

# Product information

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



# Cortisol free in Saliva ELISA



**DES6611**



**96**



Demeditec Diagnostics GmbH  
Lise-Meitner-Strasse 2  
24145 Kiel – Germany  
[www.demeditec.com](http://www.demeditec.com)

## CONTENTS / INHALTSVERZEICHNIS

1	INTRODUCTION .....	3
2	PRINCIPLE .....	3
3	WARNINGS AND PRECAUTIONS .....	3
4	REAGENTS .....	4
5	SPECIMEN COLLECTION AND PREPARATION .....	5
6	ASSAY PROCEDURE .....	6
7	EXPECTED NORMAL VALUES .....	7
8	QUALITY CONTROL .....	8
9	PERFORMANCE CHARACTERISTICS .....	8
10	LIMITATIONS OF PROCEDURE .....	10
11	LEGAL ASPECTS .....	10
12	REVISION HISTORY OF INSTRUCTION FOR USE .....	11
13	REFERENCES .....	11
1	EINLEITUNG .....	13
2	TESTPRINZIP .....	13
3	WARNUNGEN UND VORSICHTSHINWEISE .....	13
4	BESTANDTEILE DES KITS .....	15
5	PROBENVORBEREITUNG .....	16
6	TESTDURCHFÜHRUNG .....	17
7	ERWARTETE WERTE .....	18
8	QUALITÄTSKONTROLLE .....	18
9	ASSAY CHARACTERISTIKA .....	18
10	GRENZEN DES TESTS .....	19
11	RECHTLICHE GRUNDLAGEN .....	19
12	ÄNDERUNGSHISTORIE DER ARBEITSANLEITUNG .....	20
13	REFERENZEN .....	20

## 1 INTRODUCTION

### 1.1 Intended Use

Enzyme immunoassay for the quantitative determination of active free cortisol in human saliva. The assay is intended for *in-vitro* diagnostic use by professional users only. All therapeutic consequences must take not only the test result but always also all clinical and laboratory diagnostic results into account. The laboratory values themselves must never be the sole reason for therapeutic consequences derived from them. Manual processing is recommended. The usage of laboratory automats is the user's sole responsibility. The kit is intended for single use only.

### 1.2 Description of the analyte

Cortisol (hydrocortisone) is the major glucocorticoid produced in the adrenal cortex. Cortisol is a potent stress hormone and the secretion is regulated by the Hypothalamic-Pituitary-Adrenal-axis (HPA-axis). The secretion of cortisol has a specific circadian rhythm with a curve presenting a sharp peak in the early morning and a gradually decrease over the day with a nadir in the evening (7). The position of this peak-value is strongly influenced by the average wake-up time during the past weeks. It is not 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).

The loss of circadian rhythm with absence of a late-night cortisol nadir is a consistent abnormality in patients with Cushing's syndrome. This difference forms the basis for measurement of late-night salivary cortisol (4).

Studies show that salivary cortisol concentration reflects the serum unbound cortisol concentration throughout the physiological concentration range (7, 8, 9). In serum, 90-95% of cortisol is bound to protein while in saliva cortisol appears mainly in its free, metabolic active form. The salivary cortisol concentration is independent of saliva flow rate as well as of the serous and mucous content (9). Spontaneous increases in cortisol concentration during the day may occur commonly due to stress or food intake. 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, or pain.

## 2 PRINCIPLE

The **DEMEDITEC 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. The samples are dispensed in the coated wells and incubated with the enzyme conjugate (cortisol conjugated to horseradish peroxidase). During incubation endogenous cortisol of a patient sample competes with the enzyme conjugate for binding to the coated antibody. The unbound conjugate is removed by washing the wells.

Subsequently, the substrate solution is added and the color development is stopped after a defined time. The intensity of the color formed is inversely proportional to the concentration of cortisol in the sample. The optical density (OD) is measured at 450 nm with a microtiter plate reader. A calibrator curve is constructed by plotting OD values against concentrations of standards, and concentrations of unknown samples are determined using this standard curve.

## 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 break apart strips. Unused wells must be stored at 2-8°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 coloured. 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 (18-25°C) before starting the test. Temperature will affect the absorbance readings of the assay.

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. Some reagents contain Proclin 300, CMIT and MIT as preservatives. In case of contact with eyes or skin, flush immediately with water.
18. Chemicals and prepared or used reagents have to be treated as hazardous waste according to the national biohazard safety guideline or regulation.
19. For information please refer to Material Safety Data Sheets. Safety Data Sheets for this product are available upon request directly from Demeditec Diagnostics GmbH or on Demeditec homepage ([www.demeditec.com](http://www.demeditec.com)).
20. All serious incidents occurring in relation to products made available on the EU market in accordance with Article 2(61) of Regulation (EU) 2017/746 shall be notified to the manufacturer and to the competent authority of the Member State where the user or patient is established in accordance with Article 82 of Regulation (EU) 2017/746.
21. If product information, including labeling, is incorrect or inaccurate, please contact the kit manufacturer or supplier.

## 4 REAGENTS

### 4.1 Reagents provided

1. **SORB | MT** **Microtiter Plate**, 12x8 (break apart) strips, 96 wells; wells coated with rabbit 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. Buffer matrix spiked with defined concentration of cortisol.  
Concentrations: 0.1 - 0.4 - 1.7 - 7.0 - 30 ng/ml  
Conversion factor: 1 ng/ml = 2.76 nmol/l
4. **CONTROL | 1-2** **Control 1 (low) / Control 2 (high)**, 2 vials, 0.5 ml each, ready to use. Buffer matrix spiked with defined concentration of cortisol.  
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 hydrochlorid acid.  
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“.

### 4.2 Material required but not provided

- Microcentrifuge
- A calibrated microtiter plate reader (450 nm)
- Microplate mixer operating at 900 rpm
- Manual or automatic equipment for microtiter plate washing
- Vortex mixer
- Calibrated variable precision micropipettes and multichannel pipettes with disposable pipette tips
- Absorbent paper
- Distilled or deionized water
- Timer
- Semi logarithmic graph paper or software for data reduction

### 4.3 Storage conditions

When stored at 2-8°C unopened reagents will be stable until expiration date. Do not use reagents beyond this date. Opened reagents must be stored at 2-8°C. After first opening the reagents are stable for 30 days if used and stored properly. Keep away from heat and direct sunlight. Microtiter wells must be stored at 2-8°C. Take care that the foil bag is sealed tightly.

### 4.4 Preparation of reagents

Allow the reagents and the required number of wells to reach room temperature (18-25°C) before starting the test.

### Wash Solution

Dilute 50 ml of 10X concentrated *Wash Solution* with 450 ml deionized water to a final volume of 500 ml. The diluted Wash Solution is stable for at least 12 weeks at room temperature (18-25°C). Precipitates may form when stored at 2-8°C, which should dissolve again by swirling at room temperature (18-25°C). The Wash Solution should only be used when the precipitates have completely dissolved.

### 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 must 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 result in 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. Chewing anything during the sampling period must be avoided. 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 recommend to only use appropriate devices made from ultra-pure polypropylene (PP). Do not use any PE devices or Salivettes for sampling; in most cases this 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.

As the Cortisol secretion in saliva as well as in serum shows an obvious secretion pattern throughout the day, it is important to care for a proper sample timing of the sampling. In order to avoid arbitrary results it is recommended to always collect five samples within a period of two hours (multiple sampling) preferably before a meal. The morning peak normally appears during the first two hours after the average wake-up time. Therefore it is recommended to take five separate samples within a period of two hours (multiple sampling) directly after the usual wake-up time (e.g. 1 min, 30 min, 60 min, 90 min and 120 min). It is important to know that the timing of the morning peak is not related to the absolute time or day light. It is just related to the wake-up habits of the patient. If possible the volume of each single sample should be a minimum of 0.5 ml (better 1 ml).

As food might contain significant amounts of steroid hormones samples should be taken preferably while fasting. Do not collect samples within 60 minutes after eating a major meal, 12 hours after consuming alcohol or 60 minutes after brushing teeth. Rinse mouth with water 10 minutes prior to specimen collection. Furthermore please avoid any strenuous physical exercises and intense stress situations.

### 5.2 Specimen Storage and Preparation

Saliva samples may be stored at 2-8°C for up to one week. For longer storage, it is recommended to store the samples at ≤-20°C. Whenever possible samples preferably should be kept at a temperature of ≤-20°C. Avoid multiple freeze-thaw cycles.

Each sample has to be frozen, thawed, and centrifuged at least once in order to precipitate and separate the mucins. Upon arrival of the samples in the lab the samples have to be stored frozen at least overnight. In the next morning the frozen samples are thawed, brought to room temperature and mixed carefully. Then the samples have to be centrifuged for five to ten 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 cortisol secretion the strategy of multiple sampling is highly recommended. 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 five 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 five morning samples have to be tested separately.

### 5.3 Specimen Dilution

If in an initial assay a specimen is found to contain more cortisol than the highest calibrator, the specimens must 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.

## 6 ASSAY PROCEDURE

### 6.1 General remarks

- All reagents and specimens must be allowed to come to room temperature (18-25°C) 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 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 equally 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.
- Duplicate determination of calibrators, controls and samples is recommended in order to identify potential pipetting errors.
- Microtiter plate washing is important. Improperly washed wells will give erroneous results. It is recommended to use a multichannel pipette or a multistepper, or an automatic microtiter plate washing system. Do not allow the wells to dry between incubations. Do not scratch coated wells during rinsing and aspiration. Rinse and fill all reagents with care. While rinsing, check that all wells are filled precisely with wash solution, and that there are no residues in the wells.
- A calibrator curve must be established for every run

### 6.2 Assay procedure

1. Secure the desired number of coated strips in the frame holder.
2. Dispense **50 µl** of each **Calibrator**, **Control** and **Sample** in duplicates with new disposable tips into appropriate wells.
3. Dispense **50 µl** of **Enzyme Conjugate** into each well.
4. Incubate for **60 minutes** at room temperature (18-25°C) on a plate shaker (900 rpm).
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** without shaking in the dark at room temperature (18-25°C).
8. Stop the enzymatic reaction by adding **50 µl** of **Stop Solution** to each well.
9. Determine the optical density (OD) of each well at **450 nm** within 15 minutes after adding the Stop Solution.

### 6.3 Calculation of results

1. Calculate the average optical density values for each set of calibrators, controls, and patient samples.
2. The obtained OD of the standards (y-axis, linear) are plotted against their concentration (x-axis, logarithmic) either on semi-logarithmic paper or using an automated method.
3. Using the mean absorbance value for each sample determine the corresponding concentration from the standard curve.
4. Automated method: The results in this instruction for use 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 Density (450 nm)
Calibrator 0	0.0 ng/ml	3.099
Calibrator 1	0.1 ng/ml	2.647
Calibrator 2	0.4 ng/ml	1.932
Calibrator 3	1.7 ng/ml	0.856
Calibrator 4	7 ng/ml	0.357
Calibrator 5	30 ng/ml	0.172

## 7 EXPECTED NORMAL VALUES

Because of differences, which may exist between laboratories and location with respect to population, laboratory technique and selection of reference group, it is important for each laboratory to determine its own normal and pathological values and to establish the appropriateness of adopting the reference range suggested here.

Time of day	5 - 95. percentile (ng/ml)	n
Morning	1.6 – 9.2	234
Midday	0.9 - 6.9	427
Afternoon	0.6 - 3.6	129
Evening	0.4 - 3.9	419
Midnight	< 1.2	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 collect a series of samples in the morning and another sample in the evening. The difference between morning and evening is an important parameter.

## 8 QUALITY CONTROL

Good laboratory practice requires that controls are 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 kit control values and the corresponding results are stated in the QC certificate added to the kit. The values and ranges stated at 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, microtiter plate reader, 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 Cortisol free in Saliva ELISA was calculated by subtracting two standard deviations from the mean of twenty (20) replicate analyses of *Calibrator 0*. The analytical sensitivity of the assay is 0.019 ng/ml.

### 9.2 Specificity (Cross Reactivity)

The following materials have been evaluated for cross reactivity.

Steroids	% Crossreactivity
Testosterone	< 0.1
Corticosterone	6.2
Cortisone	0.8
11-Deoxycorticosterone	2.6
11-Deoxycortisol	50
Dexamethasone	< 0.1
Estriol	< 0.1
Estrone	< 0.1
Prednisolone	100
Prednisone	0.9
Progesterone	< 0.1
17-Hydroxyprogesterone	1.3
Danazole	< 0.1
Pregnenolone	< 0.1
Estradiol	< 0.1
Androstenedione	< 0.1

### 9.3 Assay Dynamic Range

The range of the assay is between 0.1 - 30 ng/ml.



## 9.4 Reproducibility

### 9.4.1 Intra-Assay

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

	Sample 1	Sample 2	Sample 3
<b>Mean (ng/ml)</b>	0.64	2.01	4.87
<b>SD (ng/ml)</b>	0.05	0.08	0.21
<b>CV (%)</b>	7.1	4.1	4.3
<b>n =</b>	20	20	20

### 9.4.2 Inter-Assay

The inter-assay variation was determined by duplicate measurements of three saliva samples in ten different runs using the Demeditec Cortisol free in Saliva ELISA. The inter-assay variation is shown below:

	Sample 1	Sample 2	Sample 3
<b>Mean (ng/ml)</b>	0.65	2.05	5.31
<b>SD (ng/ml)</b>	0.03	0.15	0.48
<b>CV (%)</b>	4.2	7.5	9.1
<b>n =</b>	10	10	10

## 9.5 Recovery

Recovery of the Demeditec Cortisol free in Saliva 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	Measured Concentration (ng/ml)	Expected Concentration (ng/ml)	Recovery %
1	native	0.53	-	-
	3 ng/mL	3.35	3.53	95%
	5 ng/mL	6.57	5.53	119%
	7 ng/mL	8.31	7.53	110%
2	native	0.54	-	-
	3 ng/mL	3.52	3.54	99%
	5 ng/mL	7.02	5.54	126%
	7 ng/mL	8.61	7.54	114%
3	native	0.82	-	-
	3 ng/mL	3.51	3.82	92%
	5 ng/mL	6.32	5.82	108%
	7 ng/mL	9.15	7.82	117%

## 9.6 Linearity

Three saliva samples containing different amounts of analyte were serially diluted with Calibrator 0 and assayed with the Demeditec Cortisol free in Saliva ELISA. The percentage linearity was calculated by comparing the expected and measured values for cortisol.

Saliva	Dilution	Measured Concentration (ng/ml)	Expected Concentration (ng/ml)	Linearity %
1	native	4.13	-	-
	1 in 2	2.04	2.07	99%
	1 in 4	1.07	1.03	104%
	1 in 8	0.60	0.52	115%
2	native	4.13	-	-
	1 in 2	2.26	2.07	109%
	1 in 4	1.24	1.03	120%
	1 in 8	0.66	0.52	127%
3	native	4.48	-	-
	1 in 2	2.32	2.24	104%
	1 in 4	1.33	1.12	119%
	1 in 8	0.65	0.56	116%

## 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 GLP (Good Laboratory Practice). Any improper handling of samples or modification of this test might influence the results.

### 10.1 Interfering Substances

- Blood contamination in saliva samples will affect results, and usually can be seen by eye. In case of visible blood contamination, the patient should discard the sample, rinse the sampling device with water, wait for 10 minutes and take a new sample.
- Samples containing sodium azide should not be used in the assay. This can cause false results.
- The result of any immunological test system may be affected by heterophilic antibodies, anti-species antibodies or rheumatoid factors present in human samples (11-13). For example, the presence of heterophilic antibodies in patients who are regularly exposed to animals or animal products may interfere with immunological tests. Therefore, interference with this in vitro immunoassay cannot be excluded. If unplausible results are suspected, they should be considered invalid and verified by further testing. For diagnostic purposes, results should always be considered only in conjunction with the patient's clinical picture and further diagnostic tests.

### 10.2 High-Dose Hook Effect

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

### 10.3 Drug Interferences

Any medication (cream, oil, pill etc) containing Cortisol of course will significantly influence the measurement of this analyte in saliva. The same is true for any medication containing Prednisolone. The clinical significance of the determination of cortisol can be affected if the patient was treated with natural or synthetic steroids. Any medication should be taken into account when assessing the results.

## 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 a sufficient number of controls within the test procedure for validating the accuracy and precision of the test.

The test results are only valid if all controls meet the specified ranges and 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 therapeutic consequences should 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 REVISION HISTORY OF INSTRUCTION FOR USE

Changes from the previous version 16a-03/21 to actual version 17-08/23

Cover page	Layout change
General	Editorial changes
Chapter 10.1 & 12	added
Updated information in chapter 1.1, 3, 4.2, 4.4, 5.1, 5.2, 6.1, 10.3, 13	

## 13 REFERENCES

1. Fleiner T., Zijlstra W, Dauth H., Haussermann P.  
Evaluation of a hospital-based day-structuring exercise programme on exacerbated behavioural and psychological symptoms in dementia – the exercise carousel: study protocol for a randomised controlled trial, *BioMedCentral* **2015** 16:228
2. De Steenwinkel F.D.O, Hokken-Koelega A.C.S, Hazes J.M.W, Dolhain R.J.E.M.  
The influence of foetal prednisone exposure on the cortisol level in the offspring  
*Clinical Endocrinology* **2014**, 80, 804-810
3. Balsalobre-Fernández C., Tjero-González C.M., del Campo-Vecino J.  
Relationships between Training Load, Salivary Cortisol Responses and Performance during Season Training in Middle and Long Distance Runners; *PLOS ONE* **2014**, Vol. 9, Issue 8
4. LK Nieman, BMK Biller, JW Findling, J Newell-Price, VM Montori  
The diagnosis of Cushing's syndrome: An Endocrine Society Clinical Practice Guideline  
*J. Clin. Endocrin. & Metabol.* **2008**, Vol.93, No.5, pages 1526-1540
5. Kirschbaum C., Hellhammer DH: Salivary cortisol in psychobiological Research: An overview,  
*Neuropsychobiology*, **1989**, 22, 150-169
6. Kirschbaum C, Hellhammer Dh.  
Salivary cortisol in psychoneuroendocrine Research: Recent developments and applications,  
*Psychoneuroendocrinology* **1994**, 19, pp 313-333
7. Vining RF, et al., Salivary cortisol: a better measure of adrenal cortical function than serum cortisol, *Ann Clin Biochem*, **1983**, 20, 329-335
8. L.D. Dorn, J.F. Lucke, T.L. Loucks, S.L. Berga  
Salivary Cortisol reflects serum Cortisol: Analysis of circadian profiles.  
*Ann Clin Biochem* **2007** Vol. 44, pages 281-284
9. Aardal E. and Holm AC  
Cortisol in Saliva – Reference Ranges and Relation to Cortisol in Serum  
*Eur. J. Clin. Chem. Clin. Biochem.* (**1995**), 33:927-932
10. Garde A.H. and Hansen A.M.  
Long-term stability of salivary cortisol  
*Scand J Clin Lab Invest* **2005**; 65:433-436
11. Marks V.  
False-Positive Immunoassay Results: A Multicenter Survey of Erroneous Immunoassay Results from Assays of 74 Analytes in 10 Donors from 66 Laboratories in Seven Countries  
*Clinical Chemistry* **2002**, 48:11: 2008-2016
12. Tate J. & Ward G.  
Interferences in Immunoassays,  
*Clin. Biochem Rev* Vol 25, May **2004**

13. Selby C.  
Interference in Immunoassays;  
Ann. Clin. Biochem **1999**, 36: 704-721

## 1 EINLEITUNG

### 1.1 Verwendungszweck

Enzymimmunoassay zur quantitativen Bestimmung von aktivem freiem Cortisol in humanem Speichel. Dieser Test ist nur für *in-vitro* diagnostische Anwendungen durch geschultes Laborpersonal bestimmt. Das Testergebnis muss immer alle klinischen und labordiagnostischen Ergebnisse berücksichtigen. Die Laborwerte selbst dürfen niemals der alleinige Grund für daraus abgeleitete therapeutische Konsequenzen sein. Die manuelle Abarbeitung wird empfohlen. Der darüberhinausgehende Einsatz von Laborautomaten liegt in der Verantwortung des Anwenders. Das Kit ist zum einmaligen Gebrauch bestimmt.

### 1.2 Beschreibung des Analyten

Cortisol (Hydrocortison) ist das wichtigste Glukokortikoid, das in der Nebennierenrinde produziert wird. Cortisol ist ein starkes Stresshormon und die Sekretion wird durch die Hypothalamus-Hypophysen-Nebennierenrinden-Achse (HPA-Achse) reguliert.

Die Sekretion von Cortisol hat einen spezifischen zirkadianen Rhythmus mit einer Kurve, die einen Höchstwert am frühen Morgen und einen allmählichen Rückgang über den Tag mit einem Tiefstwert am Abend darstellt (7). Der Zeitpunkt dieses Spitzenwertes wird stark von der durchschnittlichen Aufwachzeit der vergangenen Wochen beeinflusst. Sie ist unabhängig von der tatsächlichen Aufwachzeit des jeweiligen Tages der Probenahme, sofern diese von der durchschnittlichen Aufwachzeit der letzten Wochen abweicht.

Der Verlust des zirkadianen Rhythmus bei Abwesenheit eines späten Cortisol-Tiefstwertes ist eine Anomalie bei Patienten mit Cushing-Syndrom. Diese Differenz bildet die Grundlage für die Messung von Speichelcortisol (4).

Studien zeigen, dass die Cortisolkonzentration im Speichel die ungebundene Cortisolkonzentration im Serum über den gesamten physiologischen Konzentrationsbereich widerspiegelt (7, 8, 9). Im Serum ist Cortisol zu 90-95% an Proteine gebunden, während Cortisol im Speichel hauptsächlich in freier, metabolisch aktiver Form vorkommt. Die Cortisolkonzentration im Speichel ist unabhängig vom Speicheldurchfluss und vom Muzingehalt (9).

Spontane Erhöhungen der Cortisolkonzentration während des Tages können häufig durch Stress oder Nahrungsaufnahme bedingt sein. Veränderte Muster des Cortisolspiegels werden im Zusammenhang mit abnormalen ACTH-Spiegeln, klinischer Depression, psychischem Stress und verschiedenen physiologischen Stressfaktoren wie Hypoglykämie, Krankheit, Fieber, Trauma, Operation oder Schmerz beobachtet.

## 2 TESTPRINZIP

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

Die Wells der Mikrotiterplatten sind mit einem polyklonalen Kaninchen-Antikörper beschichtet, der gegen das Cortisol-Molekül gerichtet ist. Die Proben werden in die beschichteten Wells gegeben und zusammen mit einem Cortisol-Enzymkonjugat (Cortisol konjugiert mit dem Enzym Meerrettich-Peroxidase) inkubiert. Während der Inkubation konkurriert das Cortisol der Probe mit dem Cortisol-Enzymkonjugat um die freien Bindungsstellen der Antikörper. 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 zur Cortisolkonzentration in der Probe. Die Extinktion wird bei 450 nm mit einem Mikrotiterplatten-Lesegerät gemessen. Es wird eine Standardkurve erstellt, indem die OD-Werte gegen die Konzentrationen der Standards aufgetragen werden. Die Konzentrationen der unbekanntenen Proben werden anhand dieser Standardkurve bestimmt.

## 3 WARNUNGEN UND VORSICHTSHINWEISE

1. Dieses Kit ist nur zum *in-vitro*-diagnostischen Gebrauch geeignet und sollte nur von medizinischem Fachpersonal durchgeführt werden.
2. Vor der Testdurchführung muss die Arbeitsanleitung vollständig und sorgfältig gelesen werden und verstanden worden sein. Die gültige Version aus dem Kit verwenden.
3. Die Mikrotiterplatte enthält teilbare, einzeln brechbare Mikrotiterstreifen. Unbenutzte Mikrotiterstreifen müssen im verschlossenen Folienbeutel bei 2-8°C aufbewahrt werden und im mitgelieferten Rahmen verwendet werden.
4. Proben und Reagenzien müssen so schnell wie möglich und in einer gleichbleibenden Sequenz pipettiert werden.

5. Für jedes Reagenz einen separaten Behälter verwenden. Das gilt besonders für die Substratlösung. Wenn der Behälter der Substratlösung vorher z.B. für das Konjugat verwendet wurde, kommt es zu einem Farbumschlag der Substratlösung. Reagenzien nie zurück ins Fläschchen überführen, da so Reagenz-Kontaminationen verursacht werden können.
6. Den Inhalt der Mikrotiterplatte sorgfältig mischen, um gute Testergebnisse zu gewährleisten. Mikrotiterplatten nicht wiederverwenden!
7. Mikrotiterstreifen nicht austrocknen lassen während des Testlaufes. Nach jedem Waschschrift zügig im Testprotokoll fortfahren.
8. Reagenzien vor dem Testansatz auf Raumtemperatur (18-25°C) bringen. Die Temperatur hat einen Einfluss auf die Bestimmung der Optischen Dichte.
9. Nicht mit dem Mund pipettieren und Kontakt von Kitbestandteilen und Proben mit Haut und Schleimhäuten vermeiden.
10. In den Bereichen, in denen Proben oder Kitbestandteile verwendet werden, nicht rauchen, essen, trinken oder Kosmetika verwenden.
11. Beim Umgang mit Proben oder Reagenzien Einweg-Handschuhe 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 in der Packungsbeilage 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 austauschen oder mischen. Es wird empfohlen, keine Wells von verschiedenen Platten zu verwenden, auch nicht, wenn es sich um das gleiche Los 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 Stopplösung sollte vermieden werden, da sie Hautreizungen und Verätzungen verursachen kann.
17. Einige Reagenzien enthalten ProClin 300, CMIT und oder MIT als Konservierungsmittel. Bei Kontakt mit Augen oder Haut sofort mit Wasser spülen.
18. Die Reagenzien des Kits sind als gesundheitsgefährdende Abfälle zu betrachten und gemäß den nationalen Vorschriften zu entsorgen.
19. 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. Sie finden diese auch unter [www.demeditec.de](http://www.demeditec.de) zum Herunterladen.
20. Alle im Zusammenhang mit den Produkten, die auf dem EU-Markt bereitgestellt werden, auftretende schwerwiegende Ereignisse gemäß VERORDNUNG (EU) 2017/746 Artikel 2, Absatz 61 sind dem Hersteller und der zuständigen Behörde des Mitgliedstaates, in dem der Anwender oder Patient niedergelassen ist, gemäß VERORDNUNG (EU) 2017/746 Artikel 82 zu melden.
21. Sollten Produktinformationen, einschließlich Etikettierung falsch oder inkorrekt sein, bitte den Hersteller oder den Lieferanten des Kits kontaktieren.

## 4 BESTANDTEILE DES KITS

### 4.1 Kitinhalt

1. **SORB MT Mikrotiterplatte**, 12x8 (einzeln brechbare) Mikrotiterstreifen, 96 Wells; beschichtet mit polyklonalem Kaninchen anti-Cortisol-Antikörper.
2. **CAL 0 Standard 0**, 1 Fläschchen, 2,0 ml, gebrauchsfertig.  
**CAL 1-5 Standard (Standard 1-5)**, 5 Fläschchen, je 0,5 ml, gebrauchsfertig. Puffermatrix mit definierter Menge Cortisol.  
Konzentrationen: 0.1 - 0.4 - 1.7 - 7.0 - 30 ng/ml  
Umrechnung: 1 ng/ml = 2.76 nmol/l
3. **CONTROL 1-2 Kontrolle 1 (niedrig) / Kontrolle 2 (hoch)**, 2 Fläschchen, je 0,5 ml, gebrauchsfertig; Puffermatrix mit definierter Menge Cortisol; Kontrollwerte und Sollbereiche entnehmen Sie bitte dem QC-Datenblatt.
4. **ENZ CONJ Enzymkonjugat**, 1 Fläschchen, 7.0 ml, gebrauchsfertig; Cortisol mit Meerrettichperoxidase konjugiert.
5. **SUB TMB Substratlösung**, 1 Fläschchen, 22 ml, gebrauchsfertig; Tetramethylbenzidine (TMB).
6. **STOP SOLN Stopplösung**, 1 Fläschchen, 7,0 ml, gebrauchsfertig; Enthält 2 N Salzsäure. Kontakt mit der Stopplösung vermeiden! Kann Hautreizungen und Verbrennungen verursachen.
7. **WASH SOLN 10x Waschlösung**, 1 Fläschchen, 50 ml (10x konzentriert); Siehe „Vorbereitung der Reagenzien“.

### 4.2 Nicht im Kit enthaltene aber erforderliche Geräte und Materialien

- Mikrozentrifuge
- Kalibriertes Mikrotiterplatten-Lesegerät (450 nm)
- Mikrotiterplattenmischer (900rpm)
- Manuelle oder automatische Geräte zum Waschen von Mikrotiterplatten
- Vortex Mixer
- Kalibrierte variable Präzisions-Mikropipetten und Mehrkanalpipetten mit Einwegspitzen
- Saugfähiges Papier
- Aqua dest.
- Zeitnahmegerät
- Semilogarithmisches Papier oder Software zur Datenermittlung

### 4.3 Lagerung und Haltbarkeit des Kits

Die ungeöffneten Reagenzien behalten bei Lagerung um 2-8°C ihre Reaktivität bis zum Verfallsdatum. Nach dem Verfallsdatum die Reagenzien nicht mehr verwenden. Nach dem Öffnen sollten alle Reagenzien bei 2-8°C gelagert werden. Nach dem ersten Öffnen sind die Reagenzien bei sachgemäßer Abarbeitung und Lagerung 30 Tage stabil. Vor Hitze und direkter Sonneneinstrahlung schützen. Die Mikrotiterstreifen 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 Wells sollen vor dem Gebrauch auf Raumtemperatur (18-25°C) 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 (18-25°C) für mindestens 12 Wochen stabil.

Bei einer Lagerung bei 2-8°C können sich Präzipitate bilden, die sich durch Schwenken bei Raumtemperatur (18-25°C) wieder auflösen sollten. Die Waschlösung darf erst verwendet werden, wenn sich die Präzipitate komplett aufgelöst haben.

### 4.5 Entsorgung des Kits

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

#### 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

Natriumazidhaltige Proben sollten nicht verwendet werden. Die Proben sollten vollkommen farblos sein. Bereits eine geringfügige Rotfärbung deutet auf eine Blutkontamination hin, welche zu einem falsch erhöhten Testergebnis führt. Bei rötlicher Verfärbung sollte die Probe verworfen, der Mund mit Wasser ausgespült und nach zehn Minuten eine neue Probe genommen werden. 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, nur geeignete Gefäße aus hochreinem Polypropylen (PP) zu verwenden. Verwenden Sie zur Probenahme keine PE-Gefäße oder Salivetten; dies führt in den meisten Fällen zu erheblichen Störungen. Es können auch Glasgefäße verwendet werden. Hier muss allerdings darauf geachtet werden, dass der verwendete Stopfen keine Interferenzen zeigt. Da die Cortisol-Sekretion sowohl im Speichel als auch im Serum einen signifikanten Tagesrhythmus zeigt, ist es wichtig, für einen richtigen Zeitpunkt der Probenahme zu sorgen. Um arbiträre (willkürliche) Ergebnisse zu vermeiden, empfehlen wir stets fünf Proben in einem Zeitraum von zwei Stunden zu sammeln (mehrfache Probeentnahme). Der Morgenpeak tritt normalerweise in den ersten zwei Stunden nach der durchschnittlichen Aufwachzeit auf. Daher empfehlen wir, entsprechend fünf Einzelproben innerhalb von zwei Stunden direkt nach der üblichen Aufwachzeit (z.B. 1 min, 30 min, 60 min, 90 min und 120 min) zu entnehmen.

Die Lage des Morgenpeaks hängt nicht mit der absoluten Zeit oder dem Tageslicht zusammen, sondern ausschließlich mit den Aufwachgewohnheiten des Patienten. Wenn möglich, sollte das Volumen jeder einzelnen Probe mindestens 0,5 ml (besser 1 ml) betragen.

Da Lebensmittel erhebliche Mengen an Steroidhormonen enthalten können, sollten Proben vorzugsweise während des Fastens genommen werden. Proben sollten nicht innerhalb von 60 Minuten nach dem Verzehr einer größeren Mahlzeit, innerhalb von 12 Stunden nach Alkoholkonsum oder 60 Minuten nach dem Zähneputzen genommen werden. Den Mund zehn Minuten vor der Probenahme mit Wasser ausspülen. Anstrengende körperliche Übungen und intensive Stresssituationen vermeiden.

#### 5.2 Probenaufbewahrung und Vorbereitung

Eine Aufbewahrung der Speichelproben kann bis zu einer Woche bei 2-8°C vorgenommen werden. Für eine längere Aufbewahrung müssen die Proben bei  $\leq -20^{\circ}\text{C}$  aufbewahrt werden. Wenn immer möglich sollten die Proben sicherheitshalber bei  $\leq -20^{\circ}\text{C}$  aufbewahren. Multiple Gefrier- und Auftauzyklen sollten vermieden werden.

Grundsätzlich muss jede Speichelprobe zumindest einmal einen Gefrier- und Auftauzyklus durchlaufen, um die Muzine durch Zentrifugation und Präzipitation zu entfernen. Daher sollten die Speichelproben nach der Ankunft im Labor zunächst eingefroren werden. Zur eigentlichen Messung der Hormonkonzentration werden die Speichelproben aufgetaut und fünf bis zehn 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 durch Blut kontaminierte Proben zeigen immer zu hohe Konzentrationswerte. Wegen der episodischen Sekretionsmuster sollten in der Routine immer Mehrfachproben eingesetzt werden. Die fünf 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.

#### 5.3 Probenverdünnung

Wenn in einem ersten Testdurchlauf bei einer Probe eine höhere Konzentration als der höchste Standard gefunden wird, muss diese Probe mit *Standard 0* weiter verdünnt und nochmals bestimmt werden. Die Verdünnung muss jedoch bei der Berechnung der Konzentration beachtet werden.



## 6 TESTDURCHFÜHRUNG

### 6.1 Allgemeine Hinweise

- Alle Reagenzien und Proben müssen vor Gebrauch auf Raumtemperatur (18-25°C) gebracht und gut durchmischt werden. Dabei sollte Schaumbildung vermieden werden.
- Wenn die Testdurchführung einmal begonnen wurde, muss sie ohne Unterbrechung zu Ende geführt werden.
- Für jeden Standard, jede Kontrolle oder Probe eine neue Plastikspitze verwenden, um Verschleppungen zu vermeiden.
- Die Optische Dichte ist abhängig von Inkubationszeit und Temperatur. Deshalb ist es notwendig, vor Beginn der Testdurchführung alle Reagenzien in einen arbeitsbereiten Zustand zu bringen, die Deckel der Fläschchen zu öffnen, alle benötigten Wells der Mikrotiterplatte in den Rahmen 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.
- Standards, Kontrollen und Proben in Doppelbestimmungen auftragen, um eventuelle Pipettierfehler erkennen zu können.
- Die korrekte Durchführung der Waschschriffe ist entscheidend. Ungenügend gewaschene Wells ergeben falsche Ergebnisse. Die Verwendung einer Multikanalpipette bzw. Multistepplers oder eines automatischen Waschgerätes für Mikrotiterplatten wird empfohlen. Zwischen den Inkubationen die Wells nicht austrocknen lassen. Beim Waschen und Ausschütteln dürfen die beschichteten Wells nicht beschädigt werden. Alle Reagenzien müssen daher mit Vorsicht pipettiert werden. Beim Waschvorgang ist es wichtig, dass alle Wells vollständig und gleichmäßig mit Waschlösung gefüllt werden und nach dem Ausschütteln kein Rückstand an Flüssigkeit zurückbleibt.
- Jeder Testlauf muss eine eigene Standardkurve beinhalten.

### 6.2 Testdurchführung

1. Die benötigte Anzahl Wells in dem Rahmen befestigen.
2. **Je 50 µl Standard, Kontrolle und Probe mit neuen Plastikspitzen** in Doppelbestimmung in die entsprechenden Wells geben.
3. **50 µl Enzymkonjugat** in jedes Well geben.
4. **60 Minuten** bei Raumtemperatur (18-25°C) auf einem Mikrotiterplattenschüttler (900 rpm) inkubieren.
5. Den Inhalt der Wells kräftig ausschütteln. Wells **4mal mit verdünnter Waschlösung (300 µl pro Well)** waschen. Verbleibende Flüssigkeit durch Ausklopfen der Wells auf saugfähigem Papier entfernen.  
**Achtung:** Die Sensitivität und Präzision dieses Tests wird erheblich beeinflusst von der korrekten Durchführung des Waschschriffes!
6. **200 µl Substratlösung** in jedes Well geben.
7. **30 Minuten** bei Raumtemperatur (18-25°C) ohne Schütteln im Dunkeln inkubieren.
8. Die enzymatische Reaktion durch Zugabe von **50 µl Stopplösung** in jedes Well beenden.
9. Die Optische Dichte (OD) bei **450 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 OD jedes Standards (y-Achse, linear) gegen deren Konzentration (x-Achse, logarithmisch), entweder auf semi-logarithmischem Papier oder durch eine entsprechende Software.
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) 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 ist ein Beispiel für eine Standardkurve mit dem Demeditec Cortisol free in Saliva ELISA gezeigt. Diese Werte sollten nicht zur Berechnung von Patientendaten verwendet werden.

Standard		Optische Dichte (450 nm)
Standard 0	0,0 ng/ml	3,099
Standard 1	0,1 ng/ml	2,647
Standard 2	0,4 ng/ml	1,932
Standard 3	1,7 ng/ml	0,856
Standard 4	7 ng/ml	0,357
Standard 5	30 ng/ml	0,172

## 7 ERWARTETE WERTE

Aufgrund der Unterschiede, die zwischen den einzelnen Laboratorien und Standorten in Bezug auf die Bevölkerung, die Labortechnik und die Auswahl der Referenzgruppe bestehen können, ist es wichtig, dass jedes Labor seine eigenen normalen und pathologischen Werte bestimmt und feststellt, ob die Übernahme des hier vorgeschlagenen Referenzbereichs angemessen ist.

Tageszeit	5. - 95. Perzentile (ng/ml)	n
Morgens	1,6 – 9,2	234
Mittags	0,9 - 6,9	427
Nachmittags	0,6 - 3,6	129
Abends	0,4 - 3,9	419
Mitternacht	< 1,2	26

Nur alleine auf den Ergebnissen basierend sollten keine therapeutischen Konsequenzen getroffen werden. Es sind immer weitere klinische Beobachtungen mit einzubeziehen. Da der Cortisolspiegel relativ starken episodischen Schwankungen unterliegt, empfehlen wir eine Mehrfachprobensammlung am Morgen und am Abend. Die Differenz zwischen dem Morgen- und dem Abendwert ist ein wichtiger Parameter.

## 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 Kit-Kontrollen mit den entsprechenden Ergebnissen 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 ungünstig eingestuft werden.

In diesem Fall überprüfen Sie bitte die folgenden Bereiche: Pipetten und Zeitnehmer, Mikrotiterplatten-Lesegerät, 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 abzüglich der zweifachen Standardabweichung des Standards 0 (n = 20), beträgt 0,019 ng/ml.

### 9.2 Spezifität der Antikörper (Kreuzreaktivität)

Die Daten bitte der ausführlichen englischen Arbeitsanleitung entnehmen.

### 9.3 Messbereich

Der Messbereich des Testes liegt zwischen 0,1 - 30 ng/ml.

Die Daten zu:

### 9.4 Präzision

### 9.5 Wiederfindung

### 9.6 Linearität

bitte der ausführlichen englischen Arbeitsanleitung entnehmen.

## 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 Interferenzen

- Eine Kontamination der Speichelproben mit Blut beeinflusst das Ergebnis. Eine solche Verunreinigung kann bereits mit den Augen wahrgenommen werden. Im Falle einer sichtbaren Blut-Kontamination sollte der Patient die Probe verwerfen, das Probenentnahmegesäß mit Wasser spülen, 10 Minuten abwarten und eine erneute Probenentnahme durchführen.
- Natriumazid darf nicht in diesem Assay eingesetzt werden. In dem Fall kann es zu falschen Ergebnissen führen.
- Das Ergebnis eines jeden immunologischen Testsystems kann durch heterophile Antikörper, Anti-Spezies-Antikörper oder Rheumafaktoren, die in menschlichen Proben vorhanden sind, beeinflusst werden (11-13). Das Auftreten von heterophilen Antikörpern bei Patienten, die regelmäßig mit Tieren oder tierischen Produkten in Berührung kommen, kann beispielsweise zu Störungen bei immunologischen Tests führen. Daher können Interferenzen mit diesem *In-vitro*-Immunoassay nicht ausgeschlossen werden. Bei Verdacht auf nicht plausible Ergebnisse sollten diese als nicht gültig betrachtet und durch weitere Untersuchungen überprüft werden. Zu diagnostischen Zwecken sollten die Ergebnisse immer nur in Verbindung mit dem klinischen Bild des Patienten und weiteren diagnostischen Tests betrachtet werden.

### 10.2 High-Dose-Hook-Effekt

Ein High-Dose-Hook-Effekt tritt in diesem Test nicht auf.

### 10.3 Beeinflussung durch Medikamente

Medikationen wie Cremes, Öle oder Pillen, die Cortisol enthalten, haben einen entsprechenden Einfluss auf die Bestimmung des Analyten im Speichel. Das Gleiche gilt für Medikationen mit Prednisolon. Die klinische Bedeutung der Bestimmung von Cortisol kann beeinflusst werden, wenn der Patient mit natürlichen oder synthetischen Steroiden behandelt wurde. Jede Medikation muss bei der Bewertung der Ergebnisse berücksichtigt werden.

## 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 ÄNDERUNGSHISTORIE DER ARBEITSANLEITUNG

Änderungen gegenüber der Vorgängerversion 16a-03/21 zur aktuellen Version 17-08/23

Deckblatt	Layout aktualisiert
Allgemein	Redaktionelle Änderungen
Kapitel 3	Überschrift umbenannt
Kapitel 10.1 & 12	eingefügt
Aktualisierungen in Kapitel 1.1, 3, 4.2, 4.4, 5.1, 5.2, 6.1, 10.3, 13	

## 13 REFERENZEN

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

### SYMBOLS USED WITH DEMEDITEC ASSAYS

Symbol	English	Deutsch	Française	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	utilisation 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 catalogo
	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
	Note warnings and precautions	Warnhinweise und Vorsichtsmaßnahmen beachten	Avertissements et mesures de précaution font attention	Tiene en cuenta advertencias y precauciones	Annoti avvisi e le precauzioni
	Storage Temperature	Lagerungstemperatur	Température de conservation	Temperatura de conservación	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>	Distributed by	Vertrieb durch	Distribution par	Distribución por	Distribuzione da parte di
	Version	Version	Version	Versión	Versione
	Single-use	Einmalverwendung	À usage unique	Uso único	Uso una volta