



**KIT DE DOSAGE IMMUNO-ENZYMATIQUE (EIA)**  
quantitatif de la  
**COTININE SALIVAIRE**  
ultrasensible



Pour diagnostic *in vitro*

Référence catalogue 1-2112, kit de 96 puits (kit unique) ;  
1-2112-5, 480 puits (boîte de 5)



101 Innovation Boulevard • Suite 302 • State College, PA 16803  
1.800.790.2258 • [support@salimetrics.com](mailto:support@salimetrics.com) • [salimetrics.com](http://salimetrics.com)

# TABLE DES MATIÈRES

Utilisation prévue .....	3
Introduction .....	3
Principe du test .....	4
Précautions de sécurité .....	5
Informations générales concernant l'utilisation du kit .....	6
Stockage .....	6
Indicateur de pH .....	7
Recueil de l'échantillon .....	7
Manipulation et préparation des échantillons .....	7
Matériel fourni avec le kit unique .....	8
Matériel nécessaire non fourni .....	9
Préparation des réactifs .....	10
Procédure .....	11
Contrôle qualité .....	13
Calculs .....	13
Résultats attendus .....	13
Limites .....	14
Exemples de gammes de concentrations de la cotinine salivaire .....	14
Caractéristiques de performance du kit d'EIA quantitatif de la cotinine salivaire	16
Références .....	18
Garantie limitée du vendeur .....	19



## Utilisation prévue

Le kit de dosage immuno-enzymatique de la cotinine de Salimetrics® est un test d'immunodosage compétitif spécifiquement conçu et validé pour la mesure quantitative *in vitro* de la cotinine salivaire. Ce kit peut être utilisé pour mesurer l'exposition active ou passive à la nicotine. Il n'est pas conçu pour le diagnostic de l'intoxication à la nicotine. L'utilisation de ce kit avec des échantillons sériques ou plasmatiques n'est pas validée par Salimetrics. Un protocole urinaire validé est toutefois disponible sur demande.

***Veillez lire la notice du kit dans son intégralité avant de réaliser le test. Tout non-respect de la procédure et des recommandations relatives au prélèvement salivaire et à la manipulation des échantillons pourrait entraîner des résultats inexacts.***

Pour plus d'informations sur ce kit, son utilisation ou les procédures décrites dans cette notice, contactez le service technique de Salimetrics ou votre représentant commercial local.

## Introduction

Depuis les temps primitifs, les feuilles de tabac sont transformées et utilisées par les humains pour délivrer de la nicotine au système nerveux central. Les voies d'administration de la nicotine privilégiées par les utilisateurs ont évolué avec le temps : tabac à priser, à chiquer, ou inhalation de la fumée de feuilles de tabac brûlées et, plus récemment, patchs transdermiques, gommes à mâcher et inhalateurs sans fumée. Quelle que soit sa voie d'administration, la nicotine possède des propriétés addictives qui poussent l'utilisateur à continuer de consommer malgré ses efforts pour arrêter. Lorsque les feuilles de tabac sont fumées sous forme de cigarette, la nicotine est absorbée et se diffuse dans l'organisme en quelques secondes. Le principal métabolisme est l'oxydation en cotinine et en nicotine N-oxyde. De nombreuses publications documentent les conséquences économiques et sanitaires de l'exposition à la nicotine. Le coût associé à l'exposition à la nicotine, à l'échelle individuelle et de la société, a entraîné l'adoption généralisée de mesures sanitaires visant à freiner la consommation de nicotine.

La mesure de la cotinine est la méthode privilégiée pour détecter une exposition à la fumée de tabac. La nicotine n'est pas considérée comme un marqueur fiable du tabagisme, sa demi-vie étant relativement courte (environ 2 heures). À l'inverse, la cotinine a une demi-vie moyenne de 17 heures et ses concentrations sanguines sont étroitement liées à la dose de nicotine absorbée à partir de la fumée de tabac. La salive est plus facile à prélever que le sang, et les concentrations salivaires sont fortement corrélées aux concentrations sanguines, les deux étant interchangeables (1).

Les tests de détection de la cotinine salivaire commercialisés sont principalement des tests qualitatifs. Ils donnent un résultat positif ou négatif quant à l'exposition au tabac/à la nicotine. En revanche, de nombreuses études mettent en évidence des différences inter-individuelles importantes en ce qui concerne les concentrations salivaires de cotinine.



101 Innovation Boulevard • Suite 302 • State College, PA 16803  
1.800.790.2258 • support@salimetrics.com • salimetrics.com

Ces différences s'expliquent entre autres par des facteurs liés à des prédispositions intrinsèques et extrinsèques qui influencent la physiologie du métabolisme de la nicotine, par la dose de nicotine présente dans la source et par des comportements de santé liés à l'utilisation de la nicotine (p. ex., rétention de la fumée dans les poumons, durée et fréquence des bouffées) (2). Il y a un avantage certain à proposer des méthodes peu coûteuses, précises, quantitatives et non invasives de détermination de la consommation de nicotine, capables de mesurer les conséquences physiologiques immédiates des différences individuelles et des variations inter-individuelles en termes de comportement des utilisateurs, et de déterminer l'exposition secondaire à la fumée de tabac. Salimetrics a conçu ce test dans l'objectif de fournir à la communauté médicale une méthode fiable et de haute sensibilité.

Les concentrations de cotinine dans les liquides biologiques ont été mesurées à l'aide de méthodes chromatographiques (chromatographie en phase gazeuse [CPG] ou chromatographie liquide haute performance [CLHP], parfois couplées à la spectrométrie de masse [SM]) et d'immunodosage. Ces méthodes présentent une meilleure spécificité et une sensibilité plus élevée (1), mais les résultats de l'EIA montrent une concordance quasi parfaite avec le statut tabagique confirmé par la CPG-SM (3). Par ailleurs, les méthodes d'immunodosage utilisent des échantillons de plus petit volume que les méthodes chromatographiques et ne nécessitent aucune extraction ni autre manipulation des échantillons, ce qui facilite leur utilisation dans des études épidémiologiques de grande ampleur et évite le recours à des laboratoires spécialisés (4,5). Les concentrations peuvent toutefois être plus élevées avec l'EIA, car les métabolites de la cotinine (tels que la 3-OH-cotinine) sont également mesurés (1).

## Principe du test

Il s'agit d'un kit d'immunodosage compétitif. La cotinine présente dans les étalons et dans les échantillons entre en compétition avec la cotinine conjuguée à la peroxydase de raifort pour les sites de liaison des anticorps sur une plaque de microtitration. Après incubation, les composants non liés sont éliminés par lavage. Le conjugué enzymatique lié de la cotinine est mesuré par la réaction de l'enzyme (la peroxydase de raifort) au substrat (le tétraméthylbenzidine [TMB]). Cette réaction produit une coloration bleue. Une coloration jaune se produit après arrêt de la réaction à l'aide d'une solution acide. La densité optique est lue sur un lecteur de plaques standard à 450 nm. La quantité de conjugué enzymatique de la cotinine détectée est inversement proportionnelle à la quantité de cotinine présente dans l'échantillon (6).



101 Innovation Boulevard • Suite 302 • State College, PA 16803  
1.800.790.2258 • support@salimetrics.com • salimetrics.com

## Précautions de sécurité

**Lire les fiches de données de sécurité avant de manipuler les réactifs.**

### *Ingrédients dangereux*

La solution d'arrêt est corrosive. Utiliser avec précaution. Nous recommandons de suivre les procédures suivantes pour tous les réactifs du kit.

### *Manipulation*

Respecter les bonnes pratiques de laboratoire lors de la manipulation des réactifs du kit. Le port d'une blouse de laboratoire, de gants et de lunettes de protection est recommandé. Essuyer les liquides renversés à l'aide d'un matériau absorbant en portant des vêtements de protection. Respecter la réglementation locale concernant l'élimination.

### *Mesures d'urgence en cas d'exposition*

En cas de contact, rincer immédiatement la peau ou les yeux à l'eau pendant 15 minutes. Retirer les vêtements contaminés. En cas d'inhalation, faire respirer de l'air frais. Si la personne présente des difficultés respiratoires, appeler un médecin.

Les informations ci-dessus sont jugées exactes mais ne sont pas exhaustives. Elles sont fournies uniquement à titre indicatif. La responsabilité de Salimetrics ne saurait être engagée en cas d'accident ou de dommage résultant d'une mauvaise utilisation du produit.

Les **fiches de données de sécurité** sont disponibles sur demande auprès de Salimetrics à l'adresse [support@salimetrics.com](mailto:support@salimetrics.com) (consulter le site [www.salimetrics.com](http://www.salimetrics.com) pour connaître les autres options de contact).



101 Innovation Boulevard • Suite 302 • State College, PA 16803  
1.800.790.2258 • [support@salimetrics.com](mailto:support@salimetrics.com) • [salimetrics.com](http://salimetrics.com)

## Informations générales concernant l'utilisation du kit

- Le kit contient des barrettes de microtitration sécables. Il est possible de ne pas utiliser tous les puits de la plaque. Les puits inutilisés doivent être conservés à une température comprise entre 2 et 8 °C dans le sachet avec le dessiccant et doivent être utilisés dans le cadre fourni.
- Éviter toute contamination microbienne des réactifs lorsqu'ils sont entamés. Salimetrics recommande d'utiliser les réactifs entamés dans un délai d'un mois. Conserver tous les réactifs à une température comprise entre 2 et 8 °C.
- La quantité de réactif fournie dans le kit unique est suffisante pour trois analyses partielles. Si tous les puits de la plaque ne sont pas utilisés, les volumes de tampon de lavage et de conjugué enzymatique préparés doivent être réduits en conséquence, en conservant le même rapport de dilution.
- Ne pas mélanger les composants de différents lots de kits.
- Pour garantir une qualité optimale des résultats du test, le pipetage des échantillons et des réactifs doit se faire le plus rapidement possible (sans interruption) d'un bout à l'autre de la plaque. Idéalement, ce processus ne doit pas prendre plus de 20 minutes.
- Si une pipette multicanaux est utilisée pour le transfert des réactifs, veiller à toujours ajouter les réactifs dans le même ordre afin que le temps d'incubation soit le même pour tous les puits.
- Si plusieurs plaques ou jeux de barrettes sont analysés, une courbe d'étalonnage doit être établie pour chaque plaque et/ou jeu de barrettes.
- La température du laboratoire peut avoir une incidence sur les analyses. Les kits Salimetrics sont validés à une température comprise entre 20 et 23,3 °C. Une température inférieure ou supérieure peut influencer les valeurs de densité optique.
- L'étalonnage de routine des pipettes et autre matériel est essentiel pour une performance optimale du test.
- Lors de l'agitation des plaques durant les procédures du test, éviter les vitesses entraînant un déversement du contenu des puits.
- Retirer le film adhésif de la plaque avec précaution afin d'éviter tout déversement ou contamination croisée des puits après l'incubation à 37 C.
- Nous recommandons de conserver tous les réactifs jusqu'à ce que l'analyse des données confirme le succès du test, pour faciliter la résolution des éventuels problèmes.
- Avant d'ajouter l'échantillon, étiqueter chaque barrette pour garantir la bonne orientation de la plaque et le bon ordre des échantillons lors de l'acquisition des données sur le lecteur de plaques.

## Stockage

Avant ouverture, tous les composants du kit sont stables à une température comprise entre 2 et 8 °C jusqu'à la date de péremption du kit.



101 Innovation Boulevard • Suite 302 • State College, PA 16803  
1.800.790.2258 • support@salimetrics.com • salimetrics.com

## Indicateur de pH

Les valeurs de cotinine obtenues avec des échantillons ayant un pH  $\leq 3,5$  ou  $\geq 9$  pourraient être inexactes. Un indicateur de pH dans le diluant du test indique à l'utilisateur les échantillons ayant un pH trop bas ou trop élevé. Lors de l'ajout du diluant du test, les échantillons acides prendront une coloration jaune et les échantillons alcalins une coloration mauve. Une coloration jaune foncé ou mauve foncé du puits indique que le pH de l'échantillon doit être mesuré à l'aide d'une bandelette indicatrice de pH. En cas de pH  $\leq 3,5$  ou  $\geq 9$ , un nouvel échantillon doit être recueilli.

## Recueil de l'échantillon

Éviter de prélever l'échantillon dans les 60 minutes suivant la prise d'un repas et dans les 12 heures suivant la consommation d'alcool. Les aliments acides ou à forte teneur en sucre peuvent compromettre la performance du test car ils diminuent le pH de l'échantillon et influencent le développement des bactéries. Afin de limiter l'impact de ces facteurs, le donneur doit se rincer soigneusement la bouche à l'eau 10 minutes avant le recueil de l'échantillon.

Recueillir la salive totale par salivation passive non stimulée. Le donneur peut pencher la tête en avant afin que la salive s'écoule sur le plancher buccal jusque dans le tube en polypropylène en passant à travers le dispositif de recueil SalivaBio. Les protocoles/méthodes de recueil sont disponibles en ligne à l'adresse [www.salimetrics.com](http://www.salimetrics.com) ou sur simple demande.

Noter la date et l'heure de recueil de l'échantillon.

## Manipulation et préparation des échantillons

Après le recueil, il est important de conserver l'échantillon au froid pour éviter toute prolifération bactérienne. Placer l'échantillon au réfrigérateur dans les 30 minutes suivant le recueil, puis le congeler à une température inférieure ou égale à  $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$  dans les 4 heures suivant le recueil. (Les échantillons peuvent être conservés à  $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$  pendant 6 mois.) En cas de stockage à long terme, consulter le livret d'informations de Salimetrics sur le prélèvement et la manipulation des échantillons (*Collection and Handling Advice Booklet*).

***Ne pas ajouter d'azoture de sodium (conservateur) aux échantillons de salive car cela pourrait fausser l'immunodosage.***

Le jour de l'analyse, décongeler complètement les échantillons de salive, les passer au vortex puis les centrifuger à 1 500 g pendant 15 minutes. La congélation des échantillons de salive entraîne la précipitation des mucines. La centrifugation élimine les mucines et autres particules susceptibles de perturber la liaison aux anticorps et de fausser les résultats. Les échantillons doivent être ramenés à température ambiante avant le transfert dans les puits. Pipeter la salive claire dans les puits appropriés.



101 Innovation Boulevard • Suite 302 • State College, PA 16803  
1.800.790.2258 • [support@salimetrics.com](mailto:support@salimetrics.com) • [salimetrics.com](http://salimetrics.com)

Recongeler les échantillons de salive dès que possible après le transfert. Recentrifuger les échantillons à chaque décongélation. Éviter les cycles de congélation/décongélation répétés.

SEULS les échantillons de salive recueillis chez des fumeurs doivent être dilués pour ce test. Pour plus d'informations, voir la section *Procédure*.

## Matériel fourni avec le kit unique

	Article	Quantité/taille
1	<b>Plaque de microtitration</b>	1/96 puits
2	<b>Étalon de cotinine</b> 200 ng/mL dans une matrice salivaire. Contient : cotinine, tampon, conservateur.	1 flacon/500 µL
3	<b>Contrôles de cotinine</b> Concentration élevée (Ctrl-H), concentration faible (Ctrl-L), dans une matrice salivaire. Prêt à l'emploi. Contient : cotinine, tampon, conservateur.	2 flacons/250 µL par flacon
4	<b>Conjugué enzymatique de la cotinine</b> Concentré. À diluer avec le diluant du test avant utilisation. (Voir l'étape 7 de la section <i>Procédure</i> .) Contient : conjugué cotinine-peroxydase de raifort, conservateur.	1 flacon/75 µL
5	<b>Diluant du test</b> Contient : tampon phosphate, indicateur de pH, conservateur.	1 flacon/60 mL
6	<b>Antisérum de cotinine</b> Contient : anticorps de lapin anti-cotinine, tampon, conservateur.	1 flacon/15 mL
7	<b>Tampon de lavage concentré (10×)</b> À diluer avant utilisation en respectant les instructions de la section <i>Préparation des réactifs</i> . Contient : tampon phosphate, détergent, conservateur.	1 flacon/100 mL
8	<b>Solution de substrat TMB</b> Non toxique, prête à l'emploi.	1 flacon/25 mL
9	<b>Solution d'arrêt</b>	1 flacon/12,5 mL
10	<b>Films adhésifs pour plaque</b>	2





## Matériel nécessaire non fourni

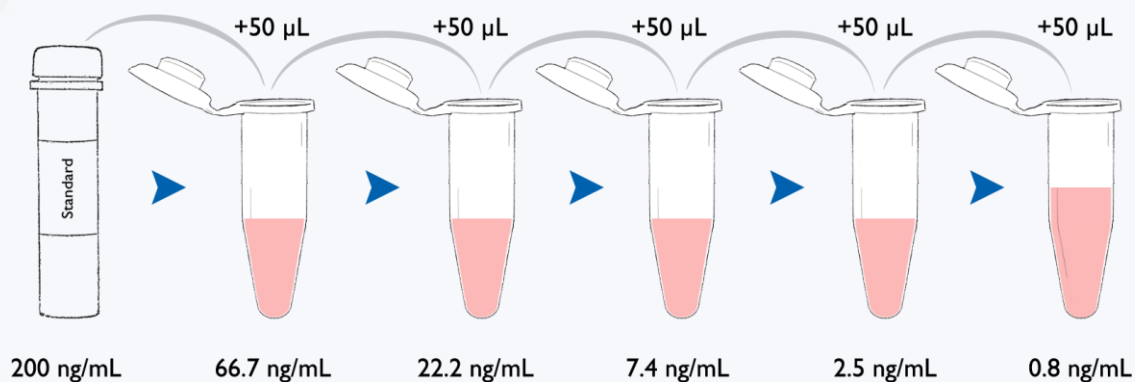
- Pipette de précision pouvant délivrer 10 µL, 20 µL, 50 µL, 90 µL et 100 µL
- Pipette de précision multicanaux pouvant délivrer 50 µL, 100 µL et 200 µL
- Vortex
- Incubateur/agitateur pour microplaques à 37 °C avec orbite de 0,08 à 0,17 po d'une capacité de 500 tr/min
- Lecteur de plaques avec filtres de référence de 450 nm et de 620 à 630 nm
- Logiciel informatique pour la réduction des données
- Eau déminéralisée
- Réservoirs à réactif
- 1 tube en polypropylène jetable d'une capacité minimale de 15 mL
- Petits tubes en polypropylène jetables pour la dilution de l'étalon et de certains échantillons
- Embouts de pipette
- Pipette sérologique pouvant délivrer jusqu'à 15 mL
- Centrifugeuse d'une puissance de 1 500 g



101 Innovation Boulevard • Suite 302 • State College, PA 16803  
1.800.790.2258 • [support@salimetrics.com](mailto:support@salimetrics.com) • [salimetrics.com](http://salimetrics.com)

## Préparation des réactifs

- Amener tous les réactifs à température ambiante et les agiter avant utilisation. Il est recommandé d'attendre au moins 1 heure et demie pour que les 15 mL du diluant du test utilisé à l'étape 7 (dilution du conjugué) reviennent à température ambiante.
- Amener la plaque de microtitration à température ambiante avant utilisation. **Veiller à conserver le sachet contenant les barrettes fermé jusqu'à ce que le contenu soit revenu à température ambiante, car l'humidité peut affecter les puits enduits.**
- Préparer un tampon de lavage 1× en diluant le tampon de lavage concentré (10×) 10 fois avec de l'eau déminéralisée à température ambiante (100 mL de tampon de lavage concentré [10×] pour 900 mL d'eau déminéralisée). **Diluer uniquement la quantité de réactif nécessaire pour la journée et jeter toute quantité inutilisée.** (En cas de précipité dans le tampon de lavage concentré, celui-ci peut être réchauffé à 40 °C pendant 15 minutes. Laisser revenir à température ambiante avant utilisation pour l'analyse.)
- Préparer les dilutions en série de l'étalon de cotinine comme suit :
  - Numéroter 5 tubes de microcentrifugation en polypropylène (ou autres petits tubes) de 2 à 6.
  - Pipeter 100 µL de diluant du test dans les tubes 2 à 6.
  - Diluer en série l'étalon 3× en ajoutant 50 µL de l'étalon à 200 ng/mL (tube 1) dans le tube 2. Bien mélanger.
  - Après avoir changé les embouts des pipettes, transférer 50 µL du tube 2 au tube 3. Bien mélanger.
  - Procéder de la même façon pour les tubes 4, 5 et 6.
  - Les concentrations finales des étalons dans les tubes 1 à 6 sont respectivement de 200 ng/mL, 66,7 ng/mL, 22,2 ng/mL, 7,4 ng/mL, 2,5 ng/mL et 0,8 ng/mL.



## Procédure

**Étape 1 :** Lire la section *Préparation des réactifs* et préparer les réactifs conformément à ces instructions avant le début du test. Déterminer la disposition de la plaque. Un exemple de disposition est présenté ci-dessous. (Les étalons, les contrôles et les échantillons de salive doivent être analysés en doublet.)

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	Éta 200	Éta 200	Ctrl-H	Ctrl-H								
B	Éta 66,7	Éta 66,7	Ctrl-L	Ctrl-L								
C	Éta 22,2	Éta 22,2	Éch. 1	Éch. 1								
D	Éta 7,4	Éta 7,4	Éch. 2	Éch. 2								
E	Éta 2,5	Éta 2,5	Éch. 3	Éch. 3								
F	Éta 0,8	Éta 0,8	Éch. 4	Éch. 4								
G	Zéro	Zéro	Éch. 5	Éch. 5								
H	*À blanc	*À blanc	Éch. 6	Éch. 6								

\*À blanc : utilisation facultative.

**Étape 2 :** Régler l'incubateur/agitateur pour microplaques à 37 °C.

**Étape 3 :** Garder le nombre de barrettes souhaité dans le support de barrettes et remettre les autres barrettes dans le sachet. Refermer hermétiquement le sachet contenant les puits inutilisés et le dessiccant. Conserver à une température comprise entre 2 et 8 °C.

**Étape 4 :** Pipeter 15 mL de diluant du test dans le tube jetable. (Réduire le volume au prorata si tous les puits de la plaque ne sont pas utilisés.) Réserver jusqu'à l'étape 7.

### Étape 5 : Préparation des échantillons

- Fumeurs connus **UNIQUEMENT** : Diluer les échantillons de salive 10× avec le diluant du test, à raison de 10 µL de salive pour 90 µL de diluant.
- Non-fumeurs : Analyser les échantillons de salive sans les diluer.

### Étape 6 :

- Pipeter 20 µL d'étalons, de contrôles et d'échantillons salivaires dans les puits appropriés.
- Pipeter 20 µL de diluant du test dans 2 puits qui serviront d'étalon zéro.
- Pipeter 120 µL de diluant du test dans 2 tubes à blanc, si utilisés.



101 Innovation Boulevard • Suite 302 • State College, PA 16803  
1.800.790.2258 • support@salimetrics.com • salimetrics.com

**Étape 7 :** Diluer le conjugué enzymatique à une concentration de 1:300 en ajoutant 50 µL de conjugué dans le tube de 15 mL contenant le diluant du test. (Réduire le volume au prorata si tous les puits de la plaque ne sont pas utilisés.) Le tube contenant le conjugué peut être centrifugé quelques minutes pour que le liquide tombe au fond du tube. Agiter immédiatement la solution de conjugué diluée et ajouter 100 µL dans chaque puits à l'aide d'une pipette multicanaux.

**Étape 8 :** À l'aide d'une pipette multicanaux, pipeter 100 µL d'antisérum de cotinine dans tous les puits à l'exception des puits à blanc (si utilisés).

**Étape 9 :** Recouvrir la plaque avec le film adhésif fourni. Agiter la plaque dans un incubateur/agitateur pour microplaques **préalablement chauffé à 37 °C**, de façon continue à une vitesse de 500 tr/min pendant 1 heure et demie à 37 °C.

**Étape 10 :** Laver la plaque 4 fois avec le tampon de lavage 1×. L'utilisation d'un laveur de plaques est recommandée. Le lavage peut également se faire en pulvérisant délicatement du tampon de lavage dans chaque puits à l'aide d'un flacon pulvérisateur, ou en transférant 300 µL de tampon de lavage dans chaque puits puis en jetant le liquide dans l'évier. Après chaque lavage, la plaque doit être soigneusement époncée avec des serviettes en papier puis placée en position verticale. Si un laveur de plaques est utilisé, il est tout de même recommandé d'éponger la plaque après le dernier lavage.

**Étape 11 :** À l'aide d'une pipette multicanaux, ajouter 200 µL de solution de substrat TMB dans chaque puits.

**Étape 12 :** Agiter la plaque pendant 5 minutes dans un rotateur pour plaques réglé à 500 tr/min, et laisser incuber dans le noir (couvrir) à température ambiante pendant 25 minutes supplémentaires.

**Étape 13 :** À l'aide d'une pipette multicanaux, ajouter 50 µL de solution d'arrêt.

**Étape 14 :**

- Agiter la plaque pendant 3 minutes dans un rotateur pour plaques réglé à 500 tr/min. Si la coloration verte persiste, continuer d'agiter la plaque jusqu'à voir apparaître une coloration jaune. S'assurer que tous les puits ont pris une coloration jaune.

***Mise en garde : une vitesse supérieure à 600 tr/min peut entraîner un débordement.***

- Essuyer le fond de la plaque à l'aide d'un linge non pelucheux humidifié avec de l'eau, puis avec un linge sec.
- Lire la plaque à 450 nm dans un lecteur de plaques. Lire la plaque dans les 10 minutes suivant l'ajout de la solution d'arrêt. (Pour des résultats optimaux, une correction à l'aide d'un second filtre de 620 à 630 nm est recommandée).



101 Innovation Boulevard • Suite 302 • State College, PA 16803  
1.800.790.2258 • support@salimetrics.com • salimetrics.com

## Contrôle qualité

Les contrôles de cotinine à concentration élevée et faible de Salimetrics doivent être utilisés lors de chaque test. Les plages de contrôle établies par Salimetrics sont données à titre indicatif. Chaque laboratoire doit établir sa propre plage. Ces plages peuvent varier d'un laboratoire à l'autre en raison des différences techniques et d'instruments.

## Calculs

1. Déterminer la densité optique (DO) moyenne pour tous les puits dédoublés.
2. Soustraire la valeur moyenne de DO obtenue avec les puits à blanc (si utilisés) des valeurs obtenues avec le zéro, les étalons, les contrôles et les échantillons de salive.
3. Calculer le pourcentage de liaison (B/Bo) pour chaque étalon, contrôle et échantillon de salive en divisant la DO de chaque puits (B) par la DO moyenne du zéro (Bo). (Le zéro ne correspond pas à un point sur la courbe d'étalonnage.)
4. Déterminer les concentrations des contrôles et des échantillons de salive par interpolation en utilisant le logiciel de réduction des données. Il est recommandé d'utiliser un ajustement de courbe de régression non linéaire à 4 paramètres.
5. Les échantillons donnant des valeurs de cotinine supérieures à 200 ng/mL (ou supérieures à 2 000 ng/mL après multiplication par le facteur de dilution de 10) doivent être dilués avec le diluant du test et réanalysés afin d'obtenir des résultats précis. Si l'échantillon est dilué, multiplier les résultats du test par le facteur de dilution.

***Une nouvelle courbe d'étalonnage doit être établie pour chaque plaque complète ou partielle.***

## Résultats attendus

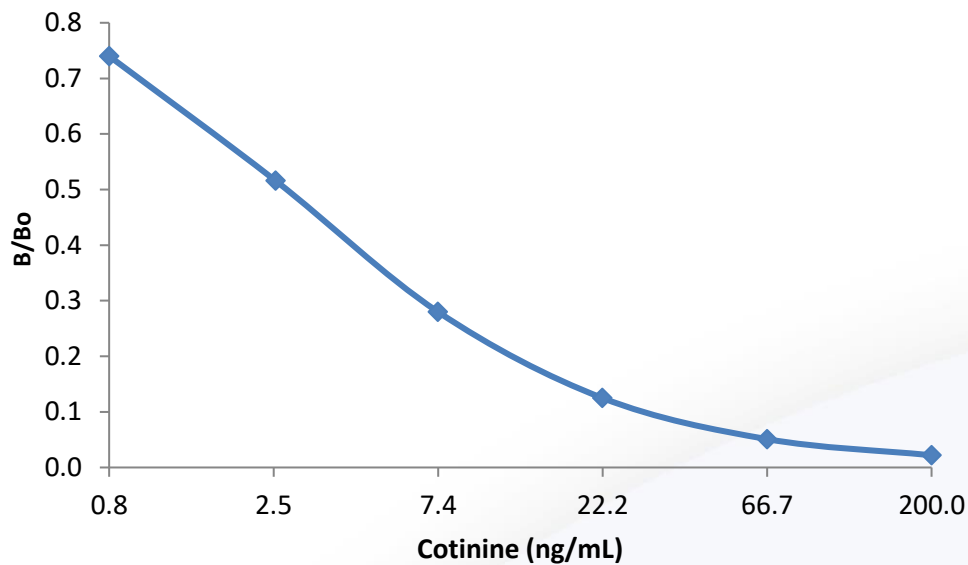
Les résultats ci-dessous sont présentés à titre indicatif uniquement et ne doivent pas être utilisés pour calculer les résultats d'un autre test.

Puits	Étalon	DO moyenne	B	B/Bo	Cotinine (ng/mL)
A1,A2	S1	0,045	0,037	0,022	200
B1,B2	S2	0,096	0,088	0,051	66,7
C1,C2	S3	0,222	0,214	0,125	22,2
D1,D2	S4	0,489	0,481	0,280	7,4
E1,E2	S5	0,893	0,885	0,516	2,5
F1,F2	S6	1,278	1,270	0,740	0,8
G1,G2	Bo	1,724	1,716	S.O.	S.O.
H1,H2	À blanc	0,008	S.O.	S.O.	S.O.



101 Innovation Boulevard • Suite 302 • State College, PA 16803  
1.800.790.2258 • support@salimetrics.com • salimetrics.com

## Exemple : ajustement de courbe de la cotinine à 4 paramètres



### Limites

- Les échantillons donnant des valeurs de cotinine supérieures à 200 ng/mL (ou supérieures à 2 000 ng/mL après multiplication par le facteur de dilution de 10) doivent être dilués avec le diluant du test et réanalysés afin d'obtenir des résultats précis. Pour obtenir la concentration finale de cotinine, multiplier la concentration de l'échantillon dilué par le facteur de dilution.
- Si un échantillon a pris une coloration jaune ou mauve après l'ajout de la solution de conjugué diluée et l'agitation de la plaque (étape 7), son pH doit être mesuré. En cas de  $\text{pH} \leq 3,5$  ou  $\geq 9$ , un nouvel échantillon doit être recueilli.
- Voir les recommandations de la section *Recueil de l'échantillon* pour garantir que l'échantillon de salive est recueilli correctement et pour éviter les substances interférentes.
- Les échantillons contenant de l'azoture de sodium ne conviennent pas pour ce test.

### Exemples de gammes de concentrations

#### Mesure de la cotinine salivaire chez des fumeurs et des non-fumeurs à l'aide du kit d'EIA de Salimetrics

Groupe	N	Moyenne (ng/mL)	Écart-type (ng/mL)	Gamme de concentrations (ng/mL)
Fumeurs adultes	21	206,33	123,47	47,87-586,39
Non-fumeurs	10	0	0	S.O.

Le kit d'EIA de Salimetrics est capable de distinguer les fumeurs des non-fumeurs avec un degré élevé de précision.



101 Innovation Boulevard • Suite 302 • State College, PA 16803  
1.800.790.2258 • support@salimetrics.com • salimetrics.com

## Le test de dosage immuno-enzymatique quantitatif de la cotinine salivaire ultrasensible de Salimetrics distingue les fumeurs des non-fumeurs et différencie l'exposition active et passive à la fumée de tabac (7).

**Tableau 1 :** Concentrations de cotinine salivaire (ng/mL) chez des mères fumeuses et non fumeuses et chez leurs enfants de 6 mois

Statut tabagique auto-déclaré : fumeuses (n = 27)		
Groupe	Moyenne	Écart-type
Nombre de cigarettes fumées par la mère au cours des 48 heures précédentes	13,11	12,00
Concentrations de cotinine salivaire chez la mère (ng/mL)	252,27	178,81
Concentrations de cotinine salivaire chez l'enfant (ng/mL)	10,96	9,08
Statut tabagique auto-déclaré : non-fumeuses (n = 20)		
Groupe	Moyenne	Écart-type
Nombre de cigarettes fumées par la mère au cours des 48 heures précédentes	0,0	S.O.
Concentrations de cotinine salivaire chez la mère (ng/mL)	0,91	1,43
Concentrations de cotinine salivaire chez l'enfant (ng/mL)	2,26	3,30

Remarques :

1. Statut tabagique déterminé par le nombre de cigarettes fumées au cours des 48 heures précédentes, 0 signifiant « non-fumeuse » et > 3 « fumeuse ».
2. Test t pour échantillons indépendants comparant les groupes « fumeuses » et « non-fumeuses »,  $p < 0,001$ .
3. Un seul enfant de mère fumeuse avait été allaité au sein au cours des 7 jours précédents.

### Comparaison de la mesure de la cotinine par LC-ES/MS/MS et par EIA (données non publiées)

(n = 40)	Concentrations de cotinine mesurées par LC-ES/MS/MS*	Concentrations de cotinine mesurées par le test d'EIA de Salimetrics
<b>LC-ES/MS/MS</b> Corrélation de Pearson (valeur de $\rho$ )	--	0,90 (0,00)
<b>Test d'EIA de la cotinine de Salimetrics</b> Corrélation de Pearson (valeur de $\rho$ )	0,90 (0,00)	--
<b>Nombre total d'heures d'exposition<sup>^</sup></b> Corrélation de Pearson (valeur de $\rho$ )	0,39 (0,01)	0,48 (0,00)

\* Chromatographie en phase liquide couplée à la spectrométrie de masse en tandem avec ionisation par électrospray

<sup>^</sup> Nombre d'heures d'exposition passive à la fumée auto-déclaré



101 Innovation Boulevard • Suite 302 • State College, PA 16803  
1.800.790.2258 • support@salimetrics.com • salimetrics.com

## Caractéristiques de performance du kit d'EIA quantitatif de la cotinine salivaire ultrasensible

### Précision

La précision intra-série a été déterminée en calculant la moyenne de 10 réplicats.

Échantillon salivaire	N	Moyenne (ng/mL)	Écart-type (ng/mL)	Coefficient de variation (%)
1	10	5,49	0,25	4,5
2	10	52,35	4,50	8,6
3	10	105,21	6,16	5,9
4	10	495,47	32,04	6,5

La précision inter-série a été déterminée en calculant la moyenne des moyennes des duplicats pour 8 analyses distinctes.

Échantillon salivaire	N	Moyenne (ng/mL)	Écart-type (ng/mL)	Coefficient de variation (%)
Concentration faible	8	6,07	0,55	9,04
Concentration élevée	8	102,23	4,30	4,21

### Récupération

Trois échantillons de salive contenant différentes concentrations de cotinine endogène ont été enrichis avec des quantités connues de cotinine et analysés.

Échantillon salivaire	Endogène (ng/mL)	Ajoutée (ng/mL)	Attendue (ng/mL)	Observée (ng/mL)	Récupération (%)
1	3,26	5	8,26	8,22	99,6
1	2,96	50	52,96	60,45	114,1
1	3,22	100	103,22	102,27	99,1
2	0,00	500	500,00	470,32	94,1
3	17,02	5	22,02	20,69	94,0
3	17,02	50	67,02	64,77	96,6



101 Innovation Boulevard • Suite 302 • State College, PA 16803  
1.800.790.2258 • support@salimetrics.com • salimetrics.com



## **Sensibilité**

La limite inférieure de détection a été déterminée en interpolant la densité optique moyenne moins 2 écarts-types de 10 ensembles de duplicats à la concentration de 0 ng/mL. La concentration minimale de cotinine pouvant être distinguée de 0 est de 0,15 ng/mL.

## **Récupération après dilution de l'échantillon**

Deux échantillons ont été dilués en série avec le diluant du test et ont été analysés.

<b>Échantillon salivaire</b>	<b>Facteur de dilution</b>	<b>Attendue (ng/mL)</b>	<b>Observée (ng/mL)</b>	<b>Récupération (%)</b>
1			120,27	
	1:2	60,14	56,87	94,6
	1:4	30,07	27,12	90,2
	1:8	15,03	14,00	93,1
	1:16	7,52	6,77	90,0
	1:32	3,76	3,50	93,2
	1:64	1,88	1,82	96,7
2			538,34	
	1:2	269,17	278,40	103,4
	1:4	134,59	139,68	103,8
	1:8	67,29	67,27	100,0
	1:16	33,65	33,34	99,1
	1:32	16,82	16,91	100,5
	1:64	8,41	9,24	109,8

## **Réactivité croisée**

Nicotine	0,0293 %		Nicotinamide	ND
Acide nicotinique	ND		3-OH-cotinine*	24,82 %

\* La 3-OH-cotinine est un métabolite de la cotinine.



101 Innovation Boulevard • Suite 302 • State College, PA 16803  
1.800.790.2258 • support@salimetrics.com • salimetrics.com

## Références

1. Benowitz, N.L. (1996). Cotinine as a biomarker of environmental tobacco smoke exposure. *Epidemiol Rev*, 18(2), 188-204.
2. Benowitz, N.L., Hukkanen, J., & Jacob, P., 3<sup>rd</sup> (2009). Nicotine chemistry, metabolism, kinetics and biomarkers. *Handb Exp Pharmacol*, 192, 29-60.
3. Alterman, A.I., Gariti, P., & Niedbala, R.S. (2002). Varying results for immunoassay screening kits for cotinine levels. *Psychol Addict Behav*, 16(3), 256-59.
4. Watts, R.R., Longone, J.J., Kinght, G.J., & Lewtas, J. (1990). Cotinine analytical workshop report: Consideration of analytical methods for determining cotinine in human body fluids as a measure of passive exposure to tobacco smoke. *Environ Health Perspect*, 84, 173-82.
5. Roche, D., Callai, F., Reungoat, P., & Momas, I. (2001). Adaptation of an enzyme immunoassay to assess urinary cotinine in nonsmokers exposed to tobacco smoke. *Clin Chem*, 47(5), 950-52.
6. Chard, T. (1990). *An introduction to radioimmunoassay and related techniques* (4th ed.). Amsterdam: Elsevier.
7. Granger, D.A., Blair, C., Willoughby, M., Kivlighan, K.T., Hibel, L.C., Fortunato, C.K., Wiegand, L.E., & The Family Life Project Investigators (2007). Individual differences in salivary cortisol and alpha-amylase in mothers and infants: Relation to tobacco smoke exposure. *Dev Psychobiol*, 49(7), 692-701.



101 Innovation Boulevard • Suite 302 • State College, PA 16803  
1.800.790.2258 • support@salimetrics.com • salimetrics.com

## Garantie limitée du vendeur

« Le Vendeur garantit que tous les produits vendus aux termes des présentes sont exempts de défaut de matériau et de fabrication. En cas de notification d'un défaut par l'Acheteur, envoyée dans les trente (30) jours suivant la date de la découverte dudit défaut et dans les trois mois suivant la date d'expédition, le Vendeur, à sa discrétion, réparera ou remplacera le produit s'il le juge défectueux. Toute demande doit être soumise par écrit. Cette garantie ne couvre pas les dommages résultant d'un accident, d'un mésusage, d'une négligence ou d'une utilisation anormale. Dans tous les cas, la responsabilité se limitera au prix d'achat du kit.

**Il est expressément convenu que cette garantie limitée remplace toute garantie d'adéquation avec un usage particulier et de qualité marchande. Le Vendeur ne peut être tenu responsable des dommages accessoires ou indirects découlant de l'installation, de l'utilisation et de manipulation du produit du Vendeur ou découlant du non-respect de toute garantie expresse ou tacite. »**

<p>Salimetrics, LLC (East Coast) 101 Innovation Blvd., Suite 302 State College, PA 16803, États-Unis Tél. : 814.234.2617 Fax : 814.238.1608 800-790-2258 (États-Unis et Canada uniquement) <a href="http://www.salimetrics.com">www.salimetrics.com</a> <a href="mailto:support@salimetrics.com">support@salimetrics.com</a></p>	<p>Salimetrics, LLC (West Coast) 5962 La Place Court, Suite 275 Carlsbad, CA 92008, États-Unis Tél. : 760.444.4126 Fax : 814.238.1608 800-790-2258 (États-Unis et Canada uniquement) <a href="http://www.salimetrics.com">www.salimetrics.com</a> <a href="mailto:support@salimetrics.com">support@salimetrics.com</a></p>
<p>Représentant autorisé dans l'Union européenne Biozol Diagnostica Vertrieb GmbH Leipziger Straße 4 85386 Eching, Allemagne Tél. : +49 (0)89 3799666-6 <a href="http://www.biozol.de">www.biozol.de</a> <a href="mailto:info@biozol.de">info@biozol.de</a></p> <p>CE</p>	<p>Personne responsable au Royaume-Uni Stratech Scientific Ltd Cambridge House, St Thomas Place, Cambridgeshire Business Park, Ely, CB7 4EX, Royaume-Uni Tél. : +44 (0) 1638782600 <a href="http://www.stratech.co.uk">www.stratech.co.uk</a> <a href="mailto:info@stratech.co.uk">info@stratech.co.uk</a></p> <p>UK CA</p>

**Date de mise à jour : 9 septembre 2021**



101 Innovation Boulevard • Suite 302 • State College, PA 16803  
1.800.790.2258 • [support@salimetrics.com](mailto:support@salimetrics.com) • [salimetrics.com](http://salimetrics.com)