

Instructions for Use

Salivary Cortisol ELISA

IVD



REF SLV-4635 (formerly SLV-2930)



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

Contents / Inhaltsverzeichnis / Tabla de Contenidos

| | | | | | | |
|----|---|----|-------------------|---------------------------------|----|----|
| 1 | INTRODUCTION | 2 | 1 | INTRODUCCIÓN | 25 | |
| 2 | PRINCIPLE OF THE TEST..... | 2 | 2 | FUNDAMENTO DEL ENSAYO | 25 | |
| 3 | WARNINGS AND PRECAUTIONS..... | 3 | 3 | PRECAUCIONES..... | 25 | |
| 4 | REAGENTS | 4 | 4 | COMPONENTES DEL KIT..... | 26 | |
| 5 | SPECIMEN COLLECTION AND PREPARATION | 5 | 5 | MUESTRAS | 27 | |
| 6 | ASSAY PROCEDURE | 6 | 6 | PROCEDIMIENTO DE ENSAYO | 27 | |
| 7 | EXPECTED NORMAL VALUES | 7 | 7 | VALORES ESPERADOS | 29 | |
| 8 | QUALITY CONTROL | 7 | 8 | CONTROL DE CALIDAD | 29 | |
| 9 | PERFORMANCE CHARACTERISTICS | 8 | 9 | CARACTERÍSTICAS DEL ENSAYO..... | 29 | |
| 10 | LIMITATIONS OF USE | 10 | 10 | LIMITACIONES DE USO | 30 | |
| 11 | LEGAL ASPECTS..... | 11 | 11 | ASPECTOS LEGALES | 30 | |
| 12 | REFERENCES / LITERATURE | 12 | 12 | REFERENCIAS / BIBLIOGRAFÍA..... | 30 | |
| | | | | | | |
| 1 | EINLEITUNG | 13 | SYMBOLS USED..... | | | 31 |
| 2 | TESTPRINZIP..... | 13 | | | | |
| 3 | VORSICHTSMAßNAHMEN..... | 13 | | | | |
| 4 | BESTANDTEILE DES KITS..... | 14 | | | | |
| 5 | PROBENVORBEREITUNG | 15 | | | | |
| 6 | TESTDURCHFÜHRUNG | 16 | | | | |
| 7 | ERWARTETE WERTE | 17 | | | | |
| 8 | QUALITÄTS-KONTROLLE | 17 | | | | |
| 9 | ASSAY-CHARAKTERISTIKA | 17 | | | | |
| 10 | GRENZEN DES TESTS | 18 | | | | |
| 11 | RECHTLICHE GRUNDLAGEN..... | 18 | | | | |
| 12 | REFERENZEN / LITERATUR..... | 18 | | | | |
| | | | | | | |
| 1 | INTRODUZIONE..... | 19 | | | | |
| 2 | PRINCIPIO DEL TEST | 19 | | | | |
| 3 | PRECAUZIONI | 19 | | | | |
| 4 | COMPONENTI DEL KIT | 20 | | | | |
| 5 | CAMPIONI | 21 | | | | |
| 6 | ATTUAZIONE DEL TEST | 21 | | | | |
| 7 | VALORI NORMALI | 23 | | | | |
| 8 | CONTROLLO QUALITÀ | 23 | | | | |
| 9 | CARATTERISTICHE DEL TEST | 23 | | | | |
| 10 | LIMITAZIONE DEL TEST | 24 | | | | |
| 11 | ASPETTI LEGALI | 24 | | | | |
| 12 | BIBLIOGRAFIA | 24 | | | | |

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

The hormone Cortisol is vital for several functions of the human body. A strong correlation exists between stress related conditions and Cortisol levels (1–3) Cortisol is a steroid hormone made in the adrenal glands. Among its important functions in the body include roles in the regulation of blood pressure and cardiovascular function as well as regulation of the body's use of proteins, carbohydrates, and fats. Cortisol secretion increases in response to any stress in the body, whether physical (such as illness, trauma, surgery, or temperature extremes) or psychological. When cortisol is secreted, it 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 energy, in a process called gluconeogenesis. This process raises the blood sugar level so the brain will have more glucose for energy. Cortisol also leads to the release of so-called fatty acids, an energy source from fat cells, for use by the muscles. Taken together, these energy-directing processes prepare the individual to deal with stressors and ensure that the brain receives adequate energy sources (4).

Cortisol is the most potent glucocorticoid produced by the human adrenal (5-7). It is synthesized from cholesterol and its production is stimulated by pituitary adrenocorticotrophic hormone (ACTH) which is regulated by corticotropin releasing factor (CRF). ACTH and CRF 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.

Elevated cortisol levels and lack of diurnal variation have been identified with Cushing's disease (ACTH hypersecretion). Elevated circulating cortisol levels have also been identified in patients with adrenal tumors. Low cortisol levels are found in primary adrenal insufficiency (e.g. adrenal hypoplasia, Addison's disease) and in ACTH deficiency. Due to the normal circadian variation in cortisol levels (8), 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, and steroids not bound by carrier proteins in the blood freely diffuse into saliva. Only about 1-10% of the steroids in blood are in the unbound or free form, and it is this fraction that diffuses into target tissues of the body, and into saliva (9, 10). The majority (90-99%) of steroid hormones in the blood are bound to carrier proteins (cortisol binding globulin, sex-hormone binding globulin and albumin) and are unavailable to target tissues. The process of passive diffusion of non-bound (free) steroid hormones occurs because these small molecules are of a low molecular weight (less than 400 daltons) and are relatively nonpolar, thus enabling them to freely diffuse from blood to saliva. Bound steroids are too large to diffuse freely through the salivary cells into the salivary gland lumen. (11-14)

2 PRINCIPLE OF THE TEST

The **DRG Salivary Cortisol ELISA** kit is based on the competition principle and the microplate separation. An unknown amount of Cortisol present in the sample and a fixed amount of Cortisol conjugated with horseradish peroxidase compete for the binding sites of mouse monoclonal Cortisol -antiserum coated onto the wells. After one hour incubation the microplate is washed to stop the competition reaction. After addition of the substrate solution the concentration of Cortisol is inversely proportional to the optical density measured.

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 - 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 MIT as preservatives. In case of contact with eyes or skin, flush immediately with water.
19. TMB substrate has an irritant effect on skin and mucosa. In case of possible contact, wash eyes with an abundant volume of water and skin with soap and abundant water. Wash contaminated objects before reusing them. If inhaled, take the person to open air.
20. Chemicals and prepared or used reagents have to be treated as hazardous waste according to the national biohazard safety guideline or regulation.
21. For information on hazardous substances included in the kit please refer to Safety Data Sheets. Safety Data Sheets for this product are available upon request directly from DRG.

4 REAGENTS

4.1 Reagents provided

1. **Microtiterwells**, 12x8 (break apart) strips, 96 wells; coated with (mouse) anti-Cortisol antiserum.
2. **Standard (Standard 0-6)**, 7 vials, 1 mL each, ready to use; Concentrations: 0.0 – 2 – 5 – 10 – 20 – 40 – 80 ng/mL
Conversion factor: 1 pg/mL = 2.76 pmol/L.
Contain non-mercury preservative.
3. **Control low / Control high**, 2 vials, 1.0 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); Concentrate for 1200 mL.
see „Preparation of Reagents“.

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

4.2 Materials required but not provided

1. Calibrated EIA reader adjusted to read at 450 nm
2. Precision pipettes (100 and 200 µL)
3. Distilled or Deionized water
4. Timer (60 min. range)
5. Reservoirs (disposable)
6. Test tube or microtube rack in a microplate configuration
7. Linear-linear graph paper or software for data reduction

4.3 Storage Conditions

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

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

Opened kits retain activity for two month if stored as described above.

4.4 Reagent Preparation

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

Wash Solution

Add deionized water to the 40X concentrated Wash Solution.

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

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

4.5 Disposal of the Kit

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

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) or Salivette (Sarstedt cat. # 51.1534).

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 3000 - 2000 x 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.

6.2 Test Procedure

Each run must include a standard curve.

1. Secure the desired number of coated strips in the frame holder.
2. Dispense **100 µL** of each Cortisol *Standard* and *Control* into appropriate wells.
3. Dispense **100 µL** of each sample into selected wells.
4. Dispense **200 µL** of *Enzyme Conjugate* into each sample and standard well and mix the plate for thoroughly for 10 seconds.
5. Incubate for **60 minutes** at room temperature.
6. Briskly shake out the contents of the wells and rinse the wells 3 times with diluted Wash Solution (400 µL per well). Strike the inverted wells sharply on absorbent paper towel to remove residual droplets.
7. Add **200 µL** of *Substrate Solution* to each well.
8. Incubate for **30 minutes** at room temperature.
9. Stop the reaction by adding **100 µL** of *Stop Solution* to each well.
10. Determine the absorbance of each well at 450 ± 10 nm.
It is recommended that the wells be read within 10 minutes.

6.3 Calculation of Results

1. Calculate the average absorbance values for each set of standards, controls and patient samples.
2. Using graph paper, construct a standard curve by plotting the mean absorbance obtained from each standard against its concentration with absorbance value on the vertical (Y) axis and concentration on the horizontal (X) axis.
3. Using the mean absorbance value for each sample determine the corresponding concentration from the standard curve.
4. Automated method: The results in the IFU have been calculated automatically using a 4 PL (4 Parameter Logistics) curve fit. 4 Parameter Logistics is the preferred calculation method. Other data reduction functions may give slightly different results.
5. The concentration of the samples can be read directly from this standard curve. Samples with concentrations higher than that of the highest standard have to be further diluted or reported as > 80 ng/mL. For the calculation of the concentrations this dilution factor has to be taken into account.

6.3.1 Example of Typical Standard Curve

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

| Standard | Absorbance Units (450 nm) |
|-----------------------|---------------------------|
| Standard 0 (0 ng/mL) | 1.88 |
| Standard 1 (2 ng/mL) | 1.75 |
| Standard 2 (5 ng/mL) | 1.58 |
| Standard 3 (10 ng/mL) | 1.39 |
| Standard 4 (20 ng/mL) | 1.09 |
| Standard 5 (40 ng/mL) | 0.75 |
| Standard 6 (80 ng/mL) | 0.47 |

7 EXPECTED NORMAL VALUES

In order to determine the normal range of SLV cortisol, 109 saliva samples from adult male and female apparently healthy subjects, ages 20 to 80 years, were collected in the morning and analyzed using the DRG SLV Cortisol ELISA kit. The following range was calculated from this study.

Adults: 0.12 – 1.47 µg/dL or 1.2 – 14.7 ng/mL

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 0.537 – 80 ng/mL.

9.2 Specificity

The following materials have been evaluated for cross reactivity. The percentage indicates cross reactivity at 50% displacement compared to Cortisol.

| Steroid | % Cross reaction |
|--------------------------------|------------------|
| Cortisol | 100 |
| Corticosterone | 29.00 |
| Cortisone | 3.00 |
| 11-Deoxycortisol | < 1.00 |
| 17-OH Progesterone | < 0.50 |
| Prednisone | <0.10 |
| Progesterone | < 0.10 |
| Dexamethazone | < 0.10 |
| Desoxycorticosterone | < 0.10 |
| Dehydroepiandrosterone sulfate | < 0.10 |
| Estradiol | < 0.10 |
| Estriol | < 0.10 |
| Estrone | < 0.10 |
| Testosterone | < 0.10 |

9.3 Sensitivity

The lowest detectable level of Cortisol that can be distinguished from the Zero Standard is 0.537 ng/mL or 0.0537 µg/dL at the 95 % confidence limit.

9.4 Reproducibility

Intra-Assay

The intra-assay variation was determined by replicate measurements of 4 saliva samples using DRG ELISA kit. The within assay variability is shown below:

| | | | | |
|---------------------|-------|-------|-------|-------|
| Mean (ng/mL) | 4.52 | 0.94 | 12.79 | 17.50 |
| SD (ng/mL) | 0.120 | 0.042 | 0.230 | 0.258 |
| CV (%) | 2.65 | 4.52 | 1.80 | 1.47 |
| n = | 20 | 20 | 20 | 20 |

Inter-Assay

The inter-assay (between-run) variation was determined by quadruplicate measurements of commercial control samples in three different days runs.

| | | |
|---------------------|-------|-------|
| Mean (ng/mL) | 24.29 | 40.85 |
| SD (ng/mL) | 1.81 | 2.38 |
| CV (%) | 7.47 | 5.82 |
| n = | 12 | 12 |

Inter-Lot

The Inter-Lot (between-lot) variation was determined by duplicate measurements of five saliva samples in three different kit lots. The between run variability is shown below:

| | | | | | |
|---------------------|------|-------|-------|------|------|
| Mean (ng/mL) | 1.22 | 12.65 | 15.81 | 4.16 | 4.53 |
| SD (ng/mL) | 0.07 | 0.35 | 0.70 | 0.10 | 0.12 |
| CV(%) | 5.97 | 2.73 | 4.43 | 2.35 | 2.72 |
| N = | 9 | 9 | 9 | 9 | 9 |

9.5 Recovery

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

| Sample | Endogenous cortisol ng/mL | Added cortisol ng/mL | Measured OD mean of duplicate (450 nm) | Measured Conc. SLV cortisol ng/mL | Expected conc ng/mL | Recovery (%) |
|--------|---------------------------|----------------------|--|-----------------------------------|---------------------|--------------|
| 1 | 0.90 | 0.00 | 1.284 | 0.90 | | |
| | | 40.00 | 0.175 | 38.74 | 40.90 | 94.7 |
| | | 20.00 | 0.262 | 22.45 | 20.90 | 107.4 |
| | | 10.00 | 0.421 | 11.50 | 10.90 | 105.5 |
| | | 5.00 | 0.608 | 6.42 | 5.90 | 108.8 |
| 2 | 8.37 | 0.00 | 0.518 | 8.37 | | |
| | | 40.00 | 0.160 | 43.57 | 48.37 | 90.1 |
| | | 20.00 | 0.225 | 27.59 | 28.37 | 97.3 |
| | | 10.00 | 0.321 | 17.00 | 18.37 | 92.5 |
| | | 5.00 | 0.367 | 14.07 | 13.37 | 105.2 |
| 3 | 14.60 | 0.00 | 0.357 | 14.61 | | |
| | | 40.00 | 0.144 | 50.31 | 54.61 | 92.1 |
| | | 20.00 | 0.187 | 35.55 | 34.60 | 102.7 |
| | | 10.00 | 0.246 | 24.52 | 24.60 | 99.7 |
| | | 5.00 | 0.279 | 20.60 | 19.60 | 105.1 |

9.6 Linearity

Three samples (saliva) containing different amounts of analyte were serially diluted to 1:64 with zero standard and assayed with the DRG ELISA. The percentage recovery was calculated by comparing the expected and measured values for SLV cortisol. An assay linearity of 0.537 – 77 ng/mL has been identified as the usable range. Samples above this range must be diluted and re-run.

| | Sample 1 | Sample 2 | Sample 3 |
|------------------------------------|----------|----------|----------|
| Concentr. ng/mL | 33.13 | 80.00 | 23.23 |
| Average % Recovery | 107.0 | 99.1 | 97.5 |
| Range of % Recovery from to | 101.1 | 97.8 | 92.4 |
| | 114.0 | 99.6 | 104.4 |

9.7 Comparison Studies

Studies were performed to compare the DRG SLV Cortisol test to commercially available tests.

One study evaluated saliva samples from 114 subjects ages 40 to 70 years. The samples were run in duplicate on the DRG test and another commercially available LIA method to determine the concentration of Cortisol in the samples. A correlation of 0.872 was obtained versus this method.

A second study was performed using saliva samples from seventy-two (72) saliva samples collected from 40 – 70 year old men and women and run in duplicate on DRG and another commercially available EIA test.

Another study was performed comparing 28 saliva samples to a reference LC-MS method. A correlation of $r = 0.89056$ with a formula of $y = 1.0144x + 1.7762$ was obtained to this method.

To further demonstrate substantial equivalence of the DRG SLV test, additional expanded comparison studies were requested.

One expanded study evaluated saliva samples from 40 subjects ages 25 – 65 years. The samples were run in duplicate on the DRG test and another commercially available LIA method to determine the concentration of Cortisol in the samples.

An overall correlation of 0.9795 and a regression formula of $y = 0.9588x - 0.0338$ was obtained versus this method.

A second expanded study was performed using 40 saliva samples collected from men and women ages 25 – 65 years and run in duplicate on DRG and another commercially available EIA test.

A correlation of 0.9920 with a regression formula of $y = 1.0722x + 0.1482$ was observed compared to another EIA method.

10 LIMITATIONS OF USE

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

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

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

10.1 Interfering Substances

Blood contamination of more than 0.32% in saliva samples will affect results, and usually can be seen by eye. Concentrations of Sodium Azide >0.2% interferes in this assay and may lead to false results.

10.2 High-Dose-Hook Effect

No hook effect was observed in this test.

11 LEGAL ASPECTS

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

11.1 Reliability of Results

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

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

12 REFERENCES / LITERATURE

1. Irwin M, et al (1987): Life events, depressive symptoms and immune function, *Am J. Psychiat*, 144, 437-441
2. Solomon GF, Moss RH. (1964): Emotions, Immunity and disease. A speculative theoretical integration, *Arch. Gen Psychiatry*, 11, 657-674
3. 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
4. Hucklebridge FH, et al. (1999): The awakening of cortisol response and blood glucose levels, *Life Sci.*, 64, 931-937
5. Drucker S. (1987): New MI: Disorders of adrenal steroidogenesis, *Pediatr. Clin. North Am*, 34, 1055-1066
6. Hellhammer DH, et al. (1997): Social hierarchy and adrenocortical stress Reactivity in men, *Psychoneuroendocrinology*, 22, 643-650
7. 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
8. Chernow B., et al (1987): Hormonal responses to graded surgical stress, *Arch. Intern. Med.*, 147, 1273- 1278
9. 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
10. Riad-Fahny et al (1982), Steroids in saliva for assessing endocrine function, *Endocr. Rev*, 3, 367-395
11. Kirchbaum C., Hellhammer DH. (1989): Salivary cortisol in psychobiological Research: An overview, *Neuropsychobiology*, 22, 150-169
12. Kirchbaum C, Hellhammer Dh. (1994): Salivary cortisol in psychoneuroendocrine Research: Recent developments and applications, *Psychoneuroendocrinology*, 19, pp 313-333
13. Robin P., et al. (1977): Assay of unbound cortisol in plasma, *J. Clin. Endocrinol. Metab.*, 46, 277-283
14. Vining RF, et al. (1983), Hormones in saliva: Mode of entry and consequent implications for clinical interpretation, *Clin. Chem.*, 29, 1752-1756

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 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, Arbeitsanleitung verwenden.
- Informationen zu im Kit enthaltenen gefährlichen Substanzen entnehmen Sie bitte dem Sicherheitsdatenblatt.
- Alle Bestandteile dieses Testkits, die humanes Serum oder Plasma enthalten, wurden mit FDA-geprüften Methoden auf HIV I/II, HbsAg und HCV getestet und als negativ bestätigt. Jedoch sollten alle Bestandteile im Umgang und bei der Entsorgung wie mögliche Gefahrenstoffe betrachtet werden.
- Der Kontakt mit der *Stop Solution* sollte vermieden werden, da sie 0.5 M H₂SO₄ enthält. Schwefelsäure kann Hautreizungen und Verbrennungen verursachen.
- Nicht mit dem Mund pipettieren und den Kontakt von Kitbestandteilen und Proben mit Haut und Schleimhäuten vermeiden.
- In den Bereichen, in denen Proben oder Kitbestandteile verwendet werden, nicht rauchen, essen oder Kosmetika verwenden.
- Beim Umgang mit Proben oder Reagenzien Einweg-Latexhandschuhe tragen. Die Verunreinigung von Reagenzien oder Proben mit Mikroben kann zu falschen Ergebnissen führen.
- Der Gebrauch sollte gemäß der Vorschriften einer entsprechenden nationalen Gefahrenstoff-Sicherheitsrichtlinie erfolgen.
- Reagenzien nicht nach dem auf dem Kit-Etikett angegebenen Verfallsdatum verwenden.
- Alle im Kit-Protokoll angegebenen Mengen müssen genau eingehalten werden. Optimale Ergebnisse können nur durch Verwendung kalibrierter Pipetten und Mikrotiterplatten-Lesegeräte erreicht werden.
- Komponenten von Kits mit unterschiedlichen Lotnummern nicht untereinander vertauschen. Es wird empfohlen, keine Wells von verschiedenen Platten zu verwenden, auch nicht, wenn es sich um das gleiche Lot handelt. Die Kits können unter anderen Bedingungen gelagert oder versendet worden sein, so dass die Bindungscharakteristik der Platten leicht unterschiedlich ausfällt.
- Chemikalien und zubereitete oder bereits benutzte Reagenzien müssen gemäß den nationalen Gefahrenstoffvorschriften wie gefährlicher Abfall behandelt werden.
- Ein Sicherheitsdatenblatt für dieses Produkt ist 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; 2; 5; 10; 20; 40; 80 ng/mL; Umrechnungsfaktor: $1 \text{ ng/mL} = 2.76 \text{ nmol/L}$
Enthält quecksilberfreies Konservierungsmittel.
3. **Control low / Control high**, Kontrollen) 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 $450 \pm 10 \text{ nm}$ Filter), (z.B. das DRG Instruments Mikrotiterplattenlesegerät)
- Kalibrierte variable Präzisions-Mikropipette (100 μL , 200 μL)
- Saugfähiges Papier
- Aqua dest.

4.3 Lagerung und Haltbarkeit des Kits

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

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

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

4.4 Vorbereitung der Reagenzien

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

Wash Solution

Die 40-fach konzentrierte 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 oder Salivette (Sarstedt Kat.# 51.1534).

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 3000 – 2000 x 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 durchgemischt werden. Dabei sollte Schaumbildung vermieden werden.

Wenn die Testdurchführung einmal begonnen wurde, muss sie ohne Unterbrechung zu Ende geführt werden.

Für jeden Standard, jede Kontrolle oder Probe eine neue Plastikspitze verwenden, um Verschleppungen zu vermeiden.

Die Optische Dichte ist abhängig von Inkubationszeit und Temperatur. Deshalb ist es notwendig, vor Beginn der Testdurchführung alle Reagenzien in einen arbeitsbereiten Zustand zu bringen, die Deckel der Fläschchen zu öffnen, alle benötigten Wells in den Halter zu setzen. Nur eine solche Vorbereitung garantiert gleiche Zeiten für jeden Pipettiervorgang ohne Pausen.

Als generelle Regel gilt, dass die enzymatische Reaktion linear proportional zu Zeit und Temperatur ist.

6.2 Testdurchführung

Jeder Lauf muss eine Standardkurve beinhalten.

1. Die benötigte Anzahl Wells in der Halterung befestigen.
2. **Je 100 µL Standards**, Kontrollen 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.
5. Den Inhalt der Wells kräftig ausschütteln. Wells 3mal mit verdünnter Waschlösung 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 Arbeitsanleitung ermittelten Werte wurden automatisch mit Hilfe der 4 Parameter Gleichung (4PL, 4 Parameter Logistics, 4 Parameter Rodbard) bestimmt.
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 (450nm) |
|-----------------------|-------------------------|
| Standard 0 (0 ng/mL) | 1,88 |
| Standard 1 (2 ng/mL) | 1,75 |
| Standard 2 (5 ng/mL) | 1,58 |
| Standard 3 (10 ng/mL) | 1,39 |
| Standard 4 (20 ng/mL) | 1,09 |
| Standard 5 (40 ng/mL) | 0,75 |
| Standard 6 (80 ng/mL) | 0,47 |

7 ERWARTETE WERTE

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

In einer Studie wurden die Speichelproben von 109 gesunden Männern und Frauen, im Alter von 20 bis 80 Jahren, untersucht. Die Proben wurden morgens gesammelt.

Dabei ergaben sich mit dem DRG Salivary Cortisol ELISA folgende Werte:

Erwachsene: 1,2 – 14,7 ng/mL oder 0,12 – 1,47 µg/dL

Cortisolwerte im Speichel zeigen einen deutlichen zirkadianen Rhythmus. Aus diesem Grund sollten Proben immer zur selben Zeit gewonnen werden.

8 QUALITÄTS-KONTROLLE

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

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

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

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

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

9 ASSAY-CHARAKTERISTIKA

9.1 Messbereich

Der Messbereich des Testes liegt zwischen 0,537 – 80 ng/mL.

9.2 Analytische Sensitivität

Die analytische Sensitivität, definiert als Mittelwert minus der zweifachen Standardabweichung des Standards 0 (n = 20), beträgt 0,537 ng/mL.

9.3 Spezifität der Antikörper (Kreuzreaktivität)

Die Daten entnehmen Sie bitte der ausführlichen englischen Arbeitsanleitung.

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 Interferenzen

Eine Kontamination der Speichelproben mit Blut von mehr als 0,32% beeinflusst das Ergebnis. Eine solche Verunreinigung kann bereits mit den Augen wahrgenommen werden.

Konzentrationen von Natriumazid über 0,2% beeinflussen den Test und können zu falschen Ergebnissen führen.

10.2 Beeinflussung durch Medikamente

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

10.3 High-Dose-Hook Effekt

Ein Hook Effekt tritt in diesem Test nicht auf.

11 RECHTLICHE GRUNDLAGEN

11.1 Zuverlässigkeit der Ergebnisse

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

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

12 REFERENZEN / LITERATUR

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

1 INTRODUZIONE

Il test immuno-enzimatico **DRG Salivary Cortisol ELISA** contiene materiale per la determinazione quantitativa di cortisolo nella saliva.

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

2 PRINCIPIO DEL TEST

Il test Salivary Cortisol ELISA è un metodo 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/a 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** (Micropozetti), 12 x 8 file (separatamente staccabili), 96 pozzetti; Pozzetti ricoperti con l'anti-cortisolo anticorpo (monoclonale)
2. **Standard (Standard 0-6)**, 7 flaconi, 1 mL, pronto all'uso
Concentrazioni: 0.0 – 2 – 5 – 10 – 20 – 40 – 80 ng/mL
Conversione: 1 ng/mL = 2,76 nmol/L
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.

Test kits aperti rimangono attivi per due mesi se magazzinati alle condizioni sopra descritte.

4.4 Preparazione dei reagenti

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

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 scartarlo, 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 (SLV-4158) o Salivette (Sarstedt cat.# 51.1534)

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 fino a 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 3000 - 2000 x 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 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.

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.
 5. Rovesciare la piastra per vuotare i pozzetti.
Lavare i pozzetti **3 volte** con *Wash Solution* diluita .
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) | 1,88 |
| Standard 1 (2 ng/mL) | 1,75 |
| Standard 2 (5 ng/mL) | 1,58 |
| Standard 3 (10 ng/mL) | 1,39 |
| Standard 4 (20 ng/mL) | 1,09 |
| Standard 5 (40 ng/mL) | 0,75 |
| Standard 6 (80 ng/mL) | 0,47 |

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.

Pruebas de adultes masculinos y femeninos se muestreaban por la mañana.

| Popolazione | Età (anni) | N Valori | Intervalli |
|----------------|------------|----------|---|
| Uomini e donne | 20 - 80 | 109 | 1,2 – 14,7 ng/mL (0,12 – 1,47 µg/dL) |

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 magazzino 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 0,537 – 80 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 0,537 ng/mL.

9.4 Precisione

Per dettagli più precisi consultare la metodica in inglese.

9.5 Ritrovato

Per dettagli più precisi consultare la metodica in inglese.

9.6 Linearità

Per dettagli più precisi consultare la metodica in inglese.

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 Sostanze interferenti

Una contaminazione di sangue superiore a 0.32 % nella saliva avrà effetti sui risultati e può normalmente essere vista a occhio.

Una concentrazione di azide di sodio >0.2 % interferisce con questo saggio e può portare a risultati falsi.

10.2 Droghe interferenti

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

10.3 Effetto Hook di alti dosaggi

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

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 limitata al valore massimo del test kit. Ogni danno provocato durante il trasporto del kit non sottostà alla responsabilità del produttore.

12 BIBLIOGRAFIA

Per dettagli più precisi consultare la metodica in inglese.

1 INTRODUCCIÓN

El **Kit de inmunoensayo enzimático DRG Cortisol** proporciona los materiales necesarios para la determinación cuantitativa del Cortisol en saliva.

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

2 FUNDAMENTO DEL ENSAYO

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

Los pocillos de las placas están recubiertos con un anticuerpo monoclonal dirigido contra un foci antigénico en la molécula Cortisol. En las muestras de los pacientes Cortisol compite con un conjugado Cortisol -peroxidasa de rábano en la unión al anticuerpo inmovilizado. Después de la incubación el conjugado no unido se lava.

La cantidad de conjugado de peroxidasa unido es inversamente proporcional a la concentración de Cortisol en la muestra. Después de la adición de la solución sustrato, la intensidad de color desarrollado es inversamente proporcional a la concentración de Cortisol en la muestra del paciente.

3 PRECAUCIONES

- Este kit es solamente para diagnóstico *in vitro*.
- Por favor, se usa solo la version valida de la metodico técnico incluido aqui en el kit.
- Para obtener información de las sustancias peligrosas incluidas en el kit por favor mirar las hojas de los datos de seguridad del material.
- Todos los reactivos en este kit de ensayo que contienen suero o plasma humano se han ensayado y confirmado ser negativos para HIV I/II, HBsAg y HCV mediante procedimientos aprobados por la FDA. Sin embargo, todos los reactivos deben ser tratados tanto en su uso como dispensación como potencialmente biopeligrosos.
- Evitar contacto con *Stop Solution* que contiene H₂SO₄ 0,5 M. Puede provocar irritación y quemaduras en la piel.
- Nunca pipetear con la boca y evitar el contacto de los reactivos y las muestras con la piel y con membranas mucosas.
- No fumar, comer, beber o usar cosméticos en áreas donde las muestras o los reactivos del kit están siendo usados.
- Usar guantes de látex cuando se utilicen las muestras y los reactivos. La contaminación microbiana de los reactivos o las muestras puede dar resultados erróneos.
- El manejo debe realizarse de acuerdo a los procedimientos definidos por las guías o regulación nacionales de seguridad de sustancias biopeligrosas.
- No utilizar los reactivos después de su fecha de caducidad que aparece en las etiquetas del kit.
- Todos los volúmenes indicados han de ser realizados de acuerdo con el protocolo. Los resultados óptimos del ensayo se obtienen solo cuando se utilizan pipetas y lectores de microplacas calibrados.
- No mezclar o usar componentes de kits con distinto número de lote. Se recomienda no intercambiar pocillos de distintas placas incluso si son del mismo lote. Los kits pueden haber sido enviados o almacenados bajo diferentes condiciones y las características de unión de las placas pueden resultar diferentes.
- Los compuestos químicos y los reactivos preparados o utilizados han de tratarse como residuos peligrosos de acuerdo con las guías o regulación nacionales de seguridad de sustancias biopeligrosas.
- Las hojas de los datos de seguridad de este producto están disponibles bajo pedido directamente a DRG Instruments GmbH.

4 COMPONENTES DEL KIT

4.1 Componentes del Kit

1. **Microtiterwells** (Placas multipocillo), 12x8 tiras separables, 96 pocillos; Pocillos recubiertos con anticuerpo anti- Cortisol (monoclonal).
2. **Standard (Standard 0-6)**, (Estándar), 7 viales, 1 mL, listo para usar; Concentraciones: 0.0 – 2 – 5 – 10 – 20 – 40 - 80 ng/mL; *Conversión: 1 ng/mL = 2.76 nmol/L*
Contiene conservante sin mercurio.
3. **Control low / Control high**, 2 viales, 1,0 mL, listo para usar; Referir los valores y rangos del control a la etiqueta del vial o a la Hoja de datos QC. Contiene conservante sin mercurio.
4. **Enzyme Conjugate** (Conjugado enzimático), 1 vial, 26 mL, listo para usar, Cortisol conjugado con la Peroxidasa de rábano;; Contiene conservante sin mercurio.
5. **Substrate Solution** (Solución de sustrato), 1 vial, 25 mL, listo para usar, Tetrametilbencidina (TMB).
6. **Stop Solution** (Solución de parada), 1 vial, 14 mL, listo para usar, contiene 0.5M H₂SO₄, Evitar el contacto con la Solución de parada. Puede causar irritación y quemaduras en al piel.
7. **Wash Solution** (Solución de lavado), 1 vial, 30 mL (concentrado 40X), ver "Preparación de los Reactivos".

Nota: Se puede solicitar el *Standard 0* para la dilución de la muestra.

4.2 Equipamiento y material requerido pero no provisto

- Lector de microplacas calibrado (450 ± 10 nm) (ej. DRG Instruments Microtiter Plate Reader).
- Micropipetas de precisión variable calibradas.
- Papel absorbente.
- Agua destilada.

4.3 Almacenamiento y estabilidad del kit

Cuando se almacena a 2 °C - 8 °C, los reactivos sin abrir mantienen su reactividad hasta la fecha de caducidad. No utilizar los reactivos más allá de esta fecha.

Los reactivos abiertos han de almacenarse a 2 °C - 8 °C. Las placas multipocillo han de almacenarse a 2 °C - 8 °C. Una vez se ha abierto la bolsa hay que tener cuidado y cerrarla de nuevo.

4.4 Preparación de los Reactivos

Dejar que todos los reactivos y el número requerido de tiras alcancen la temperatura ambiente antes de usarse.

Wash Solution

Mezclar 30 mL de *Wash Solution* concentrada con 1170 mL de agua desionizada hasta un volumen final de 1200 mL. La solución del lavado diluida es estable durante 2 semanas a temperatura ambiente.

4.5 Eliminación del Kit

La eliminación del kit debe realizarse de acuerdo con las leyes nacionales. En las hojas de datos de seguridad se proporciona información especial de este producto (ver capítulo 13).

4.6 Kits de ensayo dañados

En caso de que exista cualquier daño severo del kit de ensayo o de sus componentes, ha de informarse por escrito a DRG, no mas tarde de una semana después de recibir el kit. No deben utilizarse componentes dañados para llevar a cabo un ensayo. Han de almacenarse hasta que se encuentre una solución. Después de esto, deben ser eliminados de acuerdo con las leyes oficiales.

5 MUESTRAS

Evitar: comer, beber, tomar chicles o limpiarse los dientes, al menos 30 minutos antes de la recogida de la muestra. Por el contrario, se recomienda enjuagarse la boca a fondo con agua fría 5 minutos antes de la recogida de la muestra.

No recoger muestras cuando hay enfermedades bucales, inflamación o lesiones (contaminación por sangre) de la boca. Si existe una contaminación por sangre visible en la muestra del paciente, ésta debe ser descartada, enjuagar el aparato de recogida de muestra con agua, esperar 10 minutos y recoger una nueva muestra.

Nota: No deben utilizarse muestras que contengan acida sódica.

5.1 Toma de muestras

Las muestras de saliva han de ser recogidas solamente utilizando aparatos especiales para recogida de muestras de saliva (vial y pajita), ej. SALI-TUBES 100 (SLV-4158) o Salivette (Sarstedt cat.# 51.1534).

Debido al patrón de secreción cíclica de las hormonas esteroideas, es importante preocuparse por una recogida coordinada.

Para evitar resultados arbitrarios recomendamos la recogida de 5 muestras siempre en un período de 2-3 horas (recogida múltiple) preferentemente antes de una comida.

Debido a que la comida puede contener una cantidad significativa de hormonas esteroideas, las muestras han de recogerse preferentemente en ayuno. Si el ayuno fuera un problema, el período de recogida debe ser coordinado justo antes de comer o de cenar.

5.2 Almacenamiento de las muestras

Las muestras de saliva han de almacenarse entre 2-8°C hasta una semana, y deben congelarse a -20°C para períodos superiores; no es un problema el descongelado y congelado repetido.

Cada muestra ha de ser congelada, descongelada y centrifugada al menos una vez para separar las mucinas por centrifugación.

Cuando llegan las muestras al laboratorio, estas han de permanecer en el congelador al menos durante una noche. A la mañana siguiente las muestras congeladas se calientan hasta temperatura ambiente y se mezclan cuidadosamente.

Entonces, las muestras han de ser centrifugadas de 5 a 10 minutos (a 3000 - 2000 x g).

Ahora el sobrenadante incoloro es fácil de pipetear.

Si se ha de ensayar un conjunto de múltiples muestras, se han de mezclar (al menos con un ciclo de congelado, descongelado y centrifugación) una mezcla de 5 muestras a parte y realizar el ensayo de esta mezcla.

5.3 Dilución de las muestras

Si en un ensayo inicial, se encuentra una muestra que presenta valores mayores que el estándar mas concentrado, ha de diluirse con *Standard 0* y volver a ensayarse como se describe en el Procedimiento de Ensayo.

Para el cálculo de las concentraciones habrá que tener en cuenta el factor de dilución.

Ejemplo:

a) dilución 1:10: 10 µL saliva + 90 µL *Standard 0* (mezclar totalmente)

b) dilución 1:100: 10 µL dilución a) 1:10 + 90 µL *Standard 0* (mezclar totalmente).

6 PROCEDIMIENTO DE ENSAYO

6.1 Consideraciones generales

- Todos los reactivos y muestras han de estar a temperatura ambiente antes de su uso. Todos los reactivos deben mezclarse sin formar espuma.
- Una vez se ha comenzado el ensayo deben completarse todos los pasos sin interrupción.
- Utilizar puntas de pipeta de plástico nuevas para cada estándar, control o muestra para evitar combinaciones cruzadas.
- La absorbancia es función del tiempo de incubación y la temperatura. Antes de comenzar el ensayo, se recomienda que todos los reactivos estén preparados, tapas removidas, todos los pocillos que se necesiten asegurados en recipiente, etc. Esto asegurará un tiempo similar para cada paso de pipeteo sin que haya interrupciones.
- Como regla general, la reacción enzimática es linealmente proporcional al tiempo y a la temperatura.

6.2 Procedimiento de ensayo

Cada uno debe incluir una curva de estándares.

1. Asegurar el número deseado de pocillos en el recipiente.
2. Dispensar **100 µL** de cada *Standard*, *Control* y muestras con puntas nuevas en los pocillos adecuados.
3. Dispensar **200 µL** de *Enzyme Conjugate* a cada pocillo.
Mezclar totalmente durante 10 segundos. Es importante mezclar completamente en este paso.
4. Incubar durante **60 minutos** a temperatura ambiente.
5. Sacudir enérgicamente el contenido de los pocillos.
Lavar los pocillos **3 veces** con *Wash Solution* diluida (400 µL por pocillo). Realizar un golpe seco de los pocillos contra el papel absorbente para eliminar las gotas residuales.
Nota importante:
La sensibilidad y la precisión de este ensayo se ve marcadamente influenciada por la realización correcta del proceso de lavado!
6. Adicionar **200 µL** de *Substrate Solution* a cada pocillo.
7. Incubar durante **30 minutos** a temperatura ambiente.
8. Parar la reacción enzimática mediante la adición de **100 µL** de *Stop Solution* a cada pocillo.
9. Leer la OD a **450 ± 10 nm** con un lector de microplacas **dentro de los 10 minutos** después de la adición de la *Stop Solution*.

6.3 Cálculo de los Resultados

1. Calcular los valores de absorbancia media para cada conjunto de estándares, controles y muestras de pacientes.
2. Construir una curva estándar mediante la representación de la absorbancia media obtenida para cada estándar frente a su concentración con el valor de absorbancia en el eje vertical (Y) y la concentración en el eje horizontal (X).
3. Usando el valor de absorbancia media de cada muestra determinar la concentración correspondiente a partir de la curva estándar.
4. Método automatizado: Los resultados en la IFU se han calculado automáticamente usando una curva de regresión 4 PL (4 Parámetros Logísticos). Otras funciones de regresión darán lugar a resultados sensiblemente diferentes.
5. La concentración de la muestra puede leerse directamente de la curva de estándares. Las muestras con concentraciones superiores al mayor estándar han de diluirse. Para el cálculo de las concentraciones hay que tener en cuenta el factor de dilución.

6.3.1 Ejemplo de una Curva Estándar Típica

Los siguientes datos son solamente para la explicación y **no** pueden ser utilizados en lugar de los datos generados en el momento del ensayo.

| Estándar | Unidades Ópticas (450 nm) |
|-----------------------|---------------------------|
| Standard 0 (0 ng/mL) | 1.88 |
| Standard 1 (2 ng/mL) | 1.75 |
| Standard 2 (5 ng/mL) | 1.58 |
| Standard 3 (10 ng/mL) | 1.39 |
| Standard 4 (20 ng/mL) | 1.09 |
| Standard 5 (40 ng/mL) | 0.75 |
| Standard 6 (80 ng/mL) | 0.47 |

7 VALORES ESPERADOS

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

En un estudio con adultos aparentemente sanos utilizando el DRG Cortisol ELISA se observaron los siguientes valores:

Adultos: 0.12 – 1.47 µg/dL or 1.2 – 14.7 ng/mL

8 CONTROL DE CALIDAD

Se recomienda usar muestras control de acuerdo con las leyes estatales y federales. El uso de muestras control se recomienda para asegurar la validez diaria de los resultados. Usar controles tanto a niveles normal como patológico. Los controles y los correspondientes resultados del Laboratorio de control de calidad están fijados en el certificado de control de calidad que acompañan al kit. Los valores y los rangos fijados en la hoja del control de calidad se refieren siempre al kit actual y deben usarse para la comparación directa de los resultados.

Es recomendable también hacer uso de programas de Aseguramiento de la Calidad nacionales o internacionales para asegurar la exactitud de los resultados.

Utilizar métodos estadísticos apropiados para el análisis de los valores y tendencia de los controles. Si los resultados del ensayo no se ajustan a los rangos aceptables establecidos en los controles, los resultados obtenidos de los pacientes han de considerarse inválidos.

En este caso, por favor comprobar las siguientes áreas técnicas: Pipeteo y tiempo empleado, fotómetro, fecha de caducidad de los reactivos, condiciones de almacenamiento e incubación, métodos de aspiración y lavado.

Después de comprobar los asuntos mencionados arriba sin encontrar ningún error, contactar con su distribuidor o con DRG directamente.

9 CARACTERÍSTICAS DEL ENSAYO

9.1 Rango dinámico del ensayo

El rango del ensayo se encuentra entre 0,537 – 80 ng/mL.

9.2 Sensibilidad Analítica

La sensibilidad analítica se calculó a partir de la media menos dos desviaciones estándar de veinte (20) réplicas del *Estándar 0* y resultó ser 0,537 ng/mL.

9.3 Especificidad de los Anticuerpos (Reactividad Cruzada)

Consultar el manual de usuario en inglés.

9.4 Precisión

Consultar el manual de usuario en inglés.

9.5 Recuperación

Consultar el manual de usuario en inglés.

9.6 Linealidad

Consultar el manual de usuario en inglés.

10 LIMITACIONES DE USO

Cualquier manipulación inadecuada de las muestras o modificaciones del ensayo pueden influenciar los resultados. Para la obtención de resultados fiables y reproducibles en el desarrollo del ensayo es necesario un conocimiento completo de las instrucciones del interior del paquete y de acuerdo a las buenas prácticas de laboratorio.

10.1 Sustancias que pueden interferir

Una contaminación con sangre de más de 0,32% en las muestras de saliva afectará los resultados, y puede verse normalmente a simple vista.

Las concentraciones de acida sódica >0,2% interfieren en el ensayo y pueden conducir a falsos resultados.

10.2 Interferencias con drogas

Hasta ahora no se han encontrado sustancias (drogas) conocidas por nosotros, que tengan influencia en la medida de Cortisol en una muestra.

10.3 Efecto Gancho-Dosis-Elevada

No se ha observado efecto gancho en este ensayo.

11 ASPECTOS LEGALES

11.1 Fiabilidad de los Resultados

El ensayo debe realizarse exactamente de acuerdo a las instrucciones del fabricante. Mas aún, el usuario debe ajustarse estrictamente a las reglas BPL (Buenas Prácticas de Laboratorio) o a otros estándares y/o leyes nacionales aplicables. Esto es especialmente relevante para el uso de reactivos control. Es importante incluir siempre, dentro del procedimiento de ensayo, un número suficiente de controles para validar la exactitud y la precisión del ensayo.

Los resultados del ensayo son válidos sólo si todos los controles se encuentran dentro de los rangos especificados y si todos los otros parámetros del ensayo se encuentran dentro de las especificaciones dadas para el ensayo. En caso de alguna duda o inquietud, por favor, contactar con DRG.

11.2 Consecuencias Terapéuticas

Las consecuencias terapéuticas nunca deben basarse sólo en los resultados de laboratorio incluso si todos los resultados del ensayo están de acuerdo con los asuntos fijados en el punto 11.1. Cualquier resultado de laboratorio es solamente una parte del cuadro clínico de un paciente.

Solamente en los casos donde los resultados de laboratorio están en acuerdo con todo el cuadro clínico de un paciente, se pueden derivar consecuencias terapéuticas.

Nunca deben derivarse consecuencias terapéuticas a partir de solamente el resultado obtenido en el ensayo

11.3 Responsabilidad











Cualquier modificación del kit y/o cambio o mezcla de cualquier componente procedentes de kits de lotes diferentes puede afectar negativamente a los resultados esperados y en la validez de todo el test. Esas modificaciones y/o cambios invalidan cualquier reclamación de reposición.

Las reclamaciones emitidas debidas a una mala interpretación de los resultados de laboratorio por parte del comprador referidos al punto 11.2 son también inválidas. A pesar de todo, en el caso de cualquier reclamación, la responsabilidad del fabricante no excede el valor del kit. Cualquier daño provocado al kit durante su transporte no está sujeto a la responsabilidad del fabricante.

12 REFERENCIAS / BIBLIOGRAFÍA

Consultar el manual de usuario en inglés.

SYMBOLS USED

| Symbol | English | Deutsch | Français | Español | 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 | Usage Diagnostic in vitro | Diagnóstico in vitro | Per uso Diagnostica in vitro |
|  | For research use only | Nur für Forschungszwecke | Seulement dans le cadre de recherches | Sólo para uso en investigación | Solo a scopo di ricerca |
|  | 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 |
|  | 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 conservacion | Temperatura di conservazione |
|  | Expiration Date | Mindesthaltbarkeitsdatum | 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 | Antisero | Antisiero |
| <i>Enzyme Conjugate</i> | Enzyme Conjugate | Enzymkonjugat | Conjugué enzymatique | Conjugado enzimático | Tracciante enzimatico |
| <i>Enzyme Complex</i> | Enzyme Complex | Enzymkomplex | Complexe enzymatique | Complex enzimático | Complesso enzimatico |
| <i>Substrate Solution</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 Diluent</i> | Sample Diluent | Probenverdünnungsmedium | Solution pour dilution de l'échantillon | | Diluyente dei campioni |
| <i>Conjugate Diluent</i> | Conjugate Diluent | Konjugatverdünnungsmedium | Solution pour dilution du conjugué | | Diluyente del tracciante |