



Instructions for Use

Salivary Estradiol HS ELISA

IVD



REF SLV-6145

Σ 96



DRG

DRG Instruments GmbH, Germany
Frauenbergstraße 18, 35039 Marburg
Phone: +49 (0)6421-1700 0, Fax: +49 (0)6421-1700 50
Website: www.drg-diagnostics.de
E-mail: drg@drg-diagnostics.de



DRG

DRG International, Inc., USA
841 Mountain Ave., Springfield, NJ 07081
Phone: (973) 564-7555, Fax: (973) 564-7556
Website: www.drg-international.com
E-mail: corp@drg-international.com

**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, use sólo la versión válida de las instrucciones de uso que se suministran con el kit.
Utilisez seulement la version valide des Instructions d'utilisation fournies avec le kit.**

Table of Contents / Inhaltsverzeichnis / Tabella die Contenuti / Tabla de Contenidos / Table des matières

1	INTENDED USE	2	1	FINALIDAD PREVISTA.....	22
2	PRINCIPLE OF THE TEST	2	2	FUNDAMENTO DEL ENSAYO	22
3	WARNINGS AND PRECAUTIONS	3	3	PRECAUCIONES	22
4	REAGENTS	4	4	COMPONENTES DEL KIT.....	23
5	SPECIMEN COLLECTION AND PREPARATION.....	5	5	MUESTRAS	24
6	ASSAY PROCEDURE	5	6	PROCEDIMIENTO DE ENSAYO	24
7	EXPECTED NORMAL VALUES	7	7	VALORES ESPERADOS	26
8	QUALITY CONTROL	7	8	CONTROL DE CALIDAD	26
9	PERFORMANCE CHARACTERISTICS.....	7	9	CARACTERÍSTICAS DEL ENSAYO.....	26
10	LIMITATIONS OF USE	9	10	LIMITACIONES DE USO	27
11	LEGAL ASPECTS.....	9	11	ASPECTOS LEGALES	27
1	ZWECKBESTIMMUNG	10	1	UTILISATION PRÉVUE	28
2	TESTPRINZIP	10	2	PRINCIPE DU TEST	28
3	VORSICHTSMAßNAHMEN	10	3	AVERTISSEMENTS ET PRECAUTIONS	28
4	BESTANDTEILE DES KITS	11	4	RÉACTIFS	29
5	PROBENVORBEREITUNG	12	5	PRÉLÈVEMENT ET PRÉPARATION DES SPÉCIMENS	30
6	TESTDURCHFÜHRUNG	12	6	RÉALISATION DU TEST	30
7	ERWARTETE WERTE	14	7	VALEURS NORMALES ATTENDUES	32
8	QUALITÄTSKONTROLLE	14	8	CONTROLE DE QUALITE	32
9	ASSAY-CHARAKTERISTIKA	14	9	CARACTERISTIQUES DES PERFORMANCES	32
10	GRENZEN DES TESTS	15	10	LIMITES D'UTILISATION.....	33
11	RECHTLICHE GRUNDLAGEN.....	15	11	ASPECTS JURIDIQUES.....	33
1	DESTINAZIONE D'USO	16	12	REFERENCES / LITERATURE	34
2	PRINCIPIO DEL TEST	16			
3	PRECAUZIONI	16			
4	COMPONENTI DEL KIT	17			
5	CAMPIONI	18			
6	ATTUAZIONE DEL TEST	18			
7	VALORI NORMALI	20			
8	CONTROLLO QUALITÀ	20			
9	CARATTERISTICHE DEL TEST.....	20			
10	LIMITAZIONE DEL TEST	21			
11	ASPETTI LEGALI	21			
				SYMBOLS USED	35

1 INTENDED USE

The **DRG Salivary Estradiol HS ELISA** is an enzyme immunoassay for the quantitative *in vitro* diagnostic measurement of active free estradiol in saliva.

Results may be used to assess fertility problems in women; to diagnose menopause, and to monitor hormone replacement therapy.

1.1 Summary and Explanation

Estradiol (1,3,5(10)-estratriene-3,17 β -diol; 17 β -estradiol; E2) is a C18 steroid hormone with a molecular weight of 272.4 Dalton. It is the most potent natural estrogen, produced mainly by granulosa cells of the female ovary and the placenta by the aromatization of androstenedione to estrone, followed by conversion of estrone to estradiol by 17 β -HSD. Estradiol is also synthesized in other tissues including testicles, adrenal gland, fat tissue, liver, breast, and brain (1-5).

In plasma, estradiol is largely bound to SHBG and albumin. Only a fraction of 2.21 % is free and biologically active, the percentage remaining constant throughout the menstrual cycle (6-8). Estradiol acts primarily as an agonist of the estrogen receptor (ER) subtypes ER α and ER β , nuclear steroid hormone receptors which trigger the appropriate response at the nuclear level in the target sites. These sites include follicles, uterus, breast, vagina, urethra, hypothalamus, pituitary and to a lesser extent liver and skin.

In the female, estradiol acts as a growth hormone for tissue of the reproductive organs. During the menstrual cycle, estradiol secretion follows a cyclic, biphasic pattern with the highest concentration found immediately prior to ovulation. This estradiol peak stimulates the hypothalamic-pituitary axis to secrete the gonadotropins follicle stimulating hormone (FSH) and luteinizing hormone (LH), which are essential for follicular maturation and ovulation. In the luteal phase, estradiol, in conjunction with progesterone, prepares the endometrium for implantation (9-15). During pregnancy, estradiol concentration increases due to placental production and high levels are sustained throughout pregnancy (16.)

Salivary steroid levels can reflect the circulating level of free steroid rather than total levels in serum, which is explained by the absence of circulating estradiol binding proteins. Therefore, saliva provides an excellent specimen for monitoring estradiol levels across the menstrual cycle or during hormone replacement therapy (17-19).

2 PRINCIPLE OF THE TEST

The DRG Salivary Estradiol HS ELISA is a solid phase enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) based on the **principle of competitive binding**.

The microtiter wells are coated with a polyclonal (rabbit) antibody directed towards antigenic sites of the estradiol molecule.

During incubation, the estradiol in the added sample competes with the added enzyme conjugate, which is estradiol conjugated to horseradish peroxidase, for binding to the coated antibody.

After a washing step to remove all unbound substances, the solid phase is incubated with the substrate solution. The colorimetric reaction is stopped by addition of stop solution, and optical density (OD) of the resulting yellow product is measured. The intensity of colour is inversely proportional to the concentration of the analyte in the sample.

A standard curve is constructed by plotting OD values against concentrations of standards, and concentrations of unknown samples are determined using this standard curve.

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 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 coloured. 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 (20 °C to 26 °C) before starting the test. Temperature will affect the optical density 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 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 DRG.

4 REAGENTS

4.1 Reagents provided

1. **Microtiterwells**, 12 x 8 (break apart) strips, 96 wells;
Wells coated with anti-estradiol antibody (polyclonal).
2. **Standard (Standard 0 - 5)**, 6 vials, 1 mL each, ready to use;
Concentrations: 0 – 1 – 5 – 10 – 50 – 100 pg/mL
The standards are calibrated against the following reference material: Cerilliant E-060
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 Certificate of Analysis.
Contain non-mercury preservative.
4. **Enzyme Conjugate**, 1 vial, 14 mL, ready to use;
estradiol conjugated with horseradish peroxidase;
Contains non-mercury preservative.
5. **Substrate Solution**, 1 vial, 14 mL, ready to use;
Tetramethylbenzidine (TMB).
6. **Stop Solution**, 1 vial, 14 mL, ready to use;
Contains 0.5 M H₂SO₄,
Avoid contact with the stop solution. It may cause skin irritations and burns.
7. **Wash Solution**, 1 vial, 30 mL (40X concentrated);
See "Reagent Preparation".

4.2 Materials required but not provided

- A calibrated microtiter plate reader (450 nm, with reference wavelength at 620 nm to 630 nm) (e.g. the DRG Instruments Microtiter Plate Reader)
- Calibrated variable precision micropipettes
- Absorbent paper
- Distilled water
- Timer
- 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 (20 °C to 26 °C) prior to use.

Wash Solution

Add distilled water to the 40X concentrated Wash Solution.

Dilute 30 mL of concentrated *Wash Solution* with 1170 mL distilled water to a final volume of 1200 mL.

The diluted Wash Solution is stable for 1 week at room temperature.

4.5 Disposal of the Kit

The disposal of the kit and all used materials/reagents must be performed according to the national regulations. Special information for this product is given in the Safety Data Sheet, section 13.

4.6 Damaged Test Kits

In case of any damage to the test kit or components, DRG must be informed in writing, at the latest one week after receiving the kit. 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 of according to the official regulations.

5 SPECIMEN COLLECTION AND PREPARATION

Saliva can be used in this assay.

The sampling must be done in the morning **before** food intake, drinking or smoking. It is recommended to rinse mouth thoroughly with cold water 5 minutes prior to sampling.

If sampling must be done during the day, eating, drinking, smoking, chewing gums or brushing teeth should be avoided at least 2 hours before sampling.

Do not collect samples when oral diseases, inflammation or lesions exist (blood contamination).

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

Please refer to chapters “Interfering Substances” and “Drug Interferences”.

5.1 Specimen Collection

Saliva samples should be collected using SALI-TUBES 100 (REF SLV-4158, available from DRG).

Other saliva sampling devices have not been tested and should be validated under the responsibility of the user.

5.2 Specimen Storage and Preparation

Fresh saliva samples

Immediately after arrival in the lab fresh saliva samples should be **frozen at least overnight at -20 °C.**

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

Storage: immediately at -20 °C

Then samples must be thawed and centrifuged for 5 to 10 minutes at 10 000 g.

Thereafter, the clear supernatant must be transferred into a fresh tube.

Only this clear supernatant can be used as sample for the ELISA.

If a set of multiple samples has to be tested, the lab has to **mix aliquots of the supernatant** of the 5 single samples in a separate sampling device and perform the testing from this mixture.

Supernatant

Storage: up to 7 days at 2 °C to 8 °C

at least 2 months at -20 °C, in aliquots

The supernatant should be frozen only once.

Thawed supernatant should be inverted several times prior to testing!

5.3 Specimen Dilution

If in an initial assay, a specimen is found to contain more analyte than the highest standard, the specimen can be diluted with 0.9% NaCl 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 1:2: 50 µL sample + 50 µL 0.9% NaCl (mix thoroughly)

b) dilution 1:10: 10 µL sample + 90 µL 0.9% NaCl (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.
- Optical density 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 **sample** with new disposable tips into appropriate wells.
3. Incubate for **60 minutes** at room temperature.
4. Dispense **100 µL Enzyme Conjugate** into each well.
Thoroughly mix for 10 seconds. It is important to have a complete mixing in this step.
5. Incubate for **60 minutes** at room temperature.
6. Rinse the wells **3 times** with **400 µL** diluted *Wash Solution* per well, if a plate washer is used.
- OR -
Briskly shake out the contents of the wells.
Rinse the wells **3 times** with **300 µL** diluted *Wash Solution* per well for manual washing. Strike the wells sharply on absorbent paper to remove residual droplets.
Important note:
The sensitivity and precision of this assay is markedly influenced by the correct performance of the washing procedure!
7. Add **100 µL** of **Substrate Solution** to each well.
8. Incubate for **30 minutes** at room temperature.
9. Stop the enzymatic reaction by adding **100 µL** of **Stop Solution** to each well.
10. Determine the optical density of the solution in each well at **450 nm (reading) and at 620 nm to 630 nm (background subtraction, recommended)** 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 optical density (OD) values for each set of standards, controls and patient samples.
2. Using graph paper, construct a standard curve by plotting the mean OD obtained from each standard against its concentration with OD value on the vertical (Y) axis and concentration on the horizontal (X) axis.
3. Using the mean OD 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 > 100 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 Density (450 nm)
<i>Standard 0</i> (0 pg/mL)	1.99
<i>Standard 1</i> (1 pg/mL)	1.80
<i>Standard 2</i> (5 pg/mL)	1.45
<i>Standard 3</i> (10 pg/mL)	1.20
<i>Standard 4</i> (50 pg/mL)	0.48
<i>Standard 5</i> (100 pg/mL)	0.24

7 EXPECTED NORMAL VALUES

It is strongly recommended that each laboratory should determine its own normal and abnormal values.

In a study conducted with apparently healthy individuals, using the DRG Salivary Estradiol HS ELISA the following data were observed:

Population	n	Mean (pg/mL)	Median (pg/mL)	2.5 th - 97.5 th Percentile (pg/mL)	Range (min. - max.) (pg/mL)
Males	58	3.74	3.45	1.26 – 9.12	0.74 – 11.46
Females					
Pre-menopausal					
Follicular phase	26	5.85	3.45	1.32 – 29.35	1.08 – 46.42
Luteal phase	26	4.28	3.12	1.46 – 14.97	1.19 – 22.94
Post-menopausal	26	5.56	3.03	1.21 – 28.43	1.02 – 41.48
Stages of pregnancy					
1. Trimester	24	8.27	5.08	2.33 – 25.29	1.90 – 28.98
2. Trimester	24	44.16	39.52	7.29 – 97.68	7.20 – 97.86
3. Trimester	24	75.35	75.69	23.25 – 126.49	21.38 – 149.68

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 0.366 pg/mL – 100 pg/mL.

9.2 Specificity of Antibodies (Cross-Reactivity)

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

Substance	Added Conc. (pg/mL)	Cross-reactivity (%)
Androstenedione	1000	0.03
DHEA	1440	0.00
Testosterone	1000	0.00
Cortisol	80000	0.02
17-OHP	1000	0.03
Estrone	300	1.77
Progesterone	1000	0.00
DHT	1000	0.00
Estriol	1000	0.61
17-a-Ethinylestradiol	20000	0.47

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 *Standard 0* and was found to be 0.195 pg/mL.

The Limit of Blank (LoB) is 0.145 pg/mL.

The Limit of Detection (LoD) is 0.366 pg/mL.

The Limit of Quantification (LoQ) is 0.736 pg/mL.

9.4 Reproducibility

9.4.1 Intra-Assay

The within-assay variability was determined by measuring each sample 10 times per run (n = 10):

Sample	n	Mean (pg/mL)	CV (%)
1	10	2.50	9.4
2	10	4.95	9.4
3	10	26.45	6.3
4	10	92.54	1.4

9.4.2 Inter-Assay

The between-assay variability was determined by measuring each sample 10 times per run for 3 days (n = 30):

Sample	n	Mean (pg/mL)	CV (%)
1	30	2.51	14.9
2	30	5.49	12.3
3	30	29.48	9.4
4	30	93.20	1.7

9.4.3 Inter-Lot

The inter-assay (between-lots) variation was determined by measuring each sample 6 times with 3 different kit lots:

Sample	n	Mean (pg/mL)	CV (%)
1	18	2.67	13.5
2	18	6.82	6.2
3	18	26.35	5.9
4	18	85.69	5.5

9.5 Recovery

Samples have been spiked by adding estradiol solutions with known concentrations.

The recovery (%) was calculated by multiplying the ratio of measured and expected values with 100.

	Sample 1	Sample 2	Sample 3	Sample 4	
Concentration (pg/mL)	6.34	16.63	22.96	71.01	
Average Recovery (%)	100.8	87.4	88.8	90.0	
Range of Recovery (%)	from	98.8	86.8	87.4	88.9
	to	104.3	88.3	90.4	91.1

9.6 Linearity

Samples were measured undiluted and in serial dilutions with 0.9 % NaCl. The recovery (%) was calculated by multiplying the ratio of expected and measured values with 100.

	Sample 1	Sample 2	Sample 3	Sample 4	
Concentration (pg/mL)	32.02	63.24	65.23	80.89	
Average Recovery (%)	97.5	97.7	104.5	101.0	
Range of Recovery (%)	from	89.2	96.4	95.2	91.1
	to	109.9	100.3	109.8	111.0

9.7 Comparison Studies

A comparison of DRG Salivary Estradiol HS ELISA (SLV-6145) (y) and the reference method LC-MS/MS (x) using clinical samples gave the following correlation:

$$n = 9$$

$$r = 0.980$$

$$y = 0.775x + 7.536$$

A comparison of DRG Salivary Estradiol HS ELISA (SLV-6145) (y) and the IBL 17 β -Estradiol Saliva ELISA (REF 30121045) (x) using clinical samples gave the following correlation:

$$n = 48$$

$$r = 0.992$$

$$y = 1.691x - 3.462$$

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

The following substances will increase the estradiol values by more than 20 %: coffee, ethanol, coffee with milk, toothpaste, caffeine, chewing gum, nicotine.

In contrast, hemoglobin will decrease the estradiol values by more than 20%.

10.2 Drug Interferences

The Salivary Estradiol HS ELISA should not be used for patients being treated with the drugs Fulvestrant (Faslodex[®]) and Mifepristone (Mifegyne[®]), since this could lead to falsely elevated results.

Patients who are under treatment with L-Thyroxin may also show falsely elevated test results. To avoid interference with high dose L-Thyroxin treatment, the sampling must be done either directly in the morning before taking L-Thyroxin or at least 12 hours after taking L-Thyroxin.

10.3 High-Dose-Hook Effect

A High-Dose-Hook Effect is not known for competitive assays.

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.

1 ZWECKBESTIMMUNG

Der **DRG Salivary Estradiol HS ELISA** wird zur quantitativen Bestimmung von aktivem freien Estradiol in Speichel eingesetzt.

Nur für *In-vitro* Diagnostik.

Die Ergebnisse können eingesetzt werden bei der Beurteilung von Fertilitätsstörungen bei der Frau, zur Diagnose der Menopause und zur Überwachung bei Hormonersatztherapie.

2 TESTPRINZIP

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

Die Wells der Mikrotiterplatten sind mit einem polyklonalen Antikörper (Kaninchen) beschichtet, der gegen definierte Antikörper-Bindungsstellen des Estradiol-Moleküls gerichtet ist.

Während der Inkubation konkurriert das Estradiol in der zugegebenen Probe mit dem Enzymkonjugat (Estradiol, konjugiert an Meerrettichperoxidase) um die freien Bindungsstellen auf den beschichteten Wells.

Nach einem Waschschrift, um alle ungebundenen Substanzen zu entfernen, wird die feste Phase mit der Substratlösung inkubiert. Die Farbreaktion wird durch die Zugabe der Stopplösung beendet und die optische Dichte (OD) des resultierenden gelben Produktes gemessen. Die Intensität der Farbe ist umgekehrt proportional zur Konzentration des Analyten in der Probe.

Durch Auftragen der OD-Werte gegen die Konzentrationen der Standards wird eine Standardkurve erstellt, und die Konzentrationen der unbekanntenen Proben werden anhand dieser Standardkurve bestimmt.

3 VORSICHTSMAßNAHMEN

- Dieser Kit ist nur zum in vitro diagnostischen Gebrauch geeignet. Nur für den professionellen Gebrauch.
- Nur die gültige, im Testkit enthaltene, Gebrauchsanweisung verwenden.
- Informationen zu im Kit enthaltenen gefährlichen Substanzen entnehmen Sie bitte dem 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 DRG Instruments GmbH erhältlich.

4 BESTANDTEILE DES KITS

4.1 Kitinhalt

1. **Microtiterwells**, 96 Wells, 12 x 8 Wells (einzeln brechbar);
Mit anti-Estradiol-Antikörper (polyklonal) beschichtet.
2. **Standard (Standard 0 - 5)**, 6 Fläschchen, je 1 mL, gebrauchsfertig;
Konzentrationen: 0 – 1 – 5 – 10 – 50 – 100 pg/mL
Die Standards sind gegen das folgende Referenzmaterial kalibriert: Cerilliant E-060
Enthält quecksilberfreies Konservierungsmittel.
3. **Control Low & High** (Kontrolle), 2 Fläschchen, je 1 mL, gebrauchsfertig;
Kontrollwerte und -bereiche entnehmen Sie bitte dem Fläschchenetikett oder dem „Certificate of Analysis“.
Enthält quecksilberfreies Konservierungsmittel.
4. **Enzyme Conjugate** (Enzymkonjugat), 1 Fläschchen, 14 mL, gebrauchsfertig;
Estradiol mit Meerrettichperoxidase konjugiert;
Enthält quecksilberfreies Konservierungsmittel.
5. **Substrate Solution** (Substratlösung), 1 Fläschchen, 14 mL, gebrauchsfertig;
Substratlösung TMB.
6. **Stop Solution** (Stopplösung), 1 Fläschchen, 14 mL, gebrauchsfertig;
enthält 0,5 M H₂SO₄,
Kontakt mit der Stopplösung vermeiden! Kann Hautreizungen und Verbrennungen verursachen.
7. **Wash Solution** (Waschlösung), 1 Fläschchen, 30 mL, **40X** konzentriert;
Siehe „Vorbereitung der Reagenzien“.

4.2 Erforderliche aber nicht enthaltene Geräte und Materialien

- Kalibriertes Mikrotiterplattenlesegerät (450 nm, mit Referenzwellenlänge bei 620 nm bis 630 nm), (z.B. das DRG Instruments Mikrotiterplattenlesegerät)
- Kalibrierte variable Präzisions-Mikropipetten
- Saugfähiges Papier
- Destilliertes Wasser
- Laborwecker
- Millimeterpapier oder Software zur Datenauswertung

4.3 Lagerung und Haltbarkeit des Kits

Die ungeöffneten Reagenzien behalten bei Lagerung um 2 °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 (20 °C bis 26 °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 1 Woche stabil.*

4.5 Entsorgung des Kits

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

4.6 Beschädigte Testkits

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

5 PROBENVORBEREITUNG

Speichelproben können in diesem Test als Probenmaterial eingesetzt werden.

Die Probenentnahme muss am Morgen **vor** der Nahrungsaufnahme, dem Trinken oder Rauchen erfolgen. Es wird empfohlen, den Mund 5 Minuten vor der Probenentnahme gründlich mit kaltem Wasser auszuspülen.

Falls die Probenentnahme im Laufe des Tages erfolgen muss, sollte Essen, Trinken, Rauchen, Kaugummi kauen oder Zähne putzen mindestens 2 Stunden vor der Entnahme vermieden werden.

Speichelproben sollten nicht bei Krankheiten, Entzündungen oder Verletzungen der Mundhöhle entnommen werden (Blutkontamination).

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

Weitere Informationen finden Sie in den Kapiteln „Interferenzen“ und „Beeinflussung durch Medikamente“.

5.1 Probenentnahme

Die Speichelproben müssen gesammelt werden mit SALI-TUBES 100 (REF SLV-4158, erhältlich bei DRG).

Andere Sammelsysteme wurden nicht getestet. Diese müssen in Verantwortung des Anwenders validiert werden.

5.2 Probenaufbewahrung und -vorbereitung

FrISCHE Speichelproben

Sofort nach der Ankunft im Labor müssen frISCHE Speichelproben **mindestens über Nacht bei -20 °C** tiefgefroren werden.

Jede Speichelprobe muss eingefroren, aufgetaut und anschließend zentrifugiert werden, um Muzine aus der Probe zu entfernen.

Lagerung: sofort bei -20 °C

Danach müssen die eingefrorenen Proben aufgetaut und 5 bis 10 Minuten bei 10 000 g zentrifugiert werden.

Anschließend muss der klare Überstand in ein frisches Röhrchen überführt werden.

Nur dieser klare Überstand darf als Probe im ELISA eingesetzt werden.

Überstand

Lagerung: bis zu 7 Tage bei 2 °C bis 8 °C
mindestens 2 Monate bei -20 °C, in Aliquots

Der Überstand sollte nur einmal eingefroren werden.

Vor dem Einsatz im Test muss der aufgetaute Überstand durch hin- und herschwenken gemischt werden.

5.3 Probenverdünnung

Wenn in einem ersten Testdurchlauf bei einer Probe eine Konzentration höher als der höchste Standard gefunden wird, kann diese Probe mit 0,9% NaCl weiter verdünnt und nochmals bestimmt werden. Die Verdünnung muss jedoch bei der Berechnung der Konzentration beachtet werden.

Beispiel:

a) Verdünnung 1:2: 50 µL Probe + 50 µL 0,9% NaCl gründlich mischen)

b) Verdünnung 1:10: 10 µL Probe + 90 µL 0,9% NaCl 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 Probe mit neuen Plastikspitzen** in die entsprechenden Wells geben.
3. **60 Minuten** bei Raumtemperatur inkubieren.
4. **100 µL Enzyme Conjugate** in jedes Well geben.
Für 10 Sekunden gut schütteln. Es ist sehr wichtig, in diesem Schritt eine komplette Durchmischung zu erreichen.
5. **60 Minuten** bei Raumtemperatur inkubieren.
6. Wells **3-mal** mit **400 µL** verdünnter *Wash Solution* waschen, falls ein Waschautomat verwendet wird.
- ODER -
Den Inhalt der Wells kräftig ausschütteln.
Wells **3-mal** mit **300 µL** verdünnter *Wash Solution* waschen bei manueller Durchführung.
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 Waschschrittes!
7. **100 µL Substrate Solution** in jedes Well geben.
8. **30 Minuten** bei Raumtemperatur inkubieren.
9. Die enzymatische Reaktion durch Zugabe von **100 µL Stop Solution** in jedes Well abstoppen.
10. Die Optische Dichte (OD) bei **450 nm (Messung) und 620 nm bis 630 nm (Abzug des Hintergrundes, empfohlen)** mit einem Mikrotiterplattenleser 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 DRG ELISA gezeigt. Diese Werte sollten **nicht** zur Berechnung von Patientendaten verwendet werden.

Standard	Optische Dichte (450 nm)
<i>Standard 0</i> (0 pg/mL)	1,99
<i>Standard 1</i> (1 pg/mL)	1,80
<i>Standard 2</i> (5 pg/mL)	1,45
<i>Standard 3</i> (10 pg/mL)	1,20
<i>Standard 4</i> (50 pg/mL)	0,48
<i>Standard 5</i> (100 pg/mL)	0,24

7 ERWARTETE WERTE

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

In einer Studie mit dem DRG Salivary Estradiol HS ELISA wurden die Proben von scheinbar gesunden Probanden untersucht. Dabei ergaben sich folgende Werte:

Population	n	Mittelwert (pg/mL)	Median (pg/mL)	2,5. - 97,5. Perzentile (pg/mL)	Bereich (min. - max.) (pg/mL)
Männer	58	3,74	3,45	1,26 – 9,12	0,74 – 11,46
Frauen					
Pre-menopausal					
Follikelphase	26	5,85	3,45	1,32 – 29,35	1,08 – 46,42
Lutealphase	26	4,28	3,12	1,46 – 14,97	1,19 – 22,94
Post-menopausal	26	5,56	3,03	1,21 – 28,43	1,02 – 41,48
Schwangerschaft					
1. Trimester	24	8,27	5,08	2,33 – 25,29	1,90 – 28,98
2. Trimester	24	44,16	39,52	7,29 – 97,68	7,20 – 97,86
3. Trimester	24	75,35	75,69	23,25 – 126,49	21,38 – 149,68

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

8 QUALITÄTSKONTROLLE

Es wird empfohlen, die Kontrollproben gemäß den nationalen gesetzlichen Bestimmungen einzusetzen. Durch die Verwendung von Kontrollproben wird eine Tag-zu-Tag Überprüfung der Ergebnisse erzielt. Es sollten Kontrollen sowohl mit normalem als auch pathologischem Level eingesetzt werden.

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

Es wird ebenfalls empfohlen, an nationalen oder internationalen Qualitätssicherungs-Programmen teilzunehmen, um die Genauigkeit der Ergebnisse zu sichern.

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

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

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

9 ASSAY-CHARAKTERISTIKA

9.1 Messbereich

Der Messbereich des Testes liegt zwischen 0,366 pg/mL – 100 pg/mL.

9.2 Spezifität der Antikörper (Kreuzreaktivität)

entnehmen Sie bitte der ausführlichen englischen Version der Gebrauchsanweisung.

9.3 Sensitivität

Die analytische Sensitivität, definiert als Mittelwert, abzüglich der zweifachen Standardabweichung, des *Standard 0* (n = 20), beträgt 0,195 pg/mL.

Der „Limit of Blank“ (LoB) ist 0,145 pg/mL.

Die Nachweisgrenze (LoD) ist 0,366 pg/mL.

Die Quantifizierungsgrenze (LoQ) ist 0,736 pg/mL.

Die Daten zu:

9.4 Reproduzierbarkeit (Präzision)

9.5 Wiederfindung

9.6 Linearität

9.7 Methodenvergleich

entnehmen Sie bitte der ausführlichen englischen Version der Gebrauchsanweisung.

10 GRENZEN DES TESTS

Zuverlässige und reproduzierbare Ergebnisse werden erzielt, wenn das Testverfahren mit vollständigem Verständnis der Anweisungen in der Gebrauchsanleitung und unter Befolgung der GLP (Good Laboratory Practice)-Richtlinien durchgeführt wird.

Jede unsachgemäße Behandlung von Proben oder Modifikation dieses Tests können die Ergebnisse beeinflussen.

10.1 Interferenzen

Folgende Substanzen erhöhen die Estradiolwerte um mehr als 20 %: Kaffee, Ethanol, Milchkaffee, Zahnpasta, Koffein, Kaugummi, Nikotin.

Im Gegensatz dazu bewirkt Hämoglobin eine Verminderung der Estradiolwerte um mehr als 20 %.

10.2 Beeinflussung durch Medikamente

Der Salivary Estradiol HS ELISA sollte nicht bei Patienten angewendet werden, die mit den Medikamenten Fulvestrant (Faslodex®) und Mifepriston (Mifegyne®) behandelt werden, da dies zu falsch erhöhten Ergebnissen führen könnte.

Auch bei Patienten, die mit L-Thyroxin behandelt werden, können falsch erhöhte Testergebnisse auftreten. Um Interferenzen mit hochdosierter L-Thyroxin-Behandlung zu vermeiden, muss die Probenahme entweder direkt am Morgen vor der Einnahme von L-Thyroxin oder mindestens 12 Stunden nach der Einnahme von L-Thyroxin erfolgen.

10.3 High-Dose-Hook Effekt

Ein Hook-Effekt ist für kompetitive Assays nicht bekannt.

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.

1 DESTINAZIONE D'USO

Il test immuno-enzimatico **DRG Salivary Estradiol HS ELISA** contiene materiale per la determinazione quantitativa di dell'estradiolo attivo libero nella saliva.

Solo per uso diagnostico *in vitro*.

I risultati possono essere utilizzati per valutare i problemi di fertilità nelle donne, per diagnosticare la menopausa e per monitorare la terapia ormonale sostitutiva.

2 PRINCIPIO DEL TEST

Il test kit DRG Salivary Estradiol HS 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 i siti antigenici della molecola di estradiolo.

Durante l'incubazione, l'estradiolo nel campione aggiunto compete con il coniugato enzimatico aggiunto, che è estradiolo coniugato con perossidasi di rafano, per il legame con l'anticorpo rivestito.

Dopo una fase di lavaggio per rimuovere tutte le sostanze non legate, la fase solida viene incubata con la soluzione di substrato. La reazione colorimetrica viene bruscamente interrotta con l'aggiunta di soluzione di arresto e viene misurata la densità ottica (DO) del prodotto giallo risultante.

L'intensità del colore è inversamente proporzionale alla concentrazione dell'analita nel campione.

Una curva standard viene costruita tracciando i valori di DO rispetto alle concentrazioni di standard, e le concentrazioni di campioni sconosciuti vengono determinate usando questa curva standard.

3 PRECAUZIONI

- Questo kit è adatto soltanto per l'uso diagnostico *in vitro*. Solo per l'uso professionale.
- Si prega di usare la versione valida dell'inserito 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 magazzinati 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 DRG Instruments GmbH.

4 COMPONENTI DEL KIT

4.1 Contenuto del kit

1. **Microtiterwells** (Micropozzetti), 12 x 8 file (separatamente staccabili), 96 pozzetti; Pozzetti ricoperti con l'anti-estradiolo anticorpo (policlonale)
2. **Standard (Standard 0 - 5)**, 6 flaconi, 1 mL ognuno, pronto all'uso; Concentrazione: 0 – 1 – 5 – 10 – 50 – 100 pg/mL
Gli standard sono standardizzati contro il seguente materiale di riferimento: Cerilliant E-060.
Contiene conservante senza mercurio.
3. **Control Low & High** (Controllo), 2 flaconi, 1 mL ognuno, pronto all'uso; Per i valori e gli intervalli di controllo si prega di fare riferimento all'etichetta della fiala o al certificato di analisi.
Contiene conservante senza mercurio.
4. **Enzyme Conjugate** (Tracciante enzimatico), 1 flacone, 14 mL, pronto all'uso; Estradiolo coniugato alla perossidasi di rafano;
Contiene conservante senza mercurio.
5. **Substrate Solution** (Soluzione di substrato), 1 flacone, 14 mL, pronto all'uso; TMB (benzidine tetrametilico).
6. **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 Solution** (Soluzione di lavaggio), 1 flacone, 30 mL (concentrata 40X); vedi „preparazione dei reagenti“.

4.2 Materiali richiesti ma non contenuti nel kit

- Lettore di piastre di microtitolazione calibrato (450 nm, con lunghezza d'onda di riferimento a 620 nm a 630 nm) (p.es. il DRG Instruments Microtiterplate Reader)
- Micropipette calibrate di precisione a volume variabile
- Carta assorbente
- Acqua distillata
- Timer
- Carta millimetrata o software per il calcolo dei dati

4.3 Magazzinaggio e stabilità del kit

A 2 °C a 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 a 8 °C. I micropozzetti devono essere magazzinati a 2 °C a 8 °C. Una volta aperti i pacchi, questi devono essere richiusi accuratamente.

Test kits aperti rimangono attivi per 8 settimane 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 (20 °C a 26 °C).

Wash Solution

Diluire 30 mL *Wash Solution* concentrata con 1170 mL di acqua distillata fino ad un volume finale di 1200 mL.

La soluzione di lavaggio diluita è stabile per 1 settimana a temperatura ambiente.

4.5 Smaltimento del kit

La discarica del kit e di tutti i materiali/reagenti usati devono avvenire secondo i regolamenti nazionali. Informazioni aggiuntive per questo prodotto si trovano nella scheda di dati di sicurezza, sezione 13.

4.6 Test kits danneggiati

In caso di alcun danno al test kit o ai suoi componenti, DRG deve essere informato per iscritto, al Massimo una settimana dopo la ricezione del kit. Componenti singoli danneggiati non devono essere usati per un saggio. Questi devono essere conservati fino ad aver trovato una soluzione finale. Dopo, questi componenti devono essere scaricati secondo i regolamenti ufficiali.

5 CAMPIONI

La saliva può essere utilizzata in questo test.

Il prelievo deve essere effettuato la mattina **prima** dell'assunzione di cibo, bere o fumare. Si consiglia di sciacquare la bocca accuratamente con acqua fredda 5 minuti prima del campionamento.

Se il campionamento deve essere effettuato durante il giorno, è necessario evitare di mangiare, bere, fumare, masticare gomme o lavarsi i denti almeno 2 ore prima del campionamento.

Non raccogliere campioni in presenza di malattie orali, infiammazioni o lesioni (contaminazione del sangue).

Nota: i campioni contenenti sodio azide non devono essere utilizzati nel test.

Fare riferimento ai capitoli "Sostanze interferenti" e "Droghe interferenti".

5.1 Collezione dei campioni

I campioni di saliva devono essere raccolti utilizzando SALI-TUBES 100 (REF SLV-4158, disponibile presso DRG).

Altri dispositivi di campionamento della saliva non sono stati testati e devono essere convalidati sotto la responsabilità dell'utente.

5.2 Conservazione e preparazione dei campioni

Campioni di saliva fresca

Immediatamente dopo l'arrivo in laboratorio, i campioni di saliva fresca devono essere **congelati almeno per una notte a -20 °C**.

Ogni campione di saliva deve essere congelato, scongelato e centrifugato per separare le mucine mediante centrifugazione.

Conservazione: immediatamente a -20 °C

Quindi i campioni devono essere scongelati e centrifugati per 5 a 10 minuti a 10 000 g.

Successivamente, il supernatante trasparente deve essere trasferito in una nuova provetta.

Solo questo supernatante chiaro può essere utilizzato come campione per l'ELISA.

Se deve essere testato un set di più campioni, il laboratorio deve **miscelare aliquote del supernatante dei 5 campioni singoli** in un dispositivo di campionamento separato ed eseguire il test da questa miscela.

Supernatante

Conservazione: fino a 7 giorni a 2 °C a 8 °C
almeno 2 mesi a -20 °C, in aliquote

Il supernatante dovrebbe essere congelato solo una volta.

Il supernatante scongelato deve essere invertito più volte prima del test!

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 0,9% NaCl e nuovamente determinato. Della diluizione deve essere però tenuto conto.

Esempio:

- a) diluizione 1:2: 50 µL campione + 50 µL 0,9% NaCl (agitare bene)
b) diluizione 1:10: 10 µL campione + 90 µL 0,9% NaCl (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.
- 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 Eseguito del test

Ogni analisi deve includere una curva standard.

1. Fissare i pozzetti necessari sul supporto.
2. Pipettare **100 µL** ciascuno di **Standard, Control** e **campioni** nei pozzetti appropriati, cambiando ogni volta la punta monouso.
3. Incubare per **60 minuti** a temperatura ambiente.
4. Pipettare **100 µL Enzyme Conjugate** in ogni pozzetto. Agitare bene per 10 secondi. È molto importante raggiungere un completo mescolamento.
5. Incubare per **60 minuti** a temperatura ambiente.
6. Lavare i pozzetti **3 volte** con **400 µL Wash Solution** diluita in ogni pozzetto, se si utilizza una piastra di lavaggio.
- OPPURE -
Rovesciare la piastra per vuotare i pozzetti.
Lavare i pozzetti **3 volte** con **300 µL Wash Solution** diluita in ogni pozzetto per il lavaggio manuale.
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 eseguito del lavaggio!
7. Aggiungere **100 µL** della **Substrate Solution** ad ogni pozzetto.
8. Incubare per **30 minuti** a temperatura ambiente.
9. Fermare la reazione enzimatica aggiungendo **100 µL** della **Stop Solution** ad ogni pozzetto.
10. Determinare la densità ottica (DO) della soluzione in ogni pozzetto **a 450 nm (lettura) e a 620 nm a 630 nm (sottrazione dello sfondo, raccomandata)** con un lettore di piastre di microtitolazione.
Si raccomanda di leggere i pozzetti entro **10 minuti** dall'aggiunta della **Stop Solution**.

6.3 Rilevamento dei risultati

1. Determinare i valori medi della densità ottica (DO) per ogni set di standard, controlli e campioni.
2. Costruire una curva standard: riportare i valori medi della densità ottica (DO) di ogni standard contro la rispettiva concentrazione dove i valori delle DO si devono trovare sull'asse verticale (Y) e le concentrazioni sull'asse orizzontale (X).
3. Utilizzando il valore medio delle DO 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'eseguito del test.

Standard	Densità ottiche (450 nm)
Standard 0 (0 pg/mL)	1,99
Standard 1 (1 pg/mL)	1,80
Standard 2 (5 pg/mL)	1,45
Standard 3 (10 pg/mL)	1,20
Standard 4 (50 pg/mL)	0,48
Standard 5 (100 pg/mL)	0,24

7 VALORI NORMALI

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

In uno studio condotto con soggetti apparentemente sani, usando il DRG Salivary Estradiol HS ELISA, i seguenti valori sono stati trovati:

Popolazione	n	Media (pg/mL)	Mediano (pg/mL)	2,5. - 97,5. percentile (pg/mL)	Intervallo (min. - max.) (pg/mL)
Uomini	58	3,74	3,45	1,26 – 9,12	0,74 – 11,46
Uomini					
Pre-menopausa					
Fase follicolare	26	5,85	3,45	1,32 – 29,35	1,08 – 46,42
Fase luteale	26	4,28	3,12	1,46 – 14,97	1,19 – 22,94
Post menopausa	26	5,56	3,03	1,21 – 28,43	1,02 – 41,48
Gravidanza					
1° trimestre	24	8,27	5,08	2,33 – 25,29	1,90 – 28,98
2° trimestre	24	44,16	39,52	7,29 – 97,68	7,20 – 97,86
3° trimestre	24	75,35	75,69	23,25 – 126,49	21,38 – 149,68

Come per tutti i test diagnostici, una diagnosi clinica definitiva **non** dovrebbe basarsi sui risultati di un singolo dosaggio. Una diagnosi clinica dovrebbe essere formulata dal medico in seguito ad un'attenta valutazione di tutti gli aspetti clinici assieme ai dati di laboratorio.

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.

È altresì consigliabile di partecipare a programmi di sicurezza sulla qualità nazionali o internazionali, per assicurarsi dell'esattezza 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 DRG.

9 CARATTERISTICHE DEL TEST

9.1 Assay Dynamic Range

Le concentrazioni determinabili con questo test stanno tra 0,366 pg/mL – 100 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 deviazione standard, di venti (20) repliche dello *Standard 0* ed erano 0,195 pg/mL.

Il limite del bianco (LoB) è 0,145 pg/mL.

Il limite di rilevabilità (LoD) è 0,366 pg/mL.

Il limite di quantificazione (LoQ) è 0,736 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

Le seguenti sostanze aumenteranno i valori di estradiolo di oltre il 20%: caffè, etanolo, caffè con latte, dentifricio, caffeina, chewing gum, nicotina.

Al contrario, l'emoglobina ridurrà i valori di estradiolo di oltre il 20%.

10.2 Droghe interferenti

Il Salivary Estradiol HS ELISA non deve essere utilizzato per i pazienti in trattamento con i farmaci Fulvestrant (Faslodex®) e Mifepristone (Mifegyne®), poiché ciò potrebbe portare a risultati falsamente elevati.

I pazienti che sono in trattamento con L-tiroxina possono anche mostrare risultati del test falsamente elevati. Per evitare interferenze con il trattamento ad alte dosi di L-tiroxina, il campionamento deve essere effettuato direttamente al mattino prima di assumere L-tiroxina o almeno 12 ore dopo l'assunzione di L-tiroxina.

10.3 Effetto Hook (Gancio) ad alto dosaggio

Un effetto ad alto dosaggio non è noto per i test competitivi.

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 DRG.

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.

1 FINALIDAD PREVISTA

El Kit de inmunoensayo enzimático DRG Salivary Estradiol HS ELISA proporciona los materiales necesarios para la determinación cuantitativa del estradiol libre activo en la saliva.

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

Los resultados se pueden utilizar para evaluar los problemas de fertilidad en las mujeres, para diagnosticar la menopausia y para controlar la terapia de reemplazo hormonal.

2 FUNDAMENTO DEL ENSAYO

El Kit DRG Salivary Estradiol HS ELISA es un ensayo en fase sólida de inmunoadsorción unido a enzimas (ELISA), basado en el **principio de unión competitiva**.

Los pocillos de la placa están recubiertos con un anticuerpo policlonal dirigido contra los sitios antigénicos de la molécula estradiol.

Durante la incubación, el estradiol en la muestra agregada compite con el conjugado enzimático agregado, que es estradiol conjugado con peroxidasa de rábano, por unirse al anticuerpo recubierto.

Después de un paso de lavado para eliminar todas las sustancias no ligadas, la fase sólida se incuba con la solución de sustrato. La reacción colorimétrica se detiene mediante la adición de la solución de parada, y se mide la densidad óptica (OD) del producto amarillo resultante.

La intensidad del color es inversamente proporcional a la concentración del analito en la muestra.

Se construye una curva estándar trazando los valores de DO frente a las concentraciones de los estándares, y las concentraciones de las muestras desconocidas se determinan utilizando esta curva estándar.

3 PRECAUCIONES

- Este kit es solamente para diagnóstico *in vitro*. Solo para uso profesional.
- Por favor, se usa solo la versión válida de la metodología técnica incluido aquí 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 H₂SO₄ 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.

4 COMPONENTES DEL KIT

4.1 Componentes del Kit

1. **Microtiterwells** (Placas multipocillo), 12 x 8 tiras separables, 96 pocillos; Pocillos recubiertos con anticuerpo anti-estradiol (policlonal).
2. **Standard (Standard 0 - 5)**, (Estándar), 6 viales, 1 mL cada, listos para usar; Concentraciones: 0 – 1 – 5 – 10 – 50 – 100 pg/mL
Los estándares están calibrado contra el siguiente material de referencia: Cerilliant E-060
Contiene conservante sin mercurio.
3. **Control Low & High** (Control), 2 viales, 1 mL cada, listos para usar; Para los valores y rangos de control, por favor consulte la etiqueta del frasco o el Certificado de Análisis.
Contiene conservante sin mercurio.
4. **Enzyme Conjugate** (Conjugado enzimático), 1 vial, 14 mL, listo para usar; estradiol conjugado con la peroxidasa de rábano;
Contiene conservante sin mercurio.
5. **Substrate Solution** (Solución de sustrato), 1 vial, 14 mL, listo para usar; Tetrametilbencidina (TMB).
6. **Stop Solution** (Solución de parada), 1 vial, 14 mL, listo para usar; Contiene 0.5 M H₂SO₄,
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".

4.2 Equipamiento y material requerido pero no provisto

- Lector de microplacas calibrado (450 nm, con longitud de onda de referencia a 620 nm a 630 nm) (ej. DRG Instruments Microtiter Plate Reader)
- Micropipetas de precisión variable calibradas
- Papel absorbente
- Agua destilada
- Temporizador
- Papel cuadriculado o software para el cálculo de datos

4.3 Almacenamiento y estabilidad del kit

Cuando se almacena a 2 °C a 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 a 8 °C. Las placas multipocillo han de almacenarse a 2 °C a 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 (20 °C a 26 °C) antes de usarse.

Wash Solution

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

La solución del lavado diluida es estable durante 1 semana a temperatura ambiente.

4.5 Eliminación del Kit

El desecho del kit y de los materiales/reactivos usados ha de realizarse conforme a la regulación nacional en vigor. Información adicional sobre este producto se ofrece en las hojas de datos de seguridad (Safety Data Sheet), sección 13).

4.6 Kits de ensayo dañados

En caso de cualquier daño severo en el kit o en sus componentes, DRG ha de ser informada por escrito una semana después de recibir el kit como fecha límite. Componentes individuales que hayan sufrido daños importantes no deberían usarse para realizar el test. Han de ser almacenados hasta que se haya encontrado una solución final al problema. Después de encontrarse una solución, pueden ser desechados en concordancia con las reglas oficiales en vigor.

5 MUESTRAS

En este ensayo se puede utilizar saliva.

El muestreo debe realizarse por la mañana **antes** de ingerir alimentos, beber o fumar. Se recomienda enjuagar bien la boca con agua fría 5 minutos antes del muestreo.

Si el muestreo debe realizarse durante el día, se debe evitar comer, beber, fumar, masticar chicle o cepillarse los dientes al menos 2 horas antes del muestreo.

No recolecte muestras cuando existan enfermedades, inflamación o lesiones bucales (contaminación sanguínea).

Nota: Las muestras que contienen azida de sodio no deben usarse en el ensayo.

Consulte los capítulos " Sustancias que pueden interferir" e " Interferencias con drogas".

5.1 Recogida de la muestra

Las muestras de saliva deben recogerse utilizando SALI-TUBES 100 (REF SLV-4158, disponible en DRG).

Otros dispositivos de muestreo de saliva no se han probado y deben validarse bajo la responsabilidad del usuario.

5.2 Almacenamiento y preparación de muestras

Muestras de saliva fresca

Inmediatamente después de llegar al laboratorio, las muestras de saliva fresca deben **congelarse al menos durante la noche a -20 °C**.

Cada muestra de saliva debe congelarse, descongelarse y centrifugarse para separar las mucinas por centrifugación.

Almacenamiento: inmediatamente a -20 ° C.

Luego, las muestras deben descongelarse y centrifugarse durante 5 a 10 minutos a 10 000 g.

A partir de entonces, el sobrenadante transparente debe transferirse a un tubo nuevo.

Solo este sobrenadante transparente se puede utilizar como muestra para el ELISA.

Si se debe analizar un conjunto de muestras múltiples, el laboratorio debe **mezclar alícuotas del sobrenadante de 5 muestras individuales** en un dispositivo de muestreo separado y realizar la prueba a partir de esta mezcla.

Sobrenadante

Almacenamiento: hasta 7 días entre 2 °C y 8 °C
al menos 2 meses a -20 ° C, en alícuotas

El sobrenadante se debe congelar solo una vez.

¡El sobrenadante descongelado debe invertirse varias veces antes de la prueba!

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 0,9% NaCl 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 1:2: 50 µL muestra + 50 µL 0,9% NaCl (mezclar totalmente)
- b) dilución 1:10: 10 µL muestra + 90 µL 0,9% NaCl (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 densidad óptica 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. Incubar durante **60 minutos** a temperatura ambiente.
4. Dispensar **100 µL** de **Enzyme Conjugate** a cada pocillo.
Mezclar totalmente durante 10 segundos. Es importante mezclar completamente en este paso.
5. Incubar durante **60 minutos** a temperatura ambiente.
6. Lavar los pocillos **3 veces** con **400 µL Wash Solution** diluida por pocillo, si se utiliza un lavador de placas.
- O -
Sacudir enérgicamente el contenido de los pocillos.
Lavar los pocillos **3 veces** con **300 µL Wash Solution** diluida por pocillo para el lavado manual.
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!
7. Adicionar **100 µL** de **Substrate Solution** a cada pocillo.
8. Incubar durante **30 minutos** a temperatura ambiente.
9. Parar la reacción enzimática mediante la adición de **100 µL** de **Stop Solution** a cada pocillo.
10. Determinar la densidad óptica (DO) de la solución en cada pocillo a **450 nm (lectura)** y a **620 nm a 630 nm (se recomienda la sustracción de fondo)** con un lector de microplacas. Se recomienda que los pocillos se lean dentro de los **10 minutos** siguientes a la adición de la solución de parada (*Stop Solution*).

6.3 Cálculo de los Resultados

1. Calcular los valores de densidad óptica (DO) promedio para cada conjunto de estándares, controles y muestras de pacientes.
2. Construir una curva estándar mediante la representación de la densidad óptica media obtenida para cada estándar frente a su concentración con el valor de DO en el eje vertical (Y) y la concentración en el eje horizontal (X).
3. Usando el valor de la DO media de cada muestra determinar la concentración correspondiente a partir de la curva estándar.
4. Método automatizado: Los resultados en las instrucciones de uso se han calculado automáticamente usando una curva de regresión 4-Parámetros. (4-Parámetros Rodbard o 4-Parámetros Marquardt son los métodos preferidos.) Otras funciones de regresión darán lugar a resultados sensiblemente diferentes.
5. La concentración de las muestras 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	Densidad óptica (450 nm)
<i>Standard 0</i> (0 pg/mL)	1,99
<i>Standard 1</i> (1 pg/mL)	1,80
<i>Standard 2</i> (5 pg/mL)	1,45
<i>Standard 3</i> (10 pg/mL)	1,20
<i>Standard 4</i> (50 pg/mL)	0,48
<i>Standard 5</i> (100 pg/mL)	0,24

7 VALORES ESPERADOS

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

En un estudio llevado a cabo con individuos aparentemente sanos, usando el DRG Salivary Estradiol HS ELISA, se obtuvieron los siguientes valores:

Población	n	Media (pg/mL)	Mediana (pg/mL)	Percentil 2,5 - 97,5 (pg/mL)	Rango (min. - max.) (pg/mL)
Hombres	58	3,74	3,45	1,26 – 9,12	0,74 – 11,46
Mujeres					
Premenopáusica					
Fase folicular	26	5,85	3,45	1,32 – 29,35	1,08 – 46,42
Fase lútea	26	4,28	3,12	1,46 – 14,97	1,19 – 22,94
Posmenopáusica	26	5,56	3,03	1,21 – 28,43	1,02 – 41,48
Etapas del embarazo					
1. trimestre	24	8,27	5,08	2,33 – 25,29	1,90 – 28,98
2. trimestre	24	44,16	39,52	7,29 – 97,68	7,20 – 97,86
3. trimestre	24	75,35	75,69	23,25 – 126,49	21,38 – 149,68

Los resultados obtenidos no deberían ser el único motivo para una intervención terapéutica. Los resultados han de correlacionarse con otras observaciones clínicas y tests de diagnóstico.

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 arriba mencionado 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 0,366 pg/mL – 100 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 veces la desviación estándar de veinte (20) réplicas del *Standard 0* y resultó ser 0,195 pg/mL.

El límite del blanco (LoB) es 0,145 pg/mL.

El Límite de Detección (LoD) es 0,366 pg/mL.

El Límite de Cuantificación (LoQ) es 0,736 pg/mL.

Para información sobre

9.4 Precisión

9.5 Recuperación

9.6 Linealidad

9.7 Comparativa de métodos

por favor consulte la versión detallada en inglés de las Instrucciones de Uso.

10 LIMITACIONES DE USO

Únicamente se obtendrán resultados fiables y reproducibles, cuando el procedimiento del ensayo se realice entendiendo las instrucciones de uso correctamente y desarrollando buenas prácticas de laboratorio.

Cualquier manejo impropio de las muestras o modificación del test puede influenciar los resultados.

10.1 Sustancias que pueden interferir

Las siguientes sustancias aumentarán los valores de estradiol en más de un 20 %: café, etanol, café con leche, pasta de dientes, cafeína, chicle, nicotina.

Por el contrario, la hemoglobina reducirá los valores de estradiol en más del 20 %.

10.2 Interferencias con drogas

El Salivary Estradiol HS ELISA no debe usarse en pacientes que estén siendo tratados con los medicamentos Fulvestrant (Faslodex®) y Mifepristone (Mifegyne®), ya que esto podría conducir a resultados falsamente elevados.

Los pacientes que están en tratamiento con L-tiroxina también pueden mostrar resultados de prueba falsamente elevados. Para evitar interferencias con el tratamiento con dosis altas de L-tiroxina, el muestreo debe realizarse directamente por la mañana antes de tomar L-tiroxina o al menos 12 horas después de tomar L-tiroxina.

10.3 Efecto de Alta Concentración (Gancho)

Un efecto de gancho de dosis alta no se conoce para ensayos competitivos.

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.

1 UTILISATION PRÉVUE

Le kit de dosage immuno-enzymatique **DRG Salivary Estradiol HS ELISA** propose le matériel requis pour la mesure quantitative de l'œstradiol libre actif, une hormone stéroïde œstrogénique, dans la salive.

Ce kit est à utiliser uniquement dans le cadre de tests **diagnostiques *in vitro***.

Les résultats peuvent être utilisés dans l'identification des troubles de la fertilité chez la femme, pour diagnostiquer la ménopause et pour le contrôle dans le cadre d'une thérapie hormonale.

2 PRINCIPE DU TEST

Le kit DRG Salivary Estradiol HS ELISA est un test immuno-enzymatique en phase solide (ELISA basé sur le **principe de liaison compétitive**).

Les puits de microtitration sont recouverts d'un anticorps polyclonal dirigé contre les sites antigéniques de la molécule d'œstradiol.

Au cours de la incubation, l'œstradiol présent dans l'échantillon ajouté entre en compétition avec le conjugué enzymatique ajouté, qui est de l'œstradiol conjugué à la peroxydase de raifort (HRP), pour se fixer à l'anticorps enrobé.

Après une étape de lavage pour éliminer toutes les substances non liées, la phase solide est incubée avec la solution de substrat. La réaction colorimétrique est arrêtée par l'ajout d'une solution d'arrêt, et la densité optique (DO) du produit jaune résultant est mesurée. L'intensité de la couleur est inversement proportionnelle à la concentration de l'analyte dans l'échantillon.

Une courbe standard est construite en traçant les valeurs de DO par rapport aux concentrations des étalons, et les concentrations des échantillons inconnus sont déterminées à l'aide de cette courbe standard.

3 AVERTISSEMENTS ET PRECAUTIONS

- Ce kit est uniquement destiné aux tests diagnostiques *in vitro*. Pour un usage professionnel seulement.
- Utilisez uniquement la version valide d'instructions d'utilisation qui est incluse dans le kit.
- Les informations concernant la toxicité des réactifs contenus dans ce kit sont présentées dans la fiche de sécurité (« Safety Data Sheets »).
- Tous les réactifs de ce kit contenant du sérum ou du plasma humain ont été testés avec des résultats négatifs pour le VIH I/II, le HBsAg et le HCV selon les normes FDA en vigueur. Néanmoins, lors de leur utilisation, tous les réactifs de ce kit doivent être manipulés avec précaution.
- Éviter les contacts avec la *Stop Solution*, celle-ci contient 0,5 M de H₂SO₄. Cela pourrait engendrer irritations ou brûlures de la peau.
- Ne jamais pipeter avec la bouche, et éviter tout contact de la peau ou des muqueuses avec les réactifs ou les échantillons.
- Ne pas fumer, manger, boire ou utiliser des produits cosmétiques dans les zones où les échantillons ou le kit ont été maniés.
- Porter des gants d'examen lors de l'utilisation des échantillons ou des réactifs. Une contamination microbienne des échantillons ou des réactifs pourrait fausser les résultats.
- L'utilisation de ce kit devra être en accord avec les normes ou recommandations nationales de sécurité en vigueur concernant les produits à risque biologique.
- Ne pas utiliser les réactifs au-delà de la date d'expiration inscrite sur l'emballage.
- Tous les volumes indiqués doivent être scrupuleusement respectés, comme indiqué dans le protocole expérimental. Seule l'utilisation de pipettes calibrées ou d'un spectrophotomètre lecteur de microplaques calibré garantit l'obtention de résultats optimaux à ce test.
- Ne pas mélanger ou utiliser des réactifs contenus dans des kits de lots différents. Il est conseillé de ne pas échanger les puits de différentes plaques, même si celles-ci proviennent du même lot. Les kits peuvent avoir été transportés ou stockés différemment, et les caractéristiques de liaison de chaque plaque pourraient ainsi être modifiées.
- L'élimination des solutions chimiques et des réactifs contenus dans ce kit, utilisés ou non, doit être en accord avec la réglementation nationale en vigueur concernant l'élimination des déchets à risque biologique.
- La fiche de sécurité concernant ce produit peut être obtenue en contactant directement DRG Instruments GmbH.

4 RÉACTIFS

4.1 Réactifs fournis

1. **Microtiterwells** (*Microplaques*), 12 x 8 (à détacher) barrettes, plaques de 96 puits; Les puits sont recouverts avec un anticorps anti-oestradiol (polyclonal).
2. **Standard (Standard 0 - 5)**, 6 flacons, 1 mL chacun, prêts à l'emploi; Concentrations: 0 – 1 – 5 – 10 – 50 – 100 pg/mL
Les standards sont étalonnés par rapport au matériel de référence suivante: Cerilliant E-060
Contient un agent de conservation sans mercure.
3. **Control Low & High** (Contrôle), 2 flacons, 1 mL chacun, prêts à l'emploi; Pour les valeurs de contrôle et les limites, se référer à l'étiquette du flacon ou au certificat d'analyse.
Contient un agent de conservation sans mercure.
4. **Enzyme Conjugate** (Conjugué enzymatique), 1 flacon, 14 mL, prêt à l'emploi; Oestradiol conjugué à la HRP;
Contient un agent de conservation sans mercure.
5. **Substrate Solution** (Solution substrat), 1 flacon, 14 mL, prêt à l'emploi; Tétraméthylbenzidine (TMB).
6. **Stop Solution** (Solution d'arrêt), 1 flacon, 14 mL, prêt à l'emploi; Contient 0,5 M de H₂SO₄.
Eviter les contacts avec la solution stop. Cela pourrait engendrer des irritations ou brûlures de la peau.
7. **Wash Solution** (Solution de lavage), 1 flacon (concentré 40X); Voir « Préparation des réactifs ».

4.2 Equipement et matériel requis, mais non fournis

- Un spectrophotomètre lecteur de microplaques calibré (450 nm, avec longueur d'onde de référence à 620 nm à 630 nm) (ex. le lecteur de microplaques de DRG Instruments GmbH)
- Des micro-pipettes de précision variables et calibrées
- Du papier absorbant
- De l'eau distillée
- Un minuteur
- Papier graphique ou logiciel pour la réduction des données

4.3 Stockage et stabilité du kit

Les réactifs contenus dans des flacons non-ouverts, stockés à 2 °C à 8 °C, seront stables jusqu'à la date d'expiration inscrite sur l'étiquette. Ne pas utiliser les réactifs au-delà de cette date.

Les réactifs contenus dans des flacons ouverts doivent être stockés à 2 °C à 8 °C. Les microplaques doivent être stockées à 2 °C à 8 °C. Une fois le sachet en aluminium ouvert, attention à bien refermer le flacon.

Les kits ouverts conservent leur activité durant 8 semaines s'ils sont stockés comme précédemment mentionné.

4.4 Préparation des réactifs

Amener tous les réactifs et le nombre de barrettes nécessaires au test à température ambiante (20 °C à 26 °C) avant utilisation.

Wash Solution

Pour le tampon de lavage (1x), diluer 30 mL de *Wash Solution* (40x) dans 1170 mL d'eau distillée pour un volume final de 1200 mL.

La solution de lavage diluée est stable pendant 1 semaine à température ambiante.

4.5 Elimination du kit

L'élimination du kit et de tout le matériel/tous les réactifs doit être conforme aux réglementations nationales. Des informations spécifiques au produit sont indiquées dans la fiche de données de sécurité, rubrique 13.

4.6 Kits endommagés

En cas de dommage du kit de tests ou de ses composants, DRG doit en être informé par écrit, au plus tard une semaine après réception du kit. Les composants endommagés ne doivent pas être utilisés pour le test. Ils doivent être stockés jusqu'à ce qu'une solution adaptée ait été trouvée. Après cela, ils doivent être éliminés conformément à la réglementation en vigueur.

5 PRÉLÈVEMENT ET PRÉPARATION DES SPÉCIMENS

La salive peut être utilisée dans ce test.

L'échantillonnage doit être effectué le matin **avant** la prise de nourriture, boire ou fumer. Il est recommandé de se rincer soigneusement la bouche à l'eau froide 5 minutes avant le prélèvement.

Si l'échantillonnage doit être fait pendant la journée, il faut éviter de manger, de boire, de fumer, de mâcher des gommes ou de se brosser les dents au moins 2 heures avant le prélèvement.

Ne prélevez pas d'échantillons en cas de maladie bucco-dentaire, d'inflammation ou de lésions (contamination sanguine).

Remarque: les échantillons contenant de l'azide de sodium ne doivent pas être utilisés dans le test.

Veillez-vous référer aux chapitres «Substances interférentes» et «Drogues interférentes».

5.1 Prélèvement des spécimens

Les échantillons de salive doivent être prélevés à l'aide de SALI-TUBES 100 (REF SLV-4158, disponible auprès de DRG).

Les autres dispositifs de prélèvement de salive n'ont pas été testés et doivent être validés sous la responsabilité de l'utilisateur.

5.2 Stockage et préparation des spécimens

Échantillons de salive fraîche

Immédiatement après leur arrivée au laboratoire, les échantillons de salive fraîche doivent être **congelés au moins une nuit à -20 °C**.

Chaque échantillon de salive doit être congelé, décongelé et centrifugé afin de séparer les mucines par centrifugation.

Stockage: immédiatement à -20 °C

Ensuite, les échantillons doivent être décongelés et centrifugés pendant 5 à 10 minutes à 10 000 g.

Ensuite, le surnageant clair doit être transféré dans un tube neuf.

Seul ce surnageant clair peut être utilisé comme échantillon pour l'ELISA.

Si un ensemble d'échantillons multiples doit être testé, le laboratoire doit **mélanger des aliquotes du surnageant de 5 échantillons individuels** dans un dispositif d'échantillonnage séparé et effectuer les tests à partir de ce mélange.

Surnageant

Conservation: jusqu'à 7 jours entre 2 °C et 8 °C
au moins 2 mois à -20 °C, en aliquotes

Le surnageant ne doit être congelé qu'une seule fois.

Le surnageant décongelé doit être inversé plusieurs fois avant le test!

5.3 Dilution de l'échantillon

Si, lors d'un test préliminaire, la concentration de l'échantillon se révèle être supérieure à celle du standard le plus concentré, alors l'échantillon doit être dilué avec le 0,9% NaCl et testé de nouveau, comme décrit dans Réalisation du test. Pour le calcul des concentrations, ce facteur de dilution doit être pris en considération.

Exemple:

a) dilution 1:2: 50 µL de l'échantillon + 50 µL 0,9% NaCl (bien mélanger).

b) dilution 1:10: 10 µL de l'échantillon + 90 µL 0,9% NaCl (bien mélanger).

6 RÉALISATION DU TEST

6.1 Remarques générales

- Tous les réactifs et échantillons doivent être amenés à température ambiante avant utilisation. Tous les réactifs doivent être mélangés, sans formation de mousse.
- Une fois la procédure engagée, toutes les étapes doivent être réalisées sans interruption.
- Utiliser un nouvel embout de pipette pour chaque standard, contrôle ou échantillon, ceci afin d'éviter toute contamination.
- La densité optique est fonction du temps d'incubation et de la température. Avant de commencer le test, il est recommandé de préparer tous les réactifs, bouchons ouverts, de préparer les puits des microplaques, etc. Cela garantira un intervalle de temps équivalent entre chaque étape, sans interruption.
- En règle générale, la réaction enzymatique est linéairement proportionnelle au temps et à la température.

6.2 Réalisation du dosage

Chaque test doit inclure une courbe étalon.

1. Disposer le nombre de puits de micro-titration désiré dans le support.
2. Déposer **100 µL** de chaque **Standard, Control** et les **échantillons**, avec de nouveaux cônes de pipette, dans les puits appropriés.
3. Incuber pendant **60 minutes** à température ambiante.
4. Déposer **100 µL d'Enzyme Conjugate** dans chaque puits.
Bien mélanger pendant 10 secondes. Il est important d'obtenir un mélange parfait lors de cette étape.
5. Incuber pendant **60 minutes** à température ambiante.
6. Rincer les puits **3 fois** avec **400 µL** de la *Wash Solution* diluée par puits, si un laveur de microplaques est utilisé.
- OU -
Décanter le contenu des puits.
Rincer les puits **3 fois** avec **300 µL** de la *Wash Solution* diluée par puits pour un lavage manuel.
Tapoter les puits sur du papier absorbant afin d'éliminer les gouttelettes résiduelles.
Remarque importante:
La sensibilité et la précision de ce test sont fortement dépendantes de la bonne réalisation des étapes de lavage!
7. Ajouter **100 µL** de **Substrate Solution** à chaque puits.
8. Incuber pendant **30 minutes** à température ambiante.
9. Stopper la réaction enzymatique en ajoutant **100 µL** de **Stop Solution** à chaque puits.
10. Déterminer la densité optique (DO) de la solution dans chaque puits à **450 nm (lecture) et à 620 nm à 630 nm (soustraction de fond, recommandée)** à l'aide d'un spectrophotomètre lecteur de microplaques.
Il est recommandé de lire les puits dans les **10 minutes** qui suivent l'ajout de la solution d'arrêt (*Stop Solution*).

6.3 Calcul des résultats

1. Calculer les valeurs moyennes des densités optiques (DO) pour chaque série de standards, contrôles et échantillons.
2. Etablir la courbe étalon en reportant la densité optique moyenne de chaque valeur standard en fonction de sa concentration, en posant la densité optique en axe des ordonnées et la concentration en axe des abscisses.
3. L'utilisation de la densité optique moyenne pour chaque échantillon détermine la concentration correspondante à partir de la courbe étalon.
4. Méthode automatique: Les résultats dans les instructions d'utilisation ont été calculés de façon automatique en utilisant une courbe de régression 4-Paramètres. (4-paramètres Rodbard ou 4-paramètres Marquardt sont les méthodes favorites.) D'autres fonctions logistiques peuvent donner des résultats légèrement différents.
5. La concentration des échantillons peut être lue directement à partir de cette courbe étalon. Les échantillons avec une concentration supérieure à celle du standard le plus concentré doivent être dilués de nouveau ou rapportés comme étant > 100 pg/mL. Pour le calcul des concentrations, ce facteur de dilution doit être pris en considération.

6.3.1 Exemple d'une courbe standard typique

Les résultats suivants sont ici présentés à titre d'exemple et **ne peuvent** être utilisés au moment de l'essai.

Standard	Densité optique (450 nm)
<i>Standard 0</i> (0 pg/mL)	1,99
<i>Standard 1</i> (1 pg/mL)	1,80
<i>Standard 2</i> (5 pg/mL)	1,45
<i>Standard 3</i> (10 pg/mL)	1,20
<i>Standard 4</i> (50 pg/mL)	0,48
<i>Standard 5</i> (100 pg/mL)	0,24

7 VALEURS NORMALES ATTENDUES

Il est fortement recommandé à chaque laboratoire de déterminer ses propres valeurs normales et pathologiques.

Dans une étude menée sur des sujets apparemment sains, à l'aide du test Salivary Estradiol HS ELISA de DRG, les valeurs suivantes ont été observées :

Population	n	Valeur moyenne (pg/mL)	Médiane (pg/mL)	2,5. - 97,5. Percentile (pg/mL)	Portée (min. - max.) (pg/mL)
Hommes	58	3,74	3,45	1,26 – 9,12	0,74 – 11,46
Femmes					
Préménopause					
Phase folliculaire	26	5,85	3,45	1,32 – 29,35	1,08 – 46,42
Phase lutéale	26	4,28	3,12	1,46 – 14,97	1,19 – 22,94
Postménopausique	26	5,56	3,03	1,21 – 28,43	1,02 – 41,48
Les étapes de la grossesse					
1. Trimestre	24	8,27	5,08	2,33 – 25,29	1,90 – 28,98
2. Trimestre	24	44,16	39,52	7,29 – 97,68	7,20 – 97,86
3. Trimestre	24	75,35	75,69	23,25 – 126,49	21,38 – 149,68

Les résultats ne doivent pas être utilisés seuls pour déterminer les décisions thérapeutiques. Ils doivent être corrélés avec d'autres observations cliniques et tests diagnostiques.

8 CONTROLE DE QUALITE

Il est recommandé d'utiliser les échantillons contrôles selon les réglementations nationales en vigueur. L'utilisation des échantillons contrôles est recommandée afin de s'assurer jour après jour de la validité des résultats. Utiliser les contrôles de valeurs normales et pathologiques.

Les contrôles et les résultats correspondants issus du laboratoire QC sont mentionnés dans le certificat QC fourni avec le kit. Les valeurs et les limites mentionnées sur la fiche QC font toujours référence au lot de kit courant et doivent être utilisées pour une comparaison directe avec les résultats.

Il est également recommandé d'utiliser les programmes d'évaluation de qualité nationaux ou internationaux, afin de s'assurer de l'exactitude des résultats.

Utiliser les méthodes d'analyses statistiques appropriées pour l'analyse des valeurs contrôles et des tendances. Si les résultats ne correspondent pas aux limites établies des contrôles, les résultats concernant ces patients doivent être considérées comme non valides.

Dans ce cas, tester les zones techniques suivantes : mécanisme de pipettage et temps; spectrophotomètre, dates d'expiration des réactifs, conditions de stockage et d'incubation, méthodes d'aspiration et de lavage.

Après avoir tester les points mentionnés, si aucune erreur n'est détectée, contacter votre distributeur ou directement la DRG.

9 CARACTERISTIQUES DES PERFORMANCES

9.1 Zone de mesure

Les limites du dosage sont comprises entre 0,366 pg/mL – 100 pg/mL.

9.2 Spécificité des anticorps (réactivité croisée)

Consulter la version anglaise détaillée du mode d'emploi.

9.3 Sensibilité de l'analyse

La sensibilité de l'analyse a été calculée en soustrayant 2 écarts-types de la moyenne de l'analyse de 20 réplicats du *Standard 0* et a été mesurée à 0,195 pg/mL.

La limite du blanc (LoB) est de 0,145 pg/mL.

La limite de détection (LoD) est de 0,366 pg/mL.

La limite de quantification (LoQ) est de 0,736 pg/mL.

Pour obtenir des données concernant

9.4 Précision

9.5 Récupération

9.6 Linéarité

9.7 Comparaison des méthodes

consulter la version anglaise détaillée du mode d'emploi.

10 LIMITES D'UTILISATION

Des résultats fiables et reproductibles seront obtenus lorsque la procédure de test est effectuée avec une compréhension complète de la notice et en respectant les bonnes pratiques de laboratoire.

Toute utilisation impropre des échantillons ou toute modification du test peut influencer les résultats.

10.1 Substances interférentes

Les substances suivantes augmenteront les valeurs d'estradiol de plus de 20 %: café, éthanol, café au lait, dentifrice, caféine, chewing-gum, nicotine.

En revanche, l'hémoglobine diminuera les valeurs d'estradiol de plus de 20 %.

10.2 Drogues interférentes

Le test Salivary Estradiol HS ELISA ne doit pas être utilisé chez les patients traités avec les médicaments Fulvestrant (Faslodex®) et Mifepristone (Mifegyne®), car cela pourrait conduire à des résultats faussement élevés.

Les patients sous traitement par L-thyroxine peuvent également présenter des résultats de test faussement élevés. Pour éviter toute interférence avec le traitement à haute dose de L-thyroxine, le prélèvement doit être effectué soit directement le matin avant de prendre L-thyroxine, soit au moins 12 heures après la prise de L-thyroxine.

10.3 Effet de Hook

Un effet de surdose (effet de crochet à forte dose) n'est pas connu pour les tests compétitifs.

11 ASPECTS JURIDIQUES

11.1 Fiabilité des résultats

Ce test doit être exactement utilisé selon les instructions d'utilisation du fabricant. De plus, les utilisateurs doivent strictement respecter les règles de la bonne pratique de laboratoire, ou autres lois nationales. Cela est spécialement le cas pour l'utilisation des réactifs contrôles. Pour chaque test, il est important d'inclure un nombre suffisant de contrôles, afin de pouvoir valider l'exactitude et la précision du test.

Les résultats du test sont valides si et seulement si tous les contrôles sont compris dans les gammes de mesure mentionnées et si tous les autres paramètres du test sont également compris dans les instructions de ce test. En cas de doute ou d'inquiétude, contacter la DRG.

11.2 Conséquences thérapeutiques

Les suites thérapeutiques ne devront jamais être basées sur les résultats de laboratoire seuls, même si les tous les résultats du test sont en accord avec les points mentionnés dans le paragraphe 11.1. Tout résultat n'est qu'une partie du tableau clinique complet d'un patient.

Les suites thérapeutiques peuvent découler des résultats de laboratoire si et seulement si ceux-ci sont en accord avec l'ensemble du tableau clinique du patient.

Le résultat du test en lui-même ne doit en aucun cas être le seul déterminant des suites thérapeutiques à suivre.

11.3 Responsabilité














Toute modification du kit et / ou échange ou mélange d'un des composants de différents lots, d'un kit à un autre, pourrait affecter de façon négative les résultats attendus et la validité du test dans son ensemble. De telles modifications ou échanges invalident toute réclamation pour remplacement.

Toutes les réclamations soumises, relatives au paragraphe 11.2, et dues à une mauvaise interprétation des résultats de laboratoire de la part du client sont également invalides. Néanmoins, en cas de réclamation, la responsabilité du fabricant n'est pas de dépasser les limites de la valeur du kit. Tout dommage causé au kit lors de son transport n'est pas du ressort de la responsabilité du fabricant.

12 REFERENCES / LITERATURE

1. Tsang BK et al. (1980) Steroid biosynthesis by isolated human ovarian follicular cells in vitro. *J Clin Endocrinol Metab* 1980, 51, 1407 – 11.
2. Gore-Langton RE et al. Follicular steroidogenesis and its control. In: *The physiology of Reproduction*. 1988, Ed.: Knobil et al., 331-385, Raven press, New York.
3. Hall, PF. Steroid synthesis: Organization and Regulation. In: *The Physiology of Reproduction*. 1988, Ed.: Knobil et al., 975 – 988, Raven press, New York
4. Saldanha CJ, Remage-Healey L, and Schlinger BA. "Synaptocrine signaling: steroid synthesis and action at the synapse." *Endocrine reviews* 32.4, 2011, 532–549.
5. Wu CH et al. Free and protein-bound plasma estradiol-17 beta during the menstrual cycle". *The Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism*. 1976, 43 (2), 436–45.
6. Siiteri PK et al. The serum transport of steroid hormones. *Rec Progr Horm Res* 1982, 38, 457 – 510
7. Martin B. et al. Binding of steroids by proteins in follicular fluid of the human ovary. *J Clin Endocrinol Metab* 1982, 35, 443 – 447.
8. Celec P et al. Salivary Sex Hormones during the Menstrual Cycle. *Endocrine Journal* 2009, 56 (3), 521-523
9. Gandara BK, Leresche L, and Mancl L. Patterns of Salivary Estradiol and Progesterone across the Menstrual Cycle *Ann N Y Acad Sci*. 2007, 1098, 446–450.
10. Baird DT Ovarian steroid secretion and metabolism in women. In: *The Endocrine function of the human ovary*. Eds.: James V.H.T., Serio M. and Guisti G., 1976, 125 – 33, Academic press, New York
11. McNtty KP et al. Concentration of estrogens and androgens in human ovarian venous plasma and follicular fluid throughout the menstrual cycle. *J. Endocrinol*. 1976, 71, 77 –85.
12. Gruhn JG, Kazer RR. *Hormonal Regulation of the Menstrual Cycle: The Evolution of Concepts*. Springer Science & Business Media. 2013, 69–73. ISBN 978-1-4899-3496-3.
13. March CM et al. Roles of estradiol and progesterone in eliciting mid-cycle luteinizing hormone and follicle stimulating hormone surges. *J. Clin. Endocrinol. Metab*. 1979, 49, 507 – 12.
14. Stricker R et al. Establishment of detailed reference values for luteinizing hormone, follicle stimulating hormone, estradiol, and progesterone during different phases of the menstrual cycle on the Abbott ARCHITECT analyzer". *Clinical Chemistry and Laboratory Medicine*. 2006, 44 (7), 883–7.
15. Simpson ER and McDonald PC. *Endocrinology of pregnancy*. In: *Textbook of Endocrinology*, Ed.: Williams R.H. 1981, 412 – 22, Saunders Company, Philadelphia.
16. Lipson, SF and Ellison, PT. Comparison of salivary steroid profiles in naturally occurring conception and non-conception cycles. *Hum Reprod*, 1996, 11(10), 2090-96.
17. Choe, JK, Khan-Dawood, FS, and Dawood, MY. Progesterone and estradiol in saliva and plasma during the menstrual cycle. *Am J Obstet Gynecol*, 1983, 147(5), 557-62.
18. Lewis JG. Steroid Analysis in Saliva: An overview. *Clin Biochem Rev* 2006, 27 August 139-146.
19. Gameiro, CM, Romão, F, and Castelo-Branco, C. Menopause and aging: Changes in the immune system –A review. *Maturitas*, 2010, 67(4), 316-20.

SYMBOLS USED

Symbol	English	Deutsch	Italiano	Español	Français
	European Conformity	CE-Konformitäts-kennzeichnung	Conformità europea	Conformidad europea	Conformité normes européennes
	Consult instructions for use *	Gebrauchsanweisung beachten *	Consultare le istruzioni per l'uso	Consulte las instrucciones de uso	Consulter les instructions d'utilisation
	<i>In vitro</i> diagnostic medical device *	<i>In-vitro</i> -Diagnostikum *	Dispositivo medico-diagnostico in vitro	Producto sanitario para diagnóstico in vitro	Dispositif médical de diagnostic in vitro
	Catalogue number *	Artikelnummer *	No. di Cat.	No de catálogo	Référence
	Batch code *	Fertigungslosnummer, Charge *	Lotto no	Número de lote	No. de lot
	Contains sufficient for <n> tests *	Ausreichend für <n> Prüfungen *	Contenuto sufficiente per "n" saggi	Contenido suficiente para <n> ensayos	Contenu suffisant pour "n" tests
	Temperature limit *	Temperaturbegrenzung *	Temperatura di conservazione	Temperatura de conservación	Température de conservation
	Use-by date *	Verwendbar bis *	Data di scadenza	Fecha de caducidad	Date limite d'utilisation
	Manufacturer *	Hersteller *	Fabbricante	Fabricante	Fabricant
	Biological risks *	Biologische Risiken *	Rischi biologici	Riesgos biológicos	Risques biologiques
	Caution *	Achtung *	Attenzione	Precaución	Attention
	For research use only	Nur für Forschungszwecke	Solo a scopo di ricerca	Sólo para uso en investigación	Seulement dans le cadre de recherches
	Distributed by	Vertreiber	Distributore	Distribuidor	Distributeur
<i>Content</i>	Content	Inhalt	Contenuto	Contenido	Conditionnement
<i>Volume/No.</i>	Volume / No.	Volumen / Anzahl	Volume / Quantità	Volumen / Número	Volume / Quantité
<i>Microtiterwells</i>	Microtiterwells	Mikrotiterwells	Micropozzetti	Placas multipocillo	Microplaques
<i>Antiserum</i>	Antiserum	Antiserum	Antisiero	Antisuero	Antisérum
<i>Enzyme Conjugate</i>	Enzyme Conjugate	Enzymkonjugat	Tracciante enzimatico	Conjugado enzimático	Conjugué enzymatique
<i>Enzyme Complex</i>	Enzyme Complex	Enzymkomplex	Complesso enzimatico	Complejo enzimático	Complexe enzymatique
<i>Substrate Solution</i>	Substrate Solution	Substratlösung	Soluzione di substrato	Solución de sustrato	Solution substrat
<i>Stop Solution</i>	Stop Solution	Stopplösung	Soluzione d'arresto	Solución de parada	Solution d'arrêt
<i>Zero Standard</i>	Zero Standard	Nullstandard	Standard zero	Estándar cero	Zero Standard
<i>Standard</i>	Standard	Standard	Standard	Estándar	Standard
<i>Control</i>	Control	Kontrolle	Controllo	Control	Contrôle
<i>Assay Buffer</i>	Assay Buffer	Assaypuffer	Tampone del test	Tampón de ensayo	Tampon d'essai
<i>Wash Solution</i>	Wash Solution	Waschlösung	Soluzione di lavaggio	Solución de lavado	Solution de lavage
<i>1N NaOH</i>	1N NaOH	1N NaOH	1N NaOH (idrossido di sodio 1N)	1N NaOH	1N NaOH
<i>1 N HCl</i>	1 N HCl	1 N HCl		1 N HCl	1N HCl
<i>Sample Diluent</i>	Sample Diluent	Probenverdünnungs-medium	Diluyente dei campioni	Solución para dilución de la muestra	Solution pour dilution de l'échantillon
<i>Conjugate Diluent</i>	Conjugate Diluent	Konjugatverdünnungs-medium	Diluyente del tracciante	Solución para dilución del conjugado	Solution pour dilution du conjugué