

# **Cortisol Saliva Elisa**

***KAPDB290***





# History

---

Summary of change :

<b>Previous Version :</b> 220421	<b>Current Version :</b> 230629
Old Diasource logo	New DiaSource logo on the front page



# 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 cortisol saliva ELISA is a competitive immunoassay. Competition occurs between an unlabeled antigen present in calibrators, controls and patient samples and an enzyme-labelled antigen (conjugate) for a limiting number of anti-cortisol antibody binding sites on the microplate wells. After a washing step that removes unbound materials, the enzyme substrate is added and approximately 20 minutes later the enzymatic reaction is terminated by addition of stopping solution. The resulting optical density (OD), measured with a microplate reader, is inversely proportional to the concentration of cortisol in the sample. A calibrator curve is plotted with a provided set of calibrators to calculate directly the concentration of cortisol in patient samples and controls.

## 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. The levels of cortisol are increased under stress situations, physical exercise and external administration of ACTH.

Most circulating cortisol is bound to corticosteroid-binding globulin (transporting) and albumin. The amount of unbound or free cortisol (which is considered the active fraction in blood), represents approximately 1–2% of the total amount in blood.

The measurement of salivary cortisol is considered to represent the free fraction, due to the absence of appreciable amounts of cortisol-binding proteins in saliva. The level of salivary cortisol shows a diurnal rhythm with the highest levels in the morning and the lowest levels at night. Studies consistently report high correlations between serum and salivary cortisol, indicating that salivary cortisol levels reliably estimate serum cortisol levels.

The measurement of salivary cortisol levels can be used as an indicator of adrenal function and the differential diagnosis of Addison's and Cushing's diseases.

## PROCEDURAL CAUTIONS AND WARNINGS

1. This kit is intended for *in vitro* use only.
2. Practice good laboratory practices when handling kit reagents and specimens. This includes:
  - Do not pipette by mouth.
  - Do not smoke, drink, or eat in areas where specimens or kit reagents are handled.
  - Wear protective clothing and disposable gloves.
  - Wash hands thoroughly after performing the test.
  - Avoid contact with eyes; use safety glasses; in case of contact with eyes, flush eyes with water immediately and contact a doctor.
3. 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.
4. Avoid microbial contamination of reagents.
5. A calibrator curve must be established for every run.
6. It is recommended to all customers to prepare their own control materials or saliva pools which should be included in every run at a high and low level for assessing the reliability of results.
7. The controls (included in kit) must be included in every run and their results must fall within the ranges stated in the quality control certificate; a failed control result might indicate improper procedural techniques or pipetting, incomplete washing or improper reagent storage.
8. When the use of water is specified for dilution or reconstitution, use deionized or distilled water.
9. All kit reagents and specimens should be brought to room temperature and mixed gently but thoroughly before use.
10. When reading the microplate, the presence of bubbles in the wells will affect the optical densities (ODs). Carefully remove any bubbles before performing the reading step.

11. 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.
12. When dispensing the substrate and stopping solutions, do not use pipettes in which these liquids will come into contact with any metal parts.
13. To prevent contamination of reagents, use a new disposable pipette tip for dispensing each reagent, sample, calibrator and control.
14. Do not use kit components from different kit lots within a test and do not use any component beyond the expiration date printed on the label.
15. Kit reagents must be regarded as hazardous waste and disposed of according to local and/or national regulations.

## LIMITATIONS

1. The kit is calibrated for the determination of cortisol in human saliva. The kit is not calibrated for the determination of cortisol in other specimens of human or animal origin.
2. Do not use blood contaminated saliva samples.
3. Patients being treated with prednisone or prednisolone should not be tested with this cortisol saliva test until at least 24 hours after the last treatment.
4. Samples or controls containing azide or thimerosal are not compatible with this kit, they may lead to false results.
5. Only calibrator 0 may be used to dilute high saliva samples. The use of any other reagent will lead to false results.
6. The results obtained with this kit shall never be used as the sole basis for a clinical diagnosis. For example, some drugs and the occurrence of heterophilic antibodies in patients regularly exposed to animals or animal products have the potential of causing interferences in immunological tests. Consequently, the clinical diagnosis should comprise all aspects of a patient's background including the frequency of exposure to animals/products.

## SAFETY CAUTIONS AND WARNINGS POTENTIAL BIOHAZARDOUS MATERIAL

The reagents should be considered a potential biohazard and handled with the same precautions applied to saliva specimens. All human specimens should be considered a potential biohazard and handled as if capable of transmitting infections and in accordance with good laboratory practices.

## 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, PRE-TREATMENT AND STORAGE

Avoid sample collection within 1 hour after eating a major meal or within 12 hours after consuming alcohol. Acidic or high sugar foods can compromise assay performance by lowering sample pH and influencing bacterial growth. To minimize these factors, rinse mouth thoroughly with water 10 minutes before the sample is collected. Do not use blood-contaminated specimens.

### Specimen Collection

Approximately 0.1 mL of saliva is required per duplicate determination. Rinse mouth thoroughly with water 10 minutes before the sample is collected. Collect 1–2 mL of saliva into a clean polypropylene tube without force or inducement.

### Specimen Pre-Treatment

Following collection, the sample must be pretreated according to the following procedure:

1. Freeze the sample for a minimum of 2 hours.
2. Thaw the sample.
3. Vortex to mix and centrifuge the sample at 2000x g for 10 minutes.
4. Carefully remove the supernatant and transfer to a new labeled tube. The supernatant will be used in the assay procedure of the test.

## Specimen Storage

Store pretreated samples at 4°C for up to 24 hours or freeze at or below -20°C for up to 6 months. Samples that have been stored should be inspected to ensure they are free from precipitates before being used in the assay. If there are precipitates present, follow steps 3–4 in the specimen pretreatment section. Consider all human specimens as possible biohazardous materials.

## REAGENTS AND EQUIPMENT NEEDED BUT NOT PROVIDED

1. Precision pipette to dispense 25, 50, 100, 150, 300 and 1000 µL
2. Disposable pipette tips
3. Distilled or deionized water
4. Benchtop centrifuge
5. Vortex
6. Microplate reader with a filter set at 450 nm and an upper OD limit of 3.0 or greater
7. Microplate washer (recommended)

## REAGENTS PROVIDED

**Anti-Cortisol Antibody-Coated Break-Apart Well Microplate** - 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

**Cortisol Horseradish Peroxidase (HRP) Conjugate Concentrate** – Requires Preparation **X50**

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

Volume: 450 µL/vial

Storage: Refrigerate at 2–8°C

Preparation of working conjugate: Dilute 1:50 in assay buffer before use (eg. 40 µL of conjugate concentrate in 2 mL of assay buffer). If the whole plate is to be used dilute 340 µL of conjugate concentrate in 17 mL of assay buffer. Discard any that is left over.

**Cortisol Saliva Calibrators** - Ready To Use. N = 0 to 5

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 ng/mL	Volume/Vial
Calibrator 0	0	2.0
Calibrator 1	0.1	1.0
Calibrator 2	0.5	1.0
Calibrator 3	2.5	1.0
Calibrator 4	10	1.0
Calibrator 5	50	1.0

Storage: Refrigerate at 2–8°C

Stability: Once opened, calibrators should be used within 14 days or aliquoted and stored frozen. Avoid multiple freezing and thawing cycles.

**Controls** - Ready To Use.

Contents: Two vials 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 labels for the acceptable ranges.

Volume: 1.0 mL/vial

Storage: Refrigerate at 2–8°C

Stability: Once opened, the controls should be used within 14 days or aliquoted and stored frozen. Avoid multiple freezing and thawing cycles.

**Wash Buffer Concentrate** – **X10**

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

Preparation of working wash buffer: 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.

**Assay Buffer** - Ready To Use.

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

Volume: 20 mL/bottle

Storage: Refrigerate at 2–8°C

**TMB Substrate** - Ready To Use.

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

**Stopping Solution** - Ready To Use.

Contents: One bottle containing 1M sulfuric acid.

Volume: 6 mL/bottle

Storage: Refrigerate at 2–8°C

## ASSAY PROCEDURE

Specimen Pretreatment: See Specimen Collection, Pre-Treatment and Storage Section.

All kit components, controls and specimen samples must reach room temperature prior to 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. After all kit components have reached room temperature, mix gently by inversion. Prepare the working conjugate and working wash buffer (see Cortisol-Horseradish Peroxidase (HRP) Conjugate Concentrate and Wash Buffer Concentrate reagents in the REAGENTS PROVIDED section).
2. Remove the required number of strips from the microplate and assemble into a plate frame. Reseal the bag and return any unused strips to the refrigerator.
3. Pipette 25 µL of each calibrator, control and specimen sample into correspondingly labelled microplate wells.
4. Pipette 150 µL of the Cortisol-HRP working conjugate solution into each microplate well (the use of a multi-channel pipette is recommended).
5. Gently tap the microplate frame for 10 seconds to mix the contents of the wells and incubate the microplate at room temperature (no shaking) for 45 minutes.
6. Wash the microplate wells 3 times with working wash buffer (350 µL/well for each wash) and tap the plate firmly against absorbent paper to ensure that it is dry. The use of a microplate washer is highly recommended. If a microplate washer is not available, ensure that the wash buffer reaches the top edge of the wells and that no liquid remains in the microplate after the final washing, avoid splashing.
7. Pipette 150 µL of TMB substrate into each microplate well at timed intervals.
8. Gently tap the microplate frame for 10 seconds to mix the contents of the wells and incubate the microplate at room temperature (no shaking) for 15–20 minutes.
9. Pipette 50 µL of stopping solution into each microplate well at the same timed intervals as in step 7 and gently tap the microplate frame to mix the contents of the wells.
10. Read the microplate in a microplate reader at 450 nm, within 20 minutes after addition of the stopping solution.

## CALCULATIONS

1. Calculate the mean optical density of each calibrator, control and sample duplicate.
2. Use a 4-parameter or 5-parameter curve fit with immunoassay software to generate a calibrator curve.
3. Read the values of the unknowns directly off the calibrator curve.

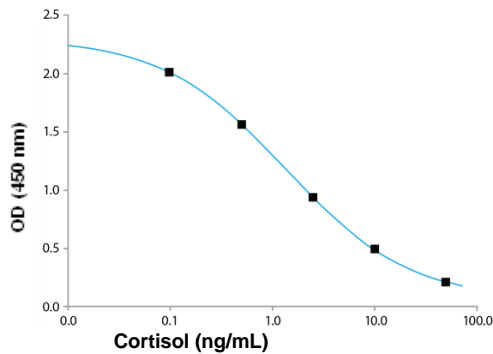
4. If a sample reads more than 50 ng/mL dilute it with calibrator 0 not more than 10-fold. The result obtained must be multiplied by the dilution factor.

#### TYPICAL TABULATED DATA

Calibrator	Mean OD 450 nm	% Binding	Value (ng/mL)
0	2.555	100	0
1	2.219	87	0.1
2	1.695	66	0.5
3	0.963	38	2.5
4	0.498	20	10
5	0.204	8	50
Unknown	0.988	—	2.4

#### TYPICAL CALIBRATION CURVE

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



#### PERFORMANCE CHARACTERISTICS

##### SENSITIVITY

The lower detection limit is calculated from the standard 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 Cortisol Saliva ELISA kit is 0.033 ng/mL.

##### SPECIFICITY (CROSS REACTIVITY)

The following compounds were tested for cross-reactivity with cortisol cross-reacting at 100%.

Compound	% Cross Reactivity
Cortisol	100
Progesterone	1.9
Corticosterone	1.4
11-Deoxycorticosterone	< 0.04
Cortisone	6.3
Prednisone	3.6
DHEAS	< LoD
Prednisolone	17.8

Prednisolone does cross react with most assays (~30% with most commercially available assays). Prednisolone has a half-life of ~3.5 hours and needs 16–18 hours to be adequately cleared from the circulation.

Since prednisone is converted to prednisolone in vivo, caution must be exercised when assaying the cortisol levels of patients undergoing either therapy. Patients being treated with prednisone or prednisolone should not be tested with this cortisol saliva test until at least 24 hours after the last treatment.

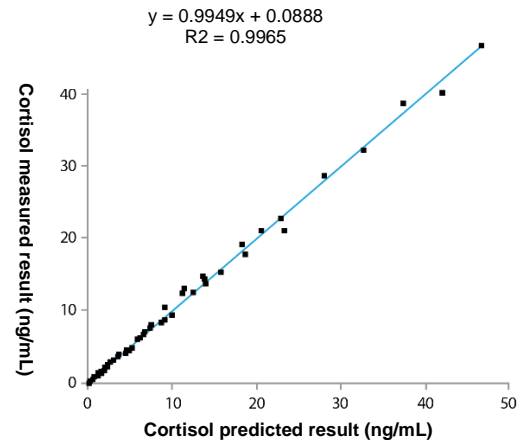
##### PRECISION

The experimental protocol used a nested components-of-variance design with 10 testing days, two lots and two scientists per day. Each scientist ran two tests with two lots per day and two replicate measurements per run (a 10 x 2 x 2 x 2 design) for each sample. The results were analyzed with a two-way nested ANOVA and summarized in the table below.

Sample	Mean	Within Run SD	Within Run CV	Total SD	Total CV
1	1.870	0.213	11.4%	0.218	11.7%
2	6.637	0.462	7.0%	0.589	8.9%
3	10.196	0.834	8.2%	1.061	10.4%
4	18.756	1.383	7.4%	1.763	9.4%
5	3.035	0.287	9.4%	0.291	9.6%
6	0.679	0.114	16.9%	0.118	17.4%
7	24.800	2.103	8.5%	2.567	10.4%
8	0.356	0.056	15.8%	0.058	16.4%
9	2.309	0.214	9.2%	0.228	9.9%
10	12.939	0.991	7.7%	1.090	8.4%

#### LINEARITY

The linearity study was performed with five human saliva samples with concentrations covering the range of the assay and following CLSI guideline EP06-A. The samples were diluted in calibrator 0 up to ten-fold (1:10), tested in duplicate, and the results (y) compared to the predicted concentration. The statistical analysis shows that the assay is sufficiently linear throughout the dynamic range of the kit up to a 1:10 dilution, when using calibrator 0 as the diluent.



#### COMPARATIVE STUDIES

The DIIAsource Cortisol Saliva ELISA kit assay (y) was compared to a commercial Cortisol Saliva ELISA assay (x). The comparison of 47 saliva samples yielded the following linear regression results:  $y = 0.844x + 0.634$ ,  $R^2 = 0.929$

#### REFERENCE RANGES

Reference ranges (95%) were established using samples obtained from individuals of diverse races. Each laboratory shall establish their own range of reference values.

Group	N	Median (ng/mL)	95% Range (ng/mL)	95% Range (ng/mL)	Total Range (ng/mL)	Total Range (ng/mL)
Males AM	82	1.638	0.21–6.33	AM range (ng/mL) 0.21–7.27	0.07–7.63	AM range (ng/mL) 0.07–7.90
Females AM	78	2.265	0.23–7.27		0.113–7.90	
Males PM	76	0.897	0.16–3.42	PM range (ng/mL) 0.074–3.42	0.045–4.34	PM range (ng/mL) 0.02–4.34
Females PM	77	0.396	0.074–2.38		0.02–3.78	

## LITERATURE

7. Rose JQ, Yurchak AM, Jusko JW. Dose dependent pharmacokinetics of prednisone and prednisolone in man. *J Pharmacokinet Biopharm.* 1981; 9:389–417.
8. Vining RF, McGinley RA. The measurement of hormones in saliva: possibilities and pitfalls. *J Steroid Biochem.* 1987; 27:81–94.
9. Aardal E, Holm, AC. Cortisol in saliva – Reference ranges in relation to cortisol in serum. *Eur J Clin Chem Clin Biochem.* 1995; 33(12):927–32.
10. Nicholson N, Storms C, Ponds R, Sulon J. Salivary Cortisol Levels and Stress Reactivity in Human Aging . *J Gerontol A Biol Sci Med Sci.* 1997; 52:68–75
11. Yaneva M, et al. Midnight Salivary Cortisol for the Initial Diagnosis of Cushing's Syndrome of Various Cause. *J Clin Endocrinol Metab.* 2004; 89(7):3345–51.
12. Dorn LD, Lucke JF, Loucks TL, Berga SL. Salivary cortisol reflects serum cortisol: Analysis of circadian profiles. *Ann Clin Biochem.* 2007; 44(pt 3):281–4.
13. Dickmeis T. Glucocorticoids and the circadian clock. *J Endocrinol.* 2009; 200(1):3–22.
14. VanBruggen MD, et al. The Relationship Between Serum and Salivary Cortisol Levels in Response to Different Intensities of Exercise. *Int J Sports Physiol Perform.* 2011; 6(3):396–407.
15. Prednisolone, Dexamethasone and Cortisol assays. Biochemical Investigations in Laboratory Medicine. [http://www.pathology.leedsth.nhs.uk/dnn\\_bilm/Misc/Syntheticglucocorticoidsandcortisolassays.aspx](http://www.pathology.leedsth.nhs.uk/dnn_bilm/Misc/Syntheticglucocorticoidsandcortisolassays.aspx) Published 17 Nov 2009. Accessed 21 Aug 2019.

Revision date : 2023-06-29



# 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 en la actividad antiinflamatoria. También participa en la absorción de calcio, la gluconeogénesis y la secreción de ácido gástrico y pepsina. Los niveles de cortisol aumentan en situaciones de estrés, ejercicio físico y administración externa de ACTH.

La mayor parte del cortisol circulante está unido a la globulina transportadora de corticosteroides y a la albúmina. La cantidad de cortisol no unido o libre (que se considera la fracción activa en sangre), representa aproximadamente el 1-2% de la cantidad total en sangre.

Se considera que la medición del cortisol salival representa la fracción libre, debido a la ausencia de cantidades apreciables de proteínas fijadoras de cortisol en la saliva. El nivel de cortisol salival muestra un ritmo diurno con los niveles más altos por la mañana y los más bajos por la noche. Los estudios informan sistemáticamente de altas correlaciones entre el cortisol sérico y el salival, lo que indica que los niveles de cortisol salival estiman de forma fiable los niveles de cortisol sérico.

La medición de los niveles de cortisol salival puede utilizarse como indicador de la función suprarrenal y el diagnóstico diferencial de las enfermedades de Addison y Cushing.

## PRECAUCIONES Y ADVERTENCIAS SOBRE EL PROCEDIMIENTO

- Este kit está destinado únicamente a un uso *in vitro*.
- Practique las buenas prácticas de laboratorio al manipular los reactivos y las muestras del kit. Esto incluye:
  - No pipetear con la boca.
  - No fumar, beber o comer en las zonas donde se manipulan las muestras o los reactivos del kit.
  - Utilizar ropa de protección y guantes desechables.
  - Lávese bien las manos después de realizar la prueba.
  - Evitar el contacto con los ojos; utilizar gafas de seguridad; en caso de contacto con los ojos, lavarlos con agua inmediatamente y contactar con un médico.
- Los usuarios deben conocer a fondo este protocolo para utilizar con éxito este kit. Sólo se conseguirá un rendimiento fiable si se siguen de forma estricta y cuidadosa las instrucciones proporcionadas.
- Evite la contaminación microbiana de los reactivos.
- Debe establecerse una curva de calibración para cada ejecución.
- Se recomienda a todos los clientes que preparen sus propios materiales de control o pools de saliva que deben incluirse en cada corrida en un nivel alto y bajo para evaluar la fiabilidad de los resultados.
- Los controles (incluidos en el kit) deben incluirse en cada corrida y sus resultados deben estar dentro de los rangos establecidos en el certificado de control de calidad; un resultado de control fallido podría indicar técnicas de procedimiento o pipeteo inadecuadas, lavado incompleto o almacenamiento inadecuado de reactivos.
- Cuando se especifique el uso de agua para la dilución o reconstitución, utilice agua desionizada o destilada.
- Todos los reactivos del kit y las muestras deben ser llevados a temperatura ambiente y mezclados suave pero completamente antes de su uso.

10. Al leer la microplaca, la presencia de burbujas en los pocillos afectará a las densidades ópticas (DO). Elimine cuidadosamente cualquier burbuja antes de realizar el paso de lectura.

11. La solución de sustrato (TMB) es sensible a la luz y debe permanecer incolora si se almacena correctamente. La inestabilidad o la contaminación pueden ser indicadas por el desarrollo de un color azul, en cuyo caso no debe utilizarse.

12. Al dispensar las soluciones de sustrato y de parada, no utilice pipetas en las que estos líquidos entren en contacto con cualquier parte metálica.

13. Para evitar la contaminación de los reactivos, utilice una nueva punta de pipeta desechable para dispensar cada reactivo, muestra, calibrador y control.

14. No utilice componentes del kit de diferentes lotes dentro de una prueba y no utilice ningún componente más allá de la fecha de caducidad impresa en la etiqueta.

15. Los reactivos del kit deben considerarse como residuos peligrosos y eliminarse de acuerdo con la normativa local y/o nacional.

## LIMITACIONES

- El kit está calibrado para la determinación de cortisol en saliva humana. El kit no está calibrado para la determinación de cortisol en otras muestras de origen humano o animal.
- No utilice muestras de saliva contaminadas con sangre.
- Los pacientes en tratamiento con prednisona o prednisolona no deben ser analizados con este test de cortisol en saliva hasta al menos 24 horas después del último tratamiento.
- Las muestras o controles que contengan azida o timerosal no son compatibles con este kit, pueden dar lugar a resultados falsos.
- Sólo se puede utilizar el calibrador 0 para diluir las muestras de saliva altas. El uso de cualquier otro reactivo conducirá a resultados falsos.
- Los resultados obtenidos con este kit nunca deberán utilizarse como única base para un diagnóstico clínico. Por ejemplo, algunos fármacos y la aparición de anticuerpos heterófilos en pacientes expuestos regularmente a animales o productos animales tienen el potencial de causar interferencias en las pruebas inmunológicas. Por consiguiente, el diagnóstico clínico debe comprender todos los aspectos de los antecedentes del paciente, incluida la frecuencia de exposición a animales/productos.

## PRECAUCIONES Y ADVERTENCIAS DE SEGURIDAD

### MATERIAL DE POTENCIAL RIESGO BIOLÓGICO

Los reactivos deben considerarse un riesgo biológico potencial y manipularse con las mismas precauciones aplicadas a las muestras de saliva. Todas las muestras humanas deben considerarse un riesgo biológico potencial y manipularse como si fueran capaces de transmitir infecciones y de acuerdo con las buenas prácticas de laboratorio.

### 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 DE MUESTRAS, TRATAMIENTO PREVIO Y

### ALMACENAMIENTO

Evite la recogida de muestras en la hora siguiente a una comida importante o en las 12 horas siguientes al consumo de alcohol. Los alimentos ácidos o con alto contenido de azúcar pueden comprometer el rendimiento del ensayo al disminuir el pH de la muestra e influir en el crecimiento bacteriano. Para minimizar estos factores, enjuague la boca a fondo con agua 10 minutos antes de recoger la muestra. No utilice muestras contaminadas con sangre.

### Recogida de muestras

Se requiere aproximadamente 0,1 mL de saliva por determinación duplicada. Enjuague la boca con agua 10 minutos antes de recoger la muestra. Recoger 1-2 mL de saliva en un tubo de polipropileno limpio sin forzar ni inducir.

### Pretratamiento de la muestra

Después de la recolección, la muestra debe ser pretratada de acuerdo con el siguiente procedimiento:

- Congelar la muestra durante un mínimo de 2 horas.
- Descongele la muestra.



- Vortex para mezclar y centrifugar la muestra a 2000x g durante 10 minutos.
- Retire con cuidado el sobrenadante y transfíralo a un nuevo tubo etiquetado. El sobrenadante se utilizará en el procedimiento de ensayo de la prueba.

### Conservación de muestras

Almacenar las muestras pretratadas a 4°C durante un máximo de 24 horas o congelarlas a -20°C o menos durante un máximo de 6 meses. Las muestras que han sido almacenadas deben ser inspeccionadas para asegurarse de que están libres de precipitados antes de ser utilizadas en el ensayo. Si hay precipitados, siga los pasos 3-4 de la sección de pretratamiento de muestras. Considere todas las muestras humanas como posibles materiales de riesgo biológico.

### REACTIVOS Y EQUIPOS NECESARIOS PERO NO SUMINISTRADOS

- Pipeta de precisión para dispensar 25, 50, 100, 150, 300 y 1000 µL
- Puntas de pipeta desechables
- Agua destilada o desionizada
- Centrífuga de sobremesa
- vórtice
- Lector de microplacas con un filtro ajustado a 450 nm y un límite superior de OD de 3,0 o superior
- Lavador de microplacas (recomendado)

### REACTIVOS PROPORCIONADOS

**U1** **Microplaca de pocillos recubierta de anticuerpos contra el cortisol**, -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

**Ag** **HRP** **CONC** **Conjugado concentrado de cortisol-peroxidasa de rábano picante (HRP) - X50**  
 Contenido: Conjugado Cortisol-HRP en un tampón a base de proteínas con un conservante sin mercurio.  
 Volumen: 450 µL/vial  
 Almacenamiento: Refrigerar a 2-8 °C

Preparación del conjugado de trabajo: Diluir 1:50 en tampón de ensayo antes de utilizarlo (por ejemplo, 40 µL de concentrado de conjugado en 2 mL de tampón de ensayo). Si se va a utilizar toda la placa, diluir 340 µL de concentrado de conjugado en 17 mL de tampón de ensayo. Deseche 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 a base de proteínas con un conservante sin mercurio. Preparado por adición de tampón con una cantidad definida de cortisol.

\*Las concentraciones indicadas a continuación son aproximadas; consulte las etiquetas de los viales para conocer las concentraciones exactas.

Calibrador	Concentration ng/mL	Volume/Vial ng/mL
Calibrador 0	0	2.0
Calibrador 1	0.1	1.0
Calibrador 2	0.5	1.0
Calibrador 3	2.5	1.0
Calibrador 4	10	1.0
Calibrador 5	50	1.0

Almacenamiento: Refrigerar a 2-8 °C

Estabilidad: Una vez abiertos, los calibradores deben utilizarse en un plazo de 14 días o dividirse en alícuotas y almacenarse congelados. Evite los ciclos múltiples de congelación y descongelación.

**CONTROL** **Controles** - Listos para usar.

Contenido: Dos viales que contienen cortisol en un tampón a base de proteínas con un conservante sin mercurio. Preparado añadiendo tampón con una cantidad definida de cortisol. Consulte las etiquetas de los viales para conocer los rangos aceptables.

Volumen: 1.0 mL/vial

Conservación: Refrigerado a 2-8°C

Estabilidad: Una vez abiertos, los controles deben usarse dentro de los 14 días o dividirse en alícuotas y almacenarse congelados. Evite múltiples ciclos 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 del tampón de lavado de trabajo: Diluir 1:10 en agua destilada o desionizada antes de su uso. Si se va a utilizar toda la placa, diluir 50 mL del concentrado de tampón de lavado en 450 mL de agua.

**ASS** **BUF**

**Tampón de ensayo** - Listo para usar

Contenido: Un frasco con tetrametilbencidina y peróxido de hidrógeno en un tampón que no contenga DMF o DMSO

Volumen: 20 ml/frasco

Almacenamiento: Refrigerar a 2-8 °C

**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

**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

### PROCEDIMIENTO DEL ENSAYO

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

Todos los componentes del kit, los controles y las muestras de especímenes deben alcanzar la temperatura ambiente antes de su uso. Los calibradores, controles y muestras de especímenes deben ensayarse por duplicado. Una vez iniciado el procedimiento, todos los pasos deben completarse sin interrupción.

- Una vez que todos los componentes del kit hayan alcanzado la temperatura ambiente, mezclar suavemente por inversión. Prepare el conjugado de trabajo y el tampón de lavado de trabajo (vea los reactivos Conjugado de Cortisol y Peroxidasa de Rábano (HRP) y Tampón de Lavado Concentrado en la sección REACTIVOS PROPORCIONADOS).
- Extraer el número necesario de tiras de la microplaca y montarlas en un marco de placas. Vuelva a cerrar la bolsa y devuelva las tiras no utilizadas al refrigerador.
- Pipetear 25 µL de cada calibrador, control y muestra en los pocillos de la microplaca etiquetados correspondientemente.
- Pipetear 150 µL de la solución de trabajo del conjugado Cortisol-HRP en cada pocillo de la microplaca (se recomienda el uso de una pipeta multicanal).
- Golpear suavemente el marco de la microplaca durante 10 segundos para mezclar el contenido de los pocillos e incubar la microplaca a temperatura ambiente (sin agitación) durante 45 minutos.
- Lavar los pocillos de la microplaca 3 veces con tampón de lavado de trabajo (350 µL/pocillo para cada lavado) y golpear firmemente la placa contra papel absorbente para asegurarse de que está seca. Se recomienda encarecidamente el uso de un lavador de microplacas. Si no se dispone de un lavador de microplacas, asegúrese de que el tampón de lavado llegue al borde superior de los pocillos y que no quede líquido en la microplaca después del último lavado, evite las salpicaduras.
- Pipetear 150 µL de sustrato de TMB en cada pocillo de la microplaca a intervalos de tiempo.
- Golpear suavemente el marco de la microplaca durante 10 segundos para mezclar el contenido de los pocillos e incubar la microplaca a temperatura ambiente (sin agitar) durante 15-20 minutos.
- Pipetear 50 µL de solución de parada en cada pocillo de la microplaca a los mismos intervalos de tiempo que en el paso 7 y golpear suavemente el marco de la microplaca para mezclar el contenido de

los pocillos.

10. Leer la microplaca en un lector de microplacas a 450 nm, dentro de los 20 minutos siguientes a la adición de la solución de parada.

## CÁLCULOS

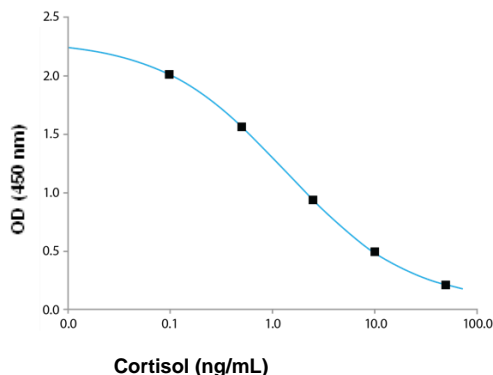
- 1 Calcular la densidad óptica media de cada calibrador, control y duplicado de muestra.
- 2 Utilizar un ajuste de curva de 4 o 5 parámetros con el software de inmunoensayo para generar una curva de calibrador.
- 3 Leer los valores de las incógnitas directamente de la curva del calibrador.
- 4 Si una muestra lee más de 50 ng/mL, dilúyala con el calibrador 0 no más de 10 veces. El resultado obtenido debe multiplicarse por el factor de dilución.

## DATOS TÍPICOS TABULADOS

Calibrador	Media OD 450 nm	% vinculante	Valor (ng/mL)
0	2.555	100	0
1	2.219	87	0.1
2	1.695	66	0.5
3	0.963	38	2.5
4	0.498	20	10
5	0.204	8	50
Unknown	0.988	—	2.4

## CURVA TÍPICA DE CALIBRACIÓN

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



## CARACTERÍSTICAS DE PRESENTACIÓN

### SENSIBILIDAD

El límite de detección inferior se calcula a partir de la curva estándar determinando la concentración resultante de la DO media del Calibrador 0 (basado en 10 análisis repetidos) menos 2 SD. Por lo tanto, la sensibilidad del kit Cortisol Saliva ELISA es de 0,033 ng/mL.

### ESPECIFICIDAD (REACTIVIDAD CRUZADA)

Se analizó la reactividad cruzada de los siguientes compuestos con una reacción cruzada de cortisol al 100 %

Compound	% Cross Reactivity
Cortisol	100
Progesterone	1.9
Corticosterone	1.4
11-Deoxycorticosterone	< 0.04
Cortisone	6.3
Prednisone	3.6
DHEAS	< LoD
Prednisolone	17.8

La prednisolona reacciona de forma cruzada con la mayoría de los ensayos (~30 % con la mayoría de los ensayos disponibles en el mercado). La prednisolona tiene una vida media de ~3.5 horas y necesita de 16 a 18 horas para eliminarse adecuadamente de la circulación.

Dado que la prednisona se convierte en prednisolona in vivo, se debe tener precaución al analizar los niveles de cortisol de los pacientes que se someten a

cualquiera de las terapias. Los pacientes en tratamiento con prednisona o prednisolona no deben someterse a esta prueba de cortisol en saliva hasta al menos 24 horas después del último tratamiento.

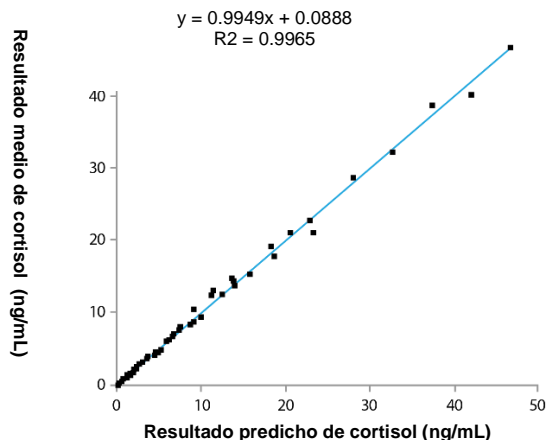
## PRECISIÓN

El protocolo experimental usó un diseño anidado de componentes de varianza con 10 días de prueba, dos lotes y dos científicos por día. Cada científico realizó dos pruebas con dos lotes por día y dos mediciones repetidas por ejecución (un diseño de 10 x 2 x 2 x 2) para cada muestra. Los resultados se analizaron con un ANOVA anidado de dos vías y se resumen en la siguiente tabla.

Muestra	Media (ng/mL)	Dentro Run SD (µg/dL)	Dentro Run CV%	Entre Run SD (µg/dL)	Entre Run CV%
1	1.870	0.213	11.4%	0.218	11.7%
2	6.637	0.462	7.0%	0.589	8.9%
3	10.196	0.834	8.2%	1.061	10.4%
4	18.756	1.383	7.4%	1.763	9.4%
5	3.035	0.287	9.4%	0.291	9.6%
6	0.679	0.114	16.9%	0.118	17.4%
7	24.800	2.103	8.5%	2.567	10.4%
8	0.356	0.056	15.8%	0.058	16.4%
9	2.309	0.214	9.2%	0.228	9.9%
10	12.939	0.991	7.7%	1.090	8.4%

## LINEALIDAD

El estudio de linealidad se realizó con cinco muestras de saliva humana con concentraciones que cubrían el rango del ensayo y siguiendo la directriz CLSI EP06-A. Las muestras se diluyeron en el calibrador 0 hasta diez veces (1:10), se analizaron por duplicado y los resultados (y) se compararon con la concentración prevista. El análisis estadístico muestra que el ensayo es suficientemente lineal en todo el rango dinámico del kit hasta una dilución de 1:10, cuando se utiliza el calibrador 0 como diluyente.



## ESTUDIOS COMPARATIVOS

El ensayo del kit DAsource Cortisol Saliva ELISA (y) se comparó con un ensayo comercial ELISA de Cortisol Saliva (x). La comparación de 47 muestras de saliva arrojó los siguientes resultados de regresión lineal:

$$y = 0.844x + 0.634,$$

## RANGOS DE REFERENCIA

Los rangos de referencia (95%) se establecieron a partir de muestras obtenidas de individuos de diversas razas. Cada laboratorio establecerá su propio rango de valores de referencia.

Grupo	N	Medios (ng/mL)	95% Rangos (ng/mL)	95% Rangos (ng/mL)	Total Rangos (ng/mL)	Total Range (ng/mL)
Masculino AM	82	1.638	0.21–6.33	AM rangos (ng/mL) 0.21–7.27	0.07–7.63	AM rangos (ng/mL) 0.07–7.90
Mujer AM	78	2.265	0.23–7.27			
Masculino AM	76	0.897	0.16–3.42	PM rangos (ng/mL) 0.074–3.42	0.045–4.34	PM rangos (ng/mL) 0.02–4.34
Mujer AM	77	0.396	0.074–2.38			

## 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., *Experientia* 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 Edocrinol.* 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: 2023-06-29