)	Linearität (%)
1	nativ	263,2	-	-
	1 : 2	137,8	131,6	105
	1 : 4	66,7	65,8	101
	1 : 8	34,9	32,9	106
2	nativ	462,6	-	-
	1 : 2	254,4	231,3	110
	1 : 4	136,6	115,7	118
	1 : 8	68,8	57,8	119
3	nativ	260,5	-	-
	1 : 2	138,8	130,2	107
	1 : 4	64,5	65,1	99
	1 : 8	28,2	32,6	87

10 LIMITATIONEN

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

10.1 Interferierende Substanzen

- Zur Vermeidung von Interferenzen keine hämolytischen, ikterischen oder lipämischen Proben verwenden.
- Proben, die Natriumazid enthalten, sollten nicht verwendet werden.
- Bis zu einer Konzentration von 3000 ng/ml hat Biotin keinen signifikanten Einfluss auf die Testergebnisse.
- Unspezifische Interferenzen mit diesem Immunoassay können nicht ausgeschlossen werden (19-21). Bei Verdacht auf unplausible Ergebnisse sollten diese als ungültig betrachtet und durch weitere Tests überprüft werden.

10.2 Interferenz von Medikamenten

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

11 RECHTLICHE GRUNDLAGEN

11.1 Zuverlässigkeit der Ergebnisse

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

Die Testergebnisse sind nur gültig, wenn alle Kontrollen in den vorgegebenen Bereichen liegen und alle anderen Testparameter die vorgegebenen Spezifikationen für diesen Assay erfüllen. Bei Zweifeln oder Bedenken bezüglich der Ergebnisse bitte die Firma Demeditec Diagnostics GmbH kontaktieren.

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 Ergebnisse und die Gültigkeit des gesamten Tests negativ beeinflussen. Solche Veränderungen und/oder Austausch haben den Ausschluss jeglicher Ersatzansprüche zur Folge. Ansprüche, die aufgrund einer Fehlinterpretation von Laborergebnissen durch Kunden vorbehaltlich Punkt 11.2. geltend gemacht werden, sind ebenfalls ungültig.

Im Falle jeglicher Reklamation ist die Haftung des Herstellers maximal auf den Wert des Testkits beschränkt. Jegliche Schäden, die während des Transports am Kit entstanden sind, unterliegen nicht der Haftung des Herstellers.

12 ÄNDERUNGSHISTORIE DER PACKUNGSBEILAGE

Änderungen von Version 6-06/23 zur Version 7-11/25:

Kap. 1	EDTA-Proben können ebenfalls verwendet werden
Kap. 2	aktualisiert
Kap. 4	aktualisiert (Standards bis zu 500 ng/ml), aktualisierte Volumina (4.1, 4.4)
Kap. 5	aktualisiert; EDTA-Proben können ebenfalls verwendet werden. Informationen über die eingeschränkte Verwendung von Biotin aufgrund von Interferenzen entfernt.
Kap. 6.2	Testverfahren aktualisiert
Kap. 7	Erwartete Normalwerte aktualisiert
Kap. 9	Aktualisiert
Kap. 10.1	Aktualisierte Informationen zu Interferenzen mit Biotin.
Kap. 14	aktualisiert
Allgemeines	Redaktionelle Änderungen

13 LITERATUR

- 1 Bouhamidi R, Gaillard JL, Silberzahn P, Martin B: Binding of Estrogen-3-Sulfates to stallion plasma and equine serum albumine. J Steroid Biochem 1992, 42: 345-349
- 2 Cox JE: Oestrone and equilin in the plasma of pregnant mare. J Reprod Fert 1975, Suppl 23: 463-468
- 3 Darenius K, Kindahl H, Knudsen O, Madej A, Edqvist LE: PMSG, progesterone and oestrone sulfate during normal pregnancy and early fetal death. Departments of Obstetrics and Gynecology and Clinical Chemistry, Swedish University of Agricultural Sciences, Uppsala, Sweden
- 4 Hearp RB, Hamon M, Allen WR: Studies on oestrogen synthesis by the preimplantation equine conceptus. J Reprod Fert 1982: Suppl 32: 343-352
- 5 Hughes JP, Stabenfeldt GH, Warren EJ: Estrous cycle and ovulation in the mare. JAVMA 1972 161:1367-1374
- 6 Hyland JH, Wright PJ, Manning SJ: An investigation of the use of plasma oestrone sulfate concentrations for the diagnosis of pregnancy in mares. Australian Vet J 1984, 61: 123
- 7 Jeffcott LB, Hyland JH, MacLean AA, Dyke T, Robertson-Smith G: Changes in maternal hormone concentrations associated with induction of fetal death at day 45 of gestation in mares. J Reprod Fert 1987, Suppl 35: 461-467
- 8 Hyland JH, Langsford DA: Changes in urinary and plasma oestrone sulfate concentrations after induction foetal death in mares at 45 days of gestation. Australian Vet J 1990, 67: 349-351
- 9 Kasman LH, Hughes JP, Stabenfeldt GH, Starr MD, Lasley BL: Estrone sulfate concentrations as an indicator of fetal demise in horses. Am J Vet Res 1988, 49: 184-187
- 10 Kindahl H, Knudsen O, Madej A, Edqvist LE: Progesterone, prostaglandin F-2 α , PMSG and oestrone sulfate during early pregnancy in the mare. J Reprod Fert 1982, Suppl 32: 353-359
- 11 Makawiti DW, Allen WE, Kilpatrick MJ: Changes in oestrone sulfate concentrations in peripheral plasma of pony mares associated with follicular growth, ovulation and early pregnancy. J Reprod Fert 1983, 68: 481-487
- 12 Muyan M, Roser JF, Dybal N, Baldwin DM: Modulation of gonadotropin-releasing hormone-stimulated luteinizing hormone release in cultured male equine anterior pituitary cells by gonadal steroids. Biol of Reprod 1993, 49: 340-345
- 13 Möstl E: The horse feto-placental unit. Exp Clin Endocrin 1994, 102: 166-168
- 14 Ousey JC, Rosedale PD, Cash RSG, Worthy K: Plasma concentrations of progestagens, oestrone sulfate and prolactin in pregnant mares subjected to natural challenge with equid herpesvirus-1. J Reprod Fert 1987, Suppl 35: 519-528
- 15 Parkes RD, Blackmore DJ, Rance DA, Park BK, Dean PDG: Plasma concentrations of equilin and oestrone in the assessment of fetoplacental function in the mare. Vet Rec 1977, 100: 511-512
- 16 Sanchi EM, LeBlanc MM, Weston PG: Progestagen, oestrone sulfate and cortisol concentrations in pregnant mares during medical and surgical disease. J Reprod Fert 1991, Suppl 44: 627-634
- 17 Setchell BP, Cox JE: Secretion of free and conjugated steroids by the horse testis into lymph and venous blood. J Reprod Fert 1982, Suppl 32: 123-127
- 18 Terqui M, Palmer E: Oestrogen pattern during early pregnancy in the mare. J Reprod Fert 1979, Suppl 27: 441-446
- 19 Marks V.: False-Positive Immunoassay Results: A Multicenter Survey of Erroneous Immunoassay Results from Assays of 74 Analytes in 10 Donors from 66 Laboratories in Seven Countries. Clinical Chemistry 2002, 48:11: 2008-2016
- 20 Tate J, Ward G: Interferences in Immunoassays. Clin. Biochem Rev 2004, 25(2) : 105-120
- 21 Selby C: Interference in immunoassays. Ann. Clin. Biochem 1999, 36: 704-721

14 KURZANLEITUNG

alle Schritte bei Raumtemperatur (18-25°C)

alle Mengenangaben in µl

Schritte	CAL 0-5 (0 - 500 ng/ml)	Probe
Pipettiere CAL 0-5	20	-
Pipettiere Proben	-	20
Pipettiere BIOTIN CONJ	50	
Pipettiere INC BUF	50	
Inkubation für 1 h auf einem Mikrotiterplattenschüttler (900 rpm)		
dekantieren	300	
Waschen 4x mit WASH SOLN 1x		
Pipettiere ENZ CONJ	100	
Inkubation für 30 min auf einem Mikrotiterplattenschüttler (900 rpm)		
dekantieren	300	
Waschen 4x mit WASH SOLN 1x		
Pipettiere SUB TMB	200	
Inkubation ohne Schütteln für 30 min im Dunkeln		
Pipettiere STOP SOLN	50	
Messung bei $\lambda = 450 \text{ nm}$		

SYMBOLS USED WITH DEMEDITEC ASSAYS

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