



DCM020-11
Ed. 04/2016

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 micropiastro (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. Controlli (2 flaconi, 1mL ciascuno)

Control A	REF DCE045/2003A-0
Control B	REF DCE045/2003B-0

3. Incubation Buffer (1 flacone, 30 mL)

Phosphate buffer 50 mM pH 7,4, BSA 1 g/L
REF DCE001-0

4. Conjugate (1 flacone, 1 mL)

Cortisolo coniugato con perossidasi di rafano (HRP)
REF DCE002/2002-0

5. Coated Microplate (1 micropiastro breakable)

Anticorpo anti Cortisolo adsorbita alla micropiastro
REF DCE002/2003-0

6. TMB Substrate (1 flacone, 15 mL)

H_2O_2 -TMB (0,26 g/L) (evitare il contatto con la pelle)
REF DCE004-0

7. Stop Solution (1 flacone, 15 mL)

Acido Solforico 0,15 mol/L (evitare il contatto con la pelle)
REF DCE005-0

8. 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.

Letture 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 e dei controlli

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 cannuccia 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.
I controlli sono pronti all'uso.

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 ($22-28^{\circ}\text{C}$).** Al termine del dosaggio riporre immediatamente tutti i reagenti a $2-8^{\circ}\text{C}$: 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 $2-8^{\circ}\text{C}$.
- 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-C_6), due per ogni Controllo, due per ogni Campione ed uno per il Bianco.

Reagente	Calibratore	Campione/ Controllo	Bianco
Calibratore C_0-C_6	25 μL		
Campione / Controllo		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-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-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 %

17b Estradiolo	< 0.1 %
Estrone 3-solfato	< 0.1 %
Estriolo	< 0.1 %
Testosterone	< 0.1 %
Spirolactone	< 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:

$$Y = 0,94 * X - 0.11$$

$$r^2 = 0,799$$

11. DISPOSIZIONI PER LO SMALTIMENTO

I reagenti devono essere smaltiti in accordo con le leggi locali.

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. 04/2016

DCM020-11

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



DCM020-11
Ed. 04/2016

CORTISOL SALIVA ELISA

for routine analysis

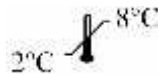
Direct immunoenzymatic determination of Cortisol in saliva.

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 (H₂O₂) and the TMB Substrate and develops a blu color that changes into yellow when the Stop Solution (H₂SO₄) 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. Controls (2 vials, 1 mL each)

Control A	REF	DCE045/2003A-0
Control B	REF	DCE045/2003B-0

3. Incubation Buffer (1 vial, 30 mL)

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

REF DCE001-0

4. Conjugate (1 vial, 1 mL)

Cortisol conjugated to horseradish peroxidase (HRP)

REF DCE002/2002-0

5. Coated Microplate (1 breakable microplate)

Antibody anti Cortisol adsorbed on microplate

REF DCE002/2003-0

6. TMB Substrate (1 vial, 15 mL)

H₂O₂-TMB 0.26 g/L (avoid any skin contact)

REF DCE004-0

7. Stop Solution (1 vial, 15 mL)

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

REF DCE005-0

8. 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 and Controls

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. The controls are ready to use.

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:

- a) If saliva is collected in the morning ensure that this is carried out prior to brushing teeth
- b) During the day allow 1 hour after a meal, oral intake of pharmaceutical drugs or tooth cleaning.
- c) 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

1. Let the saliva flow down through the straw into the centrifuge glass tube.
2. Centrifuge the sample for 15 minutes at 3000 rpm
3. Store at – 20°C for at least 1 hour
4. Centrifuge again for 15 minutes at 3000 rpm
5. The saliva sample is now ready to be tested.
6. 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

1. Remove the swab from the suspended insert of the Salivette
2. Gently chewing the swab for 1 minute produces a sufficient quantity of saliva.
3. Replace the swab into the Salivette and firmly close the tube using the stopper.
4. Centrifuge the Salivette for 2 minutes at 1000g (rcf) for saliva generation.
5. 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	Sample / Control	Blank
Calibrator C ₀ -C ₆	25 µL		
Sample / Control		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 %
Spirolonolactone	< 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:

$$Y = 0.94 * X - 0.11$$

$$r^2 = 0.799$$

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. 04/2016

DCM020-11

DiaMetra S.r.l. Headquarter: 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



DCM020-11
Ed. 04/2016

CORTISOL SALIVA ELISA

para análisis de rutina

Determinación inmunoenzimática directa del cortisol en la saliva

IVD



LOT

Ver etiqueta externa



$\Sigma = 96$ ensayos

REF DKO020

USO PREVISTO

Método competitivo inmunoenzimático colorimétrico para la determinación cuantitativa de la concentración de cortisol en la saliva.

El kit Cortisol Saliva ELISA está destinado al uso en laboratorio exclusivamente.

1. SIGNIFICADO CLÍNICO

El cortisol es una hormona esteroidea liberada por la corteza suprarrenal en respuesta a la hormona ACTH (producida por la hipófisis) y está involucrado en la respuesta al estrés. Aumenta la presión sanguínea y la glucemia, puede causar infertilidad en mujeres y suprime el sistema inmunitario.

El cortisol actúa a través de los receptores intracelulares específicos y afecta a numerosos sistemas fisiológicos, incluyendo el sistema inmunitario, la regulación de la glucosa, el tono vascular, la utilización del sustrato y el metabolismo óseo. El cortisol se excreta principalmente en la orina en forma (libre) no unida.

La mayor parte del cortisol en la saliva está en forma no unida y pasa a la saliva a través de mecanismos intracelulares. Los niveles salivales de cortisol no sufren alteraciones respecto a la saliva o a las enzimas salivales. Existe una alta correlación entre los niveles séricos y salivales.

Las funciones endógenas normales son la base de las consecuencias fisiológicas del estrés crónico. La secreción prolongada de cortisol provoca esfuerzo muscular, hiperglucemia y suprime las respuestas inmunes/inflamatorias. Estas mismas consecuencias resultan del uso prolongado de fármacos basados en glucocorticoides.

2. PRINCIPIO DEL MÉTODO

El cortisol (antígeno) de la muestra compite con el cortisol antigénico marcado con peroxidasa de rabano (HRP) qui es en el Conjugato por la unión al anticuerpo anti-cortisol adsorbido en la microplaca (fase sólida).

Después de la incubación, la separación de las fracciones libre y unida se obtiene mediante un simple lavado de la fase sólida.

Por ultimo, al reaccionar con el sustrato (H_2O_2) y el sustrato TMB (TMB), la enzima HRP presente en la fracción unida desarrolla una coloración azul que se

torna amarilla tras añadir la solución de interrupción (H_2SO_4).

La intensidad del color desarrollado es inversamente proporcional a la concentración de Cortisol en la muestra. La concentración de Cortisol en la muestra se calcula según una curva de calibración.

3. REACTIVOS, MATERIALES E INSTRUMENTACIÓN

3.1. Reactivos y materiales suministrados en el kit

1. Calibradores (7 frascos, 1 mL cada uno)

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. Control (2 frascos, 1 mL cada uno)

Control A	REF DCE045/2003A-0
Control B	REF DCE045/2003B-0

3. Tampón de incubación (1 frasco, 30 mL)

Tampón fosfato 50 mM pH 7,4	BSA 1g/L
	REF DCE001-0

4. Conjugado (1 frasco, 1 mL)

Cortisol conjugado con peroxidasa de rabano (HRP)
REF DCE002/2002-0

5. Microplaca recubierta (1 microplaca rompible)

Anticuerpo anti cortisol absorbido en la microplaca
REF DCE002/2003-0

6. Sustrato TMB (1 frasco, 15 mL)

H_2O_2 -TMB (0,26 g/L) (evitar el contacto con la piel)
REF DCE004-0

7. Solución de parada (1 frasco, 15 mL)

Ácido sulfúrico 0,15 mol/L (evitar el contacto con la piel)
REF DCE005-0

8. Solución de lavado conc.10X (1 frasco, 50 mL)

Tampón fosfato 0,2M pH 7.4
REF DCE054-0

3.2. Reactivos necesarios no suministrados en el kit

Agua destilada.

3.3. Material e instrumentación auxiliares

Dispensadores automáticos.

Lector de microplacas (450 nm, 620-630 nm)

Saliva Collection Device

REF DKO063

Salivette Sarstedt

REF 51.1534.500

Nota

Conservar los reactivos a 2-8°C, protegidos de la luz.

Abrir la bolsa del reactivo 4 (microplaca recubierta) solo cuando se encuentre a temperatura ambiente y cerrarla inmediatamente después de extraer las tiras que se vayan a utilizar; una vez abierta, permanece estable hasta la fecha de caducidad del kit.

4. ADVERTENCIAS

- Este kit de ensayo está previsto para usarse in vitro y por personal experto. No es para uso interno o externo en humanos o animales.
- Usar los equipos de protección individual previstos al trabajar con los reactivos suministrados.
- Siga las Buenas Prácticas de Laboratorio (GLP) en el manejo de las muestras sanguíneas y sus derivados.
- Algunos reactivos contienen pequeñas cantidades de Proclín 300^R como conservante. Evite el contacto con la piel y las mucosas.
- El cromógeno TMB contiene un irritante que puede ser dañino si se inhala, se ingiere o se absorbe a través de la piel. Para prevenir lesiones, evitar la inhalación, la ingestión o el contacto con la piel y con los ojos.
- La Solución de Parada está formada por una solución de ácido sulfúrico diluido. El ácido sulfúrico es venenoso y corrosivo, y puede ser tóxico si se ingiere. Para prevenir posibles quemaduras químicas, evitar el contacto con la piel y con los ojos.
- Evite la exposición de los reactivos TMB/H₂O₂ a la luz solar directa, metales u oxidantes. No congelar la solución.
- Este método permite determinar concentraciones de cortisol de 0,5 ng/mL a 100 ng/mL.
- El suministro de esteroides naturales o sintéticos puede alterar los niveles de cortisol.

5. PRECAUCIONES

- Respetar rigurosamente la secuencia de los pasos indicados en este protocolo. Los resultados aquí presentados se han obtenido utilizando los reactivos específicos que figuran en estas instrucciones de uso.
- Todos los reactivos deben conservarse a una temperatura controlada de 2-8°C en sus recipientes originales. Todas las excepciones están claramente marcadas. Los reactivos son estables hasta la fecha de caducidad cuando se almacenan y manipulan de acuerdo con las instrucciones proporcionadas.
- Antes del uso, esperar hasta que todos los componentes del kit y las muestras se encuentren

a temperatura ambiente (22-28°C) y mezclar cuidadosamente.

- No mezclar componentes de kits de lotes distintos. Se debe observar la fecha de caducidad indicada en la etiqueta de la caja y de todas las ampollas. No usar componentes después de la fecha de caducidad.
- Si utiliza un equipo automático, es responsabilidad del usuario asegurar que la metodología aplicada haya sido debidamente validada.
- Un lavado incompleto o impreciso y la aspiración insuficiente del líquido de los micropozos ELISA pueden causar una precisión pobre y/o un elevado fondo. Para mejorar el rendimiento del kit en los sistemas automatizados, se recomienda aumentar el número de lavados.
- Para la reproducibilidad de los resultados, es importante que el tiempo de reacción sea igual para cada pocillo. El tiempo de dispensación de los pocillos no debe superar los 10 minutos; si se prolongara más allá de los 10 minutos, respétese el orden de dispensación. Si utiliza más de una placa, se recomienda repetir la curva de calibración en cada placa.
- Al añadir el Sustrato TMB se inicia una reacción cinética que termina al agregar la Solución de Parada. Tanto el Sustrato TMB como la Solución de Parada deben agregarse en la misma secuencia para evitar diferentes tiempos de reacción.
- Observar las directrices para la ejecución del control de calidad en los laboratorios clínicos.
- Observar la máxima precisión en la reconstitución y dispensación de los reactivos.
- Los lectores de microplacas leen las DO verticalmente, por tanto no debe tocarse el fondo de los pocillos.

6. PROCEDIMIENTO

6.1. Preparación de los Calibradores (C₀...C₆)

Antes del uso, dejar durante al menos 5 minutos en el agitador giratorio.

Los Calibradores son listo para usar y tienen las siguientes concentraciones de 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

Tras la apertura, permanecen estables durante 6 meses a 2-8°C.

Para unidades del S.I.: ng/mL x 2,76 = nmol/L

6.2. Preparación del conjugado diluido

Preparar inmediatamente antes del uso.

Diluir 10 µL de conjugado (reactivo 3) con 1 mL de tampón de incubación (reactivo 2).

Mezclar con cuidado. Estable durante 3 horas a temperatura ambiente (22-28°C).

6.3. Preparación de la solución de lavado

Antes del uso, diluir el contenido del frasco de la "Solución de lavado conc. 10X" con agua destilada hasta un volumen de 500 mL. Para preparar volúmenes menores, respetar la relación de dilución de 1:10. La solución de lavado diluida se mantiene estable a 2-8 °C durante al menos 30 días. En la

solución de lavado concentrada es posible observar la presencia de cristales. En ese caso, agitar a temperatura ambiente hasta que los cristales se disuelvan por completo. Para una mayor precisión, diluir todo el frasco de la solución de lavado concentrada en 500 mL teniendo cuidado para transferir también los cristales y, a continuación, agitar hasta que se disuelvan por completo

6.4. Preparación de la muestra e controles

La determinación de Cortisol en este kit debe ser realizada con una muestra de saliva.

Para la obtención de la muestra se recomienda usar tubos de vidrio de centrifuga y una cánula de plástico, o el dispositivo para la obtención de saliva (*Saliva Collection Device*) de Diametra o el dispositivo "Salivette" (Sarstedt, Ref. 511534500). Los otros tipos de dispositivos de obtención disponibles en el mercado no se han comprobado.

Los Controles están listos para usar.

6.4.1. Método y limitaciones

Obtener las muestras de saliva en los tiempos indicados.

Si no se dan indicaciones específicas para la obtención de saliva, es posible obtener las muestras en cualquier momento, pero teniendo en cuenta los siguientes factores:

- Si la obtención de saliva debe realizarse por la mañana, deberá realizarse antes de lavarse los dientes.
- Durante el día para las siguientes condiciones, antes de tomar una muestra de saliva, esperar por lo menos una hora si ha comido, si ha tomado medicamentos por vía oral o si se ha cepillado los dientes.
- Es muy importante obtener una muestra limpia (no contaminada con comida, cosméticos, sangre, chicle u otros materiales extraños).

6.4.2. Procesamiento de la saliva con el equipo *Saliva Collection Device Diametra*

- Hacer fluir la saliva a través de la cánula hasta el tubo de vidrio.
- Centrifugar la muestra durante 15 minutos a 3000 rpm
- Dejar a -20°C durante al menos 1 hora
- Centrifugar durante otros 15 minutos a 3000 rpm
- La muestra de saliva está lista para el ensayo.
- Conservar la muestra a 2÷8°C durante una semana o a -20°C para períodos más largos.

6.4.3. Extracción y manejo de la muestra con el equipo *Salivette Sarstedt*

- Retirar la torunda contenida en el apósito tubo.
- Introducir la torunda en la boca y mojarla con saliva durante 1 minuto
- Devolver la torunda en el tubo original y cerrar.
- Centrifugar el tubo a 1000g (RCF) durante 2 minutos.
- Destapar el tubo y recuperar la saliva (se debería obtener por lo menos 1mL de saliva)

6.5. Procedimiento

- Esperar hasta que todos los reactivos se encuentren a temperatura ambiente (22-28°C).**

Al final del ensayo inmediatamente poner todos los reactivos a 2-8 ° C para evitar largos periodos a temperatura ambiente.

- Las tiras de pocillos no utilizados se deben guardar de inmediato en la bolsa desechable que contiene desecantes y almacenarse a 2-8°C.
- Para evitar la contaminación microbiana y/o química no regrese porciones de reactivos no usados en los viales originales.
- Para aumentar la precisión de los resultados de la prueba es necesario trabajar en duplicado: preparar dos pocillos para cada punto de la curva de calibración (C₀-C₆), dos para cada control, dos para cada muestra, uno para el blanco.

Reactivo	Calibrador	Muestra/Control	Blanco
Calibradores C ₀ -C ₆	25 µL		
Muestra/Control		25 µL	
Conjugado diluido	200 µL	200 µL	
Incubar 1 h a +37°C. Retirar la mezcla de reacción. Lave los pozos 3 veces con 0,3 mL de solución de lavado diluida. Nota importante: agite suavemente la placa durante 5 segundos en cada paso del lavado. Después del último lavado asegúrese haber eliminado completamente la solución de lavado de los pozos, invierta la placa y golpéela repetidas veces contra una servilleta de papel absorbente. Lavados automático: si está utilizando una lavadora automática, hacer 6 lavados.			
Substrato TMB	100 µL	100 µL	100 µL
Incubar 15 minutos a temperatura ambiente (22÷28°C), protegida de la luz.			
Solución de parada	100 µL	100 µL	100 µL
Agitar la microplaca con cuidado. Leer la absorbancia (E) a 450 nm frente una segunda lectura de referencia a 620-630 nm o frente al blanco dentro de los 5 minutos.			

7. CONTROL DE CALIDAD

Cada laboratorio debe analizar muestras de control para los rangos bajo, medio y alto de cortisol para supervisar el rendimiento del análisis. Estas muestras deben tratarse como desconocidas y los valores deben determinarse en cada ensayo realizado. Se deben mantener los gráficos de control de calidad para seguir el rendimiento de los reactivos suministrados. Se deben emplear métodos estadísticos adecuados para determinar las tendencias. El laboratorio debe establecer los límites de aceptabilidad del rendimiento del análisis. Entre otros parámetros que se deben controlar, se incluyen

las intersecciones de 80, 50 y 20% de la curva de calibración para evaluar la reproducibilidad. Además, la capacidad de absorción máxima debe ser constante con la experiencia anterior. Una desviación significativa del rendimiento establecido puede indicar un cambio inadvertido en las condiciones experimentales o la degradación de los reactivos del kit. Se deben usar reactivos frescos para determinar la causa de las variaciones.

8. RESULTADOS

8.1. Absorbancia media

Calcular la absorbancia media (E_m) de cada punto de la curva de calibración (C_0 - C_6) y de cada muestra.

8.2. Curva de calibración

Trazar en el gráfico de las absorbancias los valores calculados de las absorbancias medias (E_m) de cada Calibrador (C_0 - C_6) en función de las concentraciones. Trazar la curva de ajuste óptimo para los puntos de calibración (p. ej.: Logística de cuatro parámetros).

8.3. Cálculo de los resultados

Interpolarse del gráfico los valores de absorbancia relativos a cada muestra y leer la concentración correspondiente en ng/mL.

9. VALORES DE REFERENCIA

Se pueden usar los siguientes valores como guía preliminar hasta que cada laboratorio establezca sus propios valores normales.

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

Es importante señalar que la determinación de un rango de valores esperados en un método dado para una población "normal" depende de muchos factores, tales como la especificidad y sensibilidad del método en uso, y la población en estudio. Por lo tanto, cada laboratorio debe considerar el intervalo especificado por el fabricante como una guía general y producir su propio rango de valores calculados en base al estadístico obtenido por el laboratorio, donde reside la población local.

10. PARÁMETROS CARACTERÍSTICOS

10.1. Precisión

10.1.1. Intraensayo

La variabilidad dentro del mismo kit se ha determinado replicando (20x) la medición de tres muestras de saliva distintas. La variabilidad intraensayo es 10%.

10.1.2. Interensayo

La variabilidad entre distintos kits se ha determinado replicando (10x) la medición de tres muestras de saliva distintas con kits pertenecientes a lotes distintos. La variabilidad interensayo es 8,3%.

10.2. Exactitud

La prueba de recuperación realizada en una muestra de saliva enriquecida con 6,25 - 12,5 - 25 - 50 ng/mL de cortisol ha dado un valor medio (\pm SD) de 95,42% \pm 9,11%.

10.3. Sensibilidad

La concentración mínima de cortisol medible que puede distinguirse del Calibrador 0 es 0,12 ng/mL con un límite de confianza del 95%.

10.4. Especificidad

El anticuerpo empleado presenta las siguientes reacciones cruzadas, calculadas al 50% según Abraham:

Cortisol	100 %
Prednisolona	46.2 %
11-Deoxycortisol	4 %
Cortisona	3.69 %
Prednisona	3.10 %
11 α OH Progesterona	1 %
Progesterona	< 0.1 %
Aldosterona	< 0.1 %
Pregnenolona	< 0.1 %
17b Estradiol	< 0.1 %
Estrona 3-sulfato	< 0.1 %
Estriol	< 0.1 %
Testosterona	< 0.1 %
Spirolactona	< 0.1 %
DHEA	< 0.1 %
DHEA-S	< 0.1 %
Androstenediona	< 0.1 %
Androsterona	< 0.1 %
DHT	< 0.1 %
Danazol	< 0.1 %
Cholesterol	< 0.1 %
Desametasona	< 0.1 %

10.5. Correlación

El kit Diametra Cortisol saliva ELISA se ha comparado con el kit Diametra Cortisol saliva ELISA del método anterior. Se probaron 35 muestras de saliva.

La curva de regresión es la siguiente:

$$Y = 0,94 \cdot X - 0,11$$

$$r^2 = 0,799$$

11. INDICACIONES PARA LA ELIMINACIÓN

Eliminar los reactivos conforme con la normativa local sobre la materia.

BIBLIOGRAFÍA

- 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. 04/2016

DCM020-11

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

	DE ES FR GB IT PT	In vitro Diagnostikum Producto sanitario para diagnóstico In vitro Dispositif medical de diagnostic in vitro In vitro Diagnostic Medical Device Dispositivo medico-diagnostico in vitro Dispositivos medicos de diagnostico in vitro		DE ES FR GB IT PT	Hergestellt von Elaborado por Fabriqué par Manufacturer Produttore Produzido por
	DE ES FR GB IT PT	Achtung, Begleitdokumente Precaución, consulte los documentos adjuntos Attention, veuillez consulter les documents d'accompagnement Caution, consult accompanying documents Attenzione, consultare la documentazione allegata Atenção, consultar os documentos de acompanhamento	 yyyy-mm	DE ES FR GB IT PT	Herstellungs datum Fecha de fabricacion Date de fabrication Date of manufacture Data di produzione Data de produção
 yyyy-mm-dd	DE ES FR GB IT PT	Verwendbar bis Establa hasta (usar antes de último día del mes) Utiliser avant (dernier jour du mois indiqué) Use by (last day of the month) Utilizzare prima del (ultimo giorno del mese) Utilizar (antes ultimo dia do mês)		DE ES FR GB IT PT	Biogefährdung Riesco biológico Risque biologique Biological risk Rischio biologico Risco biológico
	DE ES FR GB IT PT	Gebrauchsanweisung beachten Consultar las instrucciones Consulter le mode d'emploi Consult instructions for use Consultare le istruzioni per l'uso Consultar instruções para uso	LOT	DE ES FR GB IT PT	Chargenbezeichnung Codigo de lote Numero de lot Batch code Codice del lotto Codigo do lote
 $\Sigma = xx$	DE ES FR GB IT PT	Ausreichend für "n" Tests Contenido suficiente para "n" tests Contenu suffisant pour "n" tests Contains sufficient for "n" tests Contenuto sufficiente per "n" saggi Contém o suficiente para "n" testes	CONT	DE ES FR GB IT PT	Inhalt Contenido del estuche Contenu du coffret Contents of kit Contenuto del kit Conteúdo do kit
 Max Min	DE ES FR GB IT PT	Temperaturbereich Límitación de temperatura Limites de température de conservation Temperature limitation Limiti di temperatura Temperaturas limites de conservação	REF	DE ES FR GB IT PT	Bestellnummer Número de catálogo Références du catalogue Catalogue number Numero di Catalogo Número do catálogo
	DE ES FR GB IT PT	Vor direkter Sonneneinstrahlung schützen Mantener alejado de la luz solar Tenir à l'écart de la lumière du soleil Keep away from sunlight Tenere lontano dalla luce solare Mantenha longe da luz solar			

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

ERROR / POSIBLES CAUSAS / SUGERENCIAS**No se produce ninguna reacción colorimétrica del ensayo**

- no se ha dispensado el conjugado
- contaminación del conjugado y/o del sustrato
- errores en la ejecución del ensayo (p. ej., dispensación accidental de los reactivos en orden incorrecto o procedentes de frascos equivocados, etc.)

Reacción escasa (DO demasiado bajas)

- conjugado no idóneo (p. ej., no procedente del kit original)
- tiempo de incubación demasiado corto, temperatura de incubación demasiado baja

Reacción demasiado intensa (DO demasiado altas)

- conjugado no idóneo (p. ej., no procedente del kit original)
- tiempo de incubación demasiado largo, temperatura de incubación demasiado alta
- calidad escasa del agua usada para la solución de lavado (bajo grado de desionización)
- lavados insuficientes (el conjugado no se ha retirado completamente)

Valores inexplicablemente fuera de escala

- contaminación de pipetas, puntas o contenedores- lavados insuficientes (el conjugado no se ha retirado completamente)

CV% intraensayo elevado

- los reactivos y/o tiras no se encontraban a temperatura ambiente antes del uso
- el lavador de microplacas no funciona correctamente (sugerencia: limpiar el cabezal del lavador)

CV% interensayo elevado

- condiciones de incubación no constantes (tiempo o temperatura)
- controles y muestras no dispensados al mismo tiempo (con los mismos intervalos) (controlar la secuencia de dispensación)
- variación en función de los operadores

ERREUR CAUSES POSSIBLES / SUGGESTIONS**Aucune réaction colorimétrique de l'essai**

- non distribution du conjugué
- contamination du conjugué et/ou du substrat
- erreurs dans l'exécution du dosage (par ex., distribution accidentelle des réactifs dans le mauvais ordre ou en provenance des mauvais flacons, etc.)

Réaction trop faible (DO trop basse)

- conjugué non approprié (par ex., ne provenant pas du coffret original)
- temps d'incubation trop court, température d'incubation trop basse

Réaction trop intense (DO trop élevée)

- conjugué non approprié (par ex., ne provenant pas du coffret original)
- temps d'incubation trop long, température d'incubation trop élevée
- mauvaise qualité de l'eau utilisée pour la solution de lavage (bas degré de déionisation)
- lavages insuffisants (conjugué non entièrement éliminé)

Valeurs inexplicablement hors plage

- contamination des pipettes, embouts ou récipients - lavages insuffisants (conjugué non entièrement éliminé)

CV% intra-essai élevé

- les réactifs et/ou les bandes n'ont pas atteint la température ambiante avant usage
- le laveur de microplaques ne lave pas correctement (suggestion : nettoyer la tête du laveur)

CV% inter-essai élevé

- conditions d'incubation non constantes (temps ou température)
- contrôles et échantillons non distribués en même temps (avec les mêmes intervalles) (contrôler l'ordre de distribution)
- variabilité intrinsèque des opérateurs