





6. Pipetting of samples and reagents must be done as quickly as possible and in the same sequence for each step.
7. Use reservoirs only for single reagents. This especially applies to the substrate reservoirs. Using a reservoir for dispensing a substrate solution that had previously been used for the conjugate solution may turn solution colored. Do not pour reagents back into vials as reagent contamination may occur.
8. Mix the contents of the microplate wells thoroughly to ensure good test results. Do not reuse microwells.
9. Do not let wells dry during assay; add reagents immediately after completing the rinsing steps.
10. Allow the reagents to reach room temperature (21 - 26 °C) before starting the test. Temperature will affect the absorbance readings of the assay. However, values for the patient samples will not be affected.
11. Never pipet by mouth and avoid contact of reagents and specimens with skin and mucous membranes.
12. Do not smoke, eat, drink or apply cosmetics in areas where specimens or kit reagents are handled.
13. Wear disposable latex gloves when handling specimens and reagents. Microbial contamination of reagents or specimens may give false results.
14. Handling should be done in accordance with the procedures defined by an appropriate national biohazard safety guideline or regulation.
15. Do not use reagents beyond expiry date as shown on the kit labels.
16. 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.
17. 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.
18. Avoid contact with Stop Solution containing 0.5 M H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>. It may cause skin irritation and burns.
19. Some reagents contain Proclin 300, BND and/or MIT as preservatives. In case of contact with eyes or skin, flush immediately with water.
20. 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.
21. Chemicals and prepared or used reagents have to be treated as hazardous waste according to the national biohazard safety guideline or regulation.
22. 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 the manufacturer.

## 4 REAGENTS

### 4.1 Reagents provided

**SA E-6431** 96 **Microtiterwells**  
 Contents: 12 x 8 (break apart) strips, 96 wells;  
 Wells coated with anti-17 $\alpha$ -OHP antibody (polyclonal).

**Standards and Controls** - Ready to use

Cat. no.	Component	Standard	Concentration	Volume/Vial
<b>SA E-6401</b>	<span style="border: 1px solid black; padding: 0 2px;">STANDARD A</span>	Standard A	0 pg/ml	1 ml
<b>SA E-6402</b>	<span style="border: 1px solid black; padding: 0 2px;">STANDARD B</span>	Standard B	10 pg/ml	1 ml
<b>SA E-6403</b>	<span style="border: 1px solid black; padding: 0 2px;">STANDARD C</span>	Standard C	50 pg/ml	1 ml
<b>SA E-6404</b>	<span style="border: 1px solid black; padding: 0 2px;">STANDARD D</span>	Standard D	250 pg/ml	1 ml
<b>SA E-6405</b>	<span style="border: 1px solid black; padding: 0 2px;">STANDARD E</span>	Standard E	500 pg/ml	1 ml
<b>SA E-6406</b>	<span style="border: 1px solid black; padding: 0 2px;">STANDARD F</span>	Standard F	1000 pg/ml	1 ml
<b>SA E-6451</b>	<span style="border: 1px solid black; padding: 0 2px;">CONTROL 1</span>	Control low	For control values and ranges please refer to vial label or QC-Datasheet.	1 ml
<b>SA E-6452</b>	<span style="border: 1px solid black; padding: 0 2px;">CONTROL 2</span>	Control high		1 ml

Conversion: pg/ml x 3.03 = pmol/l

Contents: Contain non-mercury preservative.

**SA E-6440** CONJUGATE **Enzyme Conjugate** - ready to use  
 Contents: 17- $\alpha$ -OHP conjugated with horseradish peroxidase; Contains non-mercury preservative.  
 Volume: 1 x 26 ml

**SA E-6455**    **SUBSTRATE**    **Substrate Solution** - ready to use

Contents: Tetramethylbenzidine (TMB).

Volume: 1 x 25 ml

**FR E-0080**    **STOP-SOLN**    **Stop Solution** - ready to use

Contents: Contains 0.5 M H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>.

Avoid contact with the stop solution. It may cause skin irritations and burns.

Volume: 1 x 14 ml

Hazards

identification:



H290 May be corrosive to metals.

H314 Causes severe skin burns and eye damage.

**FR E-0030**    **WASH-CONC 40x**    **Wash Solution** - 40X concentrated

Volume: 1 x 30 ml

see „Preparation of Reagents“.

**Note:** Additional *Standard A* for sample dilution is available upon request.

#### 4.2 Material required but not provided

- A microtiter plate calibrated reader (450 ± 10 nm)
- Calibrated variable precision micropipettes (25 µl, 100 µl, 200 µl, 250 µl)
- Absorbent paper
- Distilled or deionized water
- Timer (60 min. range)
- Semi-logarithmic graph paper or software for data reduction

#### 4.3 Storage Conditions

When stored at 2 °C to 8 °C unopened reagents will retain reactivity until expiration date. Do not use reagents beyond this date.

Opened reagents must be stored at 2 °C to 8 °C. Microtiter wells must be stored at 2 °C to 8 °C. Once the foil bag has been opened, care should be taken to close it tightly again.

Opened kits retain activity for 6 weeks if stored as described above.

#### 4.4 Reagent Preparation

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

##### **Wash Solution**

Add deionized water to the 40X concentrated Wash Solution.

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

*The diluted Wash Solution is stable for 2 weeks at room temperature.*

#### 4.5 Disposal of the Kit

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

#### 4.6 Damaged Test Kits

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

## 5 SPECIMEN COLLECTION AND PREPARATION

Eating, drinking, chewing gums or brushing teeth should be avoided for 30 minutes before sampling. Otherwise, it is recommended to rinse mouth thoroughly with cold water 5 minutes prior to sampling. Do not collect samples when oral diseases, inflammation or lesions exist (blood contamination). In case of visible blood contamination the patient should discard the sample, rinse the sampling device with water, wait for 10 minutes and take a new sample.

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

### 5.1 Specimen Collection

It is recommended to collect saliva samples with commercially available equipment (e.g. **Sali Set**, catalogue no. SA D-6100, 100 pieces).

Do not use any cotton swab for sampling, such as Salivettes; this in most cases will result in significant interferences.

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

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

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

### 5.2 Specimen Storage and Preparation

#### **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 for up to 9 months.

Then samples must be thawed and centrifuged for 5 to 10 minutes 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: 2 days at 2 °C to 8 °C  
up to 9 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 than the highest standard, the specimens can be diluted with *Standard A* and re-assayed as described in Assay Procedure.

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

Example:

- a) Dilution 1:10: 10 µl saliva + 90 µl *Standard A* (mix thoroughly)
- b) Dilution 1:100: 10 µl of dilution a) + 90 µl *Standard A* (mix thoroughly).

## 6 ASSAY PROCEDURE

### 6.1 General Remarks

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

## 6.2 Test Procedure

Each run must include a standard curve.

All standards, samples, and controls should be run in duplicate. All standards, samples, and controls should be run concurrently so that all conditions of testing are the same.

<b>1.</b>	Secure the desired number of Microtiter wells in the holder.
<b>2.</b>	Dispense <b>25 µl</b> of each <b>17-α-OHP Standard, Control</b> and <b>samples (supernatant)</b> <u>with new disposable tips</u> into appropriate wells.
<b>3.</b>	Dispense <b>250 µl Enzyme Conjugate</b> into each well. Thoroughly mix for 10 seconds. It is important to have a complete mixing in this step.
<b>4.</b>	Incubate for <b>60 minutes</b> at room temperature.
<b>5.</b>	Briskly shake out the contents of the wells. Rinse the wells <b>3 times</b> with <b>400 µl</b> diluted <i>Wash Solution</i> per well. Strike the wells sharply on absorbent paper to remove residual droplets. <b>Important note:</b> The sensitivity and precision of this assay is markedly influenced by the correct performance of the washing procedure!
<b>6.</b>	Add <b>200 µl</b> of <i>Substrate Solution</i> to each well.
<b>7.</b>	Incubate for <b>15 minutes</b> at room temperature.
<b>8.</b>	Stop the enzymatic reaction by adding <b>100 µL</b> of <i>Stop Solution</i> to each well.
<b>9.</b>	Determine the absorbance (OD) of each well at <b>450 ± 10 nm</b> with a microtiter plate reader. ⚠ It is recommended that the wells be read <b>within 10 minutes</b> after adding the <i>Stop Solution</i> .

## 6.3 Calculation of Results

- Calculate the average absorbance values for each set of standards, controls and patient samples.
- Using semi-logarithmic graph paper, construct a standard curve by plotting the mean absorbance obtained from each standard against its concentration with absorbance value on the vertical (Y) axis and concentration on the horizontal (X) axis.
- Using the mean absorbance value for each sample determine the corresponding concentration from the standard curve.
- 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.
- 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 > 1000 pg/ml. For the calculation of the concentrations this dilution factor has to be taken into account.

### 6.3.1 Example of Typical Standard Curve

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

Standard	Optical Units (450 nm)
Standard A (0 pg/ml)	1.92
Standard B (10 pg/ml)	1.72
Standard C (50 pg/ml)	1.47
Standard D (250 pg/ml)	0.91
Standard E (500 pg/ml)	0.64
Standard F (1000 pg/ml)	0.41

## 7 EXPECTED NORMAL VALUES

In order to determine the normal range of SLV 17α -OHP, two studies were performed using saliva samples from 129 apparently healthy children ages 6 – 12 years, 132 males ages 21 to 70 years, and 252 females of non-pregnant women with regular menstrual cycles, ages 21 to 50 years. Saliva samples were collected in the morning, frozen at -20°C, and analyzed using the 17-OH-Progesterone Saliva ELISA kit.

The following ranges were calculated from this study.

## Summary Normal ranges for 17-OH-Progesterone Saliva ELISA

	Age group		Mean (pg/ml)	S.D. (pg/ml)	Median (pg/ml)	5 <sup>th</sup> - 95 <sup>th</sup> percentile (pg/ml)
Children	6 - 12 years	N = 129	16.9	9.5	16.2	3.0 - 32.9
Women	21 - 50 years	Follicular phase: N = 124	22.0	11.1	19.9	8.2 - 41.1
		Luteal phase: N = 128	51.2	17.3	48.9	28.1 - 84.8
Men	21 - 70 years	N = 152	24.9	12.6	21.9	10.6 - 54.8

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. Since 17a-OHP levels show diurnal cycles, we recommend that the samples be obtained the same hour each day.

Furthermore, we recommend that each laboratory determine its own range for the population tested.

## 8 **QUALITY CONTROL**

Good laboratory practice requires that controls be run with each standard 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 the manufacturer directly.

## 9 **PERFORMANCE CHARACTERISTICS**

### 9.1 Assay Dynamic Range

The range of the assay is between 3.6 - 1000 pg/ml.

## 9.2 Specificity of Antibodies (Cross Reactivity)

The following materials have been evaluated for cross reactivity.

The percentage indicates cross reactivity at 50% displacement compared to 17- $\alpha$ -OHP.

Steroid	% Cross reaction
17- $\alpha$ -OH Progesterone	100 %
Estriol	< 0.01
Estradiol 17 $\beta$	< 0.01
Testosterone	< 0.01
Dihydrotestosterone	< 0.01
DOC	0.05
11-Desoxycortisol	1.40
Progesterone	1.20
DHEA	< 0.01
DHEA-S	< 0.001
Cortisol	< 0.01
Corticosterone	< 0.05
Aldosterone	< 0.01
Androstenedione	< 0.01
Dehydroepiandrosten sulfate	< 0.01
Prednisone	< 0.01

## 9.3 Sensitivity

The analytical sensitivity of this ELISA was calculated by subtracting 2 standard deviations from the mean of 20 replicate analyses of the Zero Standard (Standard A).

Analytical sensitivity is: 2.5 pg/ml

The Limit of Blank (LoB) is 2.02 pg/ml.

The Limit of Detection (LoD) is 3.57 pg/ml.

The Limit of Quantification (LoQ) is 11.30 pg/ml.

## 9.4 Reproducibility

### 9.4.1 Intra-Assay

The intra-assay reproducibility was determined by replicate measurements of 6 saliva samples using the ELISA kit. The within assay precision is shown below:

Sample	1	2	3	4	5	6
Mean (pg/ml)	24.2	37.5	63.3	90.3	447.4	820.4
S.D. (pg/ml)	1.9	1.4	4.6	4.5	17.8	29.0
CV (%)	8.0	3.6	7.3	5.0	4.0	3.5
n =	20	20	20	20	20	20

### 9.4.2 Inter-Assay

The inter-assay variation was determined by duplicate measurements of six saliva samples on 10 different days using 17-OH Progesterone Saliva ELISA kits. Mean of the duplicate measurements is given below.

Sample	1	2	3	4	5	6
Mean (pg/ml)	9.4	50.7	101.1	211.8	512.5	800.2
SD (pg/ml)	1.0	1.7	7.6	8.3	10.3	38.2
CV (%)	10.4	3.4	7.5	3.9	2.0	4.8
n =	20	20	20	20	20	20



### 9.4.3 Inter-Lot

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

Sample	1	2	3	4	5	6
Mean (pg/ml)	10.2	44.3	100.4	205.3	515.7	798.1
SD (pg/ml)	1.3	1.5	6.1	3.6	19.5	46.8
CV (%)	10.4	3.1	5.5	1.5	1.3	6.4
n =	9	9	9	9	9	9

### 9.5 Recovery

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

Sample	1	2	3	4	5	6
Concentration (pg/ml)	3.7	17.9	282.8	824.1	1050.0	1200.0
Average % Recovery	101.7	102.1	104.1	98.5	99.3	100.4
Range of % Recovery	from 97.7	96.6	98.2	93.1	93.6	94.5
	to 103.9	107.5	109.5	103.8	103.6	105.1

### 9.6 Linearity

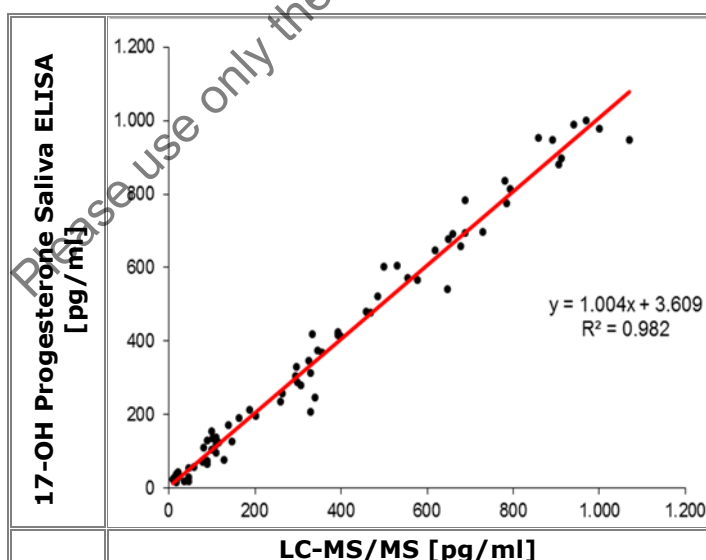
Six saliva samples containing different amounts of analyte (spiked and unspiked) were serially diluted with Standard A and assayed with this ELISA. Three native samples were serially diluted up to 1:128, and 3 samples were spiked with 17- $\alpha$ -OHP and then serially diluted up to 1:10. The percentage recovery was calculated by comparing the expected and measured values for 17- $\alpha$ -OHP.

An assay linearity of 3.6 - 1000 pg/ml has been identified as the usable range. Samples above this range must be diluted and re-run.

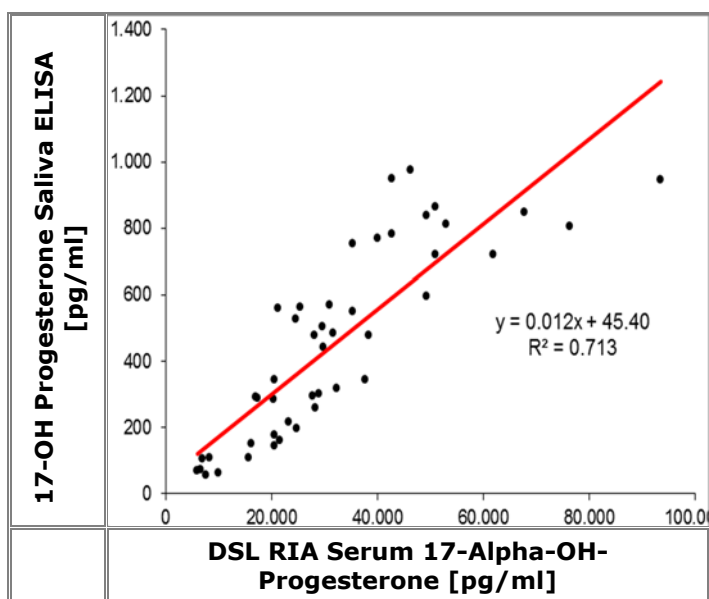
Sample	1	2	3	4	5	6
Concentration (pg/ml)	39.3	96.6	194.9	816.6	1050.0	1200.0
Average % Recovery	99.3	95.0	100.5	97.6	99.3	100.4
Range of % Recovery	from 87.2	86.1	91.5	93.8	93.6	94.5
	to 107.4	99.0	113.2	103.5	103.6	105.1

### 9.7 Comparison Studies

A study was performed using non-spiked Saliva from adult normal and CAH-patients were assayed in parallel with this ELISA and a reference LC-MS. Seventy-six patient saliva samples were tested on both the LC-MS and the Saliva ELISA test. The following results were obtained.



Another study was performed using 46 serum and saliva samples were taken in parallel at 8:00 am and assayed using the 17-OH Progesterone Saliva ELISA for the saliva samples and a Coated Tube RIA for 17-OHP for the serum samples. The patients were a collective of 22 children and young adults suffering from congenital adrenal hyperplasia (CAH). The results cover several years.



## 10 LIMITATIONS OF USE

Reliable and reproducible results will be obtained when the assay procedure is performed with a complete understanding of the package insert instruction and with adherence to good laboratory practice.

Any improper handling of samples or modification of this test might influence the results.

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

### 10.1 Interfering Substances

Blood contamination of more than 0.04 % in saliva samples will affect results, and usually can be seen by eye. Therefore, samples containing any visible blood should not be used.

Concentrations of Sodium Azide > 0.02 % interferes in this assay and may lead to false results.

### 10.2 High-Dose-Hook Effect

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

## 11 LEGAL ASPECTS

**Only for countries where the declaration of European Conformity (CE mark) is applicable.**

### 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 the manufacturer.

### 11.2 Therapeutic Consequences

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

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

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

### 11.3 Liability












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

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

### 12 REFERENCES / LITERATURE

1. Chrousos G. P., Loriaux D. L., Mann D. L. et al. : Late onset 21-hydroxylase deficiency mimicking idiopathic hirsutism or polycystic ovarian disease. *Annals Intern. Med.* 96: 143, 1982.
2. Meikle A. W., Worley R. J., West C. D.: Adrenal corticoid hyper-response in hirsute women. *Fertil. Steril.* 41: 575, 1984
3. Bustler J. E., Chang R. J., Preston D. L., et al. : Interrelationships of circulating maternal steroids ; progesterone, 16- $\alpha$  hydroxyprogesterone, 17- $\alpha$  hydroxyprogesterone, 20- $\alpha$  hydroxyprogesterone, gamma-5-pregnenolone. *J. Clin. Endocrinol. Metab.* 48: 133, 1979
4. Urban M. D., Lee P. A., Mignon C. J.: Adult high infertility in men with congenital adrenalized hyperplasia. *N. Engl. J. Med.* 299: 1392, 1978
5. Zerah, M., Pang, S., and New, M Morning Salivary 17-Hydroxyprogesterone as a Useful Screening Test for Nonclassical 21-Hydroxylase Deficiency, *J. Clinical Endo. And Metabolism*, Vol. 65, No.2, 1987
6. Otten, B.J., et. Al., Salivary Plasma Androstenedione and 17-Hydroxyprogesterone levels in Congenital Adrenal Hyperplasia, *J. Clin. Endo. And Metab.*, Vol. 57 No. 5, 1983.
7. Walker, R.F., et.al., Radioimmunoassay of 17-Hydroxyprogesterone in Saliva, Parotid Fluid, and Plasma of Congenital Adrenal Hyperplasia Patients, *Clin. Chem.*, 25/4, 542 – 545, 1979.

#### Symbols!

	Storage temperature		Manufacturer		Contains sufficient for <n> tests
	Expiry date		Batch code		For in-vitro diagnostic use only!
	Consult instructions for use		Content		CE labelled
	Caution		Catalogue number		

**1 EINLEITUNG**

Der **17-OH Progesterone Saliva ELISA** wird zur quantitativen Bestimmung von 17 $\alpha$ -Hydroxyprogesteron (17- $\alpha$ -OHP) in Speichel eingesetzt.

**Nur für In-vitro Diagnostik.**

**2 TESTPRINZIP**

Der 17-OH Progesterone Saliva ELISA ist ein Festphasen-Enzymimmunoassay, der auf dem **Prinzip der kompetitiven Bindung** basiert.

Die Wells der Mikrotiterplatten sind mit einem polyklonalen Antikörper beschichtet, der gegen eine definierte Antikörper-Bindungsstelle des 17- $\alpha$ -OHP-Moleküls gerichtet ist.

Die Proben werden in die beschichteten Wells gegeben und zusammen mit einem 17- $\alpha$ -OHP-Enzymkonjugat inkubiert. Während der Inkubation konkurriert das 17 $\alpha$ -OHP aus der Probe mit dem 17 $\alpha$ -OHP-Enzymkonjugat um die freien Bindungsstellen auf den beschichteten Wells.

Das nicht gebundene Konjugat wird durch Waschen der Wells entfernt. Anschließend wird die Substratlösung zugegeben und die Farbentwicklung nach einer definierten Zeit gestoppt.

Die Intensität der gebildeten Farbe ist umgekehrt proportional der 17 $\alpha$ -OHP-Konzentration in der Probe. Die Extinktion wird bei 450 nm mit einem Mikrotiterplattenleser gemessen.

**3 VORSICHTSMAßNAHMEN**

- Dieser Kit ist nur zum in vitro diagnostischen Gebrauch geeignet.
- Nur die gültige, im Testkit enthaltene, Gebrauchsanweisung verwenden.
- Informationen zu im Kit enthaltenen gefährlichen Substanzen entnehmen Sie bitte dem Sicherheitsdatenblatt.
- Alle Bestandteile dieses Testkits, die humanes Serum oder Plasma enthalten, wurden mit FDA-geprüften Methoden auf HIV I/II, HbsAg und HCV getestet und als negativ bestätigt. Jedoch sollten alle Bestandteile im Umgang und bei der Entsorgung wie mögliche Gefahrenstoffe betrachtet werden.
- Der Kontakt mit der *Stop Solution* sollte vermieden werden, da sie 0,5 M H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> enthält. Schwefelsäure kann Hautreizungen und Verbrennungen verursachen.
- Nicht mit dem Mund pipettieren und den Kontakt von Kitbestandteilen und Proben mit Haut und Schleimhäuten vermeiden.
- In den Bereichen, in denen Proben oder Kitbestandteile verwendet werden, nicht rauchen, essen oder Kosmetika verwenden.
- Beim Umgang mit Proben oder Reagenzien Einweg-Latexhandschuhe tragen. Die Verunreinigung von Reagenzien oder Proben mit Mikroben kann zu falschen Ergebnissen führen.
- Der Gebrauch sollte gemäß der Vorschriften einer entsprechenden nationalen Gefahrenstoff-Sicherheitsrichtlinie erfolgen.
- Reagenzien nicht nach dem auf dem Kit-Etikett angegebenen Verfallsdatum verwenden.
- Alle im Kit-Protokoll angegebenen Mengen müssen genau eingehalten werden. Optimale Ergebnisse können nur durch Verwendung kalibrierter Pipetten und Mikrotiterplatten-Lesegeräte erreicht werden.
- Komponenten von Kits mit unterschiedlichen Lotnummern nicht untereinander vertauschen. Es wird empfohlen, keine Wells von verschiedenen Platten zu verwenden, auch nicht, wenn es sich um das gleiche Lot handelt. Die Kits können unter anderen Bedingungen gelagert oder versendet worden sein, so dass die Bindungscharakteristik der Platten leicht unterschiedlich ausfällt.
- Chemikalien und zubereitete oder bereits benutzte Reagenzien müssen gemäß den nationalen Gefahrenstoffvorschriften wie gefährlicher Abfall behandelt werden.
- Sicherheitsdatenblätter für dieses Produkt sind auf Anfrage direkt vom Hersteller erhältlich.

**4 BESTANDTEILE DES KITS****4.1 Kitinhalt****SA E-6431**

96

**Microtiterwells**

Inhalt: 96 Wells, 12 x 8 Wells (einzeln brechbar);  
Mit anti-17- $\alpha$ -OHP-Antikörper (polyklonal) beschichtet.

**Standards und Controls** - gebrauchsfertig

Art. Nr.	Komponente	Standard	Konzentration	Volumen/Flasche
SA E-6401	STANDARD A	Standard A	0 pg/ml	1 ml
SA E-6402	STANDARD B	Standard B	10 pg/ml	1 ml
SA E-6403	STANDARD C	Standard C	50 pg/ml	1 ml
SA E-6404	STANDARD D	Standard D	250 pg/ml	1 ml
SA E-6405	STANDARD E	Standard E	500 pg/ml	1 ml
SA E-6406	STANDARD F	Standard F	1000 pg/ml	1 ml
SA E-6451	CONTROL 1	Kontrolle tief	Kontrollwerte und -bereiche entnehmen Sie bitte dem Fläschchenetikett oder dem QC-Datenblatt.	1 ml
SA E-6452	CONTROL 2	Kontrolle hoch		1 ml

Umrechnung:  $\text{pg/ml} \times 3,03 = \text{pmol/l}$

Inhalt: Enthält quecksilberfreies Konservierungsmittel.

**SA E-6440** CONJUGATE **Enzyme Conjugate** (Enzymkonjugat) - gebrauchsfertig

Inhalt: 17- $\alpha$ -OHP mit Meerrettichperoxidase konjugiert; Enthält quecksilberfreies Konservierungsmittel.

Volumen: 1 x 26 ml

**SA E-6455** SUBSTRATE **Substrate Solution** (Substratlösung) - gebrauchsfertig

Inhalt: Substratlösung TMB.

Volumen: 1 x 25 ml

**FR E-0080** STOP-SOLN **Stop Solution** (Stopplösung) - gebrauchsfertig

Inhalt: enthält 0,5 M H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>, Kontakt mit der Stopplösung vermeiden! Kann Hautreizungen und Verbrennungen verursachen.

Volumen: 1 x 14 ml

Mögliche Gefahren:



H290 Kann gegenüber Metallen korrosiv sein.  
H314 Verursacht schwere Verätzungen der Haut und schwere Augenschäden.

**FR E-0030** WASH- CONC 40X **Wash Solution** (Waschlösung) - 40X konzentriert

Volumen: 1 x 30 ml  
Siehe „Vorbereitung der Reagenzien“.

**Anmerkung:** Zusätzlicher *Standard A* zur Probenverdünnung ist auf Anfrage erhältlich.

#### 4.2 Erforderliche aber nicht enthaltene Geräte und Materialien

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

#### 4.3 Lagerung und Haltbarkeit des Kits

Die ungeöffneten Reagenzien behalten bei Lagerung um 2 °C - 8 °C ihre Reaktivität bis zum Verfallsdatum. Nach dem Verfallsdatum die Reagenzien nicht mehr verwenden.

Nach dem Öffnen sollten alle Reagenzien bei 2 °C - 8 °C gelagert werden.

Die Mikrotiterwells sollten bei 2 °C - 8 °C gelagert werden. Der einmal geöffnete Folienbeutel sollte stets sehr sorgfältig wieder verschlossen werden. Unter den beschriebenen Lagerbedingungen behalten geöffnete Kits 6 Wochen ihre Reaktivität.

#### 4.4 Vorbereitung der Reagenzien

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

##### **Wash Solution**

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

#### 4.5 Entsorgung des Kits

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

#### 4.6 Beschädigte Testkits

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

### 5 PROBENSAMMLUNG UND -VORBEREITUNG

Speichelproben werden in diesem Test als Probenmaterial eingesetzt.

Der Patient sollte vor der Probenahme 30 Minuten nicht essen, trinken, Kaugummi kauen oder Zähne putzen. Andernfalls 5 Minuten vor der Probenahme den Mund gründlich mit kaltem Wasser spülen.

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

Im Falle einer sichtbaren Kontamination mit Blut sollte die Probe verworfen werden. Das Probenbesteck wird mit Wasser gewaschen und nach 10 Minuten kann eine neue Probe genommen werden.

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

#### 5.1 Probenentnahme

Wir empfehlen Speichelproben mit einem kommerziell verfügbaren Besteck zu sammeln (z.B. **Sali Set**, Katalog Nr. SA D-6100, 100 Stück).

Es sollte kein Besteck mit Baumwolltupfer verwendet werden, wie z.B. Salivetten, da dies in den meisten Fällen zu deutlichen Interferenzen führt.

Da die Steroidhormone ein deutliches episodisches Sekretionsmuster zeigen, ist es wichtig auf den richtigen Zeitpunkt der Probenentnahme zu achten.

Um arbiträre (willkürliche) Ergebnisse zu vermeiden, empfehlen wir 5 Proben in einem Zeitraum von 2 bis 3 Stunden zu sammeln (mehrfache Probenentnahme). Dies sollte vorzugsweise vor einer Mahlzeit durchgeführt werden.

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

#### 5.2 Probenaufbewahrung und -vorbereitung

##### **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 für bis zu 9 Monate

Die eingefrorene Probe muss 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.**

Wird ein Set an Mehrfach-Proben getestet, muss im Labor in einem separaten Probengefäß eine **Mischprobe aus Aliquots der Überstände** der 5 Einzelproben hergestellt werden. Diese Mischprobe wird im Test eingesetzt.

##### **Überstand**

Lagerung: 2 Tage bei 2 °C bis 8 °C  
bis zu 9 Monate bei -20 °C

Der Überstand sollte nur einmal eingefroren werden.

Vor dem Einsatz im Test muss der aufgetaute Überstand durch hin und her schwenken 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 *Standard A* weiter verdünnt und nochmals bestimmt werden. Die Verdünnung muss jedoch bei der Berechnung der Konzentration beachtet werden.

Beispiel:

- a) Verdünnung 1:10: 10 µl Speichel + 90 µl *Standard A* gründlich mischen)
- b) Verdünnung 1:100: 10 µl Verdünnung a) 1:10 + 90 µl *Standard A* (gründlich mischen).

## 6 TESTDURCHFÜHRUNG

### 6.1 Allgemeine Hinweise

Alle Reagenzien und Proben müssen vor Gebrauch auf Raumtemperatur gebracht und gut durchgemischt 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.

<b>1.</b> Die benötigte Anzahl Wells in der Halterung befestigen.
<b>2. Je 25 µl Standards, Control und Probe (Überstand) mit neuen Plastikspitzen</b> in die entsprechenden Wells geben.
<b>3. 250 µl Enzyme Conjugate</b> in jedes Well geben. Für 10 Sekunden gut schütteln. Es ist sehr wichtig, in diesem Schritt eine komplette Durchmischung zu erreichen.
<b>4. 60 Minuten</b> bei Raumtemperatur inkubieren.
<b>5.</b> Den Inhalt der Wells kräftig ausschütteln. Wells <b>3-mal</b> mit 400 µl verdünnter <i>Wash Solution</i> waschen. Verbleibende Flüssigkeit durch Ausklopfen der Wells auf saugfähigem Papier entfernen. <b>Achtung:</b> Die Sensitivität und Präzision dieses Assays wird erheblich beeinflusst von der korrekten Durchführung des Waschschrittes!
<b>6. 200 µl Substrate Solution</b> in jedes Well geben.
<b>7. 15 Minuten</b> bei Raumtemperatur inkubieren.
<b>8.</b> Die enzymatische Reaktion durch Zugabe von <b>100 µl Stop Solution</b> in jedes Well abstoppen.
<b>9.</b> Die Optische Dichte bei <b>450±10 nm</b> mit einem Mikrotiterplatten-Lesegerät innerhalb von <b>10 Minuten</b> nach Zugabe der <b>Stop Solution</b> 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 (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 ELISA gezeigt. Diese Werte sollten **nicht** zur Berechnung von Patientendaten verwendet werden.

Standard	Optische Dichte (450nm)
Standard A (0 pg/ml)	1,92
Standard B (10 pg/ml)	1,72
Standard C (50 pg/ml)	1,47
Standard D (250 pg/ml)	0,91
Standard E (500 pg/ml)	0,64
Standard F (1000 pg/ml)	0,41

## 7 ERWARTETE WERTE

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

In einer Studie mit dem 17-OH Progesterone Saliva ELISA ergaben sich folgende Werte:

	Alter (Jahre)		Mittelwert (pg/ml)	S.D. (pg/ml)	Median (pg/ml)	5. - 95. Perzentile (pg/ml)
Kinder	6 - 12	N = 129	16,9	9,5	16,2	3,0 - 32,9
Frauen	21 - 50	Follikelphase: N = 124	22,0	11,1	19,9	8,2 - 41,1
		Lutealphase: N = 128	51,2	17,3	48,9	28,1 - 84,8
Männer	21 - 70	N = 152	24,9	12,6	21,9	10,6 - 54,8

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 QUALITÄTS-KONTROLLE

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

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

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

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

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

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

## 9 ASSAY CHARACTERISTIKA

### 9.1 Messbereich

Der Messbereich des Testes liegt zwischen 3,6 - 1000 pg/ml.

### 9.2 Spezifität der Antikörper (Kreuzreaktivität)

Die Daten entnehmen Sie bitte der ausführlichen englischen Arbeitsanleitung.



### 9.3 Sensitivität

Die analytische Sensitivität, definiert als Mittelwert, abzüglich der zweifachen Standardabweichung des Standards A (n = 20), beträgt 2,5 pg/ml.

Der „Limit of Blank“ (LoB) ist 2,02 pg/ml.

Die Nachweisgrenze (LoD) ist 3,57 pg/ml.

Die Quantifizierungsgrenze (LoQ) ist 11,30 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.

Der Patient sollte vor der Probenahme 30 Minuten nicht essen, trinken, Kaugummi kauen oder Zähne putzen. Andernfalls 5 Minuten vor der Probenahme den Mund gründlich mit kaltem Wasser spülen. Speichelproben sollten nicht bei Krankheiten, Entzündungen oder Verletzungen der Mundhöhle entnommen werden (Blutkontamination).

### 10.1 Interferenzen

Eine Kontamination der Speichelproben mit Blut von mehr als 0,04 % beeinflusst das Ergebnis. Eine solche Verunreinigung kann bereits mit den Augen wahrgenommen werden.

Konzentrationen von Natriumazid über 0,02 % beeinflussen den Test und können zu falschen Ergebnissen führen.

### 10.2 High-Dose-Hook-Effekt

Ein Hook-Effekt tritt in diesem Test nicht auf.

## 11 RECHTLICHE GRUNDLAGEN

### 11.1 Zuverlässigkeit der Ergebnisse

Der Test muss exakt gemäß der Testanleitung des Herstellers abgearbeitet werden. Darüber hinaus muss der Benutzer sich strikt an die Regeln der GLP (Good Laboratory Practice) oder andere eventuell anzuwendende Regeln oder nationale gesetzliche Vorgaben halten. Dies betrifft besonders den Gebrauch der Kontrollreagenzien. Es ist sehr wichtig, bei der Testdurchführung stets eine ausreichende Anzahl Kontrollen zur Überprüfung der Genauigkeit und Präzision mitlaufen zu lassen.

Die Testergebnisse sind nur gültig, wenn alle Kontrollen in den vorgegebenen Bereichen liegen, und wenn alle anderen Testparameter die vorgegebenen Spezifikationen für diesen Assay erfüllen. Wenn Sie bezüglich eines Ergebnisses Zweifel oder Bedenken haben, setzen Sie sich bitte mit dem Hersteller in Verbindung.

### 11.2 Therapeutische Konsequenzen

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

Nur in Fällen, in denen die Laborergebnisse in akzeptabler Übereinstimmung mit dem allgemeinen klinischen Bild des Patienten stehen, sollten therapeutische Konsequenzen eingeleitet werden.

Das Testergebnis allein sollte niemals als alleinige Grundlage für die Einleitung therapeutischer Konsequenzen dienen.

### 11.3 Haftung

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







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

### 12 LITERATUR

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

Please use only the valid version of the Instructions for Use provided with the kit

#### Symbole:

	Lagertemperatur		Hersteller		Enthält Testmaterial für <n> Teste
	Verwendbar bis	<b>LOT</b>	Chargennummer	<b>IVD</b>	In vitro Diagnostikum
	Vor Gebrauch Packungsbeilage lesen	<b>CONT</b>	Inhalt	<b>CE</b>	CE gekennzeichnet
	Achtung	<b>REF</b>	Katalog-Nummer		