

CORTISOL [I-125] RIA KIT

Código RK-240CT.

Estuche para 100 determinaciones

Juego de reactivos para la determinación cuantitativa *in vitro* del Cortisol en suero humano, en el rango de 0-1600 nmol/L (0-580 ng/mL).

Introducción

El Cortisol es el más potente de los glucocorticoides producidos por la corteza suprarrenal. Se produce a partir del colesterol bajo la acción estimulante de la hormona adrenocorticotrópica (ACTH) mediante una serie de pasos catalizados por enzimas. En la circulación sanguínea se encuentra mayormente enlazado a la globulina transportadora de corticosteroides (CBG) y en menor medida a la albúmina. El Cortisol ejerce efectos en numerosos sistemas fisiológicos: regula el metabolismo de carbohidratos, proteínas, grasas y purina, el balance de agua y electrolitos, el tono vascular y la respuesta inflamatoria. La secreción de Cortisol sigue un ciclo circadiano, con niveles máximos por la mañana y mínimos por la noche.

La determinación del Cortisol se utiliza para evaluar los defectos funcionales del sistema hipotálamo-hipófisis-suprarrenal. Se observan concentraciones elevadas en el síndrome de Cushing, en tumores suprarrenales así como en pacientes bajo estrés físico o psicológico. La disminución de los niveles de Cortisol es característica de la insuficiencia suprarrenal primaria y secundaria.

Principio del ensayo

Este ensayo está basado en una reacción competitiva entre el Cortisol no marcado, presente en las muestras y calibradores, con una cantidad fija de Cortisol marcado con ^{125}I por un número limitado de sitios de unión al anticuerpo anti-Cortisol. La cantidad de Cortisol marcado con ^{125}I que se une al anticuerpo es inversamente proporcional a la concentración de Cortisol no marcado presente en las muestras.

El inmuno-complejo se inmoviliza en la superficie reactiva de los tubos de ensayo durante un período de incubación de 2 horas bajo agitación constante. Después de la incubación se decantan los tubos y se mide la radiactividad enlazada en un contador gamma. La concentración del antígeno es inversamente proporcional a la radiactividad medida en los tubos. Utilizando los calibradores de concentración conocida de Cortisol, se prepara una curva estándar a partir de la cual se determina por interpolación la concentración de Cortisol presente en las muestras.

Contenido del juego

1. TRAZADOR, 1 frasco con 55 mL, listo para usar, contiene < 260 kBq de Cortisol marcado con ^{125}I en solución tampón con 0,1 % NaN_3 y colorante rojo.
2. ANTISUERO, 1 frasco con 55 mL listo para usar, contiene anti-Cortisol policlonal en

solución tampón con colorante azul y 0,1 % NaN_3 .

3. CALIBRADORES (S1-S6), 6 frascos listos para usar con 0,5 mL de suero humano y 0,1% NaN_3 . Los calibradores contienen: 0, 40, 100, 250, 650, 1600 nmol/L de Cortisol, respectivamente.

4. SUERO CONTROL, 1 frasco, contiene 0,5 mL de suero humano liofilizado con 0,1% NaN_3 . La concentración del suero control está especificada en el certificado de calidad incluido.

5. TUBOS RECUBIERTOS: 2x50 tubos de 12x75 mm, empaquetados en cajas plásticas, listos para usar.

Materiales y equipos necesarios

Gradilla para tubos de ensayo, pipetas de precisión con puntas desechables (10 y 500 μL), agitador horizontal u orbital, lámina de polietileno, papel absorbente, contador gamma
Materiales y equipos recomendados:
 Pipeta de repetición (500 μL)

Recolección y almacenamiento de las muestras

Las muestras de suero deben colectarse de acuerdo a los procedimientos habituales que se practican en los laboratorios clínicos. Las muestras pueden conservarse entre 2 y 8 °C si el análisis se efectuará dentro de las 24 horas siguientes a su recolección, de lo contrario deben conservarse congeladas a una temperatura igual o menor que -20 °C hasta 4 meses. Las muestras congeladas deben descongelarse y mezclarse completamente antes de su uso. Evitar la congelación y descongelación repetida de las muestras.

Preparación y conservación de los reactivos

Conservar los reactivos entre 2 y 8 °C después de abiertos. A esta temperatura cada componente es estable hasta la fecha de vencimiento del juego. La fecha de caducidad exacta se especifica en la etiqueta del estuche y en el certificado de calidad.

El suero control se reconstituye con 500 μl de agua destilada. Para ello se debe mezclar suavemente evitando la formación de espuma. Permitir que la solución alcance la temperatura ambiente (20 a 30 °C) antes de su uso. Para usos posteriores, conservar entre 2 y 8 °C hasta la fecha de vencimiento.

PRECAUCIÓN!

Permitir que todos los reactivos y muestras alcancen la temperatura ambiente (mín. 1 hora). Homogenizar completamente los reactivos y muestras antes de su uso, evitando la formación de espuma.

Procedimiento para el ensayo

(Ver Tabla 1.)

1. Rotular los tubos recubiertos por duplicado para cada calibrador (S1-S6), suero control (C) y muestras (M). Opcionalmente, marcar dos tubos no recubiertos para los totales (T).

2. Añadir por duplicado 10 μL de calibrador, suero control y muestras en los tubos apropiados.
3. Añadir 500 μL de trazador en cada tubo.
4. Añadir 500 μL de antisuero en todos los tubos excepto T.
5. Fijar la gradilla con los tubos de ensayo firmemente en el agitador horizontal. Cubrir los tubos con una lámina de polietileno. Encender el agitador y ajustar la velocidad de manera tal que el líquido en los tubos esté rotando o agitándose constantemente.
6. Incubar los tubos en el agitador durante 2 horas a temperatura ambiente.
7. Aspirar o decantar el líquido de todos los tubos (excepto T) mediante la inversión de la gradilla. Colocar la gradilla sobre un papel absorbente por 2 minutos manteniendo la posición invertida.
8. Medir la radiactividad de cada tubo por 60 segundos en un contador gamma.
9. Calcular la concentración de Cortisol en las muestras como se describe a continuación.

Tabla 1. Protocolo del ensayo (volúmenes en microlitros)

	T	S1-S6	C	Mx
Calibrador		10		
Control			10	
Muestras				10
Trazador	500	500	500	500
Antisuero		500	500	500
Agitar 2 horas a temperatura ambiente				
Decantar y secar en papel absorbente				
Medir la radiactividad (60 s/tubo)				
Calcular los resultados				

Cálculo de los resultados

En la Tabla 2 y la figura 1 se muestran a manera de ejemplo los cálculos y una curva estándar típica de un ensayo.

Para los cálculos:

Hallar la media de los conteos por minuto (cpm) para cada par de tubos.

Calcular el porcentaje $B_0/T\%$ para el calibrador de concentración cero (S_1) según la ecuación siguiente:

$$B_0/T\% = \frac{S_1 \text{ (cpm)}}{T \text{ (cpm)}} \times 100$$

$B_0/T\%$ es un parámetro opcional del control de calidad, no necesario para la determinación de la concentración de las muestras.

Calcular el porcentaje de unión para cada calibrador, control y muestra, utilizando la siguiente ecuación:

$$B/B_0(\%) = \frac{S_{2-6} / C / M_x \text{ (cpm)}}{S_1 \text{ (cpm)}} \times 100$$

Plotear los porcentajes B/B_0 (%) contra la concentración de Cortisol de cada calibrador en un papel semi-logarítmico. Determinar la concentración de Cortisol en las muestras por interpolación de la curva estándar. No extrapolar valores fuera del rango de la curva. Para el procesamiento automatizado de los datos pueden utilizarse programas de ajuste tipo spline o logit-log.

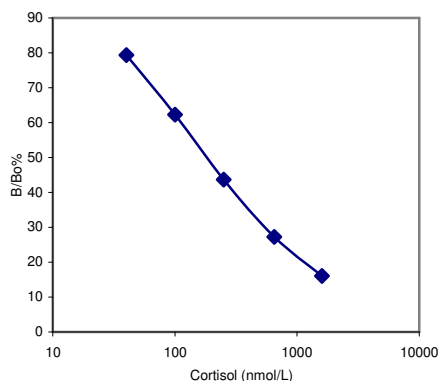
Tabla 2. Datos típicos del ensayo

Tubos	CPM1	CPM2	Media CPM	B/T %	B/Bo %
T	90172	89562	89867		
S1	51816	51699	51758	57,6	100
S2	41325	40790	41058	45,7	79,3
S3	32114	32332	32223	35,9	62,3
S4	23112	22076	22594	25,1	43,7
S5	14264	13917	14091	15,7	27,2
S6	8272	8347	8309,5	9,2	16,1
C	19600	18893	19247	21,4	37,2

Figura 1.

Ejemplo de curva estándar

(No utilizar para calcular valores de las muestras!)



Características del ensayo

Parámetros típicos

B₀/T = 75% - 85%

ED-50 = 125 - 187 nmol/L

Especificidad

Se adicionaron diferentes esteroides al calibrador de concentración cero y se determinó la concentración aparente de Cortisol.

Concentración añadida	70 nM	700 nM
	Concentración aparente de Cortisol (nM)	
Corticosterona	6	30
17- α -hidroxi-progesterona	<DL	13
Cortisona	<DL	6
11-deoxicortisol	10	56
Deoxi-corticosterona	<DL	12
Prednisolona	64	428
Dexametasona	<DL	15

Los esteroides siguientes no son detectables en el ensayo hasta una concentración de 700 nM: 17 β -estradiol, progesterona, 5-alfa dihidrotestosterona, 5- β -dihidro-19-nortestosterona, testosterona, androstendión, androstendiol, 17- α -metil-testosterona, androstandioli, aldosterona, pregnenolona, 19-nor-testosterona, dehidroepiandrosterona, estriol, estrona.

Sensibilidad

La sensibilidad analítica es de 2,9 nmol/L. Este valor corresponde a la suma de la media y dos desviaciones estándar de 10 réplicas del calibrador de concentración cero (S1).

Precisión

La precisión intra-ensayo se determinó a partir de 10 réplicas de 7 muestras, medidas en una serie. Para determinar la precisión inter-ensayo se midieron por duplicado 7 muestras, en 7 series independientes. Los valores obtenidos se muestran a continuación.

Intra-ensayo		Inter-ensayo	
Media nmol/L	CV%	Media nmol/L	CV%
45,7	1,65	46,5	6,25
86,0	3,15	84,6	3,70
223,9	3,33	237,7	6,81
339,6	1,77	398,3	3,16
427,1	2,87	439,6	2,47
792,6	4,56	766,5	4,51
1113,9	4,70	1142,8	5,62

Prueba de Recuperación

La recuperación se determinó como la diferencia porcentual entre el incremento observado y el incremento esperado, luego de añadir concentraciones conocidas de Cortisol a 16 muestras de suero con concentraciones endógenas diferentes. La recuperación obtenida fue de 92 % \pm 7 % (media \pm SD).

Prueba de dilución (linealidad)

Se diluyeron serialmente 5 muestras con el estándar de concentración cero y se sometieron a ensayo. Se obtuvo la siguiente relación lineal entre los valores medidos (Y) y los valores esperados (X):

$$Y = 1.0569X + 0.4353, R = 0.9939 (n = 20)$$

Valores de referencia

Se recomienda que cada laboratorio establezca sus propios intervalos de referencia.

Los valores presentados a continuación fueron determinados por duplicado en donantes de sangre aparentemente saludables (90 hombres y 90 mujeres). Las muestras de sangre fueron tomadas durante la mañana (8-11 am).

Media \pm SD = 353 \pm 139 nmol/L

Mín - Max = 127 - 859 nmol/L

El rango normal de Cortisol basado en el intervalo del 95% de la distribución es:

147 - 726 nmol/L

Conversión de las unidades de medida

1 nmol/L = 0,362 ng/mL

Limitaciones del procedimiento

- Los reactivos provistos en este juego están optimizados para la medición de Cortisol en suero.
- Las muestras hemolizadas, turbias o lipémicas pueden dar resultados falsos, evite su uso.
- Los resultados solo deben ser interpretados dentro del contexto clínico apropiado y nunca como prueba única e infalible de anomalía o enfermedad

Notas acerca del procedimiento

1) **Fuente de error!** Los tubos recubiertos no están marcados individualmente. Se debe evitar la mezcla con tubos de ensayo comunes. Para minimizar este riesgo, no se deben sacar de la caja más tubos de los necesarios, de igual manera los tubos no utilizados en una serie deben ser guardados de nuevo en su caja. Se

recomienda rotular los tubos con marcador permanente.

2) **Fuente de error!** Para asegurar la agitación eficiente de los tubos se debe utilizar una gradilla que los ajuste firmemente. Una agitación inadecuada puede provocar un rendimiento deficiente del ensayo y falsos resultados.

Atención! No mezclar los componentes de lotes diferentes o con productos de otro fabricante!

Precauciones

Material radiactivo

Este producto contiene material radiactivo. Es responsabilidad de cada laboratorio cumplir con las regulaciones locales referentes a la manipulación, conservación y desecho de materiales radiactivos.

Material potencialmente infeccioso

El suero humano utilizado en este producto ha sido analizado con métodos aprobados y no ha presentado positividad para anticuerpos frente a los virus de Inmunodeficiencia Humana (Anti-HIV-1/2) y Hepatitis-C (HCV), anticuerpos anti-Treponema y el antígeno de superficie de la Hepatitis-B (HBsAg). Ninguno de los métodos analíticos disponibles actualmente puede garantizar por completo la eliminación de posibles riesgos biológicos. Se deben manipular todos los reactivos y muestras de sangre como *material potencialmente infeccioso*.

Peligro químico

Algunos componentes de este juego contienen azida sódica como preservante. Al verter los desechos no radiactivos al sistema de desagüe se debe diluir con grandes cantidades de agua, para evitar la acumulación de azidas metálicas explosivas en las tuberías de plomo y cobre. Este producto contiene en total 114 mg de azida sódica.



Fecha de vencimiento



Número de lote



Almacenar entre 2 y 8 °C



Suero Control



Precaución



Calibrador



Peligro biológico



Tubos recubiertos



Consulte las instrucciones



Trazador



Dispositivo para diagnóstico *in vitro*



Antisuero



Fabricante



Material radiactivo

REF

Número de referencia



Sitio WEB: <http://www.izotop.hu>

E-mail técnico: immuno@izotop.hu

E-mail comercial: commerce@izotop.hu

IZOTOP

INSTITUTE OF ISOTOPES Ltd.

1535 Budapest. Pf.: 851.

Tel.: +36 1 392-2577, Fax: +36 1 395-9247