



CORTISOL-RIA-CT

KIPI28000

Version : 251106

Date of issue : 06/11/2025

Revision date: 06/11/2023

History

Summary of change:

Previous Version: 230123	Current Version: 251106
V. REAGENTS PROVIDED CONTROL N Controls – 1 and 2 in human plasma with azide (<0.1%)	V. REAGENTS PROVIDED CONTROL N Controls – 1 and 2 in human plasma with thymol

Read entire protocol before use.

CORTISOL-RIA-CT

I. INTENDED USE

Radioimmunoassay for the *in vitro* quantitative measurement of human Cortisol in **serum, plasma, urine or saliva** without extraction.

For professional use only.

II. GENERAL INFORMATION

- A. **Proprietary name :** DIAsource CORTISOL-RIA-CT Kit
- B. **Catalog number :** KIP128000 : 96 tests
- C. **Manufactured by :** DIAsource ImmunoAssays S.A.
Rue du Bosquet, 2, B-1348 Louvain-la-Neuve, Belgium.

For technical assistance or ordering information contact :
Tel : +32 (0)10 84.99.11 Fax : +32 (0)10 84.99.91

III. CLINICAL BACKGROUND

A. Biological activity

Cortisol is the major glucocorticoid produced and secreted by the adrenal gland. In response to different stimuli (diurnal rhythm, stress, low blood sugar concentration), the cerebral cortex stimulates the hypothalamus to release the CRF (corticotrophin releasing factor). CRF causes the release from the pituitary gland of ACTH (adrenocorticotrophic hormone). Glucocorticoids are then synthesized in response to ACTH.

Since Cortisol levels depend upon the interaction of the hypothalamus, pituitary and adrenal glands, measurement of urine cortisol levels can also aid in the differential diagnosis of the diseases states of these glands.

IV. PRINCIPLES OF THE METHOD

A fixed amount of ^{125}I labelled steroid competes with the steroid to be measured present in the sample or in the calibrator for a fixed amount of antibody sites being immobilized to the wall of a polystyrene tube. Neither extraction nor chromatography are required because of the high specificity of the coated antibodies. After 45 minutes incubation at 37°C (180 minutes for salivary procedure), an aspiration step terminates the competition reaction. The tubes are then washed with 3 ml of wash solution and aspirated again. A calibration curve is plotted and the cortisol concentrations of the samples are determined by dose interpolation from the calibration curve.

The method is calibrated against LC-MS reference method.

V. REAGENTS PROVIDED

Reagents	96 Test Kit	Colour Code	Reconstitution
 Tubes coated with anti cortisol (monoclonal)	2 x 48	yellow	Ready for use
Ag ^{125}I TRACER: ^{125}I odine labelled cortisol in phosphate-citrate buffer with proteins, ANS, and azide (<0.1%)	1 vial 52 ml 116 kBq	red	Ready for use
CAL 0 Zero Calibrator in human serum and azide (0.1%)	1 vial 1 ml	yellow	Ready for use
CAL N Calibrators - N = 1 to 5 (see exact values on vial labels) in human serum and azide (0.1%)	5 vials 0.5 ml	yellow	Ready for use
WASH SOLN CONC Wash solution (TRIS-HCl)	1 vial 10 ml	brown	Dilute 70 x with distilled water (use a magnetic stirrer).
CONTROL N Controls – 1 and 2 in human plasma with thymol	2 vials lyophilised	silver	Add 0.5 ml distilled water. Values for salivary procedure are also indicated on the labels

Note : Use the zero calibrator for sera dilutions. If needed, urines can be diluted in an ordinary phosphate saline buffer (PBS). Saliva can be diluted in physiological serum (see XI)

VI. SUPPLIES NOT PROVIDED

The following material is required but not provided in the kit:

- Distilled water
- Pipettes for delivery of: 25 μl , 200 μl and 500 μl (the use of accurate pipettes with disposable plastic tips is recommended)
- Vortex mixer
- Magnetic stirrer
- Water bath at 37°C
- 5 ml automatic syringe (Cornwall type) for washing
- Aspiration system (optional)
- Any gamma counter capable of measuring ^{125}I may be used (minimal yield 70%).
- Physiological serum (NaCl 9 g/L solution), for salivary procedure

VII. REAGENT PREPARATION

- A. Controls:** Reconstitute the controls with 0.5 ml distilled water.
- B. Working Wash solution:** Prepare an adequate volume of Working Wash solution by adding 69 volumes of distilled water to 1 volume of Wash Solution (70x). Use a magnetic stirrer to homogenize. Discard unused Working Wash solution at the end of the day.
- C. Calibrators and controls preparation for salivary procedure: see XI**

VIII. STORAGE AND EXPIRATION DATING OF REAGENTS

- Before opening or reconstitution, all kits components are stable until the expiry date, indicated on the label, if kept at 2 to 8°C .
- After reconstitution, controls are stable for 7 days at $2-8^{\circ}\text{C}$.

For longer storage periods, aliquots should be made and kept at -20°C for maximum 3 months. Avoid subsequent freeze-thaw cycles.

- Freshly prepared Working Wash solution should be used on the same day.
- After its first use, tracer is stable until expiry date, if kept in the original well-closed vial at 2 to 8°C .
- Alterations in physical appearance of kit reagents may indicate instability or deterioration.

IX. SPECIMEN COLLECTION AND PREPARATION

- Keep serum, plasma or urine at $2-8^{\circ}\text{C}$ for 1-2 days. Keep frozen for longer periods. Highly lipemic or haemolyzed samples must be discarded. Presence of fibrin filaments in the plasma can interfere with the assay. Use clear samples only.
- Collect urine during 24 hours without preservative. Record the total volume.
- Avoid subsequent freeze-thaw cycles.
- Saliva samples should be collected using adequate sampling devices e.g. Salivette (Sarstedt cat n° 51.1534.500). Eating, drinking or brushing teeth have to be avoided 30 minutes before sampling. In case of mouth lesions, inflammation or diseases the sampling must be also avoided (blood contamination). Saliva samples can be stored at $2-8^{\circ}\text{C}$ for one week or frozen for longer periods. Samples have to be frozen, thawed and centrifuged at least once (in order to separate the mucins)

X. PROCEDURE FOR SERUM, PLASMA AND URINE SAMPLES

A. Handling notes

Do not use the kit or components beyond expiry date.

Do not mix materials from different kit lots.

Bring all the reagents to room temperature prior to use.

Thoroughly mix all reagents and samples by gentle agitation or swirling.

Use a clean disposable pipette tip for addition of each different reagent and sample in order to avoid cross-contamination. High precision pipettes or automated pipetting equipment will improve the precision.

Respect the incubation times.

Prepare a calibration curve for each run, do not use data from previous runs.

Each tube can only be used once.

B. Procedure

- Label coated tubes in duplicate for each calibrator, control and sample. For the determination of total counts, label 2 normal tubes.
- Briefly vortex calibrators, controls and samples and dispense 25 μl of each into the respective tubes.
- Dispense 500 μl of ^{125}I odine labelled Cortisol into each tube, including the uncoated tubes for total counts.
- Shake the tube rack gently by hand to liberate any trapped air bubbles.
- Incubate for 45 minutes at $37^{\circ} \pm 2^{\circ}\text{C}$, in a water bath.
- Aspirate (or decant) the content of each tube (except total counts). Be sure that the plastic tip of the aspirator reaches the bottom of the coated tube in order to remove all the liquid.
- Wash tubes with 3 ml Working Wash solution (except total counts) and aspirate (or decant). Avoid foaming during the addition of the Working Wash solution.
- Let the tubes stand upright for two minutes and aspirate the remaining drop of liquid.
- Count tubes in a gamma counter for 60 seconds.

XI. PROCEDURE FOR SALIVARY CORTISOL MEASUREMENT

A. Calibrators and controls

- Using physiological serum (NaCl 9g/L in distilled water), dilute the calibrators in glass or plastic tubes: **Calibrator 1: 1/20 and 1/10. Calibrators 2 to 5: 1/10.** The needed volume to perform the ria in duplicate is 400 μl ; therefore, we recommend the following dilutions:
1/20 = 25 μl calibrator 1 + 475 μl physiological serum
1/10 = 50 μl calibrator 1 to 5 + 450 μl physiological serum
Dilute the controls 1/10 in physiological serum
- Do not use the Calibrator 0: it is replaced, in the test, by physiological serum.**
-

B. Procedure

- Label coated tubes in duplicate for each calibrator, control and sample. For the determination of total counts, label 2 normal tubes
- Briefly vortex calibrators, controls and samples and dispense **200 μl** of each into the respective tubes.
- Dispense 500 μl of ^{125}I odine labelled Cortisol into each tube, including the uncoated tubes for total counts.
- Shake the tube rack gently by hand to liberate any trapped air bubbles.
- Incubate for **180 minutes at $37^{\circ} \pm 2^{\circ}\text{C}$** , in a water bath.

- Aspirate (or decant) the content of each tube (except total counts). Be sure that the plastic tip of the aspirator reaches the bottom of the coated tube in order to remove all the liquid.
- Wash tubes with 3 ml Working Wash solution (except total counts) and aspirate (or decant). Avoid foaming during the addition of the Working Wash solution.
- Let the tubes stand upright for two minutes and aspirate the remaining drop of liquid.
- Count tubes in a gamma counter for 60 seconds.

XII. CALCULATION OF RESULTS

- Calculate the mean of duplicate determinations.
- Calculate the bound radioactivity as a percentage of the binding determined at the zero calibrator point (0) according to the following formula :

$$B/B_0 (\%) = \frac{\text{Counts (Calibrator or sample)}}{\text{Counts (Zero Calibrator)}} \times 100$$

- Plot the (B/B₀(%)) values for each calibrator point as a function of the cortisol concentration of each calibrator point. Reject obvious outliers.
- Computer assisted methods can be used to construct the calibration curve. If automatic result processing is used, a 4-parameter logistic function curve fitting is recommended.
- By interpolation of the sample (B/B₀ (%)) values, determine the cortisol concentrations of the samples from the calibration curve.
- For each assay, the percentage of total tracer bound in the absence of unlabelled cortisol (B₀/T) must be checked.
- Remark: for salivary measurement, it is mandatory to modify the concentrations of the calibrators, due to the preliminary dilutions (see XI), before calculating the calibration curve.**

XIII TYPICAL DATA

The following data are for illustration only and should never be used instead of the real time calibration curve.

Serum/plasma/urine Cortisol	cpm	B/Bo (%)
Total count	60203	
Calibrator		
0 µg/L	43148	100.0
17 µg/L	40143	93.0
34 µg/L	35177	81.5
100 µg/L	26815	62.2
274 µg/L	15359	35.6
450 µg/L	11342	26.3

Salivary Cortisol	cpm	B/Bo (%)
Total count	32041	
0.0 µg/L	20134	100.0
0.9 µg/L	18696	92.9
1.7 µg/L	18009	89.4
3.4 µg/L	16161	80.3
10.0 µg/L	12602	62.6
27.4 µg/L	7789	38.7
45.0 µg/L	5849	29.1

XIV. SERUM, PLASMA, URINE: PERFORMANCES AND LIMITATIONS

A. Detection limit

Twenty zero calibrators were assayed along with a set of other calibrators. The detection limit, defined as the apparent concentration two standard deviations below the average counts at zero binding, was **0.9 µg/L**.

B. Specificity

The percentage of cross-reaction estimated by comparison of the concentration yielding a 50% inhibition are respectively:

Compound	Cross-Reactivity (%)
Cortisol	100.00
17-OH-Progesterone	0.8
21-DOC	1.7
Corticosterone	1.4
11-DOC	89.5
Prednisone	0.7
Estradiol	0.04
Prednisolone	10.9
Testosterone	0.3
Progesterone	0.06

Note: this table shows the cross-reactivity for the anti-cortisol

C. Precision

INTRA-ASSAY PRECISION

INTER-ASSAYS PRECISION

Serum	N	Mean (µg/L)	CV (%)	Serum	N	Mean (µg/L)	CV (%)
A	5	1.10	6.2	A	8	1.95	8.7
B	5	3.70	5.2	B	8	5.48	11.5
C	5	28.30	7.7	C	8	36.85	15.1

D. Accuracy

DILUTION TEST

Dilution (serum)	Theoretical Concent. (µg/L)	Measured Concent. (µg/L)
1/1	-	630.3
1/2	315.2	298.5
1/4	157.6	159.3
1/8	78.8	81.3
1/16	39.4	39.1
1/32	19.7	21.7
1/64	9.9	11.1

Samples were diluted with zero calibrator.

RECOVERY TEST

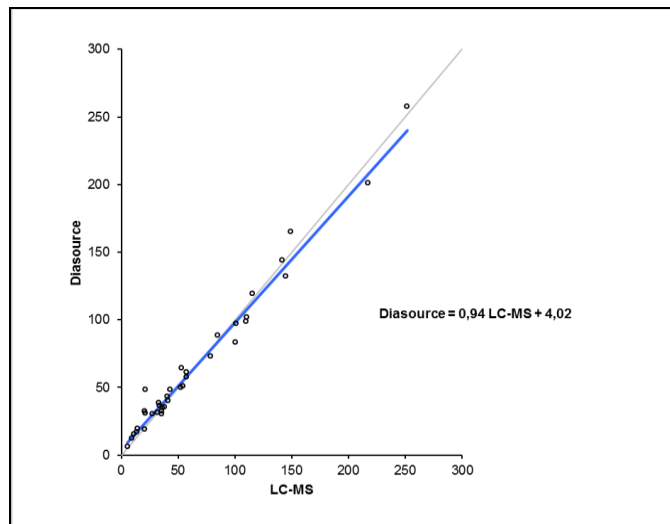
Sample (µg/L)	Added Cortisol (µg/L)	Recovered Cortisol (µg/L)	Recovered (%)
3.0	30.0	17.7	93.2
3.0	100.0	48.7	105.7
3.0	300.0	149.2	101.5
3.0	1000.0	509.2	98.5

Conversion factor :

From µg/L to nmol/L : x 2.758

From nmol/L to µg/L : x 0.363

E. Calibration against LC-MS



XV. SALIVARY PROCEDURE PERFORMANCES

A. Detection limit

Twenty zero calibrators were assayed along with a set of other calibrators. The detection limit, defined as the apparent concentration two standard deviations below the average counts at zero binding, was **0.53 µg/L**.

B. Precision

INTRA-ASSAY PRECISION

INTER-ASSAYS PRECISION

Sample	N	Mean (µg/L)	CV (%)	Sample	N	Mean (µg/L)	CV (%)
A	12	7.9	10.4	A	8	15.8	4.7
B	12	18.7	10.4	B	8	13.2	4.7

C. Accuracy

DILUTION TEST

Dilution	Theoretical conc. (µg/L)	Measured conc. (µg/L)
1/1	**	11.46
1/2	5.73	5.31
1/4	2.87	3.00
1/8	1.43	1.30
1/16	0.72	0.68
1/32	0.36	0.35

RECOVERY TEST

Sample (µg/L)	Added Cortisol (µg/L)	Recovered Cortisol (µg/L)	Recovered (%)
2.29	0.60	0.52	97.2
2.29	1.20	1.32	103.4
2.29	3.81	3.66	97.5
2.29	10.90	11.82	107.0
2.29	18.00	16.33	91.8

XVI. INTERNAL QUALITY CONTROL

- If the results obtained for Control 1 and/or Control 2 are not within the range specified on the vial label, the results cannot be used unless a satisfactory explanation for the discrepancy has been given.

- If desirable, each laboratory can make its own pools of control samples, which should be kept frozen in aliquots.
- Acceptance criteria for the difference between the duplicate results of the samples should rely on Good Laboratory Practises.

XVII. REFERENCE INTERVALS

These values are given only for guidance; each laboratory should establish its own normal range of values.

Cortisol levels vary diurnally and as a function of clinical suppression manoeuvres. Morning samples results are generally 2 to 3 times higher than these obtained with afternoon samples. Morning samples generally read less than 5 µg/L following metyrapone testing or dexamethasone suppression.

Identification	Range (*) (µg/L)
Serum samples	
Morning collection	50 – 270 µg/L
Afternoon collection	25 – 119 µg/L
24h Urine samples	6 -75 µg/24H
Saliva samples (morning collection)	1.2 – 7.5 µg/L

(*) The range is based on 2.5 % and 97.5 % percentiles

XVIII. PRECAUTIONS AND WARNINGS

Safety

For *in vitro* diagnostic use only.

This kit contains ¹²⁵I (half-life: 60 days), emitting ionizing X (28 keV) and γ (35.5 keV) radiations.

This radioactive product can be transferred to and used only by authorized persons; purchase, storage, use and exchange of radioactive products are subject to the legislation of the end user's country. In no case the product must be administered to humans or animals. All radioactive handling should be executed in a designated area, away from regular passage. A logbook for receipt and storage of radioactive materials must be kept in the lab. Laboratory equipment and glassware, which could be contaminated with radioactive substances, should be segregated to prevent cross contamination of different radioisotopes.

Any radioactive spills must be cleaned immediately in accordance with the radiation safety procedures. The radioactive waste must be disposed of following the local regulations and guidelines of the authorities holding jurisdiction over the laboratory. Adherence to the basic rules of radiation safety provides adequate protection.

The human blood components included in this kit have been tested by European approved and/or FDA approved methods and found negative for HbsAg, anti-HCV, anti-HIV-1 and 2. No known method can offer complete assurance that human blood derivatives will not transmit hepatitis, AIDS or other infections. Therefore, handling of reagents, serum or plasma specimens should be in accordance with local safety procedures.

All animal products and derivatives have been collected from healthy animals. Bovine components originate from countries where BSE has not been reported. Nevertheless, components containing animal substances should be treated as potentially infectious.

Avoid any skin contact with reagents (sodium azide as preservative). Azide in this kit may react with lead and copper in the plumbing and in this way form highly explosive metal azides. During the washing step, flush the drain with a large amount of water to prevent azide build-up.

Do not smoke, drink, eat or apply cosmetics in the working area. Do not pipette by mouth. Use protective clothing and disposable gloves.

XIX. BIBLIOGRAPHY

1. Abraham, GE, Ed. (1981)
Radioassay Systems in Clinical Endocrinology.
Marcel Dekker Inc, New York
2. Rittler M and Geisler D (1983)
Radioimmunoassay of urinary cortisol: comparison of the procedures with and without previous cortisol extraction.
Meth. Find. Exptl. Clin. Pharmacol. 5(6), 403-406.

XX. SUMMARY OF PROTOCOLS

SERUM, PLASMA AND/OR URINE SAMPLES	TOTAL COUNTS µl	CALIBRATORS µl	SAMPLE(S) CONTROLS µl
Calibrators (0 to 5) Samples, Controls Tracer	- - 500	25 - 500	- 25 500
Incubation	45 minutes at 37 +/- 2°C, in a water bath		
/Separation Working Wash solution Separation	-	Aspirate (or decant) 3.0 ml Aspirate (or decant)	
Counting	Count tubes for 60 seconds		

SALIVA SAMPLES	TOTAL COUNTS µl	CALIBRATORS µl	SAMPLE (S) CONTROLS µl
Calibrators (0 to 6)* Samples, Controls Tracer	- - 500	200 - 500	- 200 500
Incubation	180 minutes at 37 +/- 2°C, in a water bath		
/Separation Working Wash solution Separation	-	Aspirate (or decant) 3.0 ml Aspirate (or decant)	
Counting	Count tubes for 60 seconds		

* See XI for calibrators' preparation

Other translations of this Instruction for Use can be downloaded from our website: <https://www.diasource-diagnostics.com/>

Lire entièrement le protocole avant utilisation.

CORTISOL-RIA-CT

I. BUT DU DOSAGE

Dosage radio-immunométrique pour la détermination quantitative *in vitro* du Cortisol dans le **sérum, le plasma, l'urine ou la salive**, sans extraction.

Destiné uniquement à un usage professionnel.

II. INFORMATIONS GENERALES

- A. **Nom du produit :** DIAsource CORTISOL-RIA-CT Kit
- B. **Numéro de catalogue :** KIP128000 : 96 tests
- C. **Fabriqué par :** DIAsource ImmunoAssays S.A.
Rue du Bosquet, 2, B-1348 Louvain-la-Neuve, Belgique.

Pour une assistance technique ou une information sur une commande :

Tel : +32 (0)10 84.99.11

Fax : +32 (0)10 84.99.91

III. CONTEXTE CLINIQUE

A. Activité biologique

Le cortisol est le principal glucocorticoïde produit et sécrété par les glandes surrénales. En réponse à différents stimuli (rythme diurne, stress, baisse de la glycémie), le cortex cérébral stimule l'hypothalamus causant, de ce fait, la sécrétion de CRF (corticotrophin releasing factor). Le CRF induit, à son tour, la sécrétion, par la glande pituitaire, de l'ACTH (adrenocorticotropie hormone). Les glucocorticoïdes sont alors synthétisés en réponse à l'ACTH.

Etant donné que le taux de cortisol dépend des interactions de l'hypothalamus, de la glande pituitaire et des glandes surrénales, le dosage du cortisol urinaire représente une aide dans le diagnostic différencié en cas de maladie de ces glandes.

IV. PRINCIPE DU DOSAGE

Une quantité fixe de cortisol marqué à l'125I est en compétition avec le cortisol à mesurer et présent dans l'échantillon ou dans le calibrateur pour une quantité fixe d'anticorps immobilisés sur les parois du tube en polystyrène. Aucune extraction ni chromatographie n'est requise grâce à la haute spécificité de l'anticorps fixé. Après 45 minutes d'incubation à 37°C (180 minutes pour le dosage salivaire), le liquide est aspiré pour terminer la réaction de compétition. Les tubes sont lavés avec 3 ml de Solution de Lavage et aspirés à nouveau. Une courbe de calibration est réalisée et la concentration en cortisol des échantillons est déterminée par interpolation de la dose sur la courbe de calibration. La méthode est calibrée vis-à-vis de la LC-MS.

V. REACTIFS FOURNIS

Réactifs	96 Test Kit	Code couleur	Reconstitution
 Tubes recouverts d'anti cortisol (monoclonal)	2 x 48	jaune	Prêts à l'emploi
Ag 125I TRACEUR: cortisol marqué à l'125Iode dans un tampon phosphate-citrate, protéines, ANS, et azoture de sodium (<0.1%)	1 flacon 52 ml 116 kBq	rouge	Prêt à l'emploi
CAL 0 Calibrateur zéro dans du sérum humain et azoture de sodium (<0.1%)	1 flacon 1 ml	jaune	Prêt à l'emploi
CAL N Calibrateurs - N = 1 à 5 (valeurs exactes sur les étiquettes) dans du sérum humain et azoture de sodium (<0.1%)	5 flacons 0.5 ml	jaune	Prêts à l'emploi
WASH SOLN CONC Solution de lavage (TRIS-HCl)	1 flacon 10 ml	brun	Diluer 70 x avec de l'eau distillée (utiliser un agitateur magnétique).
CONTROL N Contrôles - 1 et 2 Dans du plasma humain avec thymol	2 flacons lyophilisés	argenté	Ajouter 0.5 ml d'eau distillée. Un intervalle pour la méthode salivaire est également indiqué sur l'étiquette.

Note : Utiliser le calibrateur zéro pour diluer les échantillons sériques. Si nécessaire, les urines peuvent être diluées dans un tampon phosphate salin. Les échantillons salivaires peuvent être dilués dans du sérum physiologique, si nécessaire.(voir XI)

VI. MATERIEL NON-FOURNI

Le matériel ci-dessous est requis, mais non fourni avec la trousse:

- 1. Eau distillée
- 2. Pipettes pour distribuer: 25 µl, 200 µl et 500 µl (l'usage de pipettes précises et de pointes jetables en plastique est recommandé)
- 3. Agitateur vortex
- 4. Agitateur magnétique
- 5. Bain-marie à 37°C
- 6. Seringue automatique de 5 ml (type Cornwall) pour les lavages.
- 7. Système d'aspiration (optionnel)
- 8. Compteur gamma capable de compter l' 125I. (rendement minimal: 70%).
- 9. Sérum physiologique (NaCl 9g/L) pour la procédure salivaire.

VII. PREPARATION DES REACTIFS

- A. **Contrôles:** Reconstituer les contrôles par 0.5 ml d'eau distillée.
- B. **Solution de lavage:** Préparer un volume adéquat de solution de lavage en ajoutant 69 volumes d'eau à 1 volume de tampon de lavage (70x). Utiliser un agitateur magnétique pour homogénéiser. Eliminer la solution de lavage non utilisée à la fin de la journée.
- C. **Préparation des calibrateurs et des contrôles pour la procédure salivaire :** voir XI

VIII. STOCKAGE ET DATE D' EXPIRATION DES REACTIFS

- Avant l'ouverture ou la reconstitution, tous les composants de la trousse sont stables jusqu'à la date d'expiration, indiquée sur l'étiquette, si la trousse est conservée entre 2 et 8°C.
- Après reconstitution, les contrôles sont stables pendant une semaine entre 2 et 8°C. Pour de plus longues périodes de stockage, des aliquots devront être réalisés et ceux-ci seront gardés à -20°C pour 3 mois.
- La solution de lavage préparée doit être utilisée le jour même.
- Après la première utilisation, le traceur est stable jusqu'à la date d'expiration, si celui-ci est conservé entre 2 et 8°C dans le flacon d'origine correctement fermé.
- Des altérations dans l'apparence physique des réactifs de la trousse peuvent indiquer une instabilité ou une détérioration.

IX. PREPARATION ET STABILITE DE L'ECHANTILLON

- Les échantillons de sérum, de plasma ou d'urine doivent être gardés entre 2 et 8°C. Si le test n'est pas réalisé dans les 48 heures, un stockage à -20°C est recommandé. Les sera fortement lipémiques ou hémolysés doivent être écartés. La présence de filaments de fibrine peut interférer dans le test.
- Eviter des cycles de congélation et décongélation successifs.
- Collecter les urines durant 24 heures, sans ajout de conservateur. Noter le volume total.
- Les échantillons salivaires doivent être récoltés dans des récipients adéquats (par ex. Salivette – Sarstedt cat n°51.1534.500). Manger, boire ou se brosser les dents doit être évité 30 minutes avant le prélèvement. En cas de lésion, d'inflammation ou autre maladie de la bouche, le prélèvement doit également être évité (contamination par le sang). Les échantillons salivaires peuvent être conservés à 2-8°C pour une semaine ou congelés pour une plus longue période. Les échantillons doivent être centrifugés pour séparer les mucines.

X. MODE OPÉRATOIRE POUR SERUM, PLASMA ET URINE

- A. **Notes de manipulation**
Ne pas utiliser la trousse ou ses composants après avoir dépassé la date d'expiration. Ne pas mélanger de matériel provenant de trousses de lots différents. Mettre tous les réactifs à température ambiante avant utilisation. Mélanger complètement tous les réactifs et les échantillons sous agitation douce. Pour éviter toute contamination croisée, utiliser une nouvelle pointe de pipette pour l'addition de chaque réactif et échantillon. Des pipettes de haute précision ou un équipement de pipetage automatique permettent d'augmenter la précision. Respecter les temps d'incubation. Préparer une courbe de calibration pour chaque nouvelle série d'expériences, ne pas utiliser les données d'expériences précédentes. Chaque tube ne peut être utilisé qu'une seule fois.

- B. **Procédure**
 1. Identifier les tubes recouverts fournis dans la trousse en double pour chaque calibrateur, échantillon, contrôle. Pour la détermination de l'activité totale, identifier 2 tubes non recouverts.
 2. Agiter au vortex brièvement les calibrateurs, les échantillons et les contrôles. Puis distribuer 25 µl de chacun d'eux dans leurs tubes respectifs.
 3. Distribuer 0,5 ml de cortisol marqué à l' 125Iode dans chaque tube, y compris les tubes sans anticorps pour la détermination de l'activité totale.
 4. Agiter doucement le portoir pour libérer les bulles d'air éventuelles.
 5. Couvrir les tubes et incubé pendant 45 minutes à 37°+/-2°C, dans un bain-marie.
 6. Aspirer le contenu de chaque tube (à l'exception des tubes utilisés pour la détermination de l'activité totale). Assurez-vous que la pointe utilisée pour aspirer le liquide des tubes atteint le fond de chacun d'eux pour éliminer toute trace de liquide.
 7. Laver les tubes avec 3 ml de solution de lavage (à l'exception des tubes utilisés pour la détermination de l'activité totale) et aspirer. Eviter la formation de mousse pendant l'addition de la solution de lavage.
 8. Placer les tubes dans un compteur gamma pendant 60 secondes pour quantifier la radioactivité.

XI. MODE OPÉRATOIRE POUR LE DOSAGE SALIVAIRE

- A. **Calibrateurs et contrôles**
 1. À l'aide de sérum physiologique (NaCl 9g/L dans de l'eau distillée), diluer les calibrateurs dans des tubes en verre ou en plastique.
Calibrateur 1 : 1/20 et 1/10. Calibrateurs 2 à 5 : 1/10. Le volume nécessaire pour le test (en duplicat) est de 400 µl ; nous suggérons donc les dilutions suivantes :
1/20 = 25µl calibrateur 1 + 475 µl sérum physiologique
1/10 = 50 µl calibrateur 1 à 5 + 450 µl sérum physiologique
 2. Diluer les contrôles 1/10 dans le sérum physiologique
 3. Ne pas utiliser le calibrateur 0, le remplacer par du sérum physiologique.

B. Procédure

- 1. Identifier les tubes recouverts fournis dans la trousse en double pour chaque calibrateur, échantillon, contrôle. Pour la détermination de l'activité totale, identifier 2 tubes non recouverts.
- 2. Agiter au vortex brièvement les calibrateurs, les échantillons et les contrôles. Puis distribuer 200 µl de chacun d'eux dans leurs tubes respectifs.
- 3. Distribuer 0,5 ml de cortisol marqué à l' 125Iode dans chaque tube, y compris les tubes sans anticorps pour la détermination de l'activité totale.
- 4. Agiter doucement le portoir pour libérer les bulles d'air éventuelles
- 5. Couvrir les tubes et incuber pendant 180 minutes à 37°+/-2°C, dans un bain-marie.
- 6. Aspirer le contenu de chaque tube (à l'exception des tubes utilisés pour la détermination de l'activité totale). Assurez-vous que la pointe utilisée pour aspirer le liquide des tubes atteint le fond de chacun d'eux pour éliminer toute trace de liquide.
- 7. Laver les tubes avec 3 ml de solution de lavage (à l'exception des tubes utilisés pour la détermination de l'activité totale) et aspirer. Éviter la formation de mousse pendant l'addition de la solution de lavage.
- 8. Placer les tubes dans un compteur gamma pendant 60 secondes pour quantifier la radioactivité.
- 9. Compter les tubes dans un compteur gamma pendant 60 secondes.

XII. CALCUL DES RÉSULTATS

- 1. Calculer la moyenne de chaque détermination réalisée en double.
- 2. Calculer la capacité de liaison de l'essai comme un pourcentage de liaison déterminé au point de calibration (0) en suivant la formule ci-dessous :

B/Bo (%) = (moyenne des cpm (CAL ou échantillon n) / moyenne des cpm (CAL 0)) x 100

- 3. Porter en ordonnée les valeurs exprimées en pourcentage de liaison (B/Bo(%)) de chaque point de calibration et en abscisse leur concentration respective en cortisol, écarter les valeurs aberrantes.
- 4. Des méthodes informatiques peuvent être utilisées pour construire la courbe de calibration. Si un système d'analyse de traitement informatique des données est utilisé, il est recommandé d'utiliser la fonction « 4 paramètres » du lissage de courbes.
- 5. L'interpolation des valeurs de chaque échantillon (B/Bo(%)) détermine les concentrations en cortisol à partir de la courbe de calibration.
- 6. Pour chaque essai, le pourcentage total de traceur lié en absence de cortisol non marqué (B0/T) doit être vérifié.
- 7. Remarque : pour le dosage salivaire, il est nécessaire de modifier les concentrations des calibrateurs, en fonction des dilutions préliminaires (voir XI), avant de calculer la courbe de calibration.

XIII. DONNEES TYPES

Les données représentées ci-dessous sont données pour information et ne peuvent jamais être utilisées à la place d'une courbe de calibration.

Cortisol Serum/plasma/urine	cpm	B/Bo (%)
Activité totale	60203	
Calibrateur		
0 µg/L	43148	100.0
17 µg/L	40143	93.0
34 µg/L	35177	81.5
100 µg/L	26815	62.2
274 µg/L	15359	35.6
450 µg/L	11342	26.3

Cortisol Salivaire	cpm	B/Bo (%)
Activité totale	32041	
Calibrateur		
0.0 µg/L	20134	100.0
0.9 µg/L	18696	92.9
1.7 µg/L	18009	89.4
3.4 µg/L	16161	80.3
10.0 µg/L	12602	62.6
27.4 µg/L	7789	38.7
45.0 µg/L	5849	29.1

XIV. SERUM, PLASMA, URINE : PERFORMANCES ET LIMITES DU DOSAGE

A. Détectabilité

Vingt calibrateurs zéro ont été testés en parallèle avec un assortiment d'autres calibrateurs.

La limite de détection, définie comme la concentration apparente située 2 déviations standards en-dessous de la moyenne déterminée à la fixation zéro, était de 0,9 µg/L.

B. Specificité

Les pourcentages de réaction croisée estimés par comparaison de la concentration indiquant une inhibition de 50% sont respectivement de :

Composé	Réactivité croisée (%)
Cortisol	100.00
17-OH-Progesterone	0.8
21-DOC	1.7
Corticosterone	1.4
11-DOC	89.5
Prednisone	0.7
Estradiol	0.04
Prednisolone	10.9
Testosterone	0.3
Progesterone	0.06

Note: ce tableau montre les réactions croisées de l'anti-cortisol

C. Precision

INTRA-ESSAI PRECISION

INTER-ESSAIS PRECISION

Serum	N	Moyenne (µg/L)	CV (%)	Serum	N	Moyenne (µg/L)	CV (%)
A	5	1.10	6.2	A	8	1.95	8.7
B	5	3.70	5.2	B	8	5.48	11.5
C	5	28.30	7.7	C	8	36.85	15.1

D. Exactitude

TEST DE DILUTION

Dilution (serum)	Conc. théorique (µg/L)	Conc. mesurée (µg/L)
1/1	-	630.3
1/2	315.2	298.5
1/4	157.6	159.3
1/8	78.8	81.3
1/16	39.4	39.1
1/32	19.7	21.7
1/64	9.9	11.1

L'échantillon a été dilué dans le calibrateur 0.

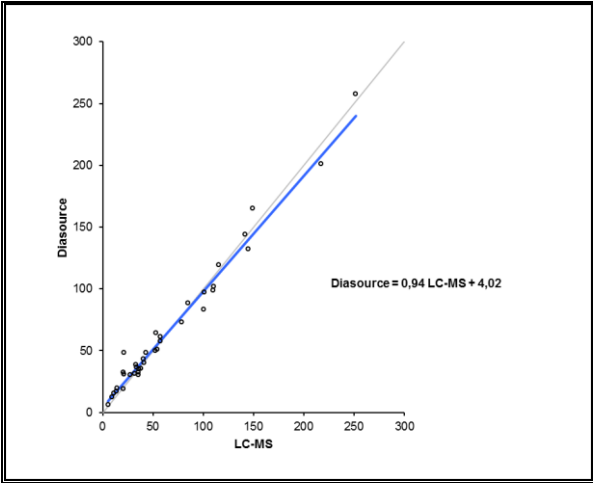
TEST DE RECUPERATION

Echantillon (µg/L)	Ajout de Cortisol (µg/L)	Récupération Cortisol (µg/L)	Recouvrement (%)
3.0	30.0	17.7	93.2
3.0	100.0	48.7	105.7
3.0	300.0	149.2	101.5
3.0	1000.0	509.2	98.5

Facteur de conversion :

De µg/L à nmol/L : x 2.758
De nmol/L à µg/L : x 0.363

E. Calibration vis-à-vis de la LC-MS



XV. PERFORMANCES DU DOSAGE SALIVAIRE

A. Détectabilité

Vingt calibrateurs zéro ont été testés en parallèle avec un assortiment d’autres calibrateurs. La limite de détection, définie comme la concentration apparente située 2 déviations standards en-dessous de la moyenne déterminée à la fixation zéro, était de 0,53 µg/L.

B. Précision

INTRA-ESSAI PRECISION				INTER-ESSAIS PRECISION			
Echn	N	Moyenne (µg/L)	CV (%)	Echn	N	Moyenne (µg/L)	CV (%)
A	12	7.9	10.4	A	8	15.8	4.7
B	12	18.7	10.4	B	8	13.2	4.7

C. Exactitude

TEST DE DILUTION		
Dilution	Conc. théorique (µg/L)	Conc. mesurée (µg/L)
1/1	**	11.46
1/2	5.73	5.31
1/4	2.87	3.00
1/8	1.43	1.30
1/16	0.72	0.68
1/32	0.36	0.35

TEST DE RECUPERATION			
Echantillon (µg/L)	Ajout de Cortisol (µg/L)	Récupération Cortisol (µg/L)	Recouvrement (%)
2.29	0.60	0.52	97.2
2.29	1.20	1.32	103.4
2.29	3.81	3.66	97.5
2.29	10.90	11.82	107.0
2.29	18.00	16.33	91.8

XVI. CONTROLE DE QUALITE INTERNE

Si les résultats obtenus pour le(s) contrôle(s) 1 et/ou 2 ne sont pas dans l’intervalle spécifié sur l’étiquette du flacon, les résultats ne peuvent pas être utilisés à moins que l’on ait donné une explication satisfaisante de la non-conformité.

Chaque laboratoire est libre de faire ses propres stocks d’échantillons contrôles, lesquels doivent être congelés aliquotés. Ne pas congeler – décongeler plus de deux fois. Les critères d’acceptation pour les écarts des valeurs en doublet des échantillons doivent être basés sur les pratiques de laboratoire courantes.

XVII. VALEURS ATTENDUES

Les valeurs sont données à titre d’information; chaque laboratoire doit établir ses propres écarts de valeurs. Les concentrations de cortisol varient durant la journée: les échantillons prélevés le matin présentent généralement des taux 2 à 3 fois plus élevés que ceux obtenus avec des échantillons de l’après-midi. Les échantillons du matin donnent généralement des résultats inférieurs à 5 µg/L après un test à la metyrapone ou après suppression à la dexaméthasone.

Identification	Intervalle (*) (µg/L)
Sera prélevés le matin	50 – 270 µg/L
Sera prélevés l’après-midi	25 – 119 µg/L
Urines de 24h	6 -75 µg/24h
Salive prélevée le matin	1.2 –7.5 µg/L

(*) Ces intervalles sont basés sur les percentiles 2.5 % and 97.5 %.

XIX. PRECAUTIONS ET AVERTISSEMENTS

Sécurité
Pour utilisation en diagnostic *in vitro* uniquement. Cette trousse contient de l’¹²⁵I (demi-vie: 60 jours), une matière radioactive émettant des rayonnements ionisants X (28 keV) et γ (35.5 keV). Ce produit radioactif peut uniquement être reçu, acheté, possédé ou utilisé par des personnes autorisées; l’achat, le stockage, l’utilisation et l’échange de produits radioactifs sont soumis à la législation du pays de l’utilisateur final. Ce produit ne peut en aucun cas être administré à l’homme ou aux animaux. Toutes les manipulations radioactives doivent être exécutées dans un secteur désigné, éloigné de tout passage. Un journal de réception et de stockage des matières radioactives doit être tenu à jour dans le laboratoire. L’équipement de laboratoire et la verrerie, qui pourrait être contaminée avec des substances radioactives, doivent être isolés afin d’éviter la contamination croisée de plusieurs isotopes. Toute contamination ou perte de substance radioactive doit être réglée conformément aux procédures de radio sécurité. Les déchets radioactifs doivent être placés de manière à respecter les réglementations en vigueur. L’adhésion aux règles de base de sécurité concernant les radiations procure une protection adéquate. Les composants de sang humain inclus dans ce kit ont été évalués par des méthodes approuvées par l’Europe et/ou la FDA et trouvés négatifs pour HBsAg, l’anti-HCV, l’anti-HIV-1 et 2. Aucune méthode connue ne peut offrir l’assurance complète que des dérivés de sang humain ne transmettront pas d’hépatite, le sida ou toute autre infection. Donc, le traitement des réactifs, du sérum ou des échantillons de plasma devront être conformes aux procédures locales de sécurité. Tous les produits animaux et leurs dérivés ont été collectés d’animaux sains. Les composants bovins proviennent de pays où l’ESB n’a pas été détectée. Néanmoins, les composants contenant des substances animales devront être traités comme potentiellement infectieux. L’azide de sodium est nocif s’il est inhalé, avalé ou en contact avec la peau (l’azide de sodium est utilisé comme agent conservateur). L’azide dans cette trousse pouvant réagir avec le plomb et le cuivre dans les canalisations et donner des composés explosifs, il est nécessaire de nettoyer abondamment à l’eau le matériel utilisé. Ne pas fumer, ni boire, ni manger, ni appliquer de produits cosmétiques dans les laboratoires où des produits radioactifs sont utilisés. Ne pas pipeter avec la bouche. Utiliser des vêtements protecteurs et des gants à usage unique.

XX. BIBLIOGRAPHY

- Abraham, GE, Ed. (1981) Radioassay Systems in Clinical Endocrinology. Marcel Dekker Inc, New York
- Rittler M and Geisler D (1983) Radioimmunoassay of urinary cortisol: comparison of the procedures with and without previous cortisol extraction. Meth. Find. Exptl. Clin. Pharmacol. 5(6), 403-406.

XXI. RESUME DES PROTOCOLES

ECHANTILLONS DE SERUM, PLASMA ET/OU URINE	ACTIVITE TOTALE µl	CALIBRATEURS µl	ECHN (S) CONTROLE µl
Calibrateurs (0 à 5) Echantillons, Contrôles Traceur	- - 500	25 - 500	- 25 500
Incubation	45 minutes à 37 +/- 2°C, au bain-marie		
Séparation Solution de lavage Séparation	-	Aspirer (ou decanter) 3.0 ml Aspirer (ou decanter)	
Comptage	Compter les tubes 60 secondes		

ECHANTILLONS SALIVAIRES	ACTIVITE TOTALE µl	CALIBRATEURS µl	ECHN (S) CTLS µl
Calibrateurs (0 à 6)* Echantillons, Contrôles Traceur	- - 500	200 - 500	- 200 500
Incubation	180 minutes at 37 +/- 2°C, in a water bath		
Séparation Solution de lavage Separation	-	Aspirer (ou decanter) 3.0 ml Aspirer (ou decanter)	
Comptage	Compter les tubes 60 secondes		

* Voir XI pour la préparation des calibrateurs

Lea todo el protocolo antes de usar.

CORTISOL-RIA-CT

I. INDICACIONES

Radioinmunoensayo para la medición cuantitativa *in vitro* de cortisol humano en **suero, plasma, orina o saliva** sin extracción.

Uso profesional solamente

II. INFORMACIÓN GENERAL

- A. Nombre comercial:** DIAsource CORTISOL-RIA-CT Kit
- B. Número de catálogo:** KIP128000: 96 pruebas
- C. Fabricado por:** DIAsource ImmunoAssays S.A.
Rue du Bosquet, 2, B-1348 Louvain-la-Neuve, Bélgica.

Para recibir asistencia técnica o información sobre pedido contacte con:

Tel: +32 (0)10 84.99.11

Fax : +32 (0)10 84.99.91

III. ANTECEDENTES CLÍNICOS

A. Actividad biológica

El cortisol es el mayor glucocorticoide que produce y secreta la glándula adrenal. En respuesta a distintos estímulos (ritmo diurno, estrés, baja concentración de azúcar en sangre), la corteza cerebral estimula el hipotálamo para liberar el factor liberador de corticotropina (CRF). El CRF hace que se libere hormona adrenocorticotrópica (ACTH) de la glándula pituitaria. A continuación se sintetizan glucocorticoides en respuesta a la ACTH.

Como los niveles de cortisol dependen de la interacción entre el hipotálamo y las glándulas pituitaria y adrenal, la determinación de los niveles de cortisol en orina pueden también ayudar en el diagnóstico diferencial de los estados patológicos de estas glándulas.

IV. PRINCIPIOS DEL MÉTODO

Una cantidad fija del esteroide marcado con ¹²⁵I compite con el esteroide que se va a medir presente en la muestra o en el calibrador por una cantidad fija de sitios de anticuerpos inmovilizados a la pared de un tubo de poliestireno. No se precisa extracción ni cromatografía debido a la elevada especificidad de los anticuerpos recubiertos. Tras 45 minutos de incubación a 37 °C (180 minutos para el procedimiento en saliva), un paso de aspiración detiene la reacción de competición. Luego se lavan los tubos con 3 ml de solución de lavado y se aspiran de nuevo. Se representa una curva de calibración y se determinan las concentraciones de cortisol de las muestras mediante interpolación de la dosis en la curva de calibración. El método se calibra con respecto al método de referencia de LC-MS.

V. REACTIVOS PROPORCIONADOS

Reactivos	Kit con 96 pruebas	Código de color	Reconstitución			
 Tubos recubiertos con anti-cortisol (monoclonal)	2 x 48	amarillo	Listos para usar			
<table border="1"><tr><td>Ag</td><td>¹²⁵I</td></tr></table> TRAZADOR: Cortisol marcado con Yodo ¹²⁵ en tampón fosfato-citrato con proteínas, ANS y azida (< 0,1 %)	Ag	¹²⁵ I	1 vial 52 ml 116 kBq	rojo	Listo para usar	
Ag	¹²⁵ I					
<table border="1"><tr><td>CAL</td><td>0</td></tr></table> Calibrador cero en suero humano y azida (0,1 %)	CAL	0	1 vial 1 ml	amarillo	Listo para usar	
CAL	0					
<table border="1"><tr><td>CAL</td><td>N</td></tr></table> Calibradores - N = 1 a 5 (véanse los valores exactos en las etiquetas del vial) en suero humano y azida (0,1 %)	CAL	N	5 viales 0,5 ml	amarillo	Listos para usar	
CAL	N					
<table border="1"><tr><td>WASH</td><td>SOLN</td><td>CONC</td></tr></table> Solución de lavado (TRIS-HCl)	WASH	SOLN	CONC	1 vial 10 ml	marrón	Diluir 70 x con agua destilada (usar un agitador magnético).
WASH	SOLN	CONC				
<table border="1"><tr><td>CONTROL</td><td>N</td></tr></table> Controles – 1 y 2 en plasma humano con timol	CONTROL	N	2 viales liofilizados	plata	Añadir 0,5 ml de agua destilada. Los valores para el procedimiento en saliva se indican también en las etiquetas	
CONTROL	N					

Nota: Usar el calibrador cero para las diluciones séricas. Si es necesario, la orina se puede diluir en un tampón fosfato salino corriente. La saliva se puede diluir en suero fisiológico (véase el apartado XI)

VI. SUMINISTROS NO PROPORCIONADOS

El material siguiente es necesario pero no se proporciona en el kit:

1. Agua destilada
2. Pipetas para dispensación de: 25 µl, 200 µl y 500 µl (se recomienda usar pipetas de precisión con puntas de plástico desechables)
3. Agitador tipo vortex
4. Agitador magnético
5. Baño maría a 37 °C
6. Jeringa automática de 5 ml (tipo Cornwall) para lavado
7. Sistema de aspiración (opcional)
8. Puede utilizarse cualquier contador gamma con capacidad para medir ¹²⁵I (eficiencia mínima del 70 %)
9. Suero fisiológico (solución de 9 g/l de NaCl), para el procedimiento en saliva

VII. PREPARACIÓN DE LOS REACTIVOS

- A. **Controles:** Reconstituya los controles con 0,5 ml de agua destilada.
- B. **Solución de lavado de trabajo:** Prepare un volumen adecuado de solución de lavado de trabajo añadiendo 69 volúmenes de agua destilada a 1 volumen de solución de lavado (70 x). Use un agitador magnético para homogeneizar. Deseche la solución de lavado de trabajo no utilizada al final de la jornada.
- C. **Preparación de los calibradores y controles para el procedimiento en saliva:** véase el apartado XI

VIII. CONSERVACIÓN Y FECHA DE CADUCIDAD DE LOS REACTIVOS

- Antes de abrir o de la reconstitución, todos los componentes del kit son estables hasta la fecha de caducidad, indicada en la etiqueta, si se conservan entre 2 y 8 °C.
- Tras la reconstitución, los controles se mantienen estables durante 7 días a 2-8 °C.
Para períodos de tiempo más largo, deben tomarse partes alícuotas y conservarse a -20 °C durante un máximo de 3 meses. Evite ciclos posteriores de congelación y descongelación.
- La solución de lavado de trabajo recién preparada deberá utilizarse en el mismo día.
- Después del primer uso, el trazador se mantiene estable hasta la fecha de caducidad si se conserva en el vial original bien cerrado entre 2 y 8 °C.
- Las alteraciones del aspecto físico de los reactivos del kit pueden indicar inestabilidad o deterioro.

IX. RECOGIDA Y PREPARACIÓN DE LAS MUESTRAS

- Mantenga el suero, el plasma o la orina a 2-8 °C durante 1-2 días. Mantenga congelado para períodos más largos. Las muestras muy lipémicas o hemolizadas deben desecharse. La presencia de filamentos de fibrina en el plasma puede interferir con el ensayo. Utilice solamente muestras claras.
- Recoja la orina durante 24 horas sin conservante. Anote el volumen total.
- Evite ciclos posteriores de congelación y descongelación.
- Las muestras de saliva deben recogerse con los dispositivos de obtención de muestras adecuados como Salivette (n.º de catálogo de Sarstedt 51.1534.500). No se debe comer, beber ni cepillarse los dientes 30 minutos antes de obtenerse la muestra. En caso de lesiones bucales, inflamación o enfermedades, la obtención de la muestra no debe realizarse (contaminación de sangre). Las muestras de saliva se pueden conservar a 2-8 °C durante una semana o congelarse durante períodos más largos. Las muestras tienen que congelarse, descongelarse y centrifugarse al menos una vez (para separar las mucinas).

X. PROCEDIMIENTO PARA LAS MUESTRAS DE SUERO, PLASMA Y ORINA

- A. **Notas sobre la manipulación**
No utilice el kit o componentes pasada la fecha de caducidad.
No mezcle materiales de distintos lotes de kit.
Todos los reactivos deben estar a temperatura ambiente antes de usar.
Mezcle bien todos los reactivos y muestras agitándolos o revolviéndolos suavemente.
Use una punta de pipeta desechable limpia para añadir cada reactivo y muestra diferente para evitar la contaminación cruzada. Las pipetas de alta precisión o un equipo de pipeteo automatizado mejorarán la precisión.
Respete los tiempos de incubación.
Prepare una curva de calibración para cada análisis, no utilice datos de análisis anteriores.
Cada tubo solo puede ser usado una vez.

- B. **Procedimiento**
 1. Etiquete los tubos recubiertos por duplicado de cada calibrador, control y muestra. Etiquete 2 tubos normales para la determinación de los recuentos totales.
 2. Agite brevemente con un vortex los calibradores, los controles y las muestras, y dispense 25 µl de cada uno en los tubos respectivos.
 3. Dispense 500 µl de cortisol marcado con Yodo¹²⁵ en cada tubo, incluidos los tubos sin recubrir para los recuentos totales.
 4. Agite la gradilla de los tubos suavemente a mano para que se liberen las burbujas de aire que pudieran estar atrapadas.
 5. Incube durante 45 minutos a 37 ° +/- 2 °C, en un baño maría.
 6. Aspire (o decante) el contenido de cada tubo (excepto los de recuentos totales) Cerciérese de que la punta de plástico del aspirador llegue al fondo del tubo recubierto para retirar todo el líquido.
 7. Lave los tubos con 3 ml de solución de lavado de trabajo (excepto los de recuentos totales) y aspire (o decante). Evite que se forme espuma al añadir la solución de lavado de trabajo.
 8. Deje los tubos reposar en posición vertical durante dos minutos y aspire el resto de líquido.
 9. Mida los tubos en un contador gamma durante 60 segundos.

XI. PROCEDIMIENTO PARA LA MEDIDA DE CORTISOL EN SALIVA

- A. **Calibradores y controles**
 1. Diluya los calibradores con suero fisiológico (9 g/l de NaCl en agua destilada) en tubos de vidrio o de plástico: **Calibrador 1: 1/20 y 1/10. Calibradores 2 a 5: 1/10.** El volumen necesario para realizar el RIA por duplicado es de 400 µl; por lo tanto, recomendamos las diluciones siguientes:

- 1/20 = 25 µl calibrador 1 + 475 µl suero fisiológico
 1/10 = 50 µl calibrador 1 a 5 + 450 µl suero fisiológico
 2. Diluya los controles 1/10 en suero fisiológico
 3. No use el calibrador 0: se sustituye, en la prueba, por el suero fisiológico.

B. Procedimiento

- Etiquete los tubos recubiertos por duplicado de cada calibrador, control y muestra. Etiquete 2 tubos normales para la determinación de los recuentos totales.
- Agite brevemente con un vórtex los calibradores, controles y las muestras, y dispense **200 µl** de cada uno en los tubos respectivos.
- Dispense 500 µl de cortisol marcado con Yodo¹²⁵ en cada tubo, incluidos los tubos sin recubrir para los recuentos totales.
- Agite la gradilla de los tubos suavemente a mano para que se liberen las burbujas de aire que pudieran estar atrapadas.
- Incube durante **180 minutos a 37 ° +/- 2 °C**, en un baño maría.
- Aspire (o decante) el contenido de cada tubo (excepto los de recuentos totales) Cerciórese de que la punta de plástico del aspirador llegue al fondo del tubo recubierto para retirar todo el líquido.
- Lave los tubos con 3 ml de solución de lavado de trabajo (excepto los de recuentos totales) y aspire (o decante). Evite que se forme espuma al añadir la solución de lavado de trabajo.
- Deje los tubos reposar en posición vertical durante dos minutos y aspire el resto de líquido.
- Mida los tubos en un contador gamma durante 60 segundos.

XII. CÁLCULO DE LOS RESULTADOS

- Calcule la media de las determinaciones por duplicado.
- Calcule la radiactividad unida como un porcentaje de la unión determinado en el punto del calibrador cero (0) según la fórmula siguiente:

$$B/B0 (\%) = \frac{\text{Counts (Calibrator or sample)}}{\text{Counts (Zero Calibrator)}} \times 100$$

- Represente los valores (B/B0(%)) del punto de cada calibrador en función de la concentración de cortisol del punto de cada calibrador. Rechace los valores atípicos obvios.
- Se pueden usar métodos informáticos para generar la curva de calibración. Si se emplea un procesamiento automático de los resultados, se recomienda un ajuste de la curva mediante función logística de 4 parámetros.
- Determine las concentraciones de cortisol de las muestras en la curva de calibración mediante interpolación de los valores (B/B0(%)) de las muestras.
- Debe comprobarse, para cada ensayo, el porcentaje de trazador total unido en ausencia de cortisol sin marcar (B0/T).
- Observación: para la medición en saliva es obligatorio modificar las concentraciones de los calibradores, debido a las diluciones preliminares (véase el apartado XI), antes de calcular la curva de calibración.**

XIII. DATOS TÍPICOS

Los datos siguientes son solo a efectos ilustrativos y no deben utilizarse nunca en lugar de la curva de calibración generada en tiempo real.

Cortisol en suero/plasma/orina		cpm	B/Bo (%)
Recuento total		60203	
Calibrador	0 µg/l	43148	100,0
	17 µg/l	40143	93,0
	34 µg/l	35177	81,5
	100 µg/l	26815	62,2
	274 µg/l	15359	35,6
	450 µg/l	11342	26,3

Cortisol en saliva		cpm	B/Bo (%)
Recuento total		32041	
	0,0 µg/l	20134	100,0
	0,9 µg/l	18696	92,9
	1,7 µg/l	18009	89,4
	3,4 µg/l	16161	80,3

10,0 µg/l	12602	62,6
27,4 µg/l	7789	38,7
45,0 µg/l	5849	29,1

XIV. SUERO, PLASMA, ORINA: EFICACIAS Y LIMITACIONES

A. Límite de detección

Se analizaron veinte calibradores cero junto con un conjunto de otros calibradores.
 El límite de detección, definido como la concentración aparente dos desviaciones estándar por debajo del promedio de recuentos en la unión cero, fue de **0,9 µg**.

B. Especificidad

Los porcentajes de reacción cruzada estimados comparando la concentración que arroja una inhibición del 50 % son respectivamente:

Compuesto	Reactividad cruzada (%)
Cortisol	100,00
17-OH progesterona	0,8
21-DOC	1,7
Corticosterona	1,4
11-DOC	89,5
Prednisona	0,7
Estradiol	0,04
Prednisolona	10,9
Testosterona	0,3
Progesterona	0,06

Nota: esta tabla muestra la reactividad cruzada del anti-cortisol

C. Precisión

PRECISIÓN INTRAENSAYO				PRECISIÓN INTERENSAYOS			
Suero	N	Media (µg/l)	CV (%)	Suero	N	Media (µg/l)	CV (%)
A	5	1,10	6,2	A	8	1,95	8,7
B	5	3,70	5,2	B	8	5,48	11,5
C	5	28,30	7,7	C	8	36,85	15,1

D. Exactitud

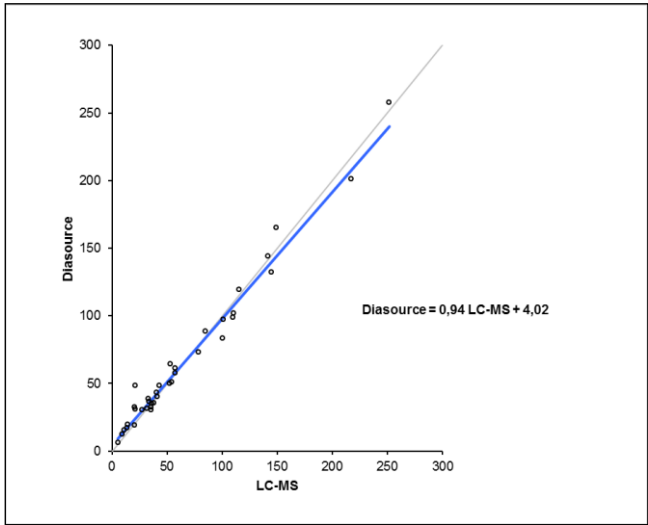
PRUEBA DE DILUCIÓN		
Dilución (suero)	Concent. teórica (µg/l)	Concent. medida (µg/l)
1/1	-	630,3
1/2	315,2	298,5
1/4	157,6	159,3
1/8	78,8	81,3
1/16	39,4	39,1
1/32	19,7	21,7
1/64	9,9	11,1

Las muestras se diluyeron con el calibrador cero.

PRUEBA DE RECUPERACIÓN			
Muestra (µg/l)	Cortisol añadido (µg/l)	Cortisol recuperado (µg/l)	Recuperado (%)
3,0	30,0	17,7	93,2
3,0	100,0	48,7	105,7
3,0	300,0	149,2	101,5
3,0	1000,0	509,2	98,5

Factor de conversión:
De µg/l a nmol/l: x 2,758
De nmol/l a µg/l: x 0,363

E. Calibración con respecto a LC-MS



XV. EFICACIAS DEL PROCEDIMIENTO EN SALIVA

A. Límite de detección

Se analizaron veinte calibradores cero junto con un conjunto de otros calibradores. El límite de detección, definido como la concentración aparente dos desviaciones estándar por debajo del promedio de recuentos en la unión cero, fue de **0,53 µg/l**.

B. Precisión

PRECISIÓN INTRAENSAYO PRECISIÓN INTERENSAYOS

Muestra	N	Media (µg/l)	CV (%)	Muestra	N	Media (µg/l)	CV (%)
A	12	7,9	10,4	A	8	15,8	4,7
B	12	18,7	10,4	B	8	13,2	4,7

C. Exactitud

PRUEBA DE DILUCIÓN

Dilución	Conc. teórica (µg/l)	Conc. medida (µg/l)
1/1	**	11,46
1/2	5,73	5,31
1/4	2,87	3,00
1/8	1,43	1,30
1/16	0,72	0,68
1/32	0,36	0,35

PRUEBA DE RECUPERACIÓN

Muestra (µg/l)	Cortisol añadido (µg/l)	Cortisol recuperado (µg/l)	Recuperado (%)
2,29	0,60	0,52	97,2
2,29	1,20	1,32	103,4
2,29	3,81	3,66	97,5
2,29	10,90	11,82	107,0
2,29	18,00	16,33	91,8

XVI. CONTROL DE CALIDAD INTERNO

- Si los resultados obtenidos para el control 1 o el control 2 no se encuentran dentro del intervalo especificado en la etiqueta del vial, no se pueden utilizar dichos resultados, salvo que se proporcione una explicación satisfactoria sobre la discrepancia.
- Cada laboratorio puede, si lo desea, realizar sus propias mezclas de muestras control, que deberían conservarse congeladas en alícuotas.
- Los criterios de aceptación de la diferencia entre los resultados duplicados de las muestras deben basarse en las buenas prácticas de laboratorio.

XVII. INTERVALOS DE REFERENCIA

Estos valores se proporcionan solo como guía; cada laboratorio debería establecer su propio intervalo de valores normales.

Los niveles de cortisol varían por el día y en función de maniobras de supresión clínica. Los resultados de muestras obtenidas por la mañana son generalmente 2 o 3 veces más altos que los obtenidos con muestras de la tarde. Las lecturas de las muestras de la mañana son generalmente menores a 5 µg/l después de la prueba de metirapona o la supresión con dexametasona.

Identificación	Intervalo (*) (µg/l)
Muestras séricas	
Obtención por la mañana	50 – 270 µg/l
Obtención por la tarde	25 – 119 µg/l
Muestras de orina de 24 h	6 -75 µg/24 H
Muestras de saliva (obtención por la mañana)	1,2 – 7,5 µg/l

(*) El intervalo se basa en percentiles del 2,5 y 97,5 %

XVIII. PRECAUCIONES Y ADVERTENCIAS

Seguridad

Solo para uso diagnóstico *in vitro*.
Este kit contiene I¹²⁵ (semivida: 60 días), que emite radiaciones ionizantes X (28 keV) y γ (35,5 keV).
Este producto radiactivo se puede transferir a y ser utilizado únicamente por personas autorizadas; la adquisición, almacenamiento, uso e intercambio de productos radiactivos están sujetos a la legislación del país del usuario final. Bajo ninguna circunstancia debe administrarse el producto a seres humanos ni animales. Toda manipulación de productos radiactivos debe llevarse a cabo en una zona designada para tal fin, alejada de zonas de paso. En el laboratorio debe custodiarse un libro de registro sobre la recepción y almacenamiento de materiales radiactivos. Los equipos y el material de vidrio de laboratorio, que podrían estar contaminados con sustancias radiactivas, deberían separarse para prevenir la contaminación cruzada de radioisótopos diferentes.
Los vertidos radiactivos deben limpiarse inmediatamente de conformidad con los procedimientos de seguridad radiológica. Los residuos radiactivos deben desecharse siguiendo la normativa y las recomendaciones locales de las autoridades con jurisdicción del laboratorio. El cumplimiento de las normas básicas sobre seguridad radiológica proporciona la protección adecuada.
Los componentes de la sangre humana incluidos en este kit se han analizado mediante métodos europeos aprobados y/o métodos aprobados por la FDA, habiendo dado negativos para HbsAg, anti-VHC y anti-VIH-1 y 2. Ningún método conocido puede ofrecer una garantía total de que los hemoderivados

humanos no transmitan hepatitis, SIDA u otras infecciones. Por tanto, la manipulación de reactivos y las muestras de suero o plasma debe realizarse de conformidad con los procedimientos de seguridad locales.

Todos los productos y derivados de animales se han obtenido de animales sanos. Los componentes bovinos son originarios de países en los que no se ha notificado EEB. Sin embargo, los componentes que contengan sustancias animales deben tratarse como potencialmente infecciosos.

Evite el contacto con la piel de los reactivos (azida sódica como conservante). La azida de este kit puede reaccionar con el plomo y el cobre de las tuberías y formar de este modo azidas metálicas muy explosivas. Durante el paso de lavado, lave el desagüe con agua abundante para prevenir la acumulación de azidas.

No fume, beba, coma ni use cosméticos en la zona de trabajo. No pipetee con la boca. Lleve ropa protectora y guantes desechables.

XIX. BIBLIOGRAFÍA

1. Abraham, GE, Ed. (1981)
Radioassay Systems in Clinical Endocrinology.
Marcel Dekker Inc, New York

2. Rittler M and Geisler D (1983)
Radioimmunoassay of urinary cortisol: comparison of the procedures with
and without previous cortisol extraction.
Meth. Find. Exptl. Clin. Pharmacol. 5(6), 403-406.

XX. RESUMEN DE PROTOCOLOS

MUESTRAS DE SUERO, PLASMA Y/U ORINA	RECUE NT OS TOTALES µl	CALIBRADORES µl	MUESTRA (S) CONTROLE S µl
Calibradores (0 a 5) Muestras, controles Trazador	- - 500	25 - 500	- 25 500
Incubación	45 minutos a 37 +/- 2 °C, en un baño maría		
/Separación Solución de lavado de trabajo Separación	-	Aspirar (o decantar) 3,0 ml Aspirar (o decantar)	
Recuento	Medir los tubos durante 60 segundos		

MUESTRAS DE SALIVA	RECUE NT OS TOTALES µl	CALIBRADORES µl	MUESTRA (S) CONTROLE S µl
Calibradores (0 a 6)* Muestras, controles Trazador	- - 500	200 - 500	- 200 500
Incubación	180 minutos a 37 +/- 2 °C, en un baño maría		
/Separación Solución de lavado de trabajo Separación	-	Aspirar (o decantar) 3,0 ml Aspirar (o decantar)	
Recuento	Medir los tubos durante 60 segundos		

* Véase en XI la preparación de los calibradores

Leia todo o protocolo antes de utilizar.

CORTISOL-RIA-CT

I. UTILIZAÇÃO PREVISTA

Radioimunoensaio para adeterminação quantitativa *in vitro* de cortisol humano em soro, plasma, urina ou saliva sem extração.
Solo para uso profissional.

II. INFORMAÇÕES GERAIS

- A. Nome do proprietário :** DIAsource CORTISOL-RIA-CT Kit
- B. Número do catálogo :** KIP128000 : 96 testes
- C. Produzido por :** DIAsource ImmunoAssays S.A.
Rue du Bosquet, 2, B-1348 Louvain-la-Neuve, Bélgica.

Para obter informações sobre aquisição ou assistência técnica, contacte :
Bélgica Tel : +32 (0)10 84.99.11 Fax : +32 (0)10 84.99.91

III. SIGNIFICADO CLÍNICO

A Atividade Biológica

O cortisol é o principal glicocorticóide produzido e segregado pela glândula supra-renal. Em resposta a diferentes estímulos (ritmo diurno, stress, baixa concentração de açúcar no sangue), o córtex cerebral estimula o hipotálamo para liberar o CRF (fator de liberação de corticotropina). CRF provoca a liberação na glândula pituitária de ACTH (hormônio adrenocorticotrófico). Os glicocorticóides são então sintetizados em resposta a ACTH. Como os níveis de cortisol dependem da interação do hipotálamo, pituitária e glândulas adrenais, a medição dos níveis de cortisol na urina pode também auxiliar no diagnóstico diferencial dos estados de doença nestas glândulas.

IV. PRINCÍPIO DO MÉTODO

Uma quantidade fixa de esteróide marcado com ¹²⁵I compete com o esteróide não marcado, que esteja presente na amostra ou no calibrador, para uma quantidade fixa de locais de anticorpo, que é imobilizado nas paredes dos tubos de poliestireno. Nem a extração nem a cromatografia são necessárias, devido à elevada especificidade dos anticorpos revestidos. Após uma incubação de 45 minutos (180 minutos para procedimento salivar) à 37°C, a reação de competição termina com a operação de aspiração. A seguir os tubos são lavados com 3ml de solução de lavagem de trabalho e novamente aspirados. Traça-se uma curva de calibração e as concentrações de cortisol das amostras são determinadas por interpolação da dose a partir da curva de calibração. O método é calibrado com método de referência LC-MS

V. REAGENTES FORNECIDOS

Reagentes	Kit 96 Testes	Código de cor	Reconstituição
 Tubos revestidos com anti cortisol (monoclonal)	2 x 48	amarelo	Pronto para utilizar
Ag ¹²⁵I Marcador: Cortisol marcado com ¹²⁵ I (grau HPLC) em tampão fosfato-citrato com proteínas, ANS e azida (<0,1%)	1 recipiente 52 ml 116 kBq	vermelho	Pronto para utilizar
CAL 0 Calibrador Zero em soro humano e azida (0,1%)	1 recipiente 1 ml	amarelo	Pronto para utilizar
CAL N Calibradores N = 1 para 5 (ver os valores exactos nos rótulos do recipiente) em soro humano e azida (0,1%)	5 recipientes 0,5 ml	amarelo	Pronto para utilizar
WASH SOLN CONC Solução de lavagem (TRIS-HCl)	1 recipiente 10 ml	castanho	Dilua 70 x com água destilada (use um agitador magnético).
CONTROLO N Controlos - N = 1 ou 2 em plasma humano com timol	2 recipientes liofilizados	prateado	Adicione 0,5 ml de água destilada. Valores para procedimentos salivares também estão indicados nas etiquetas.

Note : Use o calibrador zero para diluições dos soros. Se necessário, urinas podem ser diluídas numa solução salina de tampão fosfato comum (PBS). Saliva pode ser diluída em soro fisiológico (veja XI)

VI. MATERIAL NÃO FORNECIDO

O seguinte material é necessário, mas não fornecido com o kit:

- 1. Águade destilada
- 2. Pipetas automáticas: 25 µl, 200 µl, 500 µl (recomenda-se a utilização de pipetas precisas, com pontas descartáveis)
- 3. Misturador de vortex
- 4. Agitador magnético
- 5. Banho de água à 37°C
- 6. Pipeta automática de 5 ml para lavagem (tipo Cornwall)
- 7. Sistema de aspiração (opcional)
- 8. Qualquer contador gamma capaz de medir ¹²⁵I pode ser utilizado (mínimo alcance de 70%).
- 9. Soro fisiológico (NaCl 9 g/L solução), para procedimento salivar

VII. PREPARAÇÃO DOS REAGENTES

- A. **Controlos :** Reconstitua os controlos com 0,5 ml de água destilada.
- B. **Solução de lavagem de trabalho :** Prepare um volume adequado de Solução de lavagem de trabalho ao adicionar 69 volumes de água destilada para 1 volume de solução de lavagem (70x). Use um agitador magnético para homogeneizar. Rejeite a solução não utilizada no final do dia.
- C. **Para preparação dos Calibradores e controlos para o procedimento salivar, veja item XI.**

VIII. ARMAZENAMENTO E PRAZO DE VALIDADE DOS REAGENTES

- Antes de abrir e reconstituir, todos os componentes do kit são estáveis até ao final do prazo de validade, indicado no rótulo desde que mantido entre 2 to 8°C.
- Após reconstituição, os controlos são estáveis durante 7 dias entre 2 a 8°C. Durante períodos de armazenamento mais longos, devem ser feitas alíquotas e mantidas a -20°C por 3 meses. Evite ciclos de congelamento e descongelamentos sucessivos.
- A solução de lavagem de trabalho deve ser feita e utilizada no mesmo dia.
- Depois da 1ª utilização o marcador é estável até final do prazo de validade, desde que mantido no recipiente original, bem fechado entre 2 to 8°C.
- Alterações no aspecto dos reagentes do kit podem indicar instabilidade ou degradação.

IX. RECOLHA E PREPARAÇÃO DE AMOSTRAS

- Manter o soro, plasma ou urina a 2-8°C durante 1-2 dias. Manter congelado por períodos mais longos. Amostras altamente lipêmicas ou hemolisadas devem ser descartadas. A presença de filamentos de fibrina no plasma podem interferir com o ensaio. Use apenas amostras claras
- Coletar amostras de urina durante 24 horas sem conservantes. Anote o volume total.
- Evite ciclos de congelamento e descongelamento sucessivos.
- Amostras de salivas devem ser coletadas utilizando equipamentos adequados de coleta. Exemplo: Salivette (Sarstedt cat nº 51.1534.500). Comer, beber ou escovar os dentes deve ser evitado 30 minutos antes da coleta. No caso de lesões na boca, inflamações ou doenças a coleta deve ser evitada (contaminação com sangue). Amostras de saliva podem ser estocadas a 2-8°C por uma semana ou congeladas por períodos mais longos. Amostras congeladas devem ser descongeladas e centrifugadas pelo menos uma vez (em ordem para separar as mucinas)

X. PROCEDIMENTO PARA SORO, PLASMA E AMOSTRAS DE URINA

- A. **Notas de manipulação**
Não utilize o kit ou qualquer componente depois da expiração do prazo de validade.
Não misture componentes de diferentes lotes.
Antes de utilizar todos os componentes devem estar à temperatura ambiente (TA).
Misture bem os reagentes e as amostras, por agitação ou rotação suaves.
Para evitar contaminações cruzadas utilize uma ponta de pipeta limpa e descartável, para adição de cada componente.
Pipetas de alta precisão ou equipamento automático de pipetagem melhoram a precisão.
Respeite os períodos de incubação.
Prepare uma curva de calibração para cada análise, não utilize dados de análises prévias.
Cada tubo só pode ser usado uma vez.

- B. **Procedimento**
 1. Rotule os tubos revestidos em duplicado, para cada calibrador, amostra, controlo. Para a determinação das contagens totais, rotule 2 tubos normais.
 2. Agite ligeiramente no vortex calibradores, amostras e controlos e dispense 25 µl de cada, para os tubos respectivos.
 3. Dispense 500 µl de Cortisol marcado com ¹²⁵I para cada tubo, incluindo os tubos normais para as contagens totais.
 4. Agite suavemente o suporte dos tubos, para libertar possíveis bolhas de ar.
 5. Incubar durante 45 minutos a 37 +/- 2°C, num banho de água.
 6. aspire (ou decantar) o conteúdo de cada tubo (excepto os das contagens totais). Assegure-se que a ponta plástica do aspirador atinge o fundo do tubo revestido, para remover todo o líquido.
 7. Lave os tubos com 3 ml de solução de lavagem de trabalho (excepto os das contagens totais) e aspire (ou decantar). Evite formação de espuma quando adiciona a solução de lavagem.
 8. Depois da lavagem, deixe os tubos direitos durante 2 minutos e seguidamente aspire a última porção de líquido.
 9. Conte os tubos num contador gamma durante 60 segundos.

XI. PROCEDIMENTO PARA MEDIDA DE CORTISOL NA SALIVA

- A. **Calibradores e controlos**
 1. Usando soro fisiológico (NaCl 9g/L em água destilada), diluir os calibradores em vidro ou tubos de plástico: **Calibrator 1: 1/20 and 1/10. Calibrators 2 to 5: 1/10.** O volume necessário para realizar o ensaio em duplicata é 400 µl; entretanto, nós recomendamos a seguinte diluição. **1/20 = 25 µl calibrador 1 + 475 µl soro fisiológico**

- 1/10 = 50 µl calibrador 1 to 5 + 450 µl soro fisiológico
- Diluir o controle 1/10 em soro fisiológico
- Não use o calibrador 0: ele é substituído, no teste, por soro fisiológico.

B. Procedimento

1. Rotule os tubos revestidos em duplicado, para cada calibrador, amostra, controle. Para a determinação das contagens totais, rotule 2 tubos normais.
2. Agite ligeiramente no vortex calibradores, amostras e controles e dispense
3. 25µl de cada, para os tubos respectivos.
4. Dispense 500 µl de Cortisol marcado com I¹²⁵ para cada tubo, incluindo os tubos normais para as contagens totais.
5. Agite suavemente o suporte dos tubos, para libertar possíveis bolhas de ar.
6. Incubedurante 180 minutos a 37 +/- 2°C, num banho de água.
7. Aspire(ou decantar) o conteúdo de cada tubo (excepto os das contagens totais). Assegure-se que a ponta plástica do aspirador atinge o fundo do tubo revestido, para remover todo o líquido.
8. Lave os tubos com 3 ml de solução de lavagem de trabalho (excepto os das contagens totais) e aspire(ou decantar). Evite formação de espuma quando adiciona a solução de lavagem.
9. Depois da lavagem, deixe os tubos direitos durante 2 minutos e seguidamente aspire a última porção de líquido.
Conte os tubos num contador gamma durante 60 segundos

XII. CÁLCULO DOS RESULTADOS

1. Calcule a média das determinações em duplicata.
2. Calcule a radioactividade de ligação como uma percentagem da ligação determinada no ponto do calibrador zero (0), de acordo com a fórmula seguinte:

$$B/B0\ (\%) = \frac{\text{Contagens (Calibrador ou amostra)}}{\text{Contagens (calibrador Zero)}} \times 100$$

3. Traçe os valores (B/B0(%)) para cada ponto de calibração como uma função da concentração decortisol em cada ponto, rejeitando os “outliers” (casos marginais) óbvios.
4. Os métodos informáticos podem ser utilizados para construir a curva de calibração. Se o processamento dos resultados for automático, ajuste na curva da função logistica com 4 parâmetros é recomendado.
5. Por interpolação dos valores das amostras (B/B0(%)), determine as concentrações de cortisol das amostras da curva de referência.
6. Paracada análise, a percentagem de marcador total ligado na ausência de cortisol(B0/T) marcado, deve ser verificada.
7. **Nota: Para a medida em saliva é obrigatório modificar a concentração de calibradores, através de diluições, antes de calcular a curva da calibração**

XIII. DADOS TÍPICOS

Os dados seguintes são apenas para exemplificação e nunca devem ser utilizados em detrimento dos dados reais da curva de calibração.

Soro/plasma/urina Cortisol	cpm	B/Bo (%)
Total	60203	
Calibrador		
0 µg/L	43148	100,0
17 µg/L	40143	93,0
34 µg/L	35177	81,5
100 µg/L	26815	62,2
274 µg/L	15359	35,6
450 µg/L	11342	26,3

Cortisol salivar	cpm	B/Bo (%)
Total	32041	
0,0 µg/L	20134	100,0
0,9 µg/L	18696	92,9
1,7 µg/L	18009	89,4
3,4 µg/L	16161	80,3
10,0 µg/L	12602	62,6
27,4 µg/L	7789	38,7
45,0 µg/L	5849	29,1

XIV. DESEMPENHO E LIMITES PARA SORO, PLASMA E URINA.

- A. Limite de detecção**
Foram analisados 20 calibradores zero , juntamente com um conjunto de outros calibradores.
O limite de detecção, definido como a concentração aparente, 2 DP abaixo das contagens médias com zero ligações, foi de 0,9µg/l.
- B. Especificidade**
A percentagem de reação cruzada estimada por comparação da concentraçãooproduzindoumainibição de 50% são respectivamente:

Componentes	Reação-cruzada (%)
Cortisol	100,00
17-OH-Progesterona	0,8
21-DOC	1,7
Corticosterona	1,4
11-DOC	89,5
Prednisona	0,7
Estradiol	0,04
Prednisolona	10,9
Testosterona	0,3
Progesterona	0,06

Nota: Esta tabelamostra a reação cruzada para o a anti-cortisol

C. Precisão

PRECISÃO INTRA-ENSAIO				PRECISÃO INTER-ENSAIO			
Soro	N	<X> ± DP (µg/l)	CV (%)	Soro	N	<X> ± DP (µg/l)	CV (%)
A	5	1,10	6,2	A	8	1,95	8,7
B	5	3,70	5,2	B	8	5,48	11,5
C	5	28,30	7,7	C	8	36,85	15,1

DP: Desvio Padrão; CV: Coeficiente de variação

D. Exactidão

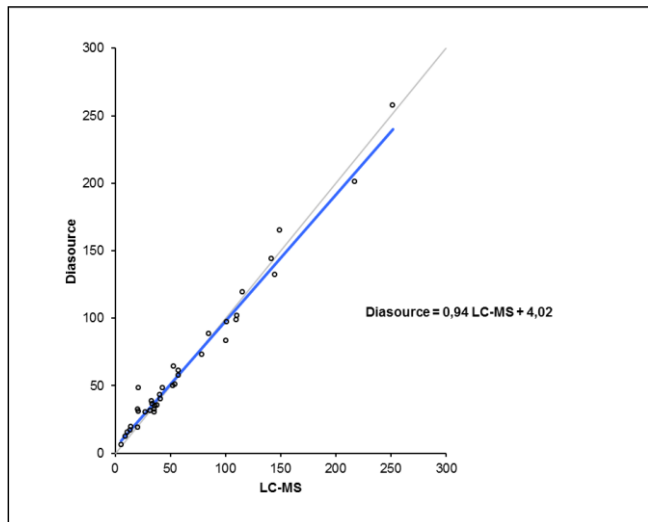
TESTE DE DILUIÇÃO		
Diluição (soro)	Conc. teórico. (µg/l)	Conc. medida (µg/l)
1/1	-	630,3
1/2	315,2	298,5
1/4	157,6	159,3
1/8	78,8	81,3
1/16	39,4	39,1
1/32	19,7	21,7
1/64	9,9	11,1

As amostras foram diluídas com calibrador zero.

TESTE DE RECUPERAÇÃO			
Amostra (µg/l)	cortisol adicionado (µg/l)	cortisolrecuperado (µg/l)	Recuperação (%)
3.0	30,0	17,7	93,2
3.0	100,0	48,7	105,7
3.0	300,0	149,2	101,5
3.0	1000,0	509,2	98,5

Fator de conversão :
De µg/l para nmol/l : x 2,758
De nmol/l para µg/l : x 0,363

E. Calibração contra LC-MS



XV. DESEMPENHO DOS PROCEDIMENTO SALIVARES

A. Detecção limite

Vinte calibradores zero foram testados juntamente com um conjunto de outros calibradores. O limite de detecção, definido como a concentração aparente de dois desvios padrão abaixo da média das contagens em zero de ligação, foi de **0,53 µg / L**.

B. Precisão

PRECISÃO INTRA-ENSAIO

PRECISÃO INTER-ENSAIO

Amostra	N	Média (µg/L)	CV (%)	Amostra	N	Média (µg/L)	CV (%)
A	12	7,9	10,4	A	8	15,8	4,7
B	12	18,7	10,4	B	8	13,2	4,7

C. Acurácia

TESTE DILUIÇÃO

Diluição	Teórica conc. (µg/L)	Medida conc. (µg/L)
1/1	**	11,46
1/2	5,73	5,31
1/4	2,87	3,00
1/8	1,43	1,30
1/16	0,72	0,68
1/32	0,36	0,35

TESTE DE RECUPERAÇÃO

Amostra (µg/L)	Adicionado Cortisol (µg/L)	Recuperado Cortisol (µg/L)	Recuperação (%)
2,29	0,60	0,52	97,2
2,29	1,20	1,32	103,4
2,29	3,81	3,66	97,5
2,29	10,90	11,82	107,0
2,29	18,00	16,33	91,8

XVI. CONTROLO DE QUALIDADE INTERNO

- Se os resultados obtidos para o controlo 1 e/ou controlo 2 não estão dentro do intervalo especificado no rótulo do recipiente, os resultados não podem ser utilizados, a menos que seja dada uma explicação satisfatória para a discrepância encontrada.
- Se for desejável, cada laboratório pode fazer os seus próprios conjuntos de amostras de controlo, que podem ser mantidas congeladas em alíquotas. Não faça ciclos de congelamento/descongelamento mais do que 2 vezes.

- Aceitação do critério para a diferença entre os resultados em duplicatas das amostras devem ser realizadas em Boas Práticas de Laboratório..

XVII. INTERVALOS DE REFERÊNCIA

Estes valores são dados apenas por segurança; cada laboratório deve estabelecer seus próprios valores normais.

Os níveis de cortisol variam durante o dia e como uma função supressão de manobras clínicas. Amostras matinais têm resultados geralmente de 2 a 3 vezes mais elevados do que os obtidos com amostras a tarde. Amostras da manhã geralmente têm leitura menor que 5 µg/l após o teste metirapona ou supressão de dexametasona

Identificação	Alcance (*) (µg/L)
Amostras do soro	
Coleta manhã	50 – 270 µg/L
Coleta tarde	25 – 119 µg/L
Amostra de urina de 24 horas	6 -75 µg/24H
Amostras de saliva (Coleta manhã)	1,2 – 7,5 µg/L

(*) O intervalo é baseado em 2,5 % e 97,5 % percentis

XVIII. AVISOS E PRECAUÇÕES

Segurança

Apenas para uso em diagnóstico *in vitro*.

Este kit contém ¹²⁵I (meia-vida: 60 dias), emitindo radiações X (28 keV) e γ (35,5 keV) ionizantes.

Este produto radioactivo pode apenas ser transportado e utilizado por pessoal autorizado: a compra, armazenamento, utilização e troca de produtos radioactivos estão sujeitas à legislação nacional vigente. Em nenhum caso, este produto pode ser administrados a seres humanos ou a animais.

Toda a manipulação radioactiva deve ser efectuada em local próprio e exclusivo para tal. Deve ser mantido no laboratório, um livro de registo para a recepção e armazenamento de material radioactivo. O equipamento do laboratório e equipamento de vidro que possa ser contaminado com radioactividade, deve ser segregado para evitar contaminação cruzada com diferentes isótopos. Qualquer derrame de material radioactivo deve ser imediatamente limpo, de acordo com os procedimentos de radioprotecção. O lixo radioactivo deve ser rejeitado de acordo com a legislação vigente e as regras do laboratório. A adesão às regras básicas da radiosegurança, fornece a protecção adequada.

Os componentes de sangue humano incluídos neste kit foram testados por métodos aprovados pela legislação europeia e/ou FDA e dados como negativos para o HBsAg, anti-HCV, anti-HIV-1 e 2. Não existe nenhum método, até agora conhecido, que oferece total segurança quanto à impossibilidade de transmissão de hepatite, HIV ou outras infecções, por via do sangue humano. Por isso, deve manipular os reagentes, o soro ou o plasma de acordo com as regras locais de segurança, quanto a materiais potencialmente infecciosos.

Todos os produtos de origem animal e seus derivados foram recolhidos de animais saudáveis. Os componentes bovinos, vieram de países sem casos notificados de BSE. No entanto, todos estes componentes devem ser manipulados como potencialmente infecciosos.

Evite o contacto da pele e mucosas com os reagentes (azida sódica como conservante). A azida pode reagir com o chumbo e o cobre das canalizações e formar compostos explosivos. Rejeitar com abundante quantidade de água corrente para evitar acumulações destes compostos.

Não fume, coma, beba ou aplique cosméticos na área de trabalho. Não pipette com o auxílio da boca. Use vestuário adequado de protecção e luvas.

XIX. BIBLIOGRAFIA

1. Abraham, GE, Ed. (1981)
Radioassay Systems in Clinical Endocrinology.
Marcel Dekker Inc, New York
2. Rittler M and Geisler D (1983)
Radioimmunoassay of urinary cortisol: comparison of the procedures with and without previous cortisol extraction.
Meth. Find. Exptl. Clin. Pharmacol. 5(6), 403-406.

XX. RESUMO DO PROTOCOLO

SORO, PLASMA E/OU	CONTAGENS TOTAIS	CALIBRADORES	AMOSTRAS CONTROLOS
-------------------	------------------	--------------	--------------------

AMOSTRAS DE URINA	(µl)	(µl)	(µl)
Calibradores (0 to 5)	-	25	-
Amostras, controles	-	-	25
Marcadores	500	500	500
Incubação	45 minutos a 37 +/- 2°C, embanhode água		
Separação Solução de lavagem de trabalho Separação	-	Aspirar (oudecantar) 3,0 ml Aspirar (oudecantar)	
Contagem	Contar os tubos durante 60 segundos		

AMOSTRAS DE SALIVA	CONTAGEM TOTAL µl	CALIBRADORES µl	AMOSTRAS CONTROLE µl
Calibradorse (0 to 6)* Amostras, Controles Marcador	- - 500	200 - 500	- 200 500
Incubação	180 minutos a 37 +/- 2°C, em banho de água		
/Separação Solução de lavagem Separaçõ	-	Aspirar(ou decantar) 3,0 ml Aspirar(ou decanter)	
Contagem	Contar tubos por 60 segundos		

*Veja XI para preparação dos calibradores