

Instructions for Use

Salivary Cortisol ELISA

IVD



REF SLV-2930

Σ 96



DRG 

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

Distributed by:

DRG 

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

**Please use only the valid version of the Instructions for Use provided with the kit.
Verwenden Sie nur die jeweils gültige, im Testkit enthaltene, Gebrauchsanweisung.
Si prega di usare la versione valida delle istruzioni per l'uso a disposizione con il kit.
Por favor, se usa solo la version valida de la metodico técnico incluido aqui en el kit.**

Contents / Inhaltsverzeichnis / Contenuti / Contenido / Contenu

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

1	EINLEITUNG	10
2	TESTPRINZIP.....	10
3	VORSICHTSMAßNAHMEN	10
4	BESTANDTEILE DES KITS.....	11
5	PROBENVORBEREITUNG	12
6	TESTDURCHFÜHRUNG.....	12
7	ERWARTETE WERTE	14
8	QUALITÄTSKONTROLLE	14
9	ASSAY CHARACTERISTIKA	14
10	GRENZEN DES TESTS	14
11	RECHTLICHE GRUNDLAGEN.....	15

1	INTRODUZIONE.....	16
2	PRINCIPIO DEL TEST	16
3	PRECAUZIONI	16
4	COMPONENTI DEL KIT	17
5	CAMPIONI	18
6	ATTUAZIONE DEL TEST	18
7	VALORI NORMALI	20
8	CONTROLLO QUALITÀ	20
9	CARATTERISTICHE DEL TEST	21
10	LIMITAZIONE DEL TEST	21
11	ASPETTI LEGALI	21

12	REFERENCES / LITERATURE / LITERATUR / BIBLIOGRAFIA	22
----	---	----

	SYMBOLS USED	23
--	--------------------	----

1 INTRODUCTION

1.1 Intended Use

An enzyme immunoassay for the quantitative in vitro diagnostic measurement of active free cortisol (hydrocortisone and hydroxycorticosterone) in saliva. Measurements of cortisol are used in the diagnosis and treatment of disorders of the adrenal gland.

1.2 Summary and Explanation

Cortisol, the most potent glucocorticoid, is produced by the zona fasciculata of the human adrenal cortex (1-3). It is synthesized from cholesterol and its production is stimulated by pituitary adrenocorticotropic hormone (ACTH) in response to corticotropin-releasing hormone (CRH). ACTH and CRH secretions are inhibited by high cortisol levels in a negative feedback loop. Cortisol acts through specific intracellular receptors and affects numerous physiologic systems including immune function, glucose counter regulation, vascular tone, and bone metabolism.

Cortisol release follows a diurnal rhythm with highest concentrations in the morning (about 1 hour after waking). Thereafter, Cortisol concentration steadily decreases to a very low level 12 hours later (4-7). Cortisol secretion increases in response to any stress in the body, whether physical (such as illness, trauma, surgery, or temperature extremes) or psychological (8-14). After secretion, cortisol causes a breakdown of muscle protein, leading to release of amino acids into the bloodstream. These amino acids are then used by the liver to synthesize glucose for the brain, a process called gluconeogenesis. Cortisol also leads to the release of fatty acids from fat cells and its utilization in muscle cells. Taken together, these energy-directing processes prepare the individual to deal with stressors and ensure that the brain receives adequate energy sources.

Elevated cortisol levels and lack of diurnal variation have been identified with Cushing's disease (ACTH hypersecretion) (7). CRH is released in a cyclic fashion by the hypothalamus, resulting in diurnal peaks (elevated in the morning) and nadirs (low in the evening) for plasma ACTH and cortisol levels. The diurnal variation is lost in patients with Cushing and these patients have elevated levels of evening plasma cortisol. The measurement of late-night salivary cortisol is an effective and convenient screening test for Cushing syndrome (15). Elevated circulating cortisol levels have also been identified in patients with adrenal tumors (16). Low cortisol levels are found in primary adrenal insufficiency (e.g. adrenal hypoplasia, Addison's disease) and in ACTH deficiency (17). Due to the normal circadian variation in cortisol levels, distinguishing normal from abnormally low cortisol levels can be difficult, therefore several daily collections are recommended.

Saliva is an excellent medium to measure steroids because it is a natural ultra-filtrate of blood. 90-99% of steroid hormones in the blood are bound to carrier proteins (corticoid-binding globulin, sex-hormone binding globulin and albumin) and are unavailable to target tissues. Only about 1-10% of the steroids in blood are in the unbound or free fraction, and can diffuse into target tissues of the body and into saliva. The process of passive diffusion of non-bound steroid hormones is supported by their low molecular weight (less than 400 daltons) and relative lipophilicity, thus enabling them to freely diffuse from blood to saliva (18-21).

2 PRINCIPLE

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

The microtiter wells are coated with a monoclonal (mouse) antibody directed towards an antigenic site on the cortisol molecule.

Endogenous cortisol of a patient sample competes with a cortisol-horseradish peroxidase conjugate for binding to the coated antibody. After incubation the unbound conjugate is washed off.

The amount of bound peroxidase conjugate is inversely proportional to the concentration of cortisol in the sample. After addition of the substrate solution, the intensity of colour developed is inversely proportional to the concentration of cortisol in the patient sample.

3 WARNINGS AND PRECAUTIONS

1. This kit is for in vitro diagnostic use only. For professional use only.
2. All reagents of this test kit which contain human serum or plasma have been tested and confirmed negative for HIV I/II, HBsAg and HCV by FDA approved procedures. All reagents, however, should be treated as potential biohazards in use and for disposal.
3. Before starting the assay, read the instructions completely and carefully. Use the valid version of the package insert provided with the kit. Be sure that everything is understood.
4. The microplate contains snap-off strips. Unused wells must be stored at 2 °C to 8 °C in the sealed foil pouch and used in the frame provided.
5. Pipetting of samples and reagents must be done as quickly as possible and in the same sequence for each step.
6. Use reservoirs only for single reagents. This especially applies to the substrate reservoirs. Using a reservoir for dispensing a substrate solution that had previously been used for the conjugate solution may turn solution colored. Do not pour reagents back into vials as reagent contamination may occur.
7. Mix the contents of the microplate wells thoroughly to ensure good test results. Do not reuse microwells.
8. Do not let wells dry during assay; add reagents immediately after completing the rinsing steps.
9. Allow the reagents to reach room temperature (21 °C to 26 °C) before starting the test. Temperature will affect the absorbance readings of the assay. However, values for the patient samples will not be affected.
10. Never pipet by mouth and avoid contact of reagents and specimens with skin and mucous membranes.
11. Do not smoke, eat, drink or apply cosmetics in areas where specimens or kit reagents are handled.
12. Wear disposable latex gloves when handling specimens and reagents. Microbial contamination of reagents or specimens may give false results.
13. Handling should be done in accordance with the procedures defined by an appropriate national biohazard safety guideline or regulation.
14. Do not use reagents beyond expiry date as shown on the kit labels.
15. All indicated volumes have to be performed according to the protocol. Optimal test results are only obtained when using calibrated pipettes and microtiterplate readers.
16. Do not mix or use components from kits with different lot numbers. It is advised not to exchange wells of different plates even of the same lot. The kits may have been shipped or stored under different conditions and the binding characteristics of the plates may result slightly different.
17. Avoid contact with *Stop Solution* containing 0.5 M H₂SO₄. It may cause skin irritation and burns.
18. Some reagents contain Proclin, BND and/or MIT as preservatives. In case of contact with eyes or skin, flush immediately with water.
19. TMB substrate has an irritant effect on skin and mucosa. In case of possible contact, wash eyes with an abundant volume of water and skin with soap and abundant water. Wash contaminated objects before reusing them. If inhaled, take the person to open air.
20. Chemicals and prepared or used reagents have to be treated as hazardous waste according to the national biohazard safety guideline or regulation.
21. For information on hazardous substances included in the kit please refer to Safety Data Sheets. Safety Data Sheets for this product are available upon request directly from DRG Instruments GmbH.

4 REAGENTS

4.1 Reagents provided

1. **Microtiterwells**, 12 x 8 (break apart) strips, 96 wells;
Wells coated with a anti-cortisol antibody (monoclonal).
2. **Standard (Standard 0-6)**, 7 vials, 1 mL each, ready to use;
Concentrations: 0 – 0.1 – 0.5 – 1.5 – 4 – 10 – 30 ng/mL,
Conversion factor: 1 ng/mL = 2.76 nmol/L;
Standards are calibrated against mass spectrometry.
Contain non-mercury preservative.
3. **Control Low & High**, 2 vials, 1 mL each, ready to use;
For control values and ranges please refer to vial label or QC-Datasheet.
Contain non-mercury preservative.
4. **Enzyme Conjugate**, 1 vial, 26 mL, ready to use;
Cortisol conjugated to horseradish peroxidase;
Contain non-mercury preservative.
5. **Substrate Solution**, 1 vial, 25 mL, ready to use;
Tetramethylbenzidine (TMB).
6. **Stop Solution**, 1 vial, 14 mL, ready to use;
contains 0.5M H₂SO₄.
Avoid contact with the stop solution. It may cause skin irritations and burns.
7. **Wash Solution**, 1 vial, 30 mL (40X concentrated);
see „Preparation of Reagents“.

Note: Additional *Standard 0* for sample dilution is available upon request.

4.2 Materials required but not provided

- A microtiter plate calibrated reader (450 ± 10 nm), (e.g. the DRG Instruments Microtiter Plate Reader).
- Calibrated variable precision micropipettes (100 µL, 200 µL).
- Absorbent paper.
- Distilled or deionized water
- Timer.
- Semilogarithmic 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.

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.

4.6 Damaged Test Kits

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

5 SPECIMEN COLLECTION AND PREPARATION

Eating, drinking, chewing gums or brushing teeth should be avoided for 30 minutes before sampling. Otherwise, it is recommended to rinse mouth thoroughly with cold water 5 minutes prior to sampling.

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

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

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

5.1 Specimen Collection

Saliva samples should be collected only using special saliva sampling devices (vial and straw), e.g. SALI-TUBES 100 (SLV-4158).

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

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

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

5.2 Specimen Storage and Preparation

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

Each sample has to be frozen, thawed, and centrifuged at least once in order to separate the mucins by centrifugation. Upon arrival of the samples in the lab the samples have to stay in the deep freeze at least overnight. Next morning the frozen samples are warmed up to room temperature and mixed carefully.

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

Now the clear colorless supernatant is easy to pipette.

If a set of multiple samples is to be tested, the lab (after at least one freezing, thawing, and centrifugation cycle) has to mix the 5 single samples in a separate sampling device and perform the testing from this mixture.

5.3 Specimen Dilution

If in an initial assay, a specimen is found to contain more than the highest standard, the specimens can be diluted with *Standard 0* 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 0* (mix thoroughly)

b) Dilution 1:100: 10 µl of dilution a) + 90 µl *Standard 0* (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.
- Respect the incubation times as stated in this instructions for use.

6.2 Assay Procedure

Each run must include a standard curve.

1. Secure the desired number of Microtiter wells in the frame holder.
2. Dispense **100 µL** of each **Standard, Control and samples** with new disposable tips into appropriate wells.
3. Dispense **200 µL Enzyme Conjugate** into each well.
Thoroughly mix for 10 seconds. It is important to have a complete mixing in this step.
4. Incubate for **60 minutes** at room temperature
Note: Incubation on a shaker at 300 rpm is recommended.
5. Briskly shake out the contents of the wells.
Rinse the wells **5 times** with diluted *Wash Solution* (400 µL per well). Strike the wells sharply on absorbent paper to remove residual droplets.
Important note:
The sensitivity and precision of this assay is markedly influenced by the correct performance of the washing procedure!
6. Add **200 µL** of **Substrate Solution** to each well.
7. Incubate for **30 minutes** at room temperature.
8. Stop the enzymatic reaction by adding **100 µL** of **Stop Solution** to each well.
9. Determine the absorbance (OD) of each well at **450 ± 10 nm** with a microtiter plate reader.
It is recommended that the wells be read **within 10 minutes** after adding the *Stop Solution*.

6.3 Calculation of Results

1. Calculate the average absorbance values for each set of standards, controls and patient samples.
2. Construct a standard curve by plotting the mean absorbance obtained from each standard against its concentration with absorbance value on the vertical(Y) axis and concentration on the horizontal (X) axis.
3. Using the mean absorbance value for each sample determine the corresponding concentration from the standard curve.
4. Automated method: The results in the Instructions for Use have been calculated automatically using a 4-Parameter curve fit. (4 Parameter Rodbard or 4 Parameter Marquardt are the preferred methods.) Other data reduction functions may give slightly different results.
5. The concentration of the samples can be read directly from this standard curve. Samples with concentrations higher than that of the highest standard have to be further diluted. For the calculation of the concentrations this dilution factor has to be taken into account.

6.3.1 Example of Typical Standard Curve

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

Standard		Optical Units (450 nm)
Standard 0	0 ng/mL	2.00
Standard 1	0.1 ng/mL	1.89
Standard 2	0.5 ng/mL	1.62
Standard 3	1.5 ng/mL	1.22
Standard 4	4.0 ng/mL	0.75
Standard 5	10 ng/mL	0.40
Standard 6	30 ng/mL	0.18

7 EXPECTED NORMAL VALUES

In order to determine the normal range of Salivary Cortisol ELISA, samples from adult male and female apparently healthy subjects, were collected in the morning, at noon, and in the evening and analyzed using the DRG ELISA kit. The following range was calculated from this study.

	Morning	Noon	Evening
n	73	73	73
Range (Min. - Max.) (ng/mL)	0.94 - 19.80	0.32 - 12.70	0.20 - 4.00
Mean (ng/mL)	3.02	1.52	0.88
2.5 th – 97.5 th Percentile (ng/mL)	1.19 - 7.21	0.66 - 3.74	0.33 - 2.23
Median (ng/mL)	2.44	1.25	0.77

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 cortisol 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 calibration curve. A statistically significant number of controls should be assayed to establish mean values and acceptable ranges to assure proper performance.

It is recommended to use control samples according to state and federal regulations. The use of control samples is advised to assure the day to day validity of results. Use controls at both normal and pathological levels.

The controls and the corresponding results of the QC-Laboratory are stated in the QC certificate added to the kit. The values and ranges stated on the QC sheet always refer to the current kit lot and should be used for direct comparison of the results.

It is also recommended to make use of national or international Quality Assessment programs in order to ensure the accuracy of the results.

Employ appropriate statistical methods for analysing control values and trends. If the results of the assay do not fit to the established acceptable ranges of control materials patient results should be considered invalid.

In this case, please check the following technical areas: Pipetting and timing devices; photometer, expiration dates of reagents, storage and incubation conditions, aspiration and washing methods.

After checking the above mentioned items without finding any error contact your distributor or DRG directly.

9 PERFORMANCE CHARACTERISTICS

9.1 Assay Dynamic Range

The range of the assay is between 0.09 – 30 ng/mL.

9.2 Specificity (Cross Reactivity)

The following materials have been evaluated for cross reactivity.

Steroids	% Cross reactivity
Progesterone	23.40
DHEA	11.39
Androstenedione	1.97
Estriol (E3)	1.47
Testosterone	< 0.001
DHEA-S	< 0.001
Estrone (E1)	< 0.001
Estradiol (E2)	< 0.001

9.3 Analytical Sensitivity

The analytical sensitivity of the DRG ELISA was calculated by subtracting 2 standard deviations from the mean of twenty (20) replicate analyses of *Standard 0* (S_0).

The analytical sensitivity of the assay is 0.09 ng/mL.

9.4 Reproducibility

9.4.1 Intra-Assay

The intra-assay variation was determined by replicate measurements of 3 saliva samples within one run using the DRG ELISA. The within-assay variability is shown below:

Sample	n	Mean (ng/mL)	CV (%)
1	20	3.08	6.1
2	20	8.18	3.0
3	20	20.14	2.6

9.4.2 Inter-Assay

The inter-assay variation was determined by duplicate measurements of 4 saliva samples in 20 different runs (2 replicates) using the DRG ELISA. The inter-assay variability is shown below:

Sample	n	Mean (ng/mL)	CV (%)
1	40	0.64	13.6
2	40	7.37	5.6
3	40	11.76	6.2
4	40	19.78	4.3

9.5 Recovery

Recovery of the DRG ELISA was determined by adding increasing amounts of the analyte to 3 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.

	Saliva 1	Saliva 2	Saliva 3
Concentration (ng/mL)	8.60	11.62	20.33
Average % recovery	103.1	97.4	102.2
Range of % recovery			
from	98.9	96.5	98.2
to	107.1	98.8	108.3

9.6 Linearity

Three saliva samples containing different amounts of analyte were serially diluted with Standard 0 and assayed with the DRG ELISA.

The percentage recovery was calculated by comparing the expected and measured values for cortisol.

	Saliva 1	Saliva 2	Saliva 3
Concentration (ng/mL)	7.91	13.84	19.15
Average % recovery	104.9	109.7	96.5
Range of % recovery from	97.1	105.5	87.8
to	111.3	114.5	102.2

10 LIMITATIONS OF PROCEDURE

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

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

10.1 High-Dose-Hook Effect

No hook effect was observed in this test

10.2 Drug Interferences

Until today no substances (drugs) are known to us, which have an influence to the measurement of Cortisol in a sample.

11 LEGAL ASPECTS

11.1 Reliability of Results

The test must be performed exactly as per the manufacturer's instructions for use. Moreover the user must strictly adhere to the rules of GLP (Good Laboratory Practice) or other applicable national standards and/or laws. This is especially relevant for the use of control reagents. It is important to always include, within the test procedure, a sufficient number of controls for validating the accuracy and precision of the test.

The test results are valid only if all controls are within the specified ranges and if all other test parameters are also within the given assay specifications. In case of any doubt or concern please contact DRG.

11.2 Therapeutic Consequences

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

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

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

11.3 Liability

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

Claims submitted due to customer misinterpretation of laboratory results subject to point 11.2 are also invalid.

Regardless, in the event of any claim, the manufacturer's liability is not to exceed the value of the test kit. Any damage caused to the test kit during transportation is not subject to the liability of the manufacturer.

1 EINLEITUNG

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

Nur für In-vitro Diagnostik.

2 TESTPRINZIP

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

Die Wells der Mikrotiterplatten sind mit einem monoklonalen Antikörper (Maus) beschichtet, der gegen eine Antikörper-Bindungsstelle des Cortisol-Moleküls gerichtet ist.

Die Proben werden in die beschichteten Wells gegeben und zusammen mit einem Cortisol-Enzymkonjugat inkubiert. Während der Inkubation konkurriert das Cortisol aus der Probe mit dem Cortisol-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 Cortisol-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 Materialsicherheitsdatenblatt.
- Alle Bestandteile dieses Testkits, die humanes Serum oder Plasma enthalten, wurden mit FDA-geprüften Methoden auf HIV I/II, HbsAg und HCV getestet und als negativ bestätigt. Jedoch sollten alle Bestandteile im Umgang und bei der Entsorgung wie mögliche Gefahrenstoffe betrachtet werden.
- Der Kontakt mit der *Stop Solution* sollte vermieden werden, da sie 0.5 M H₂SO₄ enthält. Schwefelsäure kann Hautreizungen und Verbrennungen verursachen.
- Nicht mit dem Mund pipettieren und den Kontakt von Kitbestandteilen und Proben mit Haut und Schleimhäuten vermeiden.
- In den Bereichen, in denen Proben oder Kitbestandteile verwendet werden, nicht rauchen, essen oder Kosmetika verwenden.
- Beim Umgang mit Proben oder Reagenzien Einweg-Latexhandschuhe tragen. Die Verunreinigung von Reagenzien oder Proben mit Mikroben kann zu falschen Ergebnissen führen.
- Der Gebrauch sollte gemäß der Vorschriften einer entsprechenden nationalen Gefahrenstoff-Sicherheitsrichtlinie erfolgen.
- Reagenzien nicht nach dem auf dem Kit-Etikett angegebenen Verfallsdatum verwenden.
- Alle im Kit-Protokoll angegebenen Mengen müssen genau eingehalten werden. Optimale Ergebnisse können nur durch Verwendung kalibrierter Pipetten und Mikrotiterplatten-Lesegeräte erreicht werden.
- Komponenten von Kits mit unterschiedlichen Lotnummern nicht untereinander vertauschen. Es wird empfohlen, keine Wells von verschiedenen Platten zu verwenden, auch nicht, wenn es sich um das gleiche Lot handelt. Die Kits können unter anderen Bedingungen gelagert oder versendet worden sein, so dass die Bindungscharakteristik der Platten leicht unterschiedlich ausfällt.
- Chemikalien und zubereitete oder bereits benutzte Reagenzien müssen gemäß den nationalen Gefahrenstoffvorschriften wie gefährlicher Abfall behandelt werden.
- Sicherheitsdatenblätter für dieses Produkt sind auf Anfrage direkt von der Firma DRG Instruments GmbH erhältlich.

4 BESTANDTEILE DES KITS

4.1 Kitinhalt

1. **Microtiterwells**, 96 Wells, 12 x 8 Wells (einzeln brechbar); mit anti-Cortisol-Antikörper (monoklonal) beschichtet.
2. **Standard (Standard 0-6)**, 7 Fläschchen, je 1 mL, gebrauchsfertig; Konzentrationen: 0 – 0.1 – 0.5 – 1.5 – 4 – 10 – 30 ng/mL; *Umrechnungsfaktor: 1 ng/mL = 2.76 nmol/L*; Die Standards sind gegen Massenspektrometrie kalibriert. Enthält quecksilberfreies Konservierungsmittel.
3. **Control Low & High** (Kontrolle), 2 Fläschchen, je 1 mL; gebrauchsfertig Kontrollwerte und –bereiche entnehmen Sie bitte dem Fläschchenetikett oder dem QC-Datenblatt. Enthält quecksilberfreies Konservierungsmittel.
4. **Enzyme Conjugate** (Enzymkonjugat), 1 Fläschchen, 26 mL, gebrauchsfertig; Cortisol mit Meerrettichperoxidase konjugiert. Enthält quecksilberfreies Konservierungsmittel.
5. **Substrate Solution** (Substratlösung), 1 Fläschchen, 25 mL, gebrauchsfertig; Substratlösung TMB.
6. **Stop Solution** (Stopplösung), 1 Fläschchen, 14 mL, gebrauchsfertig; Enthält 0,5M H₂SO₄. Kontakt mit der Stopplösung vermeiden! Kann Hautreizungen und Verbrennungen verursachen.
7. **Wash Solution** (Waschlösung), **40X** konzentriert, 1 Fläschchen, 30 mL; Siehe „Vorbereitung der Reagenzien“.

Anmerkung: Zusätzlicher *Standard 0* zur Probenverdünnung ist auf Anfrage erhältlich.

4.2 Nicht im Kit enthaltene aber erforderliche Geräte und Materialien

- Kalibriertes Mikrotiterplattenlesegerät mit 450 ±10 nm Filter), (z.B. das DRG Instruments Mikrotiterplattenlesegerät)
- Kalibrierte variable Präzisions-Mikropipette
- Saugfähiges Papier
- Aqua dest.
- Semilogarithmisches Papier

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.

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 Waschlösung (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, Kapitel 13.

4.6 Beschädigte Testkits

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

5 PROBENVORBEREITUNG

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 TUBES 100, REF SLV-4158 erhältlich bei DRG).

Da die Steroidhormone ein deutliches zyklisches 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 Probeentnahme). Dies sollte vorzugsweise vor einer Mahlzeit durchgeführt werden.

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

5.2 Probenaufbewahrung

Proben sollten stets gut verschlossen sein und können vor Testbeginn bis zu 1 Woche bei 2 °C bis 8 °C gelagert werden. Für eine längere Aufbewahrung sollten die Proben eingefroren bei -20 °C bis zum Testbeginn gelagert werden. Mehrfaches Auftauen und erneutes Einfrieren ist möglich.

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

Nach der Ankunft im Labor muss eine Probe mindestens über Nacht tiefgekühlt gelagert werden. Am nächsten Morgen wird die eingefrorene Probe auf Raumtemperatur gebracht und vorsichtig gemischt. Dann muss die Probe 5 bis 10 Minuten zentrifugiert werden (bei 2000 – 300 × g).

Der klare, farblose Überstand kann jetzt einfach pipettiert werden.

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

5.3 Probenverdünnung

Wenn in einem ersten Testdurchlauf bei einer Probe eine Konzentration höher als der höchste Standard gefunden wird, kann diese Probe mit *Standard 0* 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 0* gründlich mischen)

b) Verdünnung 1:100: 10 µL Verdünnung a) 1:10 + 90 µL *Standard 0* (gründlich mischen).

6 TESTDURCHFÜHRUNG

6.1 Allgemeine Hinweise

- Alle Reagenzien und Proben müssen vor Gebrauch auf Raumtemperatur gebracht und gut durchmischt werden. Dabei sollte Schaumbildung vermieden werden.
- Wenn die Testdurchführung einmal begonnen wurde, muss sie ohne Unterbrechung zu Ende geführt werden.
- Für jeden Standard, jede Kontrolle oder Probe eine neue Plastikspitze verwenden, um Verschleppungen zu vermeiden.
- Die Optische Dichte ist abhängig von Inkubationszeit und Temperatur. Deshalb ist es notwendig, vor Beginn der Testdurchführung alle Reagenzien in einen arbeitsbereiten Zustand zu bringen, die Deckel der Fläschchen zu öffnen, alle benötigten Wells in den Halter zu setzen. Nur eine solche Vorbereitung garantiert gleiche Zeiten für jeden Pipettiervorgang ohne Pausen.
- Als generelle Regel gilt, dass die enzymatische Reaktion linear proportional zu Zeit und Temperatur ist.
- Die in der Gebrauchsanweisung angegebenen Inkubationszeiten müssen eingehalten werden.

6.2 Testdurchführung

Jeder Lauf muss eine Standardkurve beinhalten.

1. Die benötigte Anzahl Wells in der Halterung befestigen.
2. **Je 100 µL Standards, Control und Proben mit neuen Plastikspitzen** in die entsprechenden Wells geben.
3. **200 µL Enzyme Conjugate** in jedes Well geben.
Für 10 Sekunden gut schütteln. Es ist sehr wichtig, in diesem Schritt eine komplette Durchmischung zu erreichen.
4. **60 Minuten** bei Raumtemperatur inkubieren; auf einem Schüttler mit 300 U/min.
5. Den Inhalt der Wells kräftig ausschütteln. Wells **5-mal** mit verdünnter Waschlösung (400 µL pro Well) waschen. Verbleibende Flüssigkeit durch Ausklopfen der Wells auf saugfähigem Papier entfernen.
Achtung: Die Sensitivität und Präzision dieses Assays wird erheblich beeinflusst von der korrekten Durchführung des Waschschrittes!
6. **200 µL Substrate Solution** in jedes Well geben.
7. **30 Minuten** bei Raumtemperatur inkubieren.
8. Die enzymatische Reaktion durch Zugabe von **100 µL Stop Solution** in jedes Well abstoppen.
9. Die Optische Dichte bei **450 ±10 nm** mit einem Mikrotiterplatten-Lesegerät innerhalb von **10 Minuten** nach Zugabe der *Stop Solution* bestimmen.

6.3 Ergebnisermittlung

1. Die durchschnittlichen Werte der Optischen Dichte (OD) für jedes Set von Standards, Controls und Patientenproben bestimmen.
2. Eine Standardkurve ermitteln durch Auftragen der mittleren Optischen Dichte jedes Standards gegen die Konzentration, wobei der OD-Wert auf der vertikalen (Y) Achse und die Konzentration auf der horizontalen (X) Achse eingetragen wird.
3. Unter Verwendung der mittleren OD wird für jede Probe die entsprechende Konzentration aus der Standardkurve ermittelt.
4. Automatische Methode: Die in der Gebrauchsanweisung angegebenen Werte wurden automatisch mit Hilfe der 4 Parameter Gleichung bestimmt. (4 Parameter Rodbard oder 4 Parameter Marquardt sind die bevorzugten Methoden.) Andere Auswertungsfunktionen können leicht abweichende Werte ergeben.
5. Die Konzentration der Proben kann direkt von der Standardkurve abgelesen werden. Proben, die eine höhere Konzentration als die des höchsten Standards enthalten, müssen verdünnt werden. Dieser Verdünnungsfaktor muss bei der Berechnung der Konzentration beachtet werden.

6.3.1 Beispiel für eine Standardkurve

Nachfolgend wird ein typisches Beispiel für eine Standardkurve mit dem DRG ELISA gezeigt. Diese Werte sollten nicht zur Berechnung von Patientendaten verwendet werden.

Standard		Optische Dichte (450 nm)
Standard 0	0 ng/mL	2,00
Standard 1	0.1 ng/mL	1,89
Standard 2	0.5 ng/mL	1,62
Standard 3	1.5 ng/mL	1,22
Standard 4	4.0 ng/mL	0,75
Standard 5	10 ng/mL	0,40
Standard 6	30 ng/mL	0,18

7 ERWARTETE WERTE

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

In einer Studie ergaben sich mit dem DRG Salivary Cortisol ELISA folgende Werte:

	Morgens	Mittags	Abends
n	73	73	73
Bereich (ng/mL)	0.94 - 19.80	0.32 - 12.70	0.20 - 4.00
Mittelwert (ng/mL)	3.02	1.52	0.88
2,5. - 97,5 Perzentile (ng/mL)	1.19 - 7.21	0.66 - 3.74	0.33 - 2.23
Median (ng/mL)	2.44	1.25	0.77

8 QUALITÄTSKONTROLLE

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

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

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

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

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

9 ASSAY CHARACTERISTIKA

9.1 Messbereich

Der Messbereich des Testes liegt zwischen 0,09 – 30 ng/mL.

9.2 Spezifität der Antikörper (Kreuzreaktivität)

Die Daten entnehmen Sie bitte der ausführlichen englischen Arbeitsanleitung.

9.3 Analytische Sensitivität

Die analytische Sensitivität, definiert als Mittelwert minus der zweifachen Standardabweichung des Standards 0 (n = 20), beträgt 0.09 ng/mL.

Die Daten zu:

9.4 Präzision

9.5 Wiederfindung

9.6 Linearität

entnehmen Sie bitte der ausführlichen englischen Arbeitsanleitung.

10 GRENZEN DES TESTS

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

10.1 High-Dose-Hook-Effekt

Ein Hook-Effekt tritt in diesem Test nicht auf.

10.2 Beeinflussung durch Medikamente

Uns sind bislang keine Stoffe (Medikamente) bekannt geworden, deren Einnahme die Messung des Cortisol-Gehaltes der Probe beeinflussen würde.

11 RECHTLICHE GRUNDLAGEN

11.1 Zuverlässigkeit der Ergebnisse

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

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

11.2 Therapeutische Konsequenzen

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

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

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

11.3 Haftung

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

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

1 INTRODUZIONE

Il test immuno-enzimatico **DRG Salivary Cortisol ELISA** contiene materiale per la determinazione quantitativa di cortisolo (hydrocortisone e hydroxycorticosterone) in saliva.

Questo test kit è adatto soltanto per l'uso diagnostico.

2 PRINCIPIO DEL TEST

Il test Salivary Cortisol ELISA è un test immunologico in fase solida con enzimi ancorati su un substrato (ELISA), basato sul principio del legame competitivo.

I micropozzetti sono ricoperti con un anticorpo monoclonale diretto contro un unico sito antigenico della molecola Cortisolo. Cortisolo endogeno di un campione compete con il cortisolo coniugato alla perossidasi di rafano per il sito di legame sull'anticorpo ancorato nel micropozzo. Dopo l'incubazione il coniugato non legato è lavato via.

La quantità della perossidasi coniugata legata è inversamente proporzionale alla concentrazione di cortisolo nel campione. Dopo l'aggiunta della soluzione substrato l'intensità del colore sviluppato è inversamente proporzionale alla concentrazione di cortisolo nel campione del paziente.

3 PRECAUZIONI

- Questo kit è adatto soltanto per l'uso diagnostico in vitro.
- Si prega di usare la versione valida dell'inserito del pacco a disposizione con il kit.
- Informazioni su sostanze pericolose contenute nel kit sono riportate nel regolamento di sicurezza.
- Tutti i componenti del kit che contengono siero o plasma umano sono controllati e confermati negativi per la presenza di HIV I/II, HbsAg e HCV con metodi conformi alle norme FDA. Ciononostante tutti i componenti dovrebbero essere trattati come potenziali sostanze nocive nella manutenzione e nello smaltimento.
- Il contatto con la *Stop Solution* dovrebbe essere evitato perché contiene 0.5 M H₂SO₄. L'acido solforico può provocare irritazioni cutanee e ustioni.
- Non pipettare con la bocca ed evitare il contatto con componenti del kit con la pelle o con le mucose.
- Nelle aree in cui il test viene utilizzato non fumare, mangiare, bere o fare uso di prodotti cosmetici.
- Nella manutenzione dei campioni o reagenti del kit portare guanti di latex monouso. La contaminazione dei reagenti o dei campioni con microbi può dare risultati falsi.
- L'utilizzo dovrebbe avvenire secondo regole che seguono le rispettive norme di sicurezza nazionali sulle sostanze nocive.
- Non utilizzare i reagenti dopo la scadenza indicata sul kit.
- Ogni indicazione sulla quantità indicata del protocollo del kit deve essere accuratamente seguito. Risultati ottimali possono essere ottenuti soltanto con l'uso di pipette calibrate e spettrofotometro calibrato.
- Componenti del kit con numeri di lotto diversi non devono essere combinati. È consigliabile di non utilizzare pozzetti di piastre diversi, anche se si tratta dello stesso lotto. I kit potrebbero essere stati magazzinati o spediti a condizioni diverse, cosicché le caratteristiche di legame potrebbero divergere leggermente.
- I componenti chimici e reagenti preparati o già utilizzati devono essere trattati e smaltiti secondo le norme di sicurezza nazionali sulle sostanze nocive.
- I regolamenti di sicurezza di questo prodotto possono essere richiesti direttamente dalla ditta DRG Instruments GmbH.

4 COMPONENTI DEL KIT

4.1 Contenuto del kit

1. **Microtiterwells** (Micropozzetti), 12 x 8 file (separatamente staccabili), 96 pozzetti; Pozzetti ricoperti con l'anticortisolo anticorpo (monoclonale)
2. **Standard (Standard 0-6)**, 7 flaconi, 1 mL, pronto all'uso
Concentrazioni: 0 – 0.1 – 0.5 – 1.5 – 4 – 10 – 30 ng/mL;
Conversione: $1 \text{ ng/mL} = 2.76 \text{ nmol/L}$
Gli standard sono calibrati contro la spettrometria di massa;
Contiene conservante senza mercurio.
3. **Control Low & High** (Controllo), 2 flaconi, 1 mL, pronto all'uso
I valori dei controlli sono indicati sull'etichetta dei flaconi o sulla descrizione QC.
Contiene conservante senza mercurio.
4. **Enzyme Conjugate** (Tracciante enzimatico), 1 flacone, 26 mL, pronto all'uso
Cortisolo coniugato alla perossidasi di rafano
Contiene conservante senza mercurio
5. **Substrate Solution** (Soluzione di substrato), 1 flacone, 25 mL, pronto all'uso;
TMB (benzidine tetrametilico).
6. **Stop Solution** (Soluzione d'arresto), 1 flacone, 14 mL, pronto all'uso;
contiene 0.5 M H₂SO₄.
Evitare il contatto con la soluzione d'arresto. Può causare irritazioni cutanee e ustioni.
7. **Wash Solution** (Soluzione di lavaggio), 1 flacone, 30 mL (concentrata 40X);
vedi „preparazione dei reagenti“.

Nota: Ulteriore *Standard 0* per la diluizione dei campioni può essere richiesto alla ditta.

4.2 Materiali richiesti ma non contenuti nel kit

- Uno spettrofotometro calibrato per micropozzetti (450 ±10 nm) (p.es. il DRG Instruments Microtiterplate Reader).
- Micropipette calibrate di precisione a volume variabile.
- Carta assorbente.
- Acqua distillata.

4.3 Magazzinaggio e stabilità del kit

A 2 °C a 8 °C i reagenti non aperti rimangono reattivi fino alla data di scadenza indicata. Non usare reagenti oltre questa data.

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

4.4 Preparazione dei reagenti

Prima dell'uso portare tutti i reagenti e il numero necessario di pozzetti a temperatura ambiente.

Wash Solution

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

La soluzione di lavaggio diluita è stabile per 2 settimane a temperatura ambiente.

4.5 Smaltimento del kit

Lo smaltimento del kit deve avvenire secondo le regole a norma di legge. Informazioni particolareggiate per questo prodotto si trovano nel regolamento di sicurezza, capitolo 13.

4.6 Test kits danneggiati

Nel caso di gravi danneggiamenti del kit o dei suoi componenti deve avvenire una dichiarazione scritta alla ditta DRG, al più tardi una settimana dopo il ricevimento del kit. Componenti danneggiati non dovrebbero essere utilizzati per il test. Questi componenti devono essere magazzinati fino alla soluzione del problema. Dopo di che essi devono essere smaltiti secondo le norme ufficiali.

5 CAMPIONI

Evitare di mangiare, bere, consumare gomme da masticare o di usare lo spazzolino da denti almeno fino a 30 minuti dal prelievo. Altrimenti si raccomanda di sciacquare la bocca con abbondante acqua fredda per 5 minuti prima del prelievo. Non prelevare campioni se esistono malattie orali, infiammazioni o lesioni (contaminazione di sangue) nella bocca. Se esiste una contaminazione visibile con sangue del campione del paziente, bisogna discartarlo, sciacquare il contenitore con acqua, aspettare 10 minuti e prendere un campione nuovo.

Nota: Campioni contenenti azide di sodio non dovrebbero essere usati in questo saggio.

5.1 Raccolta dei campioni

Campioni di saliva devono essere raccolti usando soltanto uno strumento speciale per il campionamento (contenitore e paletta), p.es. SALI TUBES 100, REF SLV-4158.

A causa del pattern ciclico di secrezione degli ormoni steroidei è importante di coordinare il campionamento.

Per evitare risultati arbitrari raccomandiamo che 5 campioni vengano raccolti sempre in un periodo di tempo di 2 -3 ore (campionamento multiplo), preferibilmente prima di un pasto.

Siccome il cibo può contenere quantità significative di ormoni steroidei, i campioni devono preferibilmente essere raccolti durante il digiuno. Se il digiuno dovesse causare problemi, la raccolta deve essere effettuata immediatamente prima del pranzo o la cena.

5.2 Conservazione e preparazione dei campioni

I campioni di saliva possono essere conservati a 2 °C - 8 °C fino ad una settimana e devono essere congelati a -20 °C per periodi più lunghi; cicli ripetuti di congelamento e scongelamento non causano problemi.

Ogni campione deve essere congelato, scongelato e centrifugato almeno una volta per separare le mucine tramite centrifugazione.

Quando i campioni arrivano nel laboratorio, essi devono rimanere nel congelatore almeno una notte. La mattina seguente i campioni congelati vengono portati a temperatura ambiente e mescolati gentilmente.

Poi i campioni devono essere centrifugati per 5 a 10 minuti (a 2000 - 3000 × g).

Adesso il surnatante chiaro ed incolore è facilmente pipettabile.

Se un set di campioni multipli deve essere analizzato, il laboratorio (dopo almeno un ciclo di congelamento, scongelamento e centrifugazione) deve mescolare i 5 campioni singoli in un contenitore separato e analizzare questa miscela.

5.3 Diluizione dei campioni

Se in un campione di siero viene trovata una concentrazione oltre lo standard più alto, questo campione può essere diluito con lo *Standard 0* e nuovamente determinato.

Della diluizione deve essere però tenuto conto.

Esempio:

- a) diluizione 1:10: 10 µL campione + 90 µL *Standard 0* (agitare bene)
- b) diluizione 1:100: 10 µL della diluizione a) + 90 µL *Standard 0* (agitare bene).

6 ATTUAZIONE DEL TEST

6.1 Indicazioni generali

- Tutti i reagenti e i campioni devono essere portati a temperatura ambiente e ben mescolati prima dell'uso. Evitare la formazione di schiume.
- Una volta iniziato il procedimento del test, questo deve essere portato alla fine senza interruzione.
- Per ogni componente, standard, controllo o campione è necessario utilizzare una nuova punta monouso per evitare reazioni incrociate.
- La densità ottica dipende dal tempo d'incubazione e dalla temperatura. Perciò si rende necessario di preparare tutti i reagenti, di aprire i tappi dei flaconi e di appostare tutti i pozzetti nelle appropriate posizioni. Soltanto una tale preparazione garantisce gli stessi tempi per ogni processo di pipettamento.
- Come regola generale vale che la reazione enzimatica si svolge linearmente proporzionale con il tempo e con la temperatura.
-
- Rispettare i tempi di incubazione come indicato in questa metodica.

6.2 Esecuzione del test

Ogni analisi deve includere una curva standard.

1. Fissare i pozzetti necessari sul supporto.
2. Pipettare **100 µL** di ogni **Standard, Control e campione** nei pozzetti, cambiando ogni volta la punta monouso.
3. Pipettare **200 µL Enzyme Conjugate** in ogni pozzetto.
Agitare bene per 10 secondi. È molto importante raggiungere un completo mescolamento.
4. Incubare per **60 minuti** a temperatura ambiente.
Nota: si raccomanda l'incubazione con shaker a 300 rpm (giri al minuto)
5. Rovesciare la piastra per vuotare i pozzetti.
Lavare i pozzetti **5 volte** con *Wash Solution* diluita (400 µL in ogni pozzetto). Rimuovere le gocce d'acqua rimanenti rivoltando la piastra su carta assorbente.
Importante:
La sensibilità e la precisazione di questo kit sono fortemente influenzate dal corretto esecuzione del lavaggio!
6. Aggiungere **200 µL** della **Substrate Solution** ad ogni pozzetto.
7. Incubare per **30 minuti** a temperatura ambiente.
8. Fermare la reazione enzimatica aggiungendo **100 µL** della **Stop Solution** ad ogni pozzetto.
9. Determinare la densità ottica a **450 ± 10 nm** con un fotometro per microtiter-piastre **entro 10 minuti** dopo l'aggiunta della *Stop Solution*.

6.3 Rilevamento dei risultati

1. Determinare i valori medi della densità ottica per ogni set di standard, controlli e campioni.
2. Costruire una curva standard: riportare i valori medi della densità ottica (OD) di ogni standard contro la rispettiva concentrazione dove i valori delle OD si devono trovare sull'asse verticale (Y) e le concentrazioni sull'asse orizzontale (X).
3. Utilizzando il valore medio delle OD per ogni campione si determina la rispettiva concentrazione dalla curva standard.
4. Metodo automatico: I valori riportati in queste istruzioni per l'uso sono stati determinati tramite l'equazione a 4 parametri. (I metodi preferiti sono 4 Parameter Rodbard oppure 4 Parameter Marquardt.) Altri funzioni usati per l'elaborazione dei dati possono dare risultati leggermente differenti.
5. La concentrazione dei campioni può essere determinata direttamente dalla curva standard. Campioni con una concentrazione più elevata dello standard più concentrato devono essere diluiti. Di questo fattore di diluizione deve essere tenuto conto per il calcolo della concentrazione.

6.3.1 Esempio di una curva standard tipica

I seguenti dati sono a scopo dimostrativo soltanto e **non possono** sostituire i dati generati dall'esecuzione del test.

Standard		Densità ottiche (450 nm)
Standard 0	0 ng/mL	2,00
Standard 1	0.1 ng/mL	1,89
Standard 2	0.5 ng/mL	1,62
Standard 3	1.5 ng/mL	1,22
Standard 4	4.0 ng/mL	0,75
Standard 5	10 ng/mL	0,40
Standard 6	30 ng/mL	0,18

7 VALORI NORMALI

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

In uno studio condotto su persone apparentemente sane usando il test DRG Salivary Cortisol ELISA i seguenti valori sono stati ottenuti:

	Di mattina	A mezzogiorno	Alla sera
n	73	73	73
Intervallo (ng/mL)	0,94 - 19,80	0,32 - 12,70	0,20 - 4,00
Media (ng/mL)	3,02	1,52	0,88
2,5. - 97,5. percentile (ng/mL)	1,19 - 7,21	0,66 - 3,74	0,33 - 2,23
Mediano (ng/mL)	2,44	1,25	0,77

Campioni di donne ed uomini adulti apparentemente sani sono stati raccolti alla mattina.

Dato che i livelli di cortisolo mostrano un ciclo diurnale, raccomandiamo che i campioni vengano raccolti alla stessa ora del giorno.

8 CONTROLLO QUALITÀ

È consigliabile utilizzare i campioni controllo secondo le norme di legge. Attraverso l'utilizzo dei campioni controllo si può raggiungere una verifica dei risultati giorno per giorno. Dovrebbero essere adoperati campioni controllo sia con un livello normale sia con uno patologico.

Le referenze con i rispettivi risultati del laboratorio QC sono elencati nel QC certificato, che è allegato al kit. I valori riportati nel QC certificato si riferiscono al lotto del kit attuale e dovrebbero essere utilizzati per un raffronto dei risultati. È altresì consigliabile di partecipare a programmi di sicurezza sulla qualità nazionali o internazionali, per assicurarsi dell'esattezza dei risultati.

Appropriati metodi statistici per l'analisi dei valori controllo e delle rappresentazioni grafici dovrebbero essere adoperati. Nel caso che i risultati del test non combaciano con il campo di accettazione indicato dal materiale di controllo, i risultati dei pazienti devono essere considerati invalidi. In questo caso si prega di controllare i seguenti fattori d'errore: pipette, cronometri, fotometro, data di scadenza dei reagenti, condizione di magazzinaggio e d'incubazione, metodi di aspirazione e di lavaggio.

Se dopo il controllo dei suddetti fattori non è rilevabile alcun errore, si prega di contattare il fornitore o direttamente la ditta DRG.

9 CARATTERISTICHE DEL TEST

9.1 Assay Dynamic Range

Le concentrazioni determinabili con questo test stanno tra 0,09 – 30 ng/mL

9.2 Specificità degli anticorpi (reazioni ad incrocio)

Per dettagli più precisi consultare la metodica in inglese.

9.3 Sensitività analitica

La sensitività *analitica* è stata calcolata dai valori medi meno due deviazioni standard di venti (20) repliche dello *Standard 0* ed erano 0,09 ng/mL.

I dati a

9.4 Precisione

9.5 Ritrovato

9.6 Linearità

si prega di consultare il manuale in inglese completo.

10 LIMITAZIONE DEL TEST

Risultati affidabili e riproducibili saranno ottenuti se il procedimento del saggio viene eseguito con una completa conoscenza delle istruzioni inserite nel pacchetto e aderendo alla buona pratica da laboratorio.

10.1 Effetto Hook di alti dosaggi

Nessun effetto gancio (effetto hook) è stato osservato in questo test.

10.2 Droghe interferenti

Fino ad oggi nessuna sostanza (farmaco) è conosciuta a noi che abbia influenzato la determinazione di Cortisolo nel campione.

11 ASPETTI LEGALI

11.1 Affidabilità dei risultati

Il test deve essere eseguito esattamente secondo il protocollo dato dal produttore. Inoltre l'utente deve seguire le regole del GLP (Good Laboratory Practice) o eventualmente altre regole comportamentali o disposizioni legali. Questo vale soprattutto per l'uso delle referenze. È molto importante utilizzare un numero appropriato di referenze in parallelo ai campioni test per poter controllare l'esattezza e la precisione del test.

I risultati del test sono validi soltanto se tutte le referenze cadono nei margini prestabiliti e se tutti gli altri parametri del test soddisfano la specificazione per questo test. Se esistono dubbi o domande su questi risultati, si prega di contattare la ditta DRG.

11.2 Conseguenze terapeutiche

Soltanto sulla base dei risultati dei laboratori non dovrebbero essere intraprese delle conseguenze terapeutiche di alcun tipo, anche se i risultati del test sono d'accordo con gli aspetti articolati nel punto 11.1. Ogni risultato di laboratorio è soltanto una parte di un quadro clinico completo di un paziente.

Soltanto in casi in cui i risultati di un test del laboratorio si accordano con il quadro clinico dell'ammalato, si possono intraprendere delle conseguenze terapeutiche.

Il risultato del test da solo non è base sufficiente per lo stabilimento di una terapia.

11.3 Responsabilità legali

Ogni cambiamento del protocollo del test e/o lo scambio o il mescolamento di componenti provenienti da cariche diverse possono influenzare negativamente i risultati e compromettere la validità del test. Questi cambiamenti e/o scambi annullano ogni diritto al risarcimento.












Si respingano inoltre tutti i richiami risultanti da interpretazioni sbagliate da parte dell'utente secondo il paragrafo 11.2.

Nel caso di reclamazione, la garanzia del produttore è limitato al valore massimo del test kit. Ogni danno provocato durante il trasporto del kit non sottostà alla responsabilità del produttore.

12 REFERENCES / LITERATURE / LITERATUR / BIBLIOGRAFIA

1. Drucker S (1987) New MI: Disorders of adrenal steroidogenesis. *Pediatr. Clin. North Am.*; 34, 1055-1066
2. Hellhammer DH et al. (1997) Social hierarchy and adrenocortical stress Reactivity in men. *Psychoneuroendocrinology*, 22; 643-650
3. Van Cauter E (1987) Pulsatile ACTH secretion. In: Wagner T., Filicori M. (eds): *Episodic hormone secretion: From basic science to clinical application*. Hameln, TM-Verlag, pp 65-75
4. Miller R et al (2016) The CIRCORT database: Reference ranges and seasonal changes in diurnal salivary cortisol derived from a meta-dataset comprised of 15 field studies. *Psychoneuroendocrinology*. 73; 16-23.
5. Lopes LM et al (2016) Determination of nighttime salivary cortisol during pregnancy: comparison with values in non-pregnancy and Cushing's disease. *Pituitary*. 19; 30-8
6. Hucklebridge FH, et al. (1999): The awakening of cortisol response and blood glucose levels. *Life Sci.*, 64; 931-937
7. Antonelli G et al (2015) Salivary cortisol and cortisone by LC-MS/MS: validation, reference intervals and diagnostic accuracy in Cushing's syndrome. *Clin. Chim. Acta*, 451; 247-51
8. Irwin M, et al (1987) Life events, depressive symptoms and immune function. *Am. J. Psychiat.*, 144; 437-441
9. Solomon GF, Moss RH (1964) Emotions, Immunity and disease. A speculative theoretical integration. *Arch. Gen. Psychiatry*, 11; 657-674
10. Mcgrady A. et al (1987) Effect of biofeedback-assisted relaxation in blood pressure and cortisol levels in normotensives and hypertensives. *J. Behav. Med.*, 10; 301-310
11. Chernow B., et al (1987) Hormonal responses to graded surgical stress. *Arch. Intern. Med.*, 147; 1273- 1278
12. Hellhammer DH, et al (1987) Measurement of salivary cortisol under psychological stimulation. In: Hingten JN, Hellhammer DH, Huppmann (eds.), *Advanced methods in Psychology*, Hogrefe, Toronto, pp 281-289
13. Kirchbaum C, Hellhammer DH. (1989) Salivary cortisol in psychobiological Research: An overview. *Neuropsychobiology*, 22; 150-169
14. Kirchbaum C, Hellhammer Dh. (1994): Salivary cortisol in psychoneuroendocrine Research: Recent developments and applications. *Psychoneuroendocrinology*, 19; 313-333
15. Ceccato F et al (2013) Performance of salivary_cortisol_in the diagnosis of Cushing's syndrome, adrenal_incidentaloma, and_adrenal_insufficiency. *Eur. J. Endocrinol.*, 169; 31-6
16. Raff H, Raff JL Findling JW (1998) Late-night salivary cortisol as a screening test for Cushing's syndrome. *J. Clin. Endocrinol. Metab.*,83; 2681-2686
17. Restituto P (2008) Advantage of Salivary cortisol measurements in the diagnosis of glucocorticoid related disorders. *Clin Biochem*. 41; 688-92
18. Riad-Fahny et al (1982), Steroids in saliva for assessing endocrine function. *Endocr. Rev.*, 3, 367-395
19. Robin P., et al. (1977) Assay of unbound cortisol in plasma. *J. Clin. Endocrinol. Metab.*, 46; 277-283
20. Vining RF, et al (1983) Hormones in saliva: Mode of entry and consequent implications for clinical interpretation, *Clin. Chem.*, 29; 1752-1756
21. Bosch JA (2014) The use of saliva markers in psychobiology: mechanisms and methods. *Monogr. Oral Sci.*, 24; 99-108

SYMBOLS USED

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