

INTENCIÓN DE USO

El kit Cortisol en CLIA se utiliza para la cuantificación por ensayo Inmunoenzimático de Cortisol en suero o plasma.

RESUMEN

El Cortisol (Hidrocortisona, compuesto F) es el Glucocorticoide sintetizado del Colesterol más potente. El Cortisol se encuentra en la sangre como Cortisol libre, o bien, ligado en alta afinidad a la unión de la globulina corticoesteroide (CBG, transcortina). La producción de Cortisol es dependiente de ACTH en ritmos circadianos con picos tempranos durante la mañana y tarde en la noche. Los factores que controlan los ritmos circadianos aún no han sido completamente definidos. Los niveles en suero son más altos por la mañana y decrecen durante el transcurso del día. En cuanto al aspecto metabólico, el Cortisol promueve glucogénesis, deposición hepática de glucógeno y una menor utilización de glucosa. Inmunológicamente, el Cortisol funciona como un anti inflamatorio y tiene un rol importante en relación a hipersensibilidad, inmunosupresión y resistencia a enfermedades. También se ha demostrado que los niveles de Cortisol en plasma se elevan como respuesta al stress. Niveles anormales de Cortisol pueden observarse en diferentes condiciones tales como tumores adrenales, cáncer de próstata, depresión y esquizofrenia. Elevados niveles de Cortisol y falta de variación diurna en sus niveles ha sido observado en pacientes con síndrome de Cushing.

PRINCIPIO DEL ENSAYO

La prueba de Cortisol CLIA es una fase sólida de dos sitios de inmunoensayo. Un anticuerpo monoclonal se aplica sobre la superficie de los pocillos de microtitulación y otro anticuerpo monoclonal marcado con rábano picante peroxidasa se utiliza como trazador. Las moléculas de Cortisol presente en la solución estándar o suero forman un "sándwich" entre los dos anticuerpos. Después de la formación de la cubierta de anticuerpos antígeno-anticuerpo-complejo enzimático, la enzima no unida se elimina por el lavado. La actividad de peroxidasa de rábano unido en los pozos de entonces se analiza con las reacciones de Quimioluminiscencia. La unidad de luz relacionada es proporcional a la concentración de Cortisol presente en la de la muestra.

MATERIALES SUMINISTRADOS

1. 96 pocillos impregnados con anti Cortisol
2. Reactivo Enzima conjugada frasco de 12 ml.
3. Cortiso estándar de referencia, 0,20,50,100,200,500ng/ml. 0.5ml. c/u
4. CLIA Sustrato A, 6.0ml
5. CLIA Sustrato B, 6.0ml
6. Control 1, 0.5 ml
7. Control 2, 0.5 ml
8. PBS solución de lavado (50x) 15ml.
9. Instructivo de uso.

MATERIALES REQUERIDOS PERO NO SUMINISTRADOS

1. Agua destilada o desionizada.
2. Pipetas de precisión.
3. Puntas de pipetas desechables.
4. Lector Microelisas con lente a 450nm de longitud de onda con una banda de amplitud de 10nm o menor y un rango de densidad óptica de 0-2 OD o mayor
5. Papel absorbente o toalla de papel.
6. Papel cuadrículado.

ALMACENAMIENTO Y ESTABILIDAD

1. Almacene el kit a 2 - 8°C.
2. Mantenga las tiras de los pocillos selladas en la bolsa de aluminio.
3. Todos los compuestos son estables hasta su fecha de expiración siempre y cuando las condiciones de almacenaje sean estrictamente llevadas a cabo como aquí se indica.
4. No exponga los reactivos al calor, luz solar o intensa luz eléctrica.

ADVERTENCIAS Y PRECAUCIONES

1. Potencial de los materiales de riesgo biológico: Los calibradores contienen componentes de origen humano, que se han sido probados y encontrados no reactivos para el antígeno de superficie de hepatitis B y anticuerpos contra el VIH Aprobado por la FDA. Sin embargo no hay método de prueba que puede ofrecer completa seguridad de que el virus VIH, Hepatitis B u otros agentes infecciosos estén presentes. Estos reactivos deben ser manejados según el Nivel de Bioseguridad 2, como se recomienda en los Centros para el Control de Enfermedades / Institutos Nacionales de Salud manuales. "Bioseguridad en laboratorios microbiológicos y biomédicos" 1984
2. No pipetee con la boca. No fume, coma, o beba en el área donde maneje este equipo
3. Los componentes en este equipo son para uso como una unidad integral. Los componentes de diferentes lotes no se deben mezclar
4. Es recomendable que los estándares, controles y muestras de suero se corran por duplicado
5. Para obtener óptimos resultados, debe apegarse estrictamente al protocolo. Pipeteado exacto y preciso, así como después de la hora exacta y requerimientos de temperatura prescritos son esenciales. Cualquier desviación de este pueden dar datos no válidos

RECOLECCIÓN DE LA MUESTRA

1. Recolecte sangre por venopunción y separe el suero de inmediato.
2. En caso de no llevar a cabo el examen inmediatamente, refrigere la muestra a (2-8° C) por cinco días. En caso de exceder dicho plazo, congele a -20° C hasta un mes.
3. Evite múltiples ciclos de congelación - descongelación.
4. Previo al ensayo, la muestra deberá ser debidamente descongelada y mezclada.
5. Evite utilizar muestras con exceso de lípidos.

PREPARACIÓN DEL REACTIVO

1. Para preparar Buffer de Lavado: añadir frasco wash buffer (50X) a 735ml de agua destilada y mezclar. El buffer de lavado es estable a temperatura ambiente.
2. Determinar la cantidad que de la solución de sustrato necesario y preparar mezclando volúmenes iguales de sustrato A y B en un recipiente limpio. Por ejemplo, añadir 1 ml de sustrato A y 1 ml de sustrato B por 2 tiras de ocho pocillos (quedara un ligero exceso de material preparado). Deseche la porción no utilizada si no se utiliza dentro de 20 minutos después de la mezcla.

PROCEDIMIENTO DEL ENSAYO

1. Todas las muestras y reactivos deben ser llevados a temperatura ambiente (18-23° C) antes de su uso. Mezcle gentilmente todos los reactivos previos a su uso.
2. Corte el número de pozos a utilizar. Cierre y selle el resto de los pozos no utilizados y refrigérelos a 2-8° C.
3. Dispensar 25 µl de los estándares de Cortisol, control y muestras en los pozos designados.
4. Agregar 100 µl de Reactivo Enzima Conjugada
5. Mezcle suavemente los pozos en agitador por 30 segundos.
6. Incube a temperatura ambiente (18-23° C) por 60 minutos.

7. Retire el líquido de los pocillos. Enjuague y lave los pocillos 5 veces con 300 uL de solución de lavado 1X. Golpee la placa sobre el papel absorbente.
8. Agregue 100 µl de sustrato A + B en cada pozo.
9. Poner la microplaca en la cámara de detección del Luminómetro durante 5 minutos, a continuación, leer el valor de RLU de cada pocillo.

CALCULO DE RESULTADOS

La curva estándar se construye de la siguiente manera:

1. Calcule el valor del estándar de Cortisol en cada vial estándar. Este valor puede variar de un lote a otro. Asegúrese de revisar los valores en cada kit. Véase el ejemplo de estándar adjunto.
2. Para construir la curva estándar, trace los RLU's de los estándares de Cortisol (eje vertical) frente a concentraciones normales de Cortisol (eje horizontal) en un papel de grafica lineal. Dibuje la mejor curva a través de los puntos.
3. Lea la absorbancia de los controles y cada muestra desconocida de la curva. Registre el valor de cada control o muestra desconocida.

Ejemplo de Curva Standard

	RLU's 10	Conc. ng/mL
Std 1	16.45	0
Std 2	12.27	20
Std 3	7.43	50
Std 4	3.38	100
Std 5	1.89	200
Std 6	1.06	500

VALORES ESPERADOS

Se recomienda que cada laboratorio establezca sus propios rangos normales sobre la base de una muestra representativa de la población local. Los siguientes valores de Cortisol pueden usar rangos utilizados solo como guía:

Clasificación	ng/ml
8:00AM- 10:00AM	50-230
4:00PM	20-150

LIMITACIONES DE LA PRUEBA

1. Los resultados obtenidos mediante la utilización de este kit sirven solo como ayuda en el diagnóstico y deben ser interpretados en relación a la historia clínica del paciente, síntomas y otros procedimientos de diagnóstico.
2. No utilice acido de sodio como preservante ya que inhibe la actividad de la enzima conjugada.
3. **Linealidad:** Dos muestras diferentes fueron diluidas con el calibrador "0" a 1:2, 1:4, 1:8. Fueron calculados los valores de Insulina y los resultados corregidos con el factor de dilución.

PERFORMANCE

1. Correlación con un kit CLIA de referencia:

Un total de 86 muestras de suero fueron analizadas utilizando el presente kit CLIA y otro kit de referencia. Fueron obtenidos los siguientes resultados:

Correlación	Pendiente	Intercepción
0.95	0.96	0.5

2. Precisión:

Intra Ensayo

Suero	No. de Réplicas	Media ng/ml	Desvío Estanda	Coefficiente de Variación (%)
1	16	40.1	2.54	6.3
2	16	59.4	5.57	9.4
3	16	165.5	10.23	6.2

Inter Ensayo

Suero	No. de Réplicas	Media ng/ml	Desvío Estanda	Coefficiente de Variación (%)
1	10	52	7.8	15
2	10	87	8.9	10.2
3	10	156	13.5	8.6

3. Sensibilidad:

La sensibilidad de esta prueba fue al calcular la media más dos desvíos estándar del punto de estándar cero, veinte veces en la misma prueba.

Suero	No. de Réplicas	Media ng/ml	Desvio Estanda	Media + 2SD (Sensibilidad)
Zero Standard	20	1.38	0.06	1.5 ng/ml

4. Especificidad:

Los anticuerpos utilizados en este kit tuvieron reactividad cruzada con Insulina bovina (20-25%) y con Insulina porcina, pero no con Proinsulina de ninguna especial ni con otros complejos insulinos.

Esteroides	Reactividad Cruzada
Cortisol	100%
Prednisolona	5.1%
11- Deoxycortisol	0.6%
Cort1	0.3%
11- Deoxycorticosterone	<0.1%
Progesterona	<0.1%
17 – OH Progesterona	<0.1%
Estradiol	<0.1%
Testosterona	<0.1%

REFERENCIAS

1. Chernow B, Alexander R, Smallridge RC, Thompson WR, Cook D, Beardsley D, Fink MP, Lake R, Fletcher JR: Hormonal responses to graded surgical stress. Arch Intern Med 147:1273-1278, 1987.
2. Crapo L: Cushing's syndrome: A review of diagnostic tests. Metabolism 28:955-977, 1979.
3. Lee PDK, Winter RJ, and Green OC: Virilizing adrenocortical tumors in childhood. Eight cases and a review of the literature. Pediatrics 76:437-444, 1985.
4. Leisti S, Ahonen P, Perheentupa J: The diagnosis and staging of hypocortisolism in progressing autoimmune adrenalitis. Pediatr Res 17:861-867, 1983.
5. Stewart PM, Seckl JR, Corrie J, Edwards CRW, Padfield PL: A rational approach for assessing the hypothalamo-pituitary-adrenal axis. Lancet 5:1208-1210, 1988.
6. Watts NB, Tindall GT: Rapid assessment of corticotropin reserve after pituitary surgery. JAMA 259:708-711, 1988.