



DiaMetra



## CORTISOL SALIVA

para análisis de rutina

Determinación inmunoenzimática directa del cortisol en la saliva

IVD



LOT

Ver etiqueta externa

2°C - 8°C



Σ = 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 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) presente en la muestra compete con el antígeno marcado con peroxidasa frente al anticuerpo anti-cortisol absorbido en la microplaca (fase sólida).

La separación libre-unido se obtiene mediante un simple lavado de la fase sólida.

La enzima presente en la fracción unida cataliza la reacción entre el sustrato ( $H_2O_2$ ) y el sustrato TMB (TMB), desarrollando una coloración azul que cambia a amarillo tras la adición de la solución de parada ( $H_2SO_4$ ).

La intensidad del color desarrollado es proporcional a la concentración de antígeno marcado y, por lo tanto,

inversamente proporcional a la concentración de cortisol presente en la muestra.

### 3. REACTIVOS, MATERIALES E INSTRUMENTACIÓN

#### 3.1. Reactivos y materiales suministrados en el kit

- Estándares (STD) de cortisol (7 frascos, 1 mL cada uno)

STD0	REF DCE002/2006-0
STD1	REF DCE002/2007-0
STD2	REF DCE002/2008-0
STD3	REF DCE002/2009-0
STD4	REF DCE002/2010-0
STD5	REF DCE002/2011-0
STD6	REF DCE002/2012-0
- Tampón de incubación (1 frasco, 30 mL)  
Tampón fosfato pH 7,4 BSA 1g/L  
REF DCE001-0
- Conjugado (1 frasco, 1 mL)  
Cortisol conjugado con peroxidasa de rabano (HRP)  
REF DCE002/2002-0
- Microplaca recubierta (1 microplaca rompible)  
IgG-anti-cortisol absorbido en la microplaca  
REF DCE002/2003-0
- Sustrato TMB (1 frasco, 15 mL)  
 $H_2O_2$ -TMB (0,26 g/L) (evitar el contacto con la piel)  
REF DCE004-0
- Solución de parada (1 frasco, 15 mL)  
Ácido sulfúrico 0,15 mol/L (evitar el contacto con la piel)  
REF DCE005-0

#### 3.2. Reactivos necesarios no suministrados en el kit

Agua destilada.

#### 3.3. Material e instrumentación auxiliares

Dispensadores automáticos.

Lector de microplacas (450 nm)

Dispositivo para la obtención de saliva (*Saliva Collection Device*) REF DKO063

## 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.

No retirar las hojas adhesivas de las tiras que no se vayan a usar en la sesión de análisis.

## 4. PRECAUCIONES

- Observar la máxima precisión en la dispensación de los reactivos.
- No usar reactivos de distintos lotes.
- Evitar la exposición del reactivo TMB/H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> a la luz directa del sol, metales u oxidantes
- 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. PROCEDIMIENTO

### 5.1. Preparación de los estándares

(S<sub>0</sub>, S<sub>1</sub>, S<sub>2</sub>, S<sub>3</sub>, S<sub>4</sub>, S<sub>5</sub>, S<sub>6</sub>)

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

Los estándares tienen las siguientes concentraciones de cortisol:

	S <sub>0</sub>	S <sub>1</sub>	S <sub>2</sub>	S <sub>3</sub>	S <sub>4</sub>	S <sub>5</sub>	S <sub>6</sub>
ng/mL	0	0,5	1	5	10	20	100

Estables hasta la fecha de caducidad del kit.

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

Para unidades del S.I.: pg/mL x 2,76 = pmol/L

### 5.2. 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).

### 5.3. Preparación de la muestra

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.

Se recomienda no usar dispositivos de obtención disponibles en el mercado, como "SALIVETTE". Los otros tipos de dispositivos de obtención disponibles en el mercado no se han comprobado.

#### 5.3.1. 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.

- a) Durante el día, esperar al menos una hora tras haber comido o bebido antes de obtener las muestras de saliva
- b) Es muy importante obtener una muestra limpia (no contaminada con comida, cosméticos, sangre, chicle u otros materiales extraños).

### 5.3.2. Procesamiento de la saliva

Hacer fluir la saliva a través de la cánula hasta el tubo de vidrio.

- 1) Centrifugar la muestra durante 15 minutos a 3000 rpm
- 2) Dejar a -20 °C durante al menos 1 hora
- 3) Centrifugar durante otros 15 minutos a 3000 rpm
- 4) La muestra de saliva está lista para el ensayo.
- 5) Conservar la muestra a 2-8 °C durante una semana o a -20 °C para periodos más largos.

## 5.4. Procedimiento

Puesto que es necesario operar por duplicado, preparar dos pocillos para cada punto de la curva estándar (S<sub>0</sub>-S<sub>6</sub>), dos para cada muestra y uno para el blanco.

Reactivo	Estándar	Muestras	Blanco
Estándares S <sub>0</sub> -S <sub>6</sub>	25 µL		
Muestras		25 µL	
Conjugado diluido	200 µL	200 µL	
Incubar 1 h a +37 °C. Retirar la mezcla de reacción, lavar 2 veces añadiendo a cada pocillo 0,3 mL de agua destilada.			
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 al blanco.			

## 6. CONTROL DE CALIDAD

Cada laboratorio debe analizar sueros 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 estándar 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.

## 7. LIMITACIONES DEL PROCEDIMIENTO

### 7.1. Rendimiento del análisis

No usar muestras contaminadas microbiológicamente, ni muestras muy lipémicas o hemolizadas. Es importante que el tiempo de reacción de cada pocillo sea el mismo para obtener resultados reproducibles. El tiempo de dispensación de los pocillos no debe ser superior a 10 minutos. Si dura más de 10 minutos, se recomienda seguir el orden de dispensación. Si se usa más de una microplaca, repetir la curva estándar para cada placa. La adición del sustrato TMB inicia una reacción cinética que se termina con la adición de la solución de parada. La adición del sustrato y de la solución de parada debe realizarse en la misma secuencia para evitar distintos tiempos de reacción. Los lectores de microplacas miden las DO verticalmente. No tocar el fondo de los pocillos. Si no se aspira completamente la solución de lavado de los pocillos se pueden producir repeticiones pobres y resultados falsos.

### 7.2. Interpretación de los resultados

Si para calcular los resultados se ha usado el ordenador, es imprescindible que los valores de los calibradores se encuentren dentro del 10 % de las concentraciones asignadas.

## 8. RESULTADOS

### 8.1. Absorbancia media

Calcular la absorbancia media ( $E_m$ ) de cada punto de la curva estándar ( $S_0 - S_6$ ) y de cada muestra.

### 8.2. Curva estándar

Trazar en el gráfico de las absorbancias los valores calculados de las absorbancias medias ( $E_m$ ) de cada estándar ( $S_0 - S_6$ ) en función de las concentraciones. Trazar la curva de ajuste óptimo para los puntos estándar (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

## 10. PARÁMETROS CARACTERÍSTICOS

### 10.1. Precisión

#### 10.1.1. Intraensayo

La variabilidad dentro del mismo kit se ha determinado replicando (10x) la medición de tres muestras de saliva de control distintas. La variabilidad intraensayo es  $\leq 8\%$ .

#### 10.1.2. Interensayo

La variabilidad entre distintos kits se ha determinado replicando (10x) la medición de tres muestras de saliva de control distintas con kits pertenecientes a lotes distintos. La variabilidad interensayo es  $\leq 14\%$ .

### 10.2. Exactitud

La prueba de recuperación realizada en una muestra de saliva enriquecida con 7,5 - 15 - 30 - 60 ng/mL de cortisol ha dado un valor medio ( $\pm$ SD) de 97,32%  $\pm$  5,31%.

### 10.3. Sensibilidad

La concentración mínima de cortisol medible es 0,05 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 %
Cortisona	10,8 %
11 $\alpha$ deoxicortisol	18,7 %
Corticosterona	2,4 %
Dexametasona	0,39 %
Progesterona	0,1 %
Aldosterona	1x10 <sup>-2</sup> %
11 $\alpha$ OH progesterona	1x10 <sup>-2</sup> %
Colesterol	< 1x10 <sup>-6</sup> %

## 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)

Ed. 04/2011

DCM020-8

**DiaMetra S.r.l. Headquarter:** Via Garibaldi, 18  
20090 SEGRATE (MI) Italy  
Tel. 0039-02-2139184 – 02-26921595 – Fax 0039-02-2133354.

**Manufactory:** Via Giustozzi, 35/35a – Z.I Paciana  
06034 FOLIGNO (PG) Italy  
Tel. 0039-0742-24851 Fax 0039-0742-316197  
E-mail: [info@diametra.com](mailto:info@diametra.com)

	<b>DIA.METRA SRL</b>	
Mod. PIS	<b>PACKAGING INFORMATION SHEET</b>	

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

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

	<b>DIA.METRA SRL</b>	
Mod. PIS	<b>PACKAGING INFORMATION SHEET</b>	

## **SUGERENCIAS PARA LA SOLUCIÓN DE PROBLEMAS/TROUBLESHOOTING**

### **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

### **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