

Cortisol Saliva

CE

Only for in-vitro diagnostic use

Instructions for use / Instrucciones de uso

English	2
Español	8
Bibliography / Bibliografía	14
Abbreviations / Abreviaciones	14
Packaging materials / Materiales de embalaje	14
Symbols Key / Símbolos	15
Summary of Test Procedure / Resumen de la técnica	16

REF

DSNOV20 (96 Determinations)

ENGLISH

1. INTRODUCTION

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 correlation 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. INTENDED USE

Competitive immunoenzymatic colorimetric method for quantitative determination of Cortisol in saliva from an adult population.

3. PRINCIPLE OF THE ASSAY

Microtiter strip wells are precoated with anti-Cortisol antibodies (solid-phase). Cortisol in the sample competes with added horseradish peroxidase labelled Cortisol (enzyme-labelled antigen) for antibody binding. After incubation a bound/free separation is performed by solid-phase washing. The immune complex formed by enzyme-labelled antigen is visualized by adding Tetramethylbenzidine (TMB) substrate which gives a blue reaction product. The intensity of this product is **inversely** proportional to the amount of Cortisol in the sample. Sulphuric acid is added to stop the reaction. This produces a yellow endpoint colour. Absorption at 450 nm is read using an ELISA microwell plate reader.

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

4. MATERIALS

4.1. Reagents supplied

- **Microtiterplate:** 12 breakapart 8-well snap-off strips coated with anti-Cortisol; in resealable aluminium foil.
- **Stop Solution:** 1 bottle containing 15 ml sulphuric acid, 0.15 mol/l (avoid any skin contact).
- **Conjugate conc.:** 1 bottle containing 1 ml of concentrated horseradish peroxidase labelled Cortisol; contains < 0.06 % (v/v) CMIT/MIT (3:1) and 0.1 % BSA.
- **Incubation Buffer:** 1 bottle containing 30 ml phosphate buffer (50 mM, pH 7.4, BSA 1 g/l); contains < 0.06 % (v/v) CMIT/MIT (3:1)
- **TMB Substrate Solution:** 1 bottle containing 15 ml 3,3',5,5'-tetramethylbenzidine (H₂O₂-TMB 0.26 g/l) (avoid any skin contact); contains ≤ 0.0015 % (v/v) CMIT/MIT (3:1).
- **Wash solution 10x conc:** one bottle containing 50 ml (phosphate buffer 0,2M, ph 7.4; contains < 0.06 % (v/v) CMIT/MIT (3:1)
- **Control A:** 1 bottle containing 1 ml of a lot-specific control solution. The concentration is indicated on the label of the bottle; contains < 0.06 % (v/v) CMIT/MIT (3:1) and 0.1 % BSA.
- **Control B:** 1 bottle containing 1 ml of a lot-specific control solution. The concentration is indicated on the label of the bottle; contains < 0.06 % (v/v) CMIT/MIT (3:1) and 0.1 % BSA.
- **Standards:** 7 bottles, 1 ml each; contains < 0.06 % (v/v) CMIT/MIT (3:1) and 0.1 % BSA.
 - Standard 0: 0 ng/ml
 - Standard 1: 0.5 ng/ml
 - Standard 2: 1 ng/ml
 - Standard 3: 5 ng/ml
 - Standard 4: 10 ng/ml
 - Standard 5: 20 ng/ml
 - Standard 6: 100 ng/ml

For SI units: ng/ml x 2.76 = nmol/l

For hazard and precautionary statements see 14.1

4.2. Materials supplied

- 1 Cover foil
- 1 Instructions for use (IFU)

4.3. Materials and Equipment needed

- ELISA microwell plate reader, equipped for the measurement of absorbance at 450 nm, 620-630 nm
- Manual or automatic equipment for rinsing wells
- Pipettes
- Distilled water

- Glass centrifuge tubes
- Plastic straw
- Timer

5. STABILITY AND STORAGE

The reagents are stable up to the expiry date stated on the label when stored at 2...8 °C in the dark

6. PRECAUTION

- Avoid the exposure of TMB substrate solution to direct sun light, metals or oxidants. Do not freeze the solution.
- Maximum precision is required for reconstitution and dispensation of the reagents.
- This method allows the determination of Cortisol from 0.5 – 100 ng/ml.
- Treatment of the patient with corticosteroids, natural or synthetic steroids can impair Cortisol determination.

7. REAGENT PREPARATION

It is very important to bring all reagents, samples and standards to room temperature (22...28 °C) before starting the test run!

7.1. Microtiterplate

The ready to use break apart snap-off strips are coated with anti-Cortisol antibodies. Store at 2...8 °C. Open the bag only when it is at room temperature. *Immediately after removal of strips, the remaining strips should be resealed in the aluminium foil along with the desiccant supplied and stored at 2...8 °C; stability until expiry date.*

7.2. Conjugate

Dilute the Cortisol conjugate immediately before use. Add 10 µl conjugate to 1.0 ml Incubation Buffer. Mix gently. Stable for 3 hours at 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.

7.3. Standards

Mix gently for at least 5 minutes with rotating mixer. The standards are ready to use and have the concentration mentioned in 4.1. After first opening stable for another 6 months at 2-8°C.

7.4. TMB Substrate Solution

The bottle contains 15 ml of a tetramethylbenzidine/hydrogen peroxide system. The reagent is ready to use and has to be stored at 2...8°C in the dark. *The solution should be colourless or could have a slight blue tinge. If the substrate turns into blue, it may have become contaminated and should be thrown away.*

7.5. Stop Solution

The bottle contains 15 ml 0.15 M sulphuric acid solution . This ready to use solution has to be stored at 2...8°C.

7.6. Wash Solution

Dilute the concentrated 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 the concentrated solution it is possible to observe the presence of crystals, in this case mix at room temperature until complete dissolution of crystals. For greater accuracy dilute the whole bottle of concentrated wash solution to 500 ml and take care that all crystals are transferred by washing the bottle, then mix until crystals are completely dissolved.

7.7. Controls

Ready to use. The bottles contain 1 ml of a lot-specific control solution. The concentration is indicated on the label.

8. SPECIMEN COLLECTION AND PREPARATION

The determination of Cortisol can be performed in saliva. It is recommended to collect saliva samples with a centrifuge glass tube and a plastic straw or with the "Salivette" (Sarstedt, Ref. 51.1534.500).

Other equipment of sample collection commercially available has not been tested.

8.1. Method and Limitation

Collect saliva samples at the times indicated.

If no specific instructions have been given oral fluid (saliva) samples may be collected at any time. The following should be noted:

- a) If saliva collection is carried out in the morning ensure that this is carried out prior to brushing teeth
- b) During the day allow 1 hour after any food or drink before collecting saliva samples
- c) It is very important that a good clear sample is received – i.e. no contamination with food, lipstick, blood (bleeding gums) or other extraneous materials.

8.2. Processing Instructions

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

8.3. Saliva Processing Instructions with Salivette Sarstedt

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
6. ready for analysis (at least 1 ml of saliva should be recovered with this method)

9. ASSAY PROCEDURE

9.1. Test Preparation

Please read the test instructions for use carefully **before** performing the assay. Result reliability depends on strict adherence to the instructions for use as described. Prior to commencing the assay, the distribution and identification plan for all specimens and standards should be carefully established. Select the required number of microtiter strips or wells and insert them into the holder. Pipetting of samples should not extend beyond ten minutes to avoid assay drift. If more than one plate is used, it is recommended to repeat the dose response curve. Please allocate at least:

1 well	(e.g. A1)	for the substrate blank
2 wells	(e.g. B1+C1)	for standard 0
2 wells	(e.g. D1+E1)	for standard 1
2 wells	(e.g. F1+G1)	for standard 2
2 wells	(e.g. H1+A2)	for standard 3
2 wells	(e.g. B2+C2)	for standard 4
2 wells	(e.g. D2+E2)	for standard 5
2 wells	(e.g. F2+G2)	for standard 6
2 wells	(e.g. H2+A3)	for control A
2 wells	(e.g. B3+C3)	for control B

It is recommended to determine standards, controls and patient samples in duplicate.

Perform all assay steps in the order given and without any appreciable delays between the steps.

A clean, disposable tip should be used for dispensing each standard, each control and each patient sample.

1. Dispense 25 µl standards, controls and samples into their respective wells.
2. Add 200 µl diluted Cortisol-HRP Conjugate to each well. Leave well A1 for substrate blank.
3. Cover wells with the foil supplied in the kit.
4. **Incubate for 1 hour at 37 °C (± 0.5 °C).**
5. When incubation has been completed, remove the foil, aspirate the content of the wells. Wash the wells 3 times with 300 µl of diluted wash solution. Avoid overflows from the reaction wells. 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.

Note: Washing is critical! Insufficient washing results in poor precision and falsely elevated absorbance values.

6. Dispense 100 µl TMB Substrate Solution into all wells.
7. **Incubate for exactly 15 min at room temperature (22...28°C) in the dark.**
8. Dispense 100 µl Stop Solution into all wells in the same order and at the same rate as for the TMB Substrate Solution. Shake the microplate gently.
Any blue colour developed during the incubation turns into yellow.
9. Measure the absorbance of the specimen at 450 nm against reference wavelength of 620-630 nm or against Blank within 5 minutes.

9.2. Measurement

Adjust the ELISA Microwell Plate Reader **to zero** using the **substrate blank in well A1**.

If - due to technical reasons - the ELISA reader cannot be adjusted to zero using the substrate blank in well A1, subtract the absorbance value of well A1 from all other absorbance values measured in order to obtain reliable results!

Measure the absorbance of all wells at **450 nm** and record the absorbance values for each standard and sample.

Where applicable calculate the **mean absorbance values** of all duplicates.

10. RESULTS

10.1. Calculation of results

A variety of data reduction software packages are available, which may be employed to generate the mean calibration curve and to calculate the mean concentrations of unknown samples and controls. A 4-parameter logistic (4PL) curve fit, **including Standard 0 is required**. Other curve fitting algorithms are not recommended.

Alternatively, a calibration curve may be prepared on semi-log graph paper by plotting mean absorbance on the Y-axis against concentration of analyte on the X-axis. Standard 0 should be included in the calibration curve. Read the mean absorbance value of each unknown sample off the curve.

In order for the assay results to be considered valid the kit standards and controls must fall within the specifications detailed in the lot specific certificate of analysis.

If a control is out of its specified range, the associated test results are invalid and samples must be retested.

Conversion of units

To convert results to SI units:

$$\text{nmol/L} = \text{ng/mL} \times 2.76$$

To convert results to mass units:

$$\text{ng/mL} = \text{nmol/L} \times 0.36$$

10.2. Reference Value

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

A.M.	3.0 – 10.0 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.

11. QUALITY CONTROL

Good Laboratory Practice (GLP) requires the use of quality control specimens in each series of assays in order to check the performance of the assay. Controls should be treated as unknown samples, and the results analysed with appropriate statistical methods.

The kit control provided in the kit should be tested as unknown and are intended to assist in assessing the validity of results obtained with each assay plate.

We recommend the users to maintain graphic records of the control values generated with each assay run, including the running means, SDs and %CVs. This information will facilitate the controls trending analysis relating to the performance of current and historical control lots relative to the supplied Quality Control data. The trending will assist in the identification of assays which give control values significantly different from their average range.

When interpreting control data, users should note that this product was designed and developed as a manual product. The range stated on the Certificate of Analysis (CoA) should be appropriate for assays that are performed manually and with strict adherence to the Assay Procedure described above. It is recognised by Quality Control professionals, that as a result of differences in conditions and practices, there will always be variability in the mean values and precision of control measurements between different laboratories⁸.

12. SPECIFIC PERFORMANCE CHARACTERISTICS

12.1. Precision

Intra Assay Variation

Within run variation was determined by replicate determination (20x) of three different saliva control in one assay. The within assay variability is $\leq 10\%$.

Inter Assay Variation

Between run variation was determined by replicate measurements (10x) of three different saliva control in different lots. The between assay variability is $\leq 8.3\%$.

12.2. Specificity

The cross reaction of the antibody calculated at 50% according to Abraham is:

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 %
17 beta Estradiol	< 0.1 %
Estrone 3-sulfate	< 0.1 %
Estriol	< 0.1 %
Testosterone	< 0.1 %
Spirolactone	< 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 %

12.3. Sensitivity

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

12.4. 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.

12.5. Correlation

The Cortisol Saliva ELISA kit was compared to a previous version of the Cortisol saliva ELISA kit. 35 saliva samples were analysed.

The linear regression curve was calculated:

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

$$r^2 = 0.799$$

13. LIMITATIONS OF THE PROCEDURE

Sample(s), which are contaminated microbiologically, should not be used in the assay. Highly lipemic or haemolysed specimen(s) should similarly not be used. 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 one plate is used, it is recommended to repeat the dose response curve. Addition of the substrate solution initiates a kinetic reaction, which is terminated by the addition of the stop solution. Therefore, the addition of the substrate and the stopping solution should be added in the same sequence to eliminate any time deviation during reaction. Plate readers measure vertically. Do not touch the bottom of the wells. Failure to remove adhering solution adequately in the aspiration or decantation wash step(s) may result in poor replication and spurious results.

14. PRECAUTIONS AND WARNINGS


- The test procedure, the information, the precautions and warnings in the instructions for use have to be strictly followed. The use of the test kits with analyzers and similar equipment has to be validated. Any change in design, composition and test procedure as well as for any use in combination with other products not approved by the manufacturer is not authorized; the user himself is responsible for such changes. The manufacturer is not liable for false results and incidents for these reasons. The manufacturer is not liable for any results by visual analysis of the patient samples.
- Only for in-vitro diagnostic use.
- As in the case of any diagnostic procedure, results must be interpreted in conjunction with the patient's clinical presentation and other information available to the physician.
- The performance characteristics of this assay have not been established in a paediatric population.
- Heterophilic antibodies in human serum can react with reagent immunoglobulins, interfering with in vitro immunoassays⁹. Patients routinely exposed to animals or to animal serum products can be prone to this interference and anomalous values may be observed.
- All components of human origin used for the production of these reagents have been tested for anti-HIV antibodies, anti-HCV antibodies and HBsAg and have been found to be non-reactive. Nevertheless, all materials should still be regarded and handled as potentially infectious.
- Do not interchange reagents or strips of different production lots.
- No reagents of other manufacturers should be used along with reagents of this test kit.

- Do not use reagents after expiry date stated on the label.
- Use only clean pipette tips, dispensers, and lab ware.
- Do not interchange screw caps of reagent vials to avoid cross-contamination.
- Close reagent vials tightly immediately after use to avoid evaporation and microbial contamination.
- After first opening and subsequent storage check conjugate and control vials for microbial contamination prior to further use.
- To avoid cross-contamination and falsely elevated results pipette patient samples and dispense conjugate without splashing accurately to the bottom of wells.
- Samples microbiologically contaminated, highly lipemic, icteric or haemolysed should not be used in the assay.
- 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.
- Some reagents (standards, controls, incubation buffer, conjugate and wash solution) contain small amounts of CMIT/MIT as preservative. Avoid contact with skin or mucosa.
- The ELISA is only designed for qualified personnel who are familiar with good laboratory practice.

14.1. Safety note for reagents containing hazardous substances

Reagents may contain CMIT/MIT (3:1) (refer to 4.1)

Therefore, the following hazard and precautionary statements apply.

	Warning	H317	May cause an allergic skin reaction.
		P261	Avoid breathing gas/mist/vapours/spray.
		P280	Wear protective gloves/protective clothing/eye protection/face protection.
		P302+P352	IF ON SKIN: Wash with plenty of water.
		P333+P313	If skin irritation or rash occurs: Get medical advice/attention.
		P362+P364	Take off contaminated clothing and wash it before reuse.

Further information can be found in the safety data sheet.

14.2. Disposal Considerations

Residues of chemicals and preparations are generally considered as hazardous waste. The disposal of this kind of waste is regulated through national and regional laws and regulations. Contact your local authorities or waste management companies which will give advice on how to dispose hazardous waste.

For information about the packaging materials refer to PACKAGING MATERIALS.

15. ORDERING INFORMATION

REF	DSNOV20	Cortisol Saliva	(96 Determinations)
-----	---------	-----------------	---------------------

ESPAÑOL

1. INTRODUCCIÓN

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. USO PREVISTO

Método inmunoenzimático competitivo y colorimétrico para la determinación cuantitativa de la concentración de cortisol en la saliva de una población adulta.

3. FUNDAMENTO DE LA PRUEBA

Los pocillos de microtitulación están recubiertos con anticuerpos anti-cortisol (fase sólida). El cortisol en la muestra compite por la unión a éstos anticuerpos con cortisol marcada con peroxidasa de rábano picante (HRP por sus siglas en inglés horseradish peroxidase) o antígeno marcado con enzima. Una vez finalizada la incubación, se lleva a cabo una separación del complejo unido/libre mediante el lavado de la fase sólida. El complejo inmune formado por el antígeno marcado con enzima se visualiza mediante la adición de tetrametilbencidina (TMB), la cual produce un producto de reacción azul. La intensidad de este producto es **inversamente** proporcional a la cantidad de cortisol presente en la muestra. El ácido sulfúrico se agrega para detener la reacción. Esto produce un color amarillo estable. La absorción a 450 nm se lee con un lector de microplacas de ELISA.

4. MATERIALES

4.1. Reactivos suministrados

- **Placa de Microtitulación:** 12 tiras de 8 pozos separables. Los pozos están recubiertas con anti-cortisol, empacados en una bolsa de papel de aluminio resellable.
- **Solución de parada:** 1 vial con 15 ml de ácido sulfúrico 0,15 mol/l (evitar cualquier contacto con la piel).
- **Conjugado conc.:** 1 vial contiene 1 ml de cortisol concentrado conjugado con peroxidasa de rabano; contiene < 0,06 % (v/v) CMIT/MIT (3:1) y 0,1 % BSA.
- **Buffer de incubación:** 1 vial contiene 30 ml de buffer fosfato (50 mM, pH 7.4, BSA 1 g/l)
- **Solución de sustrato TMB:** 1 vial con 15 ml de 3,3',5,5'-tetrametilbenzidina (H₂O₂-TMB 0,26 g/l) (evitar cualquier contacto con la piel); contiene ≤ 0,0015 % (v/v) CMIT/MIT (3:1).
- **Solución de lavado concentrada 10x:** 1 vial con 50 ml de una solución concentrada de buffer de fosfatos 0,2 M, pH 7.4; contiene < 0.06 % (v/v) CMIT/MIT (3:1).
- **Control A:** 1 vial que contiene 1 ml de un lote específica de solución de control. La concentración se indica en la etiqueta de la botella; contiene < 0,06 % (v/v) CMIT/MIT (3:1) y 0,1 % BSA.
- **Control B:** 1 vial que contiene 1 ml de un lote específica de solución de control. La concentración se indica en la etiqueta de la botella; contiene < 0,06 % (v/v) CMIT/MIT (3:1) y 0,1 % BSA.
- **Estándares:** 7 botellas, de 1 ml cada una; contiene < 0,06 % (v/v) CMIT/MIT (3:1) y 0,1 % BSA.
 - Estándar 0: 0 ng/ml
 - Estándar 1: 0.5 ng/ml
 - Estándar 2: 1 ng/ml
 - Estándar 3: 5 ng/ml
 - Estándar 4: 10 ng/ml
 - Estándar 5: 20 ng/ml
 - Estándar 6: 100 ng/ml

Para unidades del S.I.: ng/ml x 2,76 = nmol/l

Para indicaciones de peligro y consejos de prudencia consulte el cap. 14.1.

4.2. Materiales suministrados

- 1 lámina autoadhesiva
- 1 instrucciones de uso

4.3. Materiales y equipos necesarios

- Lector de de ELISA equipado para medir absorbancia a 450 nm, 620-630 nm.
- Equipo manual o automático para el lavado de los pozos
- Pipetas
- Agua destilada
- Tubos de vidrio de centrífuga
- Cánula de plástico
- Tubos desechables
- Temporizador

5. ESTABILIDAD Y ALMACENAMIENTO

Los reactivos son estables hasta la fecha de caducidad indicada en la etiqueta cuando se almacenan a 2...8 °C en oscuridad.

6. PRECAUCIONES

- Evitar la exposición del sustrato TMB a la luz solar directa, metal u oxidantes. No congelar la solución.
- La máxima precisión es necesaria para la dilución y la dispensación de los reactivos.
- Este método permite la determinación de Cortisol de 0.5 – 100 ng/ml
- El suministro de esteroides naturales o sintéticos puede alterar los niveles de cortisol

7. PREPARACION DE LOS REACTIVOS

¡Es muy importante tener todos los reactivos, muestras, controles y estándares a temperatura ambiente (22...28 °C) antes de iniciar la ejecución de la prueba!

7.1. Placa de Microtitulación

Las tiras vienen listas para ser usadas y se rompen para separar los pozos. Están recubiertas con anticuerpos anti-cortisol. Se deben conservar a una temperatura de entre 2...8 °C. Abra la bolsa sólo cuando ésta se encuentre a temperatura ambiente. *Inmediatamente después de retirar las tiras que va a utilizar, asegúrese de guardar las tiras que no van a ser usados dentro de la bolsa de aluminio resellable junto con el desecante suministrado y almacenarla a una temperatura entre 2...8 °C; las tiras son estables hasta la fecha de caducidad.*

7.2. Conjugado

Preparar inmediatamente antes del uso. Diluir 10 µl de conjugado con 1 ml de buffer de incubación. Mezclar con cuidado. Estable durante 3 horas a temperatura ambiente (22-28°C).

Al final del ensayo, almacenar inmediatamente los reactivos a 2-8°C: evitar una exposición prolongada a temperatura ambiente.

7.3. Estándares

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

Los estándares son listo para usar y tienen las concentraciones de cortisol mencionada en el ítem 4.1.

Después de abiertos son estables por 6 meses almacenados de 2 a 8 °C.

7.4. Solución de sustrato TMB

El frasco contiene 15 ml de un sistema de tetrametilbencidina/peróxido de hidrógeno. El reactivo está listo para ser usado y debe ser almacenado a 2...8 °C en oscuridad. *La solución debe estar incolora o puede tener un ligero tinte azul. Si el sustrato se torna azul, esto indica que puede haberse contaminado y por lo tanto debe desecharse.*

7.5. Solución de parada

El frasco contiene 15 ml de solución de ácido sulfúrico 0,15 M. Esta solución esta lista para ser usada y debe ser almacenada a 2...8 °C.

7.6. Solución de lavado

Diluir la solución de lavado concentrada con agua destilada para alcanzar un volumen final de 500 ml antes de emplearla. Para volúmenes más pequeños, asegúrese de respetar una relación de 1:10. La solución de lavado diluida es estable durante 30 días si se almacena a 2...8 °C. 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.

7.7. Controles

Listo para usar. Las botellas contienen 1 ml de una solución de control específica para el lote. La concentración se indica en la etiqueta.

8. RECOLECCIÓN Y PREPARACIÓN DE LAS MUESTRAS

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 centrífuga y una cánula de plástico, o el dispositivo "Salivette" (Sarstedt, Ref. 51.1534.500). Los otros tipos de dispositivos de obtención disponibles en el mercado no se han comprobado.

8.1. 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).

8.2. Procesamiento

- Hacer fluir la saliva a través de la cánula hasta el tubo de vidrio de la centrifuga.
- Centrifugar la muestra durante 15 minutos a 3000 rpm.
- Conservar a -20°C durante al menos 1 hora.
- Descongelar las muestras.
- 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.

8.3. 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 para la generación de saliva.
- Retira el inserto completo con el hisopo del recipiente de centrifugado y deséchalo. La saliva clara está ahora
- lista para el ensayo (con este método debería obtener por menos 1 ml de saliva)

9. PROCEDIMIENTOS

9.1. Preparación para la prueba

Por favor, lea detenidamente la instrucciones de uso de la prueba **antes** de realizar el ensayo. La confiabilidad de los resultados depende del seguimiento estricto de la instrucciones de uso la prueba tal cual se describe en el inserto. Antes de comenzar el ensayo, se debe establecer cuidadosamente la distribución e identificación de las muestras y los estándares. Seleccione el número necesario de tiras de microtitulación o pozos e insértelos en el soporte. El pipeteo de muestras no debe tomar más de diez minutos para evitar la deriva del análisis. Si utiliza más de una placa, se recomienda repetir la curva dosis-respuesta. Por favor, destinar al menos:

- | | |
|------------------------------|--------------------|
| 1 pozo (por ejemplo, A1) | para el blanco |
| 2 pozos (por ejemplo, B1+C1) | para el estándar 0 |
| 2 pozos (por ejemplo, D1+E1) | para el estándar 1 |
| 2 pozos (por ejemplo, F1+G1) | para el estándar 2 |
| 2 pozos (por ejemplo, H1+A2) | para el estándar 3 |
| 2 pozos (por ejemplo, B2+C2) | para el estándar 4 |
| 2 pozos (por ejemplo D2+E2) | para el estándar 5 |
| 2 pozos (por ejemplo F2+G2) | para el estándar 6 |
| 2 pozos (por ejemplo H2+A3) | para el control A |
| 2 pozos (por ejemplo B3+C3) | para el control B |

Se recomienda determinar los estándares, controles y muestras por duplicado.

Realice todos los pasos del ensayo en el orden indicado y sin retrasos apreciables entre los pasos.

Debe usar una punta desechable limpia para la dosificación de cada estándar y cada muestra del paciente.

- Agregue 25 µl de estándares controles y muestras en sus respectivos pozos
- Agregue 200 µl de conjugado diluido Cortisol-HRP a cada pozo. Deje el pozo A1 libre para el blanco del sustrato.
- Cubra los pozos con la lámina autoadhesiva incluida en el paquete.
- Incube durante 1 hora a 37 °C (± 0,5 °C).**
- Cuando se complete el tiempo de incubación, retire la lámina autoadhesiva, aspire el contenido de los pozos y lave cada pozo tres veces con 300 µl de solución de lavado diluida. Evite desbordamientos entre los pozos de reacción. 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.

Nota: ¡El lavado es crítico! Un lavado insuficiente resulta en una mala precisión y valores de absorbancia falsamente elevados.

- Agregue 100 µl de solución de sustrato TMB en todos los pozos.
- Incube durante exactamente 15 minutos a temperatura ambiente (22...28 °C) en oscuridad.**

8. Agregue 100 µl de solución de parada en todos los pozos en el mismo orden y a la misma velocidad que agregó la solución de sustrato TMB. Agite la microplaca. *Cualquier color azul desarrollado durante la incubación se convertirá en amarillo.*
9. Leer la absorbancia a 450 nm frente una segunda lectura de referencia a 620-630 nm o frente al blanco entre 5 minutos.

9.2. Lectura

Ajuste el lector de placas de micropozos de ELISA a cero usando el blanco de sustrato del pozo A1.

Si - por razones técnicas - el lector de ELISA no se puede ajustar a cero con el blanco del sustrato en el pozo A1, restar el valor de absorbancia del pocillo A1 de todos los valores de absorbancia otras medidas con el fin de obtener resultados fiables!

Mida la absorbancia de todos los pozos a 450 nm y registre los valores de absorbancia para cada estándar y muestra.

Cuando sea necesario, calcule la absorbancia media de los duplicados.

10. RESULTADOS

10.1. Cálculo de los resultados

Hay disponibles diversos paquetes de software de reducción de datos que se pueden utilizar para generar el promedio de la curva de calibración y para calcular el promedio de las concentraciones de muestras y controles desconocidos. Es necesario un ajuste de curva logístico de 4 parámetros (4PL), incluido el estándar 0. No se recomiendan otros algoritmos de ajuste de curva.

También se puede preparar una curva de calibración en papel semilogarítmico mediante el trazado de la absorbancia media en el eje Y frente a la concentración de analitos en el eje X. El estándar 0 debe incluirse en la curva de calibración. Lea el valor de absorbancia medio de cada muestra desconocida que se encuentra fuera de la curva.

Para que los resultados del ensayo se consideren válidos, los estándares y los controles del kit deben ajustarse a las especificaciones detalladas en el *Certificate of Analysis (CoA)* específico del lote.

Si un control está fuera de su rango especificado, los resultados de la prueba asociados no son válidos y se deben volver a realizar pruebas de las muestras.

Conversión de unidades

Para convertir los resultados a unidades del SI:

$$\text{nmol/L} = \text{ng/mL} \times 2,76$$

Para convertir los resultados en unidades de masa:

$$\text{ng/mL} = \text{nmol/L} \times 0,36$$

10.2. 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.

11. CONTROL DE CALIDAD

Las prácticas de laboratorio recomendadas (BPL) requieren el uso de muestras de control de calidad en cada serie de ensayos para comprobar el rendimiento del ensayo. Los controles deberán tratarse como muestras desconocidas y los resultados deberán analizarse con métodos estadísticos adecuados.

El control incluido en el kit debe ser probado como desconocidos y está destinado a ayudar a evaluar la validez de los resultados obtenidos con cada placa de ensayo.

Recomendamos que los usuarios mantengan registros gráficos de los valores de control que se generan con cada ensayo, incluida la media de ejecución, la DE (desviación estándar) y el % CV. Esta información facilitará los ensayos de tendencia de los controles relacionados con el rendimiento de lotes de control actuales e históricos relativos a los datos de control de calidad proporcionados. La tendencia facilitará la identificación de los análisis que generan valores de control significativamente distintos de su intervalo medio.

Al interpretar los datos de control, los usuarios deberán tener en cuenta que este producto fue diseñado y desarrollado como un producto manual. El rango establecido en el Certificate of Analysis (CoA) deberá ser adecuado para los ensayos que se realizan manualmente y en estricto cumplimiento del procedimiento de ensayo anteriormente descrito. Los profesionales del control de la calidad reconocen que, como resultado de las diferencias en las condiciones y en las prácticas, siempre habrá variaciones entre laboratorios en los valores medios y en la precisión de las mediciones de control⁸.

12. CARACTERÍSTICA ESPECÍFICAS DE DESEMPEÑO

12.1. Precisión

Variación intraensayo

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

Variación 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 $\leq 8,3\%$.

12.2. 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 %

12.3. Sensibilidad

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

12.4. 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%.

12.5. Correlación

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

La curva de regresión es la siguiente:

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

$$r^2 = 0,799$$

13. LIMITACIONES DEL PROCEDIMIENTO

No use muestras con contaminación microbiana, altamente lipémicas o hemolizadas.

Es importante que el tiempo de reacción en cada pozo se mantiene constante para obtener resultados reproducibles. El Pipeteo de las muestras no debe prolongarse más de diez minutos para evitar la deriva del análisis. Si hay más de 10 minutos son necesarios, siga el mismo orden de dispensación. Si más de una placa se utiliza, se recomienda repetir la curva dosis-respuesta en cada placa.

Además de la solución de sustrato TMB inicia una reacción cinética, que es terminada por la adición de la solución de parada. Por lo tanto, el sustrato TMB y la solución de parada debe ser añadido en la misma secuencia para eliminar cualquier desviación de tiempo durante la reacción.

Realizar la lectura verticalmente. No toque el fondo de los pozos.

La eliminación de líquidos incompleta o inexacta de los pozos podría influir en la precisión del ensayo y / o aumentar el background.

14. PRECAUCIONES Y ADVERTENCIAS

- El procedimiento de prueba, la información, precauciones y advertencias contenidas en las instrucciones de uso deben ser seguidas estrictamente. El uso de los kits con analizadores y equipos similares debe ser validado. No está autorizado realizar ningún cambio en el diseño, composición y procedimiento del ensayo, así como ningún uso en combinación con otros productos no aprobados por el fabricante; el usuario es responsable de tales cambios. El fabricante no se hace responsable por resultados falsos o por cualquier incidente causado por esta razón. El fabricante no se responsabiliza por los resultados obtenidos mediante el análisis visual de las muestras de los pacientes.
- Sólo para uso en diagnóstico in vitro.
- Como en cualquier procedimiento diagnóstico, los resultados se deberán interpretar junto con los hallazgos clínicos del paciente y otra información de la que el médico disponga.
- Las características de rendimiento de este análisis no se han establecido para una población pediátrica.
- Los anticuerpos heterofílicos en el suero humano pueden presentar reacciones con las inmunoglobulinas reactivas, que interfieren con los inmunoensayos in vitro⁹. Los pacientes que se exponen habitualmente a animales o a productos de suero animal pueden ser propensos a esta interferencia y puede que se observen valores anómalos.
- Todos los componentes de origen humano utilizados para la producción de estos reactivos han sido examinado para determinar la presencia de anticuerpos anti-VIH, anticuerpos anti-HCV y anticuerpos anti-HBsAg y se ha determinado que no son reactivos. Sin embargo, todo el material debe ser considerado y tratado como potencialmente infeccioso.
- No intercambiar reactivos o tiras de diferentes lotes de producción.
- No se deben utilizar reactivos de otros fabricantes en combinación con los reactivos de este kit.
- No utilizar los reactivos después de la fecha de caducidad indicada en la etiqueta.
- Use sólo puntas para micropipeta, dispensadores y material de laboratorio limpio.
- No intercambie las tapas de los viales. Esto evita la contaminación cruzada.
- Cierre los viales de los reactivos con fuerza inmediatamente después de usarlos para evitar la evaporación y contaminación microbiana.
- Después de abrir el kit por primera vez y almacenarlo, verifique que los viales del conjugado y los estándares no presenten contaminación microbiana antes continuar usándolo.
- Para prevenir la contaminación cruzada y la obtención de resultados falsamente elevados, pipetee las muestras de los pacientes y dispense el conjugado con precisión hacia el fondo de los pozos evitando que se produzcan salpicaduras.
- No se deben usar en el ensayo muestras contaminadas microbiológicamente, muy lipémicas, ictericas o hemolizadas.
- El sustrato de TMB contiene un irritante, que puede ser nocivo si es inhalado, ingerido o absorbido por la piel. Para evitar lesiones, evite la inhalación, ingestión o contacto con la piel y los ojos.
- La solución de parada consiste en una solución de ácido sulfúrico diluido. El ácido sulfúrico es venenoso y corrosivo y se puede tóxico si se ingiere. Para evitar quemaduras, evitar contacto con la piel y los ojos.
- Algunos reactivos (estándares, controles, tampón de incubación conjugado y solución de lavado) contienen pequeñas cantidades de CMIT/MIT como conservante. Evite el contacto con la piel o las mucosas.
- El ELISA sólo está diseñado para personal cualificado que esté familiarizado con las buenas prácticas de laboratorio.

14.1. Nota de seguridad para los reactivos que contienen sustancias peligrosas

Los reactivos pueden contener CMIT/MIT (3:1) (consulte el cap 4.1)

Por lo tanto, se aplican las indicaciones de peligro y consejos de prudencia.

Atención



H317	Puede provocar una reacción alérgica en la piel.
P261	Evitar respirar el gas/la niebla/los vapores/el aerosol.
P280	Llevar guantes/prendas/gafas/máscara de protección.
P302+P352	EN CASO DE CONTACTO CON LA PIEL: Lavar con abundante agua.
P333+P313	En caso de irritación o erupción cutánea: Consultar a un médico.
P362+P364	Quitar las prendas contaminadas y lavarlas antes de volver a usarlas.

Se puede encontrar más información en la ficha de datos de seguridad.

14.2. Consideraciones para El Descarte

Los residuos de productos y preparaciones químicos generalmente son considerados como residuos peligrosos. La eliminación de éste tipo de residuos está regulada por leyes y regulaciones nacionales y regionales. Póngase en contacto con las autoridades locales o empresas de manejo de residuos para que lo asesoren sobre cómo eliminar los residuos peligrosos.

Para obtener información sobre los materiales de embalaje, consulte MATERIALES DE EMBALAJE.

15. INFORMACIÓN PARA PEDIDOS

REF

DSNOV20

Cortisol Saliva

(96 Determinations)


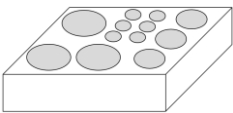


BIBLIOGRAPHY / BIBLIOGRAFÍA

1. Foster, L. B. and Dunn, R.T. (1974) Clin. Chem 20 (3), 365.
2. De Lacerda, L., Kowarski, A., and Migeon, C.J. (1973) J. Clin. Endocr. and Metab 36, 227.
3. Rolleri, E., Zannino, M., Orlandini, S. and Malvano, R. (1976) Clin chim Acta 66, 319.
4. Kobayashi, Y. et al. (1978) Steroids 32 (1), 137 – 44.
5. Arakawa, H., Maeda, M., Tsuji, A. (1979) Anal. Biochem. 97, 248.
6. Kirschbaum, C and Hellhammer, DH. (1994) Psychoneuroendocrinology 19, 313-333.
7. Cristina Mihaela Ghiciuc C.M. et al., Neuroendocrinol Lett 2011; 32(4):475-480
8. Basic QC Practices On-line Course; <http://www.Westgard.com>.
9. Boscato, LM. and Stuart, MC., 'Heterophilic antibodies: a problem for all immunoassays'. Clin Chem, 34, 1988, pp 27–33







ABBREVIATIONS / ABREVIACIONES

CMIT	5-chloro-2-methyl-4-isothiazolin-3-one
MIT	2-methyl-2H-isothiazol-3-one

PACKAGING MATERIALS / MATERIALES DE EMBALAJE

 PAP 21	 PAP 21	 PAP 22	MTP  ALU / LDPE 90
--	--	---	---

SYMBOLS KEY / SIMBOLOS

	Manufactured by / Fabricado por
IVD	In Vitro Diagnostic Medical Device / Producto para diagnóstico In vitro
LOT	Lot Number / Número de lote
	Expiration Date / Fecha de caducidad
	Storage Temperature / Temperatura de almacenamiento
	Keep away from sunlight / Mantener alejado de la luz solar
CE	CE Mark / Marca CE
REF	Catalogue Number / Número de Catálogo
	Consult Instructions for Use / Consulte las Instrucciones de Uso
MTP	Microtiterplate / Placa de Microtitulación
CONJ CONC	Conjugate / Coniugato / Conjugado
CONTROL A	Control A / Control A
CONTROL B	Control B / Control B
INC BUF	Incubation buffer / Buffer de incubación
CAL	Calibrator or. Standard / Calibrador o Estándar
SOLN STOP	Stop solution / Solución de parada
SUB TMB	TMB Substrate solution / Solución sustrato TMB
WASH BUF 10x	Washing solution 10x concentrated / Solución de lavado concentrada x10
	Contains sufficient for "n" tests / Contenido suficiente para "n" tests

SUMMARY OF TEST PROCEDURE / RESUMEN DE LA TÉCNICA

SCHEME OF THE ASSAY

Cortisol Saliva

Test Preparation

Prepare reagents and samples as described.
Establish the distribution and identification plan for all specimens and controls
Select the required number of microtiter strips or wells and insert them into the holder.

Assay Procedure

	Substrate blank	Standard 0 - 6	Controls	Sample
Standard 0 - 6	-	25 µl	-	-
Controls	-	-	25 µl	-
Sample	-	-	-	25 µl
Conjugate	-	200 µl	200 µl	200 µl
Cover wells with foil supplied in the kit Incubate for 1 h at 37°C Wash each well three times with 300 µl diluted wash solution In case you use an automatic washer, it is advised to do 6 washing steps.				
TMB Substrate	100 µL	100 µL	100 µL	100 µL
Incubate for exactly 15 min at room temperature (22...28°C) in the dark				
Stop Solution	100 µL	100 µL	100 µL	100 µL
Shake the microplate gently Photometric measurement at 450 nm against a reference wavelength of 620-630 nm or against blank within 5 minutes.				



Gold Standard Diagnostics Frankfurt GmbH

Waldstrasse 23 A6

63128 Dietzenbach, Germany

Tel.: +49 6074 23698-0

Fax: +49 6074 23698-900

E-Mail: info.frankfurt@eu.goldstandarddiagnostics.com

Website: clinical.goldstandarddiagnostics.com

Date of issue: 2024-09-13
DSNOV20_CORT Saliva_IFU_rev02_fromLot_6162BN1