



# Cortisol Saliva Elisa

*KAPDB290*





# History

---

## Summary of change :

Previous Version :	Current Version :
110225/1	200224/1
Old Diasource logo	New Diasource logo
No IVD symbol	IVD symbol added
<b>LOT</b> : 110225/1	Version: 200224/1
PI number	No PI number
No manufacturer symbol	Manufacturer symbol added



# Cortisol Saliva Elisa

en

For the quantitative determination of Cortisol by enzyme immunoassay in human saliva.

**KAPDB290**

**IN VITRO DIAGNOSTIC**

DIAsource ImmunoAssays SA - Rue du Bosquet 2, B-1348 Louvain-la-Neuve, Belgium - Tel: +32 10 84 99 11 - Fax : +32 10 84 99 90

## INTENDED USE

For the quantitative determination of Cortisol by enzyme immunoassay in human saliva.

For *in vitro* diagnostic use only.

## PRINCIPLE OF THE TEST

The principle of the following enzyme immunoassay test follows the typical competitive binding scenario. Competition occurs between an unlabeled antigen (present in calibrators, control and patient samples) and an enzyme-labelled antigen (conjugate) for a limited number of antibody binding sites on the microwell plate. The washing and decanting procedures remove unbound materials. After the washing step, the enzyme substrate is added. The enzymatic reaction is terminated by addition of the stopping solution. The absorbance is measured on a microtiter plate reader. The intensity of the colour formed is inversely proportional to the concentration of cortisol in the sample. A set of calibrators is used to plot a calibration curve from which the amount of cortisol in patient samples and controls can be directly read.

## CLINICAL APPLICATIONS

Cortisol is the most abundant circulating steroid and the major glucocorticoid secreted by the adrenal cortex. Cortisol is physiologically effective in blood pressure maintenance and anti-inflammatory activity. It is also involved in calcium absorption, gluconeogenesis as well as the secretion of gastric acid and pepsin. It is increased under stress situations, physical exercise and external administration of ACTH. Measurement of cortisol levels in general can be used as an indicator of adrenal function and the differential diagnosis of Addison's and Cushing's diseases as well as adrenal hyperplasia and carcinoma.

Most circulating cortisol is bound to cortisol binding globulin or transcortin and albumin. The free cortisol, which is considered the active part of blood, is about 1-2%. In the absence of appreciable amounts of the cortisol binding proteins in saliva, salivary cortisol is considered to be free and shows a diurnal rhythm with the highest levels in the morning and the lowest levels at night.

## PROCEDURAL CAUTIONS AND WARNINGS

1. Users should have a thorough understanding of this protocol for the successful use of this kit. Reliable performance will only be attained by strict and careful adherence to the instructions provided.
2. Control materials should be included in every run at a high and low level for assessing the reliability of results.
3. When the use of water is specified for dilution or reconstitution, use deionized or distilled water.
4. In order to reduce exposure to potentially harmful substances, gloves should be worn when handling kit reagents and human specimens.
5. All kit reagents and specimens should be brought to room temperature and mixed gently but thoroughly before use. Avoid repeated freezing and thawing of reagents and specimens.
6. A calibrator curve must be established for every run.
7. The control should be included in every run and fall within established confidence limits.
8. Improper procedural techniques, imprecise pipetting, incomplete washing as well as improper reagent storage may be indicated when assay values for the control do not reflect established ranges.
9. When reading the microplate, the presence of bubbles in the microwells will affect the optical densities (ODs). Carefully remove any bubbles before performing the reading step.
10. The substrate solution (TMB) is sensitive to light and should remain colourless if properly stored. Instability or contamination may be indicated by the development of a blue colour, in which case it should not be used.
11. When dispensing the substrate and stopping solution, do not use pipettes in which these liquids will come into contact with any metal parts.
12. To prevent contamination of reagents, use a new disposable pipette tip for dispensing each reagent, sample, calibrator and control.
13. Do not mix various lot numbers of kit components within a test and do not use any component beyond the expiration date printed on the label.
14. Kit reagents must be regarded as hazardous waste and disposed of according to national regulations.

## LIMITATIONS

1. All the reagents within the kit are calibrated for the direct determination of cortisol in human saliva. The kit is not calibrated for the determination of cortisol in serum, plasma or other specimens of human or animal origin.
2. Any samples or control sera containing azide or thimerosal are not compatible with this kit, as they may lead to false results.
3. Only calibrator 0 may be used to dilute any high saliva samples. The use of any other reagent may lead to false results.
4. The results obtained with this kit should never be used as the sole basis for a clinical diagnosis. For example, the occurrence of heterophilic antibodies in patients regularly exposed to animals or animal products has the potential of causing interferences in immunological tests. Consequently, the clinical diagnosis should include all aspects of a patient's background including the frequency of exposure to animals/products if false results are suspected.

## SAFETY CAUTIONS AND WARNINGS

### POTENTIAL BIOHAZARDOUS MATERIAL

Human serum that may be used in the preparation of the calibrators and control has been tested and found to be non-reactive for Hepatitis B surface antigen and has also been tested for the presence of antibodies to HCV and Human Immunodeficiency Virus (HIV) and found to be negative. However no test method can offer complete assurance that HIV, HCV and Hepatitis B virus or any infectious agents are absent. The reagents should be considered a potential biohazard and handled with the same precautions as applied to any blood specimen.

### CHEMICAL HAZARDS

Avoid contact with reagents containing TMB, hydrogen peroxide and sulfuric acid. If contacted with any of these reagents, wash with plenty of water. TMB is a suspected carcinogen.

### SPECIMEN COLLECTION AND STORAGE

Approximately 1 ml of saliva is required per duplicate determination. Collect 4-5 ml of saliva into a clean glass tube (Salivette by Sarstedt may be used) without force or inducement and before eating, drinking or brushing the teeth. Simply rinse the mouth with water before collection. Do not use blood-contaminated specimens. Store samples at 4°C for up to 24 hours or at -10°C or lower if the analyses are to be done at a later date. Consider all human specimens as possible biohazardous materials and take appropriate precautions when handling.

### SPECIMEN PRETREATMENT

Specimen tubes are to be placed into a freezer and allowed to freeze. When ready to use, the specimens are to be thawed and centrifuged. The supernatants are to be collected and poured into freshly labelled tubes.

### REAGENTS AND EQUIPMENT NEEDED BUT NOT PROVIDED

1. Precision pipettes to dispense 50, 100, 150 and 300 µl
2. Disposable pipette tips
3. Distilled or deionized water
4. Plate shaker (200 rpm)
5. Benchtop centrifuge
6. Microwell plate reader with a filter set at 450nm and an upper OD limit of 3.0 or greater\* (see assay procedure step 10).

### REAGENTS PROVIDED



**Rabbit Anti-Cortisol Antibody Coated Microwell Plate-Break Apart Wells - Ready To Use.**

Contents: One 96 well (12x8) polyclonal antibody-coated microwell plate in a resealable pouch with desiccant.

Storage: Refrigerate at 2-8°C

Stability: 12 months or as indicated on label.

Ag	HRP	CONC	<b>Cortisol Horseradish Peroxidase (HRP) Conjugate Concentrate – X50</b>
----	-----	------	--

Contents: Cortisol-HRP conjugate in a protein-based buffer with a non-mercury preservative.

Volume: 300 µl/vial

Storage: Refrigerate at 2-8°C

Stability: 12 months or as indicated on label.

Preparation: Dilute 1:50 in assay buffer before use (eg. 40 µl of HRP in 2 mL of assay buffer). If the whole plate is to be used dilute 240 µl of HRP in 12 mL of assay buffer. Discard any that is left over.

CAL	N	<b>Cortisol Saliva Calibrators - Ready To Use. N = 0 to 5</b>
-----	---	---

Contents: Six vials containing cortisol in a protein-based buffer with a non-mercury preservative. Prepared by spiking buffer with a defined quantity of Cortisol.

\*Listed below are approximate concentrations, please refer to vial labels for exact concentrations.

Calibrator	Concentration	Volume/Vial
Calibrator 0	0 ng/mL	2.0 mL
Calibrator 1	1 ng/mL	0.6 mL
Calibrator 2	3 ng/mL	0.6 mL
Calibrator 3	10 ng/mL	0.6 mL
Calibrator 4	30 ng/mL	0.6 mL
Calibrator 5	100 ng/mL	0.6 mL

Storage: Refrigerate at 2-8°C

Stability: 12 months in unopened vials or as indicated on label. Once opened, the calibrators should be used within 14 days or aliquoted and stored frozen. Avoid multiple freezing and thawing cycles.

CONTROL	<b>Control - Ready To Use.</b>
---------	--------------------------------

Contents: One vial containing Cortisol in a protein-based buffer with a non-mercury preservative. Prepared by spiking buffer with a defined quantity of Cortisol. Refer to vial label for expected value and acceptable range.

Volume: 0.6 mL/vial

Storage: Refrigerate at 2-8°C

Stability: 12 months in unopened vial or as indicated on label. Once opened, the control should be used within 14 days or aliquoted and stored frozen. Avoid multiple freezing and thawing cycles.

WASH	SOLN	CONC	<b>Wash Buffer Concentrate – X10</b>
------	------	------	--------------------------------------

Contents: One bottle containing buffer with a non-ionic detergent and a non-mercury preservative.

Volume: 50 mL/bottle

Storage: Refrigerate at 2-8°C

Stability: 12 months or as indicated on label.

Preparation: Dilute 1:10 in distilled or deionized water before use. If the whole plate is to be used dilute 50 mL of the wash buffer concentrate in 450 mL of water.

ASS	BUF	<b>Assay Buffer - Ready To Use.</b>
-----	-----	-------------------------------------

Contents: One vial containing a protein-based buffer with a non-mercury preservative.

Volume: 15 mL/vial

Storage: Refrigerate at 2-8°C

Stability: 12 months or as indicated on label.

CHROM	TMB	<b>TMB Substrate - Ready To Use.</b>
-------	-----	--------------------------------------

Contents: One bottle containing tetramethylbenzidine and hydrogen peroxide in a non-DMF or DMSO containing buffer.

Volume: 16 mL/bottle

Storage: Refrigerate at 2-8°C

Stability: 12 months or as indicated on label.

STOP	SOLN	<b>Stopping Solution - Ready To Use.</b>
------	------	--

Contents: One vial containing 1M sulfuric acid.

Volume: 6 mL/vial

Storage: Refrigerate at 2-8°C

Stability: 12 months or as indicated on label.

**ASSAY PROCEDURE**

**Specimen Pretreatment:**

*Freezing and Centrifugation.*

All reagents must reach room temperature before use. Calibrators, controls and specimen samples should be assayed in duplicate. Once the procedure has been started, all steps should be completed without interruption.

1. Prepare working solutions of the Cortisol-HRP conjugate and wash buffer.
2. Remove the required number of microwell strips. Reseal the bag and return any unused strips to the refrigerator.
3. Pipette 50 µl of each calibrator, control and specimen sample into correspondingly labelled wells in duplicate.
4. Pipette 100 µl of the conjugate working solution into each well (We recommend using a multichannel pipette).
5. Incubate on a plate shaker (approximately 200 rpm) for 45 minutes at room temperature.
6. Wash the wells 3 times with 300 µl of diluted wash buffer per well and tap the plate firmly against absorbent paper to ensure that it is dry (The use of a washer is recommended).
7. Pipette 150 µl of TMB substrate into each well at timed intervals.
8. Incubate on a plate shaker for 15-20 minutes at room temperature (or until calibrator 0 attains dark blue colour for desired OD).
9. Pipette 50 µl of stopping solution into each well at the same timed intervals as in step 7.
10. Read the plate on a microwell plate reader at 450 nm within 20 minutes after addition of the stopping solution.

\* If the OD exceeds the upper limit of detection or if a 450 nm filter is unavailable, a 405 or 415 nm filter may be substituted. The optical densities will be lower, however, this will not affect the results of patient/control samples.

**CALCULATIONS**

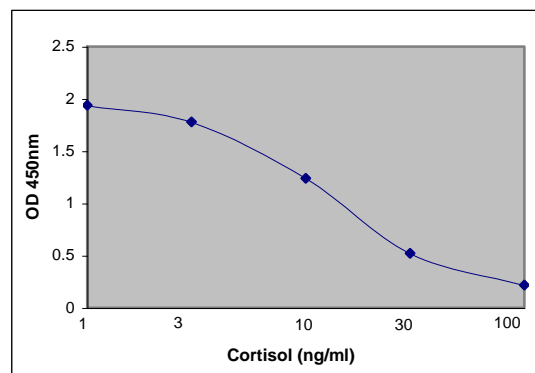
1. Calculate the mean optical density of each calibrator duplicate.
2. Draw a calibrator curve on semi-log paper with the mean optical densities on the Y-axis and the calibrator concentrations on the X-axis. If immunoassay software is being used, a 4-parameter curve is recommended.
3. Calculate the mean optical density of each unknown duplicate.
4. Read the values of the unknowns directly off the calibrator curve.
5. If a sample reads more than 100 ng/ml then dilute it with calibrator 0 at a dilution of no more than 1:8. The result obtained should be multiplied by the dilution factor.

**TYPICAL TABULATED DATA**

Calibrator	OD 1	OD 2	Mean OD	Value (ng/ml)
0	2.241	2.133	2.187	0
1	1.965	1.914	1.940	1
2	1.757	1.799	1.778	3
3	1.221	1.254	1.238	10
4	0.540	0.502	0.521	30
5	0.222	0.216	0.219	100
Unknown	0.287	0.283	0.285	63

**TYPICAL CALIBRATION CURVE**

Sample curve only. **Do not** use to calculate results.



## PERFORMANCE CHARACTERISTICS SENSITIVITY

The lower detection limit is calculated from the calibration curve by determining the resulting concentration of the mean OD of Calibrator 0 (based on 10 replicate analyses) minus 2 SD. Therefore, the sensitivity of the DIIAsource Cortisol Saliva ELISA kit is 1.0 ng/ml.

## SPECIFICITY (CROSS REACTIVITY)

The following compounds were tested for cross-reactivity with the Direct Cortisol Saliva ELISA kit with cortisol cross-reacting at 100%.

Steroid	%Cross Reactivity
Cortisol	100
Prednisolone	13.6
Corticosterone	7.6
Deoxycorticosterone	7.2
Progesterone	7.2
Cortisone	6.2
Deoxycortisol	5.6
Pednisone	5.6
Dexamethasone	1.6

No cross reaction was detected with DHEAS and Tetrahydrocortisone. Please note that there is an observed cross-reactivity of 13.6% with prednisolone. Since prednisone is converted to prednisolone in vivo, caution must be exercised when assaying the cortisol levels of patients undergoing either therapy.

## INTRA-ASSAY PRECISION

Three samples were assayed ten times each on the same calibrator curve. The results (in ng/ml) are tabulated below:

Sample	Mean	SD	CV%
1	6.6	0.68	10.3
2	24.8	1.98	8.0
3	52.4	3.40	6.5

## INTER-ASSAY PRECISION

Three samples were assayed ten times over a period of four weeks. The results (in ng/ml) are tabulated below:

Sample	Mean	SD	CV%
1	6.3	0.63	9.8
2	23.7	2.06	8.7
3	51.8	3.37	6.5

## RECOVERY

Spiked samples were prepared by adding defined amounts of cortisol to three patient saliva samples (1:1). The results (in ng/ml) are tabulated below:

Sample	Obs.Result	Exp.Result	Recovery%
1 Unspiked	6.28	-	-
+ 1.0	4.14	3.64	113.7
+ 10	9.05	8.14	111.2
+ 100	61.85	53.14	116.4
2 Unspiked	8.03	-	-
+ 3.0	6.05	5.52	109.6
+ 30	20.64	19.02	108.5
+ 100	52.20	54.02	96.6
3 Unspiked	6.98	-	-
+ 3.0	5.38	4.99	107.8
+ 10	8.76	8.49	103.2
+ 30	19.00	18.49	102.8

## LINEARITY

Three patient saliva samples were diluted with calibrator 0. The results (in ng/ml) are tabulated below:

Sample	Obs.Result	Exp.Result	Recovery%
1	18.18	-	-
1:2	10.32	9.09	113.5
1:4	5.09	4.55	112.1
1:8	2.20	2.27	96.7
2	49.89	-	-
1:2	28.03	24.95	112.3
1:4	13.29	12.47	106.6
1:8	7.97	7.24	110.1
3	68.53	-	-
1:2	34.27	31.49	91.9
1:4	17.13	13.81	80.6
1:8	8.57	7.48	87.3

## EXPECTED NORMAL VALUES

As for all clinical assays each laboratory should collect data and establish their own range of expected normal values.

Random male and female samples were taken in the early morning and had an absolute range of:

5 - 21.6 ng/ml

## REFERENCES

1. Brock P., et al., Clinical Chemistry 24/9:1595, 1978.
2. Morris R., Annals of Clinical Biochemistry 15:178, 1978.
3. Silver A.C., et al., Clinical Chemistry 29:1869, 1983.
4. Vecsei P., et al., Experimentia 28:1104, 1972.
5. Abraham G.E. et al., Anal Lett. 5:757, 1972.
6. Gomez-Sanchez C., et al., J. Lab. Clin. Med 89:902, 1977.
7. Demeris L.M., et al., Clin. Biochem. 10:104, 1977.
8. Poland R.E., et al., Life Sci. 30:177, 1982.
9. Peters J.R., et al., Clin Endocrinol. 17:583, 1982.
10. Papanicolaou, D.A. et al J. Clin Endocrinol Metab 87(10) 4515-4521.
11. Check, J.H., et al, Falsely elevated steroidal assay levels related to heterophile antibodies against various animal species. Gynecol Obstet Invest 40:139-140, 1995.

Revision date : 2020-02-24



# Cortisol Saliva Elisa

es

Para la determinación cuantitativa de cortisol mediante inmunoensayo enzimático en saliva humana.

**KAPDB290**

**DIAGNÓSTICO IN VITRO**

DIAsource ImmunoAssays SA - Rue du Bosquet 2, B-1348 Louvain-la-Neuve, Bélgica - Tel.: +32 10 84 99 11 - Fax: +32 10 84 99 90

## INDICACIONES

Para la determinación cuantitativa de cortisol mediante inmunoensayo enzimático en saliva humana.

Solo para uso diagnóstico *in vitro*.

## PRINCIPIO DE LA PRUEBA

El principio del siguiente inmunoensayo enzimático sigue la típica situación de unión competitiva. Se produce competición entre un antígeno no marcado (presente en los calibradores, controles y muestras del paciente) y un antígeno marcado con una enzima (conjugado) por un número limitado de lugares de unión de anticuerpos de la microplaca. Los procedimientos de lavado y decantación eliminan los materiales no unidos. El sustrato enzimático se añade después del paso de lavado. La reacción enzimática se detiene añadiendo solución de parada. Se mide la absorbancia con un lector de placas de microvaloración. La intensidad del color formado es inversamente proporcional a la concentración de cortisol de la muestra. Se utiliza un conjunto de calibradores para trazar una curva de calibración en la que poder leer directamente la cantidad de cortisol en las muestras del paciente y en los controles.

## APLICACIONES CLÍNICAS

El cortisol es el esteroide circulante más abundante y el principal glucocorticoide secretado por la corteza suprarrenal. El cortisol es fisiológicamente eficaz en el mantenimiento de la presión arterial y la actividad antiinflamatoria. También participa en la absorción de calcio, la gluconeogénesis y la secreción de ácido gástrico y pepsina. Aumenta en situaciones de estrés, ejercicio físico y administración externa de ACTH (Hormona adrenocorticotrópica). En general, la medición de los niveles de cortisol se puede utilizar como un indicador de la función suprarrenal y el diagnóstico diferencial de las enfermedades de Addison y Cushing, así como de la hiperplasia suprarrenal y el carcinoma.

La mayor parte del cortisol circulante se une a la globulina transportadora de cortisol o transcortina y albúmina. El cortisol libre, que se considera la parte activa de la sangre, es aproximadamente del 1-2%. En ausencia de cantidades apreciables de las proteínas de unión a cortisol en la saliva, el cortisol salival se considera libre y muestra un ritmo diurno con los niveles más altos por la mañana y los niveles más bajos por la noche.

## PRECAUCIONES Y ADVERTENCIAS SOBRE EL PROCEDIMIENTO

1. Los usuarios deben tener un completo conocimiento de este protocolo para que la utilización de este kit sea eficaz. Se obtendrá una eficacia diagnóstica fiable únicamente observando estricta y cuidadosamente las instrucciones proporcionadas.
2. Los materiales de control deberían incluirse en cada análisis a un nivel alto y bajo para evaluar la fiabilidad de los resultados.
3. Cuando se especifique utilizar agua para la dilución o reconstitución, use agua desionizada o destilada.
4. Para reducir la exposición a sustancias potencialmente nocivas, se deberán llevar guantes al manipular los reactivos del kit y las muestras humanas.
5. Todos los reactivos del kit y las muestras deberán estar a temperatura ambiente y mezclarse suavemente pero completamente antes de utilizar. Evite congelar y descongelar los reactivos y las muestras repetidamente.
6. Debe establecerse una curva del calibrador para cada análisis.
7. El control debe incluirse en cada análisis y encontrarse dentro de los límites de confianza establecidos.
8. Cuando los valores del control no se encuentren dentro de los márgenes establecidos pueden indicar unas técnicas inadecuadas del procedimiento, un pipeteo impreciso, un lavado incompleto, así como una conservación inadecuada del reactivo.
9. Al leer la microplaca, la presencia de burbujas en los micropocillos afectará a las densidades ópticas (DO). Elimine con cuidado las burbujas antes de realizar el paso de lectura.
10. La solución de sustrato (TMB) es fotosensible, debiendo permanecer incolora si se conserva correctamente. La aparición de un color azul podría indicar inestabilidad o contaminación, en cuyo caso no debería utilizarse.
11. Al dispensar el sustrato y la solución de parada, no deben emplearse pipetas en las que estos líquidos entren en contacto con partes metálicas.
12. Con objeto de prevenir la contaminación de los reactivos, utilice una punta de pipeta desechable nueva para la dispensación de cada reactivo, muestra, calibrador y control.

13. No mezcle varios números de lote de componentes del kit en una misma prueba y no utilice ningún componente si se ha pasado la fecha de caducidad impresa en la etiqueta.

14. Los reactivos del kit deben considerarse residuos peligrosos y desecharse de conformidad con la normativa nacional.

## LIMITACIONES

1. Todos los reactivos del kit están calibrados para la determinación directa de cortisol en saliva humana. El kit no está calibrado para determinar la cortisol en suero, plasma ni en otras muestras de origen humano o animal.
2. Las muestras o sueros de control que contengan azida o tiomersal no son compatibles con este kit, ya que pueden producir resultados falsos.
3. Solo puede utilizarse el calibrador 0 para diluir las muestras salivales altas. El uso de cualquier otro reactivo puede producir resultados falsos.
4. Los resultados obtenidos con este kit no deben utilizarse nunca como la única base para realizar un diagnóstico clínico. Por ejemplo, la aparición de anticuerpos heterofílicos en pacientes expuestos regularmente a animales o a productos para animales puede causar interferencias en las pruebas inmunológicas. Por consiguiente, el diagnóstico clínico debería incluir todos los aspectos de la historia de un paciente, incluyendo la frecuencia de la exposición a animales o sus productos si se sospecha de resultados falsos.

## PRECAUCIONES Y ADVERTENCIAS DE SEGURIDAD MATERIAL DE POTENCIAL RIESGO BIOLÓGICO

Se ha analizado el suero humano que puede utilizarse en la preparación de los calibradores y el control, y ha resultado no ser reactivo para el antígeno de superficie de la hepatitis B; también se ha analizado para detectar la presencia de anticuerpos frente al VHC y al Virus de Inmunodeficiencia Humana (VIH) y se ha determinado que es negativo. Sin embargo, ningún método de análisis puede ofrecer una garantía total de la ausencia de VIH, VHC y de virus de la hepatitis B ni de un microorganismo infeccioso. Los reactivos deben considerarse potencialmente biopeligrosos y deben manipularse con las mismas precauciones que se aplicarían a cualquier muestra sanguínea.

## RIESGOS QUÍMICOS

Evite el contacto con reactivos que contengan TMB, peróxido de hidrógeno y ácido sulfúrico. Si se produce el contacto con alguno de estos reactivos, lávese con abundante agua. La TMB es potencialmente carcinógena.

## RECOGIDA Y CONSERVACIÓN DE LAS MUESTRAS

Se requiere aproximadamente 1 ml de suero por cada determinación por duplicado. Recoja 4-5 ml de saliva en un tubo de vidrio limpio (se puede usar Salivette de Sarstedt) sin forzar ni estimular y antes de comer, beber o cepillarse los dientes. Simplemente enjuáguese la boca con agua antes de la recogida. No utilice muestras contaminadas con sangre. Conserve las muestras a 4 °C durante un máximo de 24 horas o a -10 °C o inferior si los análisis se van a realizar en una fecha posterior. Considere todas las muestras humanas como materiales de posible riesgo biológico y tome las precauciones adecuadas cuando las manipule.

## PRETRATAMIENTO DE LAS MUESTRAS

Los tubos de muestras se colocarán en un congelador y se dejarán congelar. Cuando estén listas para usar, las muestras deben descongelarse y centrifugarse. Los sobrenadantes deben recogerse y verterse en tubos recién marcados.

## REACTIVOS Y EQUIPO NECESARIO NO SUMINISTRADOS

1. Pipetas de precisión para dispensar 50, 100, 150 y 300 µl
2. Puntas de pipeta desechables
3. Agua destilada o desionizada
4. Agitador de placas (200 rpm)
5. Centrífuga de sobremesa
6. Lector de microplacas con un filtro ajustado a 450 nm y un límite de DO superior de 3,0 o mayor\* (véase el paso 10 del procedimiento del ensayo).

## REACTIVOS PROPORCIONADOS

**UII** **Microplaca de pocillos separables recubiertos con anticuerpos anti-cortisol de conejo**-- Lista para usar.  
 Contenido: una microplaca de 96 pocillos (12 x 8) recubierta con anticuerpos policlonales en una bolsa resellable con desecante.  
 Conservación: Refrigerar a 2-8 °C  
 Estabilidad: 12 meses o según indique la etiqueta.

**Ag HRP CONC** **Conjugado concentrado de cortisol-peroxidasa de X50**

Contenido: conjugado de cortisol-HRP en un tampón de base proteica con un conservante sin mercurio.  
 Volumen: 300 µl/vial  
 Almacenamiento: Refrigerar a 2-8 °C  
 Estabilidad: 12 meses o según indique la etiqueta.  
 Preparación: Diluir 1:50 en el tampón de ensayo antes de utilizar (p. ej., 40 µl de HRP en 2 ml de tampón de ensayo). Si se va a utilizar la placa completa, diluir 240 µl de HRP en 12 ml de tampón de ensayo. Tirar lo que sobre.

**CAL N** **Calibradores de cortisol saliva** - Listos para usar. N = 0 a 5

Contenido: Seis viales que contienen cortisol en un tampón de base proteica con un conservante sin mercurio. Preparados añadiendo tampón con una cantidad definida de cortisol.  
 \* A continuación se indican concentraciones aproximadas, consulte en las etiquetas de los viales las concentraciones exactas.

Calibrador	Concentración	Volumen/Vial
Calibrador 0	0 pg/ml	2,0 ml
Calibrador 1	1 ng/ml	0,6 ml
Calibrador 2	3 ng/ml	0,6 ml
Calibrador 3	10 ng/ml	0,6 ml
Calibrador 4	30 ng/ml	0,6 ml
Calibrador 5	100 pg/ml	0,6 ml

Almacenamiento: Refrigerar a 2-8 °C  
 Estabilidad: 12 meses sin abrir o según indique la etiqueta. Una vez abiertos, los calibradores deben utilizarse antes de 14 días o tomar alícuotas y conservar congelados. Evitar ciclos reiterados de congelación y descongelación.

**CONTROL** **Control** - Listos para usar.

Contenido: Un vial que contiene cortisol en un tampón de base proteica con un conservante sin mercurio. Preparados añadiendo tampón con una cantidad definida de cortisol. ¡Consulte en la etiqueta del vial el valor esperado y el intervalo aceptable!  
 Volumen: 0,6 ml/vial  
 Almacenamiento: Refrigerar a 2-8 °C  
 Estabilidad: 12 meses sin abrir o según indique la etiqueta. Una vez abierto, el control debe utilizarse antes de 14 días o conservarse congelado en partes alícuotas. Evitar ciclos reiterados de congelación y descongelación.

**WASH SOLN CONC** **Tampón de lavado concentrado X10**

Contenido: un frasco que contiene tampón con un detergente no iónico y un conservante sin mercurio.  
 Volumen: 50 ml/frasco  
 Almacenamiento: Refrigerar a 2-8 °C  
 Estabilidad: 12 meses o según indique la etiqueta.  
 Preparación: diluir 1:10 en agua destilada o desionizada antes de usar. Si se va a utilizar la placa completa, diluir 50 ml del tampón de lavado concentrado en 450 ml de agua.

**ASS BUF** **Tampón de ensayo** - Listo para usar

Contenido: Un vial que contiene tampón de base proteica con un conservante sin mercurio.  
 Volumen: 15 ml/frasco  
 Almacenamiento: Refrigerar a 2-8 °C  
 Estabilidad: 12 meses o según indique la etiqueta.

**CHROM TMB** **Sustrato de TMB** - Listo para usar.

Contenido: un frasco que contiene tetrametilbencidina y peróxido de hidrógeno en un tampón que no contenga DMF ni DMSO.  
 Volumen: 16 ml/frasco  
 Almacenamiento: Refrigerar a 2-8 °C  
 Estabilidad: 12 meses o según indique la etiqueta.

**STOP SOLN** **Solución de parada** - Lista para usar

Contenido: un vial con ácido sulfúrico 1 M.  
 Volumen: 6 ml/vial  
 Almacenamiento: Refrigerar a 2-8 °C  
 Estabilidad: 12 meses o según indique la etiqueta.

### PROCEDIMIENTO DEL ENSAYO

#### Pretratamiento de las muestras: Congelación y Centrifugación.

Todos los reactivos deben estar a temperatura ambiente antes de utilizar. Los calibradores, los controles y las muestras humanas deben analizarse por duplicado. Una vez que se haya iniciado al procedimiento, deben completarse todos los pasos sin interrupción.

1. Prepare la solución de trabajo del conjugado de cortisol-HRP y el tampón de lavado.
2. Retire el número necesario de tiras de micropocillos. Vuelva a sellar la bolsa y a guardar las tiras no utilizadas en el frigorífico.
3. Pipetee 50 µl de cada calibrador, control y muestra en los pocillos marcados respectivamente por duplicado.
4. Pipetee 100 µl de la solución de trabajo del conjugado en cada pocillo (recomendamos usar una pipeta multicanal).
5. Incube en un agitador de microplacas (aproximadamente a 200 rpm) durante 45 minutos a temperatura ambiente.
6. Lave los pocillos 3 veces con 300 µl de tampón de lavado diluido por pocillo y dé unos golpecitos con la placa firmemente contra papel absorbente para asegurarse de que esté seca (se recomienda usar un lavador).
7. Pipetee 150 µl de sustrato de TMB en cada pocillo a intervalos regulares.
8. Incube en un agitador de microplacas durante 15-20 minutos a temperatura ambiente (o hasta que el calibrador 0 alcance el color azul oscuro de la DO deseada).
9. Pipetee 50 µl de solución de parada en cada pocillo a los mismos intervalos regulares que en el paso 7.
10. Lea la placa en un lector de microplacas a 450 nm antes de transcurridos 20 minutos después de la adición de la solución de parada.

\* Si la DO sobrepasa el límite superior de detección o si no se dispone de un filtro de 450 nm, puede sustituirse por un filtro de 405 o 415 nm. Las densidades ópticas serán inferiores, sin embargo, esto no afectará a los resultados de las muestras del paciente/control.

### CÁLCULOS

1. Calcule la densidad óptica media de cada duplicado del calibrador.
2. Trace una curva del calibrador en papel semilogarítmico con las densidades ópticas medias en el eje de ordenadas (Y) y las concentraciones del calibrador en el eje de abscisas (X). Si se va a utilizar un software para inmunoensayos, se recomienda una curva de 4 parámetros.
3. Calcule la densidad óptica media de cada duplicado desconocido.
4. Lea los valores de los desconocidos directamente de la curva del calibrador.
5. Si la lectura de alguna muestra es superior a 100 ng/ml, entonces dilúlala con el calibrador 0 a una dilución que no sea mayor de 1:8. El resultado obtenido deberá multiplicarse por el factor de dilución.

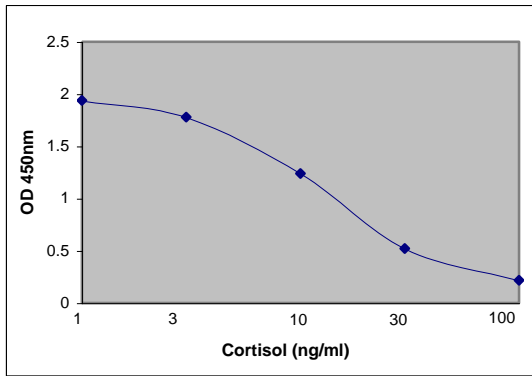
### DATOS TÍPICOS TABULADOS

Calibrador	DO 1	DO 2	DO media	Valor (ng/ml)
0	2,241	2,133	2,187	0
1	1,965	1,914	1,940	1
2	1,757	1,799	1,778	3
3	1,221	1,254	1,238	10
4	0,540	0,502	0,521	30
5	0,222	0,216	0,219	100
Desconocido	0,287	0,283	0,285	63



## CURVA TÍPICA DE CALIBRACIÓN

Solo curva de la muestra. No usar para calcular resultados.



## EFICACIA DIAGNÓSTICA SENSIBILIDAD

El límite de detección inferior se calcula a partir de la curva de calibración determinando la concentración resultante de la DO media del calibrador 0 (basada en la réplica de 10 análisis) menos una DE de 2. Por tanto, la sensibilidad del kit DAsource Cortisol Saliva ELISA es de **1,0 ng/ml**.

## ESPECIFICIDAD (REACTIVIDAD CRUZADA)

Se evaluó la reactividad cruzada de los siguientes compuestos con el kit de Direct Cortisol ELISA, siendo la reactividad cruzada del cortisol del 100 %.

Esteroides	% Reactividad cruzada
Cortisol	100
Prednisolona	13,6
Corticosterona	7,6
Desoxicorticosterona	7,2
Progesterona	7,2
Cortisona	6,2
Desoxicortisol	5,6
Pednisona	5,6
Dexametasona	1,6

No se detectó reacción cruzada con DHEAS ni con tetrahydrocortisona.

Tenga en cuenta que se ha observado una reactividad cruzada del 13,6 % con la prednisolona. Dado que la prednisona se convierte in vivo en prednisolona, se debe tener precaución al analizar los niveles de cortisol de pacientes sometidos a cualquiera de las terapias.

## PRECISIÓN INTRAENSAYO

Se analizaron tres muestras diez veces cada una con la misma curva del calibrador. Los resultados (en ng/ml) se tabulan a continuación:

Muestra	Media	SD	%CV
1	6,6	0,68	10,3
2	24,8	1,98	8,0
3	52,4	3,40	6,5

## PRECISIÓN INTERENSAYO

Se analizaron tres muestras diez veces a lo largo de un período de cuatro semanas. Los resultados (en ng/ml) se tabulan a continuación:

Muestra	Media	SD	%CV
1	6,3	0,63	9,8
2	23,7	2,06	8,7
3	51,8	3,37	6,5

## RECOVERY

Se prepararon muestras adicionadas añadiendo cantidades definidas de cortisol a tres muestras de saliva del paciente (1:1). Los resultados (en ng/ml) se tabulan a continuación:

Muestra	Resultado obs.	Resultado esp.	% Recuperación
1 sin adicionar	6,28	-	-
+1,0	4,14	3,64	113,7
	9,05	8,14	111,2

+10		61,85	53,14	116,4
+100				
2	sin adicionar	8,03	-	-
+3,0		6,05	5,52	109,6
+30		20,64	19,02	108,5
+100		52,20	54,02	96,6
3	sin adicionar	6,98	-	-
+3,0		5,38	4,99	107,8
+10		8,76	8,49	103,2
+30		19,00	18,49	102,8

## LINEALIDAD

Se diluyeron tres muestras de saliva del paciente con calibrador 0. Los resultados (en ng/ml) se tabulan a continuación:

Muestra	Resultado obs.	Resultado esp.	% Recuperación
1	18,18	-	-
1:2	10,32	9,09	113,5
1:4	5,09	4,55	112,1
1:8	2,20	2,27	96,7
2	49,89	-	-
1:2	28,03	24,95	112,3
1:4	13,29	12,47	106,6
1:8	7,97	7,24	110,1
3	68,53	-	-
1:2	34,27	31,49	91,9
1:4	17,13	13,81	80,6
1:8	8,57	7,48	87,3

## VALORES NORMALES ESPERADOS

Como en todos los análisis clínicos, cada laboratorio debería recoger datos y establecer su propio intervalo de valores normales esperados.

Se tomaron muestras aleatorias de machos y hembras temprano por la mañana y tenían un rango absoluto de:

5 - 21,6 ng/ml

## REFERENCIAS

1. Brock P., et al., Clinical Chemistry 24/9:1595, 1978.
2. Morris R., Annals of Clinical Biochemistry 15:178, 1978.
3. Silver A.C., et al., Clinical Chemistry 29:1869, 1983.
4. Vecsei P., et al., Experimentia 28:1104, 1972.
5. Abraham G.E. et al., Anal Lett. 5:757, 1972.
6. Gomez-Sanchez C., et al., J. Lab. Clin. Med 89:902, 1977.
7. Demeris L.M., et al., Clin. Biochem. 10:104, 1977.
8. Poland R.E., et al., Life Sci. 30:177, 1982.
9. Peters J.R., et al., Clin Endocrinol. 17:583, 1982.
10. Papanicolaou, D.A. et al. J. Clin Endocrinol Metab 87(10) 4515-4521.
11. Check, J.H., et al. Falsely elevated steroidal assay levels related to heterophile antibodies against various animal species. Gynecol Obstet Invest 40:139-140, 1995.

Fecha de revisión: 24/02/2020