

# Product information

Information about other products is available at: [www.demeditec.com](http://www.demeditec.com)



User's Manual

# Estrone-3-Sulfate equine ELISA

**VET**

**REF**

**DEV9933**



**96 Wells**

## CONTENTS

1. INTRODUCTION.....	3
2. PRINCIPLE .....	3
3. WARNINGS AND PRECAUTIONS.....	4
4. REAGENTS.....	5
5. SPECIMEN.....	6
6. ASSAY PROCEDURE .....	6
7. EXPECTED NORMAL VALUES .....	9
8. PERFORMANCE CHARACTERISTICS .....	10
9. LIMITATIONS OF PROCEDURE.....	11
10. REFERENCES.....	12
11. SHORT INSTRUCTION.....	13

## INHALTSVERZEICHNIS

1. EINLEITUNG.....	14
2. METHODIK UND TESTPRINZIP .....	14
3. HINWEISE UND VORSICHTSMASSNAHMEN.....	15
4. KITBESTANDTEILE.....	16
5. PROBENENTNAHME UND -VORBEREITUNG.....	17
6. TESTDURCHFÜHRUNG .....	17
7. NORMALWERTE .....	20
8. TESTCHARAKTERISTIKA .....	21
9. LIMITATIONEN:.....	22
10. LITERATUR .....	23
11. KURZANLEITUNG:.....	24
SYMBOLS USED WITH DEMEDITEC ELISAS .....	25

## 1 INTRODUCTION

### 1.1 INTENDED USE

The Demeditec Estrone-3-Sulfate equine is a competitive enzyme immunoassay for the quantitative measurement of estrone-3-sulfate in mare serum.

### 1.2 SUMMARY AND EXPLANATION

Estrone-3-Sulfate (E3S) is the predominant conjugated estrogen during pregnancy. It is produced by the fetus, possibly in association with the endometrium in the pregnant mare.

Different hormones are important for the complex events that occur during pregnancy in all mammals. In the mare these events include the maintenance of the corpus luteum function, formation of endometrial cups and development of secondary corpora lutea. Progesterone and PMSG (Pregnant Mare Serum Gonadotropine, eCG) and also free Estrogens, e.g. Estrone, are associated with these processes. It has been shown, that Estrone is rapidly conjugated after secretion and the ratio between conjugated and unconjugated estrogens is 100:1 in mare serum.

The conjugated estrogens, especially Estrone-3-sulfate, provide the opportunity to improve the accuracy of pregnancy diagnosis, to monitor the pregnancy and to distinguish whether the fetal development is normal or impaired. The diagnosis of embryonic death is usually made by using techniques of palpation of the uterus per rectum or ultrasound echography. The determination of Estrone-3-sulfate is an aid in the non-invasive diagnosis which allows a monitoring of the feto-placental unit during pregnancy. Only in mares with normal fetal development the values of Estrone-3-sulfate show a tremendous increase between day 75 and 100 of gestation.

## 2 PRINCIPLE

The Demeditec Estrone-3-Sulfate equine ELISA test kit is a solid phase enzyme immunoassay (ELISA) in the microplate format, designed for the quantitative measurement of estrone-3-sulfate. The microplate is coated with a polyclonal antibody specific for estrone-3-sulfate.

Calibrators and samples as well as a biotin-labeled estrone-3-sulfate are pipetted into the antibody coated microplate. During one hour incubation the estrone-3-sulfate of the calibrator/sample competes with the biotin-labeled estrone-sulfate for the binding sites of the antibody fixed on the inner surface of the wells.

Afterwards, horseradish peroxidase-labeled streptavidine is added. During an 30 minutes incubation, this enzyme-labeled streptavidine binds to the biotinylated estrone-3-sulfate. All wells are washed to remove excess of non-bound enzyme-labeled streptavidine.

A chromogenic substrate, TMB (3,3',5,5'-Tetra-Methyl-Benzidine), is added to all wells. During a 30 minutes incubation, the substrate is converted to a colored end product (blue) by the fixed enzyme. Enzyme reaction is stopped by dispensing of hydrochloric acid as stop solution (change from blue to yellow). The color intensity is inversely related to the concentration of estrone-3-sulfate present in the sample.

The optical density of the color solution is measured with a microplate reader at 450 nm. Bi-chromatic measurement with a 600 - 690 nm reference filter is recommended.

### 3 WARNINGS AND PRECAUTIONS

All reagents of this test kit are strictly intended for **veterinary use** only. Use by staff, who is specially informed and trained in methods which are carried out by use of immunoassays.

Please adhere strictly to the sequence of pipetting steps provided in this protocol.

All reagents should be stored refrigerated at 2 - 8 °C in their original container. Do not interchange kit components from different lots and assays. The expiration dates stated on the labels of the shipping container and all vials have to be observed. Do not use kit components beyond their expiration dates.

Allow all kit components and specimen to reach room temperature (18 – 28 °C) prior to use and mix well. During handling of all kit reagents, control and serum samples observe the existing legal regulations handling potentially infectious materials. Especially the following precautions should be taken:

- do not eat, drink or smoke
- do not pipette by mouth, use safety pipettes
- wear disposable gloves and avoid contact with kit reagents, control and sample material.

The test kit contains components of human origin which were found negative for Hepatitis B surface antigen and HIV (Human Immunodeficiency Virus). Nevertheless, for products derived from human or animal source it cannot be completely guaranteed, that they don't contain the above mentioned, others and not yet known or not diagnosticable pathogens. Sample material of patients (for example serum or plasma) normally used in laboratory determinations are always classified as potentially infectious. According to the same safety guides, kit reagents and control material are to be used. Samples of risk patients should be specially labeled and if necessary be handled in safety work benches (laminar flow bench).

The assay reagents contain against microbial growth preservation substances, avoid contact with skin and/or mucous membranes.

Avoid contact with the TMB (3,3',5,5'-Tetra-Methyl-Benzidine) substrate solution containing peroxide. If it comes into contact with skin, wash thoroughly with water. Avoid contact with any easily oxidized materials. Extreme temperature changes may cause spontaneous decay of the peroxide. Avoid the contact with the stop solution containing acid. By skin contact, wash thoroughly with water. All instrumentation employed to dispense the stop solution should be thoroughly cleaned after use.

## 4 REAGENTS

### 4.1 REAGENTS PROVIDED

1. **Divisible Microplate**, 12 x 8 (break apart) strips with 96 wells, ready to use coated with a polyclonal anti-equine E3S antibody
2. **Calibrators**, 7 vials, lyophilized, reconstitution required  
Equine E3S Calibrators highly purified in equine serum. The Calibrators contain 0, 5, 10, 50, 100, 300 and 1000 ng/ml, respectively
3. **Biotin-Labeled Estrone-3-Sulfate**, 1 vial, 11 ml, ready to use  
In a buffered solution with preservative
4. **Enzyme-Labeled Streptavidine**, 1 vial, 3 ml, blue, ready to use  
containing horseradish-peroxidase-labeled streptavidine
5. **Equine E3S Sample Buffer**, 1 vial, 11 ml, brown, ready to use
6. **TMB-Substrate Solution**, 1 vial, 22 ml, ready to use  
3,3',5,5'-Tetra-Methyl-Benzidine in buffered peroxidase solution
7. **Stop Solution**, 1 vial, 7 ml, ready to use  
Contains 2 M hydrochloric acid
8. **Wash Buffer**, 1 vial, 50 ml, 10x concentrated

### 4.2 REAGENT PREPARATION

#### **Calibrators:**

Reconstitute lyophilized Calibrator A with 2.0 ml dist. water and Calibrator B through Calibrator G with 1.0 ml dist. water 30 min. before use.

#### **Wash Buffer:**

Dilute with 450 ml dist. water to a final volume of 500 ml.

### 4.3 STORAGE CONDITIONS

When stored at 2°C to 8°C all reagents are stable until expiration date or 30 days after opening.

The Stop Solution is stable up to 2 months after opening or until the expiration date.

The Wash Buffer is stable for 3 months after dilution or until the expiration date.

Store Calibrators refrigerated, they will be stable at 2°C to 8°C for 7 days after reconstitution or until expiration date. For longer storage freeze at -20°C.

Protect Divisible Microplate from moisture. Store together with desiccant and carefully sealed in the plastic bag.

Protect TMB-Substrate Solution from light.

#### 4.4 MATERIALS REQUIRED BUT NOT PROVIDED

- Microplate reader capable for endpoint measurements at 450 nm (optional reference filter in the range of 600 - 690 nm)
- Vortex mixer
- Microplate mixer operating at 350 - 400 rpm
- Distilled or deionized water
- Graduated cylinders for 500 ml
- Plastic container for storage of the wash solution
- Adjustable pipette for up to 1000 µl
- Dispenser or repeatable pipet for 20 µl, 100 µl and 200 µl.

#### 5 SPECIMEN

For determination of Estrone-3-Sulfate equine serum is the preferred sample matrix. The procedure calls for 20 µl matrix per well.

Blood collection should be as stress-free as possible.

The samples may be stored refrigerated at 2 - 8°C for one week, or up to 6 months frozen at -20°C. To avoid repeated thawing and freezing the samples should be aliquoted.

Samples expected to contain estrone-3-sulfate concentrations higher than the highest calibrator (1000 ng/ml) should be diluted with the Zero Calibrator before assay. The additional dilution step has to be taken into account for the calculation of the results.

#### 6 ASSAY PROCEDURE

##### 6.1 GENERAL REMARKS

- Do not interchange components of different lots.
- All components should be at room temperature (18 – 28 °C) before use.
- All components of these test kits, supplied as concentrate should be diluted to their final concentration at least 30 minutes prior to use. Mix well, but prevent of foam formation.
- Use a disposable-tip micropipette to dispense serum samples. Pipet directly to the bottom of the wells. Change the tip between samples, to avoid carryover contamination.

## 6.2 ASSAY PROCEDURE

### 1. Preparation of calibrators:

The calibrators are supplied lyophilized. At least 30 minutes before use, reconstitute the calibrator A with 2.0 ml of distilled water, and each of the remaining calibrators B through G with 1.0 ml of distilled water. Use volumetric pipettes and mix by gentle inversion.

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
a	A	E	P2	P..								
b	A	E	P2	P..								
c	B	F	P3									
d	B	F	P3									
e	C	G	P4									
f	C	G	P4									
g	D	P1	P5									
h	D	P1	P5									

- Pipet **20 µl** of each calibrator and patient sample into the wells prepared.
- Add **100 µl** of **Biotin-Labeled Estrone-3-Sulfate** to every well.
- Add **100 µl** of **Sample Buffer** to every well.
- Rotate for **1 hour** at room temperature (18 - 28 °C) on a plate mixer (350-400 rpm). **Afterwards do not wash or discard!**
- Add **25 µl** of **Enzyme-Labeled Streptavidine** to every well.
- Shake again for **30 minutes**.
- Discard the content of the wells and wash **4 times** with **300 µl** buffered **wash solution**. Remove wash solution as much as possible by beating the microplate carefully.
- Add **200 µl** of liquid **TMB/Substrate Solution** to all wells.
- Incubate without shaking for **30 minutes** in the dark.
- Add **50 µl** of **Stop Solution** to each well and mix carefully.
- Read the optical density at **450 nm**. Bi-chromatic measurement with a reference at 600 - 690 nm is recommended.

**The developed color is stable for at least 15 minutes. Read optical densities during this time-frame.**

## 6.3 CALCULATION OF RESULTS

For evaluation of Demeditec Estrone-3-Sulfate equine ELISA a 4-Parameter-Fit with lin-log coordinates for optical density (linear scale) and concentration (logarithmic scale) is recommended.

Spline approximation with lin-log coordinates and log-log coordinates are also suitable.

**6.3.1 EXAMPLE OF TYPICAL CALIBRATOR CURVE**

The figure below shows typical results for Demeditec Estrone-3-Sulfate equine ELISA tests. These data are intended for illustration only and should not be used to calculate results from another run.

**Estrone-3-Sulfate equine ELISA**

	Replicate (OD)	Mean (OD)	Binding (%)	Equine E3S (ng/ml)
<b>Calibrators</b>				
<b>A</b>	2.702 ----- 2.571	2.637	<b>100</b>	<b>0</b>
<b>B</b>	1.933 ----- 1.941	1.937	<b>73</b>	<b>5</b>
<b>C</b>	1.706 ----- 1.725	1.716	<b>65</b>	<b>10</b>
<b>D</b>	0.870 ----- 0.884	0.877	<b>33</b>	<b>50</b>
<b>E</b>	0.671 ----- 0.604	0.638	<b>24</b>	<b>100</b>
<b>F</b>	0.258 ----- 0.252	0.255	<b>9.7</b>	<b>300</b>
<b>G</b>	0.078 ----- 0.096	0.087	<b>3.3</b>	<b>1000</b>
<b>Unknown Samples</b>				
<b>X 001</b>	0.589 ----- 0.571	0.580	22	105
<b>X 002</b>	0.323 ----- 0.322	0.323	12	242
<b>X 003</b>	0.227 ----- 0.236	0.232	8.8	366



## 7 EXPECTED NORMAL VALUES

In a reference range study equine serum samples were collected in the morning between 8 and 9 a.m. and in the evening between 5 and 6 p.m. Diurnal variations have not been observed. Analysis by the Demeditec Estrone-3-Sulfate equine test kit yielded the following results:

Group	Absolute Range (ng/ml)	n
Normal mares	nondetectable - 10	22

During the course of pregnancy in 26 mares the estrone-3-sulfate serum concentrations were measured using the Demeditec Estrone-3-Sulfate equine test procedure.

Gestation Week	N	mean ng/ml	min ng/ml	max ng/ml
3	12	2.6	0.4	9.2
4	20	1.8	0.4	4.9
5	21	2.1	0.2	6.5
6	18	2.8	0.4	7.1
7	17	3.2	0.4	9.1
8	16	4.5	0.9	14.0
9	19	5.1	0.9	14.1
10	11	9.7	2.8	34.7
11	18	11	2.1	54.9
12	13	23	2.7	109
13	20	34	3.1	161
14	9	94	7.8	232
15	17	80	4.8	262
16	10	185	30.9	340
17	16	186	11.6	421
18	11	367	67.5	577
19	16	374	22.2	863
20	10	575	289	905
21	12	516	71.5	1233
22	9	497	247	889
23	11	571	106	861
24	12	634	263	1621
25	13	577	184	1229
26	9	528	255	949
27	12	523	213	1258
28	12	464	267	795
29	11	473	245	778
30	7	336	209	590
31	5	385	206	478
32	4	349	184	504
33	11	302	180	510
34	10	316	131	523
35	7	215	84	506
36	8	233	113	349
37	10	189	85	358
38	11	207	85	305
39	6	93	77	123
40	7	157	52	252
41	5	145	88	227
42	8	147	58	239
43	2	106	86	126
44	6	168	101	210
45	4	80	74	85
46	9	112	32	192
47	5	101	43	214
48	5	94	66	129

Because of differences which may exist between laboratories with respect of population, laboratory technique and selection of reference groups, it is recommended that each laboratory establishes its own normal and pathological ranges of equine E3S. The reference ranges should be regarded as guidelines only.

## 8 PERFORMANCE CHARACTERISTICS

### 8.1 SENSITIVITY

The detection limit of the assay, defined as the concentration three standard deviation above the response at zero dose, is approximately 0.14 ng/ml.

### 8.2 SPECIFICITY

The antibodies in the Demeditec Estrone-3-Sulfate equine ELISA procedure are highly specific for estrone-3-sulfate, with low cross-reactivities to other steroids as listed below

Compound	Amount added ng/ml	Apparent Conc. ng/ml	Percent crossreactivity
Estrone	1000	78	7.8%
Estradiol	1000	2.2	0.22%
Estradiol-sulfate	1000	4.5	0.45 %
Equilin	1000	8.8	0.88%
Equilenin	1000	2.3	0.23%
Equilin-sulfate	1000	27.2	2.7%
Equilenin-Sulfate	1000	217	21.7%
Androstendione	1000	1.0	0.1%
Dehydro-iso-androsterone-3-sulfate	1000	5.2	0.5%
Dihydrotestosterone	1000	2.0	0.2%
Testosterone	1000	1.4	0.14%
Progesterone	1000	2.3	0.23%
Androsterone	1000	1.5	0.15%

### 8.3 REPRODUCIBILITY

Statistics for Coefficients of variation (CV) were calculated for each of three samples from the results of 12 pairs of wells in a single run for Intra-Assay precision and the Inter-Assay precision was calculated from the results of 10 different runs of three samples:

#### Estrone-3-Sulfate equine ELISA

Intra-Assay		
Sample	Mean	CV %
1	13.3	6.2
2	27.7	7.6
3	70.6	7.8

Inter-Assay		
Sample	Mean	CV %
1	31.1	9.6
2	89.5	5.3
3	241	7.0

#### 8.4 RECOVERY

Three spiking solutions were prepared using the equine E3S zero calibrator, to represent 1500, 4000 and 6000 ng/ml, respectively. A 50 µl aliquot of each solution (A, B, C) was spiked into 950 µl aliquots of three different patient serum samples, for a spiking ratio of 1 to 20, leaving the serum matrix of the spiked samples relatively intact. All samples were then assayed by the Demeditec Estrone-3-Sulfate equine test procedure.

Sample	Diluted Solution	measured Concentration [ng/ml]	expected Concentration [ng/ml]	Recovery [%]
1	-	1.0	-	-
	A	79.4	76	104
	B	200	201	100
	C	324	301	108
2	-	0.0	-	-
	A	67.8	75	90
	B	176	200	88
	C	274	300	91
3	-	1.7	-	-
	A	81.9	76.7	107
	B	216	201.7	107
	C	298	301.7	99

#### 8.5 LINEARITY

Three serum samples were assayed both undiluted and diluted with E3S zero calibrator. The observed and expected values are presented below in ng/ml

##### Estrone-3-Sulfate equine ELISA

Sample	Dilution Factor	measured Concentration [ng/ml]	expected Concentration [ng/ml]	Recovery [%]
1	8 in 8	235	-	-
	4 in 8	107	118	91
	2 in 8	53	59	90
	1 in 8	27	29	93
2	8 in 8	322	-	-
	4 in 8	155	161	96
	2 in 8	74	81	91
	1 in 8	38	40	95
3	8 in 8	470	-	-
	4 in 8	215	235	91
	2 in 8	107	118	91
	1 in 8	50	59	85

#### 9 LIMITATIONS OF PROCEDURE

Samples expected to contain estrone-3-sulfate concentrations greater than the highest calibrator (1000 ng/ml) should be diluted with Zero Calibrator.

---

**10 REFERENCES**

1. Bouhamidi R, Gaillard JL, Silberzahn P, Martin B  
Binding of Estrogen-3-Sulfates to stallion plasma and equine serum albumine.  
J Steroid Biochem 1992, 42: 345-349
2. Cox JE  
Oestrone and equilin in the plasma of pregnant mare  
J Reprod Fert 1975, Suppl 23: 463-468
3. Darenius K, Kindahl H, Knudsen O, Madej A, Edqvist LE  
PMSG, progesterone and oestrone sulfate during normal pregnancy and early fetal death.  
Departments of Obstetrics and Gynecology and Clinical Chemistry, Swedish University of  
Agricultural Sciences, Uppsala, Sweden
4. Hearp RB, Hamon M, Allen WR.  
Studies on oestrogen synthesis by the preimplantation equine conceptus  
J Reprod Fert 1982: Suppl 32: 343-352
5. Hughes JP, Stabenfeldt GH, Warren EJ  
Estrous cycle and ovulation in the mare  
JAVMA 1972 161:1367-1374
6. Hyland JH, Wright PJ, Manning SJ.  
An investigation of the use of plasma oestrone sulfate concentrations for the diagnosis of  
pregnancy in mares.  
Australian Vet J 1984, 61: 123
7. Jeffcott LB, Hyland JH, MacLean AA, Dyke T, Robertson-Smith G.  
Changes in maternal hormone concentrations associated with induction of fetal death at day  
45 of gestation in mares.  
J Reprod Fert 1987, Suppl 35: 461-467
8. Hyland JH, Langsford DA.  
Changes in urinary and plasma oestrone sulfate concentrations after induction foetal death  
in mares at 45 days of gestation  
Australian Vet J 1990, 67: 349-351
9. Kasman LH, Hughes JP, Stabenfeldt GH, Starr MD, Lasley BL  
Estrone sulfate concentrations as an indicator of fetal demise in horses  
Am J Vet Res 1988, 49: 184-187
10. Kindahl H, Knudsen O, Madej A, Edqvist LE.  
Progesterone, prostaglandin F-2 $\alpha$ , PMSG and oestrone sulfate during early pregnancy in the mare.  
J Reprod Fert 1982, Suppl 32: 353-359
11. Makawiti DW, Allen WE, Kilpatrick MJ  
Changes in oestrone sulfate concentrations in peripheral plasma of pony mares associated with follicular  
growth, ovulation and early pregnancy.  
J Reprod Fert 1983, 68: 481-487
12. Muyan M, Roser JF, Dybal N, Baldwin DM.  
Modulation of gonadotropin-releasing hormone-stimulated luteinizing hormone release in cultured male  
equine anterior pituitary cells by gonadal steroids  
Biol of Reprod 1993, 49: 340-345
13. Möstl E  
The horse feto-placental unit.  
Exp Clin Endocrin 1994, 102: 166-168
14. Ousey JC, Rosedale PD, Cash RSG, Worthy K.  
Plasma concentrations of progestagens, oestrone sulfate and prolactin in pregnant mares  
subjected to natural challenge with equid herpesvirus-1.  
J Reprod Fert 1987, Suppl 35: 519-528
15. Parkes RD, Blackmore DJ, Rance DA, Park BK, Dean PDG  
Plasma concentrations of equilin and oestrone in the assessment of fetoplacental function in the mare.  
Vet Rec 1977, 100: 511-512
16. Sanchi EM, LeBlanc MM, Weston PG.  
Progesterone, oestrone sulfate and cortisol concentrations in pregnant mares during medical  
and surgical disease  
J Reprod Fert 1991, Suppl 44: 627-634
17. Setchell BP, Cox JE.  
Secretion of free and conjugated steroids by the horse testis into lymph and venous blood  
J Reprod Fert 1982, Suppl 32: 123-127
18. Terqui M, Palmer E.  
Oestrogen pattern during early pregnancy in the mare  
J Reprod Fert 1979, Suppl 27: 441-446

**11 SHORT INSTRUCTION**(all sample sizes given in  $\mu\text{l}$ )

MP Well	ng/ml	0	1	2	3	4	5	6	Sample
		0	5	10	50	100	300	1000	
Steps	Solution								
Pipet	Calibrator	20	20	20	20	20	20	20	-
Pipet	Sample	-	-	-	-	-	-	-	20
Pipet	Biotin-Labeled Estrone-3-Sulfate	100	100	100	100	100	100	100	100
Pipet	Sample Buffer	100	100	100	100	100	100	100	100
Incubate for <b>1 hour</b> at RT on a shaker <b>Afterwards do <u>not</u> wash!</b>									
Pipet	Enzyme-labeled streptavidine	25	25	25	25	25	25	25	25
Incubate for <b>30 minutes</b> at RT on a shaker									
Decant Wash <b>4x with 300 <math>\mu\text{l}</math></b> of buffered wash solution									
Pipet	Substrate Solution	200	200	200	200	200	200	200	200
Incubate for <b>30 min</b> at RT <b>in the dark</b>									
Pipet	Stop Solution	50	50	50	50	50	50	50	50
Read at $\lambda = 450 \text{ nm}$									

## 1 EINLEITUNG

### 1.1 VERWENDUNG

Der Demeditec Estrone-3-Sulfate equine ELISA ist ein Enzymimmunoassay zur quantitativen Bestimmung von Estron-3-Sulfat in Pferdeserum.

### 1.2 ZUSAMMENFASSUNG UND ERLÄUTERUNG

Estron-3-Sulfat ist das vorherrschende konjugierte Östrogen der trächtigen Stute. Es wird durch den Feten, eventuell in Assoziation mit dem Endometrium, gebildet.

Unterschiedliche Hormone sind für die komplexen Vorgänge während der Gravidität bei der Stute wie bei allen Säugern verantwortlich. Progesteron, PMSG (Pregnant Mare Serum Gonadotropine) und auch freie Östrogene wie Estron sind mit diesen Prozessen assoziiert. Es konnte gezeigt werden, dass Estron kurz nach der Sekretion konjugiert wird. Die konjugierte Form kann im Vergleich zur unkonjugierten Form in einem Verhältnis von 100:1 im Serum der Stute nachgewiesen werden.

Die konjugierten Östrogene, insbesondere Estron-3-Sulfat, geben die Möglichkeit, die Genauigkeit der Diagnose der Gravidität zu verbessern, den Verlauf der Gravidität zu kontrollieren und zu beurteilen, ob eine normale oder gestörte fetale Entwicklung vorliegt. Bisher wurde durch eine rektale Palpation des Uterus oder mittels Ultraschall die Diagnose des fetalen Todes gestellt. Mit der Bestimmung des Estron-3-Sulfates steht jetzt eine nicht-invasive Methode zur Beurteilung der fetoplazentaren Einheit bei der trächtigen Stute zur Verfügung. Nur bei einer normalen fetalen Entwicklung ist ein starker Anstieg der Estron-3-Sulfat Konzentrationen im Serum zwischen dem 75. und 100. Tag nach Befruchtung nachzuweisen.

## 2 METHODIK UND TESTPRINZIP

Der vorliegende Demeditec Estrone-3-Sulfate equine ELISA Test ist ein Enzymimmunoassay zur quantitativen Bestimmung von Estron-3-Sulfat im Pferdeserum.

Serumproben, Kontrollen oder Standards werden zusammen mit Biotin-markiertem Estron-3-Sulfat in die mit polyklonalen anti-Estron-3-Sulfat Antikörpern beschichteten Mikroküvetten gegeben. Während der ersten einstündigen Inkubation konkurrieren das Biotin-markierte Estron-3-Sulfat und das Estron-3-Sulfat aus der Probe um die Bindungsplätze des spezifischen Antikörpers.

Nach Zugabe des Enzym-markierten Streptavidins bildet sich während der zweiten 30-minütigen Inkubation zwischen dem an der Innenwand der Mikroküvetten immobilisierten Biotin-markierten Estron-3-Sulfat und dem Enzym-markierten Streptavidin ein Komplex aus. Ungebundene Reaktionspartner werden in dem anschließenden Waschschrift entfernt.

Zugegebenes Substrat, 3',3',5',5'-Tetramethylbenzidin (TMB) wird vom gebundenen Enzym zu einem farbigen Endprodukt umgesetzt. Durch Zugabe der Stopp-Lösung wird nach 30 Minuten die enzymatische Reaktion gestoppt.

Die bei einer Wellenlänge von 450 nm gemessene optische Dichte der Lösung ist der Konzentration an Estron-3-Sulfat in der Serumprobe umgekehrt proportional.

### 3 HINWEISE UND VORSICHTSMASSNAHMEN

Alle Reagenzien dieser Testpackung dürfen ausschließlich zur **Veterinär-Forschung** verwendet werden. Die Anwendung sollte durch Personal erfolgen, das speziell in Immunoassay-Verfahren unterrichtet und ausgebildet wurde.

Die Einhaltung des vorgeschriebenen Protokolls zur Durchführung des Tests ist unbedingt erforderlich.

Die Lagerung der Kitreagenzien sollte gekühlt bei 2 - 8°C in den Originalflaschen erfolgen. Einzelne Komponenten verschiedener Chargen und Testbestecke sollten nicht ausgetauscht werden. Die auf der Verpackung und den Etiketten der einzelnen Komponenten angegebenen Verfallsdaten sind zu beachten. Verfallene Kitbestandteile nicht benutzen.

Alle Testkomponenten vor Testbeginn auf Raumtemperatur (18 - 28 °C) bringen und gut durchmischen.

Für den Umgang mit Kitreagenzien, Kontroll- und Patientenproben sind die Vorschriften zur Unfallverhütung für den Gesundheitsdienst beim Umgang mit potentiell infektiösem Material einzuhalten. Insbesondere sind folgende Vorsichtsmaßnahmen zu beachten:

- nicht essen, trinken oder rauchen
- nicht mit dem Mund pipettieren, Sicherheitspipetten verwenden
- Handschuhe tragen und Kontakt mit Reagenzien, Kontrollproben und Untersuchungsmaterial vermeiden

In diesem Testbesteck enthaltene Reagenzien humanen Ursprungs erwiesen sich bei der Prüfung auf Hepatitis B Oberflächen-Antigen und HIV (Human Immuno-deficiency Virus) als negativ. Dennoch ist bei Produkten menschlichen oder tierischen Ursprungs nie mit letzter Sicherheit auszuschließen, dass die genannten, andere oder ggf. noch nicht bekannte oder diagnostizierbare Krankheitserreger enthalten sind.

Untersuchungsmaterial von Patienten (z.B. Plasma- oder Serumproben), wie es für Laboratoriumsuntersuchungen eingesetzt wird, ist stets als potentiell infektiös einzustufen. Unter den gleichen Sicherheitsvorkehrungen sind ebenso Kitreagenzien und Kontrollproben zu handhaben. Proben von Risikopatienten sollten stets besonders gekennzeichnet werden und ggf. in Sicherheitswerkbänken (z. B. Laminar Flow-Arbeitsplatz) bearbeitet werden.

Die Reagenzien dieses Testbestecks enthalten zum Schutz gegen mikrobielles Wachstum Konservierungsmittel; daher ist die Berührung mit der Haut und /oder Schleimhäuten zu vermeiden.

Ein Kontakt mit der Peroxid enthaltenden TMB (3,3',5,5'-Tetra-Methyl-Benzidin) Substratlösung ist zu vermeiden. Bei Hautkontakt unverzüglich und kräftig mit Wasser abwaschen. Vermeiden Sie den Kontakt mit leicht oxidierbaren Materialien. Extreme Temperaturschwankungen können zum spontanen Zerfall des Peroxids führen.

Ein Kontakt mit der säurehaltigen Stopp-Lösung ist zu vermeiden. Bei Hautkontakt unverzüglich und kräftig mit Wasser abwaschen. Alle Geräte, die zur Verteilung der Stopp-Lösung verwendet wurden, sofort nach Gebrauch gründlich reinigen.

## 4 KITBESTANDTEILE

### 4.1 MITGELIEFERTE KOMPONENTEN

1. **Teilbare Mikrotiterplatte**, 12 x 8 (teilbar) Streifen mit 96 Vertiefungen, gebrauchsfertig beschichtet mit einem polyklonalen anti-equine E3S- Antikörper
2. **Standards**, 7 Fl., lyophilisiert, Auflösen erforderlich  
Equine E3S Standards enthalten Estron-3-Sulfat in Pferdeserum. Die Standards enthalten jeweils 0, 5, 10, 50, 100, 300 und 1000 ng/ml.
3. **Biotin-markiertes Estron-3-Sulfat**, 1 Fl., 11 ml, gebrauchsfertig
4. **Enzym-markiertes Streptavidin**, 1 Fl., 3 ml, blau, gebrauchsfertig  
Enthält Meerrettichperoxidase markiertes Streptavidin.
5. **Equine E3S Probenpuffer**, 1 Fl., 11 ml, braun, gebrauchsfertig
6. **TMB-Substrat-Lösung**, 1 Fl., 22 ml, gebrauchsfertig  
3,3',5,5'-Tetra-Methyl-Benzidin in gepufferter Peroxid-Lösung
7. **Stopp-Lösung**, 1 Fl., 7 ml, gebrauchsfertig  
Enthält 2 M Salzsäure
8. **Waschlösung**, 1 Fl., 50 ml, 10x konzentriert

### 4.2 VORBEREITUNG DER REAGENZIEN

#### **Standards:**

Den Standard A mit 2 ml dest. Wasser, die Standards B bis G mit 1 ml dest. Wasser 30 min. vor Gebrauch auflösen.

#### **Waschlösung:**

Mit 450 ml dest. Wasser auf 500 ml auffüllen.

### 4.3 LAGERUNG DER KOMPONENTEN

Bei einer Lagerung bei 2 °C bis 8 °C sind alle Komponenten bis zum angegebenen Verfallsdatum oder 30 Tage nach dem Öffnen haltbar.

Die Stopp-Lösung ist bis zu 2 Monate nach dem Öffnen oder bis zum Verfallsdatum haltbar.

Die Waschlösung ist bis zu 3 Monate nach der Verdünnung oder bis zum Verfallsdatum haltbar.

Lagern Sie die Standards tiefgefroren, nach dem Auflösen sind diese bei 2 °C bis 8 °C bis zu 7 Tage haltbar; für längere Aufbewahrung aliquotieren und bei -20 °C aufbewahren.

Schützen Sie die Mikrotiterplatte vor Feuchtigkeit. Zusammen mit dem Trocknungsmittel in dem verschließbaren Beutel aufbewahren.

Schützen Sie die TMB-Substrat-Lösung vor Licht.



#### 4.4 ERFORDERLICHE HILFSMITTEL

- Mikrotiter-Platten-Photometer mit optischem Filter für 450 nm, optional mit Referenzwellenlänge von 600 - 690 nm
- Wirbelmischer (Vortex)
- Mikrotiterplatten-Schüttler (350 – 400 Upm)
- destilliertes Wasser
- Messzylinder für 500 ml
- Plastikgefäße zur Aufbewahrung des Waschpuffers
- variable Mikropipette für bis zu 1.000 µl
- Dispenser bzw. Mehrkanalpipette für 25 µl, 50 µl und 200 µl.

#### 5 PROBENENTNAHME UND -VORBEREITUNG

Die Bestimmung des equinen Estron-3-Sulfats wird bevorzugt im Serum durchgeführt. Es werden 20 µl Probe pro Einzelbestimmung benötigt.

Die Proben können für eine Woche gekühlt bei 2-8°C oder bis zu 6 Monaten gefroren bei -20 °C gelagert werden. Die Proben sollten vor dem Einfrieren aliquotiert werden. Wiederholtes Einfrieren und Auftauen sollte vermieden werden.

Proben, deren Konzentration höher als der höchste Standardwert (1000 ng/ml) liegen könnte, sollten vor der Abarbeitung im Nullstandard vorverdünnt werden. Die zusätzliche Verdünnungsstufe ist bei der Auswertung der Ergebnisse zu berücksichtigen.

#### 6 TESTDURCHFÜHRUNG

##### 6.1 ALLGEMEINE ANMERKUNGEN

- Die Komponenten aus Testbestecken verschiedener Lose nicht austauschen.
- Alle Komponenten auf Raumtemperatur (18 – 28 °C) bringen.
- Die als Konzentrat gelieferten Reagenzien müssen mindestens 30 Minuten vor Gebrauch auf ihre Endkonzentration verdünnt werden. Gut mischen, aber Schaumbildung vermeiden.
- Zum Vorlegen der Plasmaproben sollten Pipetten mit Einmalspitzen verwendet werden. Direkt auf den Boden der Vertiefungen pipettieren. Für jede Probe die Spitzen wechseln, um Verschleppungen zu vermeiden.

## 6.2 TESTDURCHFÜHRUNG

### 1. Vorbereitung der Standards:

Die Standards werden lyophilisiert geliefert. Mindestens 30 Minuten vor Gebrauch werden der Standard A mit 2,0 ml und die Standards B bis G mit 1,0 ml dest. Wasser rekonstituiert. Während des Rekonstitutionsvorganges sollten die Fläschchen durch leichtes Schwenken gemischt werden.

### 2. Eine ausreichende Zahl Streifen zu je 8 Mikroküvetten zum Ansatz von Standards, Kontrollen und Proben in Doppelbestimmung vorbereiten; z. B.:

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
a	A	E	P2	P..								
b	A	E	P2	P..								
c	B	F	P3									
d	B	F	P3									
e	C	G	P4									
f	C	G	P4									
g	D	P1	P5									
h	D	P1	P5									

### 3. Jeweils 20 µl der Standards, Kontrollen und Proben entsprechend der Plattenbelegung auf den Boden der Mikroküvetten pipettieren.

### 4. 100 µl Biotin-markierte E3S-Lösung in jede Mikroküvette pipettieren.

### 5. 100 µl Probenpuffer in jede Mikroküvette pipettieren.

### 6. Platte 1 Stunde bei Raumtemperatur (18 – 28 °C) auf dem Schüttler inkubieren. **Danach nicht waschen oder abkippen!**

### 7. 25 µl Enzym-markierte Streptavidin Lösung in jede Mikroküvette pipettieren.

### 8. Platte 30 Minuten bei Raumtemperatur (18 – 28 °C) auf dem Schüttler inkubieren.

### 9. Platte dekantieren und 4 mal jeweils mit 300 µl Waschpuffer waschen. Restliche Flüssigkeit sorgfältig durch Ausklopfen der Platte entfernen.

### 10. 200 µl TMB-Substratlösung in jede Vertiefung pipettieren.

### 11. 30 Minuten bei Raumtemperatur (18 – 28 °C) im Dunkeln inkubieren.

### 12. 50 µl Stopp-Lösung in jede Vertiefung pipettieren.

### 13. Optische Dichte bei 450 nm messen. Bi-chromatische Messung mit einer Referenzfilterwellenlänge im Bereich von 600 - 690 nm ist empfehlenswert.

**Die Färbung der Lösung ist mindestens 15 Minuten stabil. In dieser Zeit sollte gemessen werden.**

### 6.3 AUSWERTUNG DER ERGEBNISSE

Zur Auswertung des Demeditec Estrone-3-Sulfate equine ELISA Tests ist eine 4-Parameter Logistik mit lin-log-Koordinaten für die optischen Dichte (lineare Achse) und für die Konzentration (logarithmische Achse) die Kurvenanpassung der Wahl.

Eine geglättete Spline-Funktion mit lin-log- oder log-log-Koordinaten ist ebenso möglich.

#### 6.3.1 AUSWERTEBEISPIEL

Die folgende Tabelle zeigt typische Messwerte bei den Demeditec Estrone-3-Sulfate equine ELISA Tests. Die Daten dienen nur der Illustration und sind nicht dazu bestimmt, die Ergebnisse eines anderen Testansatzes danach zu berechnen.

**Estrone-3-Sulfate equine ELISA**

	Doppelbestimmung (OD)	Mittelwert (OD)	Bindung (%)	Equine E3S (ng/ml)
<b>Standards</b>				
<b>A</b>	2.702 ----- 2.571	2.637	<b>100</b>	<b>0</b>
<b>B</b>	1.933 ----- 1.941	1.937	<b>73</b>	<b>5</b>
<b>C</b>	1.706 ----- 1.725	1.716	<b>65</b>	<b>10</b>
<b>D</b>	0.870 ----- 0.884	0.877	<b>33</b>	<b>50</b>
<b>E</b>	0.671 ----- 0.604	0.638	<b>24</b>	<b>100</b>
<b>F</b>	0.258 ----- 0.252	0.255	<b>9.7</b>	<b>300</b>
<b>G</b>	0.078 ----- 0.096	0.087	<b>3.3</b>	<b>1000</b>
<b>Proben</b>				
<b>X 001</b>	0.589 ----- 0.571	0.580	22	105
<b>X 002</b>	0.323 ----- 0.322	0.323	12	242
<b>X 003</b>	0.227 ----- 0.236	0.232	8.8	366

## 7 NORMALWERTE

Im Rahmen einer Studie wurden mit dem Demeditec Estrone-3-Sulfate equine ELISA Test die folgenden Werte in Serumproben, die zwischen 8 und 9 Uhr morgens bzw. 5 und 6 Uhr abends entnommen wurden, bestimmt: Schwankungen während des Tagesverlaufes wurden nicht beobachtet

Gruppe	Absoluter Bereich (ng/ml)	n
Normale Stuten	nicht nachweisbar -10	22

In 26 Stuten wurde das Estron-3-Sulfat während der Trächtigkeit bestimmt:

Trächtigkeits- Woche	n	Mittelwert ng/ml	min ng/ml	max ng/ml
3	12	2.6	0.4	9.2
4	20	1.8	0.4	4.9
5	21	2.1	0.2	6.5
6	18	2.8	0.4	7.1
7	17	3.2	0.4	9.1
8	16	4.5	0.9	14.0
9	19	5.1	0.9	14.1
10	11	9.7	2.8	34.7
11	18	11	2.1	54.9
12	13	23	2.7	109
13	20	34	3.1	161
14	9	94	7.8	232
15	17	80	4.8	262
16	10	185	30.9	340
17	16	186	11.6	421
18	11	367	67.5	577
19	16	374	22.2	863
20	10	575	289	905
21	12	516	71.5	1233
22	9	497	247	889
23	11	571	106	861
24	12	634	263	1621
25	13	577	184	1229
26	9	528	255	949
27	12	523	213	1258
28	12	464	267	795
29	11	473	245	778
30	7	336	209	590
31	5	385	206	478
32	4	349	184	504
33	11	302	180	510
34	10	316	131	523
35	7	215	84	506
36	8	233	113	349
37	10	189	85	358
38	11	207	85	305
39	6	93	77	123
40	7	157	52	252
41	5	145	88	227
42	8	147	58	239
43	2	106	86	126
44	6	168	101	210
45	4	80	74	85
46	9	112	32	192
47	5	101	43	214
48	5	94	66	129

Da Faktoren wie Population, Labortechnik und Auswahl der Referenzgruppen diese Werte beeinflussen können, wird empfohlen, dass jeder Anwender seinen eigenen Normalbereich bezüglich seines Patientenkollektivs festlegt. Die angegebenen Werte dienen zur Orientierung.

## 8 TESTCHARAKTERISTIKA

### 8.1 SENSITIVITÄT

Die untere Nachweisgrenze des Demeditec Estrone-3-Sulfate equine ELISA Test, definiert als die Konzentration, die sich drei Standardabweichungen von Null unterscheidet, wurde bei 0,14 ng/ml ermittelt.

### 8.2 SPEZIFITÄT

Das in diesem Testbesteck verwendete Antiserum ist hochspezifisch für Estron-3-Sulfat mit niedrigen Kreuzreaktivitäten zu anderen im Serum vorliegenden Steroiden.

Substanz	zugesezt ng/ml	gefunden ng/ml	Kreuzreaktivität
Estron	1000	78	7.8%
Estradiol	1000	2.2	0.22%
Estradiol-Sulfat	1000	4.5	0.45 %
Equilin	1000	8.8	0.88%
Equilenin	1000	2.3	0.23%
Equilin-Sulfat	1000	27.2	2.7%
Equilenin-Sulfat	1000	217	21.7%
Androstendion	1000	1.0	0.1%
Dehydro-iso-Androsteron-3-Sulfat	1000	5.2	0.5%
Dihydrotestosteron	1000	2.0	0.2%
Testosteron	1000	1.4	0.14%
Progesteron	1000	2.3	0.23%
Androsteron	1000	1.5	0.15%

### 8.3 REPRODUZIERBARKEIT

Nachfolgende Variationskoeffizienten (VK) wurden für die Intra-Assay-Varianz auf der Basis einer 12 fachen Bestimmung von drei Proben ermittelt; für die Inter-Assay-Varianz wurden die Ergebnisse aus 10 Assays für drei Proben ermittelt.

#### Estron-3-Sulfat

Intra-Assay		
Probe	Mittelwert	CV %
1	13.3	6.2
2	27.7	7.6
3	70.6	7.8

Inter-Assay		
Probe	Mittelwert	CV %
1	31.1	9.6
2	89.5	5.3
3	241	7.0

#### 8.4 WIEDERFINDUNG

Dem E3S-Nullstandard wurden drei unterschiedliche Mengen an Estron-3-Sulfat zugegeben (1500, 4000 und 6000 ng/ml). 50 µl jeder Lösung wurden zu je 950 µl dreier verschiedener Serumproben von Patienten hinzugefügt (Verdünnungsverhältnis von 1:20), um die Serum-Matrix der Proben möglichst intakt zu lassen. Alle Proben wurden dann mit dem Demeditec Estrone-3-Sulfate equine ELISA Test gemessen.

Probe	Verdünnungs-Lösung	gemessene Konzentration [ng/ml]	erwartete Konzentration [ng/ml]	Wiederfindung [%]
1	-	1.0	-	-
	A	79.4	76	104
	B	200	201	100
	C	324	301	108
2	-	0.0	-	-
	A	67.8	75	90
	B	176	200	88
	C	274	300	91
3	-	1.7	-	-
	A	81.9	76.7	107
	B	216	201.7	107
	C	298	301.7	99

#### 8.5 LINEARITÄT

Serumproben von drei Stuten wurden sowohl unverdünnt als auch verdünnt mit E3S-Null-Standard getestet. Der Assay ist über den gesamten Messbereich linear.

##### Estron-3-Sulfat

Probe	Verdünnungs-faktor	gemessene Konzentration [ng/ml]	erwartete Konzentration [ng/ml]	Wiederfindung [%]
1	8 in 8	235	-	-
	4 in 8	107	118	91
	2 in 8	53	59	90
	1 in 8	27	29	93
2	8 in 8	322	-	-
	4 in 8	155	161	96
	2 in 8	74	81	91
	1 in 8	38	40	95
3	8 in 8	470	-	-
	4 in 8	215	235	91
	2 in 8	107	118	91
	1 in 8	50	59	85

#### 9 LIMITATIONEN:

Proben, die eine höhere Konzentration als der höchste Standard (1000 ng/ml) haben, müssen vor der Bestimmung mit dem Null-Standard verdünnt werden

## 10 LITERATUR










1. Bouhamidi R, Gaillard JL, Silberzahn P, Martin B  
Binding of Estrogen-3-Sulfates to stallion plasma and equine serum albumine.  
J Steroid Biochem 1992, 42: 345-349
2. Cox JE  
Oestrone and equilin in the plasma of pregnant mare  
J Reprod Fert 1975, Suppl 23: 463-468
3. Darenius K, Kindahl H, Knudsen O, Madej A, Edqvist LE  
PMSG, progesterone and oestrone sulfate during normal pregnancy and early fetal death.  
Departments of Obstetrics and Gynecology and Clinical Chemistry, Swedish University of  
Agricultural Sciences, Uppsala, Sweden
4. Hearp RB, Hamon M, Allen WR.  
Studies on oestrogen synthesis by the preimplantation equine conceptus  
J Reprod Fert 1982: Suppl 32: 343-352
5. Hughes JP, Stabenfeldt GH, Warren EJ  
Estrous cycle and ovulation in the mare  
JAVMA 1972 161:1367-1374
6. Hyland JH, Wright PJ, Manning SJ.  
An investigation of the use of plasma oestrone sulfate concentrations for the diagnosis of  
pregnancy in mares.  
Australian Vet J 1984, 61: 123
7. Jeffcott LB, Hyland JH, MacLean AA, Dyke T, Robertson-Smith G.  
Changes in maternal hormone concentrations associated with induction of fetal death at day  
45 of gestation in mares.  
J Reprod Fert 1987, Suppl 35: 461-467
8. Hyland JH, Langsford DA.  
Changes in urinary and plasma oestrone sulfate concentrations after induction foetal death  
in mares at 45 days of gestation  
Australian Vet J 1990, 67: 349-351
9. Kasman LH, Hughes JP, Stabenfeldt GH, Starr MD, Lasley BL  
Estrone sulfate concentrations as an indicator of fetal demise in horses  
Am J Vet Res 1988, 49: 184-187
10. Kindahl H, Knudsen O, Madej A, Edqvist LE.  
Progesterone, prostaglandin F-2 $\alpha$ , PMSG and oestrone sulfate during early pregnancy in the mare.  
J Reprod Fert 1982, Suppl 32: 353-359
11. Makawiti DW, Allen WE, Kilpatrick MJ  
Changes in oestrone sulfate concentrations in peripheral plasma of pony mares associated with follicular  
growth, ovulation and early pregnancy.  
J Reprod Fert 1983, 68: 481-487
12. Muyan M, Roser JF, Dybal N, Baldwin DM.  
Modulation of gonadotropin-releasing hormone-stimulated luteinizing hormone release in cultured male  
equine anterior pituitary cells by gonadal steroids  
Biol of Reprod 1993, 49: 340-345
13. Möstl E  
The horse feto-placental unit.  
Exp Clin Endocrin 1994, 102: 166-168
14. Ousey JC, Rosedale PD, Cash RSG, Worthy K.  
Plasma concentrations of progestagens, oestrone sulfate and prolactin in pregnant mares  
subjected to natural challenge with equid herpesvirus-1.  
J Reprod Fert 1987, Suppl 35: 519-528
15. Parkes RD, Blackmore DJ, Rance DA, Park BK, Dean PDG  
Plasma concentrations of equilin and oestrone in the assessment of fetoplacental function in the mare.  
Vet Rec 1977, 100: 511-512
16. Sanchi EM, LeBlanc MM, Weston PG.  
Progesterone, oestrone sulfate and cortisol concentrations in pregnant mares during medical  
and surgical disease  
J Reprod Fert 1991, Suppl 44: 627-634
17. Setchell BP, Cox JE.  
Secretion of free and conjugated steroids by the horse testis into lymph and venous blood  
J Reprod Fert 1982, Suppl 32: 123-127
18. Terqui M, Palmer E.  
Oestrogen pattern during early pregnancy in the mare  
J Reprod Fert 1979, Suppl 27: 441-446

**11 KURZANLEITUNG:**(alle Volumenangaben in  $\mu$ l)







MT-Platten-Well	ng/ml	0	1	2	3	4	5	6	Probe
		0	5	10	50	100	300	1000	
<b>Schritte</b>	<b>Lösung</b>								
Pipettieren	Standard	20	20	20	20	20	20	20	-
Pipettieren	Probe	-	-	-	-	-	-	-	20
Pipettieren	Biotin-markiertes Estron-3-Sulfat	100	100	100	100	100	100	100	100
Pipettieren	Probenpuffer	100	100	100	100	100	100	100	100
<b>1 Stunde</b> bei RT auf einem Schüttler inkubieren <b>Anschließend <u>nicht</u> waschen!</b>									
Pipettieren	Enzym-markiertes Streptavidin	25	25	25	25	25	25	25	25
<b>30 Minuten</b> bei RT auf einem Schüttler inkubieren									
Dekantieren <b>4x mit 300 <math>\mu</math>l</b> Waschlösung waschen									
Pipettieren	Substrat-Lösung	200	200	200	200	200	200	200	200
<b>30 min</b> bei RT <b>im Dunkeln</b> inkubieren									
Pipettieren	Stopp-Lösung	50	50	50	50	50	50	50	50
Messen bei <b><math>\lambda = 450</math> nm</b>									



## SYMBOLS USED WITH DEMEDITEC ELISAS

Symbol	English	Deutsch	Français	Espanol	Italiano
	European Conformity	CE-Konformitätskennzeichnung	Conforme aux normes européennes	Conformidad europea	Conformità europea
	Consult instructions for use	Gebrauchsanweisung beachten	Consultez le Mode d'emploi	Consulte las Instrucciones	Consulti le istruzioni
	In vitro diagnostic device	In-vitro-Diagnostikum	Diagnostic in vitro	Diagnóstico in vitro	Diagnostica in vitro
	Catalogue number	Katalog-Nr.	Référence	No de catálogo	No. di Cat.
	Lot. No. / Batch code	Chargen-Nr.	No. de lot	Número de lote	Lotto no
	For veterinary use	Nur für Veterinärfor- schung			
	Contains sufficient for <n> tests/	Ausreichend für "n" Ansätze	Contenu suffisant pour "n" tests	Contenido suficiente para <n> ensayos	Contenuto sufficiente per "n" saggi
	Storage Temperature	Lagerungstemperatur	Temperature de conservation	Temperatura de conservación	Temperatura di con- servazione
	Expiration Date	Mindesthaltbarkeits- datum	Date limite d'utilisation	Fecha de caducidad	Data di scadenza
	Legal Manufacturer	Hersteller	Fabricant	Fabricante	Fabbricante
<i>Distributed by</i>	Distributor	Vertreiber	Distributeur	Distribuidor	Distributore
<i>Content</i>	Content	Inhalt	Contenu	Contenido	Contenuto
<i>Volume/No.</i>	Volume / No.	Volumen/Anzahl	Volume/Numéro	Volumen/Número	Volume/Quantità
<i>Microtiterwells</i>	Microtiterwells	Mikrotiterwells	Plaques de micro- titration	Pocillos de la Microplaca	Micropozzetti
<i>Antiserum</i>	Antiserum	Antiserum	Antisérum	Antisuero	Antisiero
<i>Enzyme Con- jugate</i>	Enzyme Conjugate	Enzymkonjugat	Conjugué enzymatique	Conjugado enzimático	Tracciante enzimatico
<i>Enzyme Com- plex</i>	Enzyme Complex	Enzymkomplex	Complexe enzima- tique	Complex enzimático	Complesso enzimatico
<i>Substrate So- lution</i>	Substrate Solution	Substratlösung	Solution substrat	Solución de sustrato	Soluzione di substrato
<i>Stop Solution</i>	Stop Solution	Stopplösung	Solution d'arrêt	Solución de paro	Soluzione d' arresto
<i>Zero Standard</i>	Zero Standard	Nullstandard	Standard 0	Standard 0	Standard zero
<i>Standard</i>	Standard	Standard	Standard	Calibrador	Standard
<i>Control</i>	Control	Kontrolle	Contrôle	Control	Controllo
<i>Assay Buffer</i>	Assay Buffer	Assaypuffer	Tampon d'essai	Tampón de ensayo	Tampone del test
<i>Wash Solution</i>	Wash Solution	Waschlösung	Solution de lavage	Solución de lavado	Soluzione di lavaggio
<i>1N NaOH</i>	1N NaOH	1N NaOH	1N NaOH	1N NaOH	1N NaOH (idrossido di sodio 1N)
<i>1 N HCl</i>	1 N HCl	1 N HCl	1N HCl	1 N HCl	
<i>Sample Dilu- ent</i>	Sample Diluent	Probenverdünnungs- medium	Solution pour dilution de l'échantillon		Diluyente dei campioni
<i>Conjugate Diluent</i>	Conjugate Diluent	Konjugatverdünnungs- medium	Solution pour dilution du conjugué		Diluyente del tracciante

Demeditec Estrone-3-Sulfate equine ELISA DEV9933

Symbol	Portugues	Dansk	Svenska	Ελληνικά
	Conformidade com as normas europeias	Europaeisk overensstemmelse	Europeisk överensstämmelse	Ευρωπαϊκή Συμμόρφωση
	Instruções de uso	Brugermanual	Användar manual	Εγχειρίδιο χρήστη
<b>IVD</b>	Diagnóstico in vitro	In vitro diagnostik	Diagnostik in vitro	in vitro διαγνωστικό
<b>REF</b>	Catálogo n.º	Katalognummer	Katalog nummer	Αριθμός καταλόγου
<b>LOT</b>	No do lote	Lot nummer	Batch-nummer	Αριθμός Παρτίδος
<b>VET</b>				
		Indeholder tilstrækkeligt til "n" test	Innehåller tillräckligt till "n" tester	Περιεχόμενο επαρκές για «n» εξετάσεις
	Temperatura de conservação	Opbevaringstemperatur	Förvaringstemperatur	Θερμοκρασία αποθήκευσης
	Prazo de validade	Udløbsdato	Bäst före datum	Ημερομηνία λήξης
	Fabricante	Producent	Tillverkare	Κατασκευαστής
<i>Distributed by</i>				
<i>Content</i>	Conteúdo	Indhold	Innehåll	Περιεχόμενο
<i>Volume/No.</i>	Volume/Número	Volumen/antal	Volym/antal	Όγκος/αριθ..
<i>Microtiterwells</i>	Alvéolos de microtitulação	Mikrotiterbrønde	Brunnar i Mikrotiter-platta	Πηγαδάκια Μικροτιτλοδοτήσεως
<i>Antiserum</i>	Anti-soro	Antiserum	Antiserum	Αντιορός
<i>Enzyme Conjugate</i>	Conjugado enzimático	Enzymkonjugat	Enzymkonjugat	Συζευγμένο ενζυμο
<i>Enzyme Complex</i>	Complexo enzimático	Enzymkompleks	Enzymkomplex	Σύμπλοκο ενζύμου
<i>Substrate Solution</i>	Solução de substrato	Substratopløsning	Substratlösning	Διάλυμα υποστρώματος
<i>Stop Solution</i>	Solução de paragem	Stopopløsning	Stopp lösning	Διάλυμα τερματισμού
<i>Zero Standard</i>	Padrão zero	Standard 0	Standard 0	Πρότυπο Μηδέν
<i>Standard</i>	Calibrador	Standard	Standard	Πρότυπα
<i>Control</i>	Controlo	Kontrol	Kontroll	Έλεγχος
<i>Assay Buffer</i>	Tampão de teste	Assay buffer	Assay Buffer	Ρυθμιστικό Διάλυμα Εξέτασης
<i>Wash Solution</i>	Solução de lavagem	Vaskebuffer	Tvätt lösning	Διάλυμα πλύσεως
<i>1N NaOH</i>	1N NaOH	1N NaOH	1N NaOH	1N NaOH
<i>1 N HCl</i>	1 N HCl	1 N HCl	1 N HCl	1 N HCl
<i>Sample Diluent</i>				
<i>Conjugate Diluent</i>				