

**GammaCoat™ Cortisol**  
**<sup>125</sup>I RIA Kit**

For the quantitative determination  
of cortisol levels in serum, plasma or urine

**Instruction Manual**

Manuel d'instructions

Testanleitung

Manual de instrucciones

Manuale di istruzioni

Manual de instruções

Bruksanvisning

Εγχειρίδιο οδηγιών

REF: CA-1529E, CA1549E

**DiaSorin**

Stillwater, Minnesota 55082-0285, U.S.A.

## TABLE OF CONTENTS

English .....	Page 1
Français .....	14
Deutsch .....	27
Español .....	41
Italiano.....	55
Português.....	68
Svenska .....	81
Ελληνικά.....	94

## GAMMACOAT™ CORTISOL RIA KIT

### 1. INTENDED USE

FOR IN VITRO DIAGNOSTIC USE.

The GammaCoat™ [<sup>125</sup>I] Cortisol Radioimmunoassay Kit is to be used for the quantitative determination of cortisol (hydrocortisone, Compound F) levels in serum, plasma or urine.

### 2. SUMMARY AND EXPLANATION

Cortisol (hydrocortisone, Compound F) is the major glucocorticoid which is secreted by the adrenal cortex. Among its physiological effects are anti-inflammatory activity, blood pressure maintenance, and synthesis of carbohydrate from protein.

Glucocorticoids are synthesized in response to adrenocorticotrophic hormone (ACTH) which is secreted by the anterior lobe of the pituitary gland. In the normal individual, cortisol participates in a negative feedback loop with ACTH through the hypothalamus-pituitary-adrenal cortex axis (HPA axis). Pituitary ACTH is, in turn, regulated by corticotropin-releasing factor (CRF) which is secreted by the hypothalamus. The hypothalamic CRF is responsive to cortisol levels and to stress. Physical and psychological stress, diurnal variation and low blood sugars will affect the rate of cortisol secretion.<sup>1-6</sup>

Malfunction of any organ in the HPA axis will result in alteration of cortisol levels.<sup>7,8</sup> The evaluation of adrenal gland function by measurement of plasma or serum cortisol levels aids in the diagnosis of normal and abnormal states. Combinations of morning and evening measurements and stimulation and suppression tests can offer strong evidence for diagnosis of specific adrenal-related diseases. The diagnosis of Addison's disease (chronic adrenal insufficiency) and Cushing's syndrome (adrenal overproduction) are two examples for which the specific assay of circulating cortisol levels is helpful in patient evaluation.<sup>9,10</sup>

### 3. PRINCIPLES OF THE ASSAY

The GammaCoat [<sup>125</sup>I] Cortisol Radioimmunoassay Kit procedure is based on the competitive binding principles of radioimmunoassay.<sup>11</sup> Calibrators and unknown samples (serum, plasma or urine) are incubated with cortisol tracer in antibody-coated tubes where the antibody is immobilized onto the lower inner wall of the GammaCoat tube. After incubation, the contents of the tube are aspirated or decanted and the tube is counted. A calibrator curve is prepared with 5 serum calibrators ranging from 1-60 µg/dL. Unknown values are interpolated from the calibrator curve. The entire assay is performed in the coated tube. No separate sample dilution, protein denaturation or extraction steps are required for serum, urine or plasma samples.

In addition to unextracted urinary cortisol assays, the GammaCoat [<sup>125</sup>I] Cortisol RIA Kit procedure may also be used to measure urinary free (unconjugated) cortisol. The cortisol present in the urine must first be extracted into methylene chloride. An aliquot of the extract is evaporated directly in the GammaCoat antibody-coated tube. (Experiments have shown that no deleterious effects occur to the antibody-coated tube if good quality methylene chloride is used.) To insure that the samples contain proper levels of protein, 10 microliters of Cortisol Serum Blank (CA-2367) are added to each GammaCoat tube. The remainder of the assay procedure is the same as that used for serum, plasma or unextracted urine cortisol determinations. The efficiency of the cortisol extraction from urine by methylene chloride should be monitored.

### 4. REAGENTS PROVIDED IN THE KIT

Cortisol Calibrators (A-F)	6 vials /1 mL	6 vials /1 mL
Cortisol Coated Tubes	2 bags /50 ea	10 bags / 50 ea
Cortisol Tracer	1 vial / 10 mL	5 vials/10 mL ea
PBS Buffer	1 vial/ 100 mL	5 vials / 100 mL ea
Number of tests	100	500

STORAGE: All reagents including the tracer-buffer reagent are stable through the expiration date printed on the kit label when stored at 2-8°C. The anti-cortisol coated tubes can be stored at 2-27°C. Do not use reagents beyond the kit expiration date. Reagents from different batches must not be mixed.

**4.1 Cortisol Tracer:** ready to use reagent

Each vial contains approximately 4 µCi of tracer (<1 µg/mL Cortisol) in 10 mL of phosphate buffered saline, ANS (8-Anilino-1-naphthalene sulfonic acid) with 0.1% sodium azide as a preservative.

**4.2 Rabbit Anti-Cortisol Serum Coated Tubes:** ready to use reagent

12 x 75 mm tubes are coated with rabbit anti-cortisol serum (titer<1 µg/tube) and packaged in a plastic bag.

**4.3 PBS Buffer:** ready to use reagent

Each bottle contains 100 mL of phosphate buffered saline with 0.1% sodium azide as a preservative.

**4.4 Cortisol Serum Calibrators:** ready to use reagent

Each vial contains cortisol in 1 mL of processed human serum with 0.1% sodium azide as a preservative. Calibrators are provided at the following concentrations: 0, 1, 3, 10, 25 & 60 µg/dL, respectively. The DiaSorin Cortisol Calibrators have been calibrated against the U.S.P. Cortisol Reference Standard. Any comparison with other products or procedures should be done with this reference standard. The kit calibrators demonstrate commutability with patient samples when used with reagents and operating procedure of this in vitro diagnostic test as recommended.

**4.5 Auxiliary Label**

For tracer-buffer reagent

**4.6 AVAILABLE UPON REQUEST:**

Semi-Logarithmic Graph Paper  
50 sheets per pad

**5. WARNINGS AND PRECAUTIONS**

FOR IN VITRO DIAGNOSTIC USE.

Not for internal or external use in humans or animals.

**REAGENTS CONTAINING HUMAN SOURCE MATERIAL**

**Treat as potentially infectious.**

Each serum/plasma donor unit used in the preparation of this product has been tested by an FDA approved method and found non-reactive for the presence of HBsAg, antibody to HCV and antibody to HIV 1/2. While these methods are highly accurate, they do not guarantee that all infected units will be detected. This product may also contain other human source material for which there is no approved test. Because no known test method can offer complete assurance that hepatitis B virus (HBV), hepatitis C virus (HCV), Human Immunodeficiency Virus (HIV) or other infectious agents are absent, all products containing human source material should be handled in accordance with good laboratory practices using appropriate precautions as described in the Centers for Disease Control and Prevention/National Institutes of Health Manual, "Biosafety in Microbiological and Biomedical Laboratories," 4<sup>TH</sup> ed., May 1999 or current edition.

**Reagents Containing Sodium Azide**

**CAUTION:** Some reagents in this kit contain sodium azide. Sodium azide may react with lead or copper plumbing to form highly explosive metal azides. On disposal, flush with a large volume of water to prevent azide build-up. For further information, refer to "Decontamination of Laboratory Sink Drains to Remove Azide Salts," in the Manual Guide-Safety Management No. CDC-22 issued by the Centers for Disease Control and Prevention, Atlanta, GA, 1976.

**European Communities Hazardous Substance Risk Phrases (Council Directive 1999/45/EC)**

R20/21/22 - Harmful by inhalation, in contact with skin and if swallowed.

R32 - Contact with acids liberates very toxic gas.

S28 - After contact with skin, wash immediately with plenty of water.

**Reagents Containing Iodine-125**

Appropriate precautions and good laboratory practices should be used in the storage, handling, and disposal of this material.

For practitioners or institutions receiving radioisotopes under a general license:

This radioactive material may be received, acquired, possessed and used only by physicians, veterinarians in the practice of veterinary medicine, clinical laboratories or hospitals, and only for in vitro clinical or laboratory tests not involving internal or external administration of the material, or the radiation therefrom, to human beings or animals. Its receipt, acquisition, possession, use and transfer are subject to the regulations and the general license of the U.S. Nuclear Regulatory Commission or of the state with which the Commission has entered into an agreement for the exercise of regulatory authority.

1. Storage of radioactive material should be limited to a specifically designated area.
2. Access to radioactive materials must be limited to authorized personnel only.
3. Do not pipette radioactive material by mouth.
4. Do not eat or drink within designated radioactive work areas.
5. Areas where spills may occur should be wiped up, then washed with an alkali detergent or radiological decontamination solution. Any glassware used must be rinsed completely with water before washing with other laboratory glassware.

For practitioners or institutions receiving radioisotopes under a specific license:

The receipt, use, transfer and disposal of radioactive materials are subject to the regulations and conditions of your specific license.

**WARNING:** This product contains a chemical known to the State of California to cause cancer.

**ATTENTION:** Radioactivity printed in the package insert may be slightly different from the radioactivity printed on the box label and on the tracer vial label. The box label and the tracer vial label indicate the actual amount of radioactivity at the calibration date where the package insert indicates the theoretical radioactivity of the kit.

**6. SPECIMEN COLLECTION AND HANDLING**

**Plasma Samples**

Collect a venous blood sample aseptically in an evacuated glass tube containing heparin or EDTA.

Separate the plasma fraction. The plasma may be stored refrigerated overnight at 2-8°C. For longer storage, samples must be stored frozen at -20°C. Hemolyzed, lipemic or icteric samples should be avoided.

**Serum Samples**

Although plasma samples are usually specified for cortisol assays, comparable results are obtained using serum samples.<sup>12</sup>

Separate the serum fraction. The serum may be stored refrigerated overnight at 2-8°C. For longer storage, samples must be stored frozen at -20°C. The use of hemolyzed, lipemic or icteric samples should be avoided.

**Urine Samples**

Collect a 24-hour urine specimen. Record the total volume of urine. Add 10 grams of boric acid per liter of urine as a preservative, and store a well-mixed aliquot frozen at -20°C. Thaw frozen samples at room temperature and mix well prior to use.

## **7. EQUIPMENT AND MATERIALS REQUIRED, BUT NOT SUPPLIED.**

- 7.1 Constant temperature water bath,  $37 \pm 2^\circ\text{C}$ .
- 7.2 Precision pipet (10  $\mu\text{L}$ ).
- 7.3 Semi-automatic pipet (1.0 mL).
- 7.4 Gamma counter.
- 7.5 Test tube rack.
- 7.6 Water aspirator (optional).
- 7.7 Vortex mixer.
- 7.8 Plastic-backed absorbent paper (optional).

Additional supplies for use in urine extraction procedure only:

- 1. Disposable glass test tubes (12 x 75 mm) and caps.
- 2. Methylene chloride (dichloromethane; ACS analytical reagent grade).
- 3. Ice bath.
- 4. Precision pipets (100 & 200  $\mu\text{L}$ ).
- 5. Hood or well-ventilated area.
- 6. Means of evaporating the methylene chloride. This can be done with a stream of dry air or nitrogen with mild warming of the extract to about  $37^\circ\text{C}$  in a hood or well-ventilated area.

## **8. URINE EXTRACTION PROCEDURE**

This procedure includes the methodology for determining the efficiency of methylene chloride extraction. Typical recoveries of cortisol from urine samples averaged  $99 \pm 14\%$  in DiaSorin laboratories.

- 8.1 Place an adequate volume of methylene chloride in an ice bath to chill. Allow more than 1 mL per tube. The ice bath should be large enough to accommodate a beaker of methylene chloride and the rack of glass extraction test tubes.
- 8.2 To determine the extraction efficiency, label two disposable glass test tubes for each sample to be assayed with the patient's identification. Label one tube "S" for Sample and the other tube "E" for Extraction Efficiency.
- 8.3 Add 200 microliters of a well-mixed 24 hour urine sample to the appropriate "S" and "E" tubes.
- 8.4 To each "E" tube only, add 10  $\mu\text{L}$  of the 60  $\mu\text{g}/\text{dL}$  Cortisol Serum Calibrator. Mix reagents by shaking the test tube rack or mixing each tube.
- 8.5 Add 1.0 mL chilled methylene chloride to each "S" and "E" tube. Vortex well to extract the cortisol into the organic layer. Cap or cover and place in an ice bath to avoid excessive evaporation of methylene chloride. To facilitate pipetting the methylene chloride, it is important to rinse the pipet 3 to 4 times with COLD methylene chloride before transferring it to the appropriate tubes.
- 8.6 While waiting for phase separation to occur, label two GammaCoat Cortisol tubes for each "S" tube and two GammaCoat Cortisol tubes for each "E" tube.
- 8.7 After phase separation, carefully remove 100  $\mu\text{L}$  from the bottom (methylene chloride) layer of each tube and add to the appropriately labeled GammaCoat tubes. Rinsing the pipet tip in cold methylene chloride prior to pipetting the sample will minimize seepage of extracted sample from the pipet tip. When transferring the 100  $\mu\text{L}$  aliquot of extraction solution to the coated tube, do not attempt to wipe the pipet tip, because the physical properties of methylene chloride cause leakage and air bubbles in the pipet tip.

To ease the transfer of extraction solution to the coated tube, hold both the extraction tube and the GammaCoat tube in the same hand. Rapidly, but carefully, transfer the 100  $\mu\text{L}$  of extract into the bottom of the GammaCoat tube.

- 8.8 Evaporate the methylene chloride from the GammaCoat tubes with a stream of dry air or nitrogen and mild warming of the extract to about 37°C.  
**CAUTION:** Avoid excessive concentrations of halogenated hydrocarbon fumes in work areas. EVAPORATION SHOULD BE DONE ONLY IN A HOOD OR WELL-VENTILATED AREA.
- 8.9 After the methylene chloride is completely evaporated, add 10 µL of the 0 µg/dL Cortisol Serum Blank, CA-2367, to each GammaCoat patient sample tube ("S" and "E" tubes), to ensure that the samples contain the proper levels of protein.
- 8.10 Continue with the RIA procedure starting with step 1 of Assay Procedure.

## 9. ASSAY PROCEDURE

### Tracer-Buffer Reagent:

Add the entire contents of 1 vial of cortisol tracer to 1 bottle of PBS buffer and mix gently. A final rinse of the cortisol tracer vial with the tracer-buffer reagent will maximize transfer of the tracer. Fill out and attach the auxiliary tracer-buffer reagent label to the container for proper identification. The tracer-buffer reagent must be stored in the dark, or in a foil-wrapped container, at 2-8°C.

The assay procedure includes the preparation of a calibrator curve from which the unknown cortisol content in the sample is interpolated.

- 9.1 Allow all reagents to reach room temperature and mix thoroughly without foaming prior to use.
- 9.2 Label the GammaCoat tubes in duplicate according to the following scheme. Total Count [T1,T2] and B0 tubes [1,2] may be required for certain data reduction and quality control programs, but may be omitted if the calibrator curve is plotted on semi-logarithmic graph paper.<sup>13-15</sup>
- 9.3 Add to the bottom of the appropriate duplicate GammaCoat tubes:
- 10 µL of Cortisol Serum Blank, or each Cortisol Serum Calibrator.
  - FOR SERUM, PLASMA AND UNEXTRACTED URINE SAMPLES, add 10 µL of each sample. Care must be taken to pipet calibrators and samples in the same manner.<sup>16</sup>
  - FOR EXTRACTED URINE SAMPLES, use the GammaCoat tubes containing the extracted samples from step 9 of Urine Extraction Procedure.  
 Serum Blank provide with this kit as diluent. With either unextracted or extracted urine samples, dilute as required with distilled water. For Urinary Free Cortisol, extract a 200 µL aliquot of the diluted urine sample (Urine Extraction Procedure, Step 3). Continue with the routine assay. The dilution factor must be included in the calculations.
- 9.4 Add 1.0 mL of tracer-buffer reagent to each tube. Gently mix each tube on a vortex mixer set at a low speed.
- 9.5 Incubate tubes for 45 minutes in a 37 ± 2°C water bath.
- 9.6 Aspirate or decant all tubes except Total Counts.  
**FAILURE TO REMOVE ADHERING SOLUTION ADEQUATELY MAY RESULT IN POOR REPLICATION AND SPURIOUS VALUES.**  
 If the aspiration technique is used, be sure that the plastic tip of the aspirator touches the bottom of the coated tube and that all the liquid is removed.  
 If the decanting technique is used, allow the tubes to drain in an inverted position for 3-5 minutes. Tap the tubes on absorbent paper to remove any adhering liquid before placing the tubes upright.
- 9.7 Count all tubes in a gamma counter for 1 minute with the window suitably adjusted for iodine-125.
- 9.8 Calculate results. Refer to Results.

## 10. SALIVARY PROCEDURE

This kit also allows assays of saliva samples.

It has been shown that there is a good correlation between the concentration of cortisol in saliva and the concentration of free cortisol in plasma and serum (these concentrations represent 60% to 100% of the concentration of the free fraction in circulation and 4% to 6% of the total concentration in serum or plasma).

Numerous studies have demonstrated the practical and diagnostic advantages of salivary cortisol assays and confirmed their validity and clinical value.

Two important points were taken into account in adapting this technique to salivary cortisol assays:

First, because salivary cortisol represents only 5% of total plasma cortisol, a 20-fold increase in sensitivity is required. To attain this level of sensitivity, the saliva sample was increased to a volume of 200  $\mu$ L.

Second, saliva has a lower concentration of proteins (generally consisting of enzymes and glycoproteins). Only trace amounts of plasma proteins are present, while proteins that bind with corticosteroids are absent. To guarantee that the effects of the protein matrix are similar in the sample and standards, 0 calibrator (without cortisol) is added to each saliva sample (as for assays on extracted urine samples).

Thus, only minor modifications are required in the pipetting of samples and standards to adapt the method to saliva sample assays, using only reagents already provided in the kit.

### 10.1 Collecting and preparing saliva samples

Saliva must be collected 10 minutes after patients rinse their mouths with tap water. Saliva production should not be stimulated and the patient must be told the difference between saliva and mucus. A sufficient volume of 1 mL of saliva can be collected in a few minutes, even from children.

The samples are stored frozen at  $-20^{\circ}\text{C}$ . Before the assay, they must be defrosted and centrifuged; the clear supernate is then pumped out for the assay.

### 10.2 Salivary Procedure

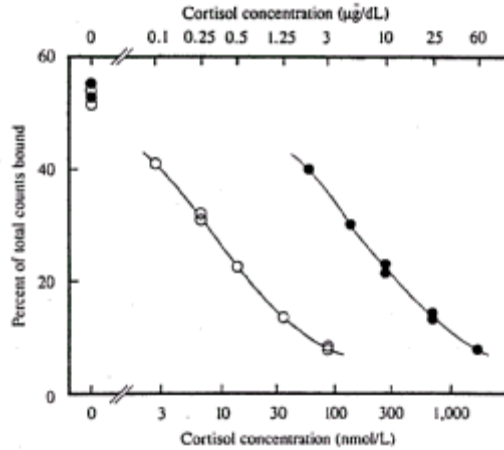
For each **saliva sample**, pipette 10  $\mu$ L of 0 calibrator in pairs into the labeled tubes; add 200  $\mu$ L of the sample and 1 mL of tracer.

For the **standard range**, pipette 10  $\mu$ L of 0 calibrator or the standard in pairs into the labeled tubes; add 200  $\mu$ L of PBS buffer, plus 1 mL of tracer

Gently swirl each tube. Incubate for 45 min in a water bath at  $37^{\circ}\text{C}$ . Pump out or decant the content of the tubes and measure the radioactivity bound to the tube sides for 1 minute.



Standard curve



The actual standard range for salivary cortisol is 0.10 – 0.25 – 0.50 – 1.25 and 3.0 μg/dL. The standard curves for the two assay techniques (serum and salivary) covered by this kit are illustrated in the chart to the left.

Although the incubation volume is somewhat higher in the salivary assay than the serum assay (1,210 μL instead of 1,010 μL), this has no effect on the taggant's binding ability within the standard curve's range.

Figure 3  
Standard curves for assay of cortisol in serum or plasma (●) and in saliva (○) with the GammaCoat™ [<sup>125</sup>I] RIA kit.

Note: This curve was obtained during a study conducted in 1984 with a standard range of 0, 2.0, 5.0, 10, 25 and 60 μg/dL. The standard range has since been modified. Please refer to the new range for salivary cortisol calculations, taking into account a ratio of 1:20.

Normal values

Table 1

Normal morning cortisol levels in saliva and serum (μg/dl)						
Group of subjects*	Saliva			Serum		
	n	Median	Range	n	Median	Range
Normal adults	150	0.43	0.18 – 1.01	103	6.5	4.5 – 21.1
Children (4 – 11 years old)	105	0.40	0.14 – 0.91	---	---	---
Pregnant women (3 <sup>rd</sup> trimester)	84	0.47	0.33 – 0.91	84	15.7	12.9 – 39.9

\* Living in the UK

11. QUALITY CONTROL

Each laboratory should utilize controls at several levels to monitor assay performance. The controls should be treated as unknowns. Quality control charts should be maintained to follow the performance of the controls. Appropriate statistical methods should be used to evaluate trends. Acceptable performance limits should be ascertained for the individual laboratory.

## 12. CALCULATION OF RESULTS

Unknown serum, plasma and urine samples may be assayed simultaneously and are all interpolated from a calibrator curve generated with Cortisol Serum Calibrators. Both unextracted urinary cortisol samples (UC) and extracted urinary free cortisol samples (UFC) are then converted to "µg/24 hours" with the appropriate formula.

- 12.1 Record the counts per minute (CPM) bound for each tube.
- 12.2 Plot CPM bound for cortisol calibrators (vertical axis) versus cortisol concentration (horizontal axis) on semi-logarithmic graph paper.
- 12.3 Draw the best fitting curve. For typical data and graph, refer to TABLE II and FIGURE 1.
- 12.4 Locate CPM bound for each tube corresponding to each sample (controls, serum, plasma, unextracted and extracted urine) on the vertical axis and follow a horizontal line intersecting the calibrator curve. At the point of intersection, read cortisol concentration (µg/dL) on the horizontal axis.

### 12.5 Unextracted Urinary Cortisol

To convert the urinary cortisol (UC) of unextracted urine samples from µg/dL to µg cortisol per 24 hours, use the following equation:

$$UC = \frac{S \times V}{100}$$

where:

- S = unextracted urine sample concentration in µg/dL  
V = total urine volume in mL/24 hours  
100 = conversion factor

### 12.6 Extracted Urinary Free Cortisol

To convert the urinary free cortisol (UFC) of extracted urine samples from µg/dL to µg cortisol per 24 hours, use the following equation:

$$UFC = \frac{S \times V}{33.3 (E - S)}$$

where:

- S = extracted urine sample concentration in µg/dL  
E = efficiency tube concentration for corresponding sample in µg/dL  
V = total urine volume in mL/24 hours

33.3 = combined dilution and extraction efficiency factor

Example:

- E = 13.50 µg/dL  
S = 7.85 µg/dL  
V = 1150 mL/24 hours

$$UFC = \frac{(7.85) (1150)}{33.3 (13.50 - 7.85)} = 48 \text{ } \mu\text{g cortisol/24 hours}$$

For labs wishing to monitor the efficiency of the urine extraction procedure (EE), the following formula can be used to calculate the efficiency as a percentage.

$$EE = \frac{E-S}{6.0} \times 100$$

where:

- S = Extracted urine sample concentration in µg/dL
- E = Efficiency tube concentration for corresponding sample in µg/dL
- 6.0 = Expected difference between the "E" and "S" tube concentrations in µg/dL
- 100 = Conversion factor

### 12.7 S.I. Units

Using a molecular weight of 362.5 daltons, serum calibrators, controls, and patient values (serum and plasma) can be converted from micrograms per deciliter (µg/dL) to nanomoles per liter (nmol/L) of S.I. units by multiplying by 27.59 (Refer to TABLE II for values of cortisol calibrators listed in both units). Similarly, both unextracted and extracted urine controls and patient values can be converted from micrograms per 24 hours (µg/24 hr) to nanomoles per 24 hours (nmol/24 hr) of S.I. units by multiplying by 2.76.

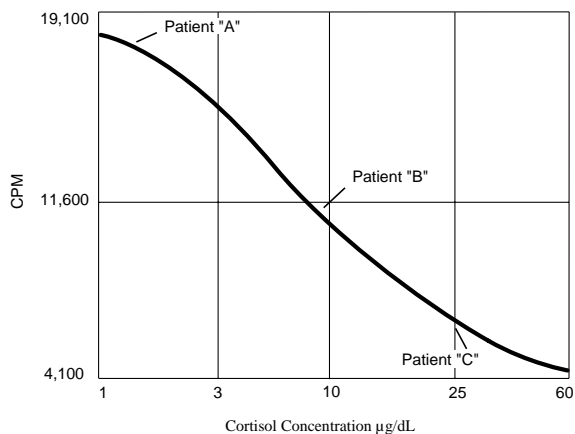
**TABLE II**  
Concentration of Calibrators

Cat. No.	Calibrator Level	S.I. Units
CA-2367	0 µg/dL	0 nmol/L
CA-2358	1 µg/dL	28 nmol/L
CA-2359	3 µg/dL	83 nmol/L
CA-2370	10 µg/dL	276 nmol/L
CA-2371	25 µg/dL	690 nmol/L
CA-2372	60 µg/dL	1655 nmol/L

**TABLE III**  
Recording the Data  
Do not use to calculate unknowns

Tube No.	Contents of Tubes	CPM Bound	Cortisol Concentration (µg/dL)
T <sub>1</sub>	Total Counts (Tracer-Buffer)	44516	
T <sub>2</sub>	Total Counts (Tracer-Buffer)	43651	
1	Cortisol Serum Blank, B <sub>0</sub>	22311	0
2	Cortisol Serum Blank, B <sub>0</sub>	22771	0
3	Cortisol Serum Calibrator	19216	1
4	Cortisol Serum Calibrator	19243	1
5	Cortisol Serum Calibrator	15331	3
6	Cortisol Serum Calibrator	15731	3
7	Cortisol Serum Calibrator	10660	10
8	Cortisol Serum Calibrator	10294	10
9	Cortisol Serum Calibrator	6862	25
10	Cortisol Serum Calibrator	6657	25
11	Cortisol Serum Calibrator	4186	60
12	Cortisol Serum Calibrator	4224	60
13	Patient "A" Sample	18470	1.3
14	Patient "A" Sample	18992	1.1
			Av: 1.2
15	Patient "B" Sample	10377	10.1
16	Patient "B" Sample	10608	9.6
			Av: 9.9
17	Patient "C" Sample	6316	28.8
18	Patient "C" Sample	6318	28.8
			Av: 28.8

**Typical Results**  
Do not use to calculate unknowns



**FIGURE 1**

### 13. LIMITATIONS OF THE PROCEDURE

#### 13.1 Procedural

The tracer-buffer reagent must be protected from light. The coated tubes are ready to use as received and should be stored at 2-27°C. The plastic wrapper should be closed securely when storing unused tubes to prevent condensation.

Incubation conditions should be checked routinely. The water bath temperature must be constant at 37 ± 2°C and the water level kept above that of the solution in the tubes without allowing tubes to float.

The user should note that erroneous results may be caused by improper storage and hand-ling of samples. Hemolyzed, lipemic and icteric samples should be avoided.

Failure to obtain the appropriate cortisol values for controls may indicate imprecise manipulations, improper handling, or deterioration of reagents. Controls should be included in every run. A calibrator curve must be established for every run.

The GammaCoat Cortisol Kit should not be used to qualify cortisol levels in samples from patients treated with prednisolone. See Interpretive Limitations.

#### 13.2 Interpretive

Normal cortisol levels are generally highest from 5 AM to 10 AM and lowest from 8 PM to 4 AM.<sup>5</sup> PM levels are usually 1/2 to 1/3 of AM levels. A mid-day surge of cortisol levels in women, coincident with food intake and markedly attenuated by food deprivation, has been described.<sup>17</sup> Diurnal variation, stimulation and suppression tests, and various types of stressful situations normally alter cortisol levels. For example, ACTH stimulation usually yields values two to three times the reference AM level.<sup>18</sup> Metyrapone and dexamethasone suppression normally yield AM samples with values less than 5 µg/dL.<sup>19</sup> Estrogens, as in oral contraceptives, may cause elevated cortisol levels as a result of altered concentrations of plasma and serum proteins. Thus, each patient's cortisol values are usually evaluated in reference to his/her AM cortisol level.

Cortisol assays of samples from patients under prednisolone treatment are contraindicated because of high cross-reactivity of this kit's cortisol antibody with prednisolone and 6-methylprednisolone. The high cross-reactivity may yield high apparent cortisol levels.

Cortisol determinations generated by the direct urinary protocol will result in clinically valid values when compare with the reported unextracted urinary cortisol normal range. Since it is well known that unidentified substances present in urine can interfere with free cortisolimmunoassays, the values obtained using direct urinary protocols will be higher than those obtained from urine samples that have been purified by techniques such as high pressure liquid chromatography.<sup>19,20</sup>

### 14. EXPECTED VALUES

#### 14.1 Plasma or Serum Levels

Mornings:

7-25 µg/dL or 70-250 ng/mL

[193-690 nmol/L]

Evenings:

2-9 µg/dL or 20-90 ng/mL

[55-248 nmol/L]

These ranges may be used as guides until each laboratory has established its own normal ranges.

#### 14.2 Unextracted Urinary Cortisol

The normal range for urinary cortisol (UC) of unextracted urine samples is 75-270 µg per 24 hours [207-745 nmol/24 hr]. Improper urine specimen collections may result in incorrect patient evaluation. It has been recommended that creatinine be determined to identify grossly inadequate urine collections.<sup>21</sup>

### 14.3 Extracted Urinary Free Cortisol

The normal range of urinary free cortisol is 20-90 µg cortisol per 24 hours [55-248 nmol/24 hr]. Improper urine specimen collection may result in incorrect patient evaluation. It has been recommended that creatinine be determined to identify grossly inadequate urine collections.<sup>21</sup>

## 15. SPECIFIC PERFORMANCE CHARACTERISTICS

### 15.1 Precision

The intra-run precision was determined from the mean of 20 simultaneous assays per serum sample. The inter-run precision was determined from the mean of the average of duplicates for 20 separate runs.

Intra-Run Precision Sample	Number of Assays	Mean (µg/dL)	Standard Deviation (µg/dL)	Coefficient of Variation (%)
Serum Pool A	20	2.9	0.19	6.6
Serum Pool B	20	12.1	0.93	7.7
Serum Pool C	20	47.1	3.18	6.8

Inter-Run Precision Sample	Number of Separate Runs	Mean (µg/dL)	Standard Deviation (µg/dL)	Coefficient of Variation (%)
Serum Pool D	20	3.7	0.33	9.0
Serum Pool E	20	12.1	1.19	9.8
Serum Pool F	20	36.9	3.24	8.8

**15.2 Trueness:** The Trueness of this assay has been checked by the recovery test.

### Recovery from Pooled Sera

Spiked samples were prepared by diluting a known high cortisol sample with a previously analyzed serum pool. Each spiked sample was assayed in quadruplicate. Percent recovery is calculated as (recovered/expected) x 100.

Contribution from Spike (µg/dL)	Contribution from Pool (µg/dL)	Expected Value (µg/dL)	Recovered Value (µg/dL)	Percent (%) Recovery
4.2	1.6	5.8	5.5	95
11.2	1.6	12.7	12.8	101
17.2	1.6	18.8	18.4	98
26.3	1.6	27.9	25.4	91
41.2	1.6	42.8	39.2	92

### 15.3 Analytical Sensitivity

The sensitivity of the calibrator curve is defined as the smallest single value which can be distinguished from zero. A statistical estimation of the minimal detectable concentration (sensitivity) was calculated according to the method of D. Rodbard<sup>22</sup> for 30 replicates at the zero point of the calibrator curve. The calculated sensitivity is 0.21 µg/dL.

### 15.4 Avidity

The calculated affinity constant of the cortisol antiserum is approximately  $2 \times 10^8$  liters/mole.

### 15.5 Analytical Specificity

Data on the cross-reactivity of the antiserum used in this kit are expressed as the ratio of cortisol concentration to the cross-reacting substance concentration at 50% inhibition of maximum binding.

Compound	% Cross-reactivity
Cortisol	100
Prednisolone	25.5
6-Methylprednisolone	14.5
11-Deoxycortisol	9.8
17-Hydroxyprogesterone	0.4
Corticosterone	0.9
Dexamethasone	0.049
Prednisone	3.8
Deoxycorticosterone	0.14
Tetrahydrocortisone	0.2
Aldosterone	<0.1
$\beta$ -Cortol	<0.1
$\beta$ -Cortolone	<0.1
Cortisone	10.3
Dihydrocortisone	0.43
Progesterone	0.015
Spirolactone	<0.1
Tetrahydrocortisol	0.3
6- $\beta$ -Hydrocortisone	4.2

**SEE LAST PAGE FOR REFERENCES**

## **TROUSSE DE DOSAGE RADIO-IMMUNOLOGIQUE GAMMACOAT™ CORTISOL**

### **1. INDICATION**

POUR USAGE DIAGNOSTIQUE IN VITRO.

La trousse de dosage radio-immunologique GammaCoat™ [<sup>125</sup>I] Cortisol permet d'effectuer la détermination quantitative du taux de cortisol (hydrocortisone, Composé F) présent dans le sérum, le plasma et l'urine.

### **2. RÉSUMÉ ET COMMENTAIRE**

Cortisol (hydrocortisone, Composé F) est le glucocorticoïde le plus important sécrété par le cortex surrénal. Ses effets physiologiques comprennent l'activité anti-inflammatoire, le maintien de la pression sanguine et la synthèse des protéines en carbohydrates.

Les glucocorticoïdes sont synthétisés par l'hormone corticotrope (ACTH) sécrétée par le lobe antérieur de l'hypophyse. Chez un individu normal, le cortisol participe à une boucle de suivi négative avec la ACTH dans l'axe hypothalamus-hypophyse-cortex surrénal (axe HPA). La ACTH sécrétée par l'hypophyse est à son tour régulée par la substance libératrice de l'hormone corticotrope (CRF) sécrétée par l'hypothalamus. La substance libératrice de l'hormone corticotrope (CRF) détermine le taux de cortisol et le stress. Le stress physique et psychologique, la variation au cours de la journée et une faible quantité de sucre dans le sang affectent le taux de sécrétion de cortisol.<sup>1-6</sup>

Les troubles de la fonction de l'un des organes de l'axe HPA engendreront une altération du taux de cortisol.<sup>7,8</sup> L'évaluation de la fonction de la glande surrénale, effectuée en mesurant le taux de cortisol dans le plasma ou le sérum, est utile dans le diagnostic d'un état normal ou anormal. La comparaison des mesures effectuées le matin et le soir, ainsi que les tests de stimulation et de suppression, peuvent apporter des résultats concrets pour le diagnostic de troubles spécifiques liés à la surrénale. Le diagnostic de la maladie d'Addison (insuffisance surrénale chronique) et du syndrome de Cushing (hypersécrétion du cortex surrénal) sont deux exemples pour lesquels l'évaluation spécifique du taux de cortisol en circulation est utile pour l'examen du patient.<sup>9,10</sup>

### **3. DESCRIPTION DE LA METHODE DE DOSAGE**

La méthode de la trousse de dosage radio-immunologique GammaCoat [<sup>125</sup>I] Cortisol est basée sur les principes de liaison compétitive du dosage radio-immunologique.<sup>11</sup> Les étalons et échantillons à déterminer (sérum, plasma ou urine) sont mis en incubation avec le traceur cortisol dans des tubes enduits d'anticorps, où l'anticorps est immobilisé sur la paroi interne inférieure du tube de GammaCoat. Après l'incubation, le contenu de l'éprouvette est aspiré ou décanté et l'éprouvette est comptée. Une courbe d'étalonnage est préparée avec 5 étalons de sérum dans un intervalle de 1 à 60 µg/dL. Les valeurs à déterminer sont interpolées à l'aide de la courbe d'étalonnage. La totalité du dosage est effectuée dans le tube enduit. Pour les échantillons de sérum, d'urine et de plasma, aucune dilution séparée des échantillons, dénaturation des protéines ou étape d'extraction n'est nécessaire.

Outre les dosages de cortisol effectués dans l'urine non extraite, la procédure de la trousse de dosage radio-immunologique GammaCoat [<sup>125</sup>I] Cortisol peut être utilisée pour mesurer le cortisol libre (non conjugué) dans l'urine. Le cortisol présent dans l'urine doit avant tout être extrait dans du chlorure de méthylène. Une part de l'extrait est évaporé directement dans le tube enduit d'anticorps GammaCoat. (Des expériences ont montré qu'aucun effet délétère n'est provoqué dans le tube enduit d'anticorps si du chlorure de méthylène de bonne qualité est utilisé.) Pour vérifier que les échantillons contiennent un taux correct de protéines, 10 microlitres de Sérum témoin cortisol (CA-2367) sont ajoutés à chaque éprouvette GammaCoat. La suite de la procédure de dosage est la même que celle qui est utilisée pour le dosage de cortisol dans le sérum, le plasma et l'urine non extraite. L'efficacité de l'extraction du cortisol de l'urine à l'aide du chlorure de méthylène doit être surveillée.



#### 4. RÉACTIFS FOURNIS DANS LA TROUSSE

Étalons Cortisol (A-F)	6 tubes /1 mL	6 tubes/1 mL
Tubes enduits de Cortisol	2 poches / 50 chacun	10 poches / 50 chacun
Traceur Cortisol	1 tube / 10 mL	5 tubes / 10 mL chacun
Tampon PBS	1 tube/ 100 mL	5 tubes / 100 mL chacun
Nombre de dosages	100	500

CONSERVATION : tous les réactifs, y compris le réactif du tampon de traceur, sont stables jusqu'à la date de péremption indiquée sur l'étiquette de la trousse, s'ils sont conservés entre 2 et 8°C. Les tubes enduits d'anti-cortisol peuvent être conservés à une température comprise entre 2 et 27°C. Ne pas utiliser les réactifs au-delà de la date de péremption de la trousse. Les réactifs de lots différents ne doivent pas être mélangés.

##### 4.1 Traceur Cortisol : réactif prêt à l'emploi

Chaque tube contient environ 4 µCi de traceur (<1 µg/mL Cortisol) dans 10 mL de solution saline de tampon phosphaté, ANS (8-Aniline-1-naphtalène acide sulfonique) avec 0,1% de nitrate de sodium comme conservateur.

##### 4.2 Tubes enduits de sérum anti-Cortisol de lapin : réactif prêt à l'emploi

Les tubes de 12 x 75 mm sont enduits de sérum anti-cortisol de lapin (titre <1 µg/épiprouvette) et emballés dans une poche plastique.

##### 4.3 Tampon PBS : réactif prêt à l'emploi

Chaque flacon contient 100 mL de solution saline de tampon phosphaté avec 0,1% de nitrate de sodium comme conservateur.

##### 4.4 Étalons Cortisol Sérum : réactif prêt à l'emploi

Chaque tube contient du cortisol dans 1 ml de sérum humain traité contenant 0,1% de nitrate de sodium comme conservateur. Les étalons sont fournis dans les concentrations suivantes : respectivement 0, 1, 3, 10, 25 et 60 µg/dL. Les étalons Cortisol DiaSorin ont été calibrés selon le standard de référence de cortisol U.S.P. Toute comparaison avec d'autres produits ou procédures de dosage doit être effectuée selon ce standard de référence. Les étalons de la trousse démontrent leur commutabilité avec les échantillons des patients lorsqu'ils sont utilisés avec des réactifs et selon le mode d'emploi de ce dosage diagnostique in vitro, comme recommandé.

##### 4.5 Marquage supplémentaire

Pour le réactif du tampon de traceur

##### 4.6 DISPONIBLE SUR DEMANDE :

Papier quadrillé semi-logarithmique

50 feuilles par paquet

#### 5. AVERTISSEMENTS ET PRECAUTIONS

POUR USAGE DIAGNOSTIQUE IN VITRO.

Non prévu pour une utilisation interne ou externe sur l'homme ou l'animal.

##### Réactifs contenant des produits d'origine humaine

##### Traiter comme potentiellement infectieux.

Chaque don de sérum/plasma utilisé dans la préparation du présent produit a été testé selon une méthode approuvée par la FDA. Il s'est avéré non réactif à la présence de HBsAg, d'anticorps VHC et d'anticorps VIH 1/2. Même si ces méthodes sont extrêmement précises, elles ne garantissent pas la détection de tous les dons infectés. Ce produit peut également contenir d'autres produits d'origine humaine pour lesquelles il n'existe aucun test agréé. Comme aucune méthode de test connue ne peut offrir l'assurance complète de l'absence du virus de l'hépatite B (VHB), du virus de l'hépatite C (VHC), du virus de l'immunodéficience humaine (VIH) ou d'autres agents infectieux, tous les produits d'origine humaine doivent être manipulés conformément aux bonnes pratiques de laboratoire en prenant les précautions appropriées décrites dans le document des Centers for Disease Control and Prevention/National Institutes of Health Manual, "Biosafety in Microbiological and Biomedical Laboratories," 4<sup>ème</sup> éd., Mai 1999 ou dernière édition.

#### **REACTIFS CONTENANT DU NITRURE DE SODIUM**

**ATTENTION** : Certains réactifs de cette trousse contiennent du nitrure de sodium. Le nitrure de sodium peut réagir avec la plomberie en plomb ou en cuivre et former des azotures ultra-explosifs. Pour leur mise au rebut, rincer à grande eau pour empêcher l'accumulation d'azide. Pour plus d'informations, consultez le guide "Decontamination No. Pour plus d'informations, consultez "Decontamination of Laboratory Sink Drains to Remove Azide Salts," dans le manuel the Manual Guide-Safety Management No

#### **Déclaration des risques relatifs aux substances dangereuses des communautés européennes (Directive du conseil 1999/45/EC)**

R 20/21/22 - Nocif en cas d'inhalation, d'ingestion et de contact avec la peau.

R 32 - Un contact avec les acides dégage des gaz très toxiques.

S28 - Après un contact avec la peau, laver immédiatement à grande eau.

#### **REACTIFS CONTENANT DE L'IODE 125**

Les précautions appropriées et les bonnes pratiques de laboratoire doivent être utilisées pour la conservation, la manipulation et la mise au rebut de ce produit.

Pour les praticiens ou les établissements recevant des radio-isotopes dans le cadre d'une licence générale :

Ce produit radioactif peut être reçu, réceptionné, détenu et utilisé uniquement par des médecins, des laboratoires cliniques, des hôpitaux, des vétérinaires et des centres de recherche dans le cadre de la pratique de médecine vétérinaire, de laboratoires cliniques ou des hôpitaux, et uniquement pour des analyses cliniques ou de laboratoire in vitro n'impliquant pas l'administration interne ou externe du produit, ni par rayonnement, à l'homme ou à l'animal. Sa réception, son acquisition, sa détention, son utilisation et son transfert sont sujets aux réglementations et à la licence générale de l'U.S. Nuclear Regulatory Commission de l'État avec lequel la Commission a conclu un accord pour l'exercice de l'autorité réglementaire.

1. Le produit radioactif doit être conservé dans son récipient d'origine à un endroit désigné.
2. L'accès aux produits radioactifs doit être limité au personnel autorisé uniquement.
3. Ne pas pipeter des solutions radioactives avec la bouche.
4. Ne pas manger, ni boire dans les zones de travail radioactives.
5. En cas de déversement de produits radioactifs dans une zone, nettoyer la zone, puis la laver à l'aide d'une produit détergent à base d'alcali ou d'une solution de décontamination radioactive. Tout article de verre utilisé doit être entièrement lavé à l'eau avant de laver les autres articles de verre du laboratoire.

Pour les praticiens ou les établissements recevant des radio-isotopes dans le cadre d'une licence spécifique :

La réception, l'utilisation, le transfert et la mise au rebut de produits radioactifs sont sujets aux réglementations et conditions de votre licence spécifique.

**AVERTISSEMENT** : Ce produit contient un produit chimique connu dans l'Etat de Californie comme étant cancérigène.

**ATTENTION** : La radioactivité imprimée sur la notice d'utilisation peut être légèrement différente de celle qui est imprimée sur l'étiquette de la boîte et sur l'étiquette du flacon du traceur. Les étiquettes de la boîte et du flacon du traceur indiquent la dose réelle de radioactivité à la date de calibrage, alors que la notice d'utilisation indique la radioactivité théorique de la trousse.

## **6. PRELEVEMENT ET PREPARATION DES ECHANTILLONS**

### **Echantillons de plasma**

Prélevez un échantillon de sang veineux dans un environnement aseptique et placez-le dans un tube de verre à vide contenant de l'héparine ou de l'EDTA.

Fractionnez le plasma. Le plasma peut être conservé une nuit dans un endroit réfrigéré entre 2 et 8°C. Pour une conservation plus longue, les échantillons doivent être congelés à -20°C. Les échantillons hémolysés, lipémiques ou ictériques doivent être évités.

### **Echantillons de sérum**

Bien que les dosages de cortisol soient habituellement effectués dans des échantillons de plasma, des résultats comparables peuvent être obtenus à partir d'échantillons de sérum.<sup>12</sup>

Fractionnez le sérum. Le sérum peut être conservé pendant une nuit dans un endroit réfrigéré entre 2 et 8°C. Pour une conservation plus longue, les échantillons doivent être congelés à -20°C. Les échantillons hémolysés, lipémiques ou ictériques doivent être évités.

### **Echantillons d'urine**

Prélevez un échantillon d'urine de 24 heures. Enregistrez le volume total d'urine. Ajoutez 10 grammes d'acide borique par litre d'urine comme conservateur, puis conservez une fraction bien mélangée en la congelant à -20°C. Décongelez les échantillons à température ambiante et mélangez bien avant l'emploi.

## **7. MATÉRIEL ET PRODUITS REQUIS MAIS NON FOURNIS**

- 7.1 Bain d'eau à température constante à  $37 \pm 2^\circ\text{C}$ .
- 7.2 Pipette de précision (10  $\mu\text{L}$ ).
- 7.3 Pipette semi-automatique (1,0 mL).
- 7.4 Compteur gamma.
- 7.5 Portoir.
- 7.6 Aspirateur d'eau (optionnel).
- 7.7 Agitateur-mélangeur Vortex.
- 7.8 Papier absorbant recouvert d'une pellicule plastique (optionnel).

Fourniture supplémentaire uniquement pour la procédure d'extraction d'urine :

1. Tubes en verre jetable (12 x 75 mm) et bouchons.
2. Chlorure de méthylène (dichlorométhane ; degré analytique de réactif ACS).
3. Bain de glace.
4. Pipettes de précision (100 & 200  $\mu\text{L}$ ).
5. Endroit protégé ou bien ventilé.
6. Moyens d'évaporation du chlorure de méthylène. Cette opération peut être effectuée avec un courant d'air sec ou d'azote en chauffant légèrement l'échantillon à  $37^\circ\text{C}$  environ, dans un endroit protégé ou bien ventilé.

## **8. PROCEDURE DE PRELEVEMENT DE L'URINE**

Cette procédure comprend la méthode de détermination de l'efficacité de l'extraction à l'aide du chlorure de méthylène. La récupération du cortisol dans les échantillons d'urine est en général de  $99 \pm 14\%$  dans les laboratoires DiaSorin.

- 8.1 Placez une quantité adéquate de chlorure de méthylène dans un bain de glace pour le refroidir. Disposez plus de 1 mL par tube. Le bain de glace doit être suffisamment grand, de manière à pouvoir y placer un vase à bec de chlorure de méthylène et le portoir.
- 8.2 Pour déterminer l'efficacité de l'échantillon, marquez l'identification du patient sur deux tubes de verre jetables pour chaque échantillon à doser. Marquez une éprouvette "S" pour l'échantillon et l'autre avec "E" pour l'efficacité d'extraction.
- 8.3 Ajoutez 200 microlitres d'un échantillon d'urine de 24 heures bien mélangé dans les éprouvettes "S" et "E".

- 8.4 Dans chaque éprouvette "E", ajoutez 10 µL de l'étalon de sérum Cortisol 60 µg/dL. Mélangez les réactifs en agitant tout le portoir ou en mélangeant chaque éprouvette individuellement.
- 8.5 Ajoutez 1,0 mL de chlorure de méthylène refroidi à chaque éprouvette "S" et "E". Agitez bien l'échantillon sur un Vortex de manière à extraire le cortisol de la couche organique. Placez le bouchon ou couvrez les éprouvettes et disposez-les dans un bain de glace pour éviter l'évaporation excessive du chlorure de méthylène. Pour faciliter le pipetage du chlorure de méthylène, il est important de rincer la pipette 3 ou 4 fois à l'aide de chlorure de méthylène FROID avant de le verser dans les éprouvettes appropriées.
- 8.6 En attendant la phase de séparation, marquez deux éprouvettes GammaCoat Cortisol pour chaque éprouvette "S" et deux éprouvettes GammaCoat Cortisol pour chaque éprouvette "E".
- 8.7 Après la séparation, retirez soigneusement 100 µL de la couche inférieure (chlorure de méthylène) de chaque éprouvette et ajoutez-les aux éprouvettes GammaCoat marquées de manière appropriée. Rincez la pointe de la pipette à l'aide de chlorure de méthylène froid avant de pipeter l'échantillon : vous éviterez ainsi des fuites d'échantillon prélevé par la pointe de la pipette. Lorsque vous transférez la fraction de 100 µL de la solution d'extraction dans l'éprouvette enduite, n'essuyez pas la pointe de la pipette, car les propriétés physiques du chlorure de méthylène provoquent des fuites et des bulles d'air dans la pointe de la pipette.  
Pour faciliter le transfert de la solution d'extraction dans l'éprouvette enduite, tenez l'éprouvette d'extraction et l'éprouvette contenant le GammaCoat dans la même main. Transférez rapidement mais soigneusement l'extrait de 100 µL dans le fond de l'éprouvette GammaCoat.
- 8.8 Laissez s'évaporer le chlorure de méthylène des éprouvettes de GammaCoat à l'aide d'un courant d'air sec ou d'azote et chauffez légèrement l'échantillon à 37°C environ.  
**ATTENTION** : évitez les concentrations excessives de vapeurs d'hydrocarbure halogène dans les environnements de travail. L'EVAPORATION DOIT ETRE EFFECTUEE UNIQUEMENT DANS UN ENVIRONNEMENT PROTEGE OU BIEN VENTILE.
- 8.9 Lorsque le chlorure de méthylène est entièrement évaporé, ajoutez 10 µL de Sérum témoin cortisol CA-2367 0 µg/dL dans chaque éprouvette d'échantillon du patient (éprouvettes "S" et "E"), pour vous assurer que les échantillons contiennent une quantité appropriée de protéines.
- 8.10 Poursuivez la procédure de dosage radio-immunologique en commençant par la première étape de la procédure de dosage.

## 9. PROCÉDURE DE DOSAGE

### Réactif du tampon de traceur :

Ajoutez tout le contenu d'un tube de traceur cortisol à un flacon de tampon PBS et mélangez délicatement. Pour améliorer le transfert du traceur, rincez une dernière fois le flacon de traceur cortisol avec le réactif du tampon de traceur. Remplissez et collez l'étiquette du réactif du tampon de traceur au récipient, de manière à bien pouvoir l'identifier. Le réactif du tampon de traceur doit être conservé dans l'obscurité ou dans un récipient emballé dans du papier aluminium à 2-8°C.

La procédure de dosage comprend la préparation de la courbe d'étalonnage à partir de laquelle le contenu du cortisol à déterminer dans l'échantillon est interpolée.

- 9.1 Laissez tous les réactifs atteindre la température ambiante et mélangez bien avant l'emploi, en évitant la formation de mousse.

- 9.2** Marquez les éprouvettes GammaCoat en double selon le schéma suivant. L'activité totale [T1,T2] et les éprouvettes B0 [1,2] pourraient être nécessaires pour une certaine réduction des données et pour des programmes de contrôle de qualité. Cette opération peuvent toutefois être évitée si la courbe d'étalonnage est tracée sur du papier quadrillé semi-logarithmique.<sup>13-15</sup>
- 9.3** Au fond des éprouvettes GammaCoat appropriées, ajoutez :
- 10 µL de Sérum témoin cortisol, ou chaque étalon de sérum Cortisol.
  - POUR LES ECHANTILLONS DE SERUM, PLASMA ET D'URINE NON EXTRAITE, ajoutez 10 µL de chaque échantillon. Veillez à pipeter les étalons et échantillons de la même manière.<sup>16</sup>
  - POUR LES ECHANTILLONS D'URINE EXTRAITE, utilisez les éprouvettes GammaCoat contenant les échantillons extraits de la neuvième étape de la procédure d'extraction de l'urine.  
REMARQUE : pour la dilution des échantillons et sérum ou de plasma des patients, il est préférable d'utiliser le Sérum témoin cortisol fourni dans cette trousse comme diluent. Avec les échantillons d'urine extraite ou non extraite, effectuez la dilution comme indiqué avec de l'eau distillée. Pour le cortisol libre dans l'urine, extrayez 200 µL de l'échantillon d'urine dilué (Procédure d'extraction d'urine, 3ème étape). Poursuivez le dosage habituel. Le facteur de dilution doit être compris dans les calculs.
- 9.4** Ajoutez 1,0 mL de réactif du tampon de traceur dans chaque éprouvette. Mélangez lentement chaque éprouvette sur un agitateur Vortex réglé à une vitesse réduite.
- 9.5** Mettez les éprouvettes en incubation pendant 45 minutes dans un bain d'eau à  $37 \pm 2^\circ\text{C}$ .
- 9.6** Aspirez ou décantez toutes les éprouvettes, à l'exception de l'activité totale.  
UNE MAUVAISE ELIMINATION DE LA SOLUTION ADHERANT AUX PAROIS POURRAIT PROVOQUER UNE MAUVAISE REPRODUCTION OU DES VALEURS ERRONEES.  
Si vous utilisez la technique par aspiration, assurez-vous que l'extrémité de plastique de l'aspirateur entre en contact avec le fond de l'éprouvette enduite et que tout le liquide est bien éliminé.  
Si vous utilisez la technique par décantation, laissez les éprouvettes à l'envers pendant 3 à 5 minutes afin qu'elles se vident bien. Tapez les tubes sur du papier absorbant pour éliminer le liquide qui y adhère avant de replacer les tubes à l'endroit.
- 9.7** Comptez toutes les éprouvettes dans un compteur gamma pendant 1 minute, la fenêtre correctement réglée pour l'iode-125.
- 9.8** Calculez les résultats. Consultez les résultats.

## 10. PROCEDURE POUR LA SALIVE

Cette trousse permet également de doser des échantillons de salive.

Il a été démontré qu'il existe une bonne corrélation entre la concentration de cortisol présent dans la salive et la concentration de cortisol libre dans le plasma et le sérum (ces concentrations représentent entre 60% et 100% de la concentration de la fraction libre en circulation et entre 4% et 6% de la concentration totale dans le sérum ou le plasma).

De nombreuses études ont démontré les avantages pratiques et diagnostiques du dosage du cortisol dans la salive. Elles ont confirmé son intérêt et son évaluation clinique.

Deux points importants ont été pris en compte dans l'adaptation de cette technique au dosage de cortisol dans la salive :

Tout d'abord, le cortisol présent dans la salive ne représentant que 5% du cortisol total dans le plasma, une augmentation par 20 est nécessaire dans la sensibilité. Pour atteindre ce niveau de sensibilité, l'échantillon de salive a été porté à un volume de 200 µL.

De plus, la salive contient une concentration inférieure de protéines (consistant en général en enzymes et glycoprotéines). Seules des traces de protéines du plasma sont présentes, et les protéines qui se lient aux corticostéroïdes sont absentes. Pour garantir que les effets de la matrice de protéines sont semblables dans les échantillons et dans les étalons, du calibrateur 0 (sans cortisol) est ajouté dans chaque échantillon de salive (comme pour les dosages d'échantillons d'urine extraite).

Ainsi, seules des modifications minimales sont requises dans le pipetage des échantillons et étalons afin d'adapter cette méthode au dosage des échantillons de salive en n'utilisant que les réactifs fournis dans la trousse.

### 10.1 Prélèvement et préparation des échantillons de salive

La salive doit être prélevée 10 minutes après que les patients se sont rincé la bouche avec de l'eau du robinet. La production de salive ne doit pas être stimulée. Le patient doit être informé de la différence entre la salive et le mucus. 1 mL de salive est suffisant et peut être prélevé en quelques minutes, même chez les enfants.

Les échantillons sont conservés congelés à  $-20^{\circ}\text{C}$ . Avant le dosage, décongelez et centrifugez les prélèvements. Pompez ensuite le surnageant clair pour le dosage.

### 10.2 Procédure pour la salive

Pour chaque échantillon de salive, pipetez 10  $\mu\text{L}$  de calibrateur 0 en double dans des tubes marqués. Ajoutez 200  $\mu\text{L}$  d'échantillon et 1 mL de traceur.

Pour l'intervalle standard, pipetez 10  $\mu\text{L}$  de calibrateur 0 ou d'étalon en double dans les tubes marqués. Ajoutez 200  $\mu\text{L}$  de tampon PBS et 1 mL de traceur

Agitez légèrement chaque éprouvette. Faites incubé pendant 45 min dans un bain d'eau à  $37^{\circ}\text{C}$ . Pompez ou décantez le contenu des éprouvettes et mesurez la radioactivité liée aux parois de l'éprouvette pendant 1 minute.

Courbe standard

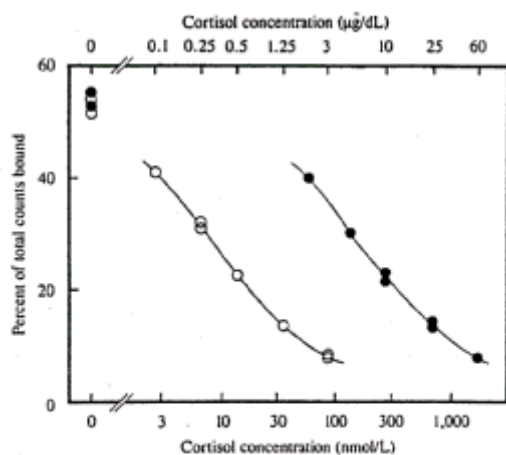


Figure 3

Standard curves for assay of cortisol in serum or plasma (●) and in saliva (○) with the GammaCoat™ [ $^{125}\text{I}$ ] RIA kit.

La valeur normale de cortisol dans la salive est de 0,10 – 0,25 – 0,50 – 1,25 et 3,0  $\mu\text{g/dL}$ . Les courbes standard pour les deux techniques de dosage (sérum et salive) comprises dans cette trousse sont illustrées dans le graphique à gauche.

Bien que le volume d'incubation soit légèrement supérieur dans le dosage de la salive que dans le dosage du sérum (1,210  $\mu\text{L}$  au lieu de 1,010  $\mu\text{L}$ ), cela n'a aucun effet sur la capacité de liaison du marqueur dans l'intervalle de la courbe standard.

Remarque : cette courbe a été obtenue au cours d'une étude conduite en 1984 avec un intervalle standard de 0 ; 2,0 ; 5,0 ; 10 ; 25 et 60  $\mu\text{g/dL}$ . L'intervalle standard a depuis été modifié. Veuillez consulter le nouvel intervalle pour les calculs de cortisol contenu dans la salive et tenir compte de la proportion de 1:20.

## Valeurs normales

Tableau 1

Taux normaux de cortisol dans la salive et le sérum le matin (µg/dL)						
Groupe de sujets*	Salive			Sérum		
	n	Médian	Intervalle	n	Médian	Intervalle
Adultes normaux	150	0,43	0,18 – 1,01	103	6,5	4,5 – 21,1
Enfants (entre 4 et 11 ans)	105	0,40	0,14 – 0,91	---	---	---
Femmes enceintes (3 <sup>ème</sup> trimestre)	84	0,47	0,33 – 0,91	84	15,7	12,9 – 39,9

\* Vivant en GB

## 11. CONTRÔLE QUALITÉ

Chaque laboratoire doit appliquer des contrôles à plusieurs niveaux pour vérifier les performances du dosage. Les contrôles doivent être considérés comme des valeurs à déterminer. Les graphiques de contrôle de la qualité doivent être maintenus pour suivre les performances des contrôles. Des méthodes statistiques appropriées doivent être utilisées pour évaluer les tendances. Chaque laboratoire doit établir ses propres limites de performances acceptables.

## 12. CALCUL DES RÉSULTATS

Les échantillons à déterminer de sérum, de plasma et d'urine peuvent être dosés simultanément être interpolés depuis une courbe d'étalonnage générée avec les étalons du sérum de cortisol. Les échantillons de cortisol dans l'urine non extraite (UC) et les échantillons de cortisol libre dans l'urine extraite (UFC) sont ensuite convertis en "µg/24 heures" à l'aide de la formule appropriée.

- 12.1 Enregistrez les coups par minute (CPM) de chaque éprouvette.
- 12.2 Tracez les CPM liés pour les étalons de cortisol (axe vertical) et la concentration de cortisol (axe horizontal) sur du papier quadrillé semi-logarithmique.
- 12.3 Dessinez la courbe la plus précise possible. Pour avoir une idée des données et du graphique typiques, veuillez consulter le TABLEAU II et la FIGURE 1.
- 12.4 Placez les CPM liés pour chaque éprouvette en correspondance de chaque échantillon (contrôles, sérum, plasma, urine extraite et non extraite) sur l'axe vertical et suivez une ligne horizontale jusqu'à rencontrer la courbe d'étalonnage. Au point d'intersection, lisez la concentration de cortisol (µg/dL) sur l'axe horizontal.

### 12.5 Cortisol dans l'urine non extraite

Pour convertir le taux de cortisol de l'urine (UC) des échantillons d'urine non extraite de µg/dL en µg pour 24 heures, appliquez l'équation suivante :

$$UC = \frac{S \times V}{100}$$

où :

- S = concentration en µg/dL de l'échantillon d'urine non extraite  
V = volume total d'urine en mL/24 heures  
100 = facteur de conversion

### 12.6 Cortisol libre dans l'urine extraite

Pour convertir le taux de cortisol libre (UFC) de l'urine dans les échantillons d'urine extraite de µg/dL en µg pour 24 heures, appliquez l'équation suivante :

$$UFC = \frac{S \times V}{33,3 (E-S)}$$

où :

- S = Concentration en µg/dL de l'échantillon d'urine extraite  
E = Concentration de l'éprouvette d'efficacité pour l'échantillon correspondant en µg/dL  
V = Volume total d'urine en mL/24 heures  
33,3 = facteur de dilution combinée et d'efficacité d'extraction

Exemple :

- E = 13,50 µg/dL  
S = 7,85 µg/dL  
V = 1150 ml/24 heures

$$UFC = \frac{(7,85) (1150)}{33,3 (13,50-7,85)} = 48 \text{ µg cortisol/24 heures}$$

Pour les laboratoires qui souhaitent contrôler l'efficacité de la procédure d'extraction de l'urine (EE), la formule suivante peut être utilisée pour calculer l'efficacité en pourcentage.

$$EE = \frac{E-S}{6,0} \times 100$$

où :

- S = concentration en µg/dL de l'échantillon d'urine extraite  
E = concentration de l'éprouvette d'efficacité pour l'échantillon correspondant en µg/dL  
6,0 = Différence attendue entre les concentrations des éprouvettes "E" et "S" en µg/dL  
100 = Facteur de conversion

### 12.7 Unités S.I.

En utilisant un poids moléculaire de 362,5 daltons, les étalons de sérum, les contrôles et les valeurs des patients (sérum et plasma) peuvent être convertis de microgrammes par décilitre (µg/dL) en nanomoles par litre (nmol/L) d'unités S.I. en multipliant par 27,59 (consultez le TABLEAU II pour les valeurs d'étalons de cortisol présentées dans les deux unités). De la même façon, les contrôles d'urine extraite et non extraite et les valeurs des patients peuvent être convertis de microgrammes pour 24 heures (µg/24 hr) en nanomoles pour 24 heures (nmol/24 hr) d'unités S.I. en multipliant par 2,76.

**TABLEAU II**

Concentration des étalons

Cat. Nb.	Niveau de calibrateurs	Unités S.I.
CA-2367	0 µg/dL	0 nmol/L
CA-2358	1 µg/dL	28 nmol/L
CA-2359	3 µg/dL	83 nmol/L
CA-2370	10 µg/dL	276 nmol/L
CA-2371	25 µg/dL	690 nmol/L
CA-2372	60 µg/dL	1655 nmol/L



**TABLEAU III**

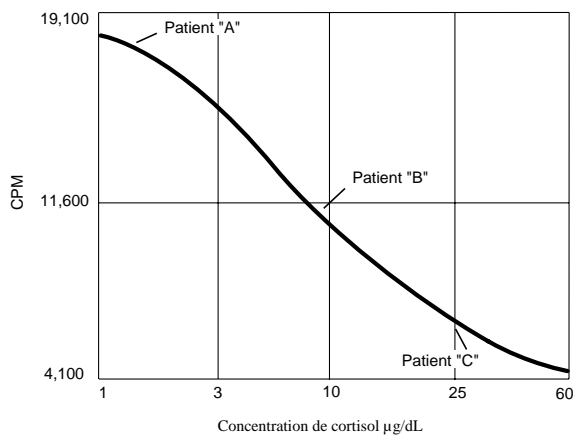
Enregistrement des données

A ne pas utiliser pour calculer les valeurs à déterminer

Tube		CPM	Cortisol
Nb	Contenu des tubes	lié	Concentration (µg/dL)
T1	Efficacité Totale (Tampon de traceur)	44516	
T2	Efficacité totale (Tampon de traceur)	43651	
1	Sérum témoin cortisol, B <sub>0</sub> 0 µg/dL	22311	
2	Sérum témoin cortisol, B <sub>0</sub> 0 µg/dL	22771	0
3	Etalon de Sérum Cortisol 1 µg/dL	19216	
4	Etalon de Sérum Cortisol 1 µg/dL	19243	1
5	Etalon de Sérum Cortisol 3 µg/dL	15331	
6	Etalon de Sérum Cortisol 3 µg/dL	15731	3
7	Etalon de Sérum Cortisol 10 µg/dL	10660	
8	Etalon de Sérum Cortisol 10 µg/dL	10294	10
9	Etalon de Sérum Cortisol 25 µg/dL	6862	
10	Etalon de Sérum Cortisol 25 µg/dL	6657	25
11	Etalon de Sérum Cortisol 60 µg/dL	4186	
12	Etalon de Sérum Cortisol 60 µg/dL	4224	60
13	Echantillon patient "A"	18470	1,3
14	Echantillon patient "A"	18992	1,1
			Mo : 1,2
15	Echantillon patient "B"	10377	10,1
16	Echantillon patient "B"	10608	9,6
			Mo : 9,9
17	Echantillon patient "C"	6316	28,8
18	Echantillon patient "C"	6318	28,8
			Mo : 28,8

**Résultats typiques**

A ne pas utiliser pour calculer les valeurs à déterminer



**FIGURE 1**

### 13. LIMITES DU DOSAGE

#### 13.1 Procédure

Le réactif du tampon de traceur doit être placé à l'abri de la lumière. Les tubes enduits sont prêts à l'emploi lorsqu'ils sont livrés. Conservez-les à une température comprise entre 2 et 27°C. Fermez bien l'emballage plastique lorsque vous conservez les tubes non utilisés, de manière à éviter la condensation.

Vérifiez régulièrement les conditions d'incubation. La température du bain d'eau doit être constante à 37 ±2°C et le niveau de l'eau doit toujours être supérieur à celui de la solution dans les éprouvettes, en veillant bien à ce que les éprouvettes ne flottent pas.

L'utilisateur doit remarquer que des résultats erronés peuvent être provoqués par une conservation impropre et par la manipulation des échantillons. Évitez les échantillons hémolysés, lipémiques et ictériques.

Si vous ne parvenez pas à obtenir des valeurs correctes de cortisol dans les contrôles, la manipulation a peut-être été imprécise ou impropre, ou les réactifs ont pu être endommagés. Les contrôles doivent être employés dans chaque dosage. Une courbe d'étalonnage doit être établie pour chaque dosage.

La trousse GammaCoat Cortisol ne doit pas être utilisée pour déterminer le taux de cortisol dans les échantillons provenant de patients traités par de la prednisolone. Voir les limites d'interprétation.

#### 13.2 Interprétation

Un taux normal de cortisol est généralement plus élevé entre 5 et 10 heures et plus bas de 20h à 4h<sup>5</sup>. Les taux à 17h sont généralement situés entre 1/2 et 1/3 de fois les taux du matin. Une augmentation du taux de cortisol en milieu de journée chez les femmes, coïncidant avec l'alimentation et largement atténuée en cas de privation de nourriture a été décrit.<sup>17</sup> La variation au cours de la journée, les tests de stimulation et de suppression, ainsi que la variation des situations de stress modifient généralement le taux de cortisol. La stimulation de ACTH par exemple, porte habituellement les valeurs à deux ou trois fois le taux du référence du matin.<sup>18</sup> La suppression de la métyrapone et de la dexaméthasone porte généralement les échantillons du matin à des valeurs inférieures à 5 µg/dL.<sup>10</sup> Les oestrogènes et les contraceptifs oraux peuvent engendrer des taux de cortisol élevés, dus à l'altération des concentrations des protéines du plasma et du sérum. Ainsi, le taux de cortisol de chaque patient est généralement évalué selon son taux de cortisol du matin. Le dosage de cortisol dans les échantillons provenant de patients soumis à un traitement par prednisolone est contre-indiqué au vu de la forte réactivité croisée entre l'anticorps cortisol contenu dans cette trousse, la prednisolone et la 6-méthylprednisolone. La réactivité croisée élevée peut engendrer un taux de cortisol visiblement élevé.

La détermination du cortisol générée par le protocole urinaire direct engendrera des valeurs cliniquement valables lorsqu'elle sera comparée avec l'intervalle normal de cortisol présent dans l'urine non extraite. Il est bien connu que des substances non identifiées présentes dans l'urine peuvent interférer avec le dosage radio-immunologique du cortisol libre. Les valeurs obtenues en utilisant des protocoles urinaires directs seront plus élevées que celles qui sont obtenues à partir d'échantillons d'urine purifiés par des techniques telles que la chromatographie liquide haute performance.<sup>19,20</sup>

### 14. VALEURS DE REFERENCE

#### 14.1 Taux de plasma ou de sérum

Matin :

7-25 µg/dL ou 70-250 ng/mL

[193-690 nmol/L]

Soir :

2-9 µg/dL ou 20-90 ng/mL

[55-248 nmol/L]

Ces intervalles peuvent être utilisés comme guides jusqu'à ce que chaque laboratoire établisse ses propres intervalles normaux.

#### 14.2 Cortisol dans l'urine non extraite

L'intervalle normal de cortisol présent dans l'urine (UC) dans des échantillons d'urine non extraite est de 75-270 µg pour 24 heures [207-745 nmol/24 hr]. Le prélèvement impropre d'échantillons d'urine peut provoquer une mauvaise évaluation du patient. Il est recommandé de déterminer le taux de créatinine pour identifier des prélèvements d'urine largement inappropriés.<sup>21</sup>

#### 14.3 Cortisol libre dans l'urine extraite

L'intervalle normal de cortisol libre dans l'urine est de 20-90 µg de cortisol pour 24 heures [55-248 nmol/24 hr]. Le prélèvement impropre d'échantillons d'urine peut provoquer une mauvaise évaluation du patient. Il est recommandé de déterminer le taux de créatinine pour identifier des prélèvements d'urine largement inappropriés.<sup>21</sup>

### 15. CRITERES DE QUALITE

#### 15.1 Précision

La précision intra-dosage a été déterminée par le dosage simultané de 20 dosages par échantillon de sérum. La précision inter-dosage a été déterminée par la moyenne des doubles de 20 dosages différents.

Intra-dosage Précision Echantillon	Nombre de dosages	Moyenne (µg/dL)	Déviati on Standard (µg/dL)	Coefficient de Variati on (%)
Ensemble de sérum A	20	2,9	0,19	6,6
Ensemble de sérum B	20	12,1	0,93	7,7
Ensemble de sérum C	20	47,1	3,18	6,8

Inter-dosage Précision Echantillon	Nombre de dosages Séparés	Moyenne (µg/dL)	Déviati on Standard (µg/dL)	Coefficient de Variati on (%)
Ensemble de sérum D	20	3,7	0,33	9,0
Ensemble de sérum E	20	12,1	1,19	9,8
Ensemble de sérum F	20	36,9	3,24	8,8

**15.2 Exactitude :** l'exactitude de ce dosage a été vérifiée par le test de récupération.

#### Récupération de l'ensemble de sérum

Des échantillons dopés ont été préparés en diluant une quantité connue d'échantillon de cortisol avec un ensemble de sérum analysé auparavant. Chaque échantillon dopé a été dosé quatre fois. Le pourcentage de récupération a été calculé (récupéré/ attendu) x 100.

Contribution du dopage (µg/dL)	Contribution de l'ensemble de l'ensemble (µg/dL)	attendue (µg/dL)	Valeur récupérée (µg/dL)	Pourcentage (%) de récupération
4,2	1,6	5,8	5,5	95
11,2	1,6	12,7	12,8	101
17,2	1,6	18,8	18,4	98
26,3	1,6	27,9	25,4	91
41,2	1,6	42,8	39,2	92

#### 15.3 Sensibilité analytique

La sensibilité de la courbe d'étalonnage est définie comme la plus petite valeur simple pouvant être distinguée de zéro. Une estimation statistique de la concentration minimum relevable (sensibilité) a été calculée selon la méthode de D. Rodbard<sup>22</sup> pour 30 répliqués au point zéro de la courbe d'étalonnage. La sensibilité calculée est de 0,21 µg/dL.

#### 15.4 Avidité

L'affinité constante calculée pour l'antisérum cortisol est approximativement de 2 x 10<sup>8</sup> litres/mole.

### 15.5 Spécificité analytique

Les données sur la réactivité croisée de l'antisérum utilisé dans cette trousse sont exprimées comme la proportion entre la concentration de cortisol et la concentration de substance à réaction croisée à 50% d'inhibition de la liaison maximum.

Composé	% Réactivité croisée
Cortisol	100
Prednisolone	25,5
6-Méthylprednisolone	14,5
11-Déoxycortisol	9,8
17-Hydroxyprogestérone	0,4
Corticostérone	0,9
Dexaméthasone	0,049
Prednisone	3,8
Déoxycorticostérone	0,14
Tétrahydrocortisone	0,2
Aldostérone	<0,1
β-Cortol	<0,1
β-Cortolone	<0,1
Cortisone	10,3
Dihydrocortisone	0,43
Progestérone	0,015
Spironolactone	<0,1
Tétrahydrocortisol	0,3
6-β-Hydrocortisone	4,2

**CONSULTER LA DERNIERE PAGE POUR LES REFERENCES**

## GAMMACOAT™ CORTISOL RIA-KIT

### 1. VERWENDUNGSZWECK

NUR ZUR IN-VITRO-DIAGNOSTIK.

Der GammaCoat™ [<sup>125</sup>I] Cortisol Radioimmunoassay-Kit dient der quantitativen Bestimmung von Cortisol (Hydrocortison, Compound F)-Spiegeln in Serum, Plasma oder Urin.

### 2. ZUSAMMENFASSUNG UND ERKLÄRUNG

Cortisol (Hydrocortison, Compound F) ist das wichtigste Glucocorticoid, das von der Nebennierenrinde ausgeschüttet wird. Physiologisch wirkt Cortisol entzündungshemmend, es regelt den Blutdruck und unterstützt die Synthese von Kohlenhydraten aus Aminosäuren.

Glucocorticoide werden unter dem Einfluss von Corticotrophin (adrenocorticotropes Hormon, ACTH), das vom Hypophysenvorderlappen ausgeschüttet wird, gebildet. Bei normalen Personen schließt Cortisol mit ACTH eine negative Rückkopplungsschleife durch die Hypothalamus-Hypophysen-Nebennierenrinden (HPA)-Achse. Das von der Hypophyse ausgeschüttete ACTH wird wiederum durch das Corticotropin-Releasing-Hormon (CRH) aus dem Hypothalamus reguliert. CRH reagiert auf Cortisol-Spiegel und Stress. Physischer und psychischer Stress, Tagesschwankungen und niedrige Blutzucker-Werte beeinflussen die Cortisol-Sekretion.<sup>1-6</sup>

Organstörungen in der HPA-Achse führen zu einer Änderung des Cortisol-Spiegels.<sup>7,8</sup> Für die Diagnose gesunder und pathologischer Zustände ist es sinnvoll, die Nebennierenfunktion durch Messung der Plasma- oder Serum-Cortisol-Spiegel zu beurteilen. Eine Kombination von Messungen am Morgen und am Abend und Stimulations- und Suppressionstests bieten eine starke Evidenz für die Diagnose von spezifischen Nebennierenerkrankungen. Die Diagnose von Morbus Addison (chronische Nebenniereninsuffizienz) und des Cushing-Syndroms (adrenale Überproduktion) sind zwei Beispiele von Diagnosen, für die der spezifische Test des Cortisol-Spiegels im Blut bei der Patientenbeurteilung hilfreich ist.<sup>9,10</sup>

### 3. TESTPRINZIPIEN

Der GammaCoat [<sup>125</sup>I] Cortisol Radioimmunoassay-Kit basiert auf den Prinzipien der kompetitiven Bindung eines Radioimmunoassays.<sup>11</sup> Kalibratoren und unbekannte Proben (Serum, Plasma oder Urin) werden mit einem Cortisol-Tracer in antikörperbeschichteten Röhrchen inkubiert, in denen der Antikörper auf der unteren Innenwand des GammaCoat-Röhrchens immobilisiert wird. Nach der Inkubation wird der Röhrcheninhalt aspiriert oder dekantiert, und das Röhrchen wird gemessen. Mit 5 Serumkalibratoren zwischen 1-60 µg/dL wird eine Eichkurve vorbereitet. Unbekannte Werte werden aus der Eichkurve interpoliert. Der gesamte Assay wird in dem beschichteten Röhrchen durchgeführt. Für Serum-, Urin- oder Plasmaproben sind keine separaten Probenverdünnungs-, Proteindenaturierungs- oder Extraktionsschritte erforderlich.

Der GammaCoat [<sup>125</sup>I] Cortisol RIA-Kit kann nicht nur als Urin-Cortisol-Test, sondern auch zur Messung des freien (unkonjugierten) Cortisols im Urin verwendet werden. Das im Urin vorliegende Cortisol muss zunächst in Methylenchlorid extrahiert werden. Ein Aliquot des Extrakts wird direkt im antikörperbeschichteten GammaCoat-Röhrchen verdampft (Versuche haben gezeigt, dass das antikörperbeschichtete Röhrchen nicht beschädigt wird, wenn Methylenchlorid guter Qualität verwendet wird). Um sicherzustellen, dass die Proben die richtigen Proteinkonzentrationen enthalten, werden zu jedem GammaCoat-Röhrchen 10 µL Cortisol Serum Blank (CA-2367) gegeben. Das weitere Testverfahren entspricht dem für die Bestimmung von Cortisol in Serum, Plasma oder nicht extrahiertem Urin. Die Effizienz der Cortisol-Extraktion aus Urin mit Hilfe von Methylenchlorid sollte überwacht werden.

#### 4. KITREAGENZIE

Cortisol-Kalibratoren (A-F)	6 Fläschchen / 1 mL	6 Fläschchen / 1 mL
Cortisolbeschichtete Röhrchen	2 Beutel / 50 St.	10 Beutel / 50 St.
Cortisol-Tracer	1 Fläschchen / 10 mL	5 Fläschchen / 10 mL St.
PBS-Puffer	1 Fläschchen / 100 mL	5 Fläschchen / 100 mL St.
Anzahl der Tests	100	500

LAGERUNG: Alle Reagenzien einschließlich des Tracer-Puffer-Reagenz sind bei 2-8°C bis zum auf dem Etikett angegebenen Verfallsdatum stabil. Die anticortisolbeschichteten Röhrchen können bei 2-27°C aufbewahrt werden. Reagenzien nicht nach Ablauf des Verfallsdatums verwenden. Reagenzien aus verschiedenen Chargen dürfen nicht vermischt werden.

##### 4.1 Cortisol-Tracer: gebrauchsfertiges Reagenz

Jedes Fläschchen enthält ca. 4 µCi Tracer (<1 µg/mL Cortisol) in 10 mL Phosphat-gepuffertes Kochsalzlösung, ANS (8-Anilino-1-Napthalin-Sulfonsäure) mit 0,1 % Natriumazid als Konservierungsmittel.

##### 4.2 Kaninchen-Anti-Cortisol-Serum-beschichtete Röhrchen: gebrauchsfertiges Reagenz

12 x 75 mm Röhrchen sind mit Kaninchen-Anti-Cortisol-Serum beschichtet (Titer<1 µg/Röhrchen) und in einem Plastikbeutel verpackt.

##### 4.3 PBS-Puffer: gebrauchsfertiges Reagenz

Jede Flasche enthält 100 mL Phosphat-gepufferte Kochsalzlösung (PBS) mit 0,1 % Natriumazid als Konservierungsmittel.

##### 4.4 Cortisol-Serum-Kalibratoren: gebrauchsfertiges Reagenz

Jedes Fläschchen enthält Cortisol in 1 mL vorbehandeltem humanen Serum mit 0,1 % Natriumazid als Konservierungsmittel. Die Kalibratoren werden in den folgenden Konzentrationen geliefert: 0, 1, 3, 10, 25 und 60 µg/dL. Die DiaSorin Cortisol-Kalibratoren wurden gegen den U.S.P. Cortisol-Referenzstandard kalibriert. Jeder Vergleich mit anderen Produkten oder Verfahren sollte mit diesem Referenzstandard erfolgen. Die Kitkalibratoren sind mit Patientenproben austauschbar, wenn sie mit Reagenzien verwendet werden und dieser diagnostische In-vitro-Test wie empfohlen durchgeführt wird.

##### 4.5 Zusatzetikett

Für Tracer-Puffer-Reagenz

##### 4.6 AUF ANFRAGE ERHÄLTlich:

Halblogarithmisches Millimeterpapier  
Block à 50 Blatt

#### 5. WARNHINWEISE UND VORSICHTSMASSNAHMEN

NUR ZUR IN-VITRO-DIAGNOSTIK.

Nicht für internen oder externen Gebrauch bei Menschen oder Tieren.

##### Reagenzien mit Material humanen Ursprungs

##### Dieses Produkt ist als potenzieller Infektionserreger zu behandeln.

Alle in der Herstellung dieses Produktes verwendeten Serum- bzw. Plasmaspendeeinheiten wurden nach einer FDA-genehmigten Methode getestet und für nicht reaktiv auf Hepatitis-B-Oberflächenantigen (HBsAg), Hepatitis-C-Antikörper (HCV) und Antikörper für HIV-1/2 befunden. Obwohl diese Methode äußerst genau ist, bietet sie keine Gewähr dafür, dass alle infizierten Einheiten identifiziert werden können. Dieses Produkt kann auch Material humanen Ursprungs enthalten, für welches es noch kein genehmigtes Testverfahren gibt. Da keine der zur Zeit bekannten Testmethoden absolute Gewähr für die Abwesenheit des Hepatits-B-Virus (HBV), Hepatitis-C-Virus (HCV), des Retrovirus (HIV) oder anderer Infektionserreger bieten kann, sind alle Produkte mit Komponenten humanen Ursprungs unter Einhaltung guter Laborpraktiken und entsprechender Vorsichtsmaßnahmen laut Empfehlungen des Leitfadens der Centers for Disease Control and Prevention/National Institutes of Health (amerikanische

Krankheitsforschungs-zentren/Staatliche Gesundheitsinstitute): "Biosafety in Microbiological and Biomedical Laboratories" (Biosicherheit in mikrobiologischen und biomedizinischen Laboren), 4. Auflage, Mai 1999, oder aktuelle Auflage, als potenzielle infektiöse Substanzen zu behandeln.

#### **REAGENZIEN MIT NATRIUMAZID**

**VORSICHT:** Einige Reagenzien in diesem Kit enthalten Natriumazid, das gegebenenfalls mit Blei- oder Kupferleitungen reagieren und höchst explosive Metallazide bilden kann. Zur Entsorgung mit reichlichst Wasser nachspülen, um Azidaufbau zu vermeiden. Weitere Informationen finden Sie im Abschnitt "Decontamination of Laboratory Sink Drains to Remove Azide Salts" (Dekontaminierung von Abflüssen in Laborspülbecken zur Entsorgung von Azidsalzen) des Handbuchs "Safety Management" (Sicherheitsmaßnahmen), Nr. CDC-22, herausgegeben von Centers for Disease Control and Prevention (US-Krankheitsforschungszentren), Atlanta, Bundesstaat Georgia, 1976.

#### **Europäische Gemeinschaften: Gefahrenbezeichnungen für gefährliche Stoffe (Richtlinie 1999/45/EG)**

R 20/21/22 - Gesundheitsschädlich beim Einatmen, Verschlucken und Berührung mit der Haut.

R 32 - Entwickelt bei Berührung mit Säure sehr giftige Gase.

S28 - Bei Berührung mit der Haut sofort mit viel Wasser abwaschen.

#### **REAGENZIEN MIT JOD-125**

Bei der Lagerung, Handhabung und Entsorgung dieses Materials sind entsprechende Vorsichtsmaßnahmen und gute Laborpraktiken einzuhalten.

Für Ärzte bzw. Institutionen, welche im Rahmen einer Generallizenz Radioisotope erhalten:

Entgegennahme, Erwerb, Besitz und Verwendung dieses radioaktiven Materials sind nur Ärzten, veterinärmedizinisch tätigen Tierärzten, klinischen Laboren oder Krankenhäusern und nur für klinische In-vitro-Tests oder In-vitro-Labortests gestattet, bei denen kein interner oder externer Kontakt des Materials oder seiner Strahlung mit Menschen oder Tieren stattfindet. Entgegennahme, Erwerb, Besitz, Verwendung und Weitergabe des Materials unterliegen den Vorschriften und der Generallizenz der US Nuclear Regulatory Commission (US-amerikanische Strahlenschutzbehörde) bzw. des Staates, mit dem diese Behörde ein Abkommen zur Ausübung ihrer Überwachungsfunktion abgeschlossen hat.

1. Die Lagerung des radioaktiven Materials ist auf einen speziell dafür bestimmten Bereich zu beschränken.
2. Der Zugang zu radioaktivem Material ist nur befugten Personen zu gestatten.
3. Radioaktives Material nicht mit dem Mund pipettieren.
4. Im vorgesehenen radioaktiven Arbeitsbereich nicht essen oder trinken.
5. Verschüttetes Material aufwischen und Bereich anschließend mit alkalischem Reinigungsmittel oder radiologischer Dekontaminationslösung waschen. Alle benutzten Glasbehälter vor dem Waschen mit anderen Laborbehältern aus Glas gründlichst mit Wasser spülen.

Für Ärzte oder Einrichtungen, die im Rahmen einer Sondergenehmigung Radioisotope erhalten:

Entgegennahme, Gebrauch, Weitergabe und Entsorgung radioaktiven Materials unterliegen den Vorschriften und Bedingungen der jeweiligen Sondergenehmigung.

**WARNHINWEIS:** Dieses Produkt enthält eine Chemikalie, die nach Angaben des US-Bundesstaates Kalifornien krebserregend ist.

**ACHTUNG:** Die auf der Packungsbeilage angegebene Radioaktivität kann von der auf dem Etikett des Kartons und des Tracer-Fläschchens angegebenen etwas abweichen. Sowohl das Etikett des Kartons als auch das Etikett des Tracer-Fläschchens geben den tatsächlichen Wert der Radioaktivität am Kalibrationsdatum an, während die Packungsbeilage die theoretische Radioaktivität darstellt.

## 6. PROBENENTNAHME UND -HANDHABUNG

### Plasmaproben

Venöses Blut unter aseptischen Bedingungen in ein Glasröhrchen mit Heparin oder EDTA abnehmen.

Die Plasmafraktion separieren. Das Plasma kann gekühlt über Nacht bei 2-8°C aufbewahrt werden. Für eine längere Lagerung müssen die Proben bei -20°C eingefroren werden. Hämolytierte, lipämische oder ikterische Proben sind zu vermeiden.

### Serumproben

Obwohl für Cortisol-Tests gewöhnlich Plasmaproben verwendet werden, werden mit Serumproben vergleichbare Ergebnisse erzielt.<sup>12</sup>

Die Serumfraktion separieren. Das Serum kann gekühlt über Nacht bei 2-8°C aufbewahrt werden. Für eine längere Lagerung müssen die Proben bei -20°C eingefroren werden. Es sollten keine hämolytierten, lipämischen oder ikterischen Proben verwendet werden.

### Urinproben

24-Stunden-Urinprobe sammeln. Das Gesamtvolumen des Urins notieren. 10 g Borsäure pro Liter Urin als Konservierungsmittel hinzufügen, und ein gut gemischtes Aliquot bei -20°C aufbewahren. Gefrorene Proben bei Raumtemperatur auftauen und vor Gebrauch gut mischen.

## 7. ZUSÄTZLICH BENÖTIGTE GERÄTE UND MATERIALIEN

- 7.1 Wasserbad gleichmäßiger Temperatur, 37°C (±2°C)
- 7.2 Präzisionspipette (10 µL)
- 7.3 Halbautomatische Pipette (1,0 mL)
- 7.4 Gammazähler
- 7.5 Röhrchenständer
- 7.6 Wasserauger (optional)
- 7.7 Vibrationsmischer (Vortex)
- 7.8 Kunststoffbeschichtetes Saugpapier (optional)

Zusätzliches Zubehör nur für den Gebrauch zur Urinextraktion:

1. Einweg-Glasröhrchen (12 x 75 mm) und Verschlusskappen
2. Methylenchlorid (Dichlormethan; ACS)
3. Eisbad
4. Präzisionspipetten (100 & 200 µL)
5. Abzugshaube oder gut belüfteter Bereich
6. Mittel zum Verdampfen des Methylenchlorids. Die Verdampfung kann mit trockener Luft oder Stickstoff und einer leichten Erwärmung des Extrakts auf ca. 37°C unter einer Abzugshaube oder in einem gut belüfteten Bereich erfolgen.

## 8. URINEXTRAKTIONSVERFAHREN

Dieses Verfahren umfasst die Methodik zur Bestimmung der Effizienz der Methylenchlorid-Extraktion. In den DiaSorin Laboren konnten durchschnittlich 99 % (±14 %) Cortisol aus Urinproben rückgewonnen werden.

- 8.1 Ein adäquates Volumen Methylenchlorid zur Abkühlung in ein Eisbad stellen. Ein Röhrchen sollte mehr als 1 mL enthalten. Das Eisbad sollte groß genug sein, um Platz für ein Becherglas Methylenchlorid und den Röhrchenständer zu bieten.
- 8.2 Zur Bestimmung der Extraktionseffizienz zwei Einmal-Teströhrchen für jede zu untersuchende Probe mit der Patientenidentifikation beschriften. Ein Röhrchen mit "P" für Probe und das andere mit "E" für Extraktionseffizienz beschriften.
- 8.3 200 µL einer gut gemischten 24-Stunden-Urinprobe in die entsprechenden "P"- und "E"-Röhrchen geben.



- 8.4 Zu jedem "E"-Röhrchen 10 µL des 60-µg/dL-Cortisol-Serum-Kalibrators geben. Die Reagenzien durch Schütteln des Röhrchenständers oder durch Mischen jedes einzelnen Röhrchens mischen.
- 8.5 Zu jedem "P"- und "E"-Röhrchen 1,0 mL gekühltes Methylenchlorid geben. Gut auf dem Vortex mischen, um das Cortisol in die organische Schicht zu extrahieren. Mit einem Deckel verschließen oder abdecken und in ein Eisbad stellen, um zu vermeiden, dass Methylenchlorid zu stark verdampft. Methylenchlorid lässt sich leichter pipettieren, wenn die Pipette 3- bis 4-mal mit KALTEM Methylenchlorid gespült wird, bevor es in die entsprechenden Röhrchen gegeben wird.
- 8.6 Während Sie auf die Phasentrennung warten, beschriften Sie jeweils zwei GammaCoat-Cortisol-Röhrchen für jedes "P"-Röhrchen und für jedes "E"-Röhrchen.
- 8.7 Nach der Phasentrennung 100 µL aus der unteren Schicht (Methylenchlorid) jedes Röhrchens entnehmen und zu den entsprechend beschrifteten GammaCoat-Röhrchen geben. Wird die Pipettenspitze vor dem Pipettieren der Probe in kaltem Methylenchlorid gespült, tropft die extrahierte Probe weniger stark aus der Pipettenspitze. Beim Übertragen des 100-µL-Aliquots Extraktionslösung in das beschichtete Röhrchen nicht versuchen, die Pipettenspitze abzuwischen, da die physikalischen Eigenschaften von Methylenchlorid ein Leck und Luftblasen in der Pipettenspitze verursachen. Die Extraktionslösung lässt sich leichter in das beschichtete Röhrchen übertragen, wenn Sie das Extraktionsröhrchen und das GammaCoat-Röhrchen in derselben Hand halten. Das 100-µL-Extrakt zwar schnell, jedoch auch vorsichtig auf den Boden des GammaCoat-Röhrchen geben.
- 8.8 Das Methylenchlorid aus den GammaCoat-Röhrchen mit trockener Luft oder Stickstoff und einer leichten Erwärmung des Extrakts auf ca. 37°C verdampfen.  
**VORSICHT:** Starke Konzentrationen von Halogenkohlenwasserstoffdämpfen in Arbeitsbereichen vermeiden. DIE VERDAMPFUNG DARF NUR UNTER EINER ABZUGSHAUBE ODER IN EINEM GUT BELÜFTETEN BEREICH ERFOLGEN.
- 8.9 Nachdem das Methylenchlorid vollständig verdampft ist, 10 µL des 0 µg/dL Cortisol Serum Blank, CA-2367, zu jedem GammaCoat-Röhrchen mit der Patientenprobe ("P"- und "E"-Röhrchen) geben, um sicherzustellen, dass die Proben die richtigen Eiweißkonzentrationen enthalten.
- 8.10 Mit Schritt 1 des RIA-Testverfahrens fortfahren.

## 9. TESTVERFAHREN

### Tracer-Puffer-Reagenz:

Den gesamten Inhalt von 1 Fläschchen Cortisol-Tracer zu 1 Flasche PBS-Puffer geben und vorsichtig mischen. Ein letztes Ausspülen des Cortisol-Tracer-Fläschchens mit dem Tracer-Puffer-Reagenz maximiert die Übertragung des Tracers. Das Zusatzetikett für das Tracer-Puffer-Reagenz ausfüllen und am Behälter zur richtigen Identifikation befestigen. Das Tracer-Puffer-Reagenz muss in einem dunklen Raum oder in einem mit Metallfolie umwickelten Behälter bei 2-8°C aufbewahrt werden.

Das Testverfahren umfasst die Vorbereitung einer Eichkurve, aus der der unbekannte Cortisol-Inhalt in der Probe interpoliert wird.

- 9.1 Vor dem Gebrauch müssen alle Reagenzien auf Raumtemperatur gebracht und gründlich gemischt werden (Schaumbildung vermeiden).
- 9.2 Die GammaCoat-Röhrchen in doppelter Ausführung nach dem folgenden Schema beschriften. Totalaktivität- [T1,T2] und B0-Röhrchen [1,2] sind möglicherweise für bestimmte Datenreduktions- und Qualitätskontrollprogramme erforderlich, können jedoch ausgelassen werden, wenn die Eichkurve auf halblogarithmischem Millimeterpapier aufgetragen wird.<sup>13-15</sup>

- 9.3** Auf dem Boden der entsprechenden doppelten GammaCoat-Röhrchen Folgendes zugeben:
- a.** 10 µL Cortisol Serum Blank oder jeden Cortisol-Serum-Kalibrator.
  - b.** BEI SERUM-, PLASMA- UND NICHT EXTRAHIERTEN URINPROBEN 10 µL jeder Probe hinzufügen. Beim Pipettieren von Kalibratoren und Proben ist vorsichtig vorzugehen.<sup>16</sup>
  - c.** BEI EXTRAHIERTEN URINPROBEN GammaCoat-Röhrchen mit den extrahierten Proben aus Schritt 9 des Urinextraktionsverfahrens verwenden.  
 HINWEIS: Wenn Patientenserum- oder -plasmaproben verdünnt werden sollen, das in diesem Kit enthaltene Cortisol Serum Blank als Verdünnungsmittel verwenden. Bei nicht extrahierten oder extrahierten Urinproben nach Bedarf mit destilliertem Wasser verdünnen. Bei freiem Cortisol im Urin ein 200-µL-Aliquot der verdünnten Urinprobe extrahieren (Urinextraktionsverfahren, Schritt 3). Mit dem Routinetest fortfahren. Der Verdünnungsfaktor muss bei den Berechnungen berücksichtigt werden.
- 9.4** Zu jedem Röhrchen 1,0 mL Tracer-Puffer-Reagenz geben. Jedes Röhrchen vorsichtig bei niedriger Geschwindigkeit auf einem Vortex mischen.
- 9.5** Die Röhrchen 45 Minuten lang in einem 37°C (±2°C) warmen Wasserbad inkubieren.
- 9.6** Mit Ausnahme der Totalaktivität-Röhrchen alle Röhrchen aspirieren oder dekantieren.  
 WENN DIE LÖSUNG NICHT VOLLSTÄNDIG ENTFERNT WIRD, KANN DIES ZU EINER SCHLECHTEN REPLIKATION UND FALSCHEN WERTEN FÜHREN.  
 Bei der Aspirationstechnik muss sichergestellt werden, dass die Kunststoffspitze des Saugers den Boden des beschichteten Röhrchens berühren und dass die gesamte Flüssigkeit entfernt wird.  
 Bei der Dekantationstechnik sollten die Röhrchen 3-5 Minuten lang umgedreht werden, damit die Flüssigkeit abfließen kann. Die Röhrchen auf Saugpapier ausschlagen, um die Flüssigkeit zu entfernen, bevor die Röhrchen aufrecht hingestellt werden.
- 9.7** Alle Röhrchen in einem Gammazähler 1 Minute messen. Dabei muss das Fenster für Iod-125 entsprechend angepasst werden.
- 9.8** Berechnen Sie die Ergebnisse und beziehen Sie sich auf sie.

## 10. VERFAHREN FÜR SPEICHELPROBEN

Mit diesem Kit können auch Speichelproben untersucht werden.

Es wurde gezeigt, dass zwischen der Cortisol-Konzentration im Speichel und der Konzentration des freien Cortisols im Plasma und Serum (diese Konzentrationen stellen 60-100 % der Konzentration der freien Fraktion im Blut und 4-6 % der Gesamtkonzentration im Serum oder Plasma dar) ein Zusammenhang besteht.

Zahlreiche Studien haben die praktischen und diagnostischen Vorteile von Speichel-Cortisol-Tests gezeigt und ihre Gültigkeit sowie ihren klinischen Wert bestätigt.

Bei der Anpassung dieser Technik an Speichel-Cortisol-Tests wurden zwei wichtige Punkte berücksichtigt:

Zum einen ist eine 20fache Erhöhung der Sensitivität erforderlich, da Speichel-Cortisol nur 5 % des gesamten Plasma-Cortisols darstellt. Um diese Sensitivität zu erreichen, wurde das Volumen der Speichelprobe auf 200 µL erhöht.

Zum anderen ist die Eiweißkonzentration im Speichel niedriger (sie besteht i.d.R. aus Enzymen und Glykoproteinen). Es liegen nur Spuren von Plasmaproteinen vor; Proteine, die sich mit Corticosteroiden verbinden, fehlen ganz. Um sicherzustellen, dass die Proteinmatrix in der Probe und den Standards ähnlich wirkt, wird zu jeder Speichelprobe Nullkalibrator (ohne Cortisol) hinzugegeben (wie bei Tests mit extrahierten Urinproben).

Beim Pipettieren von Proben und Standards sind also nur kleinere Änderungen erforderlich, um das Verfahren an Tests mit Speichelproben anzupassen, wenn nur die im Kit enthaltenen Reagenzien verwendet werden.

### 10.1 Entnahme und Vorbereitung von Speichelproben

Der Speichel muss 10 Minuten, nachdem der Patient seinen Mund mit Leitungswasser ausgespült hat, entnommen werden. Die Speichelproduktion sollte nicht angeregt werden. Darüber hinaus muss dem Patient der Unterschied zwischen Speichel und Schleim erklärt werden. Selbst bei Kindern kann ein ausreichendes Volumen von 1 mL Speichel in wenigen Minuten entnommen werden.

Die Proben werden gefroren bei -20°C aufbewahrt. Bevor sie untersucht werden, müssen sie aufgetaut und zentrifugiert werden; der klare Überstand wird für den Test abgepumpt.

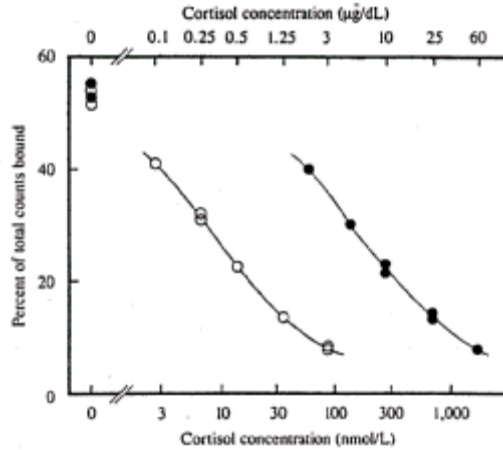
### 10.2 Verfahren für Speichelproben

Für jede **Speichelprobe** 10 µL Nullkalibrator paarweise in die beschrifteten Röhrchen pipettieren; 200 µL Probe und 1 mL Tracer zugeben.

Für den **Standardbereich** 10 µL Nullkalibrator oder den Standard paarweise in die beschrifteten Röhrchen geben; 200 µL PBS-Puffer und 1 mL Tracer zugeben.

Jedes Röhrchen vorsichtig mischen. 45 Minuten lang in einem Wasserbad bei 37°C inkubieren. Den Inhalt der Röhrchen abpumpen oder dekantieren und die an die Röhrchenseiten gebundene Radioaktivität 1 Minute lang messen.

Standardkurve



Der tatsächliche Standardbereich für Speichel-Cortisol beträgt 0,10 – 0,25 – 0,50 – 1,25 und 3,0 µg/dL. Die Standardkurven für die beiden von diesem Kit abgedeckten Testverfahren (Serum und Speichel) sind im Diagramm links dargestellt.

Obwohl das Inkubationsvolumen im Speicheltest etwas höher als im Serumtest ist (1210 µL statt 1010 µL), hat dies keine Auswirkung auf die Bindungsfähigkeit des Tracers im Bereich der Standardkurve.

Figure 3  
Standard curves for assay of cortisol in serum or plasma (●) and in saliva (○) with the GammaCoat™ [<sup>125</sup>I] RIA kit.

Hinweis: Diese Kurve wurde bei einer 1984 durchgeführten Studie mit einem Standardbereich von 0, 2,0, 5,0 10, 25 und 60 µg/dL erzielt. Der Standardbereich ist seitdem geändert worden. Beziehen Sie sich auf den neuen Bereich für Speichel-Cortisol-Berechnungen und berücksichtigen Sie ein Verhältnis von 1:20.

**Normalwerte**  
Tabelle 1

Normale Cortisol-Spiegel in Speichel und Serum morgens (µg/dL)						
Probanden-Gruppe*	Speichel			Serum		
	n	Mittel	Bereich	n	Mittel	Bereich
Normale Erwachsene	150	0,43	0,18 – 1,01	103	6,5	4,5 – 21,1
Kinder (4 – 11 Jahre alt)	105	0,40	0,14 – 0,91	---	---	---
Schwangere (3. Trimester)	84	0,47	0,33 – 0,91	84	15,7	12,9 – 39,9

\* Wohnhaft in Großbritannien

**11. QUALITÄTSKONTROLLE**

Jedes Labor sollte Kontrollen bei mehreren Konzentrationen verwenden, um die Leistung des Assays zu überwachen. Die Kontrollen sollten als unbekannte Proben behandelt werden. Um die Leistung der Kontrollen zu überwachen, sollten Qualitätskontrolltabellen geführt werden. Die Trends sollten mit Hilfe geeigneter statistischer Methoden ausgewertet werden. Jedes Labor sollte akzeptable Leistungsgrenzen festlegen.

## 12. ERGEBNISBERECHNUNG

Unbekannte Serum-, Plasma- und Urinproben können gleichzeitig untersucht werden. Sie werden alle aus einer mit Cortisol-Serum-Kalibratoren erzeugten Eichkurve interpoliert. Sowohl Cortisol aus nicht extrahierten Urinproben (UC) als auch freies Cortisol aus extrahierten Urinproben werden dann mit der entsprechenden Formel in "µg/24 Stunden" umgerechnet.

- 12.1 Die gebundene Aktivität (Impulse pro Minute, I/M) für jedes Röhrchen notieren.
- 12.2 Auf halblogarithmischem Millimeterpapier die gebundene Aktivität (I/M) für Cortisol-Kalibratoren (vertikale Achse) gegen die Cortisol-Konzentration (horizontale Achse) auftragen.
- 12.3 Die bestpassende Kurve zeichnen. TABELLE II und ABBILDUNG 1 enthalten typische Daten sowie eine typische Kurve.
- 12.4 Für das einer Probe (Kontrollen, Serum, Plasma, nicht extrahiertes und extrahiertes Urin) entsprechende Röhrchen die gebundene Aktivität (I/M) auf der vertikalen Achse ermitteln und einer die Eichkurve schneidenden horizontalen Linie folgen. Beim Schnittpunkt die Cortisol-Konzentration (µg/dL) auf der horizontalen Achse ablesen.

### 12.5 Cortisol aus nicht extrahiertem Urin

Mit der folgenden Gleichung kann das Urin-Cortisol (UC) nicht extrahierter Urinproben von µg/dL auf µg Cortisol pro 24 Stunden umgerechnet werden:

$$UC = \frac{PxV}{100}$$

wobei:

- P = Konzentration der nicht extrahierten Urinprobe in µg/dL  
V = Urin-Gesamtvolumen in mL/24 Stunden  
100 = Umrechnungsfaktor

### 12.6 Freies Cortisol aus extrahiertem Urin

Mit der folgenden Gleichung kann das freie Cortisol im Urin (UFC) extrahierter Urinproben von µg/dL auf µg Cortisol pro 24 Stunden umgerechnet werden:

$$UFC = \frac{PxV}{33,3 (E-P)}$$

wobei:

- P = Konzentration der extrahierten Urinprobe in µg/dL  
E = Effizienzröhrchenkonzentration für die entsprechende Probe in µg/dL  
V = Urin-Gesamtvolumen in mL/24 Stunden

33,3 = kombinierter Verdünnungs- und Extraktionseffizienzfaktor

Beispiel:

- E = 13,50 µg/dL  
P = 7,85 µg/dL  
V = 1150 mL/24 Stunden

$$UFC = \frac{(7,85) (1150)}{33,3 (13,50-7,85)} = 48 \text{ µg Cortisol/24 Stunden}$$

Labore, die die Effizienz der Urinextraktion (EE) überwachen möchten, können mit der folgenden Formel die Effizienz als Prozentsatz berechnen.

$$EE = \frac{E-P}{6,0} \times 100$$

wobei:

- P = Konzentration der extrahierten Urinprobe in µg/dL  
 E = Effizienzröhrchenkonzentration für die entsprechende Probe in µg/dL  
 6,0 = Erwartete Differenz zwischen den Konzentrationen der "E"- und "P"-Röhrchen in µg/dL  
 100 = Umrechnungsfaktor

### 12.7 SI-Einheiten

Mit einem Molekulargewicht von 362,5 Dalton können Serumkalibratoren, Kontrollen und Patientenwerte (Serum und Plasma) durch Multiplikation mit dem Faktor 27,59 von Mikrogramm pro Deziliter (µg/dL) in die SI-Einheit Nanomol pro Liter (nmol/L) umgerechnet werden (TABELLE II enthält Werte für Cortisol-Kalibratoren in beiden Einheiten). In ähnlicher Weise können sowohl nicht extrahierte als auch extrahierte Urinkontrollen und Patientenwerte von Mikrogramm pro 24 Stunden (µg/24 h) in die SI-Einheit Nanomol pro 24 Stunden (nmol/24 h) umgerechnet werden. Der Multiplikationsfaktor hierfür beträgt 2,76.

**TABELLE II**  
Konzentration von Kalibratoren

Kat. Nr.	Kalibratorkonzentration	SI-Einheiten
CA-2367	0 µg/dL	0 nmol/L
CA-2358	1 µg/dL	28 nmol/L
CA-2359	3 µg/dL	83 nmol/L
CA-2370	10 µg/dL	276 nmol/L
CA-2371	25 µg/dL	690 nmol/L
CA-2372	60 µg/dL	1655 nmol/L

**TABELLE III**

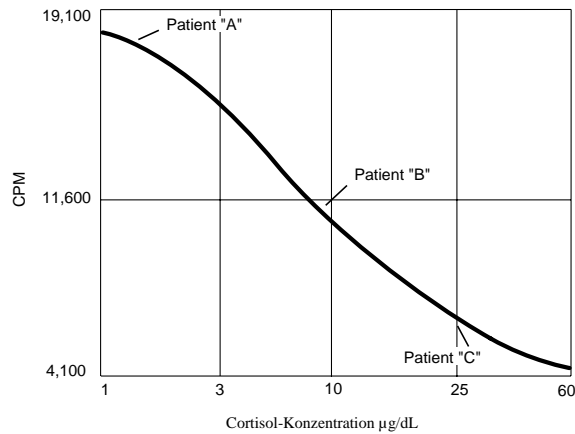
Aufzeichnung der Daten

Nicht zur Berechnung unbekannter Proben verwenden.

Röhrchen Nr.	Konzentration Röhrcheninhalt	Gebunden	Cortisol I/M (µg/dL)
T1	Totalaktivität (Tracer-Puffer)	44516	
T2	Totalaktivität (Tracer-Puffer)	43651	
1	Cortisol Serum Blank, B <sub>0</sub> 0 µg/dL	22311	
2	Cortisol Serum Blank, B <sub>0</sub> 0 µg/dL	22771	0
3	Cortisol Serum Kalibrator 1 µg/dL	19216	
4	Cortisol Serum Kalibrator 1 µg/dL	19243	1
5	Cortisol Serum Kalibrator 3 µg/dL	15331	
6	Cortisol Serum Kalibrator 3 µg/dL	15731	3
7	Cortisol Serum Kalibrator 10 µg/dL	10660	
8	Cortisol Serum Kalibrator 10 µg/dL	10294	10
9	Cortisol Serum Kalibrator 25 µg/dL	6862	
10	Cortisol Serum Kalibrator 25 µg/dL	6657	25
11	Cortisol Serum Kalibrator 60 µg/dL	4186	
12	Cortisol Serum Kalibrator 60 µg/dL	4224	60
13	Patientenprobe "A"	18470	1,3
14	Patientenprobe "A"	18992	1,1
			MW: 1,2
15	Patientenprobe "B"	10377	10,1
16	Patientenprobe "B"	10608	9,6
			MW: 9,9
17	Patientenprobe "C"	6316	28,8
18	Patientenprobe "C"	6318	28,8
			MW: 28,8

**Typische Ergebnisse**

Nicht zur Berechnung unbekannter Proben verwenden.



**ABBILDUNG 1**

## 13. GRENZEN DES VERFAHRENS

### 13.1 Durchführung

Das Tracer-Puffer-Reagenz lichtgeschützt aufbewahrt werden. Die beschichteten Röhrchen werden gebrauchsfertig geliefert. Sie sollten bei 2-27°C aufbewahrt werden. Der Kunststoffbinder sollte fest geschlossen werden, wenn ungebrauchte Röhrchen gelagert werden, um Kondensation zu vermeiden.

Die Inkubationsbedingungen sollten routinemäßig überprüft werden. Die Wasserbadtemperatur muss konstant 37°C ( $\pm 2^\circ\text{C}$ ) betragen, und der Wasserpegel muss über dem der Lösung in den Röhrchen gehalten werden. Die Röhrchen dürfen dabei nicht schwimmen.

Eine unsachgemäße Lagerung und Handhabung von Proben kann zu falschen Ergebnissen führen. Hämolytierte, lipämische und ikterische Proben sind zu vermeiden.

Werden nicht die entsprechenden Cortisol-Werte für Kontrollen erreicht, kann dies auf eine ungenaue Manipulation, eine falsche Handhabung oder den Verfall der Reagenzien hindeuten. In jeder Serie sollten Kontrollen verwendet werden. Für jede Serie muss eine Eichkurve erstellt werden.

Der GammaCoat Cortisol-Kit darf nicht zur Bestimmung der Cortisol-Spiegel in Proben von mit Prednisolon behandelten Patienten verwendet werden. Weitere Informationen enthält der Abschnitt "Interpretation".

### 13.2 Interpretation

Normale Cortisol-Spiegel sind in der Regel zwischen 5 und 10 Uhr morgens am höchsten und zwischen 20 Uhr abends und 4 Uhr morgens am niedrigsten.<sup>5</sup> Der nächtliche Spiegel beträgt gewöhnlich die Hälfte oder ein Drittel des morgendlichen Spiegels. Ein Anstieg des Cortisol-Spiegels bei Frauen tagsüber, der durch die Nahrungsaufnahme bedingt ist und durch Nahrungsentzug deutlich schwächer wird, wurde beschrieben.<sup>17</sup> Tagesschwankungen, Stimulation- und Suppressionstests sowie verschiedene Arten von Stresssituationen wirken sich gewöhnlich auf den Cortisol-Spiegel aus. Beispielsweise ergibt eine ACTH-Stimulation Werte, die das Zwei- bis Dreifache des morgendlichen Referenzspiegels betragen.<sup>18</sup> Metyrapon- und Dexamethasonsuppression führen in der Regel zu morgendlichen Proben mit Werten unter 5 µg/dL.<sup>10</sup> Östrogene wie z.B. in oralen Kontrazeptiva können die Ursache für erhöhte Cortisolspiegel sein, da sie die Konzentrationen von Plasma- und Serumproteinen ändern. Die Cortisol-Werte eines Patienten werden daher gewöhnlich in Bezug auf seinen morgendlichen Cortisol-Spiegel beurteilt.

Cortisol-Assays bei Patienten, die mit Prednisolon behandelt werden, sind aufgrund der hohen Kreuzreaktivität des Cortisol-Antikörpers dieses Kits mit Prednisolon und 6-Methylprednisolon kontraindiziert. Durch die hohe Kreuzreaktivität können sich scheinbar hohe Cortisol-Spiegel ergeben.

Die Cortisol-Bestimmungen anhand des direkten Urin-Protokolls führen zu klinisch gültigen Werten im Vergleich zum berichteten Normalbereich von Cortisol aus nicht extrahiertem Urin. Da allgemein bekannt ist, dass nicht identifizierte Substanzen im Urin Immunoassays zur Bestimmung von freiem Cortisol beeinträchtigen können, sind die Werte, die mit direkten Urin-Protokollen erzielt werden, höher als die von Urinproben, die mit Techniken wie der Hochdruckflüssigkeitschromatographie gereinigt wurden.<sup>19,20</sup>



## 14. ERWARTETE WERTE

### 14.1 Plasma- oder Serumspiegel

Morgens:

7-25 µg/dL oder 70-250 ng/mL

[193-690 nmol/L]

Abends:

2-9 µg/dL oder 20-90 ng/mL

[55-248 nmol/L]

Diese Bereiche können als Richtlinie verwendet werden, bis jedes Labor seine eigenen Normalbereiche ermittelt hat.

### 14.2 Cortisol aus nicht extrahiertem Urin

Der Normalbereich für Urin-Cortisol (UC) nicht extrahierter Urinproben beträgt 75-270 µg pro 24 Stunden [207-745 nmol/24 h]. Eine ungenaue Uringewinnung kann zu einer falschen Patientenbeurteilung führen. Es wurde eine Kreatininbestimmung empfohlen, um inadäquate Urinsammlungen festzustellen.<sup>21</sup>

### 14.3 Freies Cortisol aus extrahiertem Urin

Der Normalbereich für freies Cortisol im Urin beträgt 20-90 µg Cortisol pro 24 Stunden [55-248 nmol/24 h]. Eine ungenaue Uringewinnung kann zu einer falschen Patientenbeurteilung führen. Es wurde eine Kreatininbestimmung empfohlen, um inadäquate Urinsammlungen festzustellen.<sup>21</sup>

## 15. TESTCHARAKTERISTIKA

### 15.1 Präzision

Die Intra-Assay-Präzision wurde aus dem Mittelwert von 20 gleichzeitigen Assays pro Serumprobe bestimmt. Die Inter-Assay-Präzision wurde aus dem Mittelwert der Duplikate für 20 getrennte Serien bestimmt.

Intra-Assay-Präzision Probe	Anz. der Tests	Mittelwert (µg/dL)	Standardabweichung (µg/dL)	Variationskoeffizient (%)
Serum-Pool A	20	2,9	0,19	6,6
Serum-Pool B	20	12,1	0,93	7,7
Serum-Pool C	20	47,1	3,18	6,8

Inter-Assay-Präzision Probe	Anz. der getrennten Serien	Mittelwert (µg/dL)	Standardabweichung (µg/dL)	Variationskoeffizient (%)
Serum-Pool D	20	3,7	0,33	9,0
Serum-Pool E	20	12,1	1,19	9,8
Serum-Pool F	20	36,9	3,24	8,8

**15.2 Richtigkeit:** Die Richtigkeit des Assays wurde mit Hilfe des Wiederfindungstests überprüft.

### Wiederfindung bei gepoolten Seren

Angereicherte Proben wurden vorbereitet, indem eine bekannte hohe Cortisol-Probe mit einem zuvor analysierten Serum-Pool verdünnt wurde. Jede angereicherte Probe wurde vierfach untersucht. Die Wiederfindungsrate wird wie folgt berechnet: (wiedergefunden/erwartet) x 100.

Beitrag des Spikes (µg/dL)	Beitrag des Pools (µg/dL)	Erwarteter Wert (µg/dL)	Wiedergefundener Wert (µg/dL)	Wiederfindungsrate (%)
4,2	1,6	5,8	5,5	95
11,2	1,6	12,7	12,8	101
17,2	1,6	18,8	18,4	98
26,3	1,6	27,9	25,4	91
41,2	1,6	42,8	39,2	92

### 15.3 Analytische Sensitivität

Die Sensitivität der Eichkurve wird als der kleinste Einzelwert definiert, der von null unterschieden werden kann. Die statistische Schätzung der kleinsten nachweisbaren Konzentration (Sensitivität) wurde nach der Methode von D. Rodbard<sup>22</sup> für 30 Replikate am Nullpunkt der Eichkurve berechnet. Die berechnete Sensitivität beträgt 0,21 µg/dL.

### 15.4 Avidität

Die berechnete Affinitätskonstante des Cortisol-Antiserums beträgt ca.  $2 \times 10^8$  Liter/Mol.

### 15.5 Analytische Spezifität

Die Kreuzreaktivität des in diesem Kit verwendeten Antiserums wird ausgedrückt als das Verhältnis der Cortisol-Konzentration zur Konzentration der kreuzreaktiven Substanz bei 50 % Inhibierung der maximalen Bindung.

Verbindung	% Kreuzreaktivität
Cortisol	100
Prednisolon	25,5
6-Methylprednisolon	14,5
11-Deoxycortisol	9,8
17-Hydroxyprogesteron	0,4
Corticosteron	0,9
Dexamethason	0,049
Prednison	3,8
Deoxycorticosteron	0,14
Tetrahydrocortison	0,2
Aldosteron	<0,1
β-Cortol	<0,1
β-Cortolon	<0,1
Cortison	10,3
Dihydrocortison	0,43
Progesteron	0,015
Spirolacton	<0,1
Tetrahydrocortisol	0,3
6-β-Hydrocortison	4,2

**LITERATURANGABEN FINDEN SIE AUF DER LETZTEN SEITE**

## EQUIPO RIA GAMMACOAT™ PARA CORTISOL

### 1. USO INDICADO

#### PARA UTILIZACIÓN EN DIAGNÓSTICOS IN VITRO

El equipo RIA GammaCoat™ [<sup>125</sup>I] para cortisol tiene como finalidad la determinación cuantitativa de los niveles de cortisol (hidrocortisona, compuesto F) en suero, plasma u orina.

### 2. RESUMEN Y EXPLICACIÓN

El cortisol (hidrocortisona, compuesto F) es el principal glucocorticoide segregado por la corteza suprarrenal. Entre sus efectos fisiológicos se encuentran la actividad antiinflamatoria, el mantenimiento de la presión sanguínea y la síntesis de hidratos de carbono y proteínas.

Los glucocorticoides se sintetizan en respuesta a la hormona adrenocorticotrópica (ACTH) segregada por el lóbulo anterior de la glándula pituitaria. En los individuos normales, el cortisol participa en un ciclo de retroalimentación negativa con la ACTH a través del eje cortical hipotálamo - hipófisis - suprarrenal (eje HPA). La ACTH pituitaria, a su vez, se regula a través del factor liberador de corticotropina (CRF) secretado por el hipotálamo. El CRF hipotálamico es sensible a los niveles de cortisol y al estrés. El estrés físico y fisiológico, la variación diurna y los niveles de azúcar bajos afectan a la velocidad de secreción del cortisol.<sup>1-6</sup>

La disfunción de algún órgano del eje HPA tiene como resultado la alteración de los niveles de cortisol.<sup>7,8</sup> La evaluación del funcionamiento de la glándula suprarrenal mediante la medición del nivel de cortisol en plasma o suero es de gran ayuda en el diagnóstico de estados normales o anormales. La combinación de mediciones matinales y vespertinas y las pruebas de estimulación y supresión pueden ofrecer pruebas evidentes para el diagnóstico de enfermedades específicas de la glándula suprarrenal. El diagnóstico de la enfermedad de Addison (insuficiencia suprarrenal crónica) y el síndrome de Cushing (producción excesiva de la glándula suprarrenal) son dos ejemplos en los que el ensayo del nivel de cortisol circulante ayuda en la evaluación del paciente.<sup>9,10</sup>

### 3. PRINCIPIOS DEL ENSAYO

El procedimiento del equipo RIA GammaCoat [<sup>125</sup>I] para cortisol se basa en los principios de unión competitiva del ensayo radioinmunológico.<sup>11</sup> Se incuban calibradores y muestras desconocidas (suero, plasma u orina) con trazador de cortisol en tubos recubiertos de anticuerpo en los que éste último se inmoviliza en la pared interna más baja del tubo GammaCoat. Tras la incubación, el contenido del tubo se aspira o se decanta y el tubo se cuenta. Se prepara una curva de calibrador con 5 calibradores de suero entre 1 y 60 µg/dL. Los valores desconocidos se interpolan a partir de la curva de calibración. Todo el ensayo se realiza en el tubo recubierto. No es preciso preparar una disolución separada de la muestra, desnaturalizar las proteínas ni realizar extracciones para las muestras de suero, orina o plasma.

Además de los ensayos de cortisol en orina sin extracciones, el procedimiento del equipo RIA GammaCoat [<sup>125</sup>I] para cortisol también puede utilizarse para medir cortisol urinario libre (no conjugado). El cortisol presente en la orina debe extraerse en primer lugar en cloruro de metileno. Una parte alícuota del extracto se evapora directamente en el tubo recubierto de anticuerpos GammaCoat (los experimentos realizados han demostrado que no se producen efectos deletéreos sobre el tubo recubierto con anticuerpos si se utiliza cloruro de metileno de buena calidad). Para garantizar que las muestras contienen los niveles de proteína apropiados, se añaden 10 microlitros de suero para ensayo en blanco de cortisol (CA-2367) a cada tubo GammaCoat. El remanente del procedimiento es el mismo que el utilizado para la determinación de cortisol en suero, plasma o en orina sin extracción. Debe controlarse la eficiencia de la extracción de cortisol de la orina mediante cloruro de metileno.

#### 4. REACTIVOS SUMINISTRADOS CON EL EQUIPO

Calibradores de cortisol (A-F)	6 viales/1 mL	6 viales/1 mL
Tubos recubiertos de cortisol	2 bolsas /50 cada una	10 bolsas / 50 cada una
Trazador de cortisol	1 vial/10 mL	5 viales/10 mL cada uno
Tampón PBS	1 vial/100 mL	5 viales / 100 mL cada uno
Número de pruebas	100	500

ALMACENAMIENTO: Todos los reactivos incluido el reactivo trazador - tampón son estables hasta la fecha de caducidad impresa en la etiqueta del equipo si se almacenan entre 2 y 8 °C. Los tubos recubiertos con anticortisol pueden almacenarse entre 2 y 27 °C. No utilice los reactivos con posterioridad a su fecha de caducidad. No deben mezclarse reactivos de diferentes lotes.

##### 4.1 Trazador de cortisol: reactivo listo para utilizar

Cada vial contiene aproximadamente 4 µCi de trazador (<1 µg/mL Cortisol) en 10 mL de solución salina tamponada con fosfato, ANS (ácido 8-anilino-1-naftalén sulfónico) con un agregado de azida sódica al 0,1% como conservante.

##### 4.2 Tubos recubiertos de suero anticortisol de conejo: reactivo listo para utilizar

Tubos de 12 x 75 mm recubiertos con suero anticortisol de conejo (título <1 µg/tubo) y empaquetados en una bolsa de plástico.

##### 4.3 Tampón PBS: reactivo listo para utilizar

Cada botella contiene 100 mL de solución salina tamponada con fosfato con un agregado de azida sódica al 0,1% como conservante.

##### 4.4 Calibradores de suero de cortisol: reactivo listo para utilizar

Cada vial contiene cortisol en 1 mL de suero humano procesado con un agregado de azida sódica al 0,1% como conservante. Los calibradores se suministran en las concentraciones siguientes: 0, 1, 3, 10, 25 y 60 µg/dL, respectivamente. Los calibradores de cortisol de DiaSorin están calibrados según el estándar de referencia de cortisol de la U.S.P. Si se comparan con otros productos o procedimientos debe tenerse en cuenta este estándar de referencia. Los calibradores del equipo han demostrado tener conmutabilidad con muestras de pacientes cuando se utilizan con los reactivos y el procedimiento recomendados para esta prueba de diagnóstico in vitro.

##### 4.5 Etiqueta auxiliar

Para reactivo trazador - tampón

##### 4.6 DISPONIBLE SOBRE PEDIDO:

Papel para gráficos semilogarítmico

50 hojas por bloc

#### 5. ADVERTENCIAS Y PRECAUCIONES

PARA UTILIZACIÓN EN DIAGNÓSTICOS IN VITRO.

No debe destinarse al uso interno o externo en seres humanos ni animales.

##### Reactivos que contienen material de origen humano

##### Trátense como potencialmente infeccioso.

Todas las unidades de donantes de suero/plasma se han probado en conformidad con un método de la FDA y se ha determinado que no son reactivas por la presencia de HBsAg, anticuerpo de HCV ni anticuerpo de HIV 1/2. Aunque estos métodos son altamente precisos, no puede garantizarse que se detecten todas las unidades infectadas. Este producto también puede contener otros materiales de origen humano para los cuales no existe prueba homologada. Dado que ningún método de prueba puede ofrecer una seguridad total de la ausencia del virus de la hepatitis B (VHB), de la hepatitis C (VHC), el virus de inmunodeficiencia humana (VIH) u otros agentes infecciosos, todos los productos que contengan material de origen humano se deben manejar de acuerdo con las prácticas de laboratorio correctas utilizando las precauciones adecuadas que se describen en "Biosafety in Microbiological and Biomedical Laboratories", 4<sup>a</sup> ed., mayo 1999 o actual, para centros de control de enfermedades e institutos nacionales de salud y prevención.

### **REACTIVOS CON CONTENIDO DE AZIDA SÓDICA**

**PRECAUCIÓN:** Algunos reactivos de este equipo contienen azida sódica. La azida sódica puede reaccionar con las cañerías de plomo y cobre y formar azidas metálicas altamente explosivas. Al desecharlo, enjuague con abundante agua para evitar que se acumule la azida. Para obtener información adicional, consulte "Decontamination of Laboratory Sink Drains to Remove Azide Salts", en el manual Guide-Safety Management N° CDC-22 publicado por Centers for Disease Control and Prevention, Atlanta, GA, 1976.

#### **Advertencias establecidas en la Comunidad Europea sobre el riesgo de sustancias peligrosas (Directiva del Consejo 1999/45/EC)**

R 20/21/22 - Nocivo por inhalación, por ingestión y en contacto con la piel.

R 32 - En contacto con ácidos libera gases altamente tóxicos.

S28 - En caso de contacto con la piel, lávese inmediatamente con abundante agua.

### **REACTIVOS CON CONTENIDO DE YODO-125**

Para almacenar, manejar y desechar este material, deben adoptarse las precauciones necesarias y prácticas de laboratorio correctas.

Para facultativos o instituciones que reciben radioisótopos con licencia genérica:

Este material radiactivo sólo deben recibirlo, adquirirlo, poseerlo y utilizarlo médicos, veterinarios que practiquen la medicina veterinaria, laboratorios clínicos u hospitales, y sólo para pruebas in vitro clínicas o de laboratorio que no conlleven la administración interna o externa del material ni su radiación a seres humanos ni animales. Su recepción, adquisición, posesión, uso y transferencia se rigen por la normativa y la licencia genérica de la Comisión Reguladora Nuclear del estado en el que la Comisión haya llegado a un acuerdo para el ejercicio de su autoridad reguladora.

1. El almacenamiento del material radiactivo debe limitarse a un área destinada específicamente a tal efecto.
2. El acceso a materiales radiactivos debe estar limitado a personal autorizado únicamente.
3. No recoja material radiactivo con la pipeta usando la boca.
4. No coma ni beba dentro de las áreas destinadas a trabajos radiactivos.
5. Las áreas donde puedan producirse derrames deben enjugarse y después lavarse con un detergente alcalino o una solución descontaminante radiológica. Todo recipiente de vidrio utilizado debe enjuagarse completamente con agua antes de lavarse con otros recipientes de laboratorio.

Para facultativos o instituciones que reciben radioisótopos con licencia específica:

La recepción, uso, transferencia y eliminación de los materiales radiactivos se rigen por la normativa y las condiciones de la licencia en cuestión.

**ADVERTENCIA:** Este producto contiene una sustancia química conocida por el Estado de California como causante de cáncer.

**ATENCIÓN:** La radiactividad impresa en el interior del paquete puede diferir ligeramente de la impresa en la etiqueta de la caja y en la del vial del trazador. La etiqueta de la caja y la del trazador indican la cantidad real de radiactividad en la fecha de la calibración, mientras que el impreso del interior del paquete indica la radiactividad teórica del equipo.

## 6. RECOLECCIÓN Y PREPARACIÓN DE LA MUESTRA

### Muestras de plasma

Recoja una muestra de sangre venosa de forma aséptica en un tubo de cristal vacío que contenga heparina o EDTA.

Separe la parte plasmática. El plasma puede almacenarse refrigerado durante una noche entre 2 y 8 °C. Si desea guardarlo más tiempo, debe congelarlo a -20 °C. Deben evitarse las muestras hemolizadas, lipémicas o ictericas.

### Muestras de suero

Si bien en general se utilizan muestras de plasma para los ensayos de cortisol, pueden obtenerse resultados comparables utilizando muestras de suero.<sup>12</sup>

Separe la parte de suero. El suero puede almacenarse refrigerado durante una noche entre 2 y 8 °C. Si desea guardarlo más tiempo, debe congelarlo a -20 °C. Debe evitarse la utilización de muestras hemolizadas, lipémicas o ictericas.

### Muestras de orina

Recoja una muestra de orina de 24 horas. Registre el volumen total de orina. Añada 10 gramos de ácido bórico por litro de orina como conservante, y guarde una parte alícuota bien mezclada congelada a -20 °C. Descongele las muestras congeladas a temperatura ambiente y mézclelas bien antes de utilizarlas.

## 7. EQUIPO Y MATERIALES NECESARIOS PERO NO SUMINISTRADOS

- 7.1 Baño de agua a temperatura constante de  $37 \pm 2^\circ\text{C}$ .
- 7.2 Pipeta de precisión (10  $\mu\text{L}$ ).
- 7.3 Pipeta semiautomática (1,0 mL).
- 7.4 Contador Gamma.
- 7.5 Portatubos.
- 7.6 Aspirador de agua (opcional).
- 7.7 Mezclador vórtex.
- 7.8 Papel absorbente con reverso de plástico (opcional).

Suplementos adicionales para utilizar únicamente en la extracción de orina:

1. Tubos de ensayo desechables de cristal (12 x 75 mm) y tapones.
2. Cloruro de metileno (diclorometano; grado reactivo analítico ACS).
3. Baño de hielo.
4. Pipetas de precisión (100 y 200  $\mu\text{L}$ ).
5. Extractor o área bien ventilada.
6. Modo de evaporación del cloruro de metileno. Esto puede realizarse con un chorro de aire seco o de nitrógeno calentando con suavidad el extracto hasta alrededor de 37 °C bajo una campana extractora o en una zona bien ventilada.

## 8. PROCEDIMIENTO DE EXTRACCIÓN DE ORINA

Este procedimiento incluye la metodología para determinar la eficacia de la extracción de cloruro de metileno. La recuperación de cortisol de muestras de orina alcanzó un  $99 \pm 14\%$  en los laboratorios de DiaSorin.

- 8.1 Coloque un volumen adecuado de cloruro de metileno en un baño de hielo para que se enfríe. Disponga más de 1 mL por tubo. El baño de hielo debe ser suficientemente grande como para colocar un vaso de precipitados con cloruro de metileno y el soporte de los tubos de cristal para extracción.
- 8.2 Para determinar la eficacia de extracción, etiquete con la identificación del paciente dos tubos desechables de cristal para cada muestra que desee utilizar en el ensayo. Ponga una etiqueta con una "M" para la muestra y otro con una "E" para la eficacia de extracción.
- 8.3 Agregue 200 microlitros de una muestra de orina de 24 horas bien mezclada en los tubos "M" y "E".

- 8.4 En cada tubo "E" añada 10 µL de calibrador de suero para cortisol de 60 µg/dL. Agite el portatubos para mezclar los reactivos o mezcle cada tubo por separado.
- 8.5 Agregue 1,0 mL de cloruro de metileno frío a cada tubo "M" y "E". Agite en vórtex para extraer el cortisol en la capa orgánica. Tápelolo o cúbralo y colóquelo en un baño de hielo para evitar una evaporación excesiva del cloruro de metileno. Para facilitar la dosificación del cloruro de metileno con pipeta, es importante absorber cloruro de metileno FRÍO 3 ó 4 veces antes de transferirlo a los tubos apropiados.
- 8.6 Mientras espera que tenga lugar la fase de separación, etiquete dos tubos GammaCoat para cortisol para cada tubo "M" y dos para cada tubo "E".
- 8.7 Tras la fase de separación, retire con cuidado 100 µL de la capa inferior (cloruro de metileno) de cada tubo y agréguelo a los tubos GammaCoat con la etiqueta correspondiente. Para minimizar la filtración de la muestra extraída por la punta de la pipeta es conveniente mojar ésta en cloruro de metileno frío antes de extraer la muestra. Cuando se traspasan los 100 µL de parte alícuota de la disolución de extracción al tubo recubierto, no intente limpiar la punta de la pipeta, porque las propiedades físicas del cloruro de metileno provocan fugas y burbujas de aire en ésta.
- Para facilitar el traspaso de la solución de extracción al tubo recubierto sujete el tubo de extracción y el tubo GammaCoat en la misma mano. Rápidamente pero con cuidado, traspase los 100 µL de extracto a la parte inferior del tubo GammaCoat.
- 8.8 Evapore el cloruro de metileno de los tubos GammaCoat con un chorro de aire seco o de nitrógeno y calentando el extracto hasta 37 °C.
- PRECAUCION:** Evite concentraciones excesivas de vapores de hidrocarburos halogenados en las áreas de trabajo. LA EVAPORACIÓN DEBE REALIZARSE ÚNICAMENTE JUNTO A UN EXTRACTOR O EN UNA ZONA BIEN VENTILADA.
- 8.9 Una vez que el cloruro de metileno se ha evaporado por completo, agregue 10 µL del suero para ensayo en blanco de cortisol de 0 µg/dL, CA-2367, a cada tubo GammaCoat de muestra del paciente ("M" y "E"), para garantizar que las muestras contienen los niveles adecuados de proteína.
- 8.10 Continúe con el procedimiento RIA; comience con el paso 1 del procedimiento de ensayo.

## 9. PROCEDIMIENTO DE ENSAYO

### Reactivo trazador – tampón:

Agregue todo el contenido de 1 vial de cortisol a 1 botella de tampón PBS y mezcle con suavidad. Un aclarado final del vial de trazador de cortisol con el reactivo trazador – tampón maximiza el traspaso del trazador. Llénelo y coloque la etiqueta de reactivo trazador – tampón auxiliar al contenedor para su identificación. El reactivo trazador – tampón debe almacenarse en la oscuridad o en un contenedor recubierto con una lámina de plástico entre 2 y 8 °C.

El procedimiento de ensayo incluye la preparación de una curva de calibrador a partir de la cual se interpola el contenido de cortisol desconocido de la muestra.

- 9.1 Deje que los reactivos alcancen la temperatura ambiente y mezcle bien sin formar espuma antes de utilizarlos.
- 9.2 Etiquete por duplicado los tubos GammaCoat de acuerdo con el programa siguiente. En ocasiones se precisan tubos de cuentas totales [T1,T2] y tubos B0 [1,2] para ciertos programas de reducción de datos y de control de calidad, pero pueden omitirse si la curva de calibrador se realiza sobre papel de gráfico semilogarítmico.<sup>13-15</sup>

- 9.3** Agregue a la parte inferior de los tubos GammaCoat duplicados apropiados:
- 10  $\mu\text{L}$  de suero para ensayo en blanco de cortisol, o cada calibrador de suero para cortisol.
  - PARA MUESTRAS DE SUERO, PLASMA Y ORINA SIN EXTRAER, agregue 10  $\mu\text{L}$  de cada muestra. Tenga cuidado de dosificar los calibradores y las muestras del mismo modo.<sup>16</sup>
  - PARA MUESTRAS DE ORINA EXTRAÍDAS, utilice los tubos GammaCoat con las muestras extraídas desde el paso 9 del Procedimiento de extracción de orina.
- NOTA: Si desea diluir las muestras de suero o plasma del paciente, utilice el suero para ensayo en blanco provisto en el equipo como disolvente. Tanto con muestras de orina extraídas como sin extraer, diluya con agua destilada cuanto sea preciso. Para cortisol urinario libre, extraiga una parte alícuota de 200  $\mu\text{L}$  de la muestra de orina diluida (Procedimiento de extracción de orina, Paso 3). Continúe con el ensayo de rutina. El factor de disolución debe incluirse en los cálculos.
- 9.4** Agregue 1,0 mL de reactivo trazador – tampón a cada tubo. Mezcle con suavidad cada tubo en un mezclador vórtex a baja velocidad.
- 9.5** Incube los tubos durante 45 minutos en un baño de agua a  $37 \pm 2^\circ \text{C}$ .
- 9.6** Aspire o decante todos los tubos excepto los de cuentas totales.
- EN EL CASO DE QUE NO SE ELIMINE DE FORMA CORRECTA LA DISOLUCIÓN ADHERIDA, LA DUPLICACIÓN PUEDE RESULTAR INSUFICIENTE Y LOS VALORES INCORRECTOS.
- Si se utiliza la técnica de aspiración, compruebe que la punta de plástico del aspirador toca la parte inferior del tubo recubierto y que se extrae todo el líquido.
- Si se utiliza la técnica de decantación, permita que los tubos drenen en posición invertida durante 3 a 5 minutos. Golpee suavemente los tubos sobre un papel absorbente para eliminar todo el líquido adherido antes de colocar los tubos hacia arriba.
- 9.7** Determine el número de cuentas de todos los tubos en un contador gamma durante 1 minuto con la ventana ajustada de forma apropiada para yodo-125.
- 9.8** Calcule los resultados. Consulte Resultados.

## 10. PROCEDIMIENTO SALIVAL

El equipo también permite los ensayos de muestras de saliva.

Se ha demostrado que existe una buena correlación entre la concentración de cortisol en la saliva y la concentración de cortisol libre en plasma y suero (estas concentraciones representan entre un 60 y un 100% de la concentración de la fracción libre en circulación y entre un 4 y un 6% de la concentración en suero o plasma).

Numerosos estudios han demostrado las ventajas prácticas y de diagnóstico de los ensayos de cortisol salival y confirmado su validez y valor clínico.

Se tuvieron en cuenta dos importantes puntos al adaptar esta técnica a los ensayos de cortisol salival:

En primer lugar, dado que el cortisol salival representa solo el 5% de todo el cortisol en plasma, es preciso multiplicar por 20 la sensibilidad. Para alcanzar este nivel de sensibilidad, la muestra de saliva se incrementa a un volumen de 200  $\mu\text{L}$ .

En segundo lugar, la saliva tiene menor concentración de proteínas (que en general son enzimas y glicoproteínas). Solo están presentes cantidades mínimas de proteínas plasmáticas, y las proteínas de unión con corticoesteroides están ausentes. Para garantizar que los efectos de la matriz proteica son similares en la muestra y en los niveles estándar, se añade calibrador 0 (sin cortisol) a cada muestra de saliva (como para los ensayos con muestras de orina extraída).



De este modo, solo es necesario realizar pequeñas modificaciones en la dosificación de muestras y niveles estándar para adaptar el método a los ensayos sobre muestras de saliva, utilizando únicamente reactivos provistos en el equipo.

### 10.1 Recogida y preparación de muestras de saliva

La saliva debe recogerse 10 minutos después de que el paciente se haya enjuagado la boca con agua del grifo. No debe estimularse la producción de saliva y debe informarse al paciente de la diferencia entre saliva y mucosidad. Puede recogerse un volumen de 1 mL de saliva en pocos minutos, incluso en el caso de niños.

Las muestras se almacenan congeladas a  $-20^{\circ}\text{C}$ . Antes del ensayo deben descongelarse y centrifugarse; el líquido sobrenadante se bombea hacia el exterior para el ensayo.

### 10.2 Procedimiento salival

Para cada **muestra de saliva**, dosifique 10  $\mu\text{L}$  de calibrador 0 en parejas en los tubos etiquetados; agregue 200  $\mu\text{L}$  de la muestra y 1 mL de trazador.

Para una **velocidad estándar**, dosifique 10  $\mu\text{L}$  de calibrador 0 o el estándar en parejas en los tubos etiquetados; agregue 200  $\mu\text{L}$  de tampón PBS, más 1 mL de trazador.

Agite cada tubo con movimientos envolventes. Incube durante 45 min en un baño de agua a  $37^{\circ}\text{C}$ . Extraiga el contenido de los tubos por bombeo o por decantación y mida la radioactividad unida a los lados del tubo durante un minuto.

Curva estándar

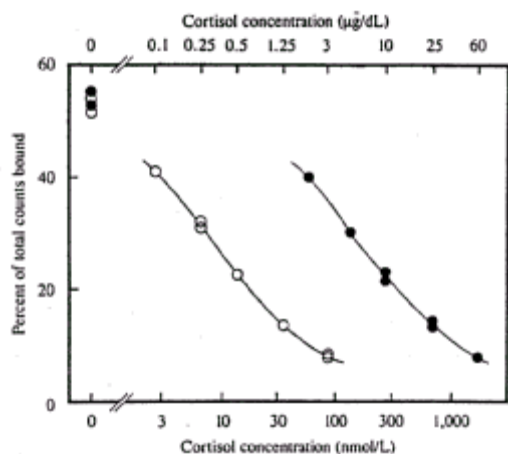


Figure 3

Standard curves for assay of cortisol in serum or plasma (●) and in saliva (○) with the GammaCoat™ [ $^{125}\text{I}$ ] RIA kit.

Nota: Esta curva se obtuvo durante un estudio realizado en 1984 con un rango estándar de 0, 2,0, 5,0, 10, 25 y 60  $\mu\text{g/dL}$ . Desde entonces se ha modificado el rango estándar. Consulte el nuevo rango para los cálculos de cortisol salival teniendo en cuenta una proporción de 1:20.

El rango estándar real para el cortisol salival es de 0,10 - 0,25 - 0,50 - 1,25 y 3,0  $\mu\text{g/dL}$ . Las curvas estándar para las dos técnicas de ensayo (suero y saliva) cubiertas por este equipo se ilustran en el gráfico de la izquierda.

Si bien el volumen de incubación es algo mayor en el ensayo salival que en el de suero (1,210  $\mu\text{L}$  en lugar de 1,010  $\mu\text{L}$ ), esto no tiene ningún efecto sobre la capacidad de unión marcante en el rango de la curva estándar.

## Valores normales

Tabla 1

Niveles normales de cortisol matinal en saliva y suero ( $\mu\text{g}/\text{dL}$ )						
Grupo de sujetos*	Saliva			Suero		
	n	Media	Rango	n	Media	Rango
Adultos normales	150	0,43	0,18 – 1,01	103	6,5	4,5 – 21,1
Niños (4 - 11 años)	105	0,40	0,14 – 0,91	---	---	---
Mujeres embarazadas (3 <sup>er</sup> trimestre)	84	0,47	0,33 – 0,91	84	15,7	12,9 – 39,9

\* Residentes en GB

## 11. CONTROL DE CALIDAD

Cada laboratorio debe utilizar controles a diferentes niveles para supervisar el rendimiento del ensayo. Los controles deben tratarse como desconocidos. Deben realizarse gráficos de control de calidad para seguir el rendimiento de los controles, así como utilizarse métodos estadísticos apropiados para evaluar las tendencias. Cada laboratorio debe determinar los límites de rendimiento aceptables.

## 12. CÁLCULO DE RESULTADOS

De forma simultánea pueden realizarse ensayos sobre muestras de suero, plasma y orina desconocidas y todas ellas se interpolan de la curva de calibrador generada con los calibradores de suero de cortisol. Las muestras de cortisol urinario sin extracción (UC) y las de cortisol urinario libre (UFC) se transforman en " $\mu\text{g}/24$  horas" con la fórmula apropiada.

- 12.1 Registre las cuentas por minuto (CPM) límite para cada tubo.
- 12.2 Trace el límite de CPM para calibradores de cortisol (eje vertical) frente a la concentración de cortisol (eje horizontal) sobre un papel para gráficos semilogarítmico.
- 12.3 Dibuje la curva que mejor se adapte. Si desea un gráfico y datos típicos, consulte la TABLA II y la FIGURA 1.
- 12.4 Coloque el límite de CPM para cada tubo correspondiente a cada muestra (controles, suero, plasma, orina extraída y sin extraer) en el eje vertical y siga una línea horizontal que interseccione con la curva de calibrador. En el punto de intersección, lea la concentración de cortisol ( $\mu\text{g}/\text{dL}$ ) en el eje horizontal.

### 12.5 Cortisol urinario sin extraer

Para convertir el cortisol urinario (UC) de muestras de orina sin extraer de  $\mu\text{g/dL}$  a cortisol  $\mu\text{g}$  por 24 horas, utilice la ecuación siguiente:

$$\text{UC} = \frac{\text{S} \times \text{V}}{100}$$

donde:

- S = concentración de muestra de orina sin extraer en  $\mu\text{g/dL}$
- V = volumen total de orina en mL/24 horas
- 100 = factor de conversión

### 12.6 Cortisol urinario extraído libre

Para convertir el cortisol urinario libre (UFC) de muestras de orina extraídas de  $\mu\text{g/dL}$  a cortisol  $\mu\text{g}$  por 24 horas, utilice la ecuación siguiente:

$$\text{UFC} = \frac{\text{S} \times \text{V}}{33,3 (\text{E} - \text{S})}$$

donde:

- S = concentración de muestra de orina extraída en  $\mu\text{g/dL}$
- E = eficiencia de concentración en tubo para la muestra correspondiente en  $\mu\text{g/dL}$
- V = volumen de orina total en mL/24 horas

33,3 = factor de eficiencia de extracción y de disolución combinado

Ejemplo:

- E = 13,50  $\mu\text{g/dL}$
- S = 7,85  $\mu\text{g/dL}$
- V = 1150 mL/24 horas

$$\text{UFC} = \frac{(7,85) (1150)}{33,3 (13,50 - 7,85)} = 48 \mu\text{g cortisol/24 horas}$$

Para los laboratorios que deseen supervisar la eficiencia del procedimiento de extracción de orina (EE), la fórmula siguiente puede utilizarse para calcular la eficiencia como porcentaje.

$$\text{EE} = \frac{\text{E} - \text{S}}{6,0} \times 100$$

donde:

- S = Concentración de muestra de orina extraída en  $\mu\text{g/dL}$
- E = Eficiencia de concentración en tubo para muestra correspondiente en  $\mu\text{g/dL}$
- 6,0 = Diferencia esperada entre la concentración de los tubos "E" y "M" en  $\mu\text{g/dL}$
- 100 = Factor de conversión

### 12.7 Unidades de S.I.

Utilizando un peso molecular de 362,5 dalton, los calibradores de suero, controles y valores del paciente (suero y plasma) pueden convertirse de microgramos por decilitro ( $\mu\text{g}/\text{dL}$ ) a nanomoles por litro ( $\text{nmol}/\text{L}$ ), unidades del S.I., multiplicando por 27,59 (en la TABLA II se muestran los valores de los calibradores de cortisol en ambas unidades). Del mismo modo, los controles de orina extraídos y sin extraer y los valores del paciente pueden convertirse de microgramos por 24 horas ( $\mu\text{g}/24 \text{ hr}$ ) a nanomoles por 24 horas ( $\text{nmol}/24 \text{ hr}$ ), unidades del S.I., multiplicando por 2,76.

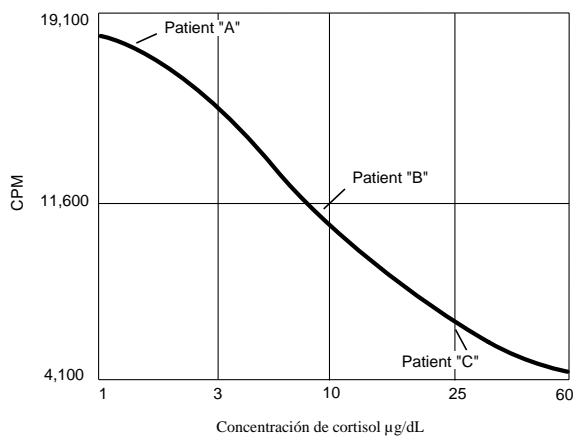
**TABLA II**  
Concentración de calibradores

Nº cat	Nivel de calibrador	Unidades del S.I.
CA-2367	0 $\mu\text{g}/\text{dL}$	0 $\text{nmol}/\text{L}$
CA-2358	1 $\mu\text{g}/\text{dL}$	28 $\text{nmol}/\text{L}$
CA-2359	3 $\mu\text{g}/\text{dL}$	83 $\text{nmol}/\text{L}$
CA-2370	10 $\mu\text{g}/\text{dL}$	276 $\text{nmol}/\text{L}$
CA-2371	25 $\mu\text{g}/\text{dL}$	690 $\text{nmol}/\text{L}$
CA-2372	60 $\mu\text{g}/\text{dL}$	1655 $\text{nmol}/\text{L}$

**TABLA III**  
 Registro de los datos  
 No utilice para calcular desconocidos

Nº tubo	Contenido de los tubos	Límite CPM	Concentración de cortisol (µg/dL)
T1	Cuentas totales (trazador - tampón)	44516	
T2	Cuentas totales (trazador - tampón)	43651	
1	Suero para ensayo en blanco de cortisol, B <sub>0</sub>	0 µg/dL 22311	
2	Suero para ensayo en blanco de cortisol, B <sub>0</sub>	0 µg/dL 22771	0
3	Calibrador de suero de cortisol	1 µg/dL 19216	
4	Calibrador de suero de cortisol	1 µg/dL 19243	1
5	Calibrador de suero de cortisol	3 µg/dL 15331	
6	Calibrador de suero de cortisol	3 µg/dL 15731	3
7	Calibrador de suero de cortisol	10 µg/dL 10660	
8	Calibrador de suero de cortisol	10 µg/dL 10294	10
9	Calibrador de suero de cortisol	25 µg/dL 6862	
10	Calibrador de suero de cortisol	25 µg/dL 6657	25
11	Calibrador de suero de cortisol	60 µg/dL 4186	
12	Calibrador de suero de cortisol	60 µg/dL 4224	60
13	Muestra "A" del paciente	18470	1,3
14	Muestra "A" del paciente	18992	1,1
			Media: 1,2
15	Muestra "B" del paciente	10377	10,1
16	Muestra "B" del paciente	10608	9,6
			Media: 9,9
17	Muestra "C" del paciente	6316	28,8
18	Muestra "C" del paciente	6318	28,8
			Media: 28,8

**Resultados típicos**  
 No utilizar para calcular desconocidos



**FIGURA 1**

### 13. LIMITACIONES DEL PROCEDIMIENTO

#### 13.1 Procedimiento

El reactivo trazador - tampón debe protegerse de la luz. Los tubos recubiertos están listos para utilizar tal como se reciben y deben almacenarse entre 2 y 27 °C. El envoltorio de plástico debe cerrarse bien si se guardan tubos no utilizados con el fin de evitar la condensación.

Las condiciones de incubación deben comprobarse de forma rutinaria. La temperatura del baño de agua debe ser constante a 37 ±2° C y el nivel de agua debe mantenerse por encima de la disolución de los tubos sin permitir que éstos floten.

El usuario debe saber que los resultados pueden ser erróneos si las muestras se almacenan o manejan de modo incorrecto. Deben evitarse las muestras hemolizadas, lipémicas e ictericas.

Si no se obtienen los valores de cortisol adecuados para los controles, puede ser debido a manipulaciones imprecisas, tratamiento inadecuado o deterioro de los reactivos. Deben incluirse controles en todos los ciclos. Debe establecerse una curva de calibrador para cada ciclo.

El equipo GammaCoat para cortisol no debe utilizarse para cuantificar los niveles de cortisol en muestras de pacientes tratados con prednisolona. Consulte las limitaciones interpretativas.

#### 13.2 Interpretativas

En general, los niveles normales de cortisol son más altos entre las 5 y las 10 de la mañana y más bajos entre las 20 y las 4.<sup>5</sup> Los niveles entre las 12 y las 24 horas son generalmente 1/2 o 1/3 de los valores de 0 a 12 horas. Se ha descrito un incremento del nivel de cortisol a mediodía en mujeres, coincidiendo con la ingesta de comida y marcadamente atenuado por la falta de esta.<sup>17</sup> La variación diurna, las pruebas de estimulación y supresión y diferentes tipos de situaciones estresantes alteran normalmente los niveles de cortisol. Por ejemplo, la estimulación de ACTH generalmente produce valores dos o tres veces mayores que el nivel referente entre 0 y 12 horas.<sup>18</sup> La supresión de la metirapona y la dexametasona generalmente produce muestras matutinas con valores inferiores a 5 µg/dL.<sup>10</sup> Los estrógenos como contraceptivo oral pueden provocar elevados niveles de cortisol como resultado de la alteración de las concentraciones de las proteínas del plasma y el suero. De este modo, los valores de cortisol de cada paciente se evalúan generalmente en referencia a su nivel de cortisol entre las 0 y las 12 horas.

Los ensayos de cortisol sobre muestras de pacientes bajo tratamiento con prednisolona están contraindicados debido a la alta reactividad cruzada del anticuerpo de cortisol de este equipo con la prednisolona y la 6-metilprednisolona. La alta reactividad cruzada puede producir niveles de cortisol aparentemente altos.

Las determinaciones de cortisol generadas por el protocolo urinario directo tendrán como resultado valores clínicamente válidos cuando se comparan con el rango normal de cortisol urinario no extraído registrado. Es bien sabido que las sustancias no identificadas presentes en la orina pueden interferir en los ensayos inmunológicos de cortisol; por esto, los valores obtenidos directamente de protocolos urinarios serán más altos que aquellos obtenidos a partir de muestras de orina purificada mediante técnicas como cromatografía líquida de alta presión.<sup>19,20</sup>

### 14. VALORES PREVISTOS

#### 14.1 Niveles de plasma o suero

Mañanas:

7-25 µg/dL o 70-250 ng/mL

[193-690 nmol/L]

Tardes:

2-9 µg/dL o 20-90 ng/mL

[55-248 nmol/L]

Estos rangos pueden utilizarse como guías hasta que cada laboratorio haya establecido sus propios rangos normales.

#### 14.2 Cortisol urinario sin extraer

El rango normal para cortisol urinario (UC) de muestras de orina sin extraer es de 75-270 µg por 24 horas [207-745 nmoL/24 hr]. Una recogida inadecuada de la muestra de orina puede tener como resultado una evaluación incorrecta del paciente. Se recomienda determinar la creatinina para identificar recogidas de orina especialmente inadecuadas.<sup>21</sup>

#### 14.3 Cortisol urinario libre extraído

El rango normal de cortisol urinario libre es de 20-90 µg por 24 horas [55-248 nmoL/24 hr]. Una recogida inadecuada de la muestra de orina puede tener como resultado una evaluación incorrecta del paciente. Se recomienda determinar la creatinina para identificar recogidas de orina especialmente inadecuadas.<sup>21</sup>

### 15. CARACTERÍSTICAS DE DESEMPEÑO ESPECÍFICAS

#### 15.1 Precisión

La precisión intracíclica se determinó a partir del promedio de 20 ensayos simultáneos por muestra de suero. La precisión intercíclica se determinó a partir del promedio de los duplicados para 20 ciclos.

Precisión intracíclica Muestra	Número de ensayos	Media (µg/dL)	Desviación estándar (µg/dL)	Coefficiente de variación (%)
Mezcla de suero A	20	2,9	0,19	6,6
Mezcla de suero B	20	12,1	0,93	7,7
Mezcla de suero C	20	47,1	3,18	6,8

Precisión intercíclica Muestra	Número de ciclos independientes	Media (µg/dL)	Desviación estándar (µg/dL)	Coefficiente de variación (%)
Mezcla de suero D	20	3,7	0,33	9,0
Mezcla de suero E	20	12,1	1,19	9,8
Mezcla de suero F	20	36,9	3,24	8,8

**15.2 Exactitud:** La exactitud de este ensayo se ha comprobado con la prueba de recuperación.

#### Recuperación de sueros mezclados

Se prepararon muestras diluyendo una muestra de cortisol alta conocida con una mezcla de suero previamente analizada. Cada muestra preparada se analizó por cuadruplicado. El porcentaje de recuperación se calcula como (recuperado / esperado) x 100.

Contribución de muestra preparada (µg/dL)	Contribución de mezcla (µg/dL)	Valor esperado (µg/dL)	Valor recuperado (µg/dL)	Porcentaje (%) recuperación
4,2	1,6	5,8	5,5	95
11,2	1,6	12,7	12,8	101
17,2	1,6	18,8	18,4	98
26,3	1,6	27,9	25,4	91
41,2	1,6	42,8	39,2	92

#### 15.3 Sensibilidad analítica

La sensibilidad de la curva del calibrador se define como el valor independiente más pequeño distinto de cero. Se calculó una estimación estadística de la concentración mínima que puede detectarse (sensibilidad) de acuerdo con el método de D. Rodbard<sup>22</sup> para 30 reproducciones en el punto cero de la curva de calibrador. La sensibilidad calculada es de 0,21 µg/dL.

#### 15.4 Avidéz

La afinidad constante calculada del antisuero de cortisol es aproximadamente de  $2 \times 10^8$  litros/mol.

### 15.5 Especificidad analítica

Los datos de la reactividad cruzada del antisuero utilizado en este equipo se expresan como la proporción de concentración de cortisol por la concentración de la sustancia de reacción cruzada con un 50% de inhibición de unión máxima.

Compuesto	% Reactividad cruzada
Cortisol	100
Prednisolona	25,5
6-Metilprednisolona	14,5
11-Desoxicortisol	9,8
17-Hidroxiprogesterona	0,4
Corticosterona	0,9
Dexametasona	0,049
Prednisona	3,8
Desoxicorticosterona	0,14
Tetrahidrocortisona	0,2
Aldosterona	<0,1
$\beta$ -Cortol	<0,1
$\beta$ -Cortolona	<0,1
Cortisona	10,3
Dihidrocortisona	0,43
Progesterona	0,015
Spirolactona	<0,1
Tetrahidrocortisol	0,3
6- $\beta$ -Hidrocortisona	4,2

**CONSULTE LA BIBLIOGRAFÍA EN LA ÚLTIMA PÁGINA.**



## KIT RIA GAMMACOAT™ CORTISOL

### 1. USO PREVISTO

PER USO DIAGNOSTICO IN VITRO.

Il kit per l'analisi radioimmunologica GammaCoat™ [<sup>125</sup>I] Cortisol serve per la determinazione quantitativa dei livelli di cortisolo (idrocortisone, Compound F) nel siero, nel plasma o nelle urine.

### 2. SOMMARIO E SPIEGAZIONI

Il cortisolo (idrocortisone, Compound F) è il principale glicocorticoide secreto dalla corteccia surrenale. Alcuni suoi effetti fisiologici comprendono attività antinfiammatoria, mantenimento della pressione sanguigna e sintesi di carboidrati dalle proteine.

I glicocorticoidi vengono sintetizzati in risposta all'azione dell'ormone adrenocorticotropo (ACTH) che viene secreto dal lobo anteriore della ghiandola pituitaria. In un normale individuo, il cortisolo agisce in un ciclo di feedback negativo con ACTH attraverso l'asse ipotalamo-ghiandola pituitaria-corteccia surrenale (asse HPA - Hypothalamus-pituitary-adrenal). L'ACTH surrenale, a sua volta, è regolato dal fattore di liberazione della corticotropina (CRF) secreta dall'ipotalamo. Il fattore CRF ipotalamico è sensibile ai livelli di cortisolo e allo stress. Lo stress fisico e psicologico, la variazione diurna e bassi livelli di zucchero nel sangue influiscono sulla quantità di secrezione del cortisolo.<sup>1-6</sup>

Il cattivo funzionamento di un qualsiasi organo nell'asse HPA comporta un'alterazione dei livelli di cortisolo.<sup>7,8</sup> La valutazione delle funzioni della ghiandola surrenale mediante misurazione dei livelli di cortisolo nel plasma o nel siero è utile nella diagnosi di stati normali o anormali. La combinazione di misurazioni eseguite al mattino e alla sera, nonché test di stimolazione e soppressione possono offrire indicazioni chiare per la diagnosi di affezioni specifiche correlate alla ghiandola surrenale. La diagnosi del morbo di Addison (insufficienza surrenale cronica) e della sindrome di Cushing (sovrapproduzione surrenale) sono due esempi in cui l'analisi specifica dei livelli di cortisolo in circolo è utile nella valutazione del paziente.<sup>9,10</sup>

### 3. PRINCIPI DELL'ANALISI

La procedura usata nel kit per l'analisi radioimmunologica di cortisolo GammaCoat [<sup>125</sup>I] si basa sui principi radioimmunologici di legame competitivo.<sup>11</sup> I calibratori e i campioni non noti (siero, plasma o urine) vengono incubati con tracciante per cortisolo in provette rivestite con anticorpo, dove l'anticorpo è immobilizzato nella parete inferiore interna della provetta GammaCoat. Al termine del periodo di incubazione, il contenuto della provetta viene aspirato o fatto decantare e si esegue il conteggio. Si crea una curva di calibrazione con 5 calibratori di siero varianti fra 1 e 60 µg/dL. I valori non noti vengono interpolati dalla curva di calibrazione. L'intera analisi viene eseguita nella provetta rivestita. Non sono richieste diluizioni separate di campioni, denaturazione delle proteine o fasi di estrazione per i campioni di siero, urine o plasma.

Oltre alle analisi di cortisolo nelle urine non estratte, il kit RIA GammaCoat [<sup>125</sup>I] Cortisol può essere usato anche per misurare il cortisolo libero (non coniugato) nelle urine. Il cortisolo presente nelle urine deve innanzitutto essere estratto in cloruro di metilene. Una parte dell'estratto viene fatta evaporare direttamente nella provetta rivestita con anticorpi GammaCoat (gli esperimenti non hanno dato luogo ad effetti deleteri per la provetta se si utilizza cloruro di metilene di buona qualità). Per garantire livelli adeguati di proteine nei campioni, in ogni provetta GammaCoat vengono aggiunti 10 microlitri di blank per siero per cortisolo (CA-2367). La parte successiva della procedura di analisi è uguale a quella effettuata per le determinazioni di cortisolo nel siero, nel plasma o nelle urine non estratte. L'efficienza dell'estrazione del cortisolo dalle urine mediante cloruro di metilene deve essere monitorata.

#### 4. REAGENTI FORNITI CON IL KIT

Calibratori di cortisolo (A-F)	6 fiale/1 mL	6 fiale/1 mL
Provette rivestite per cortisolo	2 sacchetti/50 cad.	10 sacchetti/ 50 cad.
Tracciante di cortisolo	1 fiala/ 10 mL	5 fiale/10 mL cad.
Tampone PBS	1 fiala/ 100 mL	5 fiale/ 100 mL cad.
Numero di test	100	500

CONSERVAZIONE: Tutti i reagenti, compreso il reagente tracciante-tampone, sono stabili fino alla data di scadenza stampata sull'etichetta del kit se conservati ad una temperatura di 2-8 °C. Le provette rivestite anti-cortisolo possono essere conservate ad un temperatura di 2-27 °C. Non usare i reagenti dopo la data di scadenza del kit. Non si devono mescolare reagenti di lotti diversi.

##### 4.1 Tracciante di cortisolo: reagente pronto all'uso

Ogni fiala contiene circa 4 µCi di tracciante (<1 µg/mL di cortisolo) in 10 mL di tampone fosfato isotonic, ANS (acido 8-anilino-1-naftalene solforico) con 0,1% sodio azide come conservante.

##### 4.2 Provette rivestite di anti-cortisolo di coniglio: reagente pronto all'uso

12 provette da 75 mm rivestite con siero anti-cortisolo di coniglio (titolo <1 µg/provetta) e confezionate in un sacchetto di plastica.

##### 4.3 Tampone PBS: reagente pronto all'uso

Ogni flacone contiene 100 mL di tampone fosfato isotonic con 0,1% sodio azide come conservante.

##### 4.4 Calibratori per siero per cortisolo: reagente pronto all'uso

Ogni fiala contiene cortisolo in 1 mL di siero umano trattato contenente 0.1% sodio azide come conservante. I calibratori sono forniti alle seguenti concentrazioni: 0, 1, 3, 10, 25 e 60 µg/dL. I calibratori DiaSorin per cortisolo sono stati calibrati in base allo standard di riferimento U.S.P. per il cortisolo. Eventuali comparazioni con altri prodotti o procedure devono essere eseguite in base alle norme di questo standard di riferimento. I calibratori del kit dimostrano commutabilità con i campioni del paziente quando usati con reagenti e con la procedura operativa di questo test diagnostico in vitro, come consigliato.

##### 4.5 Etichetta di riserva

Per tracciante-tampone

##### 4.6 DISPONIBILE SU RICHIESTA:

Carta millimetrata semi-logaritmica

50 fogli per blocco

#### 5. AVVERTENZE E PRECAUZIONI

PER USO DIAGNOSTICO IN VITRO.

Non per uso interno o esterno su animali o persone.

##### REAGENTI CONTENENTI MATERIALE DI PROVENIENZA UMANA

###### Trattare come potenzialmente infettivi.

Ogni unità di siero/plasma da donatore usata nella preparazione di questo prodotto è stata testata con una metodica approvata dalla FDA statunitense e trovata non reattiva per la presenza di HBsAG, anticorpi ad HCV ed anticorpi ad HIV 1/2. Anche se questi metodi sono estremamente accurati, non è garantita la localizzazione di tutte le unità infette. Questo prodotto può inoltre contenere altro materiale di provenienza umana per il quale non esiste un test approvato. Poiché nessuna metodologia di test approvata può offrire garanzia completa sull'assenza del virus dell'epatite B (HBV), dell'epatite C (HCV), del virus di immunodeficienza (HIV) o di altri agenti infettivi, tutto il materiale di provenienza umana deve essere trattato in conformità con le buone pratiche di laboratorio adottando le precauzioni appropriate come descritto nel manuale dei Centers for Disease Control and Prevention/National Institutes of Health Manual, "Biosafety in Microbiological and Biomedical Laboratories", quarta edizione, Maggio 1999 o edizione corrente.

#### **REAGENTI CONTENENTI SODIO AZIDE**

**ATTENZIONE:** Alcuni reagenti di questo kit contengono sodio azide. La sodio azide può reagire con componenti in piombo o rame e formare quindi azidi metalliche altamente esplosive. Al momento dello smaltimento, lavare con abbondante acqua al fine di evitare la formazione di azide. Per ulteriori informazioni, consultare "Decontamination of Laboratory Sink Drains to Remove Azide Salts", nel manuale Safety Management N. CDC-22 pubblicato dai Centri per il controllo e la Prevenzione delle malattie di Atlanta, GA, 1976.

#### **Fraasi di rischio per sostanze pericolose della Comunità Europea (Direttiva del Consiglio 1999/45/CE)**

R 20/21/22 - Harmful by inhalation, in contact with skin and if swallowed (Dannoso per inalazione, per contatto con la pelle ed ingestione).

R 32 - Contact with acids liberates very toxic gas (Il contatto con acidi libera gas altamente tossico).

S28 - After contact with skin, wash immediately with plenty of water (Dopo il contatto con la pelle, lavare immediatamente con abbondante acqua).

#### **REAGENTI CONTENENTI IODIO-125**

Adottare precauzioni adeguate e le buone pratiche di laboratorio per la conservazione, la manipolazione e lo smaltimento di questo materiale.

Per i professionisti o gli istituti che utilizzano radioisotopi con una licenza generale:

Questo materiale radioattivo può essere consegnato, acquisito, conservato e usato unicamente da personale medico, veterinari abilitati alla pratica di medicina veterinaria, laboratori clinici o ospedali e unicamente per test in vitro clinici o di laboratorio che non prevedano la somministrazione interna o esterna del materiale, o di radiazioni da esso derivanti, su persone o animali. L'acquisto, il possesso, la conservazione, l'uso e il trasferimento sono soggetti alle norme e alla licenza generale della Nuclear Regulatory Commission statunitense dello stato con cui la Commissione ha stipulato un accordo per l'esercizio dell'autorità normativa.

1. La conservazione del materiale radioattivo deve essere limitata ad un'area specificatamente designata.
2. L'accesso ai materiali radioattivi deve essere limitato esclusivamente al personale autorizzato.
3. Non usare la bocca per versare con la pipetta materiale radioattivo.
4. Non mangiare o bere nelle aree di lavoro designate per materiale radioattivo.
5. Le zone dove possono verificarsi perdite devono essere pulite, quindi lavate con detergente alcalino o soluzione per la decontaminazione radiologica. Tutti gli oggetti in vetro usati devono essere accuratamente risciacquati con acqua prima di lavarli con altri oggetti in vetro del laboratorio.

Per i professionisti o gli istituti che utilizzano radioisotopi con una licenza specifica:

L'acquisto, l'uso, il trasferimento e lo smaltimento di materiali radioattivi sono soggetti alle norme e alle condizioni della licenza specifica.

**AVVERTENZA:** Questo prodotto contiene un prodotto chimico noto nello Stato della California per provocare cancro.

**ATTENZIONE:** La radioattività stampata sulle istruzioni allegate alla confezione può essere leggermente diversa dalla radioattività stampata sull'etichetta della scatola e sull'etichetta della fiala di tracciante. L'etichetta sulla scatola e sulla fiala di tracciante indicano la quantità effettiva di radioattività alla data di calibrazione, mentre il materiale informativo della confezione indica la radioattività teorica del kit.

## 6. RACCOLTA DEI CAMPIONI E MANIPOLAZIONE

### Campioni di plasma

Prelevare in maniera asettica un campione di sangue venoso in una provetta di vetro sotto vuoto contenente eparina o EDTA.

Separare la frazione di plasma. Il plasma può essere conservato in frigorifero a 2-8 °C per una notte. Per periodi di conservazione più lunghi, i campioni devono essere congelati a -20 °C. È bene evitare l'uso di campioni emolizzati, lipemici o itterici.

### Campioni di siero

Anche se i campioni di plasma siano generalmente indicati per le analisi di cortisolo, si possono ottenere risultati paragonabili utilizzando campioni di siero.<sup>12</sup>

Separare la frazione di siero. Il siero può essere conservato in frigorifero a 2-8 °C per una notte.

Per periodi di conservazione più lunghi, i campioni devono essere congelati a -20 °C. È bene evitare l'uso di campioni emolizzati, lipemici o itterici.

### Campioni di urine

Raccogliere campioni di urine nell'arco di 24 ore. Registrare il volume totale delle urine. Aggiungere 10 grammi di acido borico per litro di urine come conservante e congelare una parte ben miscelata a -20 °C. Scongelare a temperatura ambiente e mescolare bene prima dell'uso.

## 7. ATTREZZATURE E MATERIALI NECESSARI, NON FORNITI IN DOTAZIONE

- 7.1 Bagno di acqua a temperatura costante, 37 ± 2°C.
- 7.2 Pipetta di precisione (10 µL).
- 7.3 Pipetta semiautomatica (1.0 mL).
- 7.4 Contatore a raggi gamma.
- 7.5 Portaprovette.
- 7.6 Aspiratore di acqua (facoltativo).
- 7.7 Mixer Vortex.
- 7.8 Carta assorbente con retro in plastica (facoltativo).

Attrezzature supplementari per utilizzo nella sola procedura di estrazione dalle urine:

1. Provette in vetro monouso (12 x 75 mm) complete di cappuccio.
2. Cloruro di metilene (diclorometano; reagente analitico di grado ACS).
3. Bagno di ghiaccio.
4. Pipette di precisione (100 e 200 µL).
5. Cappa o zona ben ventilata.
6. Strumenti per far evaporare il cloruro di metilene. L'evaporazione può essere eseguita con un getto di aria asciutta o azoto con lieve riscaldamento dell'estratto a circa 37 °C sotto una cappa o in un'area ben ventilata.

## 8. PROCEDURA DI ESTRAZIONE DALLE URINE

Questa procedura prevede la metodologia utilizzata per la determinazione dell'efficienza dell'estrazione del cloruro di metilene. Recuperi tipici di cortisolo dai campioni di urine hanno prodotto medie di 99 ± 14% nei laboratori DiaSorin.

- 8.1 Versare un volume adatto di cloruro di metilene in un bagno di ghiaccio per il raffreddamento. Prevedere più di 1 mL per provetta. Il bagno di ghiaccio deve essere sufficientemente grande da poter contenere un becher di cloruro di metilene e il portaprovette per le provette in vetro per l'estrazione.
- 8.2 Per stabilire l'efficienza dell'estrazione, etichettare due provette in vetro monouso per ogni campione con i dati di identificazione del paziente. Etichettare una provetta "C" per campione e l'altra "E" per efficienza di estrazione.
- 8.3 Aggiungere 200 microlitri di campione di urine precedentemente ben miscelati per 24 ore nelle provette "C" ed "E".

- 8.4** Per le sole provette "E", aggiungere in ciascuna provetta 10 µL di calibratore per siero da 60 µg/dL. Mescolare i reagenti agitando il portaprovette o ogni singola provetta.
- 8.5** Aggiungere 1,0 mL di cloruro di metilene raffreddato in ogni provetta "C" ed "E". Agitare bene nel Vortex per estrarre il cortisolo sullo strato organico. Chiudere con cappuccio oppure coprire e riporre nel bagno di ghiaccio per evitare un'eccessiva evaporazione del cloruro di metilene. Per facilitare l'aspirazione con pipetta del cloruro di metilene, è importante risciacquare la pipetta 3-4 volte con cloruro di metilene FREDDO prima di trasferirlo nelle provette.
- 8.6** Mentre si attende il completamento della separazione, etichettare due provette GammaCoat Cortisol per ogni provetta "C" e due provette GammaCoat Cortisol per ogni provetta "E".
- 8.7** Al termine della separazione, prelevare con cautela 100 µL dallo strato inferiore (cloruro di metilene) di ogni provetta e versarlo nelle rispettive provette GammaCoat precedentemente etichettate. L'uso della punta della pipetta risciacquata in cloruro di metilene freddo prima dell'aspirazione del campione ridurrà la quantità di campione estratto sulla punta della pipetta. Durante il trasferimento di 100 µL di soluzione di estrazione nella provetta rivestita, non tentare di pulire la punta della pipetta, in quanto le proprietà fisiche del cloruro di metilene provocano perdite e bolle d'aria sulla punta della pipetta.  
Per facilitare il trasferimento della soluzione di estrazione nella provetta rivestita, tenere la provetta di estrazione e la provetta GammaCoat nella stessa mano. Rapidamente, ma con cautela, trasferire 100 µL di estratto sul fondo della provetta GammaCoat.
- 8.8** Far evaporare il cloruro di metilene dalle provette GammaCoat con un getto di aria asciutta o azoto e lieve riscaldamento dell'estratto a circa 37 °C.  
**ATTENZIONE:** Evitare concentrazioni eccessive di fumi di idrocarburi alogenati nelle aree di lavoro. L'EVAPORAZIONE DEVE AVVENIRE SOLO SOTTO UNA CAPP A O IN UNA ZONA BEN VENTILATA.
- 8.9** Quando il cloruro di metilene è completamente evaporato, aggiungere 10 µL di blank per siero da 0 µg/dL, CA-2367, in ogni provetta GammaCoat contenente campioni del paziente (provette "C" ed "E"), per far sì che i campioni contengano livelli adeguati di proteine.
- 8.10** Continuare con la procedura RIA iniziando dal punto 1 della Procedura di analisi.

## 9. PROCEDURA DI ANALISI

### Tracciante-Tampone:

Aggiungere l'intero contenuto di 1 fiala di tracciante di cortisolo in un flacone di tampone PBS e mescolare delicatamente. Il risciacquo finale della fiala del tracciante di cortisolo con il tracciante-tampone contribuirà ad ottimizzare il trasferimento del tracciante. Completare e affiggere al contenitore l'etichetta di riserva tracciante-tampone per l'identificazione. Il reagente tracciante-tampone deve essere conservato al buio, oppure in un contenitore avvolto in carta stagnola, a 2-8 °C.

La procedura di analisi comprende la preparazione della curva di calibrazione da cui il contenuto di cortisolo non noto verrà interpolato.

- 9.1** Lasciare che tutti i reagenti raggiungano la temperatura ambiente e mescolare accuratamente prima dell'uso senza formare schiuma.
- 9.2** Etichettare due serie di provette GammaCoat in base allo schema seguente. Il conteggio totale [T1,T2] e le provette B0 [1,2] potranno essere necessari per certi programmi di riduzione dei dati e di controllo della qualità; possono tuttavia essere omessi se la curva di calibrazione viene tracciata su carta millimetrata semi-logaritmica.<sup>13-15</sup>

- 9.3** Aggiungere al fondo delle seconda serie delle provette GammaCoat:
- a. 10 µL di blank o calibratore per siero per cortisolo.
  - b. PER CAMPIONI DI SIERO, PLASMA E URINE NON ESTRATTI, aggiungere 10 µL di ciascun campione. Fare attenzione ad aspirare calibratori e campioni nello stesso modo.<sup>16</sup>
  - c. PER I CAMPIONI DI URINE ESTRATTI, usare le provette GammaCoat contenenti i campioni estratti durante la fase 9 della Procedura di estrazione dalle urine.
- NOTA: Si consiglia di diluire i campioni di siero o di plasma e usare il blank per il siero fornito con questo kit come diluente. Diluire con acqua distillata ciascun campione di urine estratto o non estratto, come previsto. Per il cortisolo libero, estrarre 200 µL del campione di urina diluito (Procedura di estrazione dalle urine, Punto 3). Continuare con la normale analisi. Il fattore di diluizione deve essere incluso nei calcoli.
- 9.4** Aggiungere in ogni provetta 1.0 mL di tracciante-tampone. Agitare lentamente ogni provetta in un mixer Vortex regolato su una velocità bassa.
- 9.5** Lasciare in incubazione le provette per 45 minuti in un bagno di acqua a  $37 \pm 2^\circ\text{C}$ .
- 9.6** Aspirare o lasciar decantare tutte le provette, eccetto quelle per il Conteggio totale.
- UNA RIMOZIONE NON CORRETTA DELLA SOLUZIONE DI ADERENZA PUO' ESSERE CAUSA DI REPLICAZIONE SCADENTE E DI VALORI ERRATI.
- Se si impiega la tecnica di aspirazione, controllare che la punta in plastica dell'aspiratore tocchi il fondo della provetta rivestita e che tutto il liquido venga rimosso.
- Se si usa la tecnica di decantazione, lasciar svuotare le provette in posizione capovolta per 3-5 minuti. Battere le provette su carta assorbente per eliminare eventuale liquidi di aderenza prima di riportare le provette in posizione verticale.
- 9.7** Contare tutte le provette in un contatore a raggi gamma per 1 minuto con la finestra opportunamente regolata per iodio-125.
- 9.8** Calcolare i risultati. Fare riferimento alla sezione Risultati.

## 10. PROCEDURA SALIVARE

Questo kit consente di eseguire anche l'analisi con campioni di saliva.

È stato dimostrato che esiste una buona correlazione fra la concentrazione di cortisolo nella saliva e la concentrazione di cortisolo libero nel plasma e nel siero (queste concentrazioni rappresentano dal 60% al 100% della concentrazione della frazione libera in circolo e dal 4% al 6% della concentrazione totale nel siero o nel plasma).

Numerosi studi hanno dimostrato i vantaggi pratici e diagnostici di analisi del cortisolo salivare e hanno confermato la loro validità e valore clinico.

Sono stati presi in considerazione due punti importanti nell'adattare questa tecnica per le analisi di cortisolo nella saliva:

Primo, poiché il cortisolo nella saliva rappresenta solo il 5% del cortisolo nel plasma, è richiesto un aumento della sensibilità di venti volte. Per ottenere questo livello di sensibilità, il campione di saliva è stato aumentato ad un volume di 200 µL.

Secondo, la saliva ha una concentrazione minore di proteine (generalmente consistenti di enzimi e glicoproteine). Sono presenti solo tracce di proteine del plasma, mentre le proteine che si legano con i corticosteroidi sono assenti. Per avere la certezza che gli effetti della matrice proteica siano simili nel campione e negli standard, viene aggiunto calibratore 0 (senza cortisolo) in ogni campione di saliva (come per le analisi dei campioni di urine estratti).

Sono richieste solo modifiche minori per l'aspirazione mediante pipetta dei campioni e degli standard per adattare il metodo alle analisi dei campioni di saliva, utilizzando solo i reagenti forniti con il kit.

#### 10.1 Prelievo e preparazione dei campioni di saliva

La saliva deve essere prelevata 10 minuti dopo che il paziente ha sciacquato la bocca con acqua di rubinetto. Non stimolare la produzione di saliva e informare il paziente sulla differenza fra saliva e muco. In pochi minuti si può prelevare un volume sufficiente di 1 mL di saliva, anche nei bambini.

I campioni devono essere congelati a  $-20^{\circ}\text{C}$ . Prima di eseguire l'analisi, i campioni devono essere scongelati e centrifugati; il soprannatante verrà aspirato e usato per l'analisi.

#### 10.2 Procedura salivare

Per ogni campione di saliva, iniettare con pipetta 10  $\mu\text{L}$  di calibratore 0 nelle due serie di provette etichettate; aggiungere 200  $\mu\text{L}$  di campione e 1 mL di tracciante.

Per il **range standard**, iniettare con pipetta 10  $\mu\text{L}$  di calibratore 0 o di standard nelle due serie di provette etichettate; aggiungere 200  $\mu\text{L}$  di tampone PBS, più 1 mL di tracciante.

Agitare delicatamente ogni provetta. Lasciare in incubazione per 45 minuti in un bagno di acqua a  $37^{\circ}\text{C}$ . Aspirare o lasciare decantare il contenuto delle provette e misurare il legato radioattivo sui lati della provetta per 1 minuto.

Curva standard

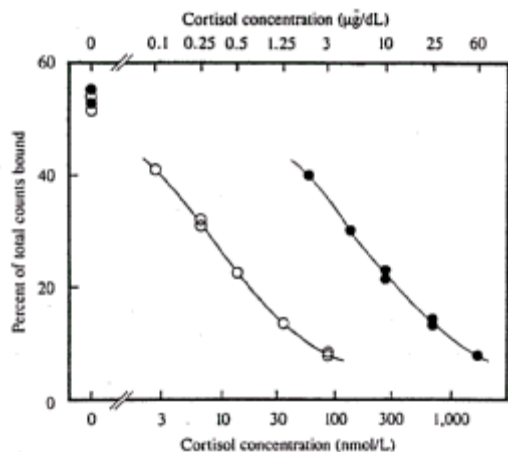


Figure 3  
Standard curves for assay of cortisol in serum or plasma (●) and in saliva (○) with the GammaCoat™ [ $^{125}\text{I}$ ] RIA kit.

Il range standard attuale per il cortisolo salivare è 0,10 – 0,25 – 0,50 – 1,25 e 3,0  $\mu\text{g/dL}$ . Le curve standard per le due tecniche di analisi (siero e saliva) previste da questo kit sono illustrate nel grafico a sinistra.

Anche se il volume di incubazione è in qualche modo maggiore nell'analisi della saliva rispetto all'analisi del siero (1,210  $\mu\text{L}$  invece di 1,010  $\mu\text{L}$ ), esso non presenta nessuna conseguenza sulla capacità di legame del marcatore nel range della curva standard.

Nota: Questa curva è stata ottenuta durante uno studio eseguito nel 1984 con un range standard di 0, 2,0, 5,0, 10, 25 e 60  $\mu\text{g/dL}$ . Il range standard è stato successivamente modificato. Si consiglia di fare riferimento al nuovo range per i calcoli di cortisolo nella saliva, tenendo presente un rapporto di 1:20.

**Valori normali**  
Tabella 1

Livelli normali di cortisolo al mattino nella saliva e nel siero (µg/dL)						
Gruppo di soggetti*	Saliva			Siero		
	n	Media	Range	n	Media	Range
Adulti normali	150	0,43	0,18 – 1,01	103	6,5	4,5 – 21,1
Bambini (età 4 - 11 anni)	105	0,40	0,14 – 0,91	---	---	---
Donne incinte (terzo trimestre)	84	0,47	0,33 – 0,91	84	15,7	12,9 – 39,9

\* Abitanti del Regno Unito

#### 11. CONTROLLO DI QUALITA'

Ogni laboratorio dovrebbe utilizzare controlli a vari livelli per monitorare le performance. I controlli devono essere considerati come campioni non noti. Conservare le tabelle per il controllo della qualità al fine di verificare le performance dei controlli. Adottare metodi statistici adeguati per valutare i trend. Limiti accettabili per le performance verranno stabiliti da ogni singolo laboratorio.

#### 12. CALCOLO DEI RISULTATI

I campioni non noti di siero, plasma e urine possono essere analizzati simultaneamente e sono tutti interpolati da una curva di calibrazione generata con i calibratori per il siero. Sia i campioni di cortisolo da urine non estratti (UC) che i campioni di cortisolo libero estratti (UFC) vengono successivamente convertiti in "µg/24 ore" con la formula adeguata.

- 12.1 Registrare i conteggi per minuto (CPM) per ogni provetta.
- 12.2 Tracciare il valore CPM per i calibratori di cortisolo (asse verticale) rispetto la concentrazione di cortisolo (asse orizzontale) su carta millimetrata semilogaritmica.
- 12.3 Tracciare la miglior curva di interpolazione. Per dati e grafico tipici, fare riferimento alla TABELLA II e alla FIGURA 1.
- 12.4 Localizzare il legame CPM per ogni provetta corrispondente ad ogni campione (controlli, siero, plasma, urina estratta e non estratta) sull'asse verticale e seguire la linea orizzontale che interseca la curva di calibrazione. Nel punto di intersezione, leggere la concentrazione di cortisolo (µg/dL) sull'asse orizzontale.

##### 12.5 Cortisolo da urine non estratte

Per convertire il cortisolo di campioni di urine non estratti (UC) da µg/dL in µg cortisolo per 24 ore, usare la seguente equazione:

$$UC = \frac{SxV}{100}$$

dove:

- S = concentrazione del campione di urine non estratto in µg/dL  
V = volume totale delle urine in mL/24 ore  
100 = fattore di conversione



### 12.6 Cortisolo libero estratto

Per convertire il cortisolo libero di campioni di urine estratti (UFC) da µg/dL in µg cortisolo per 24 ore, usare la seguente equazione:

$$UFC = \frac{S \times V}{33,3 (E-S)}$$

dove:

- S = concentrazione del campione di urine estratto in µg/dL  
E = concentrazione nella provetta per l'efficienza per il campione corrispondente in µg/dL  
V = volume totale delle urine in mL/24 ore  
33.3 = fattore combinato di diluizione ed efficienza di estrazione

Esempio:

- E = 13,50 µg/dL  
S = 7,85 µg/dL  
V = 1150 mL/24 ore

$$UFC = \frac{(7,85) (1150)}{33,3 (13,50-7,85)} = 48 \text{ µg cortisolo/24 ore}$$

I laboratori che desiderano monitorare l'efficienza della procedura di estrazione dalle urine (EE) possono usare la seguente formula per calcolare l'efficienza in percentuale:

$$EE = \frac{E-S}{6.0} \times 100$$

dove:

- S = concentrazione del campione di urine estratto in µg/dL  
E = concentrazione nella provetta per l'efficienza per il campione corrispondente in µg/dL  
6.0 = differenza prevista fra le concentrazioni per le provette "E" e "C" in µg/dL  
100 = fattore di conversione

### 12.7 Unità S.I.

Utilizzando un peso molecolare di 362,5 dalton, è possibile convertire i calibratori per il siero, i controlli e i valori del paziente (siero e plasma) da microgrammi per decilitro (µg/dL) in nanomoli per litro (nmol/L) di unità S.I. moltiplicando per 27,59 (fare riferimento alla TABELLA II per i valori dei calibratori di cortisolo elencati in entrambe le unità). Allo stesso modo è possibile convertire i valori dei pazienti e i controlli estratti e non estratti per microgrammi per 24 ore (µg/24 ore) in nanomoli per 24 ore (nmol/24 ore) di unità S.I. moltiplicando per 2,76.

**TABELLA II**  
Concentrazione dei calibratori

Cat. No.	Livello calibratore	Unità S.I.
CA-2367	0 µg/dL	0 nmol/L
CA-2358	1 µg/dL	28 nmol/L
CA-2359	3 µg/dL	83 nmol/L
CA-2370	10 µg/dL	276 nmol/L
CA-2371	25 µg/dL	690 nmol/L
CA-2372	60 µg/dL	1655 nmol/L

**TABELLA III**

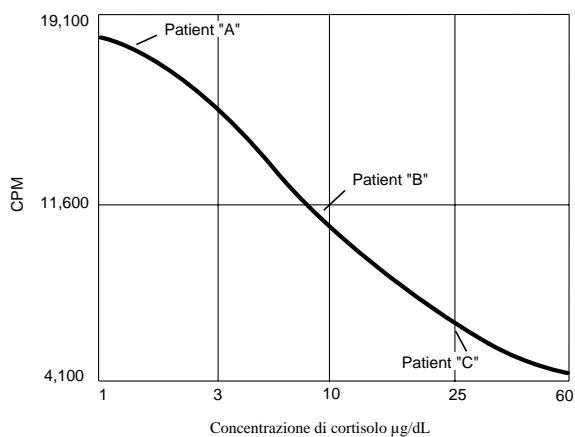
Registrazione dei dati

Non usare per calcolare campioni non noti

Provetta N.	Contenuto delle provette	CPM Legame	Concentrazione di cortisolo ( $\mu\text{g/dL}$ )
T1	Conteggi totali (Tracciante-Tampone)	44516	
T2	Conteggi totali (Tracciante-Tampone)	43651	
1	Blank per siero per cortisolo, $B_0$	0 $\mu\text{g/dL}$	
2	Blank per siero per cortisolo, $B_0$	0 $\mu\text{g/dL}$	0
3	Calibratore per siero per cortisolo	1 $\mu\text{g/dL}$	
4	Calibratore per siero per cortisolo	1 $\mu\text{g/dL}$	1
5	Calibratore per siero per cortisolo	3 $\mu\text{g/dL}$	
6	Calibratore per siero per cortisolo	3 $\mu\text{g/dL}$	3
7	Calibratore per siero per cortisolo	10 $\mu\text{g/dL}$	
8	Calibratore per siero per cortisolo	10 $\mu\text{g/dL}$	10
9	Calibratore per siero per cortisolo	25 $\mu\text{g/dL}$	
10	Calibratore per siero per cortisolo	25 $\mu\text{g/dL}$	25
11	Calibratore per siero per cortisolo	60 $\mu\text{g/dL}$	
12	Calibratore per siero per cortisolo	60 $\mu\text{g/dL}$	60
13	Campione paziente "A"	18470	1,3
14	Campione paziente "A"	18992	1,1
			Media: 1,2
15	Campione paziente "B"	10377	10,1
16	Campione paziente "B"	10608	9,6
			Media: 9,9
17	Campione paziente "C"	6316	28,8
18	Campione paziente "C"	6318	28,8
			Media: 28,8

**Risultati tipici**

Non usare per calcolare campioni non noti

**FIGURA 1**

### 13. LIMITI DELLA PROCEDURA

#### 13.1 Fattori legati alla procedura

Il tracciante-tampone deve essere protetto dalla luce. Le provette rivestite così come fornite sono pronte per l'uso e devono essere conservate a temperatura fra 2-27 C. Chiudere bene l'involucro in plastica quando si devono conservare provette non utilizzate per evitare la condensazione.

Controllare con regolarità lo stato di incubazione. La temperatura del bagno di acqua deve essere costante a  $37 \pm 2$  C e il livello dell'acqua deve essere superiore al livello della soluzione nelle provette, le quali non devono galleggiare.

L'utilizzatore deve indicare che i risultati erronei possono essere dovuti a conservazione e manipolazione inadeguata dei campioni. Evitare l'uso di campioni emolizzati, lipemici e itterici.

Il mancato raggiungimento di valori idonei di cortisolo per i controlli può essere segno di manipolazione scorretta, trattamento inadeguato o deterioramento dei reagenti. Includere i controlli in ogni ciclo di analisi. Per ogni ciclo di analisi si deve stabilire una curva di calibrazione.

Il kit GammaCoat Cortisol non deve essere usato per qualificare i livelli di cortisolo in campioni prelevati da pazienti in cura con prednisolone. Vedere la sezione Limitazioni interpretative.

#### 13.2 Limitazioni interpretative

I normali livelli di cortisolo sono generalmente maggiori al mattino fra le 5.00 e le 10.00 e inferiori fra le 20.00 e le 4.00 del mattino successivo.<sup>5</sup> I livelli pomeridiani sono generalmente la metà o un terzo dei livelli del mattino. È stato osservato un innalzamento dei livelli di cortisolo a metà giornata nelle donne coincidente con l'assunzione di cibo, che si attenuavano notevolmente con la mancanza di cibo.<sup>17</sup> La variazione diurna, test di stimolazione e soppressione e vari tipi di situazioni stressanti normalmente alterano i livelli di cortisolo. Ad esempio, la stimolazione di ACTH solitamente produce valori da due a tre volte il livello di riferimento del mattino.<sup>18</sup> La soppressione di metirapone e desametasone nei campioni del mattino solitamente produce valori inferiori a 5 µg/dL.<sup>10</sup> Estrogeni, come quelli contenuti nei contraccettivi orali, possono dare livelli elevati di cortisolo dovuti a concentrazioni alterate di proteine nel plasma e nel siero. Pertanto, i valori di cortisolo di ogni paziente sono normalmente valutati prendendo in considerazione il rispettivo livello di cortisolo al mattino.

Le analisi di cortisolo su campioni di pazienti in cura con prednisolone sono controindicate per l'elevata reattività incrociata dell'anticorpo di questo kit con il prednisolone e 6-metilprednisolone. L'elevata reattività incrociata può produrre livelli apparentemente elevati di cortisolo.

Le determinazioni di cortisolo generate dal protocollo diretto con le urine produrranno valori clinicamente validi se confrontati con il range normale dichiarato di cortisolo da urine non estratte. Poiché è noto che sostanze non identificate presenti nelle urine possono interferire con le analisi immunologiche di cortisolo libero, i valori ottenuti utilizzando i protocolli diretti per le urine saranno superiori a quelli ottenuti da campioni di urine che sono stati purificati con tecniche quali la cromatografia liquida ad alta pressione.<sup>19,20</sup>

### 14. VALORI PREVISTI

#### 14.1 Livelli nel plasma o nel siero

Mattino:

7-25 µg/dL o 70-250 ng/mL

[193-690 nmol/L]

Sera:

2-9 µg/dL o 20-90 ng/mL

[55-248 nmol/L]

Questi range possono essere usati come riferimento fino a quando ciascun laboratorio non avrà stabilito range normali propri.

#### 14.2 Cortisolo da urine non estratte

Il range normale di cortisolo da campioni di urine non estratte (UC) è 75-270 µg per 24 ore [207-745 nmol/24 ore]. La raccolta non corretta di campioni di urine può dare una valutazione errata. Si consiglia di determinare la creatinina al fine di identificare raccolte di urine non idonee.<sup>21</sup>

#### 14.3 Cortisolo libero da urine estratte

Il range normale di cortisolo libero nelle urine è 20-90 µg per 24 ore [55-248 nmol/24 ore]. La raccolta non corretta di campioni di urine può dare una valutazione errata. Si consiglia di determinare la creatinina al fine di identificare raccolte di urine non idonee.<sup>21</sup>

### 15. CARATTERISTICHE SPECIFICHE DELLE PERFORMANCE

#### 15.1 Precisione

La precisione fra più cicli di analisi è stata determinata calcolando la media fra 20 analisi simultanee per campione di siero. La precisione fra cicli di analisi è stata determinata calcolando la media fra i duplicati per 20 cicli di analisi separate.

Campione Precisione fra cicli di analisi	Numero di di analisi	Media (µg/dL)	Deviazione Standard (µg/dL)	Coefficiente di variazione (%)
Pool di siero A	20	2,9	0,19	6,6
Pool di siero B	20	12,1	0,93	7,7
Pool di siero C	20	47,1	3,18	6,8

Campione Precisione fra cicli di analisi	Numero di Ciclo di analisi separato	Media (µg/dL)	Deviazione Standard (µg/dL)	Coefficiente di variazione (%)
Pool di siero D	20	3,7	0,33	9,0
Pool di siero E	20	12,1	1,19	9,8
Pool di siero F	20	36,9	3,24	8,8

**15.2 Accuratezza:** L'accuratezza dell'analisi è stata controllata mediante test di recupero.

Recupero dai sieri suddivisi in gruppi

I campioni sono stati preparati diluendo un campione noto ad alto contenuto di cortisolo con un pool di siero precedentemente analizzato. Ogni campione è stato analizzato quattro volte. La percentuale di recupero è calcolata con la formula (recupero/previsione) x 100.

Contributo dal picco (µg/dL)	Contributo dal pool (µg/dL)	Valore previsto (µg/dL)	Valore di recupero (µg/dL)	Percentuale (%) di recupero
4,2	1,6	5,8	5,5	95
11,2	1,6	12,7	12,8	101
17,2	1,6	18,8	18,4	98
26,3	1,6	27,9	25,4	91
41,2	1,6	42,8	39,2	92

#### 15.3 Sensibilità analitica

La sensibilità della curva di calibrazione è definita come valore singolo più piccolo che si distingue da zero. È stata calcolata una stima statistica della concentrazione minima rilevabile (sensibilità) in base al metodo di D. Rodbard<sup>22</sup> per 30 ripetizioni al punto zero della curva di calibrazione. La sensibilità calcolata è di 0,21 µg/dL.

#### 15.4 Avidità

La costante di affinità calcolata per l'antisiero è di circa  $2 \times 10^8$  litri/mola.

### 15.5 Specificità analitica

I dati sulla reattività incrociata dell'antisiero utilizzato in questo kit sono espressi come rapporto di concentrazione di cortisolo rispetto alla concentrazione della sostanza reagente incrociata ad inibizione del 50% di legame massimo.

Composto	% di reattività incrociata
Cortisolo	100
Prednisolone	25,5
6-Metilprednisolone	14,5
11-Desossicortisolo	9,8
17-Idrossiprogesterone	0,4
Corticosterone	0,9
Desametasone	0,049
Prednisone	3,8
Desossicorticosterone	0,14
Tetraidro cortisone	0,2
Aldosterone	<0,1
$\beta$ -Cortol	<0,1
$\beta$ -Cortolone	<0,1
Cortisone	10,3
Diidro cortisone	0,43
Progesterone	0,015
Spironolattone	<0,1
Tetraidro cortisolo	0,3
6- $\beta$ -Idrocortisone	4,2

**FARE RIFERIMENTO ALL'ULTIMA PAGINA PER LA BIBLIOGRAFIA**

## KIT DE RADIOIMUNOENSAIO DO CORTISOL GAMMACOAT™

### 1. USO INDICADO

PARA USO DIAGNÓSTICO IN VITRO.

O kit de radioimunoensaio do Cortisol GammaCoat™ [<sup>125</sup>I] destina-se a ser utilizado na determinação quantitativa dos níveis de cortisol (hidrocortisona, Composto F) no soro, no plasma ou na urina.

### 2. RESUMO E EXPLICAÇÃO

O cortisol (hidrocortisona, Composto F) é o principal glucocorticoide segregado pelo córtex adrenal. Entre os seus efeitos fisiológicos encontram-se a actividade anti-inflamatória, a manutenção da pressão sanguínea e a síntese dos hidratos de carbono a partir da proteína.

Os glucocorticoides são sintetizados em resposta à hormona adrenocorticotropica (ACTH), a qual é segregada pelo lobo anterior da glândula pituitária. No indivíduo normal, o cortisol participa num circuito de resposta negativa com a ACTH através do eixo hipotálamo-pituitária-córtex adrenal (eixo HPA). A ACTH pituitária é, por sua vez, regulada pelo factor de libertação de corticotropina (CRF) o qual é segregado pelo hipotálamo. O CRF hipotalâmico responde aos níveis de cortisol e ao stress. O stress físico e psicológico, a variação diurna e os níveis baixos de açúcar são factores que afectam a taxa de segregação do cortisol.<sup>1-6</sup>

O funcionamento inadequado de qualquer um dos órgãos do eixo HPA resultará na alteração dos níveis de cortisol.<sup>7,8</sup> A avaliação da função da glândula adrenal por meio da medição dos níveis de cortisol no plasma ou no soro ajuda no diagnóstico de estados normais e anormais. As combinações de medições matinais e nocturnas e a estimulação e supressão de testes permitem obter provas conclusivas que possibilitam o diagnóstico de doenças específicas relacionadas com a adrenal. O diagnóstico da doença de Addison (insuficiência adrenal crónica) e da síndrome de Cushing (produção excessiva da adrenal) são dois exemplos para os quais o ensaio específico dos níveis de cortisol em circulação será de grande utilidade na avaliação do paciente.<sup>9,10</sup>

### 3. PRINCÍPIOS DO ENSAIO

O procedimento do Kit de radioimunoensaio do Cortisol GammaCoat [<sup>125</sup>I] baseia-se nos princípios de ligação competitivos do radioimunoensaio.<sup>11</sup> Os calibradores e amostras desconhecidas (soro, plasma ou urina) são incubados com traçador de cortisol em tubos revestidos com anticorpos, nos quais o anticorpo está imobilizado na parte inferior da parede interna do tubo GammaCoat. Após a incubação, o conteúdo do tubo é aspirado ou decantado e o tubo é contabilizado. É preparada uma curva de calibragem com 5 calibradores de soro entre 1-60 µg/dL. Os valores desconhecidos são interpolados da curva de calibragem. O ensaio é totalmente realizado dentro do tubo revestido. Não são necessárias diluições de amostras, desnaturação de proteínas ou fases de extracção para as amostras de soro, urina ou plasma.

Além dos ensaios de cortisol urinário não extraído, o procedimento do Kit de radioimunoensaio do Cortisol GammaCoat [<sup>125</sup>I] também pode ser utilizado para medir o cortisol livre (não conjugado) urinário. O cortisol presente na urina deve começar por ser extraído para o cloreto de metileno. Uma alíquota do extracto é evaporada directamente para o tubo revestido com anticorpos GammaCoat. (Testes demonstraram que não ocorrem efeitos nocivos no tubo revestido a anticorpos se for usado cloreto de metileno de boa qualidade.) Para assegurar que as amostras contêm os níveis adequados de proteínas, são adicionados 10 microlitros de Branco de Soro do Cortisol (CA-2367) a cada tubo GammaCoat. O resto do procedimento de ensaio é semelhante ao utilizado para as determinações de cortisol no soro, no plasma ou na urina não extraída. A eficácia da extracção de cortisol da urina pelo cloreto de metileno deve ser monitorizada.

#### 4. REAGENTES FORNECIDOS NO KIT

Calibradores de Cortisol (A-F)	6 frascos/ 1 mL	6 frascos/ 1 mL
Tubos revestidos a Cortisol	2 sacos /50 ea	10 sacos / 50 ea
Traçador de Cortisol	1 frasco/ 10 mL	5 frascos/10 mL ea
Tampão PBS	1 frasco/ 100 mL	5 frascos / 100 mL ea
Número de testes	100	500

ARMAZENAMENTO: Todos os reagentes, incluindo o reagente traçador-tampão permanecem estáveis até ao prazo de validade indicado no rótulo do kit, se forem armazenados a 2-8 °C. Os tubos revestidos a anti-cortisol podem ser armazenados a 2-27 °C. Não utilize os reagentes além do prazo de validade do kit. Não misture reagentes de lotes diferentes.

##### 4.1 Traçador de Cortisol: reagente pronto a usar

Cada frasco contém cerca de 4 µCi de traçador (<1 µg/mL Cortisol) em 10 mL de salina de tampão fosfato, ANS (Ácido 8-anilino-1-naftaleno sulfónico) com 0,1% de azida de sódio como conservante.

##### 4.2 Tubos revestidos a soro anti-cortisol de coelho: reagente pronto a usar

Os tubos de 12 x 75 mm encontram-se revestidos com soro anti-cortisol de coelho (grau <1 µg/tubo) e estão embalados num saco de plástico.

##### 4.3 Tampão PBS: reagente pronto a usar

Cada frasco contém 100 mL de salina de tampão fosfato com 0,1% de azida de sódio como conservante.

##### 4.4 Calibradores do Soro de Cortisol: reagente pronto a usar

Cada frasco contém cortisol em 1 mL de soro humano processado com 0,1% de azida de sódio como conservante. Os calibradores são fornecidos nas seguintes concentrações: 0, 1, 3, 10, 25 e 60 µg/dL, respectivamente. Os calibradores do Cortisol da Diasorin foram calibrados de acordo com a Norma de Referência do Cortisol U.S.P. Qualquer comparação com outros produtos ou procedimentos deve ser efectuada com base nesta norma de referência. Os calibradores do kit demonstram permutabilidade com amostras de pacientes quando usados com reagentes e um procedimento operacional deste teste de diagnóstico in vitro tal como recomendado.

##### 4.5 Etiqueta Auxiliar

Para reagente traçador-tampão

##### 4.6 DISPONÍVEL A PEDIDO:

Papel de Gráfico Semi-Logarítmico  
50 folhas por conjunto

#### 5. AVISOS E PRECAUÇÕES

PARA USO DIAGNÓSTICO IN VITRO.

Não recomendado para o uso interno ou externo em seres humanos ou animais.

##### Reagentes com material de fonte humana

**Trate como se fossem potencialmente infecciosos.**

Cada unidade de doador de soro/plasma usados na preparação deste produto foi testado por um método aprovado pela FDA tendo sido considerado não reactivo para a presença de HBsAg, anticorpos para HCV e anticorpos para HIV 1/2. Embora estes métodos sejam bastante precisos, não garantem que todas as unidades infectadas sejam detectadas. Este produto também pode conter outros materiais de origem humana para os quais não há teste aprovado. Como nenhum método de teste conhecido pode oferecer segurança total em relação à ausência do vírus da hepatite B (HBV), do vírus da hepatite C (HCV), do vírus da Imunodeficiência Humana (VIH) ou de outros agentes infecciosos, todos os produtos que contêm materiais de origem humana devem ser manuseados de acordo com boas práticas laboratoriais, usando as precauções adequadas tal como descrito no Manual dos Centros Americanos para Controlo e Prevenção de Doenças e Institutos Nacionais de Saúde, "Biosegurança em Laboratórios Microbiológicos e Biomédicos," (Biosafety in Microbiological and Biomedical Laboratories) 4ª edição, Maio 1999 ou edição actual.

#### **REAGENTES COM AZIDA DE SODIO**

**CUIDADO:** Alguns reagentes presentes neste kit contêm azida de sódio. A azida de sódio pode reagir com chumbo ou cobre para formar azidas de metal altamente explosivo. Ao eliminar, lave com grande quantidade de água para impedir a formação de azida. Para mais informações, consulte “Descontaminação de drenos de pias de laboratórios para remover sais de azidas,” no Manual Guia-Gestão de Segurança Nº. CDC-22 emitido pelos Centros de Controlo e Prevenção de Doenças, Atlanta, GA, 1976.

**Frases de Risco de Substâncias Perigosas da Comunidade Europeia (Directiva do Conselho 1999/45/EC)**

R20/21/22 - Nocivo pela inalação, em contacto com a pele e se ingerido.

R32 - O contacto com ácidos liberta gás muito tóxico.

S28 - Após contacto com a pele, lave imediatamente com água em abundância.

#### **REAGENTES COM IODO-125**

Devem ser tomadas todas as precauções apropriadas e usadas boas práticas laboratoriais no armazenamento, manuseio e eliminação deste material.

Para médicos ou instituições que recebem rádio-isótopos sob uma licença geral:

Este material radioactivo pode ser recebido, adquirido, possuído e usado apenas por médicos, veterinários na prática da medicina veterinária, laboratórios clínicos e hospitais, e apenas para testes laboratoriais ou testes clínico in vitro que não envolvam administração interna ou externa do material, ou a radiação deste para seres humanos ou animais. A sua recepção, aquisição, posse, uso e transferência estão sujeitos aos regulamentos e à licença geral da Comissão Reguladora Nuclear dos Estados Unidos do estado com o qual a Comissão entrou em acordo para o exercício da autoridade reguladora.

1. O armazenamento de qualquer material radioactivo deve ser limitado a uma área especificamente designada.
2. O acesso a materiais radioactivos deve ser limitado apenas a pessoal autorizado.
3. Não pipete material radioactivo por via oral.
4. Não coma nem beba nas áreas designadas para trabalho radioactivo.
5. As áreas onde possam ocorrer fugas devem ser limpas e lavadas com detergente alcali ou solução de descontaminação radiológica. Qualquer vidro usado deve ser enxaguado completamente em água antes de lavar qualquer outro material de vidro do laboratório.

Para médicos ou instituições que recebem rádio-isótopos sob uma licença específica:

A recepção, uso, transferência e eliminação de materiais radioactivos estão sujeitos aos regulamentos e condições de sua licença específica.

**ADVERTÊNCIA:** Este produto contém um elemento químico que provoca cancro, segundo o Estado da Califórnia.

**ATENÇÃO:** O símbolo de radioactividade impresso na embalagem pode ser ligeiramente diferente do símbolo impresso no rótulo da caixa e no rótulo do frasco do traçador. O rótulo da caixa e do frasco do traçador indicam a quantidade real de radioactividade na data de calibragem enquanto a embalagem indica a radioactividade teórica no kit.

#### **6. RECOLHA E PREPARAÇÃO DOS ESPÉCIMES**

##### **Amostras de Plasma**

Recolha uma amostra de sangue venoso, usando métodos assépticos, para um tubo de vidro evacuado contendo heparina ou EDTA.

Separe a fracção de plasma. O plasma pode ser armazenado no frigorífico durante a noite a uma temperatura de 2-8 °C. Para armazenar durante um período de tempo superior, as amostras devem ser congeladas a -20 °C. Evite as amostras hemolisadas, lipémicas ou ictéricas.



### **Amostras de Soro**

Apesar de as amostras de plasma serem habitualmente especificadas para os ensaios do cortisol, os resultados comparáveis são obtidos utilizando as amostras de soro.<sup>12</sup>

Separe a fracção de soro. O soro pode ser armazenado no frigorífico durante a noite a uma temperatura de 2-8 °C. Para armazenar durante um período de tempo superior, as amostras devem ser congeladas a uma temperatura de -20 °C. Evite o uso de amostras hemolisadas, lipémicas ou ictéricas.

### **Amostras de urina**

Recolha um espécime de urina de 24 horas. Registe o volume total de urina. Adicione 10 gramas de ácido bórico por litro de urina como conservante e armazene uma alíquota bem misturada, congelada a -20 °C. Corte as amostras congeladas à temperatura ambiente e misture-as bem antes de utilizar.

## **7. EQUIPAMENTOS E MATERIAIS NECESSÁRIOS NÃO FORNECIDOS**

- 7.1 Banho de água a temperatura constante,  $37 \pm 2$  °C.
- 7.2 Pipeta de precisão (10 µL).
- 7.3 Pipeta semi-automática (1.0 mL).
- 7.4 Contador gama.
- 7.5 Suporte do tubo de ensaio.
- 7.6 Aspirador de água (opcional).
- 7.7 Misturador de vórtice.
- 7.8 Papel absorvente com suporte de plástico (opcional).

Equipamento adicional para uso exclusivo no procedimento de extracção de urina:

1. Tubos de ensaio de vidro descartáveis (12 x 75 mm) com tampas.
2. Cloreto de metileno (diclorometano; ACS grau de reagente analítico).
3. Banho de gelo.
4. Pipetas de precisão (100 & 200 µL).
5. Exaustor ou área bem ventilada.
6. Meios de evaporação do cloreto de metileno. A evaporação pode ser efectuada com uma corrente de ar seco ou de nitrogénio e um ligeiro aquecimento do extracto até cerca de 37 °C num exaustor ou numa área bem ventilada.

## **8. PROCEDIMENTO DE EXTRACÇÃO DA URINA**

Este procedimento inclui a metodologia para determinar a eficácia da extracção com cloreto de metileno. As recuperações habituais do cortisol das amostras de urina apresentaram uma média de  $99 \pm 14\%$  nos laboratórios DiaSorin.

- 8.1 Coloque um volume adequado de cloreto de metileno em banho de gelo para arrefecer. Adicione mais de 1 mL por tubo. O banho de gelo deve ter a largura suficiente para acomodar um copo grande de cloreto de metileno e o suporte dos tubos de ensaio em vidro para as extracções.
- 8.2 Para determinar a eficácia da extracção, coloque etiquetas em dois tubos de ensaios de vidro descartáveis para que cada amostra seja ensaiada com a identificação do paciente. Rotule um dos tubos com um "A" de Amostra e o outro tubo com um "E" de Eficácia da Extracção.
- 8.3 Adicione 200 microlitros de amostra de urina com 24 horas, bem misturada, aos tubos apropriados "A" e "E".
- 8.4 Adicione apenas a cada tubo "E" 10 µL do Calibrador de Soro do Cortisol de 60 µg/dL. Misture os reagentes agitando o suporte dos tubos de ensaio ou misturando cada um dos tubos.
- 8.5 Adicione 1.0 mL de cloreto de metileno arrefecido a cada tubo "A" e "E". Agite bem para extrair o cortisol para a camada orgânica. Coloque a tampa ou tape e deixe em banho de gelo para evitar a evaporação excessiva do cloreto de metileno. Para conseguir pipetar o cloreto de metileno mais facilmente, é importante que enxague a pipeta 3 a 4 vezes com cloreto de metileno FRIO antes de o transferir para os tubos adequados.

- 8.6** Enquanto aguarda pela ocorrência da separação da fase, coloque rótulos em dois tubos de Cortisol GammaCoat por cada tubo "A" e em dois tubos de Cortisol GammaCoat por cada tubo "E".
- 8.7** Após a separação da fase, retire cuidadosamente 100 µL da camada inferior (cloreto de metileno) de cada tubo e adicione aos tubos GammaCoat devidamente etiquetados. O enxaguamento da ponta da pipeta em cloreto de metileno antes de pipetar a amostra minimizará a filtragem da amostra extraída da ponta da pipeta. Ao transferir a alíquota de 100 µL da solução de extracção para o tubo revestido, não tente limpar a ponta da pipeta, já que as propriedades físicas do cloreto de metileno provocam fugas e a ocorrência de bolhas de ar na ponta da pipeta.  
Para facilitar a transferência da solução de extracção para o tubo revestido, segure no tubo de extracção e no tubo GammaCoat com a mesma mão. Rapidamente, mas de forma cuidadosa, transfira os 100 µL de extracto para a parte inferior do tubo GammaCoat.
- 8.8** Evapore o cloreto de metileno dos tubos GammaCoat com uma corrente de ar seco ou de nitrogénio e fazendo um ligeiro aquecimento do extracto para cerca de 37°C.  
**CUIDADO:** Evite as concentrações excessivas de vapores de hidratos de carbono halogenados nas áreas de trabalho. A EVAPORAÇÃO DEVE SER FEITA APENAS JUNTO DE UM EXAUSTOR OU DE UMA ÁREA BEM VENTILADA.
- 8.9** Depois do cloreto de metileno estar completamente evaporado, adicione 10 µL de Branco de Soro do Cortisol de 0 µg/dL, CA-2367, a cada tubo com amostras do paciente GammaCoat (tubos "A" e "E"), para se certificar que as amostras contêm os níveis adequados de proteínas.
- 8.10** Continue com o procedimento RIA, começando pelo passo 1 do Procedimento do Ensaio.

## 9. PROCEDIMENTO DO ENSAIO

### Reagente Traçador-Tampão:

Adicione a totalidade do conteúdo de 1 frasco de traçador do cortisol a 1 frasco de tampão PBS e agite ligeiramente. Um enxaguamento final do frasco do traçador do cortisol com o reagente traçador-tampão permitirá maximizar a transferência do traçador. Preencha e cole a etiqueta auxiliar do reagente traçador-tampão ao recipiente para uma identificação adequada. O reagente traçador-tampão deve ser armazenado em locais escuros, ou num recipiente embrulhado em papel de alumínio, a 2-8 °C.

O procedimento do ensaio inclui a preparação de uma curva de calibragem a partir da qual o conteúdo de cortisol desconhecido presente na amostra será interpolado.

- 9.1** Permita que todos os reagentes atinjam a temperatura ambiente e misture bem sem provocar a formação de espuma, antes de utilizar.
- 9.2** Cole duas etiquetas aos tubos GammaCoat de acordo com o esquema seguinte. Os tubos de contagem total [T1,T2] e B0 [1,2] podem ser necessários para determinados programas de controlo de qualidade e de redução de dados, mas podem ser omitidos se a curva de calibragem for desenhada em papel de gráfico semi-logarítmico.<sup>13-15</sup>
- 9.3** Adicione à camada inferior dos dois tubos GammaCoat adequados:
- 10 µL de Branco de Soro do Cortisol ou cada Calibrador de Soro do Cortisol.
  - NO CASO DE AMOSTRAS DE SORO, PLASMA E DE URINA NÃO EXTRAÍDA, adicione 10 µL de cada amostra. Tenha o cuidado de pipetar os calibradores e as amostras da mesma forma.<sup>16</sup>

- c. NO CASO DE AMOSTRAS DE URINA EXTRAÍDA, use os tubos GammaCoat contendo as amostras extraídas no passo 9 do Procedimento de Extração da Urina.

Nota: É aconselhável proceder à diluição das amostras de plasma ou de soro do paciente, razão pela qual deverá utilizar o Branco de Soro do Cortisol fornecido neste kit como diluente. No caso das amostras de urina extraída ou não extraída, dilua a quantidade necessária, em água destilada. Para o Cortisol Livre Urinário, extraia uma alíquota de 200 µL da amostra de urina diluída (Procedimento de Extração da Urina, Passo 3). Prossiga com o ensaio de rotina. O factor de diluição deve ser incluído em todos os cálculos.

- 9.4 Adicione 1.0 mL do reagente traçador-tampão a cada tubo. Misture cuidadosamente cada tubo num misturador de vórtex ajustado para uma velocidade reduzida.

- 9.5 Incube os tubos durante 45 minutos em banho de água a  $37 \pm 2$  °C.

- 9.6 Aspire ou decante todos os tubos excepto os de Contagem Total.

**A NÃO REMOÇÃO DA SOLUÇÃO ADERENTE DE FORMA ADEQUADA PODERÁ RESULTAR NUMA REPRODUÇÃO DEFICIENTE E EM VALORES FALSOS.**

Se utilizar a técnica de aspiração, certifique-se de que a ponta plástica do aspirador entra em contacto com o fundo do tubo revestido e de que a totalidade do líquido é retirada.

Se utilizar a técnica de decantação, permita que os tubos sequem numa posição invertida durante 3 a 5 minutos. Passe os tubos por papel absorvente para retirar qualquer líquido que possa ter permanecido no interior, antes de colocar os tubos direitos.

- 9.7 Conte todos os tubos num contador gama durante 1 minuto com a janela devidamente ajustada para iodina-125.

- 9.8 Calcule os resultados. Consulte os Resultados.

## 10. PROCEDIMENTO SALIVAR

Este kit também possibilita a execução de ensaios de amostras de saliva.

Está demonstrado que há uma boa correlação entre a concentração de cortisol na saliva e a concentração de cortisol livre no plasma e no soro (estas concentrações representam 60% a 100% da concentração da fracção livre em circulação e 4% a 6% da concentração total no soro ou no plasma).

Numerosos estudos demonstraram as vantagens diagnósticas e práticas dos ensaios de cortisol salivar, tendo confirmado a sua validade e valor clínico.

Foram tidos em consideração dois pontos importantes ao adaptar esta técnica aos ensaios do cortisol salivar:

Primeiro, como o cortisol salivar representa apenas 5% do total de cortisol no plasma, é necessário desdobrar 20 vezes a sensibilidade. Para alcançar esse nível de sensibilidade, a amostra de saliva foi aumentada para um volume de 200 µL.

Em segundo lugar, a saliva tem uma menor concentração de proteínas (geralmente consistem em enzimas e glicoproteínas). Só se encontram quantidades residuais de proteínas do plasma, enquanto as proteínas que fazem a ligação com os corticosteróides estão ausentes. Para garantir que os efeitos da matriz da proteína são semelhantes na amostra e nos padrões, é adicionado calibrador 0 (sem cortisol) a cada amostra de saliva (tal como nos ensaios das amostras de urina extraída).

Assim, apenas são necessárias ligeiras alterações para pipetar as amostras e os padrões de forma a adaptar o método aos ensaios das amostras de saliva, usando apenas reagentes já fornecidos neste kit.

### 10.1 Recolha e preparação de amostras de saliva

A saliva deve ser recolhida 10 minutos após os pacientes lavarem a boca com água da torneira. A produção de saliva não deve ser estimulada e deverá explicar ao paciente a diferença entre a saliva e o muco. É possível recolher um volume suficiente de 1 mL de saliva em alguns minutos, mesmo em crianças.

As amostras devem ser armazenadas congeladas a  $-20^{\circ}\text{C}$ . Antes do ensaio, devem ser descongeladas e centrifugadas; o sobrenadante claro é depois extraído para o ensaio.

### 10.2 Procedimento Salivar

Por cada **amostra de saliva**, pipete 10  $\mu\text{L}$  de calibrador 0 em pares para os tubos etiquetados; adicione 200  $\mu\text{L}$  da amostra e 1 mL do traçador.

Para o **intervalo normal**, pipete 10  $\mu\text{L}$  de calibrador 0 ou do padrão em pares para os tubos etiquetados; adicione 200  $\mu\text{L}$  de tampão PBS, mais 1 mL de traçador.

Agite suavemente cada tubo. Incube durante 45 min. em banho de água a  $37^{\circ}\text{C}$ . Bombeie ou decante o conteúdo dos tubos e meça a radioactividade ligada às paredes laterais do tubo durante 1 minuto.

Curva padrão

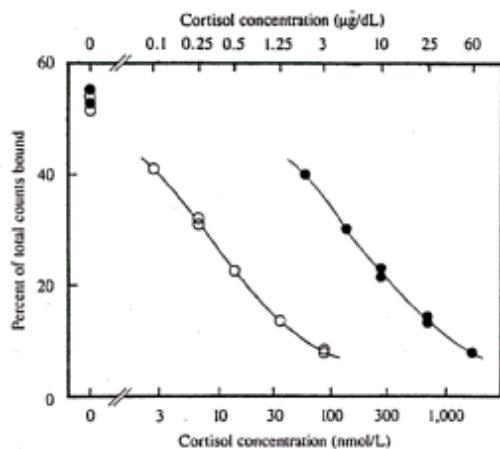


Figure 3  
Standard curves for assay of cortisol in serum or plasma (●) and in saliva (○) with the GammaCoat™ [ $^{125}\text{I}$ ] RIA kit.

O intervalo padrão real para o cortisol salivar é de 0,10 – 0,25 – 0,50 – 1,25 e 3,0  $\mu\text{g/dL}$ . As curvas padrão para as duas técnicas de ensaio (soro e saliva) abrangidas por este kit estão ilustradas no gráfico à esquerda.

Apesar do volume de incubação ser ligeiramente superior no ensaio salivar em relação ao ensaio do soro (1,210  $\mu\text{L}$  em vez de 1,010  $\mu\text{L}$ ), essa situação não provoca qualquer efeito na capacidade de ligação do marcador dentro do intervalo da curva padrão.

Nota: Esta curva foi obtida durante um estudo conduzido em 1984 com um intervalo padrão de 0, 2,0, 5,0, 10, 25 e 60  $\mu\text{g/dL}$ . O intervalo padrão foi, desde essa altura, modificado. Consulte o novo intervalo para os cálculos de cortisol salivar, tendo em consideração uma relação de 1:20.

## Valores normais

Tabela 1

Níveis matinais normais de cortisol na saliva e no soro ( $\mu\text{g/dL}$ )						
Grupo de estudo*	Saliva			Soro		
	n	Média	Intervalo	n	Média	Intervalo
Adultos normais	150	0,43	0,18 – 1,01	103	6,5	4,5 – 21,1
Crianças (4 – 11 anos de idade)	105	0,40	0,14 – 0,91	---	---	---
Mulheres grávidas (3 trimestre)	84	0,47	0,33 – 0,91	84	15,7	12,9 – 39,9

\* Residentes no Reino Unido

### 11. CONTROLO DE QUALIDADE

Cada laboratório deve utilizar controlos em diversos níveis para monitorizar o desempenho do ensaio. Os controlos devem ser tratados como espécimes desconhecidos. Devem ser mantidas tabelas de controlo da qualidade para acompanhar o desempenho dos controlos. Devem-se usar métodos estatísticos adequados para avaliar as tendências. Os limites aceitáveis de desempenho devem ser verificados para cada laboratório individual.

### 12. CÁLCULO DE RESULTADOS

As amostras de soro, plasma e urina desconhecidas podem ser ensaiadas em simultâneo, sendo todas interpoladas a partir de uma curva de calibragem gerada com os Calibradores de Soro do Cortisol. Tanto as amostras de cortisol urinário não extraído (UC) como as amostras de cortisol livre urinário extraído (UFC) são depois convertidas em " $\mu\text{g}/24$  horas" utilizando a fórmula adequada.

- 12.1 Registe as contagens por minuto (CPM) ligadas a cada tubo.
- 12.2 Desenhe a ligação CPM para os calibradores do cortisol (eixo vertical) em relação à concentração do cortisol (eixo horizontal) em papel de gráfico semi-logarítmico.
- 12.3 Desenhe a curva que melhor se adequar. Para ver os gráficos e os dados habituais, consulte a TABELA II e a FIGURA 1.
- 12.4 Localize a ligação da CPM de cada tubo correspondente a cada uma das amostras (controlo, soro, plasma, urina extraída e não extraída) no eixo vertical e siga uma linha horizontal que cruze a curva do calibrador. No ponto de cruzamento, leia a concentração de ( $\mu\text{g/dL}$ ) no eixo horizontal.

### 12.5 Cortisol Urinário Não Extraído

Para converter o cortisol urinário (UC) de amostras de urina não extraída de µg/dL para µg de cortisol por cada 24 horas, use a equação seguinte:

$$UC = \frac{S \times V}{100}$$

sendo que:

S = concentração da amostra de urina não extraída em µg/dL  
V = volume total de urina em mL/24 horas  
100 = factor de conversão

### 12.6 CORTISOL LIVRE URINARIO EXTRAIDO

Para converter o cortisol livre urinário (UFC) das amostras de urina extraídas de µg/dL para µg de cortisol por cada 24 horas, use a equação seguinte

$$UFC = \frac{S \times V}{33,3 (E-S)}$$

sendo que:

S = concentração da amostra de urina extraída em µg/dL  
E = concentração do tubo de eficácia para a amostra correspondente em µg/dL  
V = volume total de urina em mL/24 horas

33,3 = diluição combinada e factor de eficácia da extracção

Exemplo:

E = 13,50 µg/dL  
S = 7,85 µg/dL  
V = 1150 mL/24 horas

$$UFC = \frac{(7,85) (1150)}{33,3 (13,50-7,85)} = 48 \text{ µg cortisol/24 horas}$$

Para os laboratórios que pretendam monitorizar a eficácia do procedimento de extracção de urina (EE), é possível utilizar a fórmula seguinte para calcular a eficácia como percentagem.

$$EE = \frac{E-S}{6,0} \times 100$$

sendo que:

S = Concentração da amostra de urina extraída em µg/dL  
E = Concentração do tubo de eficácia para a amostra correspondente em µg/dL  
6,0 = Diferença aguardada entre as concentrações dos tubos "E" e "A" em µg/dL  
100 = Factor de conversão

### 12.7 Unidades S.I.

Utilizando um peso molecular de 362.5 daltons, os calibradores do soro, os controlos e os valores do paciente (soro e plasma) podem ser convertidos de microgramas por decilitro (µg/dL) em nanomoles por litro (nmol/L) de unidades S.I. multiplicando por 27,59 (Consulte a TABELA II para obter os valores dos calibradores do cortisol indicados em ambas as unidades). De igual modo, os controlos de urina extraída e não extraída e os valores dos pacientes podem ser convertidos de microgramas por 24 horas (µg/24 hr) para nanomoles por 24 horas (nmol/24 hr) de unidades S.I. multiplicando por 2,76.

**TABELA II**

Concentração de calibradores

Cat. N°	Nível do Calibrador	Unidades S.I.
CA-2367	0 µg/dL	0 nmol/L
CA-2358	1 µg/dL	28 nmol/L
CA-2359	3 µg/dL	83 nmol/L
CA-2370	10 µg/dL	276 nmol/L
CA-2371	25 µg/dL	690 nmol/L
CA-2372	60 µg/dL	1655 nmol/L

**TABELA III**

Registo dos Dados

Não utilize para calcular espécimes desconhecidos

Tubo N°	Conteúdo dos Tubos	Ligação a CPM	Concentração de Cortisol (µg/dL)
T1	Contagens totais (Traçador-Tampão)	44516	
T2	Contagens totais (Traçador-Tampão)	43651	
1	Branco de Soro do Cortisol, B <sub>0</sub>	0 µg/dL	22311
2	Branco de Soro do Cortisol, B <sub>0</sub>	0 µg/dL	22771
3	Calibrador de Soro do Cortisol	1 µg/dL	19216
4	Calibrador de Soro do Cortisol	1 µg/dL	19243
5	Calibrador de Soro do Cortisol	3 µg/dL	15331
6	Calibrador de Soro do Cortisol	3 µg/dL	15731
7	Calibrador de Soro do Cortisol	10 µg/dL	10660
8	Calibrador de Soro do Cortisol	10 µg/dL	10294
9	Calibrador de Soro do Cortisol	25 µg/dL	6862
10	Calibrador de Soro do Cortisol	25 µg/dL	6657
11	Calibrador de Soro do Cortisol	60 µg/dL	4186
12	Calibrador de Soro do Cortisol	60 µg/dL	4224
13	Amostra "A" Paciente	18470	1,3
14	Amostra "A" Paciente	18992	1,1
			Av: 1,2
15	Amostra "B" Paciente	10377	10,1
16	Amostra "B" Paciente	10608	9,6
			Av: 9,9
17	Amostra "C" Paciente	6316	28,8
18	Amostra "C" Paciente	6318	28,8
			Av: 28,8

## Resultados Típicos

Não utilize para calcular espécimes desconhecidos

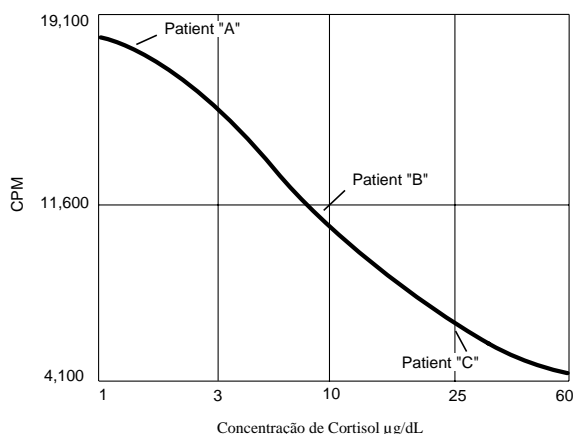


FIGURA 1

## 13. LIMITAÇÕES DO PROCEDIMENTO

### 13.1 Processuais

O reagente traçador-tampão deve estar protegido da luz. Os tubos revestidos estão prontos para serem usados tal como recebidos, devendo ser armazenados a uma temperatura de 2-27 °C. A protecção de plástico deve estar bem fechada sempre que armazenar os tubos não utilizados para evitar a formação de condensação.

As condições de incubação devem ser verificadas regularmente. A temperatura do banho de água deve estar constante a  $37 \pm 2$  °C e o nível de água deve ser mantido acima do nível das soluções nos tubos sem permitir que estes flutuem.

O utilizador deve ter em consideração que os resultados incorrectos podem ser provocados por um armazenamento inadequado e por um manuseamento inapropriado das amostras. Evite a utilização de amostras hemolisadas, lipémicas ou ictéricas.

A incapacidade de obter valores adequados de cortisol nos controlos poderá indiciar manipulações imprecisas, um manuseamento impróprio ou a deterioração dos reagentes. Os controlos devem ser incluídos em todos os ensaios. É necessário estabelecer uma curva de calibragem para cada ensaio.

O Kit do Cortisol GammaCoat não deve ser usado para qualificar os níveis de cortisol em amostras de pacientes tratados com prednisolona. Consulte as Limitações Interpretativas.

### 13.2 Interpretativas

Os níveis normais do cortisol são geralmente mais elevados entre as 5 da manhã e as 10 da manhã e mais reduzidos entre as 8 da noite e as 4 da manhã.<sup>5</sup> Os níveis da manhã são normalmente 1/2 a 1/3 dos níveis matinais. Foi descrito um aumento súbito ao meio-dia nos níveis de cortisol nas mulheres, coincidente com a ingestão de alimentos e atenuado de forma acentuada pela privação de alimentos.<sup>17</sup> A variação diurna, os testes de supressão e de estimulação e os diversos tipos de situações de stress afectam normalmente os níveis do cortisol. Por exemplo, a estimulação ACTH produz habitualmente valores duas a três vezes acima do nível de referência matinal.<sup>18</sup> A supressão da metirapona e da dexametasona produz habitualmente amostras matinais com valores inferiores a 5 µg/dL.<sup>10</sup> Os estrogénios, tal como os contraceptivos, podem provocar níveis elevados de cortisol em resultado de concentrações alteradas de proteínas do plasma e do soro. Assim, os valores do cortisol de cada paciente são normalmente avaliados em relação ao seu nível de cortisol matinal.



Os ensaios de cortisol de amostras provenientes de pacientes submetidos a tratamentos com prednisolona são contra-indicados devido à elevada reactividade cruzada do anticorpo de cortisol presente neste kit com a prednisolona e a 6-metilprednisolona. A reactividade cruzada elevada pode produzir níveis de cortisol aparentemente elevados.

As determinações relativas ao cortisol geradas pelo protocolo urinário directo resultarão em valores clinicamente válidos quando comparados com o intervalo normal relatado do cortisol urinário não extraído. Como se sabe que as substâncias não identificadas presentes na urina podem interferir com os imunoenaios do cortisol livre, os valores obtidos com a utilização de protocolos urinários directos serão superiores aos obtidos com amostras de urina que tenham sido purificadas por meio de técnicas tais como a cromatografia líquida de alta pressão.<sup>19,20</sup>

#### 14. VALORES ESPERADOS

##### 14.1 Níveis de Plasma ou Soro

Manhãs:

7-25 µg/dL ou 70-250 ng/mL

[193-690 nmol/L]

Noites:

2-9 µg/dL ou 20-90 ng/mL

[55-248 nmol/L]

Estes intervalos podem ser utilizados como referência até que cada laboratório tenha estabelecido os seus próprios intervalos normais.

##### 14.2 Cortisol Urinário Não Extraído

O intervalo normal para o cortisol urinário (UC) de amostras de urina não extraídas é de 75-270 µg por cada 24 horas [207-745 nmol/24 hr]. As recolhas inadequadas de amostras de urina poderão resultar numa avaliação incorrecta do paciente. Recomenda-se a determinação da creatinina como meio de identificação das recolhas de urina excessivamente inadequadas.<sup>21</sup>

##### 14.3 Cortisol Livre Urinário Extraído

O intervalo normal do cortisol livre urinário é de 20-90 µg de cortisol por cada 24 horas [55-248 nmol/24 hr]. A recolha inadequada de amostras de urina poderá resultar numa avaliação incorrecta do paciente. Recomenda-se a determinação da creatinina como meio de identificação das recolhas de urina excessivamente inadequadas.<sup>21</sup>

#### 15. CARACTERÍSTICAS ESPECÍFICAS DE DESEMPENHO

##### 15.1 Precisão

A precisão intra-ensaio foi determinada a partir da média de 20 ensaios simultâneos por amostra de soro. A precisão inter-ensaio foi determinada a partir da média de duplicados para 20 ensaios individuais.

Amostra de precisão do intra-ensaio	Número de ensaios	Média (µg/dL)	Desvio padrão (µg/dL)	Coefficiente de Variação (%)
Conjunto de Soro A	20	2,9	0,19	6,6
Conjunto de Soro B	20	12,1	0,93	7,7
Conjunto de Soro C	20	47,1	3,18	6,8
Amostra de Precisão do inter-ensaio	Número de Ensaios individuais	Média (µg/dL)	Desvio padrão (µg/dL)	Coefficiente de variação (%)
Conjunto de Soro D	20	3,7	0,33	9,0
Conjunto de Soro E	20	12,1	1,19	9,8
Conjunto de Soro F	20	36,9	3,24	8,8

**15.2 Precisão:** A precisão deste ensaio foi verificada através do teste de recuperação.

**Recuperação a partir de Soros Combinados**

As amostras enriquecidas foram preparadas através da diluição de uma amostra de cortisol elevada conhecida com um conjunto de soro analisado anteriormente. Cada amostra enriquecida foi ensaiada em quadruplicado. A percentagem de recuperação é calculada como (recuperada/aguada) x 100.

Contribuição da Enriquecida (µg/dL)	Contribuição do Conjunto (µg/dL)	Valor aguardado (µg/dL)	Valor recuperado (µg/dL)	Percentagem (%) de recuperação
4,2	1,6	5,8	5,5	95
11,2	1,6	12,7	12,8	101
17,2	1,6	18,8	18,4	98
26,3	1,6	27,9	25,4	91
41,2	1,6	42,8	39,2	92

**15.3 Sensibilidade Analítica**

A sensibilidade da curva de calibragem é definida como o valor simples mais pequeno passível de ser distinguido de zero. Uma estimativa estatística da concentração mínima detectável (sensibilidade) foi calculada de acordo com o método de D. Rodbard<sup>22</sup> para 30 réplicas no ponto zero da curva de calibragem. A sensibilidade calculada é de 0.21 µg/dL.

**15.4 Grau de afinidade**

A afinidade calculada constante no anti-soro do cortisol é de aproximadamente 2 x 10<sup>8</sup> litros/mole.

**15.5 Especificidade Analítica**

Os dados sobre a reactividade cruzada do anti-soro usado neste kit são expressos como a relação da concentração de cortisol para a concentração de substância de reacção cruzada a uma inibição de 50% da ligação máxima.

Composto	% Reactividade Cruzada
Cortisol	100
Prednisolona	25,5
6-Metilprednisolona	14,5
11-Desoxicortisol	9,8
17-Hidroxiprogesterona	0,4
Corticosterona	0,9
Dexametasona	0,049
Prednisona	3,8
Desoxicorticosterona	0,14
Tetrahydrocortisona	0,2
Aldosterona	<0,1
β-Cortol	<0,1
β-Cortolona	<0,1
Cortisona	10,3
Dihidro cortisona	0,43
Progesterona	0,015
Spirolactona	<0,1
Tetrahydrocortisol	0,3
6-β-Hidro cortisona	4,2

**CONSULTE A ÚTIMA PÁGINA PARA OBTER REFERÊNCIAS**

## GAMMACOAT™ CORTISOL RIA KIT

### 1. AVSEDD ANVÄNDNING

FÖR DIAGNOSTISKT BRUK IN VITRO.

GammaCoat™ [<sup>125</sup>I] Cortisol Radioimmunoassay Kit är avsett för kvantitativ bestämning av halten kortisol (hydrokortison, substans F) i serum, plasma eller urin.

### 2. SAMMANFATTNING OCH FÖRKLARING

Kortisol (hydrokortison, substans F) är den viktigaste glukokortikoiden och utsöndras av binjurebarken. Bland dess fysiologiska effekter kan nämnas antiinflammatorisk aktivitet, upprätthållande av blodtrycket och syntes av kolhydrat från protein.

Glukokortikoider syntetiseras som svar på adrenokortikotropt hormon (ACTH) som utsöndras av hypofysens framlob. Hos friska personer deltar kortisol i en slinga med negativ återkoppling med ACTH via hypotalamus-hypofys-binjure-axeln (HPA-axeln). Hypofysens ACTH regleras i sin tur av kortikotropinfrisättande faktor (CRF) som utsöndras av hypotalamus. Sekretionen av CRF från hypotalamus reagerar på kortisonnivåerna och på stress. Kortisolsekretionen påverkas av fysisk och psykologisk stress, dygnsrytmen och låga blodsockervärden.<sup>1-6</sup>

En rubbning i något av organen i HPA-axeln leder till en störning av kortisolnivåerna.<sup>7,8</sup> En utvärdering av binjurfunktionen genom mätning av kortisolnivåerna i plasma eller serum underlättar vid diagnos av normala och patologiska tillstånd. Genom att kombinera mätningar gjorda på morgonen eller kvällen med stimuleringstest eller hämningstest kan man få starka indikationer för diagnostik av specifika binjurerelaterade sjukdomar. Diagnoserna Addisons sjukdom (kronisk binjureinsufficiens) och Cushings syndrom (överproduktion från binjuren) är två exempel där den specifika assayen för kortisolnivåerna i blod är av stort värde vid bedömning av patienten.<sup>9,10</sup>

### 3. ANALYSPRINCIP

Testmetoden för GammaCoat [<sup>125</sup>I] Cortisol Radioimmunoassay Kit är baserad på principen med kompetitiv bindning i en radioimmunoassay.<sup>11</sup> Kalibreringslösningar och okända prov (serum, plasma eller urin) inkuberas med kortisol-spårämne i antikroppsbelagda rör, där antikropparna har immobiliserats på den nedre delen av innerväggen i GammaCoat-rören. Efter inkubation sugas innehållet i rören bort eller dekanteras och rören räknas i gammarräknare. En kalibreringskurva tas fram med hjälp av 5 serumkalibreringslösningar med en halt på 1-60 µg/dL. De okända värdena avläses i den interpolerade kalibreringskurvan. Hela assayen utförs i det belagda röret. Det behövs inga separata steg med provspädning, proteindenaturering eller extraktion vare sig för serum-, urin- eller plasmaprover.

Utöver för kortisolassayer på oextraherad urin kan GammaCoat [<sup>125</sup>I] Cortisol RIA Kit även användas för att mäta fritt (okonjugerat) kortisol i urin. Kortisolet i urinen måste först extraheras över i metylenklorid. En portion av extraktet får indunsta direkt i det antikroppsbelagda GammaCoat-röret. (Försök har visat att detta inte har någon negativ effekt på det antikroppsbelagda röret om man använder metylenklorid av god kvalitet.) För att säkerställa att proverna innehåller lämpliga proteinnivåer tillsätts 10 mikroliter Cortisol Serum Blank (CA-2367) till varje GammaCoat-rör. Därefter utförs assayen på samma sätt som med serum, plasma eller oextraherad urin. Extraktionsgraden för kortisol vid extraktionen från urin med metylenklorid måste kontrolleras regelbundet.

### 4. REAGENS I FÖRPACKNINGEN

Kalibreringslösningar för kortisol (A-F)	6 flaskor à 1 mL	6 flaskor à 1 mL
Belagda rör för kortisol	2 påsar à 50 rör	10 påsar à 50 rör
Spårämne för kortisol	1 flaska à 10 mL	5 flaskor à 10 mL rör
PBS-buffert	1 flaska à 100 mL	5 flaskor à 100 mL rör
Antal test	100	500

FÖRVARING: Alla reagens inklusive det beredda spårämnesreagenset är stabila till det utgångsdatum som anges på etiketten om de förvaras vid 2-8°C. De antikortisolbelagda rören kan förvaras vid 2-27°C. Reagensen får ej användas efter satsens utgångsdatum. Reagens från skilda batcher får ej blandas.

**4.1 Spårämne för kortisol:** reagens färdigt för användning

Varje flaska innehåller ungefär 4 µCi spårämne (<1 µg/mL kortisol) i 10 mL PBS med ANS (8-anilino-1-naftalensulfonsyra) och 0,1 % natriumazid som konserveringsmedel.

**4.2 Rör belagda med antikortisolserum från kanin:** reagens färdigt för användning  
12 x 75 mm-rören är belagda med antikortisolserum från kanin (titer <1 µg/rör) och förpackade i en plastpåse.

**4.3 PBS-buffert:** reagens färdigt för användning

Varje flaska innehåller 100 mL fosfatbuffrad koksaltlösning med 0,1 % natriumazid som konserveringsmedel.

**4.4 Kalibreringslösningar med kortisolhaltigt serum:** reagens färdiga för användning  
Varje flaska innehåller kortisol i 1 mL behandlat humant serum med 0,1 % natriumazid som konserveringsmedel. Det finns kalibreringslösningar med följande halter: 0, 1, 3, 10, 25 respektive 60 µg/dL. DiaSorin kalibreringslösningar för kortisol har kalibrerats mot referensstandarderna enligt U.S.P. Alla jämförelser med andra produkter eller metoder skall ske med denna referensstandard som utgångspunkt. Kalibreringslösningarna i satsen kan betraktas som likvärdiga med patientprover, när de används med de reagens och metodanvisningar som rekommenderas för detta diagnostiska in vitro-test.

**4.5 Extra etikett**

För berett spårämnesreagens

**4.6 KAN BESTÄLLAS SEPARAT:**

Lin-log-papper  
block om 50 ark

**5. VARNINGAR OCH FÖRSIKTIGHETSÅTGÄRDER**

FÖR DIAGNOSTISKT BRUK IN VITRO.

Ej avsett för vare sig invärtes eller utvärtes bruk på människor eller djur.

**Reagens som innehåller material av humant ursprung**

**Behandlas som potentiellt smittfarligt.**

Varje enhet serum/plasma från blodgivare som har använts vid framställning av denna produkt har testats med en metod godkänd av det amerikanska läkemedelsverket FDA och befunnits negativ med avseende på HBsAg, antikroppar mot HCV och antikroppar mot HIV 1/2. Även om dessa metoder är mycket tillförlitliga, utgör de ingen garanti för att samtliga infekterade enheter upptäcks. Produkten kan även innehålla annat material av humant ursprung för vilket det inte finns något godkänt test. Eftersom ingen känd testmetod kan ge en fullständig garanti för att det inte förekommer hepatit-B-virus (HBV), hepatit-C-virus (HCV), humant immunbristvirus (HIV) eller andra infektiösa agens, skall alla produkter som innehåller material av humant ursprung hanteras i enlighet med god laboratoriepraxis och med lämpliga försiktighetsåtgärder (se handboken "Biosafety in Microbiological and Biomedical Laboratories" från U.S. Centers for Disease Control and Prevention/National Institutes of Health, 4:e upplagan, maj 1999, eller aktuell upplaga).

**REAGENS SOM INNEHÅLLER NATRIUMAZID**

FÖRSIKTIGT! Vissa reagens i satsen innehåller natriumazid. Natriumazid kan reagera med bly och koppar i avloppsledningarna och bilda högexplosiva metallazider. När reagensen kasseras måste man spola efter med stora mängder vatten för att förhindra att azid ackumuleras. För ytterligare information hänvisar vi till avsnittet "Decontamination of Laboratory Sink Drains to Remove Azide Salts" i handboken Safety Management No. CDC-22 utgiven av Centers for Disease Control and Prevention, Atlanta, GA, USA, 1976.

**Europeiska Gemenskapens Riskfraser för farliga preparat (EU-kommissionens direktiv 1999/45/EC)**

R20/21/22 - Farligt vid inandning, hudkontakt och förtäring.

R32 - Utvecklar mycket giftig gas vid kontakt med syra.

S28 - Vid kontakt med huden tvätta genast med mycket vatten.

**REAGENS SOM INNEHÅLLER JOD-125**

Adekvata försiktighetsåtgärder måste vidtas och god laboratoriepraxis följas vid förvaring, hantering och kassering av detta material.

För mottagningar och institutioner som tar emot radioisotoper under en allmän licens:

Detta radioaktiva material får endast tas emot, förvärvas, ägas och användas av läkare, veterinärer med praktik inom veterinärmedicin, kliniska laboratorier eller sjukhus, och får endast användas för kliniska tester in vitro eller laboratorietester in vitro, vilka ej innebär någon invärtes eller utvärtes administrering av materialet, eller av strålning från det, till människor eller djur. För mottagande, förvärv, innehav, användning och överlåtelse gäller de regler och den allmänna licens som utfärdats av den amerikanska Nuclear Regulatory Commission eller av den stat med vilken kommissionen har ingått ett avtal för utövande av regulatorisk myndighet.

1. Radioaktivt material får endast förvaras på en speciellt avsedd plats.
2. Endast auktoriserad personal får ha tillgång till radioaktivt material.
3. Pipettera aldrig radioaktivt material med munnen.
4. Undvik att äta eller dricka i lokaler där radioaktivt material används.
5. Ytor där spill kan förekomma skall torkas av och därefter rengöras med ett alkaliskt rengöringsmedel eller radiologisk dekontamineringslösning. Alla glasvaror som används måste sköljas noga med vatten innan de diskas tillsammans med andra glasvaror för laboratoriebruk.

För mottagningar och institutioner som tar emot radioisotoper under en specifik licens:

När ni tar emot, använder, överlåter och kasserar radioaktivt material gäller reglerna och villkoren i er specifika licens.

**WARNING!** Produkten innehåller en kemikalie som enligt staten Kalifornien är känd för att orsaka cancer.

**OBSERVERA!** Den radioaktivitet som anges på bipacksedeln kan skilja sig något från den aktivitet som anges på etiketterna på kartongen och på flaskan med spårämnet. Etiketterna på kartongen och på flaskan med spårämnet anger den verkliga radioaktivitetsmängden vid kalibreringsdatum, medan bipacksedeln anger den teoretiska radioaktiviteten för satsen.

**6. PROVTAGNING OCH PROVHANTERING**

**Plasmaprover**

Tag venprov med aseptisk teknik i ett rör av vacutainertyp med heparin eller EDTA.

Separera fram plasmafractionen. Plasman kan förvaras över natt i kylskåp vid 2-8°C. Vid längre förvaring måste proverna hållas frysta vid -20°C. Hemolyserade, lipemiska eller ikeriska prov bör ej användas.

**Serumprover**

Även om man vanligen rekommenderar plasmaprover för kortisolassayer, erhålls jämförbara resultat med serumprover.<sup>12</sup>

Separera fram serumfraktionen. Serumet kan förvaras över natt i kylskåp vid 2-8°C. Vid längre förvaring måste proverna hållas frysta vid -20°C. Hemolyserade, lipemiska eller ikeriska prov bör ej användas.

**Urinprov**

Samla 24-timmarsurin. Anteckna total urinvolym. Tillsätt 10 gram borsyra per liter urin som konserveringsmedel och spara en väl blandad portion i frys vid -20°C. Tina frysta prover vid rumstemperatur och blanda dem väl innan de testas.

## 7. EJ TILLHANDAHÅLLEN MEN NÖDVÄNDIG UTRUSTNING OCH MATERIEL

- 7.1 Vattenbad med en konstant temperatur på  $37 \pm 2^\circ\text{C}$ .
- 7.2 Precisionspipett (10  $\mu\text{L}$ ).
- 7.3 Halvautomatisk pipett (1,0 mL).
- 7.4 Gammaräknare.
- 7.5 Provrörsställ.
- 7.6 Vattensug (ej obligatoriskt).
- 7.7 Vortex-blandare.
- 7.8 Absorberande papper med plastad baksida (ej obligatoriskt).

Ytterligare utrustning som endast behövs vid testning av extraherade urinprover:

1. Provrör av glas (12 x 75 mm) och proppar av engångstyp.
2. Metylenklorid (diklormetan; av analytisk kvalitet enligt ACS).
3. Isbad.
4. Precisionspipetter (100 & 200  $\mu\text{L}$ ).
5. Dragskåp eller väl ventilerad plats.
6. Utrustning för indunstning av metylenklorid. Detta kan ordnas genom en ström av torr luft eller kvävgas med en lätt värmning av extraktet till cirka  $37^\circ\text{C}$  i dragskåp eller på väl ventilerad plats.

## 8. PROCEDUR FÖR EXTRAKTION AV URINPROVER

I denna procedur beskrivs även metodiken för att bestämma extraktionsgraden vid metylenkloridextraktionen. I DiaSorins laboratorier låg medelvärdet för typiska extraktionsgrader för kortisol från urinprover på  $99 \pm 14\%$ .

- 8.1 Placera en tillräcklig mängd metylenklorid i ett isbad för kylning. Räkna med drygt 1 mL per rör. Isbadet måste vara tillräckligt stort för att rymma en bägare med metylenklorid och stället med extraktionsprovrör.
- 8.2 För att fastställa extraktionsgraden märker man för varje prov som skall testas två engångsprovrör av glas med patientens ID. Märk det ena röret med "P" för prov och det andra med "E" för extraktionsgrad.
- 8.3 Tillsätt 200 mikroliter av ett välblandat 24 timmars urinprov till respektive "P"- och "E"-rör.
- 8.4 Enbart till "E"-röret tillsätts 10  $\mu\text{L}$  av kortisolkalibreringslösningen med halten 60  $\mu\text{g}/\text{dL}$ . Blanda reagensen genom att skaka provrörsstället eller varje rör.
- 8.5 Tillsätt 1,0 mL kyld metylenklorid till varje "P"- och "E"-rör. Vortexa röret väl så att kortisolet extraheras till den organiska fasen. Sätt i propp eller täck över rören och placera i isbad för att undvika alltför stor avdunstning av metylenklorid. För att underlätta pipettering av metylenklorid är det viktigt att man sköljer pipetten 3-4 gånger med KALL metylenklorid innan man pipetterar till de olika rören.
- 8.6 Medan man väntar på att faserna skall separera märker man upp två GammaCoat Cortisol-rör för varje "P"-rör och två GammaCoat Cortisol-rör för varje "E"-rör.
- 8.7 När faserna har separerat pipetterar man försiktigt upp 100  $\mu\text{L}$  från den undre fasen (metylenkloridfasen) i varje rör och tillsätter till de korrekt märkta GammaCoat-rören. Skölj pipettspetsen i kall metylenklorid innan proverna pipetteras för att minimera läckage av provextrakt från pipettspetsen. När man överför 100  $\mu\text{L}$ -portionen med extrakt till det belagda röret, är det viktigt att man inte försöker torka av pipettspetsen, eftersom metylenkloridens fysikaliska egenskaper gör att den läcker ut och skapar luftbubblor.  
Det går lättare att föra över extraktlösningen till det belagda röret om man håller extraktionsröret och GammaCoat-röret i samma hand. Överför snabbt men omsorgsfullt 100  $\mu\text{L}$ -portionen med extrakt till GammaCoat-rörets botten.

- 8.8** Indunsta metylenkloriden i GammaCoat-rören med hjälp av en ström av torr luft eller kvävgas och en lätt uppvärmning av extraktet till cirka 37°C.  
**FÖRSIKTIGT!** Se till att det inte uppstår höga halter av ångor från halogenerade kolväten på arbetsplatsen. INDUNSTNINGEN FÅR ENDAST UTFÖRAS I DRAGSKÅP ELLER PÅ EN VÄL VENTILERAD PLATS.
- 8.9** När metylenkloriden är helt indunstad tillsätter man 10 µL av kortisolblanken med 0 µg/dL, CA-2367, till varje GammaCoat-rör för patientprover ("P"- och "E"-rör), så att proteinnivåerna i proverna blir korrekta.
- 8.10** Gå nu vidare med RIA-proceduren från och med steg 1 under Testprocedur.

## 9. TESTPROCEDUR

### Beredning av spårämnesreagens:

Tillsätt hela innehållet i 1 flaska kortisolspårämne till 1 flaska PBS-buffert och blanda försiktigt.

Skölj ur flaskan med kortisolspårämne med spårämnesreagens för att få över så mycket spårämne som möjligt. Fyll i den extra etiketten för berett spårämnesreagens och sätt fast på flaskan så att den säkert kan identifieras på rätt sätt. Det beredda spårämnesreagenset måste förvaras mörkt eller i en folieomlindad flaska vid 2-8°C.

I testproceduren ingår framtagning av en kalibreringskurva i vilken man avläser kortisolhalten i det okända provet genom interpolering.

- 9.1** Låt alla reagens anta rumstemperatur och blanda om dem noggrant utan att det bildas skum, innan de används.
- 9.2** Märk upp GammaCoat-rör för dubbelprov enligt följande schema. Rör för total aktivitet [T1,T2] och B0 [1,2] kan krävas för vissa regressions- och kvalitetskontrollprogram, men kan utelämnas om kalibreringskurvan plottas på lin-log-papper.<sup>13-15</sup>
- 9.3** Tillsätt på botten av respektive GammaCoat-rör:
- 10 µL kortisolserumblank eller serumkalibreringslösning.
  - FÖR SERUM, PLASMA OCH OEXTRAHERADE URINPROVER tillsätter man 10 µL av respektive prov. Var noga med att pipettera kalibreringslösningar och prover på samma sätt.<sup>16</sup>
  - FÖR EXTRAHERADE URINPROVER använder man GammaCoat-rören med de extraherade proverna från steg 9 i urinextraktionsproceduren.  
 OBS! Det är önskvärt att serum- och plasmaprover från patienter spädes; använd den medföljande serumblanken som spädningsbuffert. Både oextraherade och extraherade urinprover spädes vid behov med destillerat vatten. För fritt kortisol i urin extraheras en 200 µL portion av det spädda urinprovet (urinextraktionsprovet, steg 3). Gå sedan vidare med rutinassayen. Spädningsfaktorn måste tas med i beräkningarna av halten.
- 9.4** Tillsätt 1,0 mL berett spårämnesreagens till varje rör. Blanda försiktigt om varje rör på en vortexblandare på låg hastighet.
- 9.5** Inkubera rören i vattenbad vid 37± 2°C i 45 minuter.
- 9.6** Sug bort eller dekantera vätskan i alla rör utom total aktivitet.  
 OM INTE LÖSNING SOM HÄFTAR VID RÖRVÄGGARNA AVLÄGSNAS PÅ KORREKT SÄTT KAN MAN FÅ DÄLIG REPRODUCERBARHET OCH FELAKTIGA VÄRDEN.  
 Om man väljer att suga bort vätskan måste man se till att plastspetsen på sugen vidrör botten på det belagda röret och att all vätska sugs bort.  
 Om man väljer att dekantera skall man låta rören stå upp och ned och droppa av i 3-5 minuter. Knacka rören mot absorberande papper för att få bort all vidhäftande vätska och vänd dem sedan rätt igen.
- 9.7** Räkna alla rör 1 minut i en gammarräknare med fönstret korrekt inställt för jod-125.
- 9.8** Beräkna resultaten. Se avsnittet Resultat.

## 10. PROCEDUR FÖR SALIV

Satsen kan även användas för att testa salivprov.

Man har visat att det föreligger en god korrelation mellan kortisolhalten i saliv och halten fritt kortisol i plasma och serum (salivhalten utgör 60-100 % av halten för den fria fraktionen i cirkulationen och 4-6 % av den totala halten i serum eller plasma).

Ett stort antal studier har påvisat de praktiska och diagnostiska fördelarna med salivkortisoltester och bekräftat deras giltighet och kliniska värde.

När vi anpassade satsen till salivkortisoltestning tog vi hänsyn till två viktiga punkter:

För det första utgör salivkortisolhalten bara 5 % av plasmakortisolvärdet, och det krävs därför en 20-faldig höjning av känsligheten. För att nå denna känslighetsnivå ökades salivprovets volym till 200 µL.

För det andra är proteinhalten i saliven lägre, och proteinerna utgörs främst av enzymer och glykoproteiner. Det förekommer endast spår mängder av plasmaproteiner, och kortikosteroidbindande proteiner saknas helt. För att garantera att effekterna av proteinmiljön är likartade i prov och standarder tillsätts 0-kalibrator (utan kortisol) till varje salivprov (som vid test på extraherade urinprov).

Således krävs endast mindre modifieringar vid pipettering av prov och standarder för att anpassa metoden till testning av salivprover, och endast de reagens som redan ingår i satsen används.

### 10.1 Provtagning och förberedelse av salivprover

Salivprovet måste tas 10 minuter efter det att patienten sköljt munnen med kranvatten. Salivproduktionen skall inte stimuleras och man måste påpeka skillnaden mellan saliv och slem för patienten. Den nödvändiga volymen 1 mL kan samlas in på några minuter, även hos barn.

Proverna förvaras i frys vid -20°C. Före testning måste de tinas och centrifugeras; den klara supernatanten tas sedan tillvara för testning.

### 10.2 Procedur för saliv

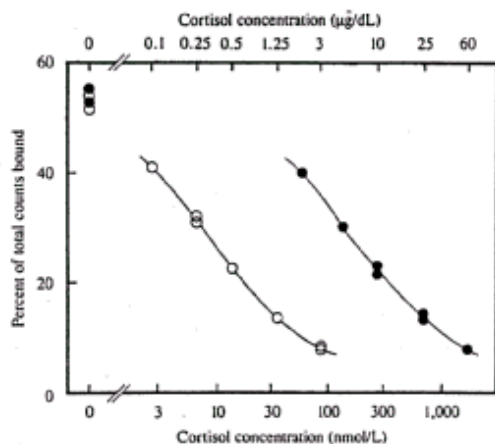
Pipettera för varje **salivprov** 10 µL 0-kalibrator till uppmärkta rör för dubbelprov; tillsätt 200 µL prov och 1 mL spårämne.

För **standardkurvan** pipetterar man 10 µL 0-kalibrator eller standard till uppmärkta rör för dubbelprov och tillsätter 200 µL PBS-buffert plus 1 ml spårämne.

Sväng försiktigt runt varje rör. Inkubera i vattenbad vid 37°C i 45 min. Sug eller dekantera av innehållet i rören och räkna dem sedan 1 minut i gammarräknare för att mäta den radioaktivitet som bundits till rörsidorna.



### Standardkurva



De verkliga värdena för standarderna för salivkortisol är 0,10 - 0,25 - 0,50 - 1,25 och 3,0 µg/dL. Diagrammet till vänster visar standardkurvorna för de båda testtekniker (serum och saliv) som täcks av satsen.

Även om inkubationsvolymen är något högre i salivtestet än i serumtestet (1 210 µL mot 1 010 µL), har detta ingen effekt på spårämnets bindnings-förmåga inom området för standardkurvan.

Figure 3

Standard curves for assay of cortisol in serum or plasma (●) and in saliva (○) with the GammaCoat™ [<sup>125</sup>I] RIA kit.

OBS! Denna kurva erhöles vid en studie genomförd 1984 med en standardkurva på 0; 2,0; 5,0; 10; 25 och 60 µg/dL. Standardkurvan har därefter modifierats. Vid beräkningar av salivkortisol skall man använda det nya området och ta hänsyn till spädningen 1:20.

### Normala värden

Tabell 1

Normala morgonvärden för kortisolhalter i saliv och serum (µg/dL)						
Patientgrupp*	Saliv			Serum		
	n	Median	Spann	n	Median	Spann
Normala vuxna	150	0,43	0,18 – 1,01	103	6,5	4,5 – 21,1
Barn (4 - 11 år)	105	0,40	0,14 – 0,91	---	---	---
Gravida kvinnor (3:e trimestern)	84	0,47	0,33 – 0,91	84	15,7	12,9 – 39,9

\* Bosatta i Storbritannien

### 11. KVALITETSKONTROLL

Varje laboratorium bör använda kontroller med flera olika nivåer för att följa upp testets prestanda. Kontrollerna skall behandlas som okända prov. Man bör kontinuerligt föra in kontrollvärdena i ett diagram för att kunna följa hur väl kontrollerna ligger. Lämpliga statistiska metoder skall användas för att utvärdera trenderna. Varje enskilt laboratorium bör fastställa godtagbara prestandagränser.

## 12. RESULTATBERÄKNING

Okända serum-, plasma- och urinprov kan testas samtidigt och avläsas från den standardkurva som tagits fram med serumkalibreringslösningarna. Både oextraherade urinkortisolprov (UK) och extraherade urinprov för fritt kortisol (UFK) omvandlas sedan till "µg/24 timmar" med lämplig formel.

- 12.1 Anteckna den bundna aktiviteten i CPM för varje rör.
- 12.2 Plotta bunden aktivitet (CPM) för kalibreringslösningarna (lodrat axel) mot kortisolhalten (vågrät axel) på ett lin-log-papper.
- 12.3 Rita in den kurva som passar bäst till punkterna. För ett typiskt exempel på mätdata och diagram hänvisar vi till TABELL II och FIGUR 1.
- 12.4 Gå på den lodräta axeln in vid CPM-värdet för varje prov (kontroller, serum, plasma, extraherad och oextraherad urin) och följ en vågrät linje tills den skär kalibreringskurvan. Från den punkt där linjen skär kurvan går man ner och läser av kortisolhalten (µg/dL) på den vågräta axeln.

### 12.5 Oextraherat urinkortisol

För att omvandla urinkortisolvärdet (UK) för oextraherade urinprov från µg/dL till µg kortisol per 24 timmar använder man följande ekvation:

$$UK = \frac{PxV}{100}$$

där:

- P = halten i det oextraherade urinprovet i µg/dL  
V = total urinvolymin i mL/24 timmar  
100 = omvandlingsfaktor

### 12.6 Fritt kortisol i extraherad urin

För att omvandla värdet på fritt kortisol i extraherade urinprov (UFK) från µg/dL till µg kortisol per 24 timmar använder man följande ekvation

$$UFK = \frac{PxV}{33,3 (E-P)}$$

där:

- P = halten i det extraherade urinprovet i µg/dL  
E = halten i extraktionsgradsröret för provet ifråga, i µg/dL  
V = total urinvolymin i mL/24 timmar  
33,3 = kombinerad faktor för spädning och extraktionsgrad

Exempel:

- E = 13,50 µg/dL  
P = 7,85 µg/dL  
V = 1150 mL/24 timmar

$$UFK = \frac{(7,85) (1150)}{33,3 (13,50-7,85)} = 48 \text{ µg kortisol/24 timmar}$$

Laboratorier som önskar en kontinuerlig uppföljning av extraktionsgraden för urinextraktionen (EG) kan använda följande formel för att beräkna extraktionsgraden uttryckt i procent.

$$EG = \frac{E-P}{6,0} \times 100$$

där:

- P = Halten i det extraherade urinprovet i µg/dL
- E = Halten i extraktionsgradsröret för provet ifråga, i µg/dL
- 6,0 = Förväntad skillnad mellan halterna i "E"- och "P"-rören i µg/dL
- 100 = Omvandlingsfaktor

### 12.7 SI- ENHETER

Med utgångspunkt i molekylvikten 362,5 dalton kan man räkna om halten i kalibreringslösningar, kontroller och patientprover (serum och plasma) från mikrogram/deciliter (µg/dL) till nanomol per liter (nmol/L) enligt SI-systemet genom att multiplicera värdet med 27,59. (I TABELL II anges kortisolhaltererna i kalibreringslösningarna i båda enheterna.) På liknande sätt kan både oextraherade och extraherade urinkontroller och -prover omvandlas från mikrogram per 24 timmar (µg/24 h) till nanomol per 24 timmar (nmol/24 h) genom att man multiplicerar med 2,76.

**TABELL II**  
Kalibreringslösningarnas halter

Kat- nr	Halt	i SI- enheter
CA-2367	0 µg/dL	0 nmol/L
CA-2358	1 µg/dL	28 nmol/L
CA-2359	3 µg/dL	83 nmol/L
CA-2370	10 µg/dL	276 nmol/L
CA-2371	25 µg/dL	690 nmol/L
CA-2372	60 µg/dL	1655 nmol/L

**TABELL III**

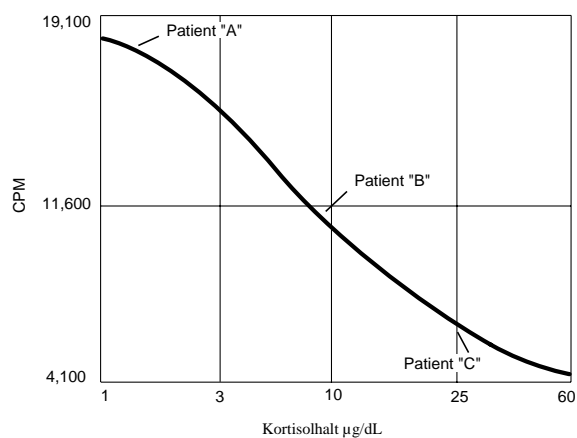
Hur man antecknar data

Använd inte denna tabell för att beräkna okända prov

Rör Nr	Innehåll	CPM	Kortisol Halt (µg/dL)
T1	Total aktivitet (Berett spårämne)	44516	
T2	Total aktivitet (Berett spårämne)	43651	
1	Serumblank, B <sub>0</sub>	0 µg/dL	22311
2	Serumblank, B <sub>0</sub>	0 µg/dL	22771
3	Serumkalibreringslösning	1 µg/dL	19216
4	Serumkalibreringslösning	1 µg/dL	19243
5	Serumkalibreringslösning	3 µg/dL	15331
6	Serumkalibreringslösning	3 µg/dL	15731
7	Serumkalibreringslösning	10 µg/dL	10660
8	Serumkalibreringslösning	10 µg/dL	10294
9	Serumkalibreringslösning	25 µg/dL	6862
10	Serumkalibreringslösning	25 µg/dL	6657
11	Serumkalibreringslösning	60 µg/dL	4186
12	Serumkalibreringslösning	60 µg/dL	4224
13	Prov, patient "A"	18470	1,3
14	Prov, patient "A"	18992	1,1
			Medel: 1,2
15	Prov, patient "B"	10377	10,1
16	Prov, patient "B"	10608	9,6
			Medel: 9,9
17	Prov, patient "C"	6316	28,8
18	Prov, patient "C"	6318	28,8
			Medel: 28,8

**Typiska resultat**

Använd inte detta diagram för att beräkna okända prov

**FIGUR 1**

### 13. METODBEGRÄNSNINGAR

#### 13.1 Procedurmässiga

Det beredda spårämnet får ej utsättas för ljus. De belagda rören levereras färdiga för användning och skall förvaras vid 2-27°C. Plastomslaget måste förslutas noggrant vid förvaring av oanvända rör, så att man undviker kondensbildning.

Inkubationsbetingelserna måste kontrolleras regelbundet. Vattenbadets temperatur måste vara konstant vid 37±2°C och vattennivån måste hållas över ytan på lösningen i rören utan att rören börjar flyta.

Användaren måste vara medveten om att felaktiga resultat kan bero på att proverna förvarats eller hanterats felaktigt. Hemolyserade, lipemiska och ikteriska prov bör ej användas.

Om man inte får korrekta kortisolvärden för kontrollerna kan detta tyda på bristande noggrannhet vid pipettering, felaktig hantering eller förorenade eller för gamla reagens. Kontroller skall ingå i varje körning av prover. Man måste ta fram en ny kalibreringskurva för varje körning.

GammaCoat Cortisol Kit får ej användas för bestämning av kortisolhalter hos patienter som behandlas med prednisolon. Se Tolkningsmässiga begränsningar.

#### 13.2 Tolkningsmässiga

De normala kortisolnivåerna är vanligen som högst mellan 5.00 och 10.00 och som lägst från 20.00 till 4.00.<sup>5</sup> nivåerna under eftermiddag och kväll utgör vanligen 1/2 till 1/3 av morgonnivåerna. Det har förekommit beskrivningar av en kortisoltopp mitt på dagen hos kvinnor, som sammanfaller med födointag och som försvagas klart vid fasta.<sup>17</sup> Dygnsvariationen, stimuleringstest och hämningstest och olika typer av stressituationer leder normalt till förändrade kortisolnivåer. Exempelvis ger ACTH-stimulering vanligen värden som ligger två-tre gånger högre än referensvärdena för morgon.<sup>18</sup> Hämning med metyrapon och dexametason ger normalt förmiddagsvärden på under 5 µg/dL.<sup>10</sup> Östrogener, exempelvis i p-piller, kan ge förhöjda kortisolnivåer som en följd av de förändrade halterna av plasma- och serumproteiner. Således bedöms varje patients kortisolvärden vanligen i förhållande till hans/hennes morgonvärde.

Kortisolanalyser på prover från patienter som behandlas med prednisolon är kontraindicerade, p.g.a. att antikropparna i satsen uppvisar en hög korsreaktivitet med prednisolon och 6-metylprednisolon. Den höga korsreaktiviteten kan ge skenbart höga kortisolnivåer.

Kortisolbestämningar som utförs med den direkta urinmetoden ger kliniskt giltiga värden när de jämförs med det angivna referensområdet för oextraherad urin. Eftersom det är väl känt att oidentifierade substanser i urinen kan interferera med immunoassayer för fritt kortisol, är de värden som erhålls med direkta urinmetoder högre än de man får från urinprov som renats med exempelvis HPLC.<sup>19,20</sup>

### 14. FÖRVÄNTADE VÄRDEN

#### 14.1 Halter i plasma eller serum

Morgon:

7-25 µg/dL eller 70-250 ng/mL

[193-690 nmol/L]

Kväll:

2-9 µg/dL eller 20-90 ng/mL

[55-248 nmol/L]

Dessa intervall kan användas som riktlinjer till dess varje laboratorium har fastställt egna referensområden.

#### 14.2 Kortisol i oextraherad urin

Referensområdet för urinkortisol (UK) i oextraherade urinprov är 75-270 µg per 24 timmar [207-745 nmol/24 h]. Felaktig teknik för urinsamling kan leda till felaktiga värden. Det finns en rekommendation att man även bestämmer kreatininvärdet för att påvisa gravt felaktiga urinprov.<sup>21</sup>

### 14.3 Fritt kortisol i extraherad urin

Referensområdet för fritt kortisol i urin är 20-90 µg kortisol per 24 timmar [55-248 nmol/24 h]. Felaktig teknik för urinsamling kan leda till felaktiga värden. Det finns en rekommendation att man även bestämmer kreatinivärdet för att påvisa gravt felaktiga urinprov.<sup>21</sup>

## 15. SPECIFIKA PRESTANDA

### 15.1 Precision

Den intraseriella precisionen bestämdes från medelvärdet av 20 samtidiga tester av varje serumprov. Den interseriella precisionen bestämdes från det genomsnittliga medelvärdet för dubbelprov vid 20 separata körningar.

Intraseriell precision prov	Antal test	Medelvärde (µg/dL)	Standardavvikelse (µg/dL)	Variationskoefficient (%)
Serumpool A	20	2,9	0,19	6,6
Serumpool B	20	12,1	0,93	7,7
Serumpool C	20	47,1	3,18	6,8

Interseriell precision prov	Antal separata körningar	Medelvärde (µg/dL)	Standardavvikelse (µg/dL)	Variationskoefficient (%)
Serumpool D	20	3,7	0,33	9,0
Serumpool E	20	12,1	1,19	9,8
Serumpool F	20	36,9	3,24	8,8

**15.2 Riktighet:** Riktigheten för assayen kontrollerades med ett utbytestest.

#### Utbyte från poolade sera

Prov med kortisol tillsats bereddes genom att man spädde ett prov med känd, hög kortisolhalt med en tidigare analyserad serumpool. Varje prov med tillsats testades i kvadrupelprov. Det procentuella utbytet beräknas som (utbyte/förväntat) x 100.

Bidrag från tillsats (µg/dL)	Bidrag från pool (µg/dL)	Förväntat värde (µg/dL)	Utbytesvärde (µg/dL)	Procent (%) utbyte
4,2	1,6	5,8	5,5	95
11,2	1,6	12,7	12,8	101
17,2	1,6	18,8	18,4	98
26,3	1,6	27,9	25,4	91
41,2	1,6	42,8	39,2	92

### 15.3 Analytisk känslighet

Kalibreringskurvans känslighet definieras som det lägsta enskilda värde som kan särskiljas från noll. En statistisk uppskattning av den lägsta påvisbara halten (känsligheten) beräknades med metoden enligt D. Rodbard<sup>22</sup> för 30 replikat vid kalibreringskurvans nollpunkt. Den beräknade känsligheten är 0,21 µg/dL.

### 15.4 Aviditet

Den beräknade affinitetskonstanten för kortisolantiserumet är cirka  $2 \times 10^8$  liter/mol.

### 15.5 Analytisk specificitet

Data för korsreaktiviteten för det antiserum som används i satsen uttrycks som kvoten mellan kortisolhalten och halten av det korsreagerande ämnet vid 50 % hämning av maximal bindning.

Förening	% korsreaktivitet
Kortisol	100
Prednisolon	25,5
6-Metylprednisolon	14,5
11-Deoxykortisol	9,8
17-Hydroxyprogesteron	0,4
Kortikosteron	0,9
Dexametason	0,049
Prednison	3,8
Deoxykortikosteron	0,14
Tetrahydrokortison	0,2
Aldosteron	<0,1
$\beta$ -Kortol	<0,1
$\beta$ -Kortolon	<0,1
Kortison	10,3
Dihydrokortison	0,43
Progesteron	0,015
Spirolakton	<0,1
Tetrahydrokortisol	0,3
6- $\beta$ -Hydrokortison	4,2

**SE SISTA SIDAN FÖR REFERENSER**

## KIT RIA KORTIZΟΛΗΣ GAMMACOAT™

### 1. ΧΡΗΣΗ ΓΙΑ ΤΗΝ ΟΠΟΙΑ ΠΡΟΟΡΙΖΕΤΑΙ

ΜΟΝΟ ΓΙΑ ΔΙΑΓΝΩΣΤΙΚΗ ΧΡΗΣΗ IN VITRO.

Το kit ραδιοανοσοπροσδιορισμού (RIA) κορτιζόλης GammaCoat™ [<sup>125</sup>I] προορίζεται για χρήση στον ποσοτικό προσδιορισμό των επιπέδων κορτιζόλης (υδροκορτιζόνη, ένωση F) στον ορό, το πλάσμα και τα ούρα.

### 2. ΠΕΡΙΛΗΨΗ ΚΑΙ ΕΠΕΞΗΓΗΣΗ

Η κορτιζόλη (υδροκορτιζόνη, ένωση F) είναι το κύριο γλυκοκορτικοειδές που εκκρίνεται από το φλοιό των επινεφριδίων. Μεταξύ των φυσιολογικών επιδράσεων του είναι η αντιφλεγμονώδης δράση, η διατήρηση της αρτηριακής πίεσης και η σύνθεση υδατανθράκων από πρωτεΐνες.

Τα γλυκοκορτικοειδή συντίθενται ανταποκρινόμενα στην αδρενοκορτικοτροπική ορμόνη (ACTH) η οποία εκκρίνεται από τον πρόσθιο λοβό της υπόφυσης. Σε ένα φυσιολογικό άτομο, η κορτιζόλη συμμετέχει σε βρόχο αρνητικής ανατροφοδότησης με την ACTH μέσω του άξονα υποθαλάμου-υπόφυσης-φλοιού των επινεφριδίων (άξονας HPA). Η υποφυσιογενής ACTH, με τη σειρά της, ρυθμίζεται από τον εκλυτικό παράγοντα της κορτικοτροφίνης (CRF) ο οποίος εκκρίνεται από τον υποθάλαμο. Ο CRF υποθαλάμου ανταποκρίνεται στα επίπεδα κορτιζόλης και στο στρες. Το σωματικό και το ψυχολογικό στρες, η εναλλαγή συναισθημάτων κατά τη διάρκεια της ημέρας και τα χαμηλά επίπεδα σακχάρου στο αίμα επηρεάζουν το ρυθμό έκκρισης της κορτιζόλης.<sup>1-6</sup>

Η δυσλειτουργία οποιουδήποτε οργάνου στον άξονα HPA θα έχει ως αποτέλεσμα τη μεταβολή των επιπέδων κορτιζόλης.<sup>7,8</sup> Η αξιολόγηση της λειτουργίας των επινεφριδίων με μέτρηση των επιπέδων κορτιζόλης στο πλάσμα ή στον ορό βοηθά στη διάγνωση φυσιολογικών και παθολογικών καταστάσεων. Συνδυασμοί πρωινών και απογευματινών μετρήσεων, μαζί με δοκιμασίες διέγερσης και καταστολής, μπορούν να προσφέρουν ακλόνητες ενδείξεις για τη διάγνωση των ειδικών νόσων που σχετίζονται με τα επινεφρίδια. Η διάγνωση της νόσου του Addison (χρόνια ανεπάρκεια των επινεφριδίων) και του συνδρόμου Cushing (επινεφριδιακή υπερλειτουργία) αποτελούν δύο παραδείγματα για τα οποία ο ειδικός προσδιορισμός των επιπέδων κορτιζόλης στην κυκλοφορία είναι χρήσιμος για την αξιολόγηση ασθενών.<sup>9,10</sup>

### 3. ΑΡΧΕΣ ΤΟΥ ΠΡΟΣΔΙΟΡΙΣΜΟΥ

Η διαδικασία που ακολουθείται με το kit RIA κορτιζόλης GammaCoat™ [<sup>125</sup>I] βασίζεται στις αρχές της ανταγωνιστικής δέσμωσης σε ραδιοανοσοπροσδιορισμό.<sup>11</sup> Οι βαθμονομητές και τα άγνωστα δείγματα (ορός, πλάσμα ή ούρα) επωάζονται με ιχνηθέτη κορτιζόλη σε δοκιμαστικούς σωλήνες οι οποίοι είναι επικαλυμμένοι με αντίσωμα το οποίο έχει ακινητοποιηθεί στο χαμηλότερο εσωτερικό τοίχωμα του δοκιμαστικού σωλήνα GammaCoat. Μετά την επώαση, γίνεται αναρρόφηση και μετάγγιση του περιεχομένου του δοκιμαστικού σωλήνα και μέτρηση του δοκιμαστικού σωλήνα. Προετοιμάζεται μια καμπύλη βαθμονόμησης με 5 βαθμονομητές ορού των οποίων οι τιμές κυμαίνονται από 1 έως 60 μg/dL. Οι τιμές των άγνωστων δειγμάτων υπολογίζονται με παρεμβολή στην καμπύλη βαθμονόμησης. Ολόκληρος ο προσδιορισμός εκτελείται στον επικαλυμμένο δοκιμαστικό σωλήνα. Δεν απαιτείται ξεχωριστή αραίωση δείγματος, μετουσίωση πρωτεΐνης ή βήματα εκχύλισης για δείγματα ορού, ούρων και πλάσματος.

Εκτός από τους προσδιορισμούς κορτιζόλης σε μη εκχυλισμένα ούρα, μπορεί επίσης να χρησιμοποιηθεί η διαδικασία που ακολουθείται με το kit RIA κορτιζόλης GammaCoat [<sup>125</sup>I] για τη μέτρηση της ελεύθερης (μη συζευγμένης) κορτιζόλης στα ούρα. Θα πρέπει πρώτα να γίνει εκχύλιση της κορτιζόλης που υπάρχει στα ούρα σε χλωριούχο μεθυλένιο. Ένα κλάσμα του εκχυλισματος εξατμίζεται απευθείας στο δοκιμαστικό σωλήνα GammaCoat, ο οποίος είναι επικαλυμμένος με αντίσωμα. (Έχει αποδειχθεί με πειράματα ότι δεν προκύπτουν βλαπτικές επιδράσεις στο δοκιμαστικό σωλήνα, ο οποίος είναι επικαλυμμένος με αντίσωμα, αν χρησιμοποιηθεί χλωριούχο μεθυλένιο καλής ποιότητας). Για να εξασφαλιστεί ότι τα δείγματα περιέχουν σωστά επίπεδα πρωτεΐνης, προστίθενται 10 μικρόλιτρα τυφλός ορός κορτιζόλης (CA-2367) σε κάθε δοκιμαστικό σωλήνα GammaCoat. Το υπόλοιπο της διαδικασίας του προσδιορισμού είναι το ίδιο με αυτό που χρησιμοποιείται για τους προσδιορισμούς κορτιζόλης στον ορό, στο πλάσμα ή στα μη εκχυλισμένα ούρα. Θα πρέπει να παρακολουθείται η αποδοτικότητα της εκχύλισης κορτιζόλης από τα ούρα με χλωριούχο μεθυλένιο.



#### 4. ΑΝΤΙΔΡΑΣΤΗΡΙΑ ΠΟΥ ΠΑΡΕΧΟΝΤΑΙ ΜΕ ΤΟ ΚΙΤ

Βαθμονομητές κορτιζόλης (Α έως F)	6 φιαλίδια/1 mL	6 φιαλίδια/1 mL
Δοκιμαστικοί σωλήνες επικαλυμμένοι με κορτιζόλη	2 σακούλες/ 50 έκαστο	10 σακούλες/ 50 έκαστο
Ιχνηθέτης κορτιζόλης	1 φιαλίδιο/10 mL	5 φιαλίδια/10 mL έκαστο
Ρυθμιστικό διάλυμα PBS	1 φιαλίδιο/100 mL	5 φιαλίδια/100 mL έκαστο
Αριθμός δοκιμών	100	500

ΦΥΛΑΞΗ: Όλα τα αντιδραστήρια, μαζί με το αντιδραστήριο ιχνηθέτη-ρυθμιστικού διαλύματος, είναι σταθερά έως την ημερομηνία λήξης που αναγράφεται στην ετικέτα του κιτ όταν αυτά φυλάσσονται στους 2 έως 8°C. Οι δοκιμαστικοί σωλήνες, οι οποίοι είναι επικαλυμμένοι με αντι-κορτιζόλη, μπορούν να φυλάσσονται στους 2 έως 27°C. Μη χρησιμοποιείτε τα αντιδραστήρια αν έχει παρέλθει η ημερομηνία λήξης του κιτ. Δεν ενδείκνυται η ανάμιξη αντιδραστηρίων από διαφορετικές παρτίδες.

##### 4.1 Ιχνηθέτης κορτιζόλης: Αντιδραστήριο έτοιμο για χρήση.

Κάθε φιαλίδιο περιέχει περίπου 4 μCi ιχνηθέτη (<1 μg/mL κορτιζόλη) σε 10 mL αλατούχο διάλυμα ρυθμισμένο με φωσφορικά, ANS (8-ανιλίνο-1-ναφθαλένιο σουλφονικό οξύ) με αζίδιο του νατρίου 0,1% ως συντηρητικό.

##### 4.2 Δοκιμαστικοί σωλήνες επικαλυμμένοι με ορό αντι-κορτιζόλης κουνελιού:

Αντιδραστήριο έτοιμο για χρήση.

Δοκιμαστικοί σωλήνες 12 x 75 χιλιοστών είναι επικαλυμμένοι με ορό αντι-κορτιζόλης κουνελιού (με τίτλο <1 μg/δοκιμαστικό σωλήνα) και συσκευάζονται σε μια πλαστική σακούλα.

##### 4.3 Ρυθμιστικό διάλυμα PBS: Αντιδραστήριο έτοιμο για χρήση.

Κάθε φιαλίδιο περιέχει 100 mL αλατούχο διάλυμα ρυθμισμένο με φωσφορικά με αζίδιο του νατρίου 0,1% ως συντηρητικό.

##### 4.4 Βαθμονομητές ορού κορτιζόλης: Αντιδραστήριο έτοιμο για χρήση.

Κάθε φιαλίδιο περιέχει κορτιζόλη σε 1 mL επεξεργασμένο ανθρώπινο ορό με αζίδιο του νατρίου 0,1% ως συντηρητικό. Οι βαθμονομητές παρέχονται στις ακόλουθες συγκεντρώσεις: 0, 1, 3, 10, 25 και 60 μg/dL, αντίστοιχα. Οι βαθμονομητές κορτιζόλης της DiaSorin έχουν βαθμονομηθεί σύμφωνα με το πρότυπο αναφοράς κορτιζόλης της U.S.P. Τυχόν σύγκριση με άλλα προϊόντα ή διαδικασίες θα πρέπει να γίνεται με αυτό το πρότυπο αναφοράς. Ο χειρισμός των βαθμονομητών μπορεί να είναι ίδιος με αυτόν των δειγμάτων ασθενών όταν χρησιμοποιούνται τα αντιδραστήρια και η λειτουργική διαδικασία της παρούσας διαγνωστικής δοκιμής in vitro, όπως συνιστάται.

##### 4.5 Βοηθητική ετικέτα

Για το αντιδραστήριο ιχνηθέτη-ρυθμιστικού διαλύματος

##### 4.6 ΔΙΑΘΕΣΙΜΟ ΚΑΤΟΠΙΝ ΑΙΤΗΣΗΣ:

Χαρτί ημιλογαριθμικού γραφήματος

50 φύλλα ανά μπλοκ

## 5. ΠΡΟΕΙΔΟΠΟΙΗΣΕΙΣ ΚΑΙ ΠΡΟΦΥΛΑΞΕΙΣ

ΜΟΝΟ ΓΙΑ ΔΙΑΓΝΩΣΤΙΚΗ ΧΡΗΣΗ IN VITRO.

Δεν προορίζεται για εσωτερική και εξωτερική χρήση σε ανθρώπους ή ζώα.

### Αντιδραστήρια που περιέχουν υλικό ανθρώπινης προέλευσης

**Χειριστείτε ως εάν ήταν δυνητικώς μολυσματικά.**

Κάθε μονάδα δότη ορού/πλάσματος που χρησιμοποιείται στην παρασκευή του παρόντος προϊόντος έχει δοκιμαστεί με μέθοδο εγκεκριμένη από την Υπηρεσία Τροφίμων και Φαρμάκων (FDA) των Η.Π.Α. και βρέθηκε μη αντιδραστική ως προς την παρουσία HBsAg, αντισώματος HCV και αντισώματος HIV 1/2. Αν και οι μέθοδοι αυτές είναι εξαιρετικά ακριβείς, δεν εγγυώνται την ανίχνευση όλων των μολυσματικών μονάδων. Το παρόν προϊόν ενδεχομένως να περιέχει και άλλο υλικό ανθρώπινης προέλευσης για το οποίο δεν υπάρχει εγκεκριμένη δοκιμή. Επειδή καμία γνωστή μέθοδος δοκιμασίας δεν μπορεί να προσφέρει πλήρη διαβεβαίωση ότι απουσιάζουν ο ιός της ηπατίτιδας Β (HBV), ο ιός της ηπατίτιδας C (HCV), ο ιός της ανθρώπινης ανοσοανεπάρκειας (HIV) ή άλλοι μολυσματικοί παράγοντες, ο χειρισμός όλων των προϊόντων που περιέχουν υλικά ανθρώπινης προέλευσης θα πρέπει να γίνεται σύμφωνα με καλές εργαστηριακές πρακτικές χρησιμοποιώντας τις κατάλληλες προφυλάξεις, όπως περιγράφονται στο εγχειρίδιο «Biosafety in Microbiological and Biomedical Laboratories», 4<sup>η</sup> έκδοση, Μάιος 1999, ή την τρέχουσα έκδοση, των Centers for Disease Control and Prevention/National Institutes of Health (Κέντρα για τον Έλεγχο και την Πρόληψη Νόσων/Εθνικά Ιδρύματα Υγείας).

### ΑΝΤΙΔΡΑΣΤΗΡΙΑ ΠΟΥ ΠΕΡΙΕΧΟΥΝ ΑΖΙΔΙΟ ΤΟΥ ΝΑΤΡΙΟΥ

**ΠΡΟΣΟΧΗ:** Μερικά αντιδραστήρια στο κιτ αυτό περιέχουν αζίδιο του νατρίου. Το αζίδιο του νατρίου μπορεί να αντιδράσει με τις σωληνώσεις μολύβδου ή χαλκού και να σχηματίσει εξαιρετικά εκρηκτικά αζιδια μέταλλων. Κατά την απόρριψη, εκπλύνετε με άφθονη ποσότητα νερού για να εμποδίσετε τη συσσώρευση αζιδίων. Για πρόσθετες πληροφορίες, ανατρέξτε στην ενότητα «Decontamination of Laboratory Sink Drains to Remove Azide Salts», στο εγχειρίδιο οδηγό - διαχείριση ασφάλειας με κωδικό CDC-22 που εκδίδεται από τα Κέντρα για τον Έλεγχο Νόσων στην Ατλάντα της Τζόρτζια, 1976.

### Φράσεις κινδύνου επικίνδυνων ουσιών των Ευρωπαϊκών Κοινοτήτων (Οδηγία Επιτροπής 1999/45/ΕΕ)

R20/21/22 - Βλαβερό κατά την εισπνοή, σε επαφή με το δέρμα και σε περίπτωση κατάποσης.

R32 - Σε επαφή με οξέα ελευθερώνονται πολύ τοξικά αέρια.

S28 - Σε περίπτωση επαφής με το δέρμα, πλύνετε αμέσως με άφθονο νερό.

### ΑΝΤΙΔΡΑΣΤΗΡΙΑ ΠΟΥ ΠΕΡΙΕΧΟΥΝ ΙΩΔΙΟ-125

Κατά τη φύλαξη, το χειρισμό και τη διάθεση του υλικού αυτού, θα πρέπει να χρησιμοποιούνται κατάλληλες προφυλάξεις και καλές εργαστηριακές πρακτικές.

Προς ιατρούς ή ιδρύματα που παραλαμβάνουν ραδιοϊσότοπα κάτω από γενική άδεια:

Το παρόν ραδιενεργό υλικό μπορεί να ληφθεί, να αποκτηθεί, να κατέχεται και να χρησιμοποιείται μόνο από ιατρούς, κτηνίατρος που εξασκούν κτηνιατρική ιατρική, κλινικά εργαστήρια ή νοσοκομεία και μόνο για κλινικές ή εργαστηριακές δοκιμές in vitro που δεν περιλαμβάνουν την εσωτερική ή εξωτερική χορήγηση του υλικού, ή της ακτινοβολίας αυτού, σε ανθρώπους και ζώα. Η παραλαβή, η απόκτηση, η κατοχή, η χρήση και η μεταφορά υπόκεινται στους κανονισμούς και τη γενική άδεια της Ρυθμιστικής Επιτροπής Πυρηνικών των Η.Π.Α. (NRC) της πολιτείας στην οποία η επιτροπή έχει συνάψει συμφωνία για την άσκηση καθηκόντων αρμόδιας αρχής.

1. Η φύλαξη του ραδιενεργού υλικού θα πρέπει να περιοριστεί σε ειδικά επισημασμένο χώρο.
2. Η πρόσβαση σε ραδιενεργά υλικά πρέπει να περιοριστεί μόνο σε εξουσιοδοτημένο προσωπικό.
3. Μη χρησιμοποιείτε πιπέτα με το στόμα σε ραδιενεργά διαλύματα.
4. Μην τρώτε ή πίνετε εντός των χώρων εργασίας που έχουν επισημανθεί ως ραδιενεργοί.

5. Οι περιοχές, όπου ενδεχομένως να έχουν προκληθεί εκχύσεις, θα πρέπει να σκουπιστούν και κατόπιν να πλυθούν με αλκαλικό απορρυπαντικό ή ραδιολογικό απολυμαντικό διάλυμα. Τυχόν υάλινα σκεύη που χρησιμοποιήθηκαν πρέπει να εκπλυθούν καλά με νερό πριν από την πλήυση άλλων εργαστηριακών υάλινων σκευών.

Προς ιατρούς ή ιδρύματα που παραλαμβάνουν ραδιοϊσότοπα κάτω από ειδική άδεια: Η παραλαβή, η χρήση, η μεταφορά και η διάθεση των ραδιενεργών υλικών υπόκεινται στους κανονισμούς και τις συνθήκες της ειδικής άδειάς σας.

**ΠΡΟΕΙΔΟΠΟΙΗΣΗ:** Το προϊόν αυτό περιέχει μια χημική ουσία η οποία είναι γνωστό από την πολιτεία της Καλιφόρνιας ότι προκαλεί καρκίνο.

**ΠΡΟΣΟΧΗ:** Η ραδιενέργεια που αναγράφεται στο ένθετο συσκευασίας μπορεί να διαφέρει ελαφρώς από τη ραδιενέργεια που αναγράφεται στην ετικέτα συσκευασίας ή στην ετικέτα φιαλιδίου ιχνηθέτη. Η ετικέτα συσκευασίας και η ετικέτα φιαλιδίου ιχνηθέτη υποδεικνύουν την πραγματική ποσότητα ραδιενέργειας κατά την ημερομηνία βαθμονόμησης, ενώ το ένθετο συσκευασίας υποδεικνύει τη θεωρητική ραδιενέργεια του kit.

## 6. ΣΥΛΛΟΓΗ ΚΑΙ ΧΕΙΡΙΣΜΟΣ ΔΕΙΓΜΑΤΟΣ

### Δείγματα πλάσματος

Συλλέξτε ασηπτικά δείγμα φλεβικού αίματος σε ένα κενό υάλινο δοκιμαστικό σωλήνα που περιέχει ηπαρίνη ή EDTA.

Διαχωρίστε το κλάσμα πλάσματος. Το πλάσμα μπορεί να φυλαχτεί στο ψυγείο ολονυκτίως στους 2 έως 8°C. Για μεγαλύτερο χρονικό διάστημα, τα δείγματα πρέπει να φυλάσσονται καταψυγμένα στους -20°C. Πρέπει να αποφεύγονται τα αιμολυόμενα, τα λιπαιμικά και τα ικτερικά δείγματα.

### Δείγματα ορού

Αν και, για τον προσδιορισμό της κορτιζόλης, χρησιμοποιούνται συνήθως δείγματα πλάσματος, λαμβάνονται συγκρίσιμα αποτελέσματα με χρήση δειγμάτων ορού.<sup>12</sup>

Διαχωρίστε το κλάσμα ορού. Ο ορός μπορεί να φυλαχτεί στο ψυγείο ολονυκτίως στους 2 έως 8°C.

Για μεγαλύτερο χρονικό διάστημα, τα δείγματα πρέπει να φυλάσσονται καταψυγμένα στους -20°C. Πρέπει να αποφεύγεται η χρήση αιμολυόμενων, λιπαιμικών και ικτερικών δειγμάτων.

### Δείγματα ούρων

Συλλέξτε δείγμα ούρων 24ώρου. Καταγράψτε το συνολικό όγκο των ούρων. Προσθέστε, ως συντηρητικό, 10 γραμμάρια βορικό οξύ ανά λίτρο ούρα και φυλάξτε ένα κλάσμα, το οποίο έχει αναμιχθεί καλά, καταψυγμένο στους -20°C. Αποψύξτε τα καταψυγμένα δείγματα σε θερμοκρασία δωματίου και αναμίξτε καλά πριν από τη χρήση.

## 7. ΕΞΟΠΛΙΣΜΟΣ ΚΑΙ ΥΛΙΚΑ ΠΟΥ ΑΠΑΙΤΟΥΝΤΑΙ, ΟΜΩΣ ΔΕΝ ΠΑΡΕΧΟΝΤΑΙ

- 7.1 Υδρόλουτρο σταθερής θερμοκρασίας, 37 ± 2°C.
- 7.2 Πιπέτα ακρίβειας (10 μL).
- 7.3 Ημι-αυτόματη πιπέτα (1,0 mL).
- 7.4 Μετρητής γάμα.
- 7.5 Βάση δοκιμαστικών σωλήνων.
- 7.6 Συσκευή αναρόφησης νερού (προαιρετικό).
- 7.7 Όργανο περιδίνησης (vortex).
- 7.8 Απορροφητικό χαρτί με πλαστικό οπίσθιο τμήμα (προαιρετικό).

Πρόσθετα εφόδια για χρήση μόνο κατά τη διαδικασία εκχύλισης ούρων:

1. Υάλινοι δοκιμαστικοί σωλήνες μίας χρήσης (12 x 75 χλστ.) και καπάκια.
2. Χλωριούχο μεθυλένιο (διχλωρομεθάνιο, βαθμού αναλυτικού αντιδραστηρίου κατά ACS).
3. Λουτρό πάγου.
4. Πιπέτες ακρίβειας (100 και 200 μL).

5. Κάλυμμα ή καλά αεριζόμενος χώρος.
6. Μέσα για την εξάτμιση του χλωριούχου μεθυλενίου. Αυτό μπορεί να γίνει με ροή ξηρού αέρα ή αζώτου με ήπια θέρμανση του εκχυλίσματος στους 37°C περίπου σε ένα χώρο κάτω από κάλυμμα ή σε ένα καλά αεριζόμενο χώρο.

#### **8. ΔΙΑΔΙΚΑΣΙΑ ΕΚΧΥΛΙΣΗΣ ΟΥΡΩΝ**

Η διαδικασία αυτή περιλαμβάνει τη μεθοδολογία για τον καθορισμό της αποτελεσματικότητας της εκχύλισης με χλωριούχο μεθυλένιο. Στα εργαστήρια της DiaSorin, οι συνήθεις ανακτήσεις της κορτιζόλης από δείγματα ούρων ήταν, κατά μέσο όρο, 99 ± 14%.

- 8.1 Τοποθετήστε επαρκή όγκο χλωριούχο μεθυλένιο σε λουτρό πάγου ώστε να κρυώσει. Υπολογίστε περισσότερο από 1 mL ανά δοκιμαστικό σωλήνα. Το λουτρό πάγου θα πρέπει να είναι αρκετά μεγάλο για να χωρέσει ένα κύπελλο χλωριούχο μεθυλένιο και τη βάση των υάλινων δοκιμαστικών σωληνίων στους οποίους θα γίνει η εκχύλιση.
- 8.2 Για να καθορίσετε την αποτελεσματικότητα της εκχύλισης, επικολλήστε ετικέτες με το αναγνωριστικό του ασθενή σε δύο υάλινους δοκιμαστικούς σωλήνες μίας χρήσης για κάθε δείγμα που θα προσδιοριστεί. Σημειώστε στον έναν δοκιμαστικό σωλήνα «Δ» για το δείγμα και στον άλλον «Ε» για την αποτελεσματικότητα εκχύλισης.
- 8.3 Προσθέστε στους κατάλληλους δοκιμαστικούς σωλήνες «Δ» και «Ε» 200 μL καλά αναμιγμένο δείγμα ούρων 24ώρου.
- 8.4 Προσθέστε 10 μL βαθμονομητή ορού κορτιζόλης 60 μg/dL μόνο σε κάθε δοκιμαστικό σωλήνα «Ε». Αναμίξτε τα αντιδραστήρια ανακινώντας τη βάση δοκιμαστικών σωληνίων ή αναμινύοντας κάθε δοκιμαστικό σωλήνα.
- 8.5 Προσθέστε 1,0 mL κρύο χλωριούχο μεθυλένιο σε κάθε δοκιμαστικό σωλήνα «Δ» και «Ε». Αναμίξτε καλά σε όργανο περιδίνησης (vortex) για να γίνει η εκχύλιση της κορτιζόλης στο οργανικό στρώμα. Τοποθετήστε καπάκι ή καλύψτε και τοποθετήστε σε λουτρό πάγου προκειμένου να αποφευχθεί η υπερβολική εξάτμιση του χλωριούχου μεθυλενίου. Για να διευκολυνθείτε στη διανομή χλωριούχου μεθυλενίου με πιπέτα, είναι σημαντικό να εκπλένετε την πιπέτα 3 έως 4 φορές με ΚΡΥΟ χλωριούχο μεθυλένιο πριν το μεταφέρετε στους κατάλληλους δοκιμαστικούς σωλήνες.
- 8.6 Ενώ περιμένετε το διαχωρισμό φάσεων, επικολλήστε ετικέτες σε δύο δοκιμαστικούς σωλήνες κορτιζόλης GammaCoat για κάθε δοκιμαστικό σωλήνα «Δ» και σε δύο δοκιμαστικούς σωλήνες κορτιζόλης GammaCoat για κάθε δοκιμαστικό σωλήνα «Ε».
- 8.7 Μετά το διαχωρισμό φάσεων, αφαιρέστε προσεχτικά 100 μL από το κάτω στρώμα (χλωριούχο μεθυλένιο) κάθε δοκιμαστικού σωλήνα και προσθέστε το στους δοκιμαστικούς σωλήνες GammaCoat με τις αντίστοιχες ετικέτες. Η έκπλυση της μύτης της πιπέτας με κρύο χλωριούχο μεθυλένιο, πριν από την τοποθέτησή του δείγματος με την πιπέτα, θα ελαχιστοποιήσει τη διαρροή του εκχυλισμένου δείγματος από τη μύτη της πιπέτας. Όταν μεταφέρετε τα 100 μL κλάσμα διαλύματος εκχύλισης στον επικαλυμμένο δοκιμαστικό σωλήνα, μην επιχειρήσετε να σκουπίσετε τη μύτη της πιπέτας επειδή οι φυσικές ιδιότητες του χλωριούχου μεθυλενίου προκαλούν τη διαρροή και τη εισχώρηση φυσαλίδων αέρα στη μύτη της πιπέτας.  
Για να διευκολύνετε τη μεταφορά του διαλύματος εκχύλισης στον επικαλυμμένο δοκιμαστικό σωλήνα, κρατήστε το δοκιμαστικό σωλήνα εκχύλισης και το δοκιμαστικό σωλήνα GammaCoat με το ίδιο χέρι. Γρήγορα, αλλά προσεχτικά, μεταφέρετε 100 μL εκχύλισμα στο κάτω μέρος του δοκιμαστικού σωλήνα GammaCoat.

- 8.8** Εξατμίστε το χλωριούχο μεθυλένιο από τους δοκιμαστικούς σωλήνες GammaCoat με ροή ξηρού αέρα ή αζώτου και ήπια θέρμανση του εκχυλίσματος στους 37°C περίπου.  
**ΠΡΟΣΟΧΗ:** Αποφύγετε τις υπερβολικές συγκεντρώσεις ατμών αλογονομένων υδρογονανθράκων στους χώρους εργασίας. Η ΕΞΑΤΜΙΣΗ ΘΑ ΠΡΕΠΕΙ ΝΑ ΓΙΝΕΤΑΙ ΜΟΝΟ ΣΕ ΧΩΡΟ ΚΑΤΩ ΑΠΟ ΚΑΛΥΜΜΑ Ή ΣΕ ΚΑΛΑ ΑΕΡΙΖΟΜΕΝΟ ΧΩΡΟ.
- 8.9** Μετά την πλήρη εξάτμιση του χλωριούχου μεθυλενίου, προσθέστε 10 µL τυφλό ορό κορτιζόλης 0 µg/dL, CA-2367, σε κάθε δοκιμαστικό σωλήνα GammaCoat που περιέχει το δείγμα ασθενή (δοκιμαστικοί σωλήνες «Δ» και «Ε»), προκειμένου να εξασφαλίσετε ότι τα δείγματα περιέχουν τα σωστά επίπεδα πρωτεΐνης.
- 8.10** Συνεχίστε με τη διαδικασία RIA από το πρώτο βήμα στην παράγραφο Διαδικασία προσδιορισμού.

## 9. ΔΙΑΔΙΚΑΣΙΑ ΠΡΟΣΔΙΟΡΙΣΜΟΥ

### Αντιδραστήριο ιχνηθέτη-ρυθμιστικού διαλύματος:

Προσθέστε όλο το περιεχόμενο 1 φιαλιδίου ιχνηθέτη κορτιζόλης σε 1 φιαλίδιο ρυθμιστικό διάλυμα PBS και αναμίξτε απαλά. Μια τελική έκπλυση του φιαλιδίου ιχνηθέτη κορτιζόλης με το αντιδραστήριο ιχνηθέτη-ρυθμιστικού διαλύματος θα μεγιστοποιήσει τη μεταφορά του ιχνηθέτη. Συμπληρώστε και επικολλήστε τη βοηθητική ετικέτα για το αντιδραστήριο ιχνηθέτη-ρυθμιστικού διαλύματος στον περιέκτη για τη σωστή αναγνώριση. Το αντιδραστήριο ιχνηθέτη-ρυθμιστικού διαλύματος θα πρέπει να φυλάσσεται στο σκοτάδι, ή σε έναν περιέκτη τυλιγμένο με αλουμινοχαρτο, στους 2 έως 8°C. Η διαδικασία του προσδιορισμού περιλαμβάνει την προετοιμασία της καμπύλης βαθμονόμησης από την οποία γίνεται η παρεμβολή της άγνωστης συγκέντρωσης κορτιζόλης στο δείγμα.

- 9.1** Πριν από τη χρήση, αφήστε όλα τα αντιδραστήρια να έρθουν σε θερμοκρασία δωματίου και αναμίξτε καλά χωρίς να σχηματιστεί αφρός.
- 9.2** Επικολλήστε ετικέτα στους δοκιμαστικούς σωλήνες GammaCoat εις διπλούν σύμφωνα με το ακόλουθο πλάνο. Ενδεχομένως, για ορισμένα προγράμματα αναγωγής και ποιοτικού ελέγχου δεδομένων, να απαιτηθούν οι δοκιμαστικοί σωλήνες ολικών κρούσεων [T1,T2] και B0 [1,2]. Όμως μπορούν να παραλειφθούν αν η καμπύλη βαθμονόμησης σχεδιάζεται σε χαρτί ημιλογαριθμικού γραφήματος.<sup>13-15</sup>
- 9.3** Στο κάτω μέρος των κατάλληλων διπλών δοκιμαστικών σωλήνων GammaCoat προσθέστε τα εξής:
- α.** 10 µL τυφλό ορό κορτιζόλης ή κάθε βαθμονομητή ορού κορτιζόλης.
- β.** ΓΙΑ ΔΕΙΓΜΑΤΑ ΟΡΟΥ, ΠΛΑΣΜΑΤΟΣ ΚΑΙ ΜΗ ΕΚΧΥΛΙΣΜΕΝΩΝ ΟΥΡΩΝ, προσθέστε 10 µL από κάθε δείγματος. Πρέπει να προσέχετε ώστε να λαμβάνετε με τον ίδιο τρόπο τους βαθμονομητές και τα δείγματα με πιπέτα.<sup>16</sup>
- γ.** ΓΙΑ ΔΕΙΓΜΑΤΑ ΕΚΧΥΛΙΣΜΕΝΩΝ ΟΥΡΩΝ, χρησιμοποιήστε τους δοκιμαστικούς σωλήνες GammaCoat που περιέχουν τα εκχυλισμένα δείγματα από το βήμα 9 της παραγράφου Διαδικασία εκχύλισης ούρων.  
**ΣΗΜΕΙΩΣΗ:** Αν η αραιώση των δειγμάτων ορού ή πλάσματος ασθενή είναι επιθυμητή, χρησιμοποιήστε ως αραιωτικό το τυφλό ορό κορτιζόλης που παρέχεται με το παρόν kit. Με δείγματα μη εκχυλισμένων ή εκχυλισμένων ούρων, αραιώστε με απεσταγμένο νερό, όπως απαιτείται. Για ελεύθερη κορτιζόλη στα ούρα, εκχυλίστε 200 µL κλάσμα αραιωμένου δείγματος ούρων (Διαδικασία εκχύλισης ούρων, βήμα 3). Συνεχίστε με το συνήθη προσδιορισμό. Στους υπολογισμούς πρέπει να περιλαμβάνεται και ο παράγοντας αραιώσης.
- 9.4** Σε κάθε δοκιμαστικό σωλήνα, προσθέστε 1,0 mL αντιδραστήριο ιχνηθέτη-ρυθμιστικού διαλύματος. Αναμίξτε απαλά κάθε δοκιμαστικό σωλήνα σε όργανο περιδίνησης (vortex) ρυθμισμένο σε χαμηλή ταχύτητα.

- 9.5 Επλώστε τους δοκιμαστικούς σωλήνες για 45 λεπτά σε υδρόλουτρο  $37 \pm 2^\circ\text{C}$ .
- 9.6 Αναρροφήστε ή μεταγγίστε όλους τους δοκιμαστικούς σωλήνες εκτός από αυτούς των συνολικών κρούσεων.  
 ΑΝ ΔΕΝ ΑΦΑΙΡΕΘΕΙ ΕΠΑΡΚΩΣ ΤΟ ΠΡΟΣΚΟΛΛΗΜΕΝΟ ΔΙΑΛΥΜΑ, ΕΝΔΕΧΟΜΕΝΩΣ ΝΑ ΕΧΕΙ ΩΣ ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑ ΤΗΝ ΠΤΩΧΗ ΕΠΑΝΑΛΗΨΗ ΚΑΙ ΨΕΥΔΕΙΣ ΤΙΜΕΣ.  
 Αν χρησιμοποιείτε τεχνική αναρρόφησης, βεβαιωθείτε ότι η πλαστική μύτη του οργάνου αναρρόφησης αγγίζει το κάτω μέρος του επικαλυμμένου δοκιμαστικού σωλήνα και ότι έχει αφαιρεθεί όλο το υγρό.  
 Αν χρησιμοποιείτε τεχνική μετάγγισης, αφήστε τους δοκιμαστικούς σωλήνες να αποστραγγίσουν ανάποδα για 3 έως 5 λεπτά. Χτυπήστε απαλά τους δοκιμαστικούς σωλήνες σε απορροφητικό χαρτί για να απομακρύνετε τυχόν προσκολλημένο υγρό πριν τοποθετήσετε τους δοκιμαστικούς σωλήνες σε όρθια θέση.
- 9.7 Μετρήστε όλους τους δοκιμαστικούς σωλήνες σε μετρητή γάμα για 1 λεπτό με το άνοιγμα κατάλληλα ρυθμισμένο για  $^{137}\text{Cs}$ -125.
- 9.8 Υπολογίστε τα αποτελέσματα. Ανατρέξτε στην παράγραφο Αποτελέσματα.

## 10. ΔΙΑΔΙΚΑΣΙΑ ΜΕ ΧΡΗΣΗ ΣΙΕΛΟΥ

Το κιτ αυτό επίσης επιτρέπει τον προσδιορισμό δειγμάτων σιέλου.

Έχει αποδειχτεί ότι υπάρχει καλή συσχέτιση μεταξύ της συγκέντρωσης κορτιζόλης στο σίελο και της συγκέντρωσης ελεύθερης κορτιζόλης στο πλάσμα και τον ορό (οι συγκεντρώσεις αυτές αντιπροσωπεύουν το 60% έως 100% της συγκέντρωσης του ελεύθερου κλάσματος στην κυκλοφορία και το 4% έως 6% της ολικής συγκέντρωσης στον ορό ή στο πλάσμα).

Πλήθος μελετών έχουν αποδείξει τα πρακτικά και διαγνωστικά πλεονεκτήματα των προσδιορισμών κορτιζόλης στο σίελο και επιβεβαίωσαν την εγκυρότητα και την κλινική αξία τους.

Λήφθηκαν υπόψη δύο σημαντικά σημεία κατά την προσαρμογή της τεχνικής αυτής στους προσδιορισμούς κορτιζόλης στο σίελο:

Πρώτον, επειδή η κορτιζόλη στο σίελο αντιπροσωπεύει μόνο το 5% της ολικής κορτιζόλης στο πλάσμα, απαιτείται εικοσαπλάσια αύξηση στην ευαισθησία. Για να επιτευχθεί αυτό το επίπεδο ευαισθησίας, αυξήθηκε ο όγκος του δείγματος σιέλου στα 200  $\mu\text{L}$ .

Δεύτερον, το σίελο έχει χαμηλότερη συγκέντρωση πρωτεϊνών (γενικά αποτελείται από ένζυμα και γλυκοπρωτεΐνες). Υπάρχουν μόνο ίχνη πρωτεϊνών πλάσματος, ενώ απουσιάζουν οι πρωτεΐνες που δεσμεύονται με τα κορτικοστεροειδή. Για να εξασφαλιστεί ότι οι επιδράσεις της πρωτεϊνικής μήτρας είναι όμοιες στα δείγματα και τα πρότυπα, προστίθεται βαθμονομητής 0 (χωρίς κορτιζόλη) σε κάθε δείγμα σιέλου (όπως γίνεται στους προσδιορισμούς σε δείγματα εκχυλισμένων ούρων).

Επομένως, απαιτούνται μόνο μικρές τροποποιήσεις κατά την τοποθέτηση των δειγμάτων και των προτύπων με πιπέτα για να προσαρμοστεί η μέθοδος στον προσδιορισμό δειγμάτων σιέλου με τη χρήση μόνο των αντιδραστηρίων που ήδη παρέχονται στο κιτ.

### 10.1 Συλλογή και προετοιμασία δειγμάτων σιέλου

Η συλλογή του σιέλου πρέπει να γίνεται 10 λεπτά μετά από έκπλυση του στόματος του ασθενή με νερό βρύσης. Πρέπει να γίνει διέγερση για την παραγωγή σιέλου και ο ασθενής θα πρέπει να ενημερωθεί για τη διαφορά μεταξύ σιέλου και βλέννας. Μπορεί να συλλεχθεί επαρκής όγκος σιέλου, δηλ. 1  $\mu\text{L}$ , σε λίγα λεπτά, ακόμη και από παιδιά.

Τα δείγματα φυλάσσονται κατεψυγμένα στους  $-20^\circ\text{C}$ . Πριν από τον προσδιορισμό, τα δείγματα πρέπει να αποψυχθούν και να φυγοκεντρηθούν. Στη συνέχεια, το διάφανο υπερκείμενο υγρό απομακρύνεται με άντληση ώστε να χρησιμοποιηθεί στον προσδιορισμό.

### 10.2 Διαδικασία με χρήση σιέλου

Για κάθε **δείγμα σιέλου**, τοποθετήστε με πιπέτα 10  $\mu\text{L}$  βαθμονομητή 0 σε ζεύγη στους δοκιμαστικούς σωλήνες στους οποίους έχουν επικολληθεί ετικέτες. Προσθέστε 200  $\mu\text{L}$  δείγμα και 1 mL ιχνηθέτη.

Για τα **πρότυπα**, τοποθετήστε με πιπέτα 10  $\mu\text{L}$  βαθμονομητή 0 ή πρότυπο σε ζεύγη στους δοκιμαστικούς σωλήνες στους οποίους έχουν επικολληθεί ετικέτες. Προσθέστε 200  $\mu\text{L}$  ρυθμιστικό διάλυμα PBS και 1 mL ιχνηθέτη.

Στροβιλίστε απαλά κάθε δοκιμαστικό σωλήνα. Επώαστε για 45 λεπτά σε υδρόλουτρο στους 37°C. Αντλήστε ή μεταγγίστε το περιεχόμενο των δοκιμαστικών σωλήνων και μετρήστε τη ραδιενέργεια που έχει δεσμευτεί στα πλαϊνά του δοκιμαστικού σωλήνα για 1 λεπτό.

Πρότυπη καμπύλη

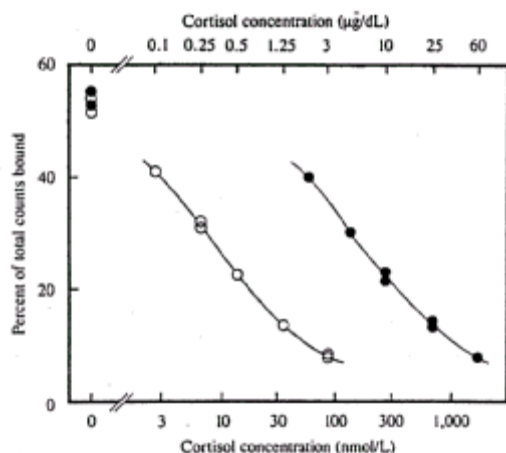


Figure 3  
Standard curves for assay of cortisol in serum or plasma (●)  
and in saliva (○) with the GammaCoat™ [ $^{125}\text{I}$ ] RIA kit.

Η πραγματική περιοχή τιμών των προτύπων για την κορτιζόλη στο σίελο είναι 0,10 – 0,25 – 0,50 – 1,25 και 3,0  $\mu\text{g/dL}$ . Στο αριστερό διάγραμμα απεικονίζονται οι πρότυπες καμπύλες για τις δύο τεχνικές προσδιορισμού (ορού και σιέλου) οι οποίες καλύπτονται στο kit αυτό.

Αν και ο όγκος επώασης είναι αρκετά μεγαλύτερος στον προσδιορισμό σιέλου από ό,τι στον προσδιορισμό ορού (1,210  $\mu\text{L}$  αντί για 1,010  $\mu\text{L}$ ), αυτό δεν επιδρά στην ικανότητα δέσμευσης του επισημαντή εντός της περιοχής τιμών της πρότυπης καμπύλης.

Σημείωση: Η καμπύλη αυτή λήφθηκε κατά τη διάρκεια μελέτης που διεξήχθη το 1984 όπου η περιοχή τιμών των προτύπων ήταν 0, 2,0, 5,0, 10, 25 και 60  $\mu\text{g/dL}$ . Από τότε, η περιοχή τιμών των προτύπων έχει αλλάξει. Παρακαλείστε να ανατρέξετε στη νέα περιοχή τιμών για τους υπολογισμούς κορτιζόλης στο σίελο, λαμβάνοντας υπόψη μια αναλογία 1:20.

**Φυσιολογικές τιμές**  
Πίνακας 1

Φυσιολογικά πρωινά επίπεδα κορτιζόλης στο σίελο και τον ορό (μg/dL)						
	Σίελο			Ορός		
Ομάδα ασθενών*	n	Διάμεσος	Περιοχή τιμών	n	Διάμεσος	Περιοχή τιμών
Φυσιολογικοί ενήλικες	150	0,43	0,18 – 1,01	103	6,5	4,5 – 21,1
Παιδιά (4 έως 11 ετών)	105	0,40	0,14 – 0,91	---	---	---
Έγκυες (3 <sup>ο</sup> τρίμηνο)	84	0,47	0,33 – 0,91	84	15,7	12,9 – 39,9

\* Κάτοικοι Ηνωμένου Βασιλείου.

**11. ΠΟΙΟΤΙΚΟΣ ΕΛΕΓΧΟΣ**

Κάθε εργαστήριο θα πρέπει να χρησιμοποιεί υλικά ελέγχου αρκετών επιπέδων για την παρακολούθηση της απόδοσης του προσδιορισμού. Ο χειρισμός των υλικών ελέγχου θα πρέπει να γίνεται όπως αυτός των άγνωστων δειγμάτων. Θα πρέπει να τηρούνται πίνακες ποιοτικού ελέγχου για να παρακολουθείται η απόδοση των υλικών ελέγχου. Θα πρέπει να χρησιμοποιούνται κατάλληλες στατιστικές μέθοδοι για την αξιολόγηση των τάσεων. Θα πρέπει να εξακριβωθούν τα αποδεκτά όρια απόδοσης για κάθε ξεχωριστό εργαστήριο.

**12. ΥΠΟΛΟΓΙΣΜΟΣ ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΩΝ**

Τα άγνωστα δείγματα ορού, πλάσματος και ούρων μπορούν να προσδιοριστούν ταυτόχρονα και η παρεμβολή όλων γίνεται με χρήση της καμπύλης βαθμονόμησης που έχει σχεδιαστεί από τους βαθμονομητές κορτιζόλης στον ορό. Στη συνέχεια, τόσο η κορτιζόλη στα δείγματα μη εκχυλισμένων ούρων (UC) όσο και η ελεύθερη κορτιζόλη στα δείγματα εκχυλισμένων ούρων (UFC) μετατρέπονται σε «μg/24ωρο» με τον κατάλληλο τύπο.

- 12.1** Καταγράψτε τις κρούσεις ανά λεπτό (CPM) λόγω δέσμησης για κάθε δοκιμαστικό σωλήνα.
- 12.2** Σε χαρτί ημιλογαριθμικού γραφήματος, σχεδιάστε τις CPM λόγω δέσμησης για τους βαθμονομητές κορτιζόλης (κάθετος άξονας) σε συνάρτηση με τη συγκέντρωση κορτιζόλης (οριζόντιος άξονας).
- 12.3** Σχεδιάστε την καμπύλη καλύτερη προσαρμογής. Για συνήθη δεδομένα και το γράφημά τους, ανατρέξτε στον ΠΙΝΑΚΑ II και το ΣΧΗΜΑ 1.
- 12.4** Εντοπίστε τις CPM λόγω δέσμησης για κάθε δοκιμαστικό σωλήνα που αντιστοιχεί σε κάθε δείγμα (υλικό ελέγχου, ορό, πλάσμα, μη εκχυλισμένα και εκχυλισμένα ούρα) στον κάθετο άξονα και χαράξτε μια οριζόντια γραμμή ώσπου να συναντήσει την καμπύλη βαθμονόμησης. Στο σημείο τομής, διαβάστε τη συγκέντρωση κορτιζόλης (μg/dL) στον οριζόντιο άξονα.



### 12.5 ΚΟΡΤΙΖΟΛΗ ΣΕ ΜΗ ΕΚΧΥΛΙΣΜΕΝΑ ΟΥΡΑ

Για να μετατρέψετε την κορτιζόλη στα ούρα (UC) των δειγμάτων μη εκχυλισμένων ούρων από μg/dL σε μg κορτιζόλη ανά 24ωρο, χρησιμοποιήστε την ακόλουθη εξίσωση:

$$UC = \frac{S \times V}{100}$$

όπου:

- S = Συγκέντρωση δείγματος μη εκχυλισμένων ούρων σε μg/dL
- V = Συνολικός όγκος ούρων σε mL/24ωρο
- 100 = Συντελεστής μετατροπής

### 12.6 ΕΛΕΥΘΕΡΗ ΚΟΡΤΙΖΟΛΗ ΣΕ ΕΚΧΥΛΙΣΜΕΝΑ ΟΥΡΑ

Για να μετατρέψετε την ελεύθερη κορτιζόλη στα ούρα (UFC) των εκχυλισμένων δειγμάτων ούρων από μg/dL σε μg κορτιζόλη ανά 24ωρο, χρησιμοποιήστε την ακόλουθη εξίσωση:

$$UFC = \frac{S \times V}{33,3 (E-S)}$$

όπου:

- S = Συγκέντρωση δείγματος εκχυλισμένων ούρων σε μg/dL
- E = Αποτελεσματική συγκέντρωση δοκιμαστικού σωλήνα για το αντίστοιχο δείγμα σε μg/dL
- V = Συνολικός όγκος ούρων σε mL/24ωρο
- 33,3 = Συνδυασμένος συντελεστής αραίωσης και αποτελεσματικότητας εκχύλισης

Παράδειγμα:

- E = 13,50 μg/dL
- S = 7,85 μg/dL
- V = 1150 mL/24ωρο

$$UFC = \frac{(7,85) (1150)}{33,3 (13,50-7,85)} = 48 \text{ μg κορτιζόλη/24ωρο}$$

Για εργαστήρια που επιθυμούν να παρακολουθούν την αποτελεσματικότητα της διαδικασίας εκχύλισης ούρων (EE), μπορεί να χρησιμοποιηθεί ο ακόλουθος τύπος υπολογισμού της αποτελεσματικότητας ως ποσοστό.

$$EE = \frac{E-S}{6,0} \times 100$$

όπου:

- S = Συγκέντρωση δείγματος εκχυλισμένων ούρων σε μg/dL
- E = Αποτελεσματική συγκέντρωση δοκιμαστικού σωλήνα για το αντίστοιχο δείγμα σε μg/dL
- 6,0 = Αναμενόμενη διαφορά μεταξύ των συγκεντρώσεων στους δοκιμαστικούς σωλήνες «E» και «Δ» σε μg/dL
- 100 = Συντελεστής μετατροπής

### 12.7 ΣΥΣΤΗΜΑ ΜΟΝΑΔΩΝ S.I.

Με χρήση μοριακού βάρους 362,5 Dalton, μπορεί να γίνει μετατροπή των τιμών βαθμονομητών ορού, υλικών ελέγχου και δειγμάτων ασθενών (ορού και πλάσματος) από μικρογραμμάρια ανά δέκατο λίτρου (μg/dL) σε nanomole ανά λίτρο (nmol/L) του συστήματος μονάδων S.I. πολλαπλασιάζοντας με 27,59 (Για τις τιμές των βαθμονομητών κορτιζόλης που παρατίθενται στα δύο συστήματα μονάδων, ανατρέξτε στον ΠΙΝΑΚΑ II). Με όμοιο τρόπο, οι τιμές υλικών ελέγχου και δειγμάτων ασθενών μη εκχυλισμένων και εκχυλισμένων ούρων μπορούν να μετατραπούν από μικρογραμμάρια ανά 24ωρο (μg/24 hr) σε nanomole ανά 24ωρο (nmol/24 hr) του συστήματος μονάδων S.I. πολλαπλασιάζοντας με 2,76.

#### ΠΙΝΑΚΑΣ II

Συγκέντρωση βαθμονομητών

Αρ. καταλόγου	Επίπεδο βαθμονομητή	Μονάδες S.I.
CA-2367	0 μg/dL	0 nmol/L
CA-2358	1 μg/dL	28 nmol/L
CA-2359	3 μg/dL	83 nmol/L
CA-2370	10 μg/dL	276 nmol/L
CA-2371	25 μg/dL	690 nmol/L
CA-2372	60 μg/dL	1655 nmol/L

#### ΠΙΝΑΚΑΣ III

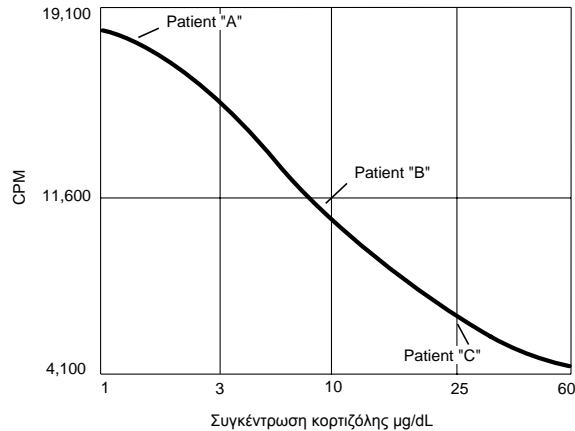
Καταγραφή δεδομένων

Να μη χρησιμοποιηθεί για τον υπολογισμό άγνωστων δειγμάτων

Αρ. δοκ. σωλήνα	Περιεχόμενο δοκ. σωλήνων	CPM λόγω δέσμησης	Συγκέντρωση κορτιζόλης (μg/dL)
T1	Συνολικές κρούσεις (ιχνηθέτης-ρυθμ. διάλυμα)	44516	
T2	Συνολικές κρούσεις (ιχνηθέτης-ρυθμ. διάλυμα)	43651	
1	Τυφλός ορός κορτιζόλης, Β <sub>0</sub>	0 μg/dL	22311
2	Τυφλός ορός κορτιζόλης, Β <sub>0</sub>	0 μg/dL	22771
3	Βαθμονομητής ορού κορτιζόλης	1 μg/dL	19216
4	Βαθμονομητής ορού κορτιζόλης	1 μg/dL	19243
5	Βαθμονομητής ορού κορτιζόλης	3 μg/dL	15331
6	Βαθμονομητής ορού κορτιζόλης	3 μg/dL	15731
7	Βαθμονομητής ορού κορτιζόλης	10 μg/dL	10660
8	Βαθμονομητής ορού κορτιζόλης	10 μg/dL	10294
9	Βαθμονομητής ορού κορτιζόλης	25 μg/dL	6862
10	Βαθμονομητής ορού κορτιζόλης	25 μg/dL	6657
11	Βαθμονομητής ορού κορτιζόλης	60 μg/dL	4186
12	Βαθμονομητής ορού κορτιζόλης	60 μg/dL	4224
13	Δείγμα ασθενή «Α»	18470	1,3
14	Δείγμα ασθενή «Α»	18992	1,1
			Μέσος όρος: 1,2
15	Δείγμα ασθενή «Β»	10377	10,1
16	Δείγμα ασθενή «Β»	10608	9,6
			Μέσος όρος: 9,9
17	Δείγμα ασθενή «Γ»	6316	28,8
18	Δείγμα ασθενή «Γ»	6318	28,8
			Μέσος όρος: 28,8

### Συνήθη αποτελέσματα

Να μη χρησιμοποιηθεί για τον υπολογισμό άγνωστων δειγμάτων



ΣΧΗΜΑ 1

### 13. ΠΕΡΙΟΡΙΣΜΟΙ ΔΙΑΔΙΚΑΣΙΑΣ

#### 13.1 Σχετικά με τη διαδικασία

Το αντιδραστήριο ιχνηθέτη-ρυθμιστικού διαλύματος πρέπει να προστατεύεται από το φως. Οι επικαλυμμένοι δοκιμαστικοί σωλήνες είναι έτοιμοι για χρήση όπως λαμβάνονται και θα πρέπει να φυλάσσονται στους 2 έως 27°C. Το πλαστικό περιτύλιγμα πρέπει να είναι κλεισμένο με ασφάλεια όταν φυλάσσετε τους μη χρησιμοποιημένους δοκιμαστικούς σωλήνες προκειμένου να αποφευχθεί η συμπύκνωση.

Πρέπει να ελέγχετε τακτικά τις συνθήκες επώασης. Η θερμοκρασία του υδρόλουτρου πρέπει να είναι σταθερή στους  $37 \pm 2^\circ\text{C}$  και η στάθμη του νερού να βρίσκεται υψηλότερα από το διάλυμα στους δοκιμαστικούς σωλήνες, χωρίς, όμως να προκαλείται η αιώρηση αυτών.

Ο χρήστης πρέπει να λαμβάνει υπόψη του ότι ενδεχομένως να προκύψουν εσφαλμένα αποτελέσματα λόγω λανθασμένης φύλαξης και χειρισμού των δειγμάτων. Πρέπει να αποφεύγονται τα αιμολυόμενα, τα λιπαιμικά και τα ικτερικά δείγματα.

Αν δεν λαμβάνεται σωστές τιμές κορτιζόλης για τα υλικά ελέγχου, ενδεχομένως οι χειρισμοί να είναι ανακριβείς, ο χειρισμός λανθασμένος ή τα αντιδραστήρια να έχουν υποβαθμιστεί. Θα πρέπει να συμπεριλαμβάνονται υλικά ελέγχου σε κάθε εκτέλεση. Θα πρέπει να καθιερώνεται μια καμπύλη βαθμονόμησης για κάθε εκτέλεση.

Το kit κορτιζόλης GammaCoat δεν θα πρέπει να χρησιμοποιηθεί για το χαρακτηρισμό των επιπέδων κορτιζόλης σε δείγματα από ασθενείς που λαμβάνουν θεραπεία με πρεδνιζολόνη. Βλ. Περιορισμούς ερμηνείας

### 13.2 Ερμηνεία

Συνήθως, τα μέγιστα φυσιολογικά επίπεδα κορτιζόλης παρατηρούνται μεταξύ 5:00 και 10:00 το πρωί, ενώ οι χαμηλότερες τιμές παρατηρούνται μεταξύ 8:00 το απόγευμα και 4:00 το πρωί.<sup>5</sup> Τα απογευματινά επίπεδα συνήθως φτάνουν στο 1/2 έως 1/3 των πρωινών επιπέδων. Έχει περιγραφεί ξαφνική αύξηση των επιπέδων κορτιζόλης σε γυναίκες το μεσημέρι, η οποία συμπίπτει με την πρόσληψη τροφής και μειώνεται έντονα με τη στέρηση τροφής.<sup>17</sup> Η εναλλαγή συναισθημάτων κατά τη διάρκεια της ημέρας, οι δοκιμασίες διέγερσης και καταστολής και οι διάφορες καταστάσεις στρες μεταβάλλουν φυσιολογικά τα επίπεδα κορτιζόλης. Για παράδειγμα, η διέγερση ACTH συνήθως αποδίδει τιμές δύο έως τρεις φορές μεγαλύτερες από το πρωινό επίπεδο αναφοράς.<sup>18</sup> Η καταστολή μετυραπρόνης και δεξαμεθαζόνης συνήθως αποδίδει πρωινά δείγματα με τιμές χαμηλότερες από 5 μg/dL.<sup>10</sup> Τα οιστρογόνα, όπως τα αντισυλληπτικά που λαμβάνονται από το στόμα, ενδεχομένως να προκαλέσουν αυξημένα επίπεδα κορτιζόλης ως αποτέλεσμα των αλλαγμένων συγκεντρώσεων πρωτεϊνών στο πλάσμα και τον ορό. Επομένως, οι τιμές κορτιζόλης κάθε ασθενή συνήθως αξιολογούνται με αναφορά το πρωινό επίπεδο κορτιζόλης του/της.

Οι προσδιορισμοί κορτιζόλης από ασθενείς που λαμβάνουν θεραπεία με πρεδνιζολόνη αντενδείκνυνται λόγω της υψηλής διασταυρούμενης αντιδραστικότητας του αντισώματος κορτιζόλης αυτού του kit με την πρεδνιζολόνη και την 6-μεθυλοπρεδνιζολόνη. Η υψηλή διασταυρούμενη αντιδραστικότητα ενδεχομένως να αποδώσει υψηλά φαινομενικά επίπεδα κορτιζόλης.

Οι προσδιορισμοί κορτιζόλης που παράγονται από το άμεσο πρωτόκολλο ούρων θα έχουν ως αποτέλεσμα κλινικά έγκυρες τιμές όταν συγκριθούν με την αναφερόμενη φυσιολογική περιοχή τιμών κορτιζόλης σε μη εκχυλισμένα ούρα. Επειδή είναι γνωστό ότι μη αναγνωρισμένες ουσίες που υπάρχουν στα ούρα μπορούν να παρεμβληθούν στους ανοσοπροσδιορισμούς ελεύθερης κορτιζόλης, οι τιμές που λαμβάνονται με χρήση των άμεσων πρωτοκόλλων ούρων θα είναι υψηλότερες από αυτές που λαμβάνονται από δείγματα ούρων που έχουν καθαριστεί με τεχνικές όπως η υγρή χρωματογραφία υψηλής πίεσης.<sup>19,20</sup>

## 14. ΑΝΑΜΕΝΟΜΕΝΕΣ ΤΙΜΕΣ

### 14.1 ΕΠΙΠΕΔΑ ΣΤΟ ΠΛΑΣΜΑ Η ΣΤΟΝ ΟΡΟ

Πρωινά:

7 έως 25 μg/dL ή 70 έως 250 ng/mL

[193 έως 690 nmol/L]

Απογεύματα:

2 έως 9 μg/dL ή 20 έως 90 ng/mL

[55 έως 248 nmol/L]

Αυτές οι περιοχές τιμών μπορούν να χρησιμοποιηθούν ως οδηγός έως ότου κάθε εργαστήριο καθιερώσει τις δικές του φυσιολογικές περιοχές τιμών.

### 14.2 ΕΛΕΥΘΕΡΗ ΚΟΡΤΙΖΟΛΗ ΣΕ ΜΗ ΕΚΧΥΛΙΣΜΕΝΑ ΟΥΡΑ

Η φυσιολογική περιοχή τιμών της κορτιζόλης στα ούρα (UC) των μη εκχυλισμένων δειγμάτων ούρων είναι 75 έως 270 μg ανά 24ωρο [207 έως 745 nmol/24 hr]. Η λανθασμένη συλλογή δείγματος ούρων ενδεχομένως να έχει ως αποτέλεσμα την εσφαλμένη αξιολόγηση του ασθενή. Συνιστάται να καθοριστεί η κρεατινίνη προκειμένου να αναγνωριστούν οι εμφανώς ακατάλληλες συλλογές ούρων.<sup>21</sup>

### 14.3 ΕΛΕΥΘΕΡΗ ΚΟΡΤΙΖΟΛΗ ΣΕ ΕΚΧΥΛΙΣΜΕΝΑ ΟΥΡΑ

Η φυσιολογική περιοχή τιμών της ελεύθερης κορτιζόλης στα ούρα είναι 20 έως 90 μg κορτιζόλη ανά 24ωρο [55 έως 248 nmol/24 hr]. Η λανθασμένη συλλογή δείγματος ούρων ενδεχομένως να έχει ως αποτέλεσμα την εσφαλμένη αξιολόγηση του ασθενή. Συνιστάται να καθοριστεί η κρεατινίνη προκειμένου να αναγνωριστούν οι εμφανώς ακατάλληλες συλλογές ούρων.<sup>21</sup>

## 15. ΕΙΔΙΚΑ ΧΑΡΑΚΗΡΙΣΤΙΚΑ ΑΠΟΔΟΣΗΣ

### 15.1 ΑΚΡΙΒΕΙΑ

Η ακρίβεια για τον ίδιο προσδιορισμό υπολογίστηκε από το μέσο όρο 20 προσδιορισμών που εκτελέστηκαν ταυτόχρονα ανά δείγμα ορού. Η ακρίβεια μεταξύ προσδιορισμών υπολογίστηκε από το μέσο όρο επαναλήψεων για 20 διαφορετικές εκτελέσεις.

Δείγμα για ακρίβεια στον ίδιο προσδιορισμό	Αριθμός προσδιορισμών	Μέσος όρος (μg/dL)	Τυπική απόκλιση (μg/dL)	Συντελεστής διακύμανσης (%)
Μείγμα ορού A	20	2,9	0,19	6,6
Μείγμα ορού B	20	12,1	0,93	7,7
Μείγμα ορού C	20	47,1	3,18	6,8

Δείγμα για ακρίβεια μεταξύ σειρών προσδιορισμών	Αριθμός ξεχωριστών εκτελέσεων	Μέσος όρος (μg/dL)	Τυπική απόκλιση (μg/dL)	Συντελεστής διακύμανσης (%)
Μείγμα ορού D	20	3,7	0,33	9,0
Μείγμα ορού E	20	12,1	1,19	9,8
Μείγμα ορού F	20	36,9	3,24	8,8

**15.2 Αληθινότητα:** Η αληθινότητα αυτού του προσδιορισμού ελέγχθηκε με δοκιμασία ανάκτησης.

### ΑΝΑΚΤΗΣΗ ΑΠΟ ΜΕΙΓΜΑ ΟΡΟΥ

Παρασκευάστηκαν δείγματα με πρόσθετο αραιώνοντα δείγμα με γνωστή υψηλή συγκέντρωση κορτιζόλης με μείγμα ορού το οποίο είχε προηγουμένως αναλυθεί. Κάθε δείγμα στο οποίο έγινε αυτή η προσθήκη προσδιορίστηκε τέσσερις φορές. Το ποσοστό ανάκτησης υπολογίστηκε ως (ανακτημένη τιμή/αναμενόμενη τιμή) x 100.

Συνεισφορά από προσθήκη (μg/dL)	Συνεισφορά από μείγμα (μg/dL)	Αναμενόμενη τιμή (μg/dL)	Ανακτημένη τιμή (μg/dL)	Ποσοστό (%) ανάκτησης
4,2	1,6	5,8	5,5	95
11,2	1,6	12,7	12,8	101
17,2	1,6	18,8	18,4	98
26,3	1,6	27,9	25,4	91
41,2	1,6	42,8	39,2	92

### 15.3 Αναλυτική ευαισθησία

Η ευαισθησία της καμπύλης βαθμονόμησης ορίζεται ως η μικρότερη μοναδική τιμή που μπορεί να διακριθεί από το μηδέν. Η στατιστική εκτίμηση της ελάχιστης ανιχνεύσιμης συγκέντρωσης (ευαισθησία) υπολογίστηκε σύμφωνα με τη μέθοδο του D. Rodbard<sup>22</sup> για 30 επαναλήψεις στο μηδενικό σημείο της καμπύλης βαθμονόμησης. Η υπολογισμένη ευαισθησία είναι 0,21 μg/dL.

### 15.4 Ισχύς σύνδεσης αντιγόνου - αντισώματος

Η σταθερά συγγένειας, κατόπιν υπολογισμού, του αντιορού κορτιζόλης είναι περίπου  $2 \times 10^8$  λίτρα/mole.

### 15.5 Αναλυτική ειδικότητα

Τα δεδομένα της διασταυρούμενης αντιδραστικότητας του αντιορού που χρησιμοποιείται στο παρόν kit εκφράζεται ως ο λόγος της συγκέντρωσης κορτιζόλης προς τη συγκέντρωση της ουσίας με διασταυρούμενη αντιδραστικότητα σε 50% αναστολή της μέγιστης δέσμευσης.








Ένωση	% διασταυρούμενη αντιδραστικότητα
Κορτιζόλη	100
Πρεδνιζολόνη	25,5
6-Μεθυλοπρεδνιζολόνη	14,5
11-δεσοξυκορτιζόλη	9,8
17-υδροξυπρογεστερόνη	0,4
Κορτικοστεροειδή	0,9
Δεξαμεθαζόνη	0,049
Πρεδνιζόνη	3,8
Δεσοξυκορτικοστερόνη	0,14
Τετραϋδροκορτιζόνη	0,2
Αλδοστερόνη	<0,1
β-κορτόλη	<0,1
β-κορτολόνη	<0,1
Κορτιζόνη	10,3
Διϋδροκορτιζόνη	0,43
Προγεστερόνη	0,015
Σπειρονολακτόνη	<0,1
Τετραϋδροκορτιζόλη	0,3
6-β-υδροκορτιζόνη	4,2

**ΓΙΑ ΤΗ ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ, ΑΝΑΤΡΕΞΤΕ ΣΤΗΝ ΤΕΛΕΥΤΑΙΑ ΣΕΛΙΔΑ**

**REFERENCES/BIBLIOGRAPHIE/LITERATUR/BIBLIOGRAFIA/BIBLIOGRAFIA/  
REFERENCIAS/REFERENSER/BIB/ΙΟΓΡΑΦΙΑ**

1. Korpassy, A., H. Stoeckel and P. Vecsei, **Acta Anaesth. Scand.**, 16, 161, (1972).
2. Hartley, L.H., et. al., **J. Appl. Physiol.**, 33, 602, (1972).
3. Kehlet, H. and C. Binder, **J. Clin. Endocr. Metab.**, 36, 330, (1973).
4. Reynolds, J.W., **Pediatrics**, 51, 884, (1973).
5. de Lacerda, L., A. Kowarski and C.J. Migeon, **J. Clin. Endocr. Metab.**, 36, 227, (1973).
6. Goth, M. and J. Gonczi, **Endokrinologie**, 60, 8, (1972).
7. Ney, R.L., D.N. Orth and G.W. Liddle, in "The Investigation of Hypothalamic-Pituitary-Adrenal Function," James (ed.), **University Press**, Cambridge, England, 285-300, (1968).
8. Wynn, V., **Endocr.**, 17, 213, (1968).
9. Nerup, J., **Acta Endocr.**, 76, 142, (1974).
10. Sawin, C.T., **Ann. Intern. Med.**, 68, 624, (1968).
11. Yalow, R.S. and S.A. Berson, in "Principles of Competitive Protein Binding Assays," Odell & Daughaday (eds.), **J.B. Lippincott Co.**, Philadelphia, Ch. 1, (1971).
12. Foster, L.B. and R.T. Dunn, **Clin. Chem.**, 20, 365, (1974).
13. Rodbard, D. and J.E. Lewald, **Acta Endocr. (Copenhagen)**, 147, 79, (1970).
14. Rodbard, D., **Clin. Chem.**, 20, 1255, (1974).
15. Rodbard, D. and D.M. Hutt, in "Radioimmunoassays and Related Procedures in Medicine," 1, **Int. Atomic Energy Agency**, Vienna, 165-192, (1974).
16. Wenk, R.E. and J.A. Lustgarten, **Clin. Chem.**, 20, 320, (1974).
17. Quigley, M.E. and S.S.C. Yen, **J. Clin. Endocr. Metab.**, 49, 945, (1979).
18. Eik-Nes, K., et. al., **J. Clin. Endocr. Metab.**, 15, 13, (1955).
19. Schoneshofer, M., A. Fenner and H.J. Dulee, **Clin. Chim. Acta**, 101, 125, 1980.
20. Pearson Murphy, B.E., et. al., **J. Clin. Endo. Metab.**, 53, 91, (1981).
21. Juselius, R.E. and F. Barnhart, **Clin. Chem.**, 20, 1470, (1974).
22. Rodbard, D., et. al., **Anal. Biochem.**, 90, 1, (1978).
23. Smith, David S., Ph.D. and John Landon, M.D., Department of Clinical Chemistry, St. Bartholomew's Hospital, London EC1, United Kingdom "Cortisol Perspectives", **Travenol-Genentech Diagnostics**, Vol. , No. 1, (1984).









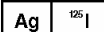




**SYMBOLS USED WITH DEVICES**

	English	Français	Deutsch	Español	Italiano
	European Conformity	Conformité aux normes européennes	CE – Konformitätskennzeichnung	Conformidad europea	Conformità europea
	Expiration Date	Date limite d'utilisation	Mindesthaltbarkeitsdatum	Fecha de caducidad	Data di scadenza
	Manufacturer	Fabricant	Hersteller	Fabricante	Fabbricante
	Consult Instructions for Use	Consulter les instructions d'utilisation	Gebrauchsanweisung beachten	Consulte las instrucciones de uso	Consultare le istruzioni per l'uso
<b>IVD</b>	In vitro diagnostic.	Diagnostic in vitro.	In-vitro-Diagnostikum.	Diagnóstico in vitro.	Diagnostica in vitro.
<b>LOT</b>	Lot No.	No. de lot	Chargen-Nr.	Número de lote	Lotto n°
	Temperature limitation.	Limitation de température.	Temperaturbereich	Limitación de temperatura	Limite della temperatura
<b>SORB</b>	Solid phase (Coated tubes).	Phase solide (Tubes enduits).	Festphase (Beschichtete Teströhrchen).	Fase sólida (Tubos recubiertos).	Fase solida (Cannule con rivestimento).
<b>Ag</b> <sup>125</sup> I	Tracer: antigen labelled with <sup>125</sup> I	Traceur : antigène marqué à l'iode <sup>125</sup>	Tracer: <sup>125</sup> I-markiertes Antigen	Trazador: antígeno etiquetado con <sup>125</sup> I	Tracciatore: antigene etichettato con <sup>125</sup> I
<b>BUF</b>	Buffer	Tampon	Puffer	Tampón	Tampone
<b>CAL</b>	Calibrator	Étalon	Kalibrator	Calibrador	Calibratore
	Radioactive	Radioactif	Radioaktiv	Radiactivo	Radioattivo
	Harmful	Nocif	Gesundheitsschädlich	Nocivo	Nocivo

**SYMBOLS USED WITH DEVICES CONTINUED ON NEXT PAGE.**

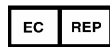


CONTINUED FROM PREVIOUS PAGE - SYMBOLS USED WITH DEVICES

	Português	Svenska	Ελληνικά
	Conformidade com as normas europeias	Europeisk överensstämmelse	Ευρωπαϊκή Συμμόρφωση
	Prazo de validade	Utgångsdatum	Ημερομηνία Λήξης
	Fabricante	Tilverkare	Κατασκευαστής
	Consulte as instruções de utilização	Se bruksanvisningen	Συμβουλευτείτε τις Οδηγίες Χρήσης
	Diagnóstico in vitro.	Diagnostik in vitro.	In vitro διαγνωστικό ιατροτεχνολογικό προϊόν.
	N.º do lote	Batch-nummer	Αρ. παρτίδας
	Limite de temperatura.	Temperaturbegränsning.	Περιορισμοί θερμοκρασίας
	Fase sólida (Tubos revestidos).	Solid fas (Belagda rör).	Στερεή φάση (Επικαλυμμένοι δοκιμαστικοί σωλήνες).
	Traçador: antígeno marcado com <sup>125</sup> I	Spårelement: antigen betecknad med <sup>125</sup> I	Ιχνηθέτης: Αντιγόνο σηματομενόμενο με <sup>125</sup> I
	Tampão	Buffert	Ρυθμιστικό διάλυμα
	Calibrador	Kalibrator	Βαθμονομητής
	Radioactivo	Radioaktiv	Ραδιενεργό
	Nocivo	Skadligt	Επιβλαβής



DiaSorin Inc.  
1951 Northwestern Avenue  
P.O. Box 285  
Stillwater, MN 55082-0285



DiaSorin S.p.A.,  
13040 Saluggia (VC) Italy

Phone: 651-439-9710  
FAX: 651-351-5669

For Customer Service in the U.S. and Canada Call Toll Free: 800-328-1482	
In the United Kingdom Call: 44 118 9364200 FAX: 44 118 9792061	
CA60380E	33941 1/10

PRINTED IN U.S.A.

