



DCM026-12
Ed. 01/2015

ESTRIOL SALIVA ELISA

per analisi di routine

Determinazione immunoenzimatica diretta dell'Estriolo nella saliva.

IVD



LOT

Vedere etichetta esterna

2°C 8°C



Σ = 96 test

REF DKO026

DESTINAZIONE D'USO

Metodo competitivo immunoenzimatico colorimetrico per la determinazione quantitativa dell'Estriolo nella saliva.

Il kit Estriol Saliva ELISA è destinato al solo uso di laboratorio.

1. SIGNIFICATO CLINICO

L'estriolo è uno dei tre estrogeni principali prodotti dal corpo umano. È prodotto principalmente durante la gravidanza da un'unità materno-placentare-fetale.

La produzione Fetale-placentare di estriolo conduce, nella madre, ad un aumento progressivo dei livelli dell'ormone circolante, i quali raggiungono un picco, notevolmente superiore rispetto ai livelli delle non gravide, al termine della gestazione. Nella circolazione materna, l'estriolo viene velocemente coniugato nel fegato ed escreto per via urinaria con un'emivita di circa 20 minuti. Poiché la produzione normale dell'estriolo dipende da una circolazione materno-placentare-fetale intatta e da un metabolismo fetale funzionale, i livelli materni dell'estriolo sono usati per controllare la condizione di benessere del feto durante la gravidanza, specialmente durante il terzo trimestre. Il DHEA-S prodotto dalla corteccia surrenale del feto, è convertito in estriolo dalla placenta. Livelli anormalmente bassi in una donna incinta, possono indicare un problema nello sviluppo del bambino. I livelli di estriolo in donne non gravide, in menopausa e negli uomini sono simili.

2. PRINCIPIO DEL METODO

L'Estriolo (antigene) presente nel campione, compete con l'antigene marcato con perossidasi di rafano (HRP) nei confronti dell'anticorpo anti-Estriolo adsorbito su micropiastra (fase solida).

Dopo l'incubazione, la separazione libero-legato si ottiene mediante semplice lavaggio della fase solida.

L'enzima presente nella frazione legata, catalizza la reazione tra il Substrato (H₂O₂) ed il TMB Substrate, sviluppando una colorazione blu che vira al giallo dopo aggiunta dello Stop solution (H₂SO₄). L'intensità del colore sviluppato è inversamente proporzionale alla concentrazione dell'Estriolo presente nel campione.

La concentrazione di Estriolo nel campione è calcolata sulla base di una curva di calibrazione.

3. REATTIVI, MATERIALI E STRUMENTAZIONE

3.1. Reattivi e materiali forniti nel kit

1. Calibrators (6 flaconi, 1 mL ciascuno)

| | |
|------|-------------------|
| CAL0 | REF DCE002/2606-0 |
| CAL1 | REF DCE002/2607-0 |
| CAL2 | REF DCE002/2608-0 |
| CAL3 | REF DCE002/2609-0 |
| CAL4 | REF DCE002/2610-0 |
| CAL5 | REF DCE002/2611-0 |

2. Controls (2 flaconi, 1 mL ciascuno)

| | |
|-------------|-------------------|
| Controllo L | REF DCE045/2601-0 |
| Controllo M | REF DCE045/2602-0 |

3. Incubation Buffer (1 flacone, 30 mL)

| | |
|-----------------------------------|--------------|
| Tampone Fosfato pH 7.5; BSA 1 g/L | REF DCE010-0 |
|-----------------------------------|--------------|

4. Conjugate (1 flacone, 1 mL)

| | |
|--|-------------------|
| Estriolo coniugato con perossidasi di rafano (HRP) | REF DCE002/2602-0 |
|--|-------------------|

5. Coated Microplate (1 micropiastra breakable)

| | |
|---|-------------------|
| Anticorpo anti estriolo adsorbito su micropiastra | REF DCE002/2603-0 |
|---|-------------------|

6. TMB Substrate (1 flacone, 15 mL)

| | |
|--|--------------|
| H ₂ O ₂ -TMB (0,26 g/L) (evitare il contatto con la pelle) | REF DCE004-0 |
|--|--------------|

7. Stop Solution (1 flacone, 15 mL)

| | |
|---|--------------|
| Acido Solforico 0,15 M (evitare il contatto con la pelle) | REF DCE005-0 |
|---|--------------|

8. 50X Conc. Wash solution (1 flacone, 20 mL)

| | |
|------------------------------|--------------|
| NaCl 45 g/L; Tween-20 55 g/L | REF DCE006-0 |
|------------------------------|--------------|

3.2. Reattivi necessari non forniti nel kit

Acqua distillata.

3.3. Materiale e strumentazione ausiliare

Dispensatori automatici.

Letture per micropiastre (450 nm, 620-630 nm)

Saliva Collection Device REF DKO063

Salivette Sarstedt REF 51.1534.500

Note

Conservare i reattivi a 2÷8°C, al riparo dalla luce.
Aprire la busta del Reattivo 5 (Coated Microplate) solo dopo averla riportata a temperatura ambiente e chiuderla subito dopo il prelievo delle strip da utilizzare; una volta aperta è stabile fino alla data di scadenza del kit.
Evitare di staccare la sheet adesiva dalle strip che non vengono utilizzate nella seduta analitica.

4. AVVERTENZE

- Questo test kit è per uso in vitro, da eseguire da parte di personale esperto. Non per uso interno o esterno su esseri Umani o Animali.
- Usare i previsti dispositivi di protezione individuale mentre si lavora con i reagenti forniti.
- Seguire le Buone Pratiche di Laboratorio (GLP) per la manipolazione di prodotti derivati da sangue.
- Alcuni reagenti contengono piccole quantità di Proclin 300^R come conservante. Evitare il contatto con la pelle e le mucose.
- Il TMB Substrato contiene un irritante, che può essere dannoso se inalato, ingerito o assorbito attraverso la cute. Per prevenire lesioni, evitare l'inalazione, l'ingestione o il contatto con la cute e con gli occhi.
- La Stop Solution è costituita da una soluzione di acido solforico diluito. L'acido solforico è velenoso e corrosivo e può essere tossico se ingerito. Per prevenire possibili ustioni chimiche, evitare il contatto con la cute e con gli occhi.
- Evitare l'esposizione del reagente TMB/H₂O₂ a luce solare diretta, metalli o ossidanti. Non congelare la soluzione.
- Questo metodo consente di determinare concentrazioni di Estriolo da 2,5 pg/mL a 4000 pg/mL.
- La somministrazione di steroidi naturali o sintetici può alterare i livelli salivari di Estriolo.

5. PRECAUZIONI

- Si prega di attenersi rigorosamente alla sequenza dei passaggi indicata in questo protocollo. I risultati presentati qui sono stati ottenuti usando specifici reagenti elencati in queste Istruzioni per l'Uso.
- Tutti i reattivi devono essere conservati a temperatura controllata di 2-8°C nei loro contenitori originali. Eventuali eccezioni sono chiaramente indicate. I reagenti sono stabili fino alla data di scadenza se conservati e trattati seguendo le istruzioni fornite.
- Prima dell'uso lasciare tutti i componenti dei kit e i campioni a temperatura ambiente (22-28°C) e mescolare accuratamente.
- Non scambiare componenti dei kit di lotti diversi. Devono essere osservate le date di scadenza riportate sulle etichette della scatola e di tutte le fiale. Non utilizzare componenti oltre la data di scadenza.
- Qualora si utilizzi strumentazione automatica, è responsabilità dell'utilizzatore assicurarsi che il kit sia stato opportunamente validato.

- Un lavaggio incompleto o non accurato dei pozzetti può causare una scarsa precisione e/o un'elevato background. Per migliorare le prestazioni del kit su strumentazione automatica, si consiglia di aumentare il numero di lavaggi.
- Per la riproducibilità dei risultati, è importante che il tempo di reazione di ogni pozzetto sia lo stesso. Per evitare il time shifting durante la dispensazione degli reagenti, il tempo di dispensazione dei pozzetti non dovrebbe estendersi oltre i 10 minuti. Se si protrae oltre, si raccomanda di seguire lo stesso ordine di dispensazione. Se si utilizza più di una piastra, si raccomanda di ripetere la curva di calibrazione in ogni piastra.
- L'aggiunta del TMB Substrato dà inizio ad una reazione cinetica, la quale termina con l'aggiunta della Stop Solution. L'aggiunta del TMB Substrato e della Stop Solution deve avvenire nella stessa sequenza per evitare tempi di reazione differenti.
- Osservare le linee guida per l'esecuzione del controllo di qualità nei laboratori clinici testando controlli e/o pool di sieri.
- Osservare la massima precisione nella ricostituzione e dispensazione dei reagenti.
- Non usare campioni microbiologicamente contaminati, altamente lipemici o emolizzati.
- I lettori di micropiastre leggono l'assorbanza verticalmente. Non toccare il fondo dei pozzetti.

6. PROCEDIMENTO

6.1. Preparazione degli Calibratori (C₀...C₅)

Prima dell'uso lasciare su agitatore rotante per almeno 5 minuti.

I Calibratori sono pronti all'uso ed hanno le seguenti concentrazioni di Estriolo:

| | C ₀ | C ₁ | C ₂ | C ₃ | C ₄ | C ₅ |
|-------|----------------|----------------|----------------|----------------|----------------|----------------|
| pg/mL | 0 | 2,5 | 15 | 100 | 600 | 4000 |

Una volta aperti, i Calibratori sono stabili a 2-8°C per 6 mesi.

Per UNITA' SI: pg/mL x 3,5 = pmol/L

6.2. Preparazione della wash solution

Prima dell'uso, diluire il contenuto di ogni fiala di soluzione di lavaggio tamponata concentrata (50x) con acqua distillata fino al volume di 1000 mL. Per preparare volumi minori rispettare il rapporto di diluizione di 1:50. La soluzione di lavaggio diluita è stabile a 2÷8°C per almeno 30 giorni.

6.3. Preparazione del Coniugato Diluito

Preparare al momento dell'uso.

Diluire 10 µL di Conjugate (Reattivo 4) con 1 mL di Incubation Buffer (Reattivo 3).

Mescolare delicatamente. Stabile 3 ore a temperatura ambiente (22÷28°C).

6.4. Preparazione del campione

La determinazione della concentrazione di estriolo con il presente kit va effettuata su campioni di saliva. Per la raccolta del campione si consiglia l'utilizzo di tubi in vetro da centrifuga e di una cannuccia in plastica, o dei *Saliva Collection Device* Diametra, o

delle "Salivette" (Sarstedt, Ref. 511534500). Altri tipi di dispositivi di raccolta commercialmente disponibili non sono stati testati.

6.4.1. Metodo e limitazioni

Raccogliere i campioni di saliva nei tempi indicati. Per una maggiore riproducibilità e precisione si consiglia di raccogliere almeno 3 campioni in un arco di tempo non inferiore a 2 ore, e farne un pool prima di testarli.

Se non vengono date indicazioni specifiche per la raccolta delle salive, è possibile raccogliere i campioni in qualsiasi momento ma tenendo conto dei seguenti fattori:

- Se la raccolta della saliva viene effettuata al mattino, questa deve essere prelevata prima di lavarsi i denti.
- Durante la giornata attendere almeno un'ora dopo aver mangiato, aver assunto farmaci per via orale o essersi lavati i denti.
- E' molto importante ottenere un campione limpido – non contaminato da cibo, cosmetici, sangue, chewing gum od altri materiali estranei.

6.4.2. Processazione delle salive con il metodo Saliva Collection Device Diametra

- Far defluire la saliva attraverso la cannuccia nel tubo di vetro.
- Centrifugare il campione per 15 minuti a 3000 rpm
- Porlo a - 20°C per almeno 1 ora
- Centrifugare ancora per 15 minuti a 3000 rpm
- Il campione di saliva è così pronto per essere testato.
- Conservare il campione a 2-8°C per una settimana o a - 20°C per un tempo maggiore.

6.4.3. Processazione delle salive con il metodo Salivette Sarstedt

- Rimuovere il tampone contenuto nell'apposita provetta all'interno del tubo.
- Mettere il tampone in bocca e bagnare con la saliva per circa 1 minuto.
- Riporre il tampone nell'apposita provetta all'interno del tubo e chiudere il tubo con l'apposto tappo.
- Centrifugare il tubo a 1000g (rcf) per 2 minuti
- Rimuovere il tampone e la provetta e recuperare la saliva sul fondo del tubo (almeno 1 mL di saliva dovrebbe essere recuperato con questo metodo).

6.5. Procedimento

- Portare tutti i reagenti a temperatura ambiente (22-28°C).** Al termine del dosaggio riporre immediatamente tutti i reagenti a 2-8°C: evitare lunghi periodi a temperatura ambiente.
- Le strisce di pozzetti non utilizzate devono essere rimesse immediatamente nella busta richiudibile contenente il materiale essicante e conservate a 2-8°C.

- Per evitare potenziali contaminazioni microbiche e/o chimiche non rimettere i reagenti inutilizzati nei flaconi originali.
- Al fine di aumentare l'accuratezza dei risultati del test è necessario operare in doppio, allestendo due pozzetti per ogni punto della curva di calibrazione (C₀-C₅), due per ogni Controllo, due per ogni Campione ed uno per il Bianco.

| Reagente | Calibratori | Campione /Controlli | Bianco |
|---|-------------|---------------------|--------|
| Calibratore C ₀ -C ₅ | 50 µL | | |
| Campione/ Controlli L-M | | 50 µL | |
| Coniugato Diluito | 100 µL | 100 µL | |
| Incubare 1 h a temperatura ambiente (22÷28°C). Allontanare la miscela di reazione; lavare i pozzetti 3 volte aggiungendo 0,3 mL di wash solution diluita. Nota importante: ad ogni step di lavaggio, agitare delicatamente la piastra per 5 secondi e successivamente rimuovere l'eccesso di soluzione di lavaggio sbattendo delicatamente la micropiastra invertita su fogli di carta assorbente. Lavaggi automatici: se si utilizza strumentazione automatica effettuare almeno 5 lavaggi. | | | |
| TMB Substrate | 100 µL | 100 µL | 100 µL |
| Incubare 15 minuti a temperatura ambiente (22÷28°C), al riparo dalla luce. | | | |
| Stop Solution | 100 µL | 100 µL | 100 µL |
| Agitare delicatamente la micropiastra. Leggere l'assorbanza (E) a 450 nm contro una lunghezza d'onda di riferimento di 620-630 nm oppure contro il Bianco entro 5 minuti. | | | |

7. CONTROLLO QUALITA'

Ogni laboratorio dovrebbe analizzare i campioni nella gamma dei livelli elevati, normali e bassi di Estriolo per il controllo delle prestazioni dell'analisi. Questi campioni dovrebbero essere trattati come ignoti ed i valori determinati in ogni test effettuato. Le tabelle di controllo qualità dovrebbero essere effettuate per seguire le prestazioni dei reagenti forniti. Metodi statistici adeguati dovrebbero essere impiegati per accertare il trend. Il laboratorio dovrebbe fissare i limiti di accettabilità di prestazioni dell'analisi. Altri parametri che dovrebbero essere controllati includono le intercette di 80, 50 e 20% della curva di calibrazione per valutare la riproducibilità. In più, la capacità di assorbimento massima dovrebbe essere costante con l'esperienza precedente. La deviazione significativa dalle prestazioni stabilite può indicare il cambiamento inosservato negli stati o nella degradazione sperimentali dei reagenti del kit. Reagenti freschi dovrebbero essere usati per determinare il motivo delle variazioni.

8. RISULTATI

8.1. Estinzione Media

Calcolare l'estinzione media (Em) di ciascun punto della curva di calibrazione (C₀-C₅) e di ogni campione.

8.2. Curva di calibrazione

Tracciare sul grafico delle assorbanze i valori calcolati delle estinzioni medie (Em) di ciascuno Calibratore (C₀-C₅) in funzione delle concentrazioni. Tracciare la miglior curva passante per i punti Calibratori (es: Four Parameter Logistic).

8.3. Calcolo dei risultati

Interpolare, dal grafico, i valori di assorbanza relativi a ciascun campione e leggerne la corrispondente concentrazione in pg/mL.

9. VALORI DI RIFERIMENTO

Siccome i valori dell'Estriolo Saliva hanno un ritmo cicardiano suggeriamo di raccogliere i campioni alla stessa ora (8 A.M.).

I seguenti valori devono essere usati come guida preliminare fino a quando ogni laboratorio ha stabilito il proprio range di normalità:

| Gruppo | Ora | N | Range +/- SD's (pg/mL) | Range Assoluto (pg/mL) |
|--------------------------------|------|-----------------------|------------------------|------------------------|
| Donne | 8 AM | 21 | 0 - 21.0 | 0 - 32.0 |
| Premenopausa | 5 AM | 21 | 0 - 6.8 | 0 - 8.9 |
| Settimana di gravidanza | | Saliva (pg/mL) | | |
| | 22° | | (700 ± 500) | |
| | 24° | | (900 ± 600) | |
| | 26° | | (1200 ± 700) | |
| | 28° | | (1500 ± 800) | |
| | 30° | | (1800 ± 800) | |
| | 32° | | (2200 ± 1100) | |
| | 34° | | (3200 ± 1300) | |
| | 36° | | (4100 ± 1600) | |
| | 37° | | (4500 ± 1700) | |
| | 38° | | (5000 ± 2000) | |
| | 39° | | (5300 ± 2000) | |
| | 40° | | (5700 ± 2000) | |

È importante tenere presente che la determinazione di un range di valori attesi in un dato metodo per una popolazione "normale" è dipendente da molteplici fattori, quali la specificità e sensibilità del metodo in uso, e la popolazione in esame. Perciò ogni laboratorio dovrebbe considerare i range indicati dal Fabbricante come un'indicazione generale e produrre range di valori attesi propri basati sulla popolazione indigena dove il laboratorio risiede.

10. PARAMETRI CARATTERISTICI

10.1. Precisione

10.1.1. Intra-Assay

La variabilità all'interno dello stesso kit è stata determinata replicando (16x) la misura di due differenti controlli salivari. La variabilità intra-assay è ≤ 9,7%.

10.1.2. Inter-Assay

La variabilità tra kit differenti è stata determinata replicando (10x) la misura di due differenti sieri di controllo con kit appartenenti a lotti diversi. La variabilità inter-assay è ≤ 13,7%.

10.2. Accuratezza

La prova di recupero condotta su un campione di saliva arricchito con 50 – 300 – 2000 pg/mL di Estriolo, ha dato un valore medio (±SD) di 100,6% ± 14,6%.

10.3. Sensibilità

La concentrazione minima di Estriolo misurabile che può essere distinta dallo Calibratori 0 è 1,0 pg/mL con un limite di confidenza del 95%.

10.4. Specificità

L'anticorpo impiegato presenta le seguenti reazioni crociate, calcolate al 50% secondo Abraham:

| | |
|--------------------------|------------------------|
| Estriolo saliva | 100 % |
| 16 epi-estriolo | 10,5 % |
| 15 α-OH-estriolo | 7,0 % |
| Estriolo 3-Solfato | 2,0 % |
| Estradiolo | 0,1 % |
| 17 epi-estriolo | < 1x10 ⁻² % |
| Estriolo 3α-Glucoronato | < 1x10 ⁻² % |
| Estriolo 16α-Glucoronato | < 1x10 ⁻² % |
| Prednisone | < 1x10 ⁻² % |
| Estrone | < 1x10 ⁻⁴ % |

10.5. Correlazione

Il kit Estriol saliva (Diametra) è stato comparato con un kit disponibile in commercio. Sono stati testati 30 campioni di saliva.

La curva di regressione è :

$$y = 1,03x + 0,68$$

$$r^2 = 0,988$$

$$y = \text{Estriol saliva Diametra Elisa kit}$$

$$x = \text{Estriol saliva Salimetrics Elisa kit}$$

11. DISPOSIZIONI PER LO SMALTIMENTO

I reagenti devono essere smaltiti in accordo con le leggi locali.

BIBLIOGRAFIA

- Fisher-Rasmussen W., et al Acta Obstet. Gynecol Scand 60: 417 -420 (1981)
- Truran, P. L., et al Clin. Chem. 28/12, 2393 (1982)
- Vining R.F., et al J.Clin.Endoc.Metab. 56,454 (1983)
- Bagger P.V, et al Acta Obstet Gynec Scand 60:187 (1981)
- Osterman, T. M., et al Clin. Chem. 25 (5) 716 (1979)
- Wisdom, G.B.Clin Chem. 22 (8) 1243-1255 (1976)

Ed. 01/2015

DCM026-12

DiaMetra S.r.l. Headquater: Via Calabria 15,
20090 SEGRATE (MI) Italy
Tel. +39-02-2139184
Fax +39-02-2133354

Manufactory: Via Pozzuolo 14,
06038 SPELLO (PG) Italy
Tel. +39-0742-24851
Fax +39-0742-316197
E-mail: info@diametra.com



DCM026-12
Ed. 01/2015

ESTRIOL SALIVA ELISA

for routine analysis

Direct immunoenzymatic determination of Estriol in saliva.

IVD



LOT

See external label

2°C 8°C



Σ = 96 tests

REF DKO026

INTENDED USE

Competitive immunoenzymatic colorimetric method for quantitative determination of Estriol concentration in saliva.

Estriol Saliva ELISA kit is intended for laboratory use only.

1. CLINICAL SIGNIFICANCE

Estriol (also Oestriol) is one of the three main estrogens produced by the human body. It is only produced in significant amounts during pregnancy as it is made by the fetus. During pregnancy the production of estriol depends on an intact maternal-placental-fetal unit. Fetal-placental production of estriol leads to a progressive rise in maternal circulating levels reaching a late-gestational peak several orders of magnitude greater than non-pregnant levels. In the maternal circulation, estriol undergoes a rapid conjugation in the liver followed by urinary excretion with a half-life of about 20 minutes. Since normal estriol production depends on an intact maternal-placental-fetal circulation and functional fetal metabolism, maternal estriol levels have been used to monitor fetal status during pregnancy, particularly during the third trimester. DHEA-S is produced by the adrenal cortex of the fetus, this is converted to estriol by the placenta. If levels are abnormally low in a pregnant woman, this may indicate a problem with the development in the child.

Levels of estriol in non-pregnant women do not change much after menopause, and levels are not significantly different from levels in men.

2. PRINCIPLE

The Estriol (antigen) in the sample competes with the antigenic Estriol conjugated with horseradish peroxidase (HRP) for binding to the limited number of antibodies anti Estriol coated on the microplate (solid phase). After incubation, the bound/free separation is performed by a simple solid-phase washing.

Then, the enzyme HRP in the bound-fraction reacts with the Substrate (H₂O₂) and the TMB Substrate and develops a blue color that changes into yellow when the Stop Solution (H₂SO₄) is added.

The colour intensity is inversely proportional to the Estriol concentration in the sample.

Estriol concentration in the sample is calculated through a calibration curve.

3. REAGENTS, MATERIALS AND INSTRUMENTATION

3.1. Reagents and materials supplied in the kit

- Calibrators (6 vials, 1 mL each)

| | |
|------|-------------------|
| CAL0 | REF DCE002/2606-0 |
| CAL1 | REF DCE002/2607-0 |
| CAL2 | REF DCE002/2608-0 |
| CAL3 | REF DCE002/2609-0 |
| CAL4 | REF DCE002/2610-0 |
| CAL5 | REF DCE002/2611-0 |
- Controls (2 vial, 1 mL each)

| | |
|-----------|-------------------|
| Control L | REF DCE045/2601-0 |
| Control M | REF DCE045/2602-0 |
- Incubation Buffer (1 vial, 30 mL)
Phosphate buffer pH 7.5; BSA 1 g/L
REF DCE010-0
- Conjugate (1 vial, 1 mL)
Estriol conjugated with horseradish peroxidase (HRP)
REF DCE002/2602-0
- Coated Microplate (1 microplate breakable)
Anti estriol antibody adsorbed on microplate
REF DCE002/2603-0
- TMB Substrate (1 vial, 15 mL)
H₂O₂-TMB 0.26 g/L (avoid any skin contact)
REF DCE004-0
- Stop solution (1 vial, 15 mL)
Sulphuric acid 0.15M (avoid any skin contact)
REF DCE005-0
- 50X Conc. Wash solution (1 vial, 20 mL)
NaCl 45 g/L; Tween-20 55 g/L
REF DCE006-0

3.2. Reagents necessary not supplied

Distilled water

3.3. Auxiliary materials and instrumentation

Automatic dispenser.

Microplates reader (450 nm, 620-630 nm)

Saliva Collection Device REF DKO063

Salivette Sarstedt REF 51.1534.500

Note

Store all reagents at 2-8°C in the dark.

Open the bag of reagent 5 (Coated Microplate) only when it is at room temperature and close it immediately after use.

Once opened, the microplate is stable until the expiry date of the kit. Do not remove the adhesive sheets on the unused strips

4. WARNINGS

- This kit is intended for in vitro use by professional persons only. Not for internal or external use in Humans or Animals.
- Use appropriate personal protective equipment while working with the reagents provided.
- Follow Good Laboratory Practice (GLP) for handling blood products.
- Some reagents contain small amounts of Proclin 300^R as preservative. Avoid the contact with skin or mucosa.
- The TMB Substrate contains an irritant, which may be harmful if inhaled, ingested or absorbed through the skin. To prevent injury, avoid inhalation, ingestion or contact with skin and eyes.
- The Stop Solution consists of a diluted sulphuric acid solution. Sulphuric acid is poisonous and corrosive and can be toxic if ingested. To prevent chemical burns, avoid contact with skin and eyes.
- Avoid the exposure of reagent TMB/H₂O₂ to directed sunlight, metals or oxidants. Do not freeze the solution.
- This method allows the determination of Estriol from 2.5 pg/mL to 4000 pg/mL.
- The clinical significance of Estriol determination can be invalidated if the patient was treated with natural or synthetic steroids.

5. PRECAUTIONS

- Please adhere strictly to the sequence of pipetting steps provided in this protocol. The performance data represented here were obtained using specific reagents listed in this Instruction For Use.
- All reagents should be stored refrigerated at 2-8°C in their original container. Any exceptions are clearly indicated. The reagents are stable until the expiry date when stored and handled as indicated.
- Allow all kit components and specimens to reach room temperature (22-28°C) and mix well prior to use.
- Do not interchange kit components from different lots. The expiry date printed on box and vials labels must be observed. Do not use any kit component beyond their expiry date.
- If you use automated equipment, the user has the responsibility to make sure that the kit has been appropriately tested.
- The incomplete or inaccurate liquid removal from the wells could influence the assay precision and/or increase the background. To improve the performance of the kit on automatic systems is recommended to increase the number of washes.
- It is important that the time of reaction in each well is held constant for reproducible results. Pipetting of samples should not extend beyond ten minutes

to avoid assay drift. If more than 10 minutes are needed, follow the same order of dispensation. If more than one plate is used, it is recommended to repeat the dose response curve in each plate

- Addition of the TMB Substrate solution initiates a kinetic reaction, which is terminated by the addition of the Stop Solution. Therefore, the TMB Substrate and the Stop Solution should be added in the same sequence to eliminate any time deviation during the reaction.
- Observe the guidelines for performing quality control in medical laboratories by assaying controls and/or pooled sera.
- Maximum precision is required for reconstitution and dispensation of the reagents.
- Samples microbiologically contaminated, highly lipemic or haemolysed should not be used in the assay.
- Plate readers measure vertically. Do not touch the bottom of the wells.

6. PROCEDURE

6.1. Preparation of the Calibrator (C₀...C₅)

Before using, mix for 5 min with a rotating mixer.

The Calibrators are ready to use and have the following concentration of Estriol:

| | C ₀ | C ₁ | C ₂ | C ₃ | C ₄ | C ₅ |
|-------|----------------|----------------|----------------|----------------|----------------|----------------|
| pg/mL | 0 | 2,5 | 15 | 100 | 600 | 4000 |

Once opened, the Calibrators are stable at 2-8°C for 6 months.

For SI UNITS: pg/mL x 3.5 = pmol/mL

6.2. Preparation of the Wash solution

Dilute the contents of each vial of the buffered wash solution concentrate (50x) with distilled water to a final volume of 1000 ml prior to use. For smaller volumes respect the 1:50 dilution ratio. The diluted wash solution is stable for 30 days at 2-8°C.

6.3. Preparation of Diluted Conjugate

Prepare immediately before use.

Add 10 µL Conjugate (reagent 4) to 1.0 mL of Incubation Buffer (reagent 3). Mix gently. Stable 3 hours at room temperature (22-28°C).

6.4. Preparation of the Sample

The determination of Estriol with this kit should be performed in saliva samples..

It is recommended to collect saliva samples with a centrifuge glass tube and a plastic straw, with the Diametra *Saliva Collection Device* or with the "Salivette" (Sarstedt, Ref. 511534500). Other commercially available sample collector devices have not been tested.

6.4.1. Method and Limitations

Collect saliva samples at the times indicated. In order to have high reproducibility and accuracy, it is advisable to collect at least 3 samples in a period of not less than 2 hours and pooling the samples before testing.

If no specific instructions have been given, saliva samples may be collected at any time; for saliva collection, the following should be noted:

- If saliva collection is carried out in the morning ensure that this is carried out prior to brushing teeth
- During the day allow 1 hour after a meal, oral intake of pharmaceutical drugs or tooth cleaning.
- It is very important that a good clear sample is received – i.e. no contamination with food, lipstick, blood (bleeding gums) or other extraneous materials.

6.4.2. Saliva Processing Instructions with Saliva Collection Device Diametra

- Let the saliva flow down through the straw into the centrifuge glass tube.
- Centrifuge the sample for 15 minutes at 3000 rpm
- Store at – 20°C for at least 1 hour
- Centrifuge again for 15 minutes at 3000 rpm
- The saliva sample is now ready to be tested.
- Store the sample at 2–8°C for one week or at -20°C for longer time.

6.4.3. Saliva Processing Instructions with Salivette Sardstedt

- Remove the swab from the suspended insert of the Salivette
- Gently chewing the swab for 1 minute produces a sufficient quantity of saliva.
- Replace the swab into the Salivette and firmly close the tube using the stopper.
- Centrifuge the Salivette for 2 minutes at 1000g (rcf) for saliva generation.
- Remove the insert complete with the swab from the centrifuge vessel and discard. The clear saliva is now ready for analysis (at least 1 mL of saliva should be recovered with this method).

6.5. Procedure

- Allow all reagents to reach room temperature (22–28°C).** At the end of the assay, store immediately the reagents at 2–8°C: avoid long exposure to room temperature.
- Unused coated microwell strips should be released securely in the foil pouch containing desiccant and stored at 2–8°C.
- To avoid potential microbial and/or chemical contamination, unused reagents should never be transferred into the original vials.
- As it is necessary to perform the determination in duplicate in order to improve accuracy of the test results, prepare two wells for each point of the calibration curve (C₀–C₅), two for each Control, two for each sample, one for Blank.

| Reagent | Calibrator | Sample/ Controls | Blank |
|--|------------|------------------|--------|
| Calibrator C ₀ –C ₅ | 50 µL | | |
| Sample/ Control L-M | | 50 µL | |
| Diluted Conjugate | 100 µL | 100 µL | |
| Incubate 1 h at room temperature (22±28°C). Remove the contents from each well; wash the wells 3 times with 300 µL of diluted wash solution. Important note: during each washing step, gently shake the plate for 5 seconds and remove excess solution by tapping the inverted plate on an absorbent paper towel. Automatic washer: if you use automated equipment, wash the wells at least 5 times. | | | |
| TMB Substrate | 100 µL | 100 µL | 100 µL |
| Incubate at room temperature (22±28°C) for 15 minutes in the dark. | | | |
| Stop Solution | 100 µL | 100 µL | 100 µL |
| Shake the microplate gently. Read the absorbance (E) at 450 nm against a reference wavelength of 620–630 nm or against Blank within 5 minutes. | | | |

7. QUALITY CONTROL

Each laboratory should assay controls at normal, high and low levels range of Estriol for monitoring assay performance. These controls should be treated as unknowns and values determined in every test procedure performed. Quality control charts should be maintained to follow the performance of the supplied reagents. Pertinent statistical methods should be employed to ascertain trends. The individual laboratory should set acceptable assay performance limits. Other parameters that should be monitored include the 80, 50 and 20% intercepts of the Calibration curve for run-to-run reproducibility. In addition, maximum absorbance should be consistent with past experience. Significant deviation from established performance can indicate unnoticed change in experimental conditions or degradation of kit reagents. Fresh reagents should be used to determine the reason for the variations.

8. RESULTS

8.1. Mean Absorbance

Calculate the mean of the absorbance (E_m) for each point of the Calibration curve (C₀–C₅) and of each sample.

8.2. Calibration curve

Plot the mean value of absorbance (E_m) of the Calibrators (C₀–C₅) against concentration. Draw the best-fit curve through the plotted points. (es: Four Parameter Logistic).

8.3. Calculation of Results

Interpolate the values of the samples on the Calibration curve to obtain the corresponding values of the concentrations expressed in pg/mL.

9. REFERENCE VALUES

As the Estriol Saliva values follow a circadian pattern we suggest to collect the samples at the same time (8 A.M.).

The following values should be used as preliminary guide until each laboratory has got his own reference range.

| Group | Time | N | Range +/- SD's (pg/mL) | Absolute Range (pg/mL) |
|-----------------|------|----------------|------------------------|------------------------|
| Women | 8 AM | 21 | 0 - 21.0 | 0 - 32.0 |
| Premenopausal | 5 AM | 21 | 0 - 6.8 | 0 - 8.9 |
| Pregnancy weeks | | Saliva (pg/mL) | | |
| 22° | | (700 ± 500) | | |
| 24° | | (900 ± 600) | | |
| 26° | | (1200 ± 700) | | |
| 28° | | (1500 ± 800) | | |
| 30° | | (1800 ± 800) | | |
| 32° | | (2200 ± 1100) | | |
| 34° | | (3200 ± 1300) | | |
| 36° | | (4100 ± 1600) | | |
| 37° | | (4500 ± 1700) | | |
| 38° | | (5000 ± 2000) | | |
| 39° | | (5300 ± 2000) | | |
| 40° | | (5700 ± 2000) | | |

Please pay attention to the fact that the determination of a range of expected values for a "normal" population in a given method is dependent on many factors, such as specificity and sensitivity of the method used and type of population under investigation. Therefore each laboratory should consider the range given by the Manufacturer as a general indication and produce their own range of expected values based on the indigenous population where the laboratory works.

10. PERFORMANCE AND CHARACTERISTICS

10.1. Precision

10.1.1. Intra Assay Variation

Within run variation was determined by replicate (16x) the measurement of two different saliva control in one assay. The within assay variability is $\leq 9.7\%$.

10.1.2. Inter Assay Variation

Between run variation was determined by replicate (10x) the measurement of two different saliva control with different lots of kit. The between assay variability is $\leq 13.7\%$.

10.2. Accuracy

The recovery of 50 – 300 – 2000 pg/mL of Estriol added to "saliva-free" sample gave an average value (\pm SD) of $100.6\% \pm 14.6\%$ with reference to the original concentrations.

10.3. Sensitivity

The lowest detectable concentration of Estriol that can be distinguished from the Calibrator 0 is 1.0 pg/mL at the 95 % confidence limit.

10.4. Specificity

The cross reaction of the antibody calculated at 50% according to Abraham are shown in the table:

| | |
|----------------------------------|-------------------------|
| Estriol saliva | 100 % |
| 16 epi-estriol | 10.5 % |
| 15 α -OH-estriol | 7.0 % |
| Estriol 3-Sulfate | 2.0 % |
| Estradiol | 0.1 % |
| 17 epi-estriol | $< 1 \times 10^{-2} \%$ |
| Estriol 3 α -Glucuronide | $< 1 \times 10^{-2} \%$ |
| Estriol 16 α -Glucuronide | $< 1 \times 10^{-2} \%$ |
| Prednisone | $< 1 \times 10^{-2} \%$ |
| Estrone | $< 1 \times 10^{-4} \%$ |

10.5. Correlation

Diametra Estriol saliva ELISA kit was compared to another commercially available Estriol saliva assay. 30 saliva samples were analysed according to both test systems. The linear regression curve was calculated:

$$y = 1.03x + 0.68$$

$$r^2 = 0.988$$

$$y = \text{Estriol saliva Diametra Elisa kit}$$

$$x = \text{Estriol saliva Salimetrics Elisa kit}$$

11. WASTE MANAGEMENT

Reagents must be disposed off in accordance with local regulations.

BIBLIOGRAPHY

- Fisher-Rasmussen, W., et al Acta Obstet. Gynecol Scand 60: 417 -420 (1981)
- Truran, P. L., et al Clin. Chem. 28/12, 2393 (1982)
- Vining, R. F., et al J.Clin.Endoc.Metab. 56, 454 (1983)
- Bagger, P. V., et al Acta Obstet Gynecol Scand 60: 187 (1981)
- Osterman, T. M., et al Clin. Chem. 25 (5) 716 (1979)
- Wisdom, G.B. Clin Chem. 22 (8) 1243-1255 (1976)

Ed. 01/2015

DCM026-12

DiaMetra S.r.l. Headquater: Via Calabria 15,
20090 SEGRATE (MI) Italy
Tel. +39-02-2139184
Fax +39-02-2133354

Manufactory: Via Pozzuolo 14
06038 SPELLO (PG) Italy
Tel. +39-0742-24851
Fax +39-0742-316197
E-mail: info@diametra.com

| | | |
|----------|------------------------------------|--|
| | DIA.METRA SRL | |
| Mod. PIS | PACKAGING INFORMATION SHEET | |

IT
Spiegazione dei simboli












GB
Explanation of symbols

FR
Explication des symboles

ES
Significado de los simbolos

DE
Verwendete Symbole

PT
Explicação dos simbolos

| | | | |
|--|--|--|---|
|  | <p>DE In vitro Diagnostikum ES Producto sanitario para diagnóstico In vitro FR Dispositif medical de diagnostic in vitro GB In vitro Diagnostic Medical Device IT Dispositivo medico-diagnostico in vitro PT Dispositivos medicos de diagnostico in vitro</p> |  | <p>DE Hergestellt von ES Elaborado por FR Fabriqué par GB Manufacturer IT Produttore PT Produzido por</p> |
| REF | <p>DE Bestellnummer ES Número de catálogo FR Références du catalogue GB Catalogue number IT Numero di Catalogo PT Número do catálogo</p> |  yyyy-mm | <p>DE Herstellungs datum ES Fecha de fabricacion FR Date de fabrication GB Date of manufacture IT Data di produzione PT Data de produção</p> |
|  yyyy-mm-dd | <p>DE Verwendbar bis ES Estable hasta (usar antes de último día del mes) FR Utiliser avant (dernier jour du mois indiqué) GB Use by (last day of the month) IT Utilizzare prima del (ultimo giorno del mese) PT Utilizar (antes ultimo dia do mês)</p> |  | <p>DE Biogefährdung ES Riesco biológico FR Risque biologique GB Biological risk IT Rischio biologico PT Risco biológico</p> |
|   | <p>DE Gebrauchsanweisung beachten ES Consultar las instrucciones FR Consulter le mode d'emploi GB Consult instructions for use IT Consultare le istruzioni per l'uso PT Consultar instruções para uso</p> |  | <p>DE Chargenbezeichnung ESCodigo de lote FR Numero de lot GB Batch code IT Codice del lotto PT Codigo do lote</p> |
|  $\Sigma = xx$ | <p>DE Ausreichend für "n" Tests ES Contenido suficiente para "n" tests FR Contenu suffisant pour "n" tests GB Contains sufficient for "n" tests IT Contenuto sufficiente per "n" saggi PT Contém o suficiente para "n" testes</p> |  | <p>DE Inhalt ES Contenido del estuche FR Contenu du coffret GB Contents of kit IT Contenuto del kit PT Conteúdo do kit</p> |
|  Max Min | <p>DE Temperaturbereich ES Límitación de temperatura FR Limites de température de conservation GB Temperature limitation IT Limiti di temperatura PT Temperaturas limites de conservação</p> | | |

| | | |
|----------|------------------------------------|--|
| | DIA.METRA SRL | |
| Mod. PIS | PACKAGING INFORMATION SHEET | |

SUGGERIMENTI PER LA RISOLUZIONE DEI PROBLEMI/TROUBLESHOOTING

ERRORE CAUSE POSSIBILI/ SUGGERIMENTI

Nessuna reazione colorimetrica del saggio

- mancata dispensazione del coniugato
- contaminazione del coniugato e/o del Substrato
- errori nell'esecuzione del saggio (es. Dispensazione accidentale dei reagenti in sequenza errata o provenienti da flaconi sbagliati, etc.)

Reazione troppo blanda (OD troppo basse)

- coniugato non idoneo (es. non proveniente dal kit originale)
- tempo di incubazione troppo breve, temperatura di incubazione troppa bassa

Reazione troppo intensa (OD troppo alte)

- coniugato non idoneo (es. non proveniente dal kit originale)
- tempo di incubazione troppo lungo, temperatura di incubazione troppa alta
- qualità scadente dell'acqua usata per la soluzione di lavaggio (basso grado di deionizzazione)
- lavaggi insufficienti (coniugato non completamente rimosso)

Valori inspiegabilmente fuori scala

- contaminazione di pipette, puntali o contenitori- lavaggi insufficienti (coniugato non completamente rimosso)

CV% intra-Assy elevato

- reagenti e/o strip non portate a temperatura ambiente prima dell'uso
- il lavatore per micropiastre non lava correttamente (suggerimento: pulire la testa del lavatore)

CV% intersaggio elevato

- condizioni di incubazione non costanti (tempo o temperatura)
- controlli e campioni non dispensati allo stesso tempo (con gli stessi intervalli) (controllare la sequenza di dispensazione)
- variabilità intrinseca degli operatori

ERROR POSSIBLE CAUSES / SUGGESTIONS

No colorimetric reaction

- no conjugate pipetted reaction after addition
- contamination of conjugates and/or of substrate
- errors in performing the assay procedure (e.g. accidental pipetting of reagents in a wrong sequence or from the wrong vial, etc.)

Too low reaction (too low ODs)

- incorrect conjugate (e.g. not from original kit)
- incubation time too short, incubation temperature too low

Too high reaction (too high ODs)

- incorrect conjugate (e.g. not from original kit)
- incubation time too long, incubation temperature too high
- water quality for wash buffer insufficient (low grade of deionization)
- insufficient washing (conjugates not properly removed)

Unexplainable outliers

- contamination of pipettes, tips or containers
- insufficient washing (conjugates not properly removed) too high within-run
- reagents and/or strips not pre-warmed to CV% Room Temperature prior to use
- plate washer is not washing correctly (suggestion: clean washer head)
- too high between-run - incubation conditions not constant (time, CV % temperature)
- controls and samples not dispensed at the same time (with the same intervals) (check pipetting order)
- person-related variation