

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 16.0a to actual version 17.0

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

Symbols:

	Storage temperature		Manufacturer		Contains sufficient for <n> tests
	Use-by date		Batch code		For in-vitro diagnostic use only!
	Consult instructions for use		Content		CE marking of conformity
	Caution		Catalogue number		Distributor
	Date of manufacture				

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 Aufwachezeit der vergangenen Wochen beeinflusst. Sie ist unabhängig von der tatsächlichen Aufwachezeit des jeweiligen Tages der Probenahme, sofern diese von der durchschnittlichen Aufwachezeit 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 Cortisol Saliva ELISA ^{Free} 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 Sicherheitsdatenblatt. Sicherheitsdatenblätter für dieses Produkt sind auf Anfrage direkt vom Hersteller erhältlich.
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. **96 SA E-6031 Microtiterwells** (Mikrotiterplatte)
12x8 (einzeln brechbare) Mikrotiterstreifen, 96 Wells; beschichtet mit polyklonalem Kaninchen anti-Cortisol-Antikörper.
2. **Standards und Kontrollen** – gebrauchsfertig

	Katalog Nr.	Standard	Konzentration	Volumen/Flasche
STANDARD A	SA E-6001	Standard A	0 ng/ml	2,0 ml
STANDARD B	SA E-6002	Standard B	0,1 ng/ml	0,5 ml
STANDARD C	SA E-6003	Standard C	0,4 ng/ml	0,5 ml
STANDARD D	SA E-6004	Standard D	1,7 ng/ml	0,5 ml
STANDARD E	SA E-6005	Standard E	7,0 ng/ml	0,5 ml
STANDARD F	SA E-6006	Standard F	30 ng/ml	0,5 ml
CONTROL 1	SA E-6051	Kontrolle 1	Kontrollwerte und Sollbereiche entnehmen Sie bitte dem QC-Report.	0,5 ml
CONTROL 2	SA E-6052	Kontrolle 2		0,5 ml

Puffermatrix mit definierter Menge Cortisol.
Umrechnung: 1 ng/ml = 2,76 nmol/l

3. **CONJUGATE SA E-6040 Enzyme Conjugate** (Enzymkonjugat) – gebrauchsfertig
1 Fläschchen, 7,0 ml; Cortisol mit Meerrettichperoxidase konjugiert.
Mögliche Gefahren:



H317 Kann allergische Hautreaktionen verursachen.

4. **SUBSTRATE AR E-0055 Substrate Solution** (Substratlösung) – gebrauchsfertig
1 Fläschchen, 22 ml; Tetramethylbenzidine (TMB).

5. **STOP-SOLN**

AR E-0080 Stop Solution (Stopplösung) – gebrauchsfertig

1 Fläschchen, 7,0 ml; Enthält 2 N Salzsäure. Kontakt mit der Stopplösung vermeiden! Kann Hautreizungen und Verbrennungen verursachen.

Mögliche Gefahren:



H290 Kann gegenüber Metallen korrosiv sein.

H314 Verursacht schwere Verätzungen der Haut und schwere Augenschäden.

H335 Kann die Atemwege reizen.

6. **WASH-CONC** **10x**

AR E-0030 Wash Solution (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 Sicherheitsdatenblatt.

4.6 Beschädigte Testkits

Im Falle einer starken Beschädigung des Testkits oder der Komponenten muss der Hersteller 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 ≤ -20 °C aufbewahrt werden. Wenn immer möglich sollten 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. 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 A* 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 Waschschrte 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, 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 Waschschrilles!
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

- Die durchschnittlichen Werte der Optischen Dichte (OD) für jedes Set von Standards, Kontrollen und Patientenproben bestimmen.
- 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.
- Unter Verwendung der mittleren OD wird für jede Probe die entsprechende Konzentration aus der Standardkurve ermittelt.
- 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.
- 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 Cortisol Saliva ELISA ^{Free} gezeigt. Diese Werte sollten nicht zur Berechnung von Patientendaten verwendet werden.

Standard	Optische Dichte (450 nm)
Standard A 0,0 ng/ml	3,099
Standard B 0,1 ng/ml	2,647
Standard C 0,4 ng/ml	1,932
Standard D 1,7 ng/ml	0,856
Standard E 7 ng/ml	0,357
Standard F 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 ungültig 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 dem Hersteller in Verbindung.

9 ASSAY CHARACTERISTIKA

9.1 Analytische Sensitivität

Die analytische Sensitivität, definiert als Mittelwert abzüglich der zweifachen Standardabweichung des Standards A (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 dem Hersteller 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 16.0a zur aktuellen Version 17.0

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.

Symbole:

	Lagertemperatur		Hersteller		Enthält Testmaterial für <n> Teste
	Verwendbar bis		Chargennummer		In vitro Diagnostikum
	Gebrauchsanweisung beachten		Inhalt		CE-Kennzeichnung
	Achtung		Katalognummer		Vertriebspartner
	Herstellungsdatum				