

# Product information

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



User's Manual

# Estrone free in Saliva ELISA

Enzyme immunoassay for the quantitative determination of Estrone in saliva



**DESLV5228**



**96 wells**

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

**Table of Contents / Inhaltsverzeichnis**

1	INTRODUCTION .....	3
2	PRINCIPLE OF THE TEST .....	3
3	WARNINGS AND PRECAUTIONS .....	4
4	REAGENTS .....	5
5	SPECIMEN COLLECTION AND PREPARATION.....	6
6	ASSAY PROCEDURE .....	6
7	EXPECTED NORMAL VALUES.....	8
8	QUALITY CONTROL .....	8
9	PERFORMANCE CHARACTERISTICS.....	9
10	LIMITATIONS OF USE .....	11
11	LEGAL ASPECTS.....	11
1	EINLEITUNG.....	12
2	TESTPRINZIP .....	12
3	VORSICHTSMAßNAHMEN.....	12
4	BESTANDTEILE DES KITS.....	13
5	PROBENVORBEREITUNG .....	14
6	TESTDURCHFÜHRUNG.....	15
7	ERWARTETE WERTE .....	16
8	QUALITÄTSKONTROLLE .....	16
9	ASSAY-CHARAKTERISTIKA .....	17
10	GRENZEN DES TESTS .....	17
11	RECHTLICHE GRUNDLAGEN.....	18
12	REFERENCES / LITERATURE .....	19
	SYMBOLS USED WITH DEMEDITEC ASSAYS.....	20

## 1 INTRODUCTION

### 1.1 Intended Use

The **Demeditec Salivary Estrone ELISA** is an enzyme immunoassay for the quantitative *in vitro diagnostic* measurement of Estrone in saliva.

### 1.2 Summary and Explanation

Estrone (3-hydroxy-1,3,5 (10)-estratrien-17-one) is beside estradiol and estriol one of the three major naturally occurring estrogens. The estrogens are involved in the development of female sex organs and secondary sex characteristics. Bioassay data indicate that the estrogenic activity of estrone is considerably lower in comparison to estradiol (1). However, the physiological role of endogenous estrone is not well defined. Estrone is produced primarily from androstenedione. In premenopausal women, more than 50% of the estrone is secreted by the ovary. In prepubertal children, men and postmenopausal women, the major portion of estrone is derived from peripheral tissue conversion (2). During the follicular phase of the menstrual cycle the estrone level increases with a clear peak around day 13. The peak is of short duration and by day 16 of the cycle levels will be low again. A second peak during the luteal phase occurs around day 21 of the cycle. If fertilization does not occur production of estrone decreases again. These changes of estrone concentration are in parallel to that of estradiol (3). Until the 4<sup>th</sup> to 6<sup>th</sup> week of pregnancy, estrone originates primarily from maternal sources such as the ovaries, adrenals, or peripheral conversion thus remaining within the normal values (4). After week 6 to 10 of pregnancy the values increase gradually due to placental secretion of estrone. After menopause, estrone levels do not decline as dramatically as estradiol levels. In postmenopausal women estrone is the major estrogen. In males the concentration of E1 has been reported to rise up with age inversely to that of 17-OH-progesterone (5). In premenopausal women excessive estrone levels can result from the conversion of large amounts of androstenedione produced in polycystic ovary syndrome (6) and ovarian tumors.

## 2 PRINCIPLE OF THE TEST

The Demeditec Salivary Estrone ELISA is a solid phase enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) based on the **principle of competitive binding**. The microtiter wells are coated with a polyclonal (rabbit) antibody directed towards a unique antigenic site of the estrone molecule. Endogenous estrone of a patient sample competes with an estrone-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 estrone in the sample. Having added the substrate solution, the intensity of colour developed is inversely proportional to the concentration of estrone in the patient sample.

### 3 WARNINGS AND PRECAUTIONS

- This kit is for in vitro diagnostic use only. For professional use only.
- All reagents of this test kit which contain human serum or plasma have been tested and confirmed negative for HIV I/II, HBsAg and HCV by FDA approved procedures. All reagents, however, should be treated as potential biohazards in use and for disposal.
- Before starting the assay, read the instructions completely and carefully. Use the valid version of instructions for use provided with the kit. Be sure that everything is understood.
- The microplate contains snap-off strips. Unused wells must be stored at 2 °C - 8 °C in the sealed foil pouch and used in the frame provided.
- Pipetting of samples and reagents must be done as quickly as possible and in the same sequence for each step.
- 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.
- Mix the contents of the microplate wells thoroughly to ensure good test results. Do not reuse microwells.
- Do not let wells dry during assay; add reagents immediately after completing the rinsing steps.
- Allow the reagents to reach room temperature (21 °C - 26 °C) before starting the test. Temperature will affect the absorbance readings of the assay. However, values for the patient samples will not be affected.
- Never pipet by mouth and avoid contact of reagents and specimens with skin and mucous membranes.
- Do not smoke, eat, drink or apply cosmetics in areas where specimens or kit reagents are handled.
- Wear disposable latex gloves when handling specimens and reagents. Microbial contamination of reagents or specimens may give false results.
- Handling should be done in accordance with the procedures defined by an appropriate national biohazard safety guideline or regulation.
- Do not use reagents beyond expiry date as shown on the kit labels.
- All indicated volumes have to be performed according to the protocol. Optimal test results are only obtained when using calibrated pipettes and microtiter plate readers.
- 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.
- Avoid contact with *Stop Solution* containing 0.5 M H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>. It may cause skin irritation and burns.
- Some reagents contain Proclin 300, BND and/or MIT as preservatives. In case of contact with eyes or skin, flush immediately with water.
- TMB substrate has an irritant effect on skin and mucosa. In case of possible contact, wash eyes with an abundant volume of water and skin with soap and abundant water. Wash contaminated objects before reusing them. If inhaled, take the person to open air.
- Chemicals and prepared or used reagents have to be treated as hazardous waste according to the national biohazard safety guideline or regulation.
- For information on hazardous substances included in the kit please refer to Safety Data Sheets. Safety Data Sheets for this product are available upon request directly from Demeditec.

## 4 REAGENTS

### 4.1 Reagents provided

1. **SORB** **MT** **Microtiterwells**, 12 x 8 (break apart) strips, 96 wells; Wells coated with estrone antibody (polyclonal).
2. **CAL** **0** – **5** **Standard (Standard 0 - 5)**, 6 vials, 1 mL each, ready to use;  
Concentrations: 0 - 3 - 12.3 - 37 - 111 - 333 pg/mL;  
Conversion: pg/mL × 3.69 = pmol/L;  
The standards are calibrated against the following reference material: Estrone solution (Certified Reference Material; E-075; Cerilliant)  
Contain non-mercury preservative.
3. **CONTROL** **low** & **high** **Control Low & High**, 2 vials, 1 mL each, ready to use; For control values and ranges please refer to vial label or QC-Datasheet. Contain non-mercury preservative.
4. **SAM** **DIL** **Sample Diluent**, 1 vial, 3 mL, ready to use, Contains non-mercury preservative.
5. **ENZ** **CONJ** **Enzyme Conjugate**, 1 vial, 14 mL, ready to use, Estrone conjugated to horseradish peroxidase;  
Contains non-mercury preservative.
6. **SUB** **TMB** **Substrate Solution**, 1 vial, 25 mL, ready to use, Tetramethylbenzidine (TMB).
7. **STOP** **SOLN** **Stop Solution**, 1 vial, 14 mL, ready to use, contains 0.5 M H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>, Avoid contact with the stop solution. It may cause skin irritations and burns.
8. **WASH** **SOLN** **40x** **Wash Solution**, 1 vial, 30 mL (40X concentrated), See "Reagent Preparation".

**Note:** Additional *Sample Diluent* for sample dilution is available upon request.

### 4.2 Materials required but not provided

- A microtiter plate calibrated reader (450 ± 10 nm)
- Calibrated variable precision micropipettes.
- Absorbent paper.
- Distilled or deionized water
- Timer
- Graph paper or software for data reduction

### 4.3 Storage Conditions

When stored at 2-8 °C unopened reagents will retain reactivity until expiration date. Do not use reagents beyond this date. Opened reagents must be stored at 2-8 °C. Microtiter wells must be stored at 2-8 °C. Once the foil bag has been opened, care should be taken to close it tightly again. Opened kits retain activity for 8 weeks if stored as described above.

### 4.4 Reagent Preparation

Bring all reagents and required number of strips to room temperature prior to use.

#### Wash Solution

Add deionized water to the 40X concentrated Wash Solution.

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

### 4.5 Disposal of the Kit

The disposal of the kit must be made according to the national regulations. Special information for this product is given in the Safety Data Sheet, section 13.

### 4.6 Damaged Test Kits

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

## 5 SPECIMEN COLLECTION AND PREPARATION

Samples containing sodium azide should not be used in the assay. The saliva samples should be completely colorless. Even the slightest red color shows blood contamination 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. 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 4°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.

### 5.3 Specimen Dilution

If in an initial assay, a specimen is found to contain more than the highest standard, the specimens can be diluted with *Sample Diluent* and reassayed as described in Assay Procedure. For the calculation of the concentrations this dilution factor has to be taken into account.

Example:

- a) dilution 1:10:           10 µL sample + 90 µL *Sample Diluent* (mix thoroughly)
- b) dilution 1:100:        10 µL dilution a) 1:10 + 90 µL *Sample Diluent* (mix thoroughly).

## 6 ASSAY PROCEDURE

### 6.1 General Remarks

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

## 6.2 Test Procedure

Each run must include a standard curve.

1. Secure the desired number of Microtiter wells in the frame holder.
2. Dispense **100 µL** of each **Standard, Control** and **samples** with new disposable tips into appropriate wells.
3. Incubate for **30 minutes** at room temperature.
4. Dispense **100 µL Enzyme Conjugate** into each well.  
Thoroughly mix for 10 seconds. It is important to have a complete mixing in this step.
5. Incubate for **30 minutes** at room temperature.
6. Briskly shake out the contents of the wells.  
Rinse the wells **5 times** with **400 µL** diluted Wash Solution per well. Strike the wells sharply on absorbent paper to remove residual droplets.

### Important note:

The sensitivity and precision of this assay is markedly influenced by the correct performance of the washing procedure!

7. Add **150 µL** of **Substrate Solution** to each well.
8. Incubate for **15 minutes** at room temperature.
9. Stop the enzymatic reaction by adding **100 µL** of **Stop Solution** to each well.
10. Determine the absorbance (OD) of each well at **450 ± 10 nm** with a microtiter plate reader.  
It is recommended that the wells be read **within 10 minutes** after adding the Stop Solution.

## 6.3 Calculation of Results

1. Calculate the average absorbance values for each set of standards, controls and patient samples.
2. Using scale paper or semi-logarithmic graph paper, construct a standard curve by plotting the mean absorbance obtained from each standard against its concentration with absorbance value on the vertical (Y) axis and concentration on the horizontal (X) axis.
3. Using the mean absorbance value for each sample determine the corresponding concentration from the standard curve.
4. Automated method: The results in the Instructions for Use have been calculated automatically using a 4-Parameter curve fit. (4 Parameter Rodbard or 4 Parameter Marquardt are the preferred methods.) Other data reduction functions may give slightly different results.
5. The concentration of the samples can be read directly from this standard curve. Samples with concentrations higher than that of the highest standard have to be further diluted or reported as > 333 pg/mL. For the calculation of the concentrations this dilution factor has to be taken into account.

### 6.3.1 Example of Typical Standard Curve

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

Standard		Optical Units (450 nm)
Standard 0	0.0 pg/mL	2.07
Standard 1	3.0 pg/mL	1.81
Standard 2	12.3 pg/mL	1.61
Standard 3	37.0 pg/mL	1.37
Standard 4	111.0 pg/mL	1.04
Standard 5	333.0 pg/mL	0.63

## 7 EXPECTED NORMAL VALUES

It is strongly recommended that each laboratory should determine its own normal and abnormal values. In a study conducted with apparently healthy individuals, using the Demeditec Salivary Estrone ELISA the following data were observed:

Population	n	Age (years)	Mean (pg/mL)	Median (pg/mL)	2.5 <sup>th</sup> - 97.5 <sup>th</sup> Percentile (pg/mL)	Range (min. - max.) (pg/mL)
Males	50	16 - 57	7.69	6.17	2.09 - 20.43	1.46 - 22.02
Females	50	19 - 58	7.37	5.04	2.61 - 23.03	1.68 - 29.25

The results alone should not be the only reason for any therapeutic consequences. The results should be correlated to other clinical observations and diagnostic tests.

## 8 QUALITY CONTROL

Good laboratory practice requires that controls be run with each calibration curve. A statistically significant number of controls should be assayed to establish mean values and acceptable ranges to assure proper performance. It is recommended to use control samples according to state and federal regulations. The use of control samples is advised to assure the day to day validity of results. Use controls at both normal and pathological levels. The controls and the corresponding results of the QC-Laboratory are stated in the QC certificate added to the kit. The values and ranges stated on the QC sheet always refer to the current kit lot and should be used for direct comparison of the results. It is also recommended to make use of national or international Quality Assessment programs in order to ensure the accuracy of the results. Employ appropriate statistical methods for analysing control values and trends. If the results of the assay do not fit to the established acceptable ranges of control materials patient results should be considered invalid. In this case, please check the following technical areas: Pipetting and timing devices; photometer, expiration dates of reagents, storage and incubation conditions, aspiration and washing methods. After checking the above mentioned items without finding any error contact your distributor or Demeditec directly.



## 9 PERFORMANCE CHARACTERISTICS

### 9.1 Assay Dynamic Range

The range of the assay is between 0.12 pg/mL - 333.0 pg/mL.

### 9.2 Specificity of Antibodies (Cross Reactivity)

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

Compound	Spiked concentration (pg/mL)	% Cross-reactivity
Estrone 3-sulfate	250	52.88
Estradiol	100	8.65
Estriol	1000	0.32
Progesterone	2400	0.08
17-OH Progesterone	1000	0.05
DHEA-S	1000	0.15
Androstenedione	1000	0.09
4-Androstene-3,17-dione	250	1.66
Cortisol	30000	ND
DHEA	1440	ND
Testosterone	1000	ND
Cortisone	250	1.06
Tetrahydrocortisone	1000	0.23
Ethisterone	250	0.32

ND = none detected (< 0.08 pg/mL)

### 9.3 Sensitivity

The analytical sensitivity of the Demeditec ELISA was calculated by subtracting 2 standard deviations from the mean of 20 replicate analyses of the *Standard 0* and was found to be 0.12 pg/mL.

The Limit of Blank (LoB) is 0.08 pg/mL.

The Limit of Detection (LoD) is 1.073 pg/mL.

The Limit of Quantification (LoQ) is 3.104 pg/mL.

### 9.4 Reproducibility

#### 9.4.1 Intra Assay

The within assay variability is shown below:

Sample	n	Mean (pg/mL)	CV (%)
1	10	9.28	8.5
2	10	37.85	9.4
3	10	59.17	2.4
4	10	126.80	8.8

#### 9.4.2 Inter Assay

The between assay variability is shown below:

Sample	n	Mean (pg/mL)	CV (%)
1	30	9.64	14.1
2	30	38.57	8.2
3	30	56.58	4.2
4	30	131.11	7.1

### 9.5 Recovery

Recovery of the Demeditec ELISA was determined by adding increasing amounts of the analyte to 4 different patient samples containing different amounts of endogenous analyte. Each sample (non-spiked and spiked) were assayed and analyte concentrations of the samples were calculated from the standard curve. The percentage recoveries were determined by comparing expected and measured values of the samples.

	Sample 1	Sample 2	Sample 3	Sample 4
<b>Concentration (pg/mL)</b>	33.60	49.19	107.21	298.68
<b>Average Recovery (%)</b>	97.7	97.2	107.8	96.6
<b>Range of Recovery (%)</b>	from	86.6	86.3	102.9
	to	107.2	110.6	112.2

### 9.6 Linearity

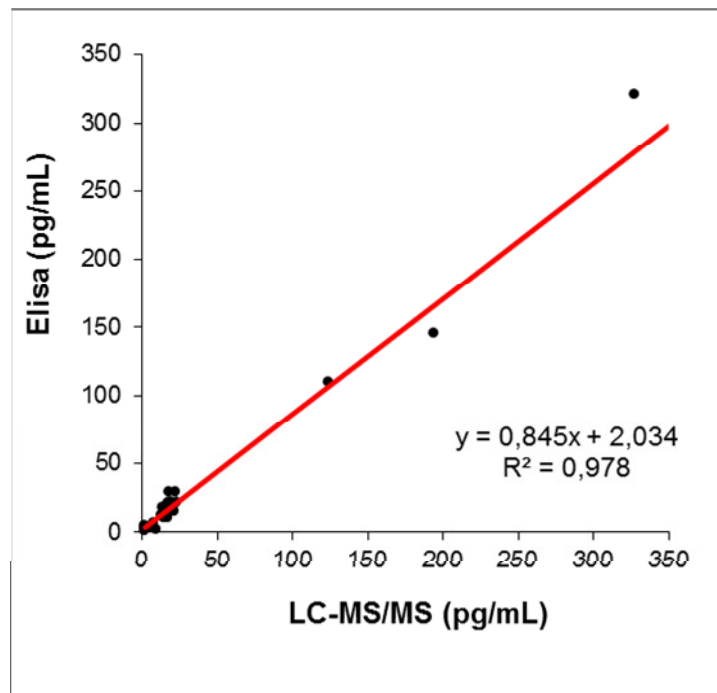
4 samples containing different amounts of analyte were serially diluted with *Sample Diluent*. The percentage recovery was calculated by comparing the expected and measured values for the analyte.

	Sample 1	Sample 2	Sample 3	Sample 4
<b>Concentration (pg/mL)</b>	66.00	100.00	122.21	174.27
<b>Average Recovery (%)</b>	98.5	96.4	106.7	99.5
<b>Range of Recovery (%)</b>	from	93.9	92.8	97.8
	to	109.1	104.0	113.9

### 9.7 Comparison Studies

A comparison of Demeditec Salivary Estrone ELISA (DESLV5228) (y) and the Reference Method LC-MS/MS (x) using clinical samples gave the following correlation:

$$\begin{aligned} n &= 26 \\ r &= 0.989 \\ y &= 0.845x + 2.034 \end{aligned}$$



## 10 LIMITATIONS OF USE

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

### 10.1 Interfering Substances

Visible blood contamination in saliva samples will affect results.

### 10.2 Drug Interferences

Until today no substances (drugs) are known to us, which have an influence to the measurement of Estrone in a sample.

### 10.3 High-Dose-Hook Effect

No hook effect was observed in this test.

## 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.

## 1 EINLEITUNG

Der **Demeditec Salivary Estrone ELISA** wird zur quantitativen Bestimmung von Estron in Speichelproben eingesetzt.

**Nur für In-vitro Diagnostik.**

## 2 TESTPRINZIP

Der Demeditec Salivary Estrone ELISA ist ein Festphasen-Enzymimmunoassay, der auf dem **Prinzip der kompetitiven Bindung** basiert. Die Wells der Mikrotiterplatten sind mit einem polyklonalen Antikörper beschichtet, der gegen eine definierte Antikörper-Bindungsstelle des Estron-Moleküls gerichtet ist. Die Proben werden in die beschichteten Wells gegeben und zusammen mit einem Estron-Enzymkonjugat inkubiert. Während der Inkubation konkurriert das Estron aus der Probe mit dem Estron-Enzymkonjugat um die freien Bindungsstellen auf den beschichteten Wells. Das nicht gebundene Konjugat wird durch Waschen der Wells entfernt. Anschließend wird die Substratlösung zugegeben und die Farbentwicklung nach einer definierten Zeit gestoppt. Die Intensität der gebildeten Farbe ist umgekehrt proportional der Estron-Konzentration in der Probe. Die Extinktion wird bei 450 nm mit einem Mikrotiterplattenleser gemessen.

## 3 VORSICHTSMABNAHMEN

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

## 4 BESTANDTEILE DES KITS

### 4.1 Kitinhalt

1. **SORB** **MT** **Microtiterwells**, 96 Wells, 12 x 8 Wells (einzeln brechbar); Mit anti-Estron-Antikörper (polyklonal) beschichtet.
2. **CAL** **0** – **5** **Standard (Standard 0 - 5)**, 6 Fläschchen, je 1 mL, gebrauchsfertig; Konzentrationen: 0 - 3 - 12.3 - 37 - 111 - 333 pg/mL; Umrechnungsfaktor: pg/mL x 3.69 = pmol/L; Die Standards sind gegen das folgende Referenzmaterial kalibriert: Estrone solution (Certified Reference Material; E-075; Cerilliant); Enthält quecksilberfreies Konservierungsmittel.
3. **CONTROL** **low & high** **Control Low & High** (Kontrolle), 2 Fläschchen, je 1 mL, gebrauchsfertig; Kontrollwerte und -bereiche entnehmen Sie bitte dem Fläschchenetikett oder dem QC-Datenblatt. Enthält quecksilberfreies Konservierungsmittel.
4. **SAM** **DIL** **Sample Diluent** (Probenverdünnungsmedium), 1 Fläschchen, 3 mL, gebrauchsfertig; Enthält quecksilberfreies Konservierungsmittel.
5. **ENZ** **CONJ** **Enzyme Conjugate** (Enzymkonjugat), 1 Fläschchen, 14 mL, gebrauchsfertig; Estron mit Meerrettichperoxidase konjugiert; Enthält quecksilberfreies Konservierungsmittel.
6. **SUB** **TMB** **Substrate Solution** (Substratlösung), 1 Fläschchen, 25 mL, gebrauchsfertig; Substratlösung TMB.
7. **STOP** **SOLN** **Stop Solution** (Stopplösung), 1 Fläschchen, 14 mL, gebrauchsfertig; enthält 0,5 M H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>. Kontakt mit der Stopplösung vermeiden! Kann Hautreizungen und Verbrennungen verursachen.
8. **WASH** **SOLN** **40x** **Wash Solution** (Waschlösung), 1 Fläschchen, 30 mL, **40X** konzentriert; Siehe „Vorbereitung der Reagenzien“.

**Anmerkung:** Zusätzliches *Sample Diluent* zur Probenverdünnung ist auf Anfrage erhältlich.

### 4.2 Erforderliche aber nicht enthaltene Geräte und Materialien

- Kalibriertes Mikrotiterplattenlesegerät mit 450 ± 10 nm Filter)
- Kalibrierte variable Präzisions-Mikropipette
- Saugfähiges Papier
- Destilliertes Wasser
- Laborwecker
- Millimeterpapier oder Software zur Datenauswertung

### 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. Die Mikrotiterwells sollten bei 2-8 °C gelagert werden. Der einmal geöffnete Folienbeutel sollte stets sehr sorgfältig wieder verschlossen werden. Unter den beschriebenen Lagerbedingungen behalten geöffnete Kits 8 Wochen ihre Reaktivität.

### 4.4 Vorbereitung der Reagenzien

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

#### Wash Solution

Die 40-fach konzentrierte *Wash Solution* (30 mL) mit 1170 mL destilliertem Wasser auf ein Gesamtvolumen von 1200 mL verdünnen. *Die verdünnte Waschlösung ist bei Raumtemperatur für 2 Wochen stabil.*

### 4.5 Entsorgung des Kits

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

### 4.6 Beschädigte Testkits

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

## 5 PROBENVORBEREITUNG

Proben, die Natriumazid enthalten, sollten nicht verwendet werden. Die 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 Polypolypropylen zu verwenden. PE-enhaltende 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.

Da die Sekretion der Steroidhormone eine ausgeprägte episodische Dynamik zeigt, ist es erforderlich eine Sammelstrategie anzuwenden, die Zufallsergebnisse vermeidet. Wir empfehlen daher, stets mehrfach Proben zu sammeln. Und zwar sollte man sich dazu einen Zeitraum von 2 Stunden im Laufe eines Tages aussuchen, in dem dann 5 Proben im Abstand von jeweils 30 Minuten genommen werden können. Vor und während dieser Sammelperiode darf keine Nahrung (fest oder flüssig) aufgenommen werden. Wenn ein Fasten vor der Sammelperiode zu schwierig sein sollte, darf in begrenzten Mengen 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 4°C ist aber vorzuziehen. 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 Mucine durch Zentrifugation entfernen zu können. Daher sollten die Speichelproben nach der Ankunft im Labor erst einmal eingefroren werden. Zur eigentlichen Messung der Hormonkonzentration werden dann alle Speichelproben wieder aufgetaut und 5 bis 10 Minuten lang zentrifugiert. Der Überstand sollte nun klar und farblos sein. Schon bei der leichtesten Rotfärbung sollte die Probe verworfen und eine neue Probe angefordert werden. Auch nur leicht rötlich gefärbte Proben zeigen immer zu hohe Konzentrationswerte. Wegen der episodischen Sekretionsmuster sollten in der Routine immer Mehrfachproben eingesetzt werden (siehe oben). Die fünf zu einer Abnahmeserie gehörenden Proben werden wie oben beschrieben vorbereitet. Sodann werden Aliquots aus jeder Einzelprobe in einem separaten Probengefäß gemischt. Aus dieser Mischung wird dann die eigentliche Messung vorgenommen.

### 5.3 Probenverdünnung

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

#### Beispiel:

- a) Verdünnung 1:10: 10 µL Speichelprobe + 90 µL *Sample Diluent* gründlich mischen)
- b) Verdünnung 1:100: 10 µL Verdünnung a) 1:10 + 90 µL *Sample Diluent* (gründlich mischen).

## 6 TESTDURCHFÜHRUNG

### 6.1 Allgemeine Hinweise

- Alle Reagenzien und Proben müssen vor Gebrauch auf Raumtemperatur 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 eine neue Plastikspitze verwenden, um Verschleppungen zu vermeiden.
- Die Optische Dichte ist abhängig von Inkubationszeit und Temperatur. Deshalb ist es notwendig, vor Beginn der Testdurchführung alle Reagenzien in einen arbeitsbereiten Zustand zu bringen, die Deckel der Fläschchen zu öffnen, alle benötigten Wells in den Halter zu setzen. Nur eine solche Vorbereitung garantiert gleiche Zeiten für jeden Pipettiervorgang ohne Pausen.
- Als generelle Regel gilt, dass die enzymatische Reaktion linear proportional zu Zeit und Temperatur ist.

### 6.2 Testdurchführung

Jeder Lauf muss eine Standardkurve beinhalten.

1. Die benötigte Anzahl Wells in der Halterung befestigen.
2. **Je 100 µL Standard, Control und Proben** mit neuen Plastikspitzen in die entsprechenden Wells geben.
3. **30 Minuten** bei Raumtemperatur inkubieren.
4. **100 µL Enzyme Conjugate** in jedes Well geben.  
Für 10 Sekunden gut schütteln. Es ist sehr wichtig, in diesem Schritt eine komplette Durchmischung zu erreichen.
5. **30 Minuten** bei Raumtemperatur inkubieren.
6. Den Inhalt der Wells kräftig ausschütteln. Wells **5-mal** mit **400 µL** verdünnter Wash Solution waschen. Verbleibende Flüssigkeit durch Ausklopfen der Wells auf saugfähigem Papier entfernen.  
**Achtung:** Die Sensitivität und Präzision dieses Assays wird erheblich beeinflusst von der korrekten Durchführung des Waschschrilles!
7. **150 µL Substrate Solution** in jedes Well geben.
8. **15 Minuten** bei Raumtemperatur inkubieren.
9. Die enzymatische Reaktion durch Zugabe von **100 µL Stop Solution** in jedes Well abstoppen.
10. Die Optische Dichte bei **450 ± 10 nm** mit einem Mikrotiterplatten-Lesegerät innerhalb von **10 Minuten** nach Zugabe der **Stop Solution** bestimmen.

### 6.3 Ergebnisermittlung

1. Die durchschnittlichen Werte der Optischen Dichte (OD) für jedes Set von Standards, Controls und Patientenproben bestimmen.
2. Eine Standardkurve ermitteln durch Auftragen der mittleren Optischen Dichte jedes Standards gegen die Konzentration, wobei der OD-Wert auf der vertikalen (Y) Achse und die Konzentration auf der horizontalen (X) Achse eingetragen wird.
3. Unter Verwendung der mittleren OD wird für jede Probe die entsprechende Konzentration aus der Standardkurve ermittelt.
4. Automatische Methode: Die in der Gebrauchsanweisung angegebenen Werte wurden automatisch mit Hilfe der 4 Parameter-Gleichung bestimmt. (4 Parameter Rodbard oder 4 Parameter Marquardt sind die bevorzugten Methoden.) Andere Auswertungsfunktionen können leicht abweichende Werte ergeben.
5. Die Konzentration der Proben kann direkt von der Standardkurve abgelesen werden. Proben, die eine höhere Konzentration als die des höchsten Standards enthalten, müssen verdünnt werden. Dieser Verdünnungsfaktor muss bei der Berechnung der Konzentration beachtet werden.

### 6.3.1 Beispiel für eine Standardkurve

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

Standard		Optische Dichte (450 nm)
Standard 0	0,0 pg/mL	2,07
Standard 1	3,0 pg/mL	1,81
Standard 2	12,3 pg/mL	1,61
Standard 3	37,0 pg/mL	1,37
Standard 4	111,0 pg/mL	1,04
Standard 5	333,0 pg/mL	0,63

## 7 ERWARTETE WERTE

Es wird empfohlen, dass jedes Labor seine eigenen normalen und abnormalen Werte ermittelt. In einer Studie mit dem Demeditec Salivary Estrone ELISA wurden die Proben von scheinbar gesunden Probanden untersucht. Dabei ergaben sich folgende Werte:

Population	n	Alter (Jahre)	Mittelwert (pg/mL)	Median (pg/mL)	2,5. - 97,5. Perzentile (pg/mL)	Bereich (min. - max.) (pg/mL)
Männer	50	16 - 57	7,69	6,17	2,09 - 20,43	1,46 - 22,02
Frauen	50	19 - 58	7,37	5,04	2,61 - 23,03	1,68 - 29,25

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

## 8 QUALITÄTSKONTROLLE

Es wird empfohlen, die Kontrollproben gemäß den nationalen gesetzlichen Bestimmungen einzusetzen. Durch die Verwendung von Kontrollproben wird eine Tag-zu-Tag Überprüfung der Ergebnisse erzielt. Es sollten Kontrollen sowohl mit normalem als auch pathologischem Level eingesetzt werden. Die Kontrollen mit den entsprechenden Ergebnissen des QC-Labors sind im QC-Zertifikat, das dem Kit beiliegt, aufgeführt. Die im QC-Blatt angegebenen Werte und Bereiche beziehen sich stets auf die aktuelle Kitcharge und sollten zum direkten Vergleich der Ergebnisse verwendet werden. Es wird ebenfalls empfohlen, an nationalen oder internationalen Qualitätssicherungs-Programmen teilzunehmen, um die Genauigkeit der Ergebnisse zu sichern. Es sollten geeignete statistische Methoden zur Analyse von Kontroll-Werten und Trends angewendet werden. Wenn die Ergebnisse des Assays nicht mit den angegebenen Akzeptanzbereichen des Kontrollmaterials übereinstimmen, sollten die Patientenergebnisse als ungültig eingestuft werden. In diesem Fall überprüfen Sie bitte die folgenden Bereiche: Pipetten und Zeitnehmer, Photometer, Verfallsdatum der Reagenzien, Lagerungs- und Inkubationsbedingungen, Absaug- und Waschmethode. Sollten Sie nach Überprüfung der vorgenannten Bereiche keinen Fehler erkannt haben, setzen Sie sich bitte mit Ihrem Lieferanten oder direkt mit der Firma Demeditec in Verbindung.



## 9 ASSAY-CHARAKTERISTIKA

### 9.1 Messbereich

Der Messbereich des Testes liegt zwischen 0,12 pg/mL - 333,0 pg/mL.

### 9.2 Spezifität der Antikörper (Kreuzreaktivität)

Die Daten entnehmen Sie bitte der ausführlichen englischen Arbeitsanleitung.

### 9.3 Sensitivität

Die analytische Sensitivität, definiert als Mittelwert, abzüglich der zweifachen Standardabweichung, des *Sample Diluent* (n = 20), beträgt 0,12 pg/mL.

Der „Limit of Blank“ (LoB) ist 0,08 pg/mL.

Die Nachweisgrenze (LoD) ist 1,073 pg/mL.

Die Quantifizierungsgrenze (LoQ) ist 3,104 pg/mL.

Die Daten zu:

### 9.4 Reproduzierbarkeit (Präzision)

### 9.5 Wiederfindung

### 9.6 Linearität

### 9.7 Vergleichsstudien

entnehmen Sie bitte der ausführlichen englischen Version der Gebrauchsanweisung.

## 10 GRENZEN DES TESTS

Zuverlässige und reproduzierbare Ergebnisse werden erzielt, wenn das Testverfahren mit vollständigem Verständnis der Anweisungen in der Gebrauchsanleitung und unter Befolgung der GLP (Good Laboratory Practice)-Richtlinien durchgeführt wird. Jede unsachgemäße Behandlung von Proben oder Modifikation dieses Tests können die Ergebnisse beeinflussen.

### 10.1 Interferenzen

Eine sichtbare Kontamination der Speichelproben mit Blut hat Einfluss auf das Testergebnis.

### 10.2 Beeinflussung durch Medikamente

Bislang sind uns keine Substanzen (Medikamente) bekannt geworden, die einen Einfluss auf die Bestimmung von Estron in einer Probe haben.

### 10.3 High-Dose-Hook Effekt

Ein Hook-Effekt tritt in diesem Test nicht auf.

## **11 RECHTLICHE GRUNDLAGEN**

### **11.1 Zuverlässigkeit der Ergebnisse**

Der Test muss exakt gemäß der Testanleitung des Herstellers abgearbeitet werden. Darüber hinaus muss der Benutzer sich strikt an die Regeln der GLP (Good Laboratory Practice) oder andere eventuell anzuwendende Regeln oder nationale gesetzliche Vorgaben halten. Dies betrifft besonders den Gebrauch der Kontrollreagenzien. Es ist sehr wichtig, bei der Testdurchführung stets eine ausreichende Anzahl Kontrollen zur Überprüfung der Genauigkeit und Präzision mitlaufen zu lassen. Die Testergebnisse sind nur gültig, wenn alle Kontrollen in den vorgegebenen Bereichen liegen, und wenn alle anderen Testparameter die vorgegebenen Spezifikationen für diesen Assay erfüllen. Wenn Sie bezüglich eines Ergebnisses Zweifel oder Bedenken haben, setzen Sie sich bitte mit der Firma Demeditec in Verbindung.

### **11.2 Therapeutische Konsequenzen**

Therapeutische Konsequenzen sollten keinesfalls nur aufgrund von Laborergebnissen erfolgen, selbst dann nicht, wenn alle Testergebnisse mit den in 11.1 genannten Voraussetzungen übereinstimmen. Jedes Laborergebnis ist nur ein Teil des klinischen Gesamtbildes eines Patienten. Nur in Fällen, in denen die Laborergebnisse in akzeptabler Übereinstimmung mit dem allgemeinen klinischen Bild des Patienten stehen, sollten therapeutische Konsequenzen eingeleitet werden. Das Testergebnis allein sollte niemals als alleinige Grundlage für die Einleitung therapeutischer Konsequenzen dienen.




### **11.3 Haftung**

Jegliche Veränderungen des Testkits und/oder Austausch oder Vermischung von Komponenten unterschiedlicher Chargen von einem Testkit zu einem anderen, können die gewünschten Ergebnisse und die Gültigkeit des gesamten Tests negativ beeinflussen. Solche Veränderungen und/oder Austausch haben den Ausschluss jeglicher Ersatzansprüche zur Folge. Reklamationen, die aufgrund von Falschinterpretation von Laborergebnissen durch den Kunden gemäß Punkt 11.2 erfolgen, sind ebenfalls abzuweisen. Im Falle jeglicher Reklamation ist die Haftung des Herstellers maximal auf den Wert des Testkits beschränkt. Jegliche Schäden, die während des Transports am Kit entstanden sind, unterliegen nicht der Haftung des Herstellers.

## 12 REFERENCES / LITERATURE

1. Resnik R, Killam AP, Battaglia FC et al: The stimulation of uterine blood flow by various estrogens. *Endocrinology* 94:1192, 1974.
2. Fayman C, Winter JSD, Reyes FI. Patterns of gonadotropins and gonadal steroids throughout life. *Clin. Obstet. Gynecol.* 3: 467-483, 1976.
3. Baird DT, Fraser IS. Blood production and ovarian secretion rates of estradiol-17 $\beta$  and estrone in women throughout the menstrual cycle. *J Clin Endocrinol. Metab* 38: 1009-1017. 1974
4. Lindbert BS, Johansson EDB, Nilsson BA: Plasma levels of non-conjugated oestrone, oestradiol-17 $\beta$  and oestriol during uncomplicated pregnancy. *Acta Obstet Gynecol Scand* 32:21, 1974.
5. Drafta D, Schindler AE, Stroe EW, Neacsu E. Age-related changes of plasma steroids in normal adult males. *J. Steroid Biochem.* 17: 683-687, 1982.
6. DeVane GW, Czekala NM, Judd HL, Yen SSC. Circulating gonadotropins, estrogens, and androgens in polycystic ovarian disease. *Am J Obstet Gynecol* 1975; 121:496.

## SYMBOLS USED WITH DEMEDITEC ASSAYS

Symbol	English	Deutsch	Français	Espanol	Italiano
	European Conformity	CE-Konformitäts-kennzeichnung	Conforme aux normes européennes	Conformidad europea	Conformità europea
	Consult instructions for use	Gebrauchsanweisung beachten	Consulter les instructions d'utilisation	Consulte las Instrucciones	Consultare le istruzioni per l'uso
	In vitro diagnostic device	In-vitro-Diagnostikum	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 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