



DCM020-10
Ed. 01/2015

CORTISOL SALIVA ELISA

per analisi di routine

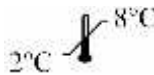
Determinazione immunoenzimatica diretta del Cortisolo nella saliva

IVD



LOT

Vedere etichetta esterna



$\Sigma = 96$ test

REF DKO020

DESTINAZIONE D'USO

Metodo competitivo immunoenzimatico colorimetrico per la determinazione quantitativa della concentrazione del Cortisolo nella saliva.

Il kit Cortisol Saliva ELISA è destinato al solo uso di laboratorio.

1. SIGNIFICATO CLINICO

Il cortisolo è un ormone steroideo liberato dalla corteccia surrenale in risposta all'ormone ACTH (prodotto dall'ipofisi), esso è coinvolto nella risposta allo stress; aumenta la pressione sanguigna, glicemia, può causare la sterilità in donne e sopprime il sistema immunitario.

Il cortisolo agisce tramite i recettori intracellulari specifici ed ha effetti in numerosi sistemi fisiologici, compreso il sistema immunitario, la regolazione del glucosio, il tono vascolare, l'utilizzazione del substrato ed il metabolismo osseo. Il cortisolo è escreto soprattutto nelle urine in forma (libera) non legata.

La maggior parte di cortisolo salivare è in forma non legata e passa in saliva attraverso meccanismi intracellulari. I livelli salivari del cortisolo non subiscono alterazioni rispetto alla saliva o agli enzimi salivari. Vi è un'elevata correlazione fra i livelli sierici e salivari.

Le funzioni endogene normali sono la base per le conseguenze fisiologiche dello stress cronico - la secrezione prolungata del cortisolo causa lo sforzo del muscolo, iperglicemia e sopprime le risposte immuni/infiammatorie. Le stesse conseguenze risultano dall'uso prolungato di farmaci a base di glucocorticoidi.

2. PRINCIPIO DEL METODO

Il cortisolo (antigene) presente nel campione, compete con l'antigene marcato con perossidasi di rafano (HRP) nei confronti dell'anticorpo anti-Cortisolo adsorbito su micropiastra (fase solida).

Dopo l'incubazione, la separazione libero-legato si ottiene mediante semplice lavaggio della fase solida. Successivamente l'enzima HRP presente nella frazione legata, catalizza la reazione tra il Substrato (H_2O_2) ed il TMB Substrate, sviluppando una colorazione blu che vira al giallo dopo aggiunta dello Stop solution (H_2SO_4). L'intensità del colore sviluppato è inversamente proporzionale alla concentrazione del cortisolo presente nel campione.

La concentrazione di Cortisolo nel campione è calcolata sulla base di una curva di calibrazione.

3. REATTIVI, MATERIALI E STRUMENTAZIONE

3.1. Reattivi e materiali forniti nel kit

1. Calibrators (7 flaconi, 1 mL ciascuno)

CAL0	REF DCE002/2006-0
CAL1	REF DCE002/2007-0
CAL2	REF DCE002/2008-0
CAL3	REF DCE002/2009-0
CAL4	REF DCE002/2010-0
CAL5	REF DCE002/2011-0
CAL6	REF DCE002/2012-0

2. Incubation Buffer (1 flacone, 30 mL)

Phosphate buffer 50 mM pH 7,4, BSA 1 g/L

REF DCE001-0

3. Conjugate (1 flacone, 1 mL)

Cortisolo coniugato con perossidasi di rafano (HRP)

REF DCE002/2002-0

4. Coated Microplate (1 micropiastra breakable)

Anticorpo anti Cortisolo adsorbito alla micropiastra

REF DCE002/2003-0

5. TMB Substrate (1 flacone, 15 mL)

H_2O_2 -TMB (0,26 g/L) (evitare il contatto con la pelle)

REF DCE004-0

6. Stop Solution (1 flacone, 15 mL)

Acido Solforico 0,15 mol/L (evitare il contatto con la pelle)

REF DCE005-0

7. 10X Conc. Wash Solution (1 flacone, 50 mL)

Tampone fosfato 0,2M pH 7.4

REF DCE054-0

3.2. Reattivi necessari non forniti nel kit

Acqua distillata.

3.3. Materiale e strumentazione ausiliare

Dispensatori automatici.

Letto per micropiastre (450 nm, 620-630 nm)

Saliva Collection Device

REF DKO063

Salivette Sarstedt

REF 51.1534.500

Note

Conservare i reattivi a 2÷8°C, al riparo dalla luce.
Aprire la busta del Reattivo 4 (Coated Microplate) solo dopo averla riportata a temperatura ambiente e chiuderla subito dopo il prelievo delle strip da utilizzare; una volta aperta è stabile fino alla data di scadenza del kit.

4. AVVERTENZE

- Questo test kit è per uso in vitro, da eseguire da parte di personale esperto. Non per uso interno o esterno su esseri Umani o Animali.
- Usare i previsti dispositivi di protezione individuale mentre si lavora con i reagenti forniti.
- Seguire le Buone Pratiche di Laboratorio (GLP) per la manipolazione di prodotti derivati da sangue.
- Alcuni reagenti contengono piccole quantità di Proclin 300^R come conservante. Evitare il contatto con la pelle e le mucose.
- Il TMB Substrato contiene un irritante, che può essere dannoso se inalato, ingerito o assorbito attraverso la cute. Per prevenire lesioni, evitare l'inalazione, l'ingestione o il contatto con la cute e con gli occhi.
- La Stop Solution è costituita da una soluzione di acido solforico diluito. L'acido solforico è velenoso e corrosivo e può essere tossico se ingerito. Per prevenire possibili ustioni chimiche, evitare il contatto con la cute e con gli occhi.
- Evitare l'esposizione del reagente TMB/H₂O₂ a luce solare diretta, metalli o ossidanti. Non congelare la soluzione.
- Questo metodo consente di determinare concentrazioni di Cortisolo da 0,5 ng/mL a 100 ng/mL.
- La somministrazione di steroidi naturali o sintetici può alterare i livelli di Cortisolo.

5. PRECAUZIONI

- Si prega di attenersi rigorosamente alla sequenza dei passaggi indicata in questo protocollo. I risultati presentati qui sono stati ottenuti usando specifici reagenti elencati in queste Istruzioni per l'Uso.
- Tutti i reattivi devono essere conservati a temperatura controllata di 2-8°C nei loro contenitori originali. Eventuali eccezioni sono chiaramente indicate. I reagenti sono stabili fino alla data di scadenza se conservati e trattati seguendo le istruzioni fornite.
- Prima dell'uso lasciare tutti i componenti dei kit e i campioni a temperatura ambiente (22-28°C) e mescolare accuratamente.
- Non scambiare componenti dei kit di lotti diversi. Devono essere osservate le date di scadenza riportate sulle etichette della scatola e di tutte le fiale. Non utilizzare componenti oltre la data di scadenza.
- Qualora si utilizzi strumentazione automatica, è responsabilità dell'utilizzatore assicurarsi che il kit sia stato opportunamente validato.
- Un lavaggio incompleto o non accurato dei pozzetti può causare una scarsa precisione e/o un'elevato background. Per migliorare le

prestazioni del kit su strumentazione automatica, si consiglia di aumentare il numero di lavaggi.

- Per la riproducibilità dei risultati, è importante che il tempo di reazione di ogni pozzetto sia lo stesso. Per evitare il time shifting durante la dispensazione degli reagenti, il tempo di dispensazione dei pozzetti non dovrebbe estendersi oltre i 10 minuti. Se si protrae oltre, si raccomanda di seguire lo stesso ordine di dispensazione. Se si utilizza più di una piastra, si raccomanda di ripetere la curva di calibrazione in ogni piastra.
- L'aggiunta del TMB Substrato dà inizio ad una reazione cinetica, la quale termina con l'aggiunta della Stop Solution. L'aggiunta del TMB Substrato e della Stop Solution deve avvenire nella stessa sequenza per evitare tempi di reazione differenti.
- Osservare le linee guida per l'esecuzione del controllo di qualità nei laboratori clinici testando campioni di controllo.
- Osservare la massima precisione nella ricostituzione e dispensazione dei reagenti.
- I lettori di micropiastre leggono l'assorbanza verticalmente. Non toccare il fondo dei pozzetti.

6. PROCEDIMENTO

6.1. Preparazione dei Calibratori (C₀...C₆)

Prima dell'uso lasciare su agitatore rotante per almeno 5 minuti.

I Calibratori sono pronti all'uso ed hanno le seguenti concentrazioni di Cortisolo:

	C ₀	C ₁	C ₂	C ₃	C ₄	C ₅	C ₆
ng/mL	0	0,5	1	5	10	20	100

Dopo l'apertura i Calibratori sono stabili 6 mesi a 2÷8°C.

Per Unità SI: ng/mL x 2,76 = nmol/L

6.2. Preparazione del Coniugato Diluito

Preparare al momento dell'uso.

Diluire 10 µL di Conjugate (reattivo 3) con 1 mL di Incubation Buffer (reattivo 2).

Mescolare delicatamente. Stabile 3 ore a temperatura ambiente (22÷28°C).

6.3. Preparazione della Wash Solution

Prima dell'uso, diluire il contenuto di ogni fiala di "10X Conc. Wash Solution" con acqua distillata fino al volume di 500 mL. Per preparare volumi minori rispettare il rapporto di diluizione di 1:10. La soluzione di lavaggio diluita è stabile a 2-8°C per almeno 30 giorni.

Nella wash solution concentrata è possibile osservare la presenza di cristalli; in tal caso agitare a temperatura ambiente fino a completa dissoluzione dei cristalli; per una maggiore precisione diluire tutto il flacone della soluzione di lavaggio concentrata a 500 mL, avendo cura di trasferire anche i cristalli, poi agitare fino a completa dissoluzione dei cristalli.

6.4. Preparazione del campione

La determinazione di Cortisolo con questo kit va effettuata su campioni di saliva.

Per la raccolta del campione si consiglia l'utilizzo di tubi in vetro da centrifuga e di una cannucchia in

plastica, o dei *Saliva Collection Device* Diametra, o delle "Salivette" (Sarstedt, Ref. 511534500). Altri tipi di dispositivi di raccolta commercialmente disponibili non sono stati testati.

6.4.1. Metodo e limitazioni

Raccogliere i campioni di saliva nei tempi indicati. Se non vengono date indicazioni specifiche per la raccolta delle salive, è possibile raccogliere i campioni in qualsiasi momento ma tenendo conto dei seguenti fattori:

- Se la raccolta della saliva deve essere effettuata al mattino, questa deve essere prelevata prima di lavarsi i denti.
- Durante la giornata prima di raccogliere i campioni di saliva, attendere almeno un'ora dopo aver mangiato, aver assunto farmaci per via orale o essersi lavati i denti.
- E' molto importante ottenere un campione limpido, non contaminato da cibo, cosmetici, sangue, chewing gum o altri materiali estranei.

6.4.2. Processazione delle salive con il metodo *Saliva Collection Device* Diametra

- Far defluire la saliva attraverso la cannucchia nel tubo di vetro.
- Centrifugare il campione per 15 minuti a 3000 rpm
- Porlo a -20°C per almeno 1 ora
- Centrifugare ancora per 15 minuti a 3000 rpm
- Il campione di saliva è così pronto per essere testato.
- Conservare il campione a $2\div 8^{\circ}\text{C}$ per una settimana o a -20°C per un tempo maggiore.

6.4.3. Processazione delle salive con il metodo *Salivette* Sarstedt

- Rimuovere il tampone contenuto nell'apposita provetta all'interno del tubo.
- Mettere il tampone in bocca e bagnare con la saliva per circa 1 minuto.
- Riporre il tampone nell'apposita provetta all'interno del tubo e chiudere il tubo con l'apposto tappo.
- Centrifugare il tubo a 1000g (rcf) per 2 minuti
- Rimuovere il tampone e la provetta e recuperare la saliva sul fondo del tubo (almeno 1 mL di saliva dovrebbe essere recuperato con questo metodo).

6.5. Procedimento

- Portare tutti i reagenti a temperatura ambiente ($22\text{-}28^{\circ}\text{C}$).** Al termine del dosaggio riporre immediatamente tutti i reagenti a $2\text{-}8^{\circ}\text{C}$: evitare lunghi periodi a temperatura ambiente.
- Le strisce di pozzetti non utilizzate devono essere rimesse immediatamente nella busta richiudibile contenente il materiale essiccante e conservate a $2\text{-}8^{\circ}\text{C}$.
- Per evitare potenziali contaminazioni microbiche e/o chimiche non rimettere i reagenti inutilizzati nei flaconi originali.
- Al fine di aumentare l'accuratezza dei risultati del test è necessario operare in doppio, allestendo due pozzetti per ogni punto della curva di calibrazione ($C_0\text{-}C_6$), due per ogni Controllo, due per ogni Campione ed uno per il Bianco.

Reagente	Calibratore	Campioni	Bianco
Calibratore $C_0\text{-}C_6$	25 μL		
Campioni		25 μL	
Coniugato Diluito	200 μL	200 μL	
Incubare 1 h a $+37^{\circ}\text{C}$. Allontanare la miscela di reazione. Lavare i pozzetti 3 volte con 0,3 mL di wash solution diluita. Nota importante: ad ogni step di lavaggio, agitare delicatamente la piastra per 5 secondi e successivamente rimuovere l'eccesso di soluzione di lavaggio sbattendo delicatamente la micropiastra invertita su fogli di carta assorbente. Lavaggi automatici: se si utilizza un lavatore automatico, effettuare 6 lavaggi.			
TMB Substrate	100 μL	100 μL	100 μL
Incubare 15 minuti a temperatura ambiente ($22\div 28^{\circ}\text{C}$), al riparo dalla luce.			
Stop Solution	100 μL	100 μL	100 μL
Agitare delicatamente la micropiastra. Leggere l'assorbanza (E) a 450 nm contro una lunghezza d'onda di riferimento di 620-630 nm oppure contro il Bianco entro 5 minuti.			

7. CONTROLLO QUALITA'

Ogni laboratorio dovrebbe analizzare i campioni nella gamma dei livelli elevati, normali e bassi di Cortisolo per il controllo delle prestazioni dell'analisi. Questi campioni dovrebbero essere trattati come ignoti ed i valori determinati in ogni test effettuato. Le tabelle di controllo qualità dovrebbero essere effettuate per seguire le prestazioni dei reagenti forniti. Metodi statistici adeguati dovrebbero essere impiegati per accertare il trend. Il laboratorio dovrebbe fissare i limiti di accettabilità di prestazioni dell'analisi. Altri parametri che dovrebbero essere controllati includono le intercette di 80, 50 e 20% della curva di calibrazione per valutare la riproducibilità. In più, la capacità di assorbimento massima dovrebbe essere costante con l'esperienza precedente. La deviazione significativa dalle prestazioni stabilite può indicare il cambiamento inosservato negli stati o nella degradazione sperimentali dei reagenti del kit. Reagenti freschi dovrebbero essere usati per determinare il motivo delle variazioni.

8. RISULTATI

8.1. Estinzione Media

Calcolare l'estinzione media (E_m) di ciascun punto della curva di calibrazione ($C_0\text{-}C_6$) e di ogni campione.

8.2. Curva di calibrazione

Tracciare sul grafico delle assorbanze i valori calcolati delle estinzioni medie (E_m) di ciascun Calibratore ($C_0\text{-}C_6$) in funzione delle concentrazioni. Tracciare la

miglior curva passante per i punti di calibrazione (es: Four Parameter Logistic).

8.3. Calcolo dei risultati

Interpolare, dal grafico, i valori di assorbanza relativi a ciascun campione e leggerne la corrispondente concentrazione in ng/mL.

9. VALORI DI RIFERIMENTO

I seguenti valori possono essere usati come guida preliminare fino a quando ogni laboratorio stabilisce i propri valori normali.

A.M.	3 – 10 ng/mL
P.M.	0,6 – 2,5 ng/mL

È importante tenere presente che la determinazione di un range di valori attesi in un dato metodo per una popolazione "normale" è dipendente da molteplici fattori, quali la specificità e sensibilità del metodo in uso, e la popolazione in esame. Perciò ogni laboratorio dovrebbe considerare i range indicati dal Fabbricante come un'indicazione generale e produrre range di valori attesi propri basati sulla popolazione indigena dove il laboratorio risiede.

10. PARAMETRI CARATTERISTICI

10.1. Precisione

10.1.1. Intra-Assay

La variabilità all'interno dello stesso kit è stata determinata replicando (20x) la misura di tre differenti campioni di saliva. La variabilità intra-assay è 10%.

10.1.2. Inter-Assay

La variabilità tra kit differenti è stata determinata replicando (10x) la misura di tre differenti campioni di saliva di controllo con kit appartenenti a lotti diversi. La variabilità inter-assay è 8.3%.

10.2. Accuratezza

La prova di recupero condotta su campione di saliva arricchito con 6,25 – 12,5 – 25 – 50 ng/mL di Cortisolo ha dato un valore medio (\pm SD) di 95,42% \pm 9,11%.

10.3. Sensibilità

La concentrazione minima di Cortisolo misurabile che può essere distinta dal Calibratore 0 è 0,12 ng/mL con un limite di confidenza del 95%.

10.4. Specificità

L'anticorpo impiegato presenta le seguenti reazioni crociate, calcolate al 50% secondo Abraham:

Cortisol	100 %
Prednisolone	46.2 %
11-Deoxycortisol	4 %
Cortisone	3.69 %
Prednisone	3.1 %
11 α OH Progesterone	1 %
Progesterone	< 0.1 %
Aldosterone	< 0.1 %
Pregnenolone	< 0.1 %
17 β Estradiolo	< 0.1 %
Estrone 3-solfato	< 0.1 %
Estriolo	< 0.1 %

Testosterone	< 0.1 %
Spironolactone	< 0.1 %
DHEA	< 0.1 %
DHEA-S	< 0.1 %
Androstenedione	< 0.1 %
Androsterone	< 0.1 %
DHT	< 0.1 %
Danazolo	< 0.1 %
Colesterolo	< 0.1 %
Desametasone	< 0.1 %

10.5. Correlazione

Il nuovo kit Diametra Cortisol saliva ELISA è stato comparato con il precedente kit Diametra Cortisol saliva ELISA. Sono stati testati 35 campioni di saliva.

La curva di regressione è:

$$Y = 0,94 * X - 0,11$$

$$r^2 = 0,799$$

BIBLIOGRAFIA

- Foster L.B. and Dunn, R.T. Clin. Chem: 20/3, 365 (1974)
- De Lacerda L., et al J. Clin. Endocr. Metab. 36, 227 (1973)
- Rolleri E., et al Clin chim Acta 66 319 (1976)
- Kobayashi, Y., et al Steroids, 32 (1) (1978)
- Arakawa H., et al Anal. Biochem. 97 248 (1979)
- Kirschbaum C. et al, Psychoneuroendocrinology, 19: 313-333
- Cristina Mihaela Ghiciuc C.M et al., Neuroendocrinol Lett 2011; 32(4):475-480

Ed. 01/2015

DCM020-10

DiaMetra S.r.l. Headquater: Via Calabria 15,
20090 SEGRATE (MI) Italy
Tel. +39-02-2139184
Fax +39-02-2133354

Manufactory: Via Pozzuolo 14,
06038 SPELLO (PG) Italy
Tel. +39-0742-24851
Fax +39-0742-316197
E-mail: info@diametra.com



DCM020-10
Ed. 01/2015

CORTISOL SALIVA ELISA

for routine analysis

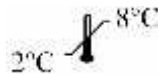
Direct immunoenzymatic determination of Cortisol in saliva.

IVD



LOT

See external label



Σ = 96 tests

REF DKO020

INTENDED USE

Competitive immunoenzymatic colorimetric method for quantitative determination of Cortisol concentration in saliva.

Cortisol Saliva ELISA kit is intended for laboratory use only.

1. CLINICAL SIGNIFICANCE

Cortisol is a steroid hormone released from the adrenal cortex in response to a hormone called ACTH (produced by the pituitary gland), it is involved in the response to stress; it increases blood pressure, blood sugar levels, may cause infertility in women, and suppresses the immune system.

Cortisol acts through specific intracellular receptors and has effects in numerous physiologic systems, including immune function, glucose-counter regulation, vascular tone, substrate utilization and bone metabolism. Cortisol is excreted primarily in urine in an unbound (free) form.

The majority of cortisol in saliva is not-bound and enters the saliva via intracellular mechanisms. Salivary cortisol levels are unaffected by salivary flow rate or salivary enzymes.

It is a high correlations between serum and saliva cortisol levels

These normal endogenous functions are the basis for the physiological consequences of chronic stress - prolonged cortisol secretion causes muscle wastage, hyperglycaemia, and suppresses immune/inflammatory responses. The same consequences arise from long-term use of glucocorticoid drugs.

2. PRINCIPLE

The Cortisol (antigen) in the sample competes with the antigenic Cortisol conjugated with horseradish peroxidase (HRP) for binding to the limited number of antibodies anti Cortisol coated on the microplate (solid phase).

After incubation, the bound/free separation is performed by a simple solid-phase washing.

Then, the enzyme HRP in the bound-fraction reacts with the Substrate (H_2O_2) and the TMB Substrate and develops a blu color that changes into yellow when the Stop Solution (H_2SO_4) is added.

The colour intensity is inversely proportional to the Cortisol concentration of in the sample.

Cortisol concentration in the sample is calculated through a calibration curve.

3. REAGENTS, MATERIALS AND INSTRUMENTATION

3.1. Reagents and materials supplied in the kit

1. Calibrators (7 vials, 1 mL each)

CAL0	REF	DCE002/2006-0
CAL1	REF	DCE002/2007-0
CAL2	REF	DCE002/2008-0
CAL3	REF	DCE002/2009-0
CAL4	REF	DCE002/2010-0
CAL5	REF	DCE002/2011-0
CAL6	REF	DCE002/2012-0

2. Incubation Buffer (1 vial, 30 mL)

Phosphate buffer 50 mM pH 7.4, BSA 1 g/L

REF DCE001-0

3. Conjugate (1 vial, 1 mL)

Cortisol conjugated to horseradish peroxidase (HRP)

REF DCE002/2002-0

4. Coated Microplate (1 breakable microplate)

Antibody anti Cortisol adsorbed on microplate

REF DCE002/2003-0

5. TMB Substrate (1 vial, 15 mL)

H_2O_2 -TMB 0.26 g/L (avoid any skin contact)

REF DCE004-0

6. Stop Solution (1 vial, 15 mL)

Sulphuric acid 0.15 mol/L (avoid any skin contact)

REF DCE005-0

7. 10X Conc. Wash Solution (1 vial, 50 mL)

Phosphate buffer 0.2M pH 7.4

REF DCE054-0

3.2. Reagents necessary not supplied

Distilled water.

3.3. Auxiliary materials and instrumentation

Automatic dispenser.

Microplates reader (450 nm, 620-630 nm)

Saliva Collection Device

REF DKO063

Salivette Sarstedt

REF 51.1534.500

Note

Store all reagents at 20±8°C in the dark.

Open the bag of reagent 4 (Coated Microplate) only when it is at room temperature and close it immediately after use; once opened, it is stable up to expiry date of the kit.

4. WARNINGS

- This kit is intended for in vitro use by professional persons only. Not for internal or external use in Humans or Animals.
- Use appropriate personal protective equipment while working with the reagents provided.
- Follow Good Laboratory Practice (GLP) for handling blood products.
- Some reagents contain small amounts of Proclin 300^R as preservative. Avoid the contact with skin or mucosa.
- The TMB Substrate contains an irritant, which may be harmful if inhaled, ingested or absorbed through the skin. To prevent injury, avoid inhalation, ingestion or contact with skin and eyes.
- The Stop Solution consists of a diluted sulphuric acid solution. Sulphuric acid is poisonous and corrosive and can be toxic if ingested. To prevent chemical burns, avoid contact with skin and eyes.
- Avoid the exposure of reagent TMB/H₂O₂ to directed sunlight, metals or oxidants. Do not freeze the solution.
- This method allows the determination of Cortisol from 0.5 ng/mL to 100 ng/mL.
- The clinical significance of the Cortisol determination can be invalidated if the patient was treated with corticosteroids or natural or syntetic steroids.

5. PRECAUTIONS

- Please adhere strictly to the sequence of pipetting steps provided in this protocol. The performance data represented here were obtained using specific reagents listed in this Instruction For Use.
- All reagents should be stored refrigerated at 2-8°C in their original container. Any exceptions are clearly indicated. The reagents are stable until the expiry date when stored and handled as indicated.
- Allow all kit components and specimens to reach room temperature (22-28°C) and mix well prior to use.
- Do not interchange kit components from different lots. The expiry date printed on box and vials labels must be observed. Do not use any kit component beyond their expiry date.
- If you use automated equipment, the user has the responsibility to make sure that the kit has been appropriately tested.
- The incomplete or inaccurate liquid removal from the wells could influence the assay precision and/or increase the background. To improve the performance of the kit on automatic systems is recommended to increase the number of washes.
- It is important that the time of reaction in each well is held constant for reproducible results. Pipetting of samples should not extend beyond ten minutes to avoid assay drift. If more than 10 minutes are

needed, follow the same order of dispensation. If more than one plate is used, it is recommended to repeat the dose response curve in each plate

- Addition of the TMB Substrate solution initiates a kinetic reaction, which is terminated by the addition of the Stop Solution. Therefore, the TMB Substrate and the Stop Solution should be added in the same sequence to eliminate any time deviation during the reaction.
- Observe the guidelines for performing quality control in medical laboratories by assaying control samples.
- Maximum precision is required for reconstitution and dispensation of reagents.
- Plate readers measure vertically. Do not touch the bottom of the wells.

6. PROCEDURE

6.1. Preparation of the Calibrators (C₀...C₆)

Before using, leave the Calibrators on a rotating mixer for at least 5 minutes.

The Calibrators are ready to use and have the following concentration of Cortisol:

	C ₀	C ₁	C ₂	C ₃	C ₄	C ₅	C ₆
ng/mL	0	0.5	1	5	10	20	100

Once opened, the Calibrators are stable six months at 2-8°C.

For SI Units: ng/mL x 2,76 = nmol/L

6.2. Preparation of Diluted Conjugate

Prepare immediately before use.

Add 10 µL of Conjugate (reagent 3) to 1 mL of Incubation Buffer (reagent 2).

Mix gently. Stable for 3 hours at room temperature (22-28°C).

6.3. Preparation of Wash Solution

Dilute the content of each vial of the "10X Conc. Wash Solution" with distilled water to a final volume of 500 mL prior to use. For smaller volumes respect the 1:10 dilution ratio. The diluted wash solution is stable for 30 days at 2-8°C.

In concentrated wash solution is possible to observe the presence of crystals; in this case mix at room temperature until the complete dissolution of crystals; for greater accuracy, dilute the whole bottle of concentrated wash solution to 500 mL, taking care to transfer completely the crystals, then mix until crystals are completely dissolved.

6.4. Preparation of the Sample

The determination of Cortisol should be performed in saliva.

It is recommended to collect saliva samples with a centrifuge glass tube and a plastic straw, with the Diametra Saliva Collection Device or with the "Salivette" (Sarstedt, Ref. 511534500). Other commercially available sample collector devices have not been tested.

6.4.1. Method and Limitations

Collect saliva samples at the times indicated.

If no specific instructions have been given, saliva samples may be collected at any time; however the following should be noted:

- If saliva is collected in the morning ensure that this is carried out prior to brushing teeth
- During the day allow 1 hour after a meal, oral intake of pharmaceutical drugs or tooth cleaning.
- It is very important that a good clear sample is received – i.e. no contamination with food, lipstick, blood (bleeding gums) or other such extraneous materials.

6.4.2. Saliva Processing Instructions with Saliva Collection Device Diametra

- Let the saliva flow down through the straw into the centrifuge glass tube.
- Centrifuge the sample for 15 minutes at 3000 rpm
- Store at – 20°C for at least 1 hour
- Centrifuge again for 15 minutes at 3000 rpm
- The saliva sample is now ready to be tested.
- Store the sample at 2-8°C for one week or at – 20°C for longer time.

6.4.3. Saliva Processing Instructions with Salivette Sardstedt

- Remove the swab from the suspended insert of the Salivette
- Gently chewing the swab for 1 minute produces a sufficient quantity of saliva.
- Replace the swab into the Salivette and firmly close the tube using the stopper.
- Centrifuge the Salivette for 2 minutes at 1000g (rcf) for saliva generation.
- Remove the insert complete with the swab from the centrifuge vessel and discard. The clear saliva is now ready for analysis (at least 1 mL of saliva should be recovered with this method).

6.5. Procedure

- Allow all reagents to reach room temperature (22-28°C).** At the end of the assay, store immediately the reagents at 2-8°C: avoid long exposure to room temperature.
- Unused coated microwell strips should be released securely in the foil pouch containing desiccant and stored at 2-8°C.
- To avoid potential microbial and/or chemical contamination, unused reagents should never be transferred into the original vials.
- As it is necessary to perform the determination in duplicate in order to improve accuracy of the test results, prepare two wells for each point of the calibration curve (C₀-C₆), two for each Control, two for each sample, one for Blank.

Reagent	Calibrator	Samples	Blank
Calibrator C ₀ -C ₆	25 µL		
Samples		25 µL	
Diluted Conjugate	200 µL	200 µL	
Incubate at 37°C for 1 hour. Remove the contents from each well. Wash the wells 3 times with 300 µL of diluted wash solution. Important note: during each washing step, gently shake the plate for 5 seconds and remove excess solution by tapping the inverted plate on an absorbent paper towel. Automatic washer: in case you use an automatic washer, it is advised to do 6 washing steps.			
TMB Substrate	100 µL	100 µL	100 µL
Incubate at room temperature (22÷28°C) for 15 minutes in the dark.			
Stop Solution	100 µL	100 µL	100 µL
Shake gently the microplate. Read the absorbance (E) at 450 nm against a reference wavelength of 620-630 nm or against Blank within 5 minutes.			

7. QUALITY CONTROL

Each laboratory should assay controls at normal, high and low levels range of Cortisol for monitoring assay performance. These controls should be treated as unknowns and values determined in every test procedure performed. Quality control charts should be maintained to follow the performance of the supplied reagents. Pertinent statistical methods should be employed to ascertain trends. The individual laboratory should set acceptable assay performance limits. Other parameters that should be monitored include the 80, 50 and 20% intercepts of the calibration curve for run-to-run reproducibility. In addition, maximum absorbance should be consistent with past experience. Significant deviation from established performance can indicate unnoticed change in experimental conditions or degradation of kit reagents. Fresh reagents should be used to determine the reason for the variations.

8. RESULTS

8.1. Mean Absorbance

Calculate the mean of the absorbance (E_m) for each point of the calibration curve (C₀-C₆) and of each sample.

8.2. Calibration curve

Plot the mean value (E_m) of absorbance of the Calibrators (C₀-C₆) against concentration. Draw the best-fit curve through the plotted points. (es: Four Parameter Logistic).

8.3. Calculation of Results

Interpolate the values of the samples on the calibration curve to obtain the corresponding values of the concentrations expressed in ng/mL.

9. REFERENCE VALUES

The following values can be used as preliminary guideline until each laboratory established its own normal range.

A.M.	3 – 10 ng/mL
P.M.	0.6 – 2.5 ng/mL

Please pay attention to the fact that the determination of a range of expected values for a “normal” population in a given method is dependent on many factors, such as specificity and sensitivity of the method used and type of population under investigation. Therefore each laboratory should consider the range given by the Manufacturer as a general indication and produce their own range of expected values based on the indigenous population where the laboratory works.

10. PERFORMANCE AND CHARACTERISTICS

10.1. Precision

10.1.1. Intra Assay Variation

Within run variation was determined by replicate (20x) the measurement of three different saliva samples in one assay. The within assay variability is 10%.

10.1.2. Inter Assay Variation

Between run variation was determined by replicate (10x) the measurement of three different saliva samples in different lots of kits. The between assay variability is 8.3%.

10.2. Accuracy

The recovery of 6.25 - 12.5 - 25 - 50 ng/mL of Cortisol added to a saliva sample gave an average value (\pm SD) of 95.42% \pm 9.11% with reference to the original concentrations.

10.3. Sensitivity

The lowest detectable concentration of Cortisol that can be distinguished from the Calibrator 0 is 0.12 ng/mL at the 95% confidence limit.

10.4. Specificity

The cross reaction of the antibody calculated at 50% according to Abraham are shown in the table:

Cortisol	100 %
Prednisolone	46.2 %
11-Deoxycortisol	4 %
Cortisone	3.69 %
Prednisone	3.10 %
11 α OH Progesterone	1 %
Progesterone	< 0.1 %
Aldosterone	< 0.1 %
Pregnenolone	< 0.1 %
17b Estradiol	< 0.1 %
Estrone 3-solfato	< 0.1 %

Estriol	< 0.1 %
Testosterone	< 0.1 %
Spiroinolactone	< 0.1 %
DHEA	< 0.1 %
DHEA-S	< 0.1 %
Androstenedione	< 0.1 %
Androsterone	< 0.1 %
DHT	< 0.1 %
Danazol	< 0.1 %
Cholesterol	< 0.1 %
Dexamethasone	< 0.1 %

10.5. Correlation

The new Diametra Cortisol saliva ELISA kit was compared to the old Diametra Cortisol saliva ELISA kit. 35 saliva samples were analysed.

The linear regression curve was calculated:

$$Y = 0.94 \cdot X - 0.11$$

$$r^2 = 0.799$$

11. WASTE MANAGEMENT

Reagents must be disposed off in accordance with local regulations.

BIBLIOGRAPHY

- Foster, L. B. and Dunn, R.T. Clin. Chem: 20/3, 365 (1974)
- De Lacerda L, et al J. Clin. Endocr. and Metab: 36, 227 (1973)
- Rolleri, E., et al Clin chim Acta 66 319 (1976)
- Kobayashi, Y., et al Steroids, 32 no. 1 (1978)
- Arakawa, H., et al Anal. Biochem. 97 248 (1979)
- Kirschbaum C. et al, Psychoneuroendocrinology, 19: 313-333
- Cristina Mihaela Ghiciuc C.M et al., Neuroendocrinol Lett 2011; **32**(4):475–480

Ed. 01/2015






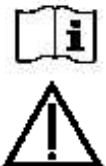




DCM020-10

DiaMetra S.r.l. Headquater: Via Calabria 15,
20090 SEGRATE (MI) Italy
Tel. +39-02-2139184
Fax +39-02-2133354

Manufactory: Via Pozzuolo 14,
06038 SPELLO (PG) Italy
Tel. +39-0742-24851
Fax +39-0742-316197
E-mail: info@diametra.com

	DIA.METRA SRL	
Mod. PIS	PACKAGING INFORMATION SHEET	

IT*Spiegazione dei simboli***GB***Explanation of symbols***FR***Explication des symboles***ES***Significado de los simbolos***DE***Verwendete Symbole***PT***Explicação dos simbolos*

	DE In vitro Diagnostikum ES Producto sanitario para diagnóstico In vitro FR Dispositif medical de diagnostic in vitro GB In vitro Diagnostic Medical Device IT Dispositivo medico-diagnostico in vitro PT Dispositivos medicos de diagnostico in vitro		DE Hergestellt von ES Elaborado por FR Fabriqué par GB Manufacturer IT Produttore PT Produzido por
REF	DE Bestellnummer ES Número de catálogo FR Références du catalogue GB Catalogue number IT Numero di Catalogo PT Número do catálogo	 yyyy-mm	DE Herstellungs datum ES Fecha de fabricacion FR Date de fabrication GB Date of manufacture IT Data di produzione PT Data de produção
 yyyy-mm-dd	DE Verwendbar bis ES Estable hasta (usar antes de último día del mes) FR Utiliser avant (dernier jour du mois indiqué) GB Use by (last day of the month) IT Utilizzare prima del (ultimo giorno del mese) PT Utilizar (antes ultimo dia do mês)		DE Biogefährdung ES Riesco biológico FR Risque biologique GB Biological risk IT Rischio biologico PT Risco biológico
	DE Gebrauchsanweisung beachten ES Consultar las instrucciones FR Consulter le mode d'emploi GB Consult instructions for use IT Consultare le istruzioni per l'uso PT Consultar instruções para uso		DE Chargenbezeichnung ESCodigo de lote FR Numero de lot GB Batch code IT Codice del lotto PT Codigo do lote
 = xx	DE Ausreichend für "n" Tests ES Contenido suficiente para "n" tests FR Contenu suffisant pour "n" tests GB Contains sufficient for "n" tests IT Contenuto sufficiente per "n" saggi PT Contém o suficiente para "n" testes		DE Inhalt ES Contenido del estuche FR Contenu du coffret GB Contents of kit IT Contenuto del kit PT Conteúdo do kit
 Max Min	DE Temperaturbereich ES Límitación de temperatura FR Limites de température de conservation GB Temperature limitation IT Limiti di temperatura PT Temperaturas limites de conservação		

	DIA.METRA SRL	
Mod. PIS	PACKAGING INFORMATION SHEET	

SUGGERIMENTI PER LA RISOLUZIONE DEI PROBLEMI/TROUBLESHOOTING

ERRORE CAUSE POSSIBILI/ SUGGERIMENTI

Nessuna reazione colorimetrica del saggio

- mancata dispensazione del coniugato
- contaminazione del coniugato e/o del Substrato
- errori nell'esecuzione del saggio (es. Dispensazione accidentale dei reagenti in sequenza errata o provenienti da flaconi sbagliati, etc.)

Reazione troppo blanda (OD troppo basse)

- coniugato non idoneo (es. non proveniente dal kit originale)
- tempo di incubazione troppo breve, temperatura di incubazione troppa bassa

Reazione troppo intensa (OD troppo alte)

- coniugato non idoneo (es. non proveniente dal kit originale)
- tempo di incubazione troppo lungo, temperatura di incubazione troppa alta
- qualità scadente dell'acqua usata per la soluzione di lavaggio (basso grado di deionizzazione)
- lavaggi insufficienti (coniugato non completamente rimosso)

Valori inspiegabilmente fuori scala

- contaminazione di pipette, puntali o contenitori- lavaggi insufficienti (coniugato non completamente rimosso)

CV% intrasaggio elevato

- reagenti e/o strip non portate a temperatura ambiente prima dell'uso
- il lavatore per micropiastre non lava correttamente (suggerimento: pulire la testa del lavatore)

CV% intersaggio elevato

- condizioni di incubazione non costanti (tempo o temperatura)
- controlli e campioni non dispensati allo stesso tempo (con gli stessi intervalli) (controllare la sequenza di dispensazione)
- variabilità intrinseca degli operatori

ERROR POSSIBLE CAUSES / SUGGESTIONS

No colorimetric reaction

- no conjugate pipetted reaction after addition
- contamination of conjugates and/or of substrate
- errors in performing the assay procedure (e.g. accidental pipetting of reagents in a wrong sequence or from the wrong vial, etc.)

Too low reaction (too low ODs)

- incorrect conjugate (e.g. not from original kit)
- incubation time too short, incubation temperature too low

Too high reaction (too high ODs)

- incorrect conjugate (e.g. not from original kit)
- incubation time too long, incubation temperature too high
- water quality for wash buffer insufficient (low grade of deionization)
- insufficient washing (conjugates not properly removed)

Unexplainable outliers

- contamination of pipettes, tips or containers
- insufficient washing (conjugates not properly removed) too high within-run
- reagents and/or strips not pre-warmed to CV% Room Temperature prior to use
- plate washer is not washing correctly (suggestion: clean washer head)
- too high between-run - incubation conditions not constant (time, CV % temperature)
- controls and samples not dispensed at the same time (with the same intervals) (check pipetting order)
- person-related variation