

Product information

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



Cortisol free in Saliva ELISA

RUO

REF

DES6611R



96



Demeditec Diagnostics GmbH
Lise-Meitner-Strasse 2
24145 Kiel – Germany
www.demeditec.com

CONTENTS / INHALTSVERZEICHNIS

1	INTRODUCTION.....	3
2	PRINCIPLE	3
3	WARNINGS AND PRECAUTIONS.....	3
4	REAGENTS	4
5	SAMPLE COLLECTION AND PREPARATION.....	5
6	ASSAY PROCEDURE	6
7	QUALITY CONTROL	7
8	PERFORMANCE CHARACTERISTICS	7
9	LIMITATIONS OF PROCEDURE	9
10	LEGAL ASPECTS.....	9
11	REFERENCES	10
12	REVISION HISTORY OF INSTRUCTION FOR USE	10
13	SHORT INSTRUCTION.....	11
1	EINLEITUNG.....	12
2	TESTPRINZIP	12
3	WARNUNGEN UND VORSICHTSHINWEISE	12
4	BESTANDTEILE DES KITS.....	13
5	PROBENVORBEREITUNG	14
6	TESTDURCHFÜHRUNG	15
7	QUALITÄTSKONTROLLE	16
8	ASSAY CHARAKTERISTIKA	17
9	GRENZEN DES TESTS	19
10	RECHTLICHE GRUNDLAGEN	19
11	REFERENZEN.....	20
12	ÄNDERUNGSHISTORIE DER ARBEITSANLEITUNG	20
13	KURZANLEITUNG.....	21

1 INTRODUCTION

1.1 Intended Use

Cortisol free in Saliva ELISA is an enzyme immunoassay for the quantitative determination of active free cortisol in human saliva. The assay is intended for research use only. Not intended for diagnostic procedures.

Since the molecular structure of steroids is not species-specific, the Cortisol free in Saliva ELISA can also be used to determine cortisol in samples from other species, considering differences in sample matrices and any required pre-treatment or extraction step.

This 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) (1-3). 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. 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 weeks).

Studies show that salivary cortisol concentration reflects the serum unbound cortisol concentration throughout the physiological concentration range (4-6). In serum, 90-95% of cortisol is protein-bound while in saliva cortisol appears mainly in its free, metabolic active form.

Cortisol is a key focus of biomedical and psychological research, as it is the predominant stress hormone and has far-reaching effects on both body and mind. In research, it is primarily used as a biomarker for stress and to investigate metabolic processes (1-3).

Cortisol also plays an important role in animal research. It is used as a biomarker to measure animals' stress levels and monitor their well-being (7-12).

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 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 calibrator curve.

3 WARNINGS AND PRECAUTIONS

1. This kit is for research use only. For professional use only.
2. Before starting the assay, read the instructions for use (IFU) completely and carefully. Use the valid version of the IFU provided with the kit. Be sure that everything is understood.
3. The microtiter plate 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 colored. Do not pour reagents back into vials as reagent contamination may occur.
6. Mix the contents of the microtiter plate wells thoroughly to ensure good test results. Do not reuse wells.
7. Do not let wells dry during assay; add reagents immediately after completing the washing 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 samples with skin and mucous membranes.
10. Do not smoke, eat, drink or apply cosmetics in areas where samples or kit reagents are handled.

11. Wear disposable latex gloves when handling samples and reagents. Microbial contamination of reagents or samples 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 microtiter plate readers.
15. Do not mix or use components from kits with different lot numbers. It is advised not to exchange wells of different microtiter 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 lead to slightly different results.
16. Avoid contact with Stop Solution. It may cause skin irritation and burns.
17. Some reagents contain Proclin 300, CMIT and/or 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 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).
20. 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 polyclonal rabbit anti-cortisol antiserum.
2. **CAL** **0** **Calibrator 0**, 1 vial, 2.0 ml, clear, ready to use.
3. **CAL** **1** - **5** **Calibrators 1-5**, 5 vials, 0.5 ml each, clear, 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, clear, 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, red, ready to use; cortisol conjugated to horseradish peroxidase.
6. **SUB** **TMB** **Substrate Solution**, 1 vial, 22 ml, clear, ready to use; Tetramethylbenzidine (TMB).
7. **STOP** **SOLN** **Stop Solution**, 1 vial, 7.0 ml, clear, 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), clear; see „Reagent preparation“.

4.2 Material required but not provided

- Microcentrifuge
- A calibrated microtiter plate reader (450 nm)
- Microtiter plate 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 Reagent preparation

Allow reagents and 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 **WASH SOLN 1x** is stable for at least 12 weeks at room temperature. Precipitates may form when stored at 2-8°C, which should dissolve again by swirling at room temperature. 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 Safety Data Sheet.

4.6 Damaged test kits

In case of any severe damage of the test kit or components, Demeditec Diagnostics GmbH has 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 SAMPLE 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. In case of visible blood contamination 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.

5.1 Sample 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 cap.

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 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 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. 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 sample collection. Furthermore please avoid any strenuous physical exercises and intense stress situations.

5.2 Sample 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. 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.

5.3 Sample Dilution

If in an initial assay a sample is found to contain more cortisol than the highest calibrator, it must be diluted with **Calibrator 0** **CAL 0** and re-assayed as described in Assay procedure. For the calculation of the concentration this dilution factor has to be taken into account.

6 ASSAY PROCEDURE

6.1 General remarks

- All reagents and samples 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 calibrator, control, or sample to avoid cross contamination.
- OD 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 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 washing and aspiration. Wash and fill all reagents with care. While washing, 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. Prepare a sufficient number of microtiter plate wells to accommodate **Calibrators, Controls and Samples** in duplicates.
2. Dispense **50 µl** of each **Calibrator** **CAL 0 - 5**, **Control** **CONTROL 1 - 2** and **Samples** in duplicates with new disposable tips into appropriate microtiter plate wells.
3. Add **50 µl** of **Enzyme Conjugate** **ENZ CONJ** into each well.
4. Incubate for **60 minutes** at room temperature (18-25°C) on a plate shaker (900 rpm).
5. Discard the content of the wells and wash **4 times** with **300 µl** diluted **1x Wash Solution** **WASH SOLN 1x**. Remove as much as possible Wash Solution by beating the microtiter plate carefully on absorbent paper.
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** **SUB TMB** to all well.
7. Incubate without shaking at room temperature (18-25°C) for 30 minutes in the dark.
8. Stop reaction by adding **50 µl** of **Stop Solution** **STOP SOLN** to each well. Mix carefully.
9. Determine the OD of each well at **450 nm**. It is recommended to read the wells within 15 minutes.

6.3 Calculation of results

1. Calculate the average OD values for each set of Calibrators, Controls, and Samples.
2. The obtained ODs of the Calibrators (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 OD value for each sample determine the corresponding concentration from the Calibrator curve.
4. Automated method: The results in this instructions 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 different results.
5. The concentration of the samples can be read directly from this Calibrator 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.

7 QUALITY CONTROL

The kit control ranges and the mean results are stated in the QC data sheet added to the kit. The values and ranges stated at the QC data sheet always refer to the current kit lot and should be used for direct comparison of the results. For further internal quality control each laboratory is recommended to additionally use own controls.

If the results of the assay do not fit to the established acceptable ranges of controls, 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 Diagnostics GmbH directly.

8 PERFORMANCE CHARACTERISTICS

8.1 Limit of Blank

The Limit of Blank of the Demeditec Cortisol free in Saliva ELISA was found at 0.04 ng/ml.

8.2 Specificity (Cross-Reactivity)

The following materials have been evaluated for cross-reactivity.

Compound	crossreactivity at 50% binding
Cortisone	29.3%
11-Deoxycortisol	16.4%
Prednisone	18.7%
Prednisolone	31.5%

The following compounds show negligible reactivities (< 2% at 50% binding):

Corticosterone, 11-Deoxycorticosterone, Dexamethasone, Progesterone, 17-Hydroxyprogesterone, Danazole, Pregnenolone, Androstenedione

The following compounds do not show any detectable cross-reactivity (< 0.004% at 50% binding):

Testosterone, DHEA, DHEA-S, Estriol, Estrone, 17 β -Estradiol

8.3 Assay Range

The range of the assay is between 0.04-30 ng/ml.

8.4 Reproducibility

8.4.1 Intra-Assay

The intra-assay variation was determined by 20 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
Mean (ng/ml)	4.32	1.07	12.86
SD (ng/ml)	0.24	0.07	0.98
CV (%)	5.6	6.2	7.6
n =	20	20	20

8.4.2 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
Mean (ng/ml)	4.00	1.06	12.50
SD (ng/ml)	0.20	0.06	1.46
CV (%)	5.1	5.2	11.7
n =	10	10	10

8.5 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 Calibrator curve. The percentage recoveries were determined by comparing expected and measured concentrations of the samples.

Sample	Spiking	Measured Concentration (ng/ml)	Expected Concentration (ng/ml)	Recovery %
1	native	1.76	-	-
	1 ng/ml	3.03	2.76	110
	4 ng/ml	6.08	5.76	106
	10 ng/ml	12.67	11.76	108
2	native	1.97	-	-
	1 ng/ml	3.14	2.97	106
	4 ng/ml	6.21	5.97	104
	10 ng/ml	12.29	11.97	103
3	native	1.74	-	-
	1 ng/ml	2.99	2.74	109
	4 ng/ml	6.02	5.74	105
	10 ng/ml	12.06	11.74	103

8.6 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 concentrations for cortisol.

Sample	Dilution	Measured Concentration (ng/ml)	Expected Concentration (ng/ml)	Linearity %
1	native	12.97	-	-
	1 : 2	6.39	6.49	99
	1 : 4	3.34	3.24	103
	1 : 8	1.68	1.62	104
2	native	13.21	-	-
	1 : 2	6.05	6.61	92
	1 : 4	3.07	3.30	93
	1 : 8	1.52	1.65	92
3	native	14.92	-	-
	1 : 2	6.97	7.46	93
	1 : 4	3.46	3.73	93
	1 : 8	1.68	1.86	90

9 LIMITATIONS OF PROCEDURE

Reliable and reproducible results will be obtained when the assay procedure is performed with a complete understanding of the instructions for use and with adherence to GLP (Good Laboratory Practice). Any improper handling of samples or modification of this test might influence the results.

9.1 Interfering Substances

- Blood contamination in saliva samples will affect results and usually can be seen by eye. In case of visible blood contamination, the collector should discard the sample, rinse the sampling device with water, wait for 10 minutes and take a new sample (see 5.1).
- 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 (13-15). Therefore, interference with this immunoassay cannot be excluded. If unplausible results are suspected, they should be considered invalid and verified by further testing.

9.2 High Dose Hook Effect

Up to a tested concentration of 1500 ng/ml cortisol no High Dose Hook Effect could be observed for the Cortisol free in Saliva ELISA.

9.3 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 Prednisone, Prednisolone and Cortisone (see cross-reactivity in chapter 8.2).

10 LEGAL ASPECTS

10.1 Reliability of Results

The test must be performed exactly as per the manufacturer's instructions for use. 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 Diagnostics GmbH.

10.2 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. 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.

11 REFERENCES

1. Kirschbaum C., Hellhammer DH
Salivary cortisol in psychobiological Research: An overview,
Neuropsychobiology, **1989**, 22, 150-169
2. Kirschbaum C, Hellhammer DH
Salivary Cortisol
Encyclopedia of Stress, **2000**, Volume 3
3. Hellhammer DH., Wüst S., Kudielka BM
Psychoneuroendocrinology, **2009**; 34(2):163-171
4. Vining RF, McGinley RA, Maksvytis JJ, Ho KY
Salivary cortisol: a better measure of adrenal cortical function than serum cortisol,
Ann Clin Biochem, **1983**, 20, 329-335
5. 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
6. 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
7. Morméde P., Andanson S., Aupérin B., Beerda B., Guémené D., Malmkvist J., Manteca X., Manteuffel G., Prunet P., van Reenen C.G., Richard S., Veisser L.
Exploration of the hypothalamic-pituitary-adrenal function as a tool to evaluate animal welfare
Physiol. Behav. 92, 317-339
8. Heimbürge S., Kanitz E., Otten W.
The use of hair cortisol for the assessment of stress in animals
General and Comparative Endocrinology 270 (**2019**) 10-17
9. Heimbürge S., Kanitz E., Tuchscherer A., Otten W.
Within a hair's breadth – factors influencing hair cortisol levels in pigs and cattle
General and Comparative Endocrinology 288 (**2020**)
10. Nadlucnik E., Vake T., Sket A., Zizek A., Snoj T. and Stukelj M.
Hair cortisol of pigs in mixed organic farms: the influence of season, breeding system and sex
Frontiers in Veterinary Science, **2024**
11. Aurich J., Wulf M., Ille N., Erber R., von Lewinski M., Palme R., Aurich C.
Effects of season, age, sex, and housing on salivary cortisol concentrations in horses
Domestic Animal Endocrinology 52 (**2015**) 11-16
12. Herbel J., Aurich J., Gautier C., Melchert M., Aurich C.
Stress response of beagle dogs to repeated short-distance road transport
Animals **2020**, 10, 2114
13. 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
14. Tate J. & Ward G.
Interferences in Immunoassays,
Clin. Biochem Rev Vol 25, May **2004**
15. Selby C.
Interference in Immunoassays;
Ann. Clin. Biochem **1999**, 36: 704-721

12 REVISION HISTORY OF INSTRUCTION FOR USE

Version 1 - no former version available

13 SHORT INSTRUCTION

all steps at RT (18-25°C)
all sample sizes given in μl

Steps	CAL 0 - 5 (0-30 ng/ml)	CONTROL 1 - 2	Sample
Pipet CAL 0 - 5	50	-	-
Pipet CONTROL 1 - 2	-	50	-
Pipet Samples	-	-	50
Pipet ENZ CONJ	50		
Incubate for 1 h on a shaker (900 rpm)			
Decant Wash 4x with WASH SOLN 1x	300 (4 times)		
Pipet SUB TMB	200		
Incubate without shaking for 30 min in the dark			
Pipet STOP SOLN	50		
Read at $\lambda = 450 \text{ nm}$			

1 EINLEITUNG

1.1 Verwendungszweck

Cortisol free in Saliva ELISA ist eine Enzymimmunoassay zur quantitativen Bestimmung von aktivem freiem Cortisol in humanem Speichel.

Dieser Test ist nur für Forschungszwecke durch geschultes Laborpersonal bestimmt. Nicht zu verwenden für diagnostische Zwecke.

Da die Molekülstruktur von Steroiden nicht speziesspezifisch ist, kann der Cortisol free in Saliva ELISA unter Berücksichtigung der unterschiedlichen Probenmatrices sowie mit gegebenenfalls erforderlichen Vorbehandlungs- oder Extraktionsschritten auch zur Bestimmung von Cortisol in Proben anderer Spezies eingesetzt werden.

Dieses Produkt ist ausschließlich 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 (1-3).

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. Der Zeitpunkt dieses Höchstwertes wird stark von der durchschnittlichen Aufwachzeit der vergangenen Wochen beeinflusst. Sie hängt nicht von der tatsächlichen Aufwachzeit des jeweiligen Tages der Datenerhebung ab (sofern diese von der durchschnittlichen Aufwachzeit der vergangenen Woche abweicht).

Studien zeigen, dass die Cortisolkonzentration im Speichel die ungebundene Cortisolkonzentration im Serum über den gesamten physiologischen Konzentrationsbereich widerspiegelt (4-6). Im Serum ist Cortisol zu 90-95% an Proteine gebunden, während Cortisol im Speichel hauptsächlich in freier, metabolisch aktiver Form vorkommt.

Cortisol ist ein zentraler Fokus in der biomedizinischen und psychologischen Forschung, da es als Hauptstresshormon weitreichende Auswirkungen auf Körper und Psyche hat. In der Forschung wird es primär als Biomarker für Stress und zur Untersuchung von Stoffwechselfprozessen eingesetzt (1-3). Auch in der Tierforschung spielt Cortisol eine wichtige Rolle. Es wird als Biomarker verwendet, um das Stresslevel von Tieren zu messen und ihr Wohlbefinden zu überwachen (7-12).

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 für Forschungszwecke geeignet und sollte nur von 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 Lots 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 Sicherheitsdatenblatt. Sicherheitsdatenblätter für dieses Produkt sind auf Anfrage direkt von der Firma Demeditec Diagnostics GmbH erhältlich. Sie finden diese auch unter www.demeditec.de zum Herunterladen.
20. Sollten Produktinformationen, einschließlich Etikettierung falsch oder inkorrekt sein, bitte den Hersteller oder 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)
- Mikrotiterplattenschüttler (900 rpm)
- 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 **WASH SOLN 1x** ist bei Raumtemperatur für mindestens 12 Wochen stabil.

Bei einer Lagerung bei 2-8°C können sich Präzipitate bilden, die sich durch Schwenken bei Raumtemperatur 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 Sicherheitsdatenblatt.

4.6 Beschädigte Testkits

Im Falle einer starken Beschädigung des Testkits oder der Komponenten muss die Firma Demeditec Diagnostics GmbH 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, dürfen nicht für den Test verwendet werden. Die Speichelproben sollten vollkommen farblos sein. Selbst die geringste Rötung deutet auf eine Blutverunreinigung hin. Bei sichtbarer Blutverunreinigung sollte die Probe entsorgt, das Entnahmehilfsmittel mit Wasser ausgespült, der Mund (vorzugsweise) mit kaltem Wasser ausgespült werden, 10 Minuten warten und eine neue Probe entnehmen. Während der Probenentnahme darf nicht gekaut werden.

5.1 Probenentnahme

Für die korrekte Speichelsammlung sollten Gefäße aus hochreinem Polypropylen (PP) verwendet werden. PE-Gefäße oder Salivetten sollten möglichst nicht verwendet werden. 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 der Person. 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 Lagerung müssen die Proben bei <-20°C aufbewahrt werden. Wann immer möglich die Proben sicherheitshalber bei <-20°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. 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.

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** **CAL 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 Waschstreps ist entscheidend. Ungenügend gewaschene Wells ergeben falsche Ergebnisse. Die Verwendung einer Multikanalpipette bzw. Multistepers 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** **CAL** **0** - **5**, **Kontrolle** **CONTROL** **1** - **2** und **Probe** mit neuen Plastikspitzen in Doppelbestimmung in die entsprechenden Wells geben.
3. **50 µl Enzymkonjugat** **ENZ** **CONJ** 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 **4 mal mit verdünnter Waschlösung** **WASH** **SOLN** **1x** (**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 Waschschrilles!
6. **200 µl Substratlösung** **SUB** **TMB** 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** **STOP** **SOLN** 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 Proben 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 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.

7 QUALITÄTSKONTROLLE

Die Kit-Kontrollen mit den entsprechenden Ergebnissen sind im QC-Zertifikat, das dem Kit beiliegt, aufgeführt. Die im QC-Datenblatt angegebenen Mittelwerte und Bereiche beziehen sich stets auf die aktuelle Kitcharge und sollten zum direkten Vergleich der Ergebnisse verwendet werden. Zur weiteren internen Qualitätskontrolle wird jedem Labor empfohlen, eigene Kontrollproben zu verwenden.

Wenn die Ergebnisse des Tests nicht mit den angegebenen Akzeptanzbereichen des Kontrollmaterials übereinstimmen, sollten die Ergebnisse als ungültig eingestuft werden.

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

Sollten nach Überprüfung der vorgenannten Bereiche keine Fehler vorliegen, bitte mit Ihrem Lieferanten oder direkt mit der Firma Demeditec Diagnostics GmbH in Verbindung treten.

8 ASSAY CHARAKTERISTIKA

8.1 Limit of Blank (LoB)

Die Limit of Blank des Cortisol free in Saliva ELISA beträgt 0,04 ng/ml.

8.2 Spezifität der Antikörper (Kreuzreaktivität)

Die folgenden Materialien wurden auf Kreuzreaktivität untersucht:

Analyt	Kreuzreaktivität bei 50% Bindung
Cortison	29,3%
11-Deoxycortisol	16,4%
Prednison	18,7%
Prednisolon	31,5%

Die folgenden Verbindungen zeigen vernachlässigbare Reaktivitäten (< 2 % bei 50 % Bindung): Corticosteron, 11-Deoxycorticosteron, Dexamethason, Progesteron, 17-Hydroxyprogesteron, Danazol, Pregnenolon, Androstendion

Die folgenden Verbindungen zeigen keine nachweisbare Kreuzreaktivität (< 0,004 % bei 50 % Bindung): Testosteron, DHEA, DHEA-S, Estriol, Estron, 17 β -Östradiol

8.3 Messbereich

Der Messbereich des Testes liegt zwischen 0,04-30 ng/ml.

8.4 Präzision

8.4.1 Intra-Assay

Die Intra-Assay-Variation wurde durch Wiederholungsmessungen von drei Speichelproben innerhalb eines Durchlaufs unter Verwendung des Demeditec Cortisol free in Saliva ELISAs ermittelt. Die Intra-Assay-Variation ist nachstehend dargestellt:

	Probe 1	Probe 2	Probe 3
Mittelwert (ng/ml)	4,32	1,07	12,86
SD (ng/ml)	0,24	0,07	0,98
CV (%)	5,6	6,2	7,6
n =	20	20	20

8.4.2 Inter-Assay

Die Inter-Assay-Variation wurde durch doppelte Messungen von drei Speichelproben in zehn verschiedenen Durchläufen unter Verwendung des Demeditec Cortisol free in Saliva ELISAs zum Nachweis von freiem Cortisol im Speichel ermittelt. Die Inter-Assay-Variation ist nachstehend dargestellt:

	Probe 1	Probe 2	Probe 3
Mittelwert (ng/ml)	4,00	1,06	12,50
SD (ng/ml)	0,20	0,06	1,46
CV (%)	5,1	5,2	11,7
n =	10	10	10

8.5 Wiederfindung

Die Wiederfindung des Demeditec Cortisol free in Saliva ELISAs wurde bestimmt, indem drei verschiedenen Speichelproben, die unterschiedliche Mengen an endogenem Analyten enthielten, steigende Mengen des Analyten zugesetzt wurden. Jede Probe (unversetzt und versetzt) wurde untersucht, und die Analytkonzentrationen der Proben wurden anhand der Standardkurve berechnet. Die prozentualen Wiederfindungsraten wurden durch den Vergleich der erwarteten mit den gemessenen Werten der Proben ermittelt.

Probe	Spiking	Gemessene Konzentration (ng/ml)	Erwartete Konzentration (ng/ml)	Wiederfindung %
1	nativ	1,76	-	-
	1 ng/ml	3,03	2,76	110
	4 ng/ml	6,08	5,76	106
	10 ng/ml	12,67	11,76	108
2	nativ	1,97	-	-
	1 ng/ml	3,14	2,97	106
	4 ng/ml	6,21	5,97	104
	10 ng/ml	12,29	11,97	103
3	nativ	1,74	-	-
	1 ng/ml	2,99	2,74	109
	4 ng/ml	6,02	5,74	105
	10 ng/ml	12,06	11,74	103

8.6 Linearität

Drei Speichelproben, die unterschiedliche Mengen des Analyten enthielten, wurden mit Standard 0 stufenweise verdünnt und mit dem Demeditec Cortisol free in Saliva ELISA untersucht. Der Linearitätsbereich wurde durch den Vergleich der erwarteten und der gemessenen Cortisolwerte berechnet.

Probe	Verdünnung	Gemessene Konzentration (ng/ml)	Erwartete Konzentration (ng/ml)	Linearität %
1	nativ	12,97	-	-
	1 : 2	6,39	6,49	99
	1 : 4	3,34	3,24	103
	1 : 8	1,68	1,62	104
2	nativ	13,21	-	-
	1 : 2	6,05	6,61	92
	1 : 4	3,07	3,30	93
	1 : 8	1,52	1,65	92
3	nativ	14,92	-	-
	1 : 2	6,97	7,46	93
	1 : 4	3,46	3,73	93
	1 : 8	1,68	1,86	90

9 GRENZEN DES TESTS

Zuverlässige und reproduzierbare Ergebnisse können nur erzielt werden, wenn der Testansatz mit vollem Verständnis der Arbeitsanleitung und unter Einhaltung der guten Laborpraxis durchgeführt wird. Jede unsachgemäße Behandlung von Proben oder Modifikationen dieses Tests können die Ergebnisse beeinflussen.

9.1 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 die Probe verworfen werden, das Probenentnahmegesäß mit Wasser gespült, 10 Minuten abgewartet und eine erneute Probenentnahme (siehe 5.1) durchgeführt werden.
- 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 (13-15). Daher können Interferenzen mit diesem Immunoassay nicht ausgeschlossen werden. Bei Verdacht auf nicht plausible Ergebnisse sollten diese als nicht gültig betrachtet und durch weitere Untersuchungen überprüft werden.

9.2 High-Dose-Hook-Effekt

Ein High-Dose-Hook-Effekt tritt in diesem Test bis zu einer getesteten Konzentration von 1500 ng/ml Cortisol nicht auf.

9.3 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, Prednison und Cortison (siehe Kreuzreaktivitäten in Kap. 8.2)

10 RECHTLICHE GRUNDLAGEN

10.1 Zuverlässigkeit der Ergebnisse

Der Test muss exakt gemäß der Testanleitung des Herstellers abgearbeitet werden. 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. Bei Zweifel oder Bedenken der Ergebnisse bitte mit der Firma Demeditec Diagnostics GmbH in Verbindung setzen.

10.2 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.

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.

11 REFERENZEN

1. Kirschbaum C., Hellhammer DH
Salivary cortisol in psychobiological Research: An overview,
Neuropsychobiology, **1989**, 22, 150-169
2. Kirschbaum C, Hellhammer DH
Salivary Cortisol
Encyclopedia of Stress, **2000**, Volume 3
3. Hellhammer DH., Wüst S., Kudielka BM
Psychoneuroendocrinology, 2009; 34(2):163-171
4. Vining RF, et al., Salivary cortisol: a better measure of adrenal cortical function than serum cortisol, *Ann Clin Biochem*, **1983**, 20, 329-335
5. 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
6. 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
7. Morméde P., Andanson S., Aupérin B., Beerda B., Guémené D., Malmkvist J., Manteca X., Manteuffel G., Prunet P., van Reenen C.G., Richard S., Veisser L.
Exploration of the hypothalamic-pituitary-adrenal function as a tool to evaluate animal welfare
Physiol. Behav. 92, 317-339
8. Heimbürge S., Kanitz E., Otten W.
The use of hair cortisol for the assessment of stress in animals
General and Comparative Endocrinology 270 (**2019**) 10-17
9. Heimbürge S., Kanitz E., Tuchscherer A., Otten W.
Within a hair's breadth – factors influencing hair cortisol levels in pigs and cattle
General and Comparative Endocrinology 288 (2020)
10. Nadlucnik E., Vake T., Sket A., Zizek A., Snoj T. and Stukelj M.
Hair cortisol of pigs in mixed organic farms: the influence of season, breeding system and sex
Frontiers in Veterinary Science, **2024**
11. Aurich J., Wulf M., Ille N., Erber R., von Lewinski M., Palme R., Aurich C.
Effects of season, age, sex, and housing on salivary cortisol concentrations in horses
Domestic Animal Endocrinology 52 (**2015**) 11-16
12. Herbel J., Aurich J., Gautier C., Melchert M., Aurich C.
Stress response of beagle dogs to repeated short-distance road transport
Animals **2020**, 10, 2114
13. 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
14. Tate J. & Ward G.
Interferences in Immunoassays,
Clin. Biochem Rev Vol 25, May **2004**
15. Selby C.
Interference in Immunoassays;
Ann. Clin. Biochem **1999**, 36: 704-721

12 ÄNDERUNGSHISTORIE DER ARBEITSANLEITUNG

Version 1 – keine vorige Version vorhanden














13 KURZANLEITUNG

Alle Schritte bei RT (18-25°C)

Alle Volumenangaben in μl

Schritte	CAL 0 - 5 (0-30 ng/ml)	CONTROL 1 - 2	Probe
Pipettiere CAL 0 - 5	50	-	-
Pipettiere CONTROL 1 - 2	-	50	-
Pipettiere Proben	-	-	50
Pipettiere ENZ CONJ	50		
Inkubation für 1 h auf einem Mikrotiterplattenschüttler (900 rpm)			
Dekantieren	300		
Waschen 4x mit WASH SOLN 1x	(4 mal)		
Pipettiere SUB TMB	200		
Inkubation ohne Schütteln für 30 min im Dunkeln			
Pipettiere STOP SOLN	50		
Messen bei $\lambda = 450 \text{ nm}$			

SYMBOLS USED WITH DEMEDITEC ASSAYS

Symbol	English	Deutsch	Française	Espanol	Italiano
	European Conformity	CE-Konformitäts-kennzeichnung	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	Artikelnummer	Référence	Número de catálogo	No. di catalogo
	Lot. No. / Batch code	Chargencode	No. de lot	Número de lote	Lotto no
	Contains sufficient for <n> tests/	Ausreichend für <n> Prüfungen	Contenu suffisant pour "n" tests	Contenido suficiente para <n> ensayos	Contenuto sufficiente per "n" saggi
	Storage Temperature	Temperaturbegrenzung	Température de conservation	Temperatura de conservacion	Temperatura di conservazione
	Expiration Date	Verwendbar bis	Date limite d'utilisation	Fecha de caducidad	Data di scadenza
	Manufacturer	Hersteller	Fabricant	Fabricante	Fabbricante
	Version	Version	Version	Versión	Versione
	Single-use	Nicht wiederverwenden/ Nur zum Einmalgebrauch/ Nur einmal verwenden	À usage unique	Uso único	Uso una volta
	Distributor	Vertreiber	Distributeur	Distribuidor	Distributore

Symbol	Português	Hungarian	Polska	Bulgarian	
	Conformidade Europeia	Európai megfeleléség	Zgodność europejska	Европейско съответствие	
	Siga as instruções de uso	Kövesse a használati utasításokat	Postępuj zgodnie z instrukcją obsługi	Вижте инструкциите за употреба	
	Dispositivo de diagnóstico in vitro	In vitro diagnosztikai eszköz	Urządzenie do diagnostyki in vitro	Уред за ин витро диагностика	
	Apenas para fins de investigação	Kizárólag kutatási célokra	Tylko do użytku badawczego	Само изследователска употреба	
	Número de artigo	Cikkszám	Numer artykułu	Каталожен номер	
	Código do lote	Tételkód	Kod partii	Партиден номер / Код на партидата	
	Suficiente para <n> exames	Elégséges <n> vizsgákhoz	Wystarczający dla <n> egzaminów	Съдържа достатъчно за <n> теста/	
	Temperatura de armazenamento	Tárolási hőmérséklet	Temperatura przechowywania	Температура на съхранение	
	Utilizável até	Használható addig,	Użyteczny do	Срок на годност	
	Fabricante	Gyártó	Producent	производител	
	Versão	Verzió	Wersja	Версия	
	Utilização única	Egyszer használatos	Jednorazowe	За еднократна употреба	
	Distribuidor	Forgalmazó	Dystrybutor	Дистрибутор	