

Product information

Information about other products is available at: www.demeditec.com



User's Manual

Cortisol free in Saliva ELISA

IVD



REF

DES6611



96 Wells

CONTENTS / INHALTSVERZEICHNIS

1	INTRODUCTION	2
2	PRINCIPLE	2
3	WARNINGS AND PRECAUTIONS	2
4	REAGENTS	3
5	SPECIMEN COLLECTION AND PREPARATION	4
6	ASSAY PROCEDURE	5
7	EXPECTED NORMAL VALUES	7
8	QUALITY CONTROL	7
9	PERFORMANCE CHARACTERISTICS	7
10	LIMITATIONS OF PROCEDURE	9
11	LEGAL ASPECTS	10
12	REFERENCES	10
1	EINLEITUNG	12
2	TESTPRINZIP	12
3	VORSICHTSMAßNAHMEN	12
4	BESTANDTEILE DES KITS	13
5	PROBENVORBEREITUNG	14
6	TESTDURCHFÜHRUNG	16
7	ERWARTETE WERTE	17
8	QUALITÄTSKONTROLLE	17
9	ASSAY CHARACTERISTIKA	17
10	GRENZEN DES TESTS	18
11	RECHTLICHE GRUNDLAGEN	18
12	REFERENZEN	19
	SYMBOLS USED WITH DEMEDITEC ELISA'S	20

1 INTRODUCTION

1.1 Intended Use

An enzyme immunoassay for the quantitative in vitro diagnostic measurement of active free cortisol in saliva.

1.2 Summary and explanation

Cortisol is a corticosteroid hormone or glucocorticoid produced by the adrenal cortex, that is part of the adrenal gland (in the Zona fasciculata and the Zona reticularis of the adrenal cortex). It is usually referred to as the "stress hormone" as it is involved in response to stress. It increases blood pressure and blood sugar, and reduces immune responses.

The amount of Cortisol present in saliva undergoes diurnal variation. During the first 2 or 3 hours after typical wake-up time there is a distinct concentration peak-value. The position of this peak-value is strongly influenced by the average wake-up time during the past week. It is not as dependent on the actual wake-up time of the specific day of sample collection (if different from the average wake-up time of the past week). After this peak the Cortisol concentration declines until approximately midnight. The best time for sample collection to test for diseases such as Morbus Cushing (Cushing's Disease) is midnight ⁽¹⁾. Spontaneous increases in Cortisol concentration during the day may occur, commonly due to stress or food intake. Strenuous physical exercise can also result in increased Cortisol concentrations post-exercise. Exercise-induced increases in Cortisol concentration have been reported to even exceed the morning peak concentration. After several hours post-exercise the concentration should return to normal levels.

The diurnal pattern of Cortisol excretion is not present at birth (estimates of when it starts vary from two weeks to 9 months). Changed patterns of Cortisol levels have been observed in connection with abnormal ACTH levels, clinical depression, psychological stress, and various physiological stressors as hypoglycemia, illness, fever, trauma, surgery, fear, or pain.

2 PRINCIPLE

The **DEMEDIATEC Cortisol free in Saliva 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 polyclonal rabbit antibody directed against 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. 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.
3. 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.
4. Pipetting of samples and reagents must be done as quickly as possible and in the same sequence for each step.
5. 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.
6. Mix the contents of the microplate wells thoroughly to ensure good test results. Do not reuse microwells.
7. Do not let wells dry during assay; add reagents immediately after completing the rinsing steps.
8. Allow the reagents to reach room temperature (21-26°C) before starting the test. Temperature will affect the absorbance readings of the assay. However, values for the patient samples will not be affected.
9. Never pipet by mouth and avoid contact of reagents and specimens with skin and mucous membranes.
10. Do not smoke, eat, drink or apply cosmetics in areas where specimens or kit reagents are handled.

11. Wear disposable latex gloves when handling specimens and reagents. Microbial contamination of reagents or specimens may give false results.
12. Handling should be done in accordance with the procedures defined by an appropriate national biohazard safety guideline or regulation.
13. Do not use reagents beyond expiry date as shown on the kit labels.
14. All indicated volumes have to be performed according to the protocol. Optimal test results are only obtained when using calibrated pipettes and microtiterplate readers.
15. 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.
16. Avoid contact with Stop Solution. It may cause skin irritation and burns.
17. Chemicals and prepared or used reagents have to be treated as hazardous waste according to the national biohazard safety guideline or regulation.
18. For information please refer to Material Safety Data Sheets. Safety Data Sheets for this product are available upon request directly from Demeditec Diagnostics GmbH.

4 REAGENTS

4.1 Reagents provided

1. **SORB MT Microtiterwells**, 12x8 (break apart) strips, 96 wells;
Wells coated with an anti-cortisol antibody (polyclonal).
2. **CAL 0 Calibrator 0**, 1 vial, 2.0 ml, ready to use
3. **CAL 1-5 Calibrator (Calibrator 1-5)**, 5 vials, 0.5 ml each, ready to use;
Concentrations: 0.1 - 0.4 - 1.7 - 7.0 - 30 ng/ml,
Conversion factors: 1 ng/ml = 2.762 nmol/l = 0.1 µg/dl
4. **CONTROL 1-2 Control low / Control high**, 2 vials, 0.5 ml each, ready to use;
For control values and ranges please refer to QC-Datasheet.
5. **ENZ CONJ Enzyme Conjugate**, 1 vial, 7.0 ml, ready to use;
Cortisol conjugated to horseradish peroxidase;
6. **SUB TMB Substrate Solution**, 1 vial, 22 ml, ready to use;
Tetramethylbenzidine (TMB).
7. **STOP SOLN Stop Solution**, 1 vial, 7.0 ml, ready to use;
contains 2 N acidic solution.
Avoid contact with the stop solution. It may cause skin irritations and burns.
8. **WASH SOLN 10x Wash Solution**, 1 vial, 50 ml (10X concentrated);
see „Preparation of Reagents“.

All reagents contain azide-free and mercury-free preservatives.

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

4.2 Material required but not provided

- Microcentrifuge
- A microtiter plate calibrated reader (450±10 nm)
- Microplate mixer operating at about 600-900 rpm, optionally
- Vortex mixer
- Calibrated variable precision micropipettes (50 µl, 100 µl, 200 µl).
- Absorbent paper.
- Distilled or deionized water
- Timer
- Semi logarithmic graph paper or software for data reduction

4.3 Storage conditions

When stored at 2 °C to 8 °C unopened reagents will be stable 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 Reagents preparations

Allow the reagents and the required number of wells to reach room temperature (21-26°C) before starting the test.

Wash Solution

Add deionized water to the 10X concentrated *Wash Solution*.

Dilute 50 ml of concentrated *Wash Solution* with 450 ml deionized water to a final volume of 500 ml.

The diluted Wash Solution is stable for 3 months at room temperature.

4.5 Disposal of the kits

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

4.6 Damaged test kits

In case of any severe damage of the test kit or components, DEMEDITEC have to be informed written, 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

Samples containing sodium azide should not be used in the assay. The saliva samples should be completely colorless. Even the slightest red color shows blood contamination. Such blood contamination will give falsely elevated concentration values. In case of visible blood contamination the patient should discard the sample, rinse the collection device with water, also rinse the mouth with (preferably) cold water, wait for 10 minutes and take a new sample. Do not chew anything during the sampling period. Any pressure on the teeth may result in falsely elevated measurements due to an elevated content of gingival liquid in the saliva sample.

5.1 Specimen Collection

For the correct collection of saliva we are recommending to only use appropriate devices made from ultra-pure polypropylene. Do not use any PE devices or Salivettes for sampling; this in most cases will result in significant interferences. Glass tubes can be used as well, but in this case special attention is necessary for excluding any interference caused by the stopper. Please contact Demeditec Diagnostics for more details.

As the Cortisol secretion in saliva as well in serum shows an obvious secretion pattern throughout the day it is important to care for a proper timing of the sampling. The morning peak normally appears during the first 2 hours after the average wake-up time. But also during the day there might be smaller peaks in the Cortisol secretion. Therefore we recommend taking 5 separate samples within a period of 2 hours (multiple sampling) directly after the usual wake-up time. As food might contain significant amounts of steroid hormones samples preferably should be taken while fasting. If fasting should be a problem it is allowed to eat small amount of vegetarian food directly after collecting one sample. After eating such a small amount the patient should clean his mouth by washing it with water. If possible the volume of each single sample should be a minimum of 0.5 ml (better 1 ml). Saliva flow may be stimulated by drinking water. This is allowed and even recommended before and during the collection period. Drinking of water is not allowed during the last 5 minutes before taking a saliva sample. It is important to know that the timing of the morning peak is not related to the absolute time or the day light. It is just related to the wake-up habits of the patient. In order to catch the peak we recommend collecting the samples at approximately 1 min, 30 min, 60 min, 90 min, and 120 minutes after the usual weak-up time of the last 10 days. The typical timing for a morning collection period would be as follows. Wake-up at 6:00 AM, 1st sample at 6:01 AM, drinking water and brushing teeth, followed by samples at 6:30 AM, 7:00 AM, 7:30 AM, and 8:00 AM, followed by breakfast at maybe 8:15 AM. Modest variation in the collection timing will not be critical, and the collection time-frame can be extended up to 3 hours. Special care has to be taken in case the patient recently has done trip over several time zones.

The collection for the evening sample (e.g. midnight Cortisol for the detection of Morbus Cushing) has to be done during the late evening (at best between 10 and 12 PM). Also in this case we recommend collecting 5 samples in intervals of at least 30 minutes. If only 5 sampling devices are available for the collection of a day profile, sampling also can be done as follows. 30 min, 60 min, and 90 minutes after the usual wake-up time for the morning value; followed by 2 samples in the late evening collected during the last hour before going to bed.

5.2 Specimen Storage and Preparation

Saliva samples in general are stable at ambient temperature for several days. Therefore mailing of such samples by ordinary mail without cooling will not create a problem. Storage at 4°C can be done for a period of up to one month. Whenever possible samples preferable should be kept at a temperature of -20°C. Even repeated thawing and freezing is no problem. Each sample has to be frozen, thawed, and centrifuged at least once anyhow 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. Now the clear colorless supernatant is easy to pipette. If the sample should show even a slight reddish tinge it should be discarded. Otherwise the concentration value most probably will be falsely elevated. Due to the episodic variations of the steroid secretion we highly recommend the strategy of multiple sampling. If such a set of multiple samples has to be tested the lab (after at least one freezing, thawing, and centrifugation cycle) has to mix the aliquots of the 5 single samples in a separate sampling device and perform the testing from this mixture. If the shape of the morning peak has to be determined all 5 morning samples have to be tested separately.

5.3 Specimen Dilution

If in an initial assay, a specimen is found to contain more than the highest calibrator, the specimens can be diluted with *Calibrator 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 *Calibrator 0* (mix thoroughly)
- b) Dilution 1:100: 10 µl of dilution a) + 90 µl *Calibrator 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 coated strips in the frame holder.
2. Dispense **50 µl** of each **Calibrator, Control and sample** with new disposable tips into appropriate wells.
3. Dispense **50 µl** of **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. Shaking on a horizontal shaker during incubation is not necessary, but it improves the sensitivity of the test slightly.
5. Briskly empty the contents of the wells by aspiration or by decanting.
Rinse the wells 4 times with diluted Wash Solution (300 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** in the dark at room temperature.
8. Stop the enzymatic reaction by adding **50 µl** of **Stop Solution** to each well.
9. Determine the absorbance of each well at **450±10 nm**.
It is recommended that the wells be read within 15 minutes.

6.3 Calculation of results

1. Calculate the average absorbance values for each set of calibrators, controls and patient samples.
2. Construct a standard curve by plotting the mean absorbance obtained from each calibrator 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 calibrator 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 calibrator curve

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

Calibrator		Optical Units (450 nm)
Calibrator 0	0.0 ng/ml	2.347
Calibrator 1	0.1 ng/ml	2.011
Calibrator 2	0.4 ng/ml	1.512
Calibrator 3	1.7 ng/ml	0.848
Calibrator 4	7.0 ng/ml	0.462
Calibrator 5	30 ng/ml	0.187

7 EXPECTED NORMAL VALUES

In order to determine the normal range of Cortisol free in Saliva samples from adult male and female apparently healthy subjects, were collected and analyzed using the DEMEDITEC Cortisol free in Saliva ELISA kit. The following range was calculated from this study.

Time of day	5-95% percentile (ng/ml)	n
Morning	1 – 11.3	234
Midday	0.3 – 5.7	427
Afternoon	0.3 – 3.3	129
Evening	0.2 – 2.7	419
Midnight	< 1.0	26

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 to always collecting a series of samples in the morning and another one in the evening. The difference between morning and evening is the important parameter. Furthermore, we recommend that each laboratory determines 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 DEMEDITEC directly.

9 PERFORMANCE CHARACTERISTICS

9.1 Analytical Sensitivity

The analytical sensitivity of the DEMEDITEC ELISA was calculated by subtracting 2 standard deviations from the mean of twenty (20) replicate analyses of *Calibrator 0*. The analytical sensitivity of the assay is 0.024 ng/ml.

9.2 Specificity (Cross Reactivity)

The following materials have been evaluated for cross reactivity.

Steroids	% Crossreactivity
Testosterone	< 0.1%
Corticosterone	5.2%
Cortisone	0.2%
11-Deoxycorticosterone	0.4%
11-Deoxycortisol	10.4%
Dexamethasone	< 0.1%
Estriol	< 0.1%
Estrone	< 0.1%
Prednisolone	63.4%
Prednisone	< 0.1%
Progesterone	< 0.1%
Danazole	< 0.1%
Pregnenolone	< 0.1%
Estradiol	< 0.1%

9.3 Assay Dynamic Range

The range of the assay is between 0.024 – 30 ng/ml.

9.4 Reproducibility

9.4.1 Intra-Assay

The intra-assay variation was determined by replicate measurements of 2 saliva samples within one run using the DEMEDITEC Cortisol free in Saliva ELISA. The within-assay variability is shown below:

	Sample 1	Sample 2
Mean (ng/ml)	6.74	2.701
SD (ng/ml)	0.39	0.102
CV (%)	5.8	3.8
n =	20	20

9.4.2 Inter-Assay

The inter-assay variation was determined by duplicate measurements of 2 saliva samples in 10 different runs using the DEMEDITEC Cortisol free in Saliva ELISA. The inter-assay variability is shown below:

	Sample 1	Sample 2
Mean (ng/ml)	1.15	8.22
SD (ng/ml)	0.071	0.53
CV (%)	6.2	6.4
n =	10	10

9.5 Recovery

Recovery of the DEMEDITEC 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.

Saliva	Spiking	Observed (O)	Expected (E)	O/E %
1	-	0,54	-	-
	2 ng/mL	2,78	2,54	109%
	4 ng/mL	4,11	4,54	91%
	6 ng/mL	5,75	6,54	88%
2	-	1,1	-	-
	2 ng/mL	3,62	3,10	116%
	4 ng/mL	5,57	5,10	109%
	6 ng/mL	7,52	7,10	106%
3	-	4,48	-	-
	2 ng/mL	6,28	6,48	97%
	4 ng/mL	8,78	8,48	104%
	6 ng/mL	9,95	10,48	95%

9.6 Linearity

Three saliva samples containing different amounts of analyte were serially diluted with Calibrator 0 and assayed with the DEMEDITEC ELISA. The percentage recovery was calculated by comparing the expected and observed values for cortisol.

Saliva	Dilution	Observed (O)	Expected (E)	O/E %
1	1 in 1	6,46	-	-
	1 in 2	3,26	3,23	101%
	1 in 4	1,58	1,62	98%
	1 in 8	0,78	0,81	96%
2	1 in 1	7,35	-	-
	1 in 2	4,32	3,68	117%
	1 in 4	2,13	1,84	116%
	1 in 8	0,98	0,92	106%
3	1 in 1	18,38	-	-
	1 in 2	9,68	9,19	105%
	1 in 4	5,15	4,60	112%
	1 in 8	2,45	2,30	106%

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 DEMEDITEC.

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

1. Authors: LK Nieman, BMK Biller, JW Findling, J Newell-Price, VM Montori
Title: The diagnosis of Cushing's syndrome: An Endocrine Society Clinical Practice Guideline
Published in: J. Clin. Endocrin. & Metabol. **2008**, Vol.93, No.5, pages 1526-1540
2. Kirchbaum C., Hellhammer DH. (**1989**): Salivary cortisol in psychobiological Research: An overview, *Neuropsychobiology*, 22, 150-169
3. Kirchbaum C, Hellhammer Dh. (**1994**): Salivary cortisol in psychoneuroendocrine Research: Recent developments and applications, *Psychoneuroendocrinology*, 19, pp 313-333
4. Vining RF, et al. (**1983**), Salivary cortisol: a better measure of adrenal cortical function than serum cortisol, *Ann Clin Biochem*, 20, 329-335
5. Authors: E.W. Harville, D.A. Savitz, N. Dole, A.H. Herring, J.M. Thorp, K.C. Light
Title: Patterns of salivary Cortisol secretion in pregnancy and implications for assessment protocols.
Published in: *Biol. Psychol* **2007**, Vol.74, pages 85-91
6. Authors: AH Thomson, MC Devers, AM Wallace, D. Grant, K. Cambell, JMC Connell
Title: Variability in hydrocortisone plasma and saliva pharmacokinetics following intravenous and oral administration to patients with adrenal insufficiency.
Published in: *Clinical Endocrinology* **2007**, Vol.66, pages 789-796
7. Authors: RJ Custodio, CE Martinelli, SLS Milani, AL Simoes, M de Castro, AC Moreira
Title: The emerge of the Cortisol circadian rhythm in monozygotic and dizygotic twin infants: the twin-pair synchrony.
Published in: *Clinical Endocrinology* **2007**, Vol 66, pages 192-197

8. Authors: MD Garcia-Prieto, FJ Tébart, F. Nicolàs, E. Larqué, M. Garaulet
Title: Cortisol secretary pattern and glucocorticoid feedback sensitivity in women from a Mediterranean area: Relationship with anthropometric characteristics, dietary intake and plasma fatty acid profile.
Published in: Clinical Endocrinology **2007**, Vol 66, pages 185-191
9. Authors: S. Izawa, N. Sugaya, N. Ogawa, Y. Nagano, M. Nakano, E. Nakase, S. Nomura
Title: Episodic stress associated with writing a graduation thesis and free Cortisol secretion after awakening.
Published in: International Journal of Psychophysiology **2007**, Vol 64, pages 141-145
10. Authors: DS Jessop, JM Turner-Cobb
Title: Measurement and meaning of salivary Cortisol: A focus on health and disease in children
Published in: Stress **2007**, Preprint, accepted 25 March 2007, pages 1-14
11. Authors: DB Fekedulegn, ME Andrew, CM Burchfiel, JM Violanti, DB Miller
Title: Area under the curve and other summary indicators of repeated waking Cortisol measurements.
Published in: Psychosomatic Medicine **2007**, Vol. 69, pages 651-659
12. Authors: I. Wilhelm, J. Born, B.M. Kudielka, W. Schlotz, S. Wüst
Title: Is the Cortisol awakening rise a response to awakening?
Published in: Psychoneuroendocrinology **2007** Vol.32. pages 358-366
13. Authors: B.M. Kudielka, S. Bellingrath, D.H. Hellhammer
Title: Further support for higher salivary Cortisol levels in "morning" compared to "evening" persons.
Published in: Journal of Psychosomatic Research **2007** Vol.62, pages 595-596
14. Authors: L.D. Dorn, J.F. Lucke, T.L. Loucks, S.L. Berga
Title: Salivary Cortisol reflects serum Cortisol: Analysis of circadian profiles.
Published in: Ann Clin Biochem **2007** Vol. 44, pages 281-284
15. Authors: R.L. Matchock, L.D. Dorn, E.J. Susman
Title: Diurnal and seasonal cortisol, testosterone, and DHEA rhythms in boys and girls during puberty
Published in: Chronobiol Int. **2007**, Vol. 24(5), pages 969-90

1 EINLEITUNG

Enzym-Immuno-Assay zur quantitativen Bestimmung von aktivem freien Cortisol in Speichel.

Nur für In-vitro Diagnostik.

Cortisol, auch Hydrocortison, ist ein Steroidhormon, das in der *Zona fasciculata* der Nebennierenrinde gebildet wird und zur Gruppe der Glucocorticoide gehört. Es ist ein wichtiges „Stresshormon“, das bei psychischem oder physischem Stress ausgeschüttet wird.

Cortisol besitzt ein sehr breites Wirkungsspektrum und hat im Stoffwechsel vor allem Effekte auf den Kohlenhydrathaushalt (Förderung der Glukoneogenese in der Leber), den Fettstoffwechsel (Förderung der lipolytischen Wirkung von Adrenalin und Noradrenalin) und den Proteinumsatz (katabol).

Die Cortisolkonzentration im Speichel unterliegt relativ starken episodischen Schwankungen. Während der ersten 2-3 Stunden nach der gewohnten Aufwachzeit ist ein deutlicher Konzentrationspeak (Morgenpeak) zu erwarten. Der Zeitpunkt des Morgenpeaks ist stark abhängig von der Aufwachzeit der letzten Wochen und nicht von der Aufwachzeit am Probensammlerstag. Nach diesem Peak sinkt die Cortisolkonzentration bis Mitternacht ab. Die beste Zeit der Probensammlung, um einen Morbus Cushing (Cushing's Syndrom) zu diagnostizieren, ist Mitternacht⁽¹⁾.

Wechselnde Cortisolspiegel wurden in Zusammenhang mit abnormalen ACTH Werten, klinischen Depressionen, psychischem Stress und verschiedenen physiologischen Stressfaktoren, wie Hypoglykämie, Fieber, Trauma, Operationen, Angst oder Schmerzen, gemessen.

2 TESTPRINZIP

Der DEMEDITEC Cortisol free in Saliva ELISA ist ein Festphasen-Enzymimmunoassay, der auf dem Prinzip der kompetitiven Bindung basiert.

Die Vertiefungen der Mikrotiterplatten sind mit einem polyklonalen Kaninchen Antikörper beschichtet, der gegen das Cortisol-Molekül gerichtet ist. Die Proben werden in die beschichteten Vertiefungen 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 Vertiefungen.

Das nicht gebundene Konjugat wird durch Waschen der Vertiefungen 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 Mikrotiterplatten-Lesegerät gemessen.

3 VORSICHTSMAßNAHMEN

1. Dieser Kit ist nur zum in vitro diagnostischen Gebrauch geeignet und sollte nur von medizinischem Fachpersonal durchgeführt werden.
2. Lesen Sie vor dem Testansatz sorgfältig die Packungsbeilage. Verwenden Sie nur die gültige, im Testkit enthaltene Arbeitsanleitung.
3. Die Mikrotiterplatte enthält teilbare einzeln brechbare Mikrotiterstreifen. Unbenutzte Mikrotiterstreifen sollten im verschlossenen Folienbeutel bei 2 – 8°C aufbewahrt werden und im mitgelieferten Rahmen verwendet werden.
4. Proben und Reagenzien sollten so schnell wie möglich und in einer gleichbleibenden Sequenz pipettiert werden.
5. Verwenden Sie für jedes Reagenz einen separaten Pipettenaufsatz. Das gilt besonders für die Substrat-Lösung. Wenn der Pipettenaufsatz der Substrat-Lösung vorher z.B. für das Konjugat verwendet wurde, kommt es zu einem Farbumschlag der Substrat-Lösung. Gießen Sie Reagenzien nie zurück ins Fläschchen, da so Reagenz-Kontaminationen verursacht werden können.
6. Mischen Sie den Inhalt der Mikrotiterplatte sorgfältig, um gute Testergebnisse zu gewährleisten. Mikrotiterplatten nicht wiederverwenden!
7. Mikrotiterstreifen nicht austrocknen lassen während des Testlaufes. Nach jedem Waschschrift zügig im Testprotokoll fortfahren.
8. Bringen sie die Reagenzien vor dem Ansetzen des Tests auf Raumtemperatur (21-26°C).

9. Nicht mit dem Mund pipettieren und den Kontakt von Kitbestandteilen und Proben mit Haut und Schleimhäuten vermeiden.
10. In den Bereichen, in denen Proben oder Kitbestandteile verwendet werden, nicht rauchen, essen oder Kosmetika verwenden.
11. Beim Umgang mit Proben oder Reagenzien Einweg-Latexhandschuhe tragen. Die Verunreinigung von Reagenzien oder Proben mit Mikroben kann zu falschen Ergebnissen führen.
12. Der Gebrauch sollte in Übereinstimmung mit den Verfahren erfolgen, welche durch eine nationale Gefahrenstoff-Sicherheitsrichtlinie festgelegt sind.
13. Reagenzien nicht nach dem auf dem Kit-Etikett angegebenen Verfallsdatum verwenden.
14. Alle im Kit-Protokoll angegebenen Mengen müssen genau eingehalten werden. Optimale Ergebnisse können nur durch Verwendung kalibrierter Pipetten und Mikrotiterplatten-Lesegeräte erreicht werden.
15. Komponenten von Kits mit unterschiedlichen Lotnummern nicht untereinander vertauschen oder mischen. Es wird empfohlen, keine Vertiefungen 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 Bindungscharakteristika der Platten leicht unterschiedlich ausfallen.
16. Der Kontakt mit der Stopp Lösung sollte vermieden werden, da sie Hautreizungen und Verbrennungen verursachen kann.
17. Die Entsorgung aller Bestandteile sollte gemäß der Vorschriften einer entsprechenden nationalen Gefahrenstoff-Sicherheitsrichtlinie erfolgen.
18. Informationen zu im Kit enthaltenen gefährlichen Substanzen entnehmen Sie bitte dem Materialsicherheitsdatenblatt. Materialsicherheitsdatenblätter für dieses Produkt sind auf Anfrage direkt von der Firma Demeditec Diagnostics GmbH erhältlich.

4 BESTANDTEILE DES KITS

4.1 Kitinhalt

1. **SORB MT Mikrotiterplatte**, 12 x 8 (einzeln brechbare) Mikrotiterstreifen mit 96 Vertiefungen; mit anti-Cortisol-Antikörper (polyklonal) beschichtet.
2. **CAL 0 Standard 0**, 1 Fläschchen, 2.0 ml, gebrauchsfertig
3. **CAL 1-5 Standard (Standard 1-5)**, 5 Fläschchen, je 0,5 ml, gebrauchsfertig;
Konzentrationen: 0.1 - 0.4 - 1.7 – 7.0 – 30 ng/ml
4. **CONTROL 1-2 Kontrolle hoch / Kontrolle niedrig**, 2 Fläschchen, je 0,5 ml, gebrauchsfertig;
Kontrollwerte und –bereiche entnehmen Sie bitte dem QC-Datenblatt.
5. **ENZ CONJ Enzymkonjugat**, 1 Fläschchen, 7.0 ml, gebrauchsfertig;
Cortisol mit Meerrettichperoxidase konjugiert.
6. **SUB TMB Substratlösung**, 1 Fläschchen, 22 ml, gebrauchsfertig;
Tetramethylbenzidine (TMB).
7. **STOP SOLN Stopplösung**, 1 Fläschchen, 7.0 ml, gebrauchsfertig;
Enthält 2 N saure Lösung.
8. **WASH SOLN 10x Waschlösung, 10X** konzentriert, 1 Fläschchen, 50 ml;
Siehe „Vorbereitung der Reagenzien“.

Alle Reagenzien enthalten Konservierungsmittel, die frei sind von Aziden und Quecksilber.

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

4.2 Nicht im Kit enthaltene aber erforderliche Geräte und Materialien

- Mikrozentrifuge
- Kalibriertes Mikrotiterplatten-Lesegerät mit 450±10 nm Filter
- Mikrotiterplattenmischer, 600-900rpm, optional
- Vortex Mixer
- Kalibrierte variable Präzisions-Mikropipette (50 µl, 100 µl, 200 µl)
- Saugfähiges Papier
- Aqua dest.
- Zeitnahmegerät
- Semilogarithmisches Papier

4.3 Lagerung und Haltbarkeit des Kits

Die ungeöffneten Reagenzien sind bei einer Lagertemperatur von 2-8°C bis zum Verfallsdatum haltbar. Die Reagenzien sollten nach überschreiten des Verfallsdatums nicht mehr verwendet werden.

Nach dem Öffnen sollten alle Reagenzien bei 2-8°C gelagert werden. Die Mikrotiterwells sollten bei 2-8°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 Vertiefungen sollen vor dem Gebrauch auf Raumtemperatur gebracht werden.

Waschlösung

Die 10-fach konzentrierte Waschlösung (50 ml) mit 450 ml destilliertem Wasser auf ein Gesamtvolumen von 500 ml verdünnen. *Die verdünnte Waschlösung ist bei Raumtemperatur für 3 Monate 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 Material Sicherheitsdatenblatt.

4.6 Beschädigte Testkits

Im Falle einer starken Beschädigung des Testkits oder der Komponenten muss die Firma DEMEDITEC 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

Proben, die Natriumazid enthalten, sollten nicht verwendet werden. Die Proben sollten vollkommen farblos sein; zumindest darf auch nur eine geringfügige Rotfärbung nicht erkennbar sein. Eine Rotfärbung wird bei dieser Bestimmungsmethode immer einen zu hohen Wert ergeben. Bereits die geringste rötliche Färbung sollte Anlass dafür sein, dass der Patient die Probe verwirft, 10 Minuten wartet und dann eine neue Probe nimmt. Während der Sammelperiode darf nichts gekaut werden. Jeder erhöhte Druck auf die Zähne kann zu unerwünschten Einschwemmungen von (unsichtbaren) Blutbestandteilen und damit erhöhten Messwerten führen.

5.1 Probenentnahme

Für die korrekte Speichelsammlung empfehlen wir geeignete Sammelgefäße aus ultra reinem Polypropylen zu verwenden. Salivetten oder andere PE enthaltende Behältnisse sind zum Sammeln von Speichelproben für diesen Test ungeeignet. Glasgefäße dagegen sind durchaus geeignet; hier muss allerdings darauf geachtet werden, dass der verwendete Stopfen keine Interferenzen zeigt, was bei PE-Stopfen aber zu erwarten ist.

Da die Sekretion des Cortisol einen signifikanten Tagesrhythmus zeigt, ist dies bei der Sammelstrategie zu berücksichtigen. In den ersten 2 Stunden nach der normalen Aufwachzeit des Patienten zeigt sich im Regelfall ein relativ steiler Morgenpeak der Cortisolsekretion. Es ist wichtig zu beachten, dass die Lage dieses Peaks ausschließlich von den Aufstehgewohnheiten des Patienten und nicht von der absoluten Tageszeit abhängt. Die normale Aufstehzeit der letzten 10 Tage bestimmt die Lage dieses Maximums. Ein regelmäßiger Tagesablauf ist in jedem Falle förderlich für die Ausbildung eines Morgenpeaks. Die Lage des Morgenpeaks ist nicht abhängig von der Uhrzeit oder von der Lichteinstrahlung. Falls der Patient in den letzten Tagen mehrere Zeitzonen übersprungen hat, sollte mit der Probennahme lieber 10 Tage abgewartet werden. Um den Morgenpeak zu erfassen, sollten die Speichelproben innerhalb eines Zeitrahmens von 2 Stunden nach der durchschnittlichen Aufwachzeit genommen werden (z.B. 1 min, 30 min, 60 min, 90 min, und 120 min. nach der normalen Aufstehzeit). Während dieser Sammelperiode soll der Patient möglichst nüchtern bleiben, darf aber Wasser in beliebigen Mengen trinken. Falls erforderlich kann der Patient auch kleinere Mengen vegetarischer Kost während der Sammelperiode zu sich nehmen, sollte danach aber den Mund gut ausspülen. Eine derartige kleinere Nahrungsaufnahme sollte unmittelbar nach der Speichelentnahme getan werden, um den Abstand zur nächsten Speichelentnahme möglichst groß werden zu lassen.

Wenn keine anderslautende Anforderung dem Labor übermittelt wird, bestimmt das Labor dann aus diesen 5 Proben einen Mittelwert. Die Strategie einer Mittelwert-Bestimmung ist erforderlich, da es auch tagsüber oder abends zu signifikanten Ausschlägen in der Cortisolsekretion kommen kann, die bei einer Einzelbestimmung einen Zufallswert ergeben würden.

Es ist zu beachten, dass nach starker körperlicher Anstrengung eine zusätzliche Erhöhung der Cortisolkonzentration auftritt und zwar vorwiegend in der Erholungsphase. Falls ein Morbus Cushing ausgeschlossen werden soll, empfehlen wir die Entnahme einer Mehrfachprobe (bestehend aus 5 Einzelproben) innerhalb eines Zeitfensters von 2 Stunden am späten Abend.

Wenn für ein Tagesprofil lediglich 5 Probengefäße zur Verfügung stehen, kann man auch damit ein Tagesprofil erstellen. Dazu nimmt man morgens nur 3 Proben (30 min, 60 min, und 90 min nach der normalen Aufwachzeit) und am späten Abend 2 Proben vor dem Schlafengehen im Abstand von ca. 30 Minuten.

5.2 Probenaufbewahrung und Vorbereitung

Die Proben können falls erforderlich mehrere Tage bei Raumtemperatur aufbewahrt werden. Daher kann ein Versand per Post problemlos und ohne Kühlung erfolgen. Eine Aufbewahrung bei 4°C ist aber vorzuziehen und kann bis zu einem Monat lang vorgenommen werden. Wenn immer möglich sollte man aber die Proben sicherheitshalber bei -20°C aufbewahren, wobei mehrfache Gefrier- und Auftauzyklen unbedenklich sind. Grundsätzlich muss jede Speichelprobe zumindest einmal einen Gefrier- und Auftauzyklus durchlaufen, um die Mucine durch Zentrifugation entfernen zu können. Daher sollten die Speichelproben nach der Ankunft im Labor erst einmal eingefroren werden. Zur eigentlichen Messung der Hormonkonzentration werden dann alle Speichelproben wieder aufgetaut und 5 bis 10 Minuten lang zentrifugiert. Der Überstand sollte nun klar und farblos sein. Schon bei der leichtesten Rotfärbung sollte die Probe verworfen und eine neue Probe angefordert werden. Auch nur leicht rötlich gefärbte Proben zeigen immer zu hohe Konzentrationswerte. Wegen der episodischen Sekretionsmuster sollten in der Routine immer Mehrfachproben eingesetzt werden (siehe oben). Die 5 zu einer Abnahmeserie gehörenden Proben werden wie oben beschrieben vorbereitet. Anschließend werden Aliquots aus jeder Einzelprobe in einem separaten Probengefäß gemischt. Aus dieser Mischung wird dann die eigentliche Messung vorgenommen. Zur Ermittlung der genauen Lage des Morgenpeaks werden dagegen die Konzentrationen der einzelnen Proben bestimmt. Falls lediglich das Vorhandensein eines Morgenpeaks von Interesse ist, sollte aus den 5 Einzelproben, die am frühen Morgen gewonnen wurden, ebenfalls wie oben beschrieben eine Mischprobe hergestellt werden.

5.3 Probenverdünnung

Wenn in einem ersten Testdurchlauf bei einer Probe eine höhere Konzentration 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 Vertiefungen 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

Jede Messreihe muss eine Standardkurve beinhalten.

1. Die benötigte Anzahl Vertiefungen in der Halterung befestigen.
2. **Je 50 µl Standard, Kontrolle und Probe** mit neuen Plastikspitzen in die entsprechenden Vertiefungen geben.
3. **50 µl Enzymkonjugat** in jede Vertiefung geben.
Für 10 Sekunden gut schütteln. Es ist sehr wichtig, in diesem Schritt eine komplette Durchmischung zu erreichen.
4. **60 Minuten** bei Raumtemperatur inkubieren. Gleichzeitiges Bewegen der Platte während der Inkubation auf einem Horizontalschüttler verbessert die Sensitivität des Systems signifikant, ist aber nicht unbedingt erforderlich.
5. Den Inhalt der Vertiefungen kräftig ausschütteln. Vertiefungen **4mal** mit verdünnter Waschlösung (300 µl pro Vertiefung) waschen. Verbleibende Flüssigkeit durch Ausklopfen der Vertiefungen auf saugfähigem Papier entfernen.
Achtung: Die Sensitivität und Präzision dieses Tests wird erheblich beeinflusst von der korrekten Durchführung des Waschschrilles!
6. **200 µl Substratlösung** in jede Vertiefung geben.
7. **30 Minuten** bei Raumtemperatur inkubieren.
8. Die enzymatische Reaktion durch Zugabe von **50 µl Stopplösung** in jede Vertiefung beenden.
9. Die Optische Dichte bei **450±10 nm** mit einem Mikrotiterplatten-Lesegerät innerhalb von **15 Minuten** nach Zugabe der Stopplösung bestimmen.

6.3 Ergebnisermittlung

1. Die durchschnittlichen Werte der Optischen Dichte (OD) für jedes Set von Standards, Kontrollen 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 DEMEDITEC ELISA gezeigt. Diese Werte sollten nicht zur Berechnung von Patientendaten verwendet werden.

Standard		Optische Dichte (450 nm)
Standard 0	0.0 ng/ml	2.347
Standard 1	0.1 ng/ml	2.011
Standard 2	0.4 ng/ml	1.512
Standard 3	1.7 ng/ml	0.848
Standard 4	7.0 ng/ml	0.462
Standard 5	30.0 ng/ml	0.187

7 ERWARTETE WERTE

Zur Ermittlung der Normalbereiche von freiem Cortisol in Speichel, wurden Speichelproben von gesunden erwachsenen Männern und Frauen mit dem Demeditec Cortisol free in Saliva ELISA gemessen. Diese Studie ergab folgende Bereiche:

Tageszeit	5-95% Perzentile (ng/ml)	n
Morgens	1 – 11,3	234
Mittags	0,3 – 5,7	427
Nachmittags	0,3 – 3,3	129
Abends	0,2 – 2,7	419
Mitternacht	< 1,0	26

Nur alleine auf den Ergebnissen basierend sollten keine therapeutischen Konsequenzen getroffen werden. Es sind immer andere klinische Beobachtungen mit einzubeziehen.

Da der Cortisolspiegel relativ starken episodischen Schwankungen unterliegt, empfehlen wir eine Probensammlung mehrerer Proben am Morgen und am Abend. Die Differenz zwischen dem Morgen- und dem Abendwert ist ein wichtiger Parameter.

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

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 Tests 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 DEMEDITEC in Verbindung.

9 ASSAY CHARACTERISTIKA

9.1 Analytische Sensitivität

Die analytische Sensitivität, definiert als Mittelwert minus der zweifachen Standardabweichung des Standards 0 (n = 20), beträgt 0.024 ng/ml.

9.2 Spezifität der Antikörper (Kreuzreaktivität)

Die Daten entnehmen Sie bitte der ausführlichen englischen Arbeitsanleitung.

9.3 Messbereich

Der Messbereich des Testes liegt zwischen 0,024 – 30 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

Zuverlässige und reproduzierbare Ergebnisse können nur erzielt werden, wenn der Testansatz mit vollstem Verständnis der Packungsbeilage und unter Einhaltung der guten Laborpraxis durchgeführt wird. 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 der Cortisolkonzentration 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 DEMEDITEC 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

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

SYMBOLS USED WITH DEMEDITEC ELISA'S

Symbol	English	Deutsch	Français	Espanol	Italiano
	European Conformity	CE-Konformitätskennzeichnung	Conforme aux normes européennes	Conformidad europea	Conformità europea
	Consult instructions for use	Gebrauchsanweisung beachten	Consulter les instructions d'utilisation	Consulte las Instrucciones	Consultare le istruzioni per l'uso
	In vitro diagnostic device	In-vitro-Diagnostikum	Ussage 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	Número 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	Placas multipocillo	Micropozzetti
<i>Antiserum</i>	Antiserum	Antiserum	Antisérum	Antisuero	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 parada	Soluzione d'arresto
<i>Zero Standard</i>	Zero Standard	Nullstandard	Standard 0	Estándar 0	Standard zero
<i>Standard</i>	Standard	Standard	Standard	Estándar	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>Sample Diluent</i>	Sample Diluent	Probenverdünnungsmedium	Solution pour dilution de l'échantillon	Solución para dilución de la muestra	Diluyente dei campioni
<i>Conjugate Diluent</i>	Conjugate Diluent	Konjugatverdünnungsmedium	Solution pour dilution du conjugué	Solución para dilución del conjugado	Diluyente del tracciante

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