



## User's Manual



# Salivary Estrone ELISA

IVD

REF **SLV-5228**

$\Sigma$  **96**



Legal Manufacturer:

**DRG**

DRG Instruments GmbH, Germany

Division of DRG International, Inc

Frauenbergstr. 18, D-35039 Marburg

Telefon: +49 (0)6421-17000 Fax: +49-(0)6421-1700 50

Internet: [www.drg-diagnostics.de](http://www.drg-diagnostics.de)

E-mail: [drg@drg-diagnostics.de](mailto:drg@drg-diagnostics.de)

Distributed by:



---

**Contents / Inhaltsverzeichnis / Contenuti / Contenido / Contenu**

1	INTRODUCTION.....	2
2	PRINCIPLE OF THE TEST .....	2
3	WARNINGS AND PRECAUTIONS .....	3
4	REAGENTS .....	4
5	SPECIMEN COLLECTION AND PREPARATION.....	5
6	ASSAY PROCEDURE .....	6
7	EXPECTED NORMAL VALUES.....	7
8	QUALITY CONTROL .....	7
9	PERFORMANCE CHARACTERISTICS.....	8
10	LIMITATIONS OF USE .....	9
11	LEGAL ASPECTS .....	10
12	REFERENCES / LITERATURE.....	10

1	EINLEITUNG.....	11
2	TESTPRINZIP.....	11
3	VORSICHTSMAßNAHMEN .....	11
4	BESTANDTEILE DES KITS .....	12
5	PROBENVORBEREITUNG .....	13
6	TESTDURCHFÜHRUNG .....	14
7	ERWARTETE WERTE .....	15
8	QUALITÄTS-KONTROLLE .....	15
9	ASSAY CHARACTERISTIKA.....	16
10	GRENZEN DES TESTS.....	16
11	RECHTLICHE GRUNDLAGEN .....	17
12	REFERENZEN / LITERATUR .....	17

1	INTRODUCCIÓN .....	18
2	FUNDAMENTO DEL ENSAYO .....	18
3	PRECAUCIONES.....	18
4	COMPONENTES DEL KIT.....	19
5	MUESTRAS .....	20
6	PROCEDIMIENTO DE ENSAYO .....	21
7	VALORES ESPERADOS .....	22
8	CONTROL DE CALIDAD .....	22
9	CARACTERÍSTICAS DEL ENSAYO .....	23
10	LIMITACIONES DE USO .....	23
11	ASPECTOS LEGALES .....	24
12	REFERENCIAS / BIBLIOGRAFÍA .....	24

	SYMBOLS USED WITH DRG ELISAS .....	25
--	------------------------------------	----

## 1 INTRODUCTION

### 1.1 Intended Use

The **DRG 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. to 6. 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 the 6. to 10. week 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 DRG Salivary 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 streptavidin and biotinylated Estrone molecules.

Endogenous Estrone of a patient sample competes with this immobilized Estrone for binding sites of a HRP-conjugated sheep antibody directed towards an antigenic site of estrone.

After incubation the unbound antibody 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 the package insert 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 to 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 – 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.
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 microtiter plate 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 H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>. 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 Material Safety Data Sheets. Material Safety Data Sheets for this product are available upon request directly from DRG.

## 4 REAGENTS

### 4.1 Reagents provided

1. **Microtiterwells**, 12 x 8 (break apart) strips, 96 wells;  
Wells coated with biotinylated Estrone.
2. **Standard (Standard 0-6)**, 7 vials, 1 mL each, ready to use;  
Concentrations: 0 – 10.0 – 20.0 – 30.0 – 60.0 – 120.0 – 300.0 pg/mL  
Conversion: pg/mL x 3.69 = pmol/L  
Contain non-mercury preservative.
3. **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. **Enzyme Conjugate**, 1 vial, 14 mL, ready to use,  
Sheep anti Estrone antibody conjugated to horseradish peroxidase;  
Contains non-mercury preservative.
5. **Substrate Solution**, 1 vial, 25 mL, ready to use,  
Tetramethylbenzidine (TMB).
6. **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.
7. **Wash Solution**, 1 vial, 30 mL (40X concentrated),  
see „Preparation of Reagents“.

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

### 4.2 Materials required but not provided

- A microtiter plate calibrated reader (450 ± 10 nm) (e.g. the DRG Instruments Microtiter Plate Reader).
- Calibrated variable precision micropipettes.
- Absorbent paper.
- Distilled or deionized water
- Timer
- Scale paper or semi-logarithmic graph paper or software for data reduction

### 4.3 Storage Conditions

When stored at 2 °C to 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 to 8 °C. Microtiter wells must be stored at 2 °C to 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 Material Safety Data Sheet.

### 4.6 Damaged Test Kits

In case of any severe damage to the test kit or components, DRG 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

Eating, drinking, chewing gums or brushing teeth should be avoided for 30 minutes before sampling. Otherwise, it is recommended to rinse mouth thoroughly with cold water 5 minutes prior to sampling. Do not collect samples when oral diseases, inflammation or lesions exist (blood contamination).

If there is visible blood contamination the patient specimen, it should be discarded, rinse the sampling device with water, wait for 10 minutes and take a new sample.

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

### 5.1 Specimen Collection

Saliva samples should be collected only using special saliva sampling devices (e.g. SALI TUBES 100 REF SLV-4158, available from DRG).

Due to the cyclic secretion pattern of steroid hormones it is important to care for a proper timing of the sampling.

In order to avoid arbitrary results we recommend that 5 samples always be taken within a period of 2 – 3 hours (*multiple sampling*) preferably before a meal.

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

### 5.2 Specimen Storage and Preparation

Saliva samples in general are stable at ambient temperature for several days.

Therefore mailing of such samples by ordinary mail without cooling will not create a problem.

The saliva samples may be stored at 2 °C to 8 °C up to one week, and should be frozen at –20 °C for longer periods; repeated thawing and freezing is no problem.

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

Upon arrival of the samples in the lab the samples have to stay in the deep freeze at least overnight. Next morning the frozen samples are warmed up to room temperature and mixed carefully.

Then the samples have to be centrifuged for 5 to 10 minutes (at 3000 - 2000 x g).

Now the clear colorless supernatant is easy to pipette.

If a set of multiple samples is to be tested, the lab (after at least one freezing, thawing, and centrifugation cycle) has to mix the 5 single samples in a separate sampling device and perform the testing from this 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. 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, on a plate shaker (~ 600 rpm).
5. Briskly shake out the contents of the wells.  
Rinse the wells **4 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 **200 µL of Substrate Solution** to each well.
7. Incubate for **15 minutes** at room temperature.
8. Stop the enzymatic reaction by adding **100 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 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 IFU have been calculated automatically using a 4 PL (4 Parameter Logistics) curve fit. 4 Parameter Logistics is the preferred method. 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 > 300.0 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)	2.78
Standard 1 (10.0 pg/mL)	2.71
Standard 2 (20.0 pg/mL)	2.54
Standard 3 (30.0 pg/mL)	2.04
Standard 4 (60.0 pg/mL)	1.31
Standard 5 (120.0 pg/mL)	0.58
Standard 6 (300.0 pg/mL)	0.22

## 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 DRG Salivary Estrone ELISA the following values are observed:

Population	Valid N	5% Percentile (pg/mL)	95% Percentile (pg/mL)
Females	52	3.16	26.28

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 DRG directly.



## 9 PERFORMANCE CHARACTERISTICS

### 9.1 Assay Dynamic Range

The range of the assay is between 4,7 pg/mL – 300 pg/mL.

### 9.2 Specificity of Antibodies (Cross Reactivity)

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

Substance	Cross reactivity (%)
Progesterone	0.0
Testosterone	0.1
17-OHP	0.3
DHEA	2.7
Cortisol	0.0
Estradiol	13.5

### 9.3 Sensitivity

The analytical sensitivity of the DRG ELISA was calculated by subtracting 2 standard deviations from the mean of 20 replicate analyses of the Standard 0 (S0) and was found to be 4,7 pg/mL.

### 9.4 Reproducibility

#### 9.4.1 Intra Assay

The within assay variability is shown below:

Sample	n	Mean (pg/mL)	CV (%)
1	20	52.1	9.7
2	20	169.2	7.0
3	20	177.6	2.7

#### 9.4.2 Inter Assay

The between assay variability is shown below:

Sample	n	Mean (pg/mL)	CV (%)
1	40	156.4	13.9
2	40	100.3	14.9
3	40	111.6	11.5
4	40	136.8	8.0

### 9.5 Recovery

Samples have been spiked by adding Estrone solutions with known concentrations

	Sample 1	Sample 2	Sample 3
Concentration [pg/mL]	7.8	0.8	171.0
Average Recovery [%]	98.6	93.7	93.6
Range of Recovery [%]	from	93.2	86.8
	to	102.2	98.9
		89.3	100.2

## 9.6 Linearity

	Sample 1	Sample 2	Sample 3	
<b>Concentration [pg/mL]</b>	105.0	211.0	265.0	
<b>Average Recovery [%]</b>	101.9	95.9	108.0	
<b>Range of Recovery [%]</b>	from	91.4	85.3	97.8
	to	114.3	106.2	114.7

## 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.

The patient should not eat, drink, chew gum or brush teeth for 30 minutes before sampling. Otherwise rinse mouth thoroughly with cold water 5 min prior to sample collection. Do not collect samples when oral diseases, inflammation or lesions exist (blood contamination)

### 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 DRG.

### 11.2 Therapeutic Consequences

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

Only in cases where the laboratory results are in acceptable agreement with the overall clinical picture of the patient should therapeutic consequences be derived.

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

### 11.3 Liability

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

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

## 12 REFERENCES / 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-17b 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.

## 1 EINLEITUNG

Der **DRG Salivary Estrone ELISA** wird zur quantitativen Bestimmung von Estron in Speichel eingesetzt.

**Nur für In-vitro Diagnostik.**

## 2 TESTPRINZIP

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

Die Wells der Mikrotiterplatten sind beschichtet mit Streptavidin und Biotin-markierten Estronmolekülen.

In der Patientenprobe enthaltenes endogenes Estron konkurriert mit diesem immobilisierten Estron um die freien Bindungsstellen des im Enzymkonjugat enthaltenen Anti-Estron-Antikörpers. Dieser Antikörper ist mit Meerrettichperoxidase konjugiert.

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, Arbeitsanleitung verwenden.
- Informationen zu im Kit enthaltenen gefährlichen Substanzen entnehmen Sie bitte dem Materialsicherheitsdatenblatt.
- 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.
- Materialsicherheitsdatenblätter für dieses Produkt sind auf Anfrage direkt von der Firma DRG Instruments GmbH erhältlich. Die Materialsicherheitsdatenblätter entsprechen den Verordnungen der EU-Richtlinie 91/155 EC.

## 4 BESTANDTEILE DES KITS

### 4.1 Kitinhalt

1. **Microtiterwells**, 96 Wells, 12 x 8 Wells (einzeln brechbar);  
Mit biotinyliertem Estron beschichtet.
2. **Standard (Standard 0-6)**, 7 Fläschchen, je 1 mL, gebrauchsfertig;  
Konzentrationen: 0 – 10.0 – 20.0 – 30.0 – 60.0 – 120.0 – 300.0 pg/mL  
Umrechnungsfaktor: pg/mL x 3.69 = pmol/L  
Enthält quecksilberfreies Konservierungsmittel.
3. **Control Low & High** (Kontrolle), 2 Fläschchen, 1 mL; gebrauchsfertig  
Kontrollwerte und –bereiche entnehmen Sie bitte dem Fläschchenetikett oder dem QC-Datenblatt.  
Enthält quecksilberfreies Konservierungsmittel.
4. **Enzyme Conjugate** (Enzymkonjugat), 1 Fläschchen, 14 mL, gebrauchsfertig;  
Schaf-Anti-Estron-Antikörper mit Meerrettichperoxidase konjugiert.  
Enthält quecksilberfreies Konservierungsmittel.
5. **Substrate Solution** (Substratlösung), 1 Fläschchen, 25 mL, gebrauchsfertig;  
Substratlösung TMB.
6. **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.
7. **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), (z.B. das DRG Instruments Mikrotiterplattenlesegerät)
- Kalibrierte variable Präzisions-Mikropipette
- Saugfähiges Papier
- Destilliertes Wasser

### 4.3 Lagerung und Haltbarkeit des Kits

Die ungeöffneten Reagenzien behalten bei Lagerung um 2 °C bis 8 °C ihre Reaktivität bis zum Verfallsdatum. Nach dem Verfallsdatum die Reagenzien nicht mehr verwenden. Nach dem Öffnen sollten alle Reagenzien bei 2 °C bis 8 °C gelagert werden. Die Mikrotiterwells sollten bei 2 °C bis 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 Material Sicherheitsdatenblatt, Kapitel 13.

### 4.6 Beschädigte Testkits

Im Falle einer starken Beschädigung des Testkits oder der Komponenten muss die Firma DRG 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 in diesem Assay nicht verwendet werden.

Die Speichelproben sollten komplett farblos sein. Selbst die geringste Rotfärbung weist auf eine Kontamination mit Blut hin. Eine solche Kontamination führt fälschlicher Weise zu erhöhten Werten.

Im Falle einer sichtbaren Kontamination mit Blut sollte der Patient die Probe verwerfen, das Probenbesteck mit Wasser ausspülen und nach 10 Minuten eine neue Probe entnehmen.

### 5.1 Probenentnahme

Wir empfehlen Speichelproben mit einem kommerziell verfügbaren Besteck zu sammeln (z.B. SALI TUBES 100 SLV-4158 erhältlich bei DRG).

Da die Progesteron-Sekretion im Speichel, wie auch im Serum, ein deutliches episodisches Sekretionsmuster zeigt, ist es wichtig auf den richtigen Zeitpunkt der Probenentnahme zu achten. Um arbiträre (willkürliche) Ergebnisse zu vermeiden, empfehlen wir 5 Proben in einem Zeitraum von 2 bis 3 Stunden zu sammeln (*mehrfache Probeentnahme*). Dies sollte vorzugsweise vor einer Mahlzeit durchgeführt werden.

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

### 5.2 Probenaufbewahrung und -vorbereitung

Speichelproben sind normalerweise bei Raumtemperatur mehrere Tage stabil. Aus diesem Grund stellt das Versenden solcher Proben mit normalem Versand ohne Kühlung kein Problem dar.

Die Proben können bis zu einer Woche bei 4 °C gelagert werden. Trotzdem sollten Proben so schnell wie möglich bei -20 °C eingefroren werden. Mehrfaches Auftauen und erneutes Einfrieren ist möglich.

Um Muzine aus der Probe zu entfernen, muss jede Probe mindestens einmal eingefroren, aufgetaut und anschließend zentrifugiert werden.

Nach der Ankunft im Labor muss eine Probe mindestens über Nacht tiefgekühlt gelagert werden. Am nächsten Morgen wird die eingefrorene Probe auf Raumtemperatur gebracht und vorsichtig gemischt. Dann muss die Probe 5 bis 10 Minuten zentrifugiert werden (bei 3000 - 2000 x g).

Der klare, farblose Überstand kann jetzt einfach pipettiert werden.

Auch bei einer leichten rötlichen Verfärbung, sollte die Probe verworfen werden, andernfalls kommt es meistens zu falsch hohen Werten.

Wird ein solches Set an Mehrfach-Proben getestet (nach mindestens einem Einfrier- Auftau- und Zentrifugationszyklus) muss im Labor in einem separaten Probengefäß eine Mischprobe aus Aliquots aller 5 Einzelproben hergestellt werden. Diese Mischprobe wird im Test eingesetzt.

### 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. **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, auf einem Schüttler (~ 600 Upm).
5. Den Inhalt der Wells kräftig ausschütteln. Wells **4-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 Waschschrilles!
6. **200 µL Substrate Solution** in jedes Well geben.
7. **15 Minuten** bei Raumtemperatur inkubieren.
8. Die enzymatische Reaktion durch Zugabe von **100 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 Arbeitsanleitung ermittelten Werte wurden automatisch mit Hilfe der 4 Parameter Gleichung (4PL, 4 Parameter Logistics, 4 Parameter Rodbard) bestimmt.  
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 DRG ELISA gezeigt. Diese Werte sollten **nicht** zur Berechnung von Patientendaten verwendet werden.

Standard	Optische Dichte (450 nm)
Standard 0 (0 pg/mL)	2,78
Standard 1 (10.0 pg/mL)	2,71
Standard 2 (20.0 pg/mL)	2,54
Standard 3 (30.0 pg/mL)	2,04
Standard 4 (60.0 pg/mL)	1,31
Standard 5 (120.0 pg/mL)	0,58
Standard 6 (300.0 pg/mL)	0,22

## 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 DRG Salivary Estrone ELISA folgende Werte:

Population	N	5% Perzentile (pg/mL)	95% Perzentile (pg/mL)
Frauen	52	3,16	26,28

## 8 QUALITÄTS-KONTROLLE

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 DRG in Verbindung.



## **9 ASSAY CHARACTERISTIKA**

### **9.1 Messbereich**

Der Messbereich des Testes liegt zwischen 4,7 pg/mL –300 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 4,7 pg/mL.

Die Daten zu:

### **9.4 Reproduzierbarkeit (Präzision)**

### **9.5 Wiederfindung**

### **9.6 Linearität**

entnehmen Sie bitte der ausführlichen englischen Arbeitsanleitung.

## **10 GRENZEN DES TESTS**

Jede unsachgemäße Behandlung von Proben oder Modifikationen 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**

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 DRG in Verbindung.

### **11.2 Therapeutische Konsequenzen**

Therapeutische Konsequenzen sollten keinesfalls nur aufgrund von Laborergebnissen erfolgen, selbst dann nicht, wenn alle Testergebnisse mit den in 11.1. genannten Voraussetzungen übereinstimmen. Jedes Laborergebnis ist nur ein Teil des klinischen Gesamtbildes eines Patienten.

Nur in Fällen, in denen die Laborergebnisse in akzeptabler Übereinstimmung mit dem allgemeinen klinischen Bild des Patienten stehen, sollten therapeutische Konsequenzen eingeleitet werden. Das Testergebnis allein sollte niemals als alleinige Grundlage für die Einleitung therapeutischer Konsequenzen dienen.

### **11.3 Haftung**

Jegliche Veränderungen des Testkits und/oder Austausch oder Vermischung von Komponenten unterschiedlicher Chargen von einem Testkit zu einem anderen, können die gewünschten Ergebnisse und die Gültigkeit des gesamten Tests negativ beeinflussen. Solche Veränderungen und/oder Austausch haben den Ausschluss jeglicher Ersatzansprüche zur Folge.

Reklamationen, die aufgrund von Falschinterpretation von Laborergebnissen durch den Kunden gemäß Punkt 11.2. erfolgen, sind ebenfalls abzuweisen. Im Falle jeglicher Reklamation ist die Haftung des Herstellers maximal auf den Wert des Testkits beschränkt. Jegliche Schäden, die während des Transports am Kit entstanden sind, unterliegen nicht der Haftung des Herstellers.

## **12 REFERENZEN / LITERATUR**

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

## 1 INTRODUCCIÓN

El **Kit de inmunoensayo enzimático DRG Estrone** proporciona los materiales necesarios para la determinación cuantitativa del estrona en saliva.

**Este ensayo está diseñado solo para diagnóstico *in vitro*.**

## 2 FUNDAMENTO DEL ENSAYO

Consultar el manual de usuario en inglés.

## 3 PRECAUCIONES

- Este kit es solamente para diagnóstico *in vitro*.
- Por favor, se usa solo la version valida de la metodico técnico incluido aqui en el kit.
- Para obtener información de las sustancias peligrosas incluidas en el kit por favor mirar las hojas de los datos de seguridad del material.
- Todos los reactivos en este kit de ensayo que contienen suero o plasma humano se han ensayado y confirmado ser negativos para HIV I/II, HBsAg y HCV mediante procedimientos aprobados por la FDA. Sin embargo, todos los reactivos deben ser tratados tanto en su uso como dispensación como potencialmente biopeligrosos.
- Evitar contacto con *Stop Solution* que contiene H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> 0,5 M. Puede provocar irritación y quemaduras en la piel.
- Nunca pipetear con la boca y evitar el contacto de los reactivos y las muestras con la piel y con membranas mucosas.
- No fumar, comer, beber o usar cosméticos en áreas donde las muestras o los reactivos del kit están siendo usados.
- Usar guantes de látex cuando se utilicen las muestras y los reactivos. La contaminación microbiana de los reactivos o las muestras puede dar resultados erróneos.
- El manejo debe realizarse de acuerdo a los procedimientos definidos por las guías o regulación nacionales de seguridad de sustancias biopeligrosas.
- No utilizar los reactivos después de su fecha de caducidad que aparece en las etiquetas del kit.
- Todos los volúmenes indicados han de ser realizados de acuerdo con el protocolo. Los resultados óptimos del ensayo se obtienen solo cuando se utilizan pipetas y lectores de microplacas calibrados.
- No mezclar o usar componentes de kits con distinto número de lote. Se recomienda no intercambiar pocillos de distintas placas incluso si son del mismo lote. Los kits pueden haber sido enviados o almacenados bajo diferentes condiciones y las características de unión de las placas pueden resultar diferentes.
- Los compuestos químicos y los reactivos preparados o utilizados han de tratarse como residuos peligrosos de acuerdo con las guías o regulación nacionales de seguridad de sustancias biopeligrosas.
- Las hojas de los datos de seguridad de este producto están disponibles bajo pedido directamente a DRG Instruments GmbH.  
Las hojas de los datos de seguridad se ajustan a las demandas de la guía europea: EU-Guideline 91/155 EC.

## 4 COMPONENTES DEL KIT

### 4.1 Componentes del Kit

1. **Microtiterwells** (Placas multipocillo), 12 x 8 tiras separables, 96 pocillos; Pocillos recubiertos con estrona biotinilado.
2. **Standard (Standard 0-6)**, (Estándar), 7 viales, 1 mL, listo para usar; Concentraciones: 0 – 10.0 – 20.0 – 30.0 – 60.0 – 120.0 – 300.0 pg/mL  
Conversión: pg/mL x 3.69 = pmol/L  
Contiene conservante sin mercurio.
3. **Control Low & High**, 2 viales, 1,0 mL, listo para usar; Referir los valores y rangos del control a la etiqueta del vial o a la Hoja de datos QC.  
Contiene conservante sin mercurio.
4. **Enzyme Conjugate** (Conjugado enzimático), 1 vial, 14 mL, listo para usar, Anticuerpo anti-estrone conjugado con la Peroxidasa de rábano; Contiene conservante sin mercurio.
5. **Substrate Solution** (Solución de sustrato), 1 vial, 25 mL, listo para usar, Tetrametilbencidina (TMB).
6. **Stop Solution** (Solución de parada), 1 vial, 14 mL, listo para usar, contiene 0.5 M H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>, Evitar el contacto con la Solución de parada. Puede causar irritación y quemaduras en la piel.
7. **Wash Solution** (Solución de lavado), 1 vial, 30 mL (concentrado 40X), ver "Preparación de los Reactivos".

**Nota:** Se puede solicitar el *Sample Diluent* para la dilución de la muestra.

### 4.2 Equipamiento y material requerido pero no provisto

- Lector de microplacas calibrado (450 ± 10 nm) (ej. DRG Instruments Microtiter Plate Reader).
- Micropipetas de precisión variable calibradas.
- Papel absorbente.
- Agua destilada.

### 4.3 Almacenamiento y estabilidad del kit

Cuando se almacena a 2 °C - 8 °C, los reactivos sin abrir mantienen su reactividad hasta la fecha de caducidad. No utilizar los reactivos más allá de esta fecha.

Los reactivos abiertos han de almacenarse a 2 °C - 8 °C. Las placas multipocillo han de almacenarse a 2 °C - 8 °C. Una vez se ha abierto la bolsa hay que tener cuidado y cerrarla de nuevo.

Los kits abiertos conservan su actividad durante 8 semanas si se almacenan como se ha descrito arriba.

### 4.4 Preparación de los Reactivos

Dejar que todos los reactivos y el número requerido de tiras alcancen la temperatura ambiente antes de usarse.

#### **Wash Solution**

Mezclar 30 mL de *Wash Solution* concentrada con 1170 mL de agua desionizada hasta un volumen final de 1200 mL.

*La solución del lavado diluida es estable durante 2 semanas a temperatura ambiente.*

### 4.5 Eliminación del Kit

La eliminación del kit debe realizarse de acuerdo con las leyes nacionales. En las hojas de datos de seguridad se proporciona información especial de este producto (ver capítulo 13).

### 4.6 Kits de ensayo dañados

En caso de que exista cualquier daño severo del kit de ensayo o de sus componentes, ha de informarse por escrito a DRG, no más tarde de una semana después de recibir el kit. No deben utilizarse componentes dañados para llevar a cabo un ensayo. Han de almacenarse hasta que se encuentre una solución. Después de esto, deben ser eliminados de acuerdo con las leyes oficiales.

## 5 MUESTRAS

Evitar: comer, beber, tomar chicles o limpiarse los dientes, al menos 30 minutos antes de la recogida de la muestra. Por el contrario, se recomienda enjuagarse la boca a fondo con agua fría 5 minutos antes de la recogida de la muestra.

No recoger muestras cuando hay enfermedades bucales, inflamación o lesiones (contaminación por sangre) de la boca .

Si existe una contaminación por sangre visible en la muestra del paciente, ésta debe ser descartada, enjuagar el aparato de recogida de muestra con agua, esperar 10 minutos y recoger una nueva muestra.

*Nota:* No deben utilizarse muestras que contengan acida sódica.

### 5.1 Toma de muestras

Las muestras de saliva han de ser recogidas solamente utilizando aparatos especiales para recogida de muestras de saliva, ej. SALI-TUBES 100 (SLV-4158).

Debido al patrón de secreción cíclica de las hormonas esteroideas, es importante preocuparse por una recogida coordinada.

Para evitar resultados arbitrarios recomendamos la recogida de 5 muestras siempre en un período de 2-3 horas (recogida múltiple) preferentemente antes de una comida.

Debido a que la comida puede contener una cantidad significativa de hormonas esteroideas, las muestras han de recogerse preferentemente en ayuno. Si el ayuno fuera un problema, el período de recogida debe ser coordinado justo antes de comer o de cenar.

### 5.2 Almacenamiento de las muestras

Las muestras de saliva han de almacenarse entre 2 °C - 8 °C hasta una semana, y deben congelarse a -20 °C para períodos superiores; no es un problema el descongelado y congelado repetido.

Cada muestra ha de ser congelada, descongelada y centrifugada al menos una vez para separar las mucinas por centrifugación.

Cuando llegan las muestras al laboratorio, estas han de permanecer en el congelador al menos durante una noche. A la mañana siguiente las muestras congeladas se calientan hasta temperatura ambiente y se mezclan cuidadosamente.

Entonces, las muestras han de ser centrifugadas de 5 a 10 minutos (a 3000 - 2000 x g).

Ahora el sobrenadante incoloro es fácil de pipetear.

Si se ha de ensayar un conjunto de múltiples muestras, se han de mezclar (al menos con un ciclo de congelado, descongelado y centrifugación) una mezcla de 5 muestras a parte y realizar el ensayo de esta mezcla.

### 5.3 Dilución de las muestras

Si en un ensayo inicial, se encuentra una muestra que presenta valores mayores que el estándar mas concentrado, ha de diluirse con *Sample Diluent* y volver a ensayarse como se describe en el Procedimiento de Ensayo.

Para el cálculo de las concentraciones habrá que tener en cuenta el factor de dilución.

Ejemplo:

a) dilución 1:10: 10 µL Suero + 90 µL *Sample Diluent* (mezclar totalmente)

b) dilución 1:100: 10 µL dilución a) 1:10 + 90 µL *Sample Diluent* (mezclar totalmente).

## 6 PROCEDIMIENTO DE ENSAYO

### 6.1 Consideraciones generales

- Todos los reactivos y muestras han de estar a temperatura ambiente antes de su uso. Todos los reactivos deben mezclarse sin formar espuma.
- Una vez se ha comenzado el ensayo deben completarse todos los pasos sin interrupción.
- Utilizar puntas de pipeta de plástico nuevas para cada estándar, control o muestra para evitar combinaciones cruzadas.
- La absorbancia es función del tiempo de incubación y la temperatura. Antes de comenzar el ensayo, se recomienda que todos los reactivos estén preparados, tapas removidas, todos los pocillos que se necesiten asegurados en recipiente, etc. Esto asegurará un tiempo similar para cada paso de pipeteo sin que haya interrupciones.
- Como regla general, la reacción enzimática es linealmente proporcional al tiempo y a la temperatura.

### 6.2 Procedimiento de ensayo

Cada uno debe incluir una curva de estándares.

1. Asegurar el número deseado de pocillos en el recipiente.
2. Dispensar **100 µL** de cada **Standard, Control y muestras** con puntas nuevas en los pocillos adecuados.
3. Dispensar **100 µL** de **Enzyme Conjugate** a cada pocillo.  
Mezclar totalmente durante 10 segundos. Es importante mezclar completamente en este paso.
4. Incubar durante **60 minutos** a temperatura ambiente, en un agitador (~ 600 rpm)
5. Sacudir enérgicamente el contenido de los pocillos.  
Lavar los pocillos 4 veces con *Wash Solution* diluida (400 µL por pocillo). Realizar un golpe seco de los pocillos contra el papel absorbente para eliminar las gotas residuales.

**Nota importante:**

La sensibilidad y la precisión de este ensayo se ve marcadamente influenciada por la realización correcta del proceso de lavado!

6. Adicionar **200 µL** de **Substrate Solution** a cada pocillo.
7. Incubar durante **15 minutos** a temperatura ambiente.
8. Parar la reacción enzimática mediante la adición de **100 µL** de **Stop Solution** a cada pocillo.
9. Leer la OD a **450 ± 10 nm** con un lector de microplacas **dentro de los 10 minutos** después de la adición de la *Stop Solution*.

### 6.3 Cálculo de los Resultados

1. Calcular los valores de absorbancia media para cada conjunto de estándares, controles y muestras de pacientes.
2. Construir una curva estándar mediante la representación de la absorbancia media obtenida para cada estándar frente a su concentración con el valor de absorbancia en el eje vertical (Y) y la concentración en el eje horizontal (X).
3. Usando el valor de absorbancia media de cada muestra determinar la concentración correspondiente a partir de la curva estándar.
4. Método automatizado: Los resultados en la IFU se han calculado automáticamente usando una curva de regresión 4 PL (4 Parámetros Logísticos). Otras funciones de regresión darán lugar a resultados sensiblemente diferentes.
5. La concentración de las muestra puede leerse directamente de la curva de estándares. Las muestras con concentraciones superiores al mayor estándar han de diluirse. Para el cálculo de las concentraciones hay que tener en cuenta el factor de dilución.

### 6.3.1 Ejemplo de una Curva Estándar Típica

Los siguientes datos son solamente para la explicación y **no** pueden ser utilizados en lugar de los datos generados en el momento del ensayo.

Estándar	Unidades Ópticas (450 nm)
Standard 0 (0 pg/mL)	2,78
Standard 1 (10.0 pg/mL)	2,71
Standard 2 (20.0 pg/mL)	2,54
Standard 3 (30.0 pg/mL)	2,04
Standard 4 (60.0 pg/mL)	1,31
Standard 5 (120.0 pg/mL)	0,58
Standard 6 (300.0 pg/mL)	0,22

## 7 VALORES ESPERADOS

Se recomienda encarecidamente que cada laboratorio determine sus valores normales e inusuales.

En un estudio con adultos aparentemente sanos utilizando el DRG Salivary Estrone ELISA se observaron los siguientes valores:

Población	N válido	Percentil 5% (pg/mL)	Percentil 95% (pg/mL)
Mujeres	52	3,16	26,28

## 8 CONTROL DE CALIDAD

Se recomienda usar muestras control de acuerdo con las leyes estatales y federales. El uso de muestras control se recomienda para asegurar la validez diaria de los resultados. Usar controles tanto a niveles normal como patológico.

Los controles y los correspondientes resultados del Laboratorio de control de calidad están fijados en el certificado de control de calidad que acompañan al kit. Los valores y los rangos fijados en la hoja del control de calidad se refieren siempre al kit actual y deben usarse para la comparación directa de los resultados.

Es recomendable también hacer uso de programas de Aseguramiento de la Calidad nacionales o internacionales para asegurar la exactitud de los resultados.

Utilizar métodos estadísticos apropiados para el análisis de los valores y tendencia de los controles. Si los resultados del ensayo no se ajustan a los rangos aceptables establecidos en los controles, los resultados obtenidos de los pacientes han de considerarse inválidos.

En este caso, por favor comprobar las siguientes áreas técnicas: Pipeteo y tiempo empleado, fotómetro, fecha de caducidad de los reactivos, condiciones de almacenamiento e incubación, métodos de aspiración y lavado.

Después de comprobar los asuntos mencionados arriba sin encontrar ningún error, contactar con su distribuidor o con DRG directamente.

## **9 CARACTERÍSTICAS DEL ENSAYO**

### **9.1 Rango dinámico del ensayo**

El rango del ensayo se encuentra entre 4,7 pg/mL –1000 pg/mL.

### **9.2 Especificidad de los Anticuerpos (Reactividad Cruzada)**

Consultar el manual de usuario en inglés.

### **9.3 Sensibilidad Analítica**

La sensibilidad analítica se calculó a partir de la media menos dos desviaciones estándar de veinte (20) réplicas del *Estándar 0* y resultó ser 4,7 pg/mL.

### **9.4 Precisión**

Consultar el manual de usuario en inglés.

### **9.5 Recuperación**

Consultar el manual de usuario en inglés.

### **9.6 Linealidad**

Consultar el manual de usuario en inglés.

## **10 LIMITACIONES DE USO**

Cualquier manipulación inadecuada de las muestras o modificaciones del ensayo pueden influenciar los resultados.

### **10.1 Sustancias que pueden interferir**

Si existe una contaminación por sangre visible en la muestra del paciente, ésta debe ser descartada.

### **10.2 Interferencias con drogas**

Hasta ahora no se han encontrado sustancias (drogas) conocidas por nosotros, que tengan influencia en la medida de estrona en una muestra.

### **10.3 Efecto Gancho-Dosis-Elevada**

No se ha observado efecto gancho en este ensayo.



## **11 ASPECTOS LEGALES**

### **11.1 Fiabilidad de los Resultados**

El ensayo debe realizarse exactamente de acuerdo a las instrucciones del fabricante. Mas aún, el usuario debe ajustarse estrictamente a las reglas BPL (Buenas Prácticas de Laboratorio) o a otros estándares y/o leyes nacionales aplicables. Esto es especialmente relevante para el uso de reactivos control. Es importante incluir siempre, dentro del procedimiento de ensayo, un número suficiente de controles para validar la exactitud y la precisión del ensayo.

Los resultados del ensayo son válidos sólo si todos los controles se encuentran dentro de los rangos especificados y si todos los otros parámetros del ensayo se encuentran dentro de las especificaciones dadas para el ensayo. En caso de alguna duda o inquietud, por favor, contactar con DRG.

### **11.2 Consecuencias Terapéuticas**

Las consecuencias terapéuticas nunca deben basarse sólo en los resultados de laboratorio incluso si todos los resultados del ensayo están de acuerdo con los asuntos fijados en el punto 11.1. Cualquier resultado de laboratorio es solamente una parte del cuadro clínico de un paciente.

Solamente en los casos donde los resultados de laboratorio están en acuerdo con todo el cuadro clínico de un paciente, se pueden derivar consecuencias terapéuticas.

Nunca deben derivarse consecuencias terapéuticas a partir de solamente el resultado obtenido en el ensayo

### **11.3 Responsabilidad**











Cualquier modificación del kit y/o cambio o mezcla de cualquier componente procedentes de kits de lotes diferentes puede afectar negativamente a los resultados esperados y en la validez de todo el test. Esas modificaciones y/o cambios invalidan cualquier reclamación de reposición.

Las reclamaciones emitidas debidas a una mala interpretación de los resultados de laboratorio por parte del comprador referidos al punto 11.2 son también inválidas. A pesar de todo, en el caso de cualquier reclamación, la responsabilidad del fabricante no excede el valor del kit. Cualquier daño provocado al kit durante su transporte no está sujeto a la responsabilidad del fabricante.

## **12 REFERENCIAS / BIBLIOGRAFÍA**

Consultar el manual de usuario en inglés.

## SYMBOLS USED WITH DRG ELISAS

Symbol	English	Deutsch	Français	Español	Italiano
	European Conformity	CE-Konformitätskennzeichnung	Conforme aux normes européennes	Conformidad europea	Conformità europea
	Consult instructions for use	Gebrauchsanweisung beachten	Consulter les instructions d'utilisation	Consulte las Instrucciones	Consultare le istruzioni per l'uso
	In vitro diagnostic device	In-vitro-Diagnostikum	Usage Diagnostic in vitro	Para uso 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
	Storage Temperature	Lagerungstemperatur	Température de conservation	Temperatura de conservación	Temperatura di conservazione
	Expiration Date	Mindesthaltbarkeitsdatum	Date limite d'utilisation	Fecha de caducidad	Data di scadenza
	Legal Manufacturer	Hersteller	Fabricant	Fabricante	Fabbricante
<i>Distributed by</i>	Distributor	Vertreiber	Distributeur	Distribuidor	Distributore
<i>Content</i>	Content	Inhalt	Contenu	Contenido	Contenuto
<i>Volume/No.</i>	Volume / No.	Volumen/Anzahl	Volume/Numéro	Volumen/Número	Volume/Quantità
<i>Microtiterwells</i>	Microtiterwells	Mikrotiterwells	Plaques de micro-titration	Placas multipocillo	Micropozzetti
<i>Antiserum</i>	Antiserum	Antiserum	Antisérum	Antisero	Antisiero
<i>Enzyme Conjugate</i>	Enzyme Conjugate	Enzymkonjugat	Conjugué enzymatique	Conjugado enzimático	Tracciante enzimatico
<i>Enzyme Complex</i>	Enzyme Complex	Enzymkomplex	Complexe enzymatique	Complex enzimático	Complesso enzimatico
<i>Substrate Solution</i>	Substrate Solution	Substratlösung	Solution substrat	Solución de sustrato	Soluzione di substrato
<i>Stop Solution</i>	Stop Solution	Stopplösung	Solution d'arrêt	Solución de parada	Soluzione d'arresto
<i>Zero Standard</i>	Zero Standard	Nullstandard	Zero Standard	Estándar cero	Standard zero
<i>Standard</i>	Standard	Standard	Standard	Estándar	Standard
<i>Control</i>	Control	Kontrolle	Contrôle	Control	Controllo
<i>Assay Buffer</i>	Assay Buffer	Assaypuffer	Tampon d'essai	Tampón de ensayo	Tampone del test
<i>Wash Solution</i>	Wash Solution	Waschlösung	Solution de lavage	Solución de lavado	Soluzione di lavaggio
<i>1N NaOH</i>	1N NaOH	1N NaOH	1N NaOH	1N NaOH	1N NaOH (idrossido di sodio 1N)
<i>1 N HCl</i>	1 N HCl	1 N HCl	1N HCl	1 N HCl	
<i>Sample Diluent</i>	Sample Diluent	Probenverdünnungsmedium	Solution pour dilution de l'échantillon	Solución para dilución de la muestra	Diluyente dei campioni
<i>Conjugate Diluent</i>	Conjugate Diluent	Konjugatverdünnungsmedium	Solution pour dilution du conjugué	Solución para dilución del conjugado	Diluyente del tracciante