



User's Manual



Distribuito in ITALIA da
Li StarFish S.r.l.
Via Cavour, 35
20063 Cernusco S/N (MI)
telefono 02-92150794
fax 02-92157285
info@listarfish.it
www.listarfish.it

Estrone ELISA

Enzyme immunoassay for the quantitative measurement of Estrone
in serum and plasma



DE4174



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.
 Si prega di usare la versione valida delle istruzioni per l'uso a disposizione con il kit.
 Por favor, se usa solo la version valida de la metodico técnico incluido aqui en el kit.**

**Table of Contents / Inhaltsverzeichnis / Tabella die Contenuti / Tabla de Contenidos /
 Sommaire**

1	INTRODUCTION.....	4
2	PRINCIPLE OF THE TEST.....	4
3	WARNINGS AND PRECAUTIONS.....	5
4	REAGENTS.....	6
5	SPECIMEN COLLECTION AND PREPARATION.....	7
6	ASSAY PROCEDURE.....	7
7	EXPECTED NORMAL VALUES.....	9
8	QUALITY CONTROL.....	9
9	PERFORMANCE CHARACTERISTICS.....	10
10	LIMITATIONS OF USE.....	11
11	LEGAL ASPECTS.....	12
1	EINLEITUNG.....	13
2	TESTPRINZIP.....	13
3	VORSICHTSMAßNAHMEN.....	13
4	BESTANDTEILE DES KITS.....	14
5	PROBENVORBEREITUNG.....	15
6	TESTDURCHFÜHRUNG.....	15
7	ERWARTETE WERTE.....	17
8	QUALITÄTSKONTROLLE.....	17
9	ASSAY-CHARACTERISTIKA.....	17
10	GRENZEN DES TESTS.....	18
11	RECHTLICHE GRUNDLAGEN.....	18
1	INTRODUZIONE.....	19
2	PRINCIPIO DEL TEST.....	19
3	PRECAUZIONI.....	19
4	COMPONENTI DEL KIT.....	20
5	CAMPIONI.....	21
6	ATTUAZIONE DEL TEST.....	21
7	VALORI NORMALI.....	23
8	CONTROLLO QUALITÀ.....	23
9	CARATTERISTICHE DEL TEST.....	23
10	LIMITAZIONE DEL TEST.....	24
11	ASPETTI LEGALI.....	24

1 INTRODUCTION

1.1 Intended Use

The **DEMEDIATEC Estrone ELISA** is an enzyme immunoassay for the quantitative *in vitro diagnostic* measurement of Estrone in serum and EDTA plasma.

1.2 Summary and Explanation

There are three forms of estrogens in the female body: estrone (E1), estradiol (E2), and estriol (E3). The estrogens are involved in the development of female sex organs and secondary sex characteristics and effect most organ systems, including brain, breast, cardiovascular (heart and vasculature), immune, reproductive (ovaries and uterus), bladder, skin, and bone (1,11).

Estrone is produced primarily from androstenedione. In premenopausal women, more than 50% of the estrone is secreted by the ovary. In pre-pubertal 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 peak around day 14 and decreases thereafter. A second peak during the luteal phase occurs around day 21 of the cycle. These changes of estrone concentration mirror the estradiol levels (3). Up to week 4-6 of pregnancy, estrone originates primarily from maternal sources but gradually increases during week 6-10 of pregnancy due to placental secretion of estrone (4). 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 increase with age inversely to that of 17-OH-progesterone (5,9).

In premenopausal women estrone levels can increase after conversion of large amounts of androstenedione produced in polycystic ovary syndrome (6) and ovarian tumors. Furthermore, excess weight results in increased estrogen concentrations from peripheral conversion of androgens to estrogens (mainly E1) in adipose tissue by aromatase enzyme (10).

This test can be used for monitoring low-dose female hormone replacement therapy in postmenopausal women, monitoring of anti-estrogen therapy (e.g. with aromatase inhibitors), and as an adjunct to clinical assessment, imaging studies and bone mineral density measurement in the fracture risk assessment of postmenopausal women. In addition, it can be useful as part of the diagnosis and work-up of precocious and delayed puberty in females (to a lesser degree in males), and of suspected disorders of sex steroid metabolism (e.g. aromatase deficiency and 17 alpha-hydroxylase deficiency).

2 PRINCIPLE OF THE TEST

The DEMEDIATEC Estrone ELISA Kit 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 an 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. After addition of the substrate solution, the intensity of colour developed is inversely proportional to the concentration of Estrone in the patient sample.

3 WARNINGS AND PRECAUTIONS

1. This kit is for in vitro diagnostic use only. For professional use only.
2. All reagents of this test kit which contain human serum or plasma have been tested and confirmed negative for HIV I/II, HBsAg and HCV by FDA approved procedures. All reagents, however, should be treated as potential biohazards in use and for disposal.
3. Before starting the assay, read the instructions completely and carefully. Use the valid version of instructions for use provided with the kit. Be sure that everything is understood.
4. The microplate contains snap-off strips. Unused wells must be stored at 2 °C - 8 °C in the sealed foil pouch and used in the frame provided.
5. Pipetting of samples and reagents must be done as quickly as possible and in the same sequence for each step.
6. Use reservoirs only for single reagents. This especially applies to the substrate reservoirs. Using a reservoir for dispensing a substrate solution that had previously been used for the conjugate solution may turn solution colored. Do not pour reagents back into vials as reagent contamination may occur.
7. Mix the contents of the microplate wells thoroughly to ensure good test results. Do not reuse microwells.
8. Do not let wells dry during assay; add reagents immediately after completing the rinsing steps.
9. Allow the reagents to reach room temperature (21 °C - 24 °C) before starting the test. Temperature will affect the absorbance readings of the assay. However, values for the patient samples will not be affected.
10. Never pipet by mouth and avoid contact of reagents and specimens with skin and mucous membranes.
11. Do not smoke, eat, drink or apply cosmetics in areas where specimens or kit reagents are handled.
12. Wear disposable latex gloves when handling specimens and reagents. Microbial contamination of reagents or specimens may give false results.
13. Handling should be done in accordance with the procedures defined by an appropriate national biohazard safety guideline or regulation.
14. Do not use reagents beyond expiry date as shown on the kit labels.
15. All indicated volumes have to be performed according to the protocol. Optimal test results are only obtained when using calibrated pipettes and microtiterplate readers.
16. Do not mix or use components from kits with different lot numbers. It is advised not to exchange wells of different plates even of the same lot. The kits may have been shipped or stored under different conditions and the binding characteristics of the plates may result slightly different.
17. Avoid contact with *Stop Solution* containing 0.5 M H₂SO₄. It may cause skin irritation and burns.
18. Some reagents contain Proclin 300, BND and/or MIT as preservatives. In case of contact with eyes or skin, flush immediately with water.
19. TMB substrate has an irritant effect on skin and mucosa. In case of possible contact, wash eyes with an abundant volume of water and skin with soap and abundant water. Wash contaminated objects before reusing them. If inhaled, take the person to open air.
20. Chemicals and prepared or used reagents have to be treated as hazardous waste according to the national biohazard safety guideline or regulation.
21. For information on hazardous substances included in the kit please refer to Safety Data Sheets. Safety Data Sheets for this product are available upon request directly from DEMEDITEC.

4 REAGENTS

4.1 Reagents provided

1. **SORB** **MT** **Microtiterwells**, 12 x 8 (break apart) strips, 96 wells; Wells coated with anti-Estrone antibody (polyclonal).
2. **CAL** **0 – 6** **Standard (Standard 0-6)**, 7 vials, 1 mL ready to use; Concentrations: 0 - 15 - 30 - 90 - 270 - 810 - 2400 pg/mL. Conversion: $\text{pg/mL} \times 3.69 = \text{pmol/L}$. The standards are calibrated against certified reference material code 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. **ENZ** **CONJ** **Enzyme Conjugate**, 1 vial, 14 mL, ready to use, Estrone conjugated to horseradish peroxidase; Contains non-mercury preservative.
5. **SUB** **TMB** **Substrate Solution**, 1 vial, 14 mL, ready to use, Tetramethylbenzidine (TMB).
6. **STOP** **SOLN** **Stop Solution**, 1 vial, 14 mL, ready to use, contains 0.5 M H_2SO_4 . Avoid contact with the stop solution. It may cause skin irritations and burns.
7. **WASH** **SOLN** **40x** **Wash Solution**, 1 vial, 30 mL (40X concentrated), See "Reagent Preparation".

Note: Additional *Standard 0* 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
- Semi logarithmic graph paper or software for data reduction

4.3 Storage Conditions

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

4.4 Reagent Preparation

Bring all reagents and required number of strips to room temperature (21 °C - 24 °C) 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 Material Safety Data Sheet.

4.6 Damaged Test Kits

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

5 SPECIMEN COLLECTION AND PREPARATION

Serum or EDTA plasma can be used in this assay.

Do not use haemolytic, icteric or lipaemic specimens.

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

5.1 Specimen Collection

Serum:

Collect blood by venipuncture (e.g. Sarstedt Monovette for serum), allow to clot, and separate serum by centrifugation at room temperature. Do not centrifuge before complete clotting has occurred. Patients receiving anticoagulant therapy may require increased clotting time.

Plasma:

Whole blood should be collected into centrifuge tubes containing anti-coagulant (e.g. Sarstedt Monovette with the appropriate plasma preparation) and centrifuged immediately after collection.

5.2 Specimen Storage and Preparation

Specimens should be capped and may be stored for up to 4 days at 2 °C - 8 °C prior to assaying. Specimens held for a longer time (up to two months) should be frozen only once at -20 °C prior to assay. Thawed samples should be inverted several times prior to testing.

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 *Standard 0* and re-assayed as described in Assay Procedure.

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

Example:

- a) dilution 1:10: 10 µL sample + 90 µL *Standard 0* (mix thoroughly)
- b) dilution 1:100: 10 µL dilution a) 1:10 + 90 µL *Standard 0* (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.
- **The test should not be performed above a temperature of 24 °C.**
- 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 **25 µL** of each **Standard, Control** and **samples** with new disposable tips into appropriate wells.
3. Dispense **100 µL Enzyme Conjugate** into each well.
Thoroughly mix for 10 seconds. It is important to have a complete mixing in this step.
4. Incubate for **60 minutes** at room temperature.
5. Briskly shake out the contents of the wells.
Rinse the wells **5 times** with diluted *Wash Solution* (400 µL per well). Strike the wells sharply on absorbent paper to remove residual droplets.
Important note: The sensitivity and precision of this assay is markedly influenced by the correct performance of the washing procedure!
6. Add **100 µL** of **Substrate Solution** to each well.
7. Incubate for **15 minutes** at room temperature.
8. Stop the enzymatic reaction by adding **50 µL** of **Stop Solution** to each well.
9. Determine the absorbance (OD) of each well at **450 ± 10 nm** with a microtiter plate reader.
It is recommended that the wells be read **within 10 minutes** after adding the *Stop Solution*.

6.3 Calculation of Results

1. Calculate the average absorbance values for each set of standards, controls and patient samples.
2. Using semi-logarithmic graph paper, construct a standard curve by plotting the mean absorbance obtained from each standard against its concentration with absorbance value on the vertical (Y) axis and concentration on the horizontal (X) axis.
3. Using the mean absorbance value for each sample determine the corresponding concentration from the standard curve.
4. Automated method: The results in the 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 > 2400 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 pg/mL)	2.24
Standard 1 (15 pg/mL)	2.04
Standard 2 (30 pg/mL)	1.88
Standard 3 (90 pg/mL)	1.48
Standard 4 (270 pg/mL)	1.05
Standard 5 (810 pg/mL)	0.68
Standard 6 (2400 pg/mL)	0.43

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 normal healthy adults, using the DEMEDITEC Estrone ELISA the following values are observed:

Population	n	Range (min. - max.) (pg/mL)	Mean (pg/mL)	2.5 th - 97.5 th Percentile (pg/mL)	Median (pg/mL)
Males	60	9.0 - 79.1	47.6	15.6 - 77.0	47.9
Females					
premenopausal	110	11.2 - 338.3	69.4	15.5 - 220.2	52.8
postmenopausal	91	9.4 - 59.6	28.6	11.0 - 54.5	27.4

These results correlate well to published data (8, 9).

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.

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 8.1 - 2400 pg/mL.

9.2 Specificity of Antibodies (Cross Reactivity)

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

Compound	Cross reactivity %
17-OH-Progesterone	0.01
Androstenedione	0.04
Corticosterone	0.01
Cortisone	0.39
DHEA	0.01
Estradiol	1.19
Estriol	0.07
Estrone 3- β -D-glucuronide	0.35
Estrone 3-sulfate	0.44
Ethisterone	0.39
Hydrocortisone	0.30
Progesterone	< 0.01
Testosterone	0.03

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 Zero Standard (S0) and was found to be 8.1 pg/mL.

The limit of detection (LoD) of the assay is 14.6 pg/mL.

The limit of quantification (LoQ) of the assay is 15.8 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	57.7	8.4
2	10	82.1	6.8
3	10	409.1	6.4

9.4.2 Inter Assay

The between assay variability is shown below:

Sample	n	Mean (pg/mL)	CV (%)
1	30	32.9	12.1
2	30	87.8	9.4
3	30	451.6	8.7

9.4.3 Inter-Lot

The inter-assay (between-lots) variation was determined by repeated measurements of 3 samples in 3 different kit lots.

Sample	n	Mean (pg/mL)	CV (%)
1	18	2005.5	4.8
2	18	1122.1	2.3
3	18	66.3	14.0
4	18	53.5	8.4

9.5 Recovery

Samples have been spiked by adding Estrone solutions with known concentrations in a 1:1 ratio. The % recovery has been calculated by multiplication of the ratio of the measurements and the expected values with 100 (expected value = (endogenous Estrone + added Estrone) / 2; because of a 1:2 dilution of serum with spike material).

	Sample 1	Sample 2	Sample 3
Concentration [pg/mL]	31.95	32.06	639.70
Average Recovery	102.0	103.4	92.4
Range of Recovery [%]	from	96.0	89.2
	to	104.2	95.4

9.6 Linearity

	Sample 1	Sample 2	Sample 3
Concentration [pg/mL]	92.42	547.96	1649.26
Average Recovery	110.3	96.6	101.6
Range of Recovery [%]	from	108.4	95.7
	to	112.1	105.2

9.7 Comparison Studies

For method comparison, 40 samples spanning the complete assay range were tested by the DEMEDITEC Estrone ELISA and by the Beckman Coulter RIA.

The resulting regression equation was:

$$\text{DEMEDITEC} = 0.743 \text{ RIA} + 15.52; R^2 = 0.990$$

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

Haemoglobin (up to 4 mg/mL), Bilirubin (up to 0.5 mg/mL) and Triglyceride (up to 30 mg/mL) have no influence on the assay 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 **DEMEDIATEC Estrone ELISA** wird zur quantitativen Bestimmung von Estron in Serum und EDTA-Plasma eingesetzt.

Nur für In-vitro Diagnostik.

2 TESTPRINZIP

Der DEMEDIATEC Estrone ELISA ist ein Festphasen-Enzymimmunoassay, der auf dem Prinzip der kompetitiven Bindung basiert.

Die Wells der Mikrotiterplatten sind mit einem polyklonalen Kaninchen-Antikörper beschichtet, der gegen eine 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 VORSICHTSMAßNAHMEN

- 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 H₂SO₄ 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 – 6** **Standard (Standard 0-6)**, 7 Fläschchen, je 1 mL, gebrauchsfertig; Konzentrationen: 0 - 15 - 30 - 90 - 270 - 810 - 2400 pg/mL; Umrechnungsfaktor: $\text{pg/mL} \times 3,69 = \text{pmol/L}$; Die Standards sind kalibriert gegen zertifiziertes Referenzmaterial Code 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. **ENZ** **CONJ** **Enzyme Conjugate** (Enzymkonjugat), 1 Fläschchen, 14 mL, gebrauchsfertig; Estron mit Meerrettichperoxidase konjugiert. Enthält quecksilberfreies Konservierungsmittel.
5. **SUB** **TMB** **Substrate Solution** (Substratlösung), 1 Fläschchen, 14 mL, gebrauchsfertig; Substratlösung TMB.
6. **STOP** **SOLN** **Stop Solution** (Stopplösung), 1 Fläschchen, 14 mL, gebrauchsfertig; enthält 0,5 M H_2SO_4 , Kontakt mit der Stopplösung vermeiden! Kann Hautreizungen und Verbrennungen verursachen.
7. **WASH** **SOLN** **40x** **Wash Solution** (Waschlösung), 1 Fläschchen, 30 mL, 40X konzentriert; Siehe „Vorbereitung der Reagenzien“.

Anmerkung: Zusätzlicher *Standard 0* 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

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 zwei Monate ihre Reaktivität.

4.4 Vorbereitung der Reagenzien

Alle Reagenzien sowie die benötigte Anzahl von Wells sollen vor dem Gebrauch auf Raumtemperatur (21 °C - 24 °C) 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, Kapitel 13.

4.6 Beschädigte Testkits

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

5 PROBENVORBEREITUNG

Serum oder EDTA-Plasma kann in diesem Test als Probenmaterial eingesetzt werden.

Lipämische, ikterische und/oder stark hämolysierte Proben sollten nicht verwendet werden.

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

5.1 Probenentnahme

Serum:

Blut durch Venenpunktion entnehmen (z.B. mit Sarstedt Monovette für Serum), gerinnen lassen und das Serum durch Zentrifugation bei Raumtemperatur abtrennen. Vor der Zentrifugation muss die Gerinnung vollständig abgeschlossen sein. Bei Patienten, die Antikoagulantien erhalten, kann die Gerinnungszeit länger dauern.

Plasma:

Die Blutentnahme erfolgt mit Röhrchen, die ein Antikoagulant enthalten (z.B.: Sarstedt Monovette - mit entsprechender Plasma-Präparierung). Das Plasma wird als Überstand nach einer Zentrifugation gewonnen.

5.2 Probenaufbewahrung

Proben sollten stets gut verschlossen sein und können vor Testbeginn bis zu 4 Tage bei 2 °C - 8 °C gelagert werden.

Für eine längere Aufbewahrung (bis zu 2 Monaten) sollten die Proben eingefroren bei -20 °C bis zum Testbeginn gelagert werden. Nur einmal einfrieren. Aufgetaute Proben sollten vor Testbeginn vorsichtig durchmischt werden, ohne Schaumbildung.

5.3 Probenverdünnung

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

Beispiel:

a) Verdünnung 1:10: 10 µL Probe + 90 µL *Standard 0* gründlich mischen)

b) Verdünnung 1:100: 10 µL Verdünnung a) 1:10 + 90 µL *Standard 0* (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.
- **Der Test sollte nicht bei Temperaturen über 24 °C durchgeführt 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 25 µL Standard, Control und Proben mit neuen Plastikspitzen** in die entsprechenden Wells geben.
3. **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.
4. **60 Minuten** bei Raumtemperatur inkubieren.
5. Den Inhalt der Wells kräftig ausschütteln. Wells **5-mal** mit verdünnter *Wash Solution* (400 µL) waschen. Verbleibende Flüssigkeit durch Ausklopfen der Wells auf saugfähigem Papier entfernen.
Achtung: Die Sensitivität und Präzision dieses Assays wird erheblich beeinflusst von der korrekten Durchführung des Waschschruttes!
6. **100 µL Substrate Solution** in jedes Well geben.
7. **15 Minuten** bei Raumtemperatur inkubieren.
8. Die enzymatische Reaktion durch Zugabe von **50 µL Stop Solution** in jedes Well abstoppen.
9. 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 pg/mL)	2,24
Standard 1 (15 pg/mL)	2,04
Standard 2 (30 pg/mL)	1,88
Standard 3 (90 pg/mL)	1,48
Standard 4 (270 pg/mL)	1,05
Standard 5 (810 pg/mL)	0,68
Standard 6 (2400 pg/mL)	0,43

7 ERWARTETE WERTE

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

In einer Studie wurden die Proben von gesunden Erwachsenen untersucht. Dabei ergaben sich mit dem DEMEDITEC Estrone ELISA folgende Werte:

Population	n	Bereich (min. - max.) (pg/mL)	Mittelwert (pg/mL)	2,5. - 97,5. Perzentile (pg/mL)	Median (pg/mL)
Männer	60	9,0 - 79,1	47,6	15,6 - 77,0	47,9
Frauen					
prämenopausal	110	11,2 - 338,3	69,4	15,5 - 220,2	52,8
postmenopausal	91	9,4 - 59,6	28,6	11,0 - 54,5	27,4

Diese Ergebnisse stimmen gut mit publizierten Daten überein (8, 9).

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

In diesem Fall überprüfen Sie bitte die folgenden Bereiche: Pipetten und Zeitnehmer, Photometer, Verfallsdatum der Reagenzien, Lagerungs- und Inkubationsbedingungen, Absaug- und Waschmethode.

Sollten Sie nach Überprüfung der vorgenannten Bereiche keinen Fehler erkannt haben, setzen Sie sich bitte mit Ihrem Lieferanten oder direkt mit der Firma DEMEDITEC in Verbindung.

9 ASSAY-CHARACTERISTIKA

9.1 Messbereich

Der Messbereich des Testes liegt zwischen 8,1 - 2400 pg/mL.

9.2 Spezifität der Antikörper (Kreuzreaktivität)

Die Daten entnehmen Sie bitte der ausführlichen englischen Arbeitsanleitung.

9.3 Sensitivität

Die analytische Sensitivität, definiert als Mittelwert minus der zweifachen Standardabweichung des *Standards 0* (n = 20), beträgt 8,1 pg/mL.

Die Nachweisgrenze (LoD) ist 14,6 pg/mL.

Die Quantifizierungsgrenze (LoQ) ist 15,8 pg/mL.

Die Daten zu:

9.4 Reproduzierbarkeit (Präzision)

9.5 Wiederfindung

9.6 Linearität

9.7 Methodenvergleich

entnehmen Sie bitte der ausführlichen englischen Arbeitsanleitung.

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

Hämoglobin (bis zu 4 mg/mL), Bilirubin (bis zu 0.5 mg/mL) und Triglyceride (bis zu 30 mg/mL) haben keinen Einfluss auf das Testergebnis.

10.2 Beeinflussung durch Medikamente

Uns sind bislang keine Stoffe (Medikamente) bekannt geworden, deren Einnahme die Messung des Estron-Gehaltes der Probe beeinflussen würde.

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.

1 INTRODUZIONE

Il test immuno-enzimatico **DEMEDIATEC Estrone ELISA** contiene materiale per la determinazione quantitativa di estrone in siero e EDTA plasma.

Questo test kit è adatto soltanto per l'uso diagnostico.

2 PRINCIPIO DEL TEST

Il test Estrone ELISA è un test immunologico in fase solida con enzimi ancorati su un substrato (ELISA), basato sul principio del legame competitivo.

I micropozzetti sono ricoperti con un anticorpo policlonale diretto contro un unico sito antigenico della molecola estrone. Estrone endogeno/a di un campione compete con il estrone coniugato alla perossidasi di rafano per il sito di legame sull'anticorpo ancorato nel micropozzo. Dopo l'incubazione il coniugato non legato è lavato via.

La quantità della perossidasi coniugata legata è inversamente proporzionale alla concentrazione di estrone nel campione. Dopo l'aggiunta della soluzione substrato l'intensità del colore sviluppato è inversamente proporzionale alla concentrazione di estrone nel campione del paziente.

3 PRECAUZIONI

- Questo kit è adatto soltanto per l'uso diagnostico in vitro.
- Si prega di usare la versione valida dell'insero del pacco a disposizione con il kit.
- Informazioni su sostanze pericolose contenute nel kit sono riportate nel regolamento di sicurezza.
- Tutti i componenti del kit che contengono siero o plasma umano sono controllati e confermati negativi per la presenza di HIV I/II, HbsAg e HCV con metodi conformi alle norme FDA. Ciononostante tutti i componenti dovrebbero essere trattati come potenziali sostanze nocive nella manutenzione e nello smaltimento.
- Il contatto con la *Stop Solution* dovrebbe essere evitato perché contiene 0.5 M H₂SO₄. L'acido solforico può provocare irritazioni cutanee e ustioni.
- Non pipettare con la bocca ed evitare il contatto con componenti del kit con la pelle o con le mucose.
- Nelle aree in cui il test viene utilizzato non fumare, mangiare, bere o fare uso di prodotti cosmetici.
- Nella manutenzione dei campioni o reagenti del kit portare guanti di latex monouso. La contaminazione dei reagenti o dei campioni con microbi può dare risultati falsi.
- L'utilizzo dovrebbe avvenire secondo regole che seguono le rispettive norme di sicurezza nazionali sulle sostanze nocive.
- Non utilizzare i reagenti dopo la scadenza indicata sul kit.
- Ogni indicazione sulla quantità indicata del protocollo del kit deve essere accuratamente seguito. Risultati ottimali possono essere ottenuti soltanto con l'uso di pipette calibrate e spettrofotometro calibrato.
- Componenti del kit con numeri di lotto diversi non devono essere combinati. È consigliabile di non utilizzare pozzetti di piastre diversi, anche se si tratta dello stesso lotto. I kit potrebbero essere stati immagazzinati o spediti a condizioni diverse, cosicché le caratteristiche di legame potrebbero divergere leggermente.
- I componenti chimici e reagenti preparati o già utilizzati devono essere trattati e smaltiti secondo le norme di sicurezza nazionali sulle sostanze nocive.
- I regolamenti di sicurezza di questo prodotto possono essere richiesti direttamente dalla ditta Demeditec Diagnostics GmbH.

4 COMPONENTI DEL KIT

4.1 Contenuto del kit

1. **SORB MT Microtiterwells** (Micropozzetti), 12 x 8 file (separatamente staccabili), 96 pozzetti; Pozzetti ricoperti con l'anti-estrone anticorpo (policlonale)
2. **CAL 0 – 6 Standard (Standard 0-6)**, 7 flaconi, 1 mL, pronto all'uso
Concentrazioni: 0 - 15 - 30 - 90 - 270 - 810 - 2400 pg/mL. Conversione: $\text{pg/mL} \times 3,69 = \text{pmol/L}$
Gli standard sono standardizzati contro il seguente materiale di riferimento: code E-075 (Cerilliant). Contiene conservante senza mercurio.
3. **CONTROL low & high Control Low & High** (Controllo), 2 flaconi, 1 mL, pronto all'uso; I valori dei controlli sono indicati sull'etichetta dei flaconi o sulla descrizione QC. Contiene conservante senza mercurio.
4. **ENZ CONJ Enzyme Conjugate** (Tracciante enzimatico), 1 flacone, 14 mL, pronto all'uso; Estrone coniugato alla perossidasi di rafano; Contiene conservante senza mercurio
5. **SUB TMB Substrate Solution** (Soluzione di substrato), 1 flacone, 14 mL, pronto all'uso; TMB (benzidine tetrametilico).
6. **STOP SOLN Stop Solution** (Soluzione d'arresto), 1 flacone, 14 mL, pronto all'uso; contiene 0.5 M H₂SO₄. Evitare il contatto con la soluzione d'arresto. Può causare irritazioni cutanee e ustioni.
7. **WASH SOLN 40x Wash Solution** (Soluzione di lavaggio), 1 flacone, 30 mL (concentrata 40X); vedi „preparazione dei reagenti“.

Nota: Ulteriore *Standard 0* per la diluizione dei campioni può essere richiesto alla ditta.

4.2 Materiali richiesti ma non contenuti nel kit

- Uno spettrofotometro calibrato per micropozzetti (450 ± 10 nm)
- Micropipette calibrate di precisione a volume variabile.
- Carta assorbente.
- Acqua distillata.

4.3 Magazzinaggio e stabilità del kit

A 2 °C - 8 °C i reagenti non aperti rimangono reattivi fino alla data di scadenza indicata. Non usare reagenti oltre questa data. Tutti i reagenti aperti devono essere magazzinati a 2 °C - 8 °C. I micropozzetti devono essere magazzinati a 2 °C - 8 °C. Una volta aperti i pacchi, questi devono essere richiusi accuratamente. Test kits aperti rimangono attivi per due mesi se magazzinati alle condizioni sopra descritte.

4.4 Preparazione dei reagenti

Prima dell'uso portare tutti i reagenti e il numero necessario di pozzetti a temperatura ambiente (21 °C - 24 °C).

Wash Solution

Diluire 30 mL *Wash Solution* concentrata con 1170 mL di acqua deionizzata fino ad un volume finale di 1200 mL. *La soluzione di lavaggio diluita è stabile per 2 settimane a temperatura ambiente.*

4.5 Smaltimento del kit

Lo smaltimento del kit deve avvenire secondo le regole a norma di legge. Informazioni particolareggiate per questo prodotto si trovano nel regolamento di sicurezza, capitolo 13.

4.6 Test kits danneggiati

Nel caso di gravi danneggiamenti del kit o dei suoi componenti deve avvenire una dichiarazione scritta alla ditta DEMEDITEC, al più tardi una settimana dopo il ricevimento del kit. Componenti danneggiati non dovrebbero essere utilizzati per il test. Questi componenti devono essere magazzinati fino alla soluzione del problema. Dopo di che essi devono essere smaltiti secondo le norme ufficiali.

5 CAMPIONI

Siero o EDTA plasma può essere usato per questo test.

Non usare campioni emolitici, itterici o lipemici.

Attenzione: Se i campioni contengono sodio azide non devono essere utilizzati per questo test.

5.1 Collezione dei campioni

Siero:

Collezionare sangue tramite puntura venale (p.es. Sarstedt Monovette per siero), far coagulare e separare il siero centrifugando a temperatura ambiente.

Non centrifugare prima che la coagulazione sia completata. Campioni di pazienti con una terapia anticoagulante possono richiedere più tempo per la coagulazione.

Plasma:

Il sangue dovrebbe essere collezionato in tubetti da centrifuga contenenti un anticoagulante (p. es. Sarstedt Monovette con un'adeguata preparazione per il plasma) e centrifugando immediatamente dopo la puntura.

5.2 Magazzinaggio dei campioni

I campioni dovrebbero essere magazzinati ben chiusi fino a 4 giorni a 2 °C - 8 °C.

Campioni magazzinati per un periodo più lungo (fino a due mesi) dovrebbero essere congelati solo una volta a -20 °C prima dell'analisi. Congelare soltanto una volta. Invertire campioni scongelati alcune volte prima dell'uso.

5.3 Diluizione dei campioni

Se in un campione di siero viene trovata una concentrazione oltre lo standard più alto, questo campione può essere diluito con lo *Standard 0* e nuovamente determinato.

Della diluizione deve essere però tenuto conto.

Esempio:

a) diluizione 1:10: 10 µL campione + 90 µL *Standard 0* (agitare bene)

b) diluizione 1:100: 10 µL della diluizione a) + 90 µL *Standard 0* (agitare bene)

6 ATTUAZIONE DEL TEST

6.1 Indicazioni generali

- Tutti i reagenti e i campioni devono essere portati a temperatura ambiente e ben mescolati prima dell'uso. Evitare la formazione di schiume.
- **Il test non deve essere eseguito sopra di una temperatura di 24 °C.**
- Una volta iniziato il procedimento del test, questo deve essere portato alla fine senza interruzione.
- Per ogni componente, standard, controllo o campione è necessario utilizzare una nuova punta monouso per evitare reazioni incrociate.
- La densità ottica dipende dal tempo d'incubazione e dalla temperatura. Perciò si rende necessario di preparare tutti i reagenti, di aprire i tappi dei flaconi e di appostare tutti i pozzetti nelle appropriate posizioni. Soltanto una tale preparazione garantisce gli stessi tempi per ogni processo di pipettamento.
- Come regola generale vale che la reazione enzimatica si svolge linearmente proporzionale con il tempo e con la temperatura.

6.2 Esecuzione del test

Ogni analisi deve includere una curva standard.

1. Fissare i pozzetti necessari sul supporto.
2. Pipettare **25 µL** di ogni **Standard, Control e campione** nei pozzetti, cambiando ogni volta la punta monouso.
3. Pipettare **100 µL Enzyme Conjugate** in ogni pozzetto.
Agitare bene per 10 secondi. È molto importante raggiungere un completo mescolamento.
4. Incubare per **60 minuti** a temperatura ambiente.
5. Rovesciare la piastra per vuotare i pozzetti.
Lavare i pozzetti **5 volte** con *Wash Solution* diluita (400 µL in ogni pozzetto). Rimuovere le gocce d'acqua rimanenti rivoltando la piastra su carta assorbente.

Importante:

La sensibilità e la precisazione di questo kit sono fortemente influenzate dal corretto esecutione del lavaggio!

6. Aggiungere **100 µL** della **Substrate Solution** ad ogni pozzetto.
7. Incubare per **15 minuti** a temperatura ambiente.
8. Fermare la reazione enzimatica aggiungendo **50 µL** della **Stop Solution** ad ogni pozzetto.
9. Determinare la densità ottica a **450 ± 10 nm** con un fotometro per microtiter-piastre **entro 10 minuti** dopo l'aggiunta della *Stop Solution*.

6.3 Rilevamento dei risultati

1. Determinare i valori medi della densità ottica per ogni set di standard, controlli e campioni.
2. Costruire una curva standard: riportare i valori medi della densità ottica (OD) di ogni standard contro la rispettiva concentrazione dove i valori delle OD si devono trovare sull'asse verticale (Y) e le concentrazioni sull'asse orizzontale (X).
3. Utilizzando il valore medio delle OD per ogni campione si determina la rispettiva concentrazione dalla curva standard.
4. Metodo automatico: I valori riportati in queste istruzioni per l'uso sono stati determinati tramite l'equazione a 4 parametri. (I metodi preferiti sono 4 Parameter Rodbard oppure 4 Parameter Marquardt.) Altri funzioni usati per l'elaborazione dei dati possono dare risultati leggermente differenti.
5. La concentrazione dei campioni può essere determinata direttamente dalla curva standard. Campioni con una concentrazione più elevata dello standard più concentrato devono essere diluiti. Di questo fattore di diluizione deve essere tenuto conto per il calcolo della concentrazione.

6.3.1 Esempio di una curva standard tipica

I seguenti dati sono a scopo dimostrativo soltanto e **non possono** sostituire i dati generati dall'esecuzione del test.

Standard	Densità ottiche (450 nm)
Standard 0 (0 pg/mL)	2,24
Standard 1 (15 pg/mL)	2,04
Standard 2 (30 pg/mL)	1,88
Standard 3 (90 pg/mL)	1,48
Standard 4 (270 pg/mL)	1,05
Standard 5 (810 pg/mL)	0,68
Standard 6 (2400 pg/mL)	0,43

7 VALORI NORMALI

È consigliabile che ogni laboratorio determini i propri valori normali e anormali.

In uno studio condotto su persone apparentemente sane usando il test DEMEDITEC Estrone ELISA i seguenti valori sono stati ottenuti:

Popolazione	n	Intervallo (min. - max.) (pg/mL)	Media (pg/mL)	2,5. - 97,5. percentile (pg/mL)	Mediano (pg/mL)
Uomini	60	9,0 - 79,1	47,6	15,6 - 77,0	47,9
Donne prima della menopausa	110	11,2 - 338,3	69,4	15,5 - 220,2	52,8
dopo la menopausa	91	9,4 - 59,6	28,6	11,0 - 54,5	27,4

Questi risultati corrispondono bene con il campo di riferimento pubblicato (8, 9).

8 CONTROLLO QUALITÀ

È consigliabile utilizzare i campioni controllo secondo le norme di legge. Attraverso l'utilizzo dei campioni controllo si può raggiungere una verifica dei risultati giorno per giorno. Dovrebbero essere adoperati campioni controllo sia con un livello normale sia con uno patologico.

Le referenze con i rispettivi risultati del laboratorio QC sono elencati nel QC certificato, che è allegato al kit. I valori riportati nel QC certificato si riferiscono al lotto del kit attuale e dovrebbero essere utilizzati per un raffronto dei risultati.

Appropriati metodi statistici per l'analisi dei valori controllo e delle rappresentazioni grafici dovrebbero essere adoperati. Nel caso che i risultati del test non combaciano con il campo di accettazione indicato dal materiale di controllo, i risultati dei pazienti devono essere considerati invalidi. In questo caso si prega di controllare i seguenti fattori d'errore: pipette, cronometri, fotometro, data di scadenza dei reagenti, condizione di magazzinaggio e d'incubazione, metodi di aspirazione e di lavaggio.

Se dopo il controllo dei suddetti fattori non è rilevabile alcun errore, si prega di contattare il fornitore o direttamente la ditta DEMEDITEC.

9 CARATTERISTICHE DEL TEST

9.1 Assay Dynamic Range

Le concentrazioni determinabili con questo test stanno tra 8,1 - 2400 pg/mL.

9.2 Specificità degli anticorpi (reazioni ad incrocio)

Per dettagli più precisi consultare la metodica in inglese.

9.3 Sensitività analitica

La sensitività analitica è stata calcolata dai valori medi meno due deviazioni standard di venti (20) repliche dello 8,1 pg/mL.

Il limite di rilevabilità (LoD) è 14,6 pg/mL.

Il limite di quantificazione (LoQ) è 15,8 pg/mL.

Dati dettagliati su

9.4 Precisione

9.5 Recupero

9.6 Linearità

9.7 Comparazione metodica

si prega di consultare le dettagliate istruzioni per l'uso in inglese.

10 LIMITAZIONE DEL TEST

Risultati affidabili e riproducibili saranno ottenuti quando il procedimento del test è seguito con una comprensione completa delle istruzioni all'uso e seguendo una buona pratica di laboratorio (GLP). Ogni manutenzione impropria dei campioni o modificazione al saggio può influenzare i risultati.

10.1 Sostanze interferenti

Emoglobina (fino a 4 mg/mL), bilirubina (fino a 0.5 mg/mL) e trigliceridi (fino a 30 mg/mL) non influenzano i risultati di questo test.

10.2 Droghe interferenti

Fino ad oggi nessuna sostanza (farmaco) è conosciuta a noi che abbia influenzato la determinazione di estrone nel campione.

10.3 Effetto Hook di alti dosaggi

Nessun effetto gancio (effetto hook) è stato osservato in questo test.

11 ASPETTI LEGALI

11.1 Affidabilità dei risultati

Il test deve essere eseguito esattamente secondo il protocollo dato dal produttore. Inoltre l'utente deve seguire le regole del GLP (Good Laboratory Practice) o eventualmente altre regole comportamentali o disposizioni legali. Questo vale soprattutto per l'uso delle referenze. È molto importante utilizzare un numero appropriato di referenze in parallelo ai campioni test per poter controllare l'esattezza e la precisione del test.

I risultati del test sono validi soltanto se tutte le referenze cadono nei margini prestabiliti e se tutti gli altri parametri del test soddisfano la specificazione per questo test. Se esistono dubbi o domande su questi risultati, si prega di contattare la ditta DEMEDITEC.

11.2 Conseguenze terapeutiche

Soltanto sulla base dei risultati dei laboratori non dovrebbero essere intraprese delle conseguenze terapeutiche di alcun tipo, anche se i risultati del test sono d'accordo con gli aspetti articolati nel punto 11.1. Ogni risultato di laboratorio è soltanto una parte di un quadro clinico completo di un paziente. Soltanto in casi in cui i risultati di un test del laboratorio si accordano con il quadro clinico dell'ammalato, si possono intraprendere delle conseguenze terapeutiche.

Il risultato del test da solo non è base sufficiente per lo stabilimento di una terapia.

11.3 Responsabilità legali












Ogni cambiamento del protocollo del test e/o lo scambio o il mescolamento di componenti provenienti da cariche diverse possono influenzare negativamente i risultati e compromettere la validità del test. Questi cambiamenti e/o scambi annullano ogni diritto al risarcimento.

Si respingano inoltre tutti i richiami risultanti da interpretazioni sbagliate da parte dell'utente secondo il paragrafo 11.2. Nel caso di reclamazione, la garanzia del produttore è limitato al valore massimo del test kit. Ogni danno provocato durante il trasporto del kit non sottostà alla responsabilità del produttore.

12 REFERENCES / LITERATURE

1. Resnik R, Killam AP, Battaglia FC et al: The stimulation of uterine blood flow by various estrogens. *Endocrinology*. 1974; 94:1192,
2. Fayman C, Winter JSD, Reyes FI. Patterns of gonadotropins and gonadal steroids throughout life. *Clin. Obstet. Gynecol*. 1976; 3:467-483.
3. Baird DT, Fraser IS. Blood production and ovarian secretion rates of estradiol-17 β and estrone in women throughout the menstrual cycle. *J Clin Endocrinol. Metab*. 1974; 38:1009-1017.
4. Lindbert BS, Johansson EDB, Nilsson BA: Plasma levels of non-conjugated oestrone, oestradiol-17b and oestriol during uncomplicated pregnancy. *Acta Obstet Gynecol Scand*. 1974; 32:21.
5. Drafta D, Schindler AE, Stroe EW, Neacsu E. Age-related changes of plasma steroids in normal adult males. *J Steroid Biochem*. 1982; 17:683-687.
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.
7. Kushnir MM et al. High-sensitivity tandem mass spectrometry assay for serum estrone and estradiol. *Am J Clin Pathol*. 2008; 129:530-9.
8. Jasuja GK et al. Age trends in estradiol and estrone levels measured using liquid chromatography tandem mass spectrometry in community-dwelling men of the Framingham Heart Study. *J Gerontol A Biol Sci Med Sci*. 2013; 68:733-40.
9. Kaaks R, Lukanova A, Kurzer MS. Obesity, endogenous hormones, and endometrial cancer risk: a synthetic review. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev*. 2002; 11(12):1531-43.
10. Kuiper GG, et al. Comparison of the ligand binding specificity and transcript tissue distribution of estrogen receptors alpha and beta. *Endocrinology*. 1997; 138:863–870.

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	Usage Diagnostic in vitro	Diagnóstico in vitro	Per uso Diagnostica in vitro
	For research use only	Nur für Forschungszwecke	Seulement dans le cadre de recherches	Sólo para uso en investigación	Solo a scopo di ricerca
	Catalogue number	Katalog-Nr.	Référence	Número de catálogo	No. di Cat.
	Lot. No. / Batch code	Chargen-Nr.	No. de lot	Número de lote	Lotto no
	Contains sufficient for <n> tests/	Ausreichend für "n" Ansätze	Contenu suffisant pour "n" tests	Contenido suficiente para <n> ensayos	Contenuto sufficiente per "n" saggi
	Note warnings and precautions	Warnhinweise und Vorsichtsmaßnahmen beachten	Avertissements et mesures de précaution font attention	Tiene en cuenta advertencias y precauciones	Annoti avvisi e le precauzioni
	Storage Temperature	Lagerungstemperatur	Temperature de conservation	Temperatura de conservacion	Temperatura di conservazione
	Expiration Date	Mindesthaltbarkeitsdatum	Date limite d'utilisation	Fecha de caducidad	Data di scadenza
	Legal Manufacturer	Hersteller	Fabricant	Fabricante	Fabbricante
<i>Distributed by</i>	Distributor	Vertreiber	Distributeur	Distribuidor	Distributore



Distribuito in ITALIA da
Li StarFish S.r.l.
 Via Cavour, 35
 20063 Cernusco S/N (MI)
 telefono 02-92150794
 fax 02-92157285
 info@listarfish.it
 www.listarfish.it