



CORTISOLO E CORTISONE SALIVARI IN LC-MS/MS

REF LC91110

Questo prodotto adempie a tutte le esigenze della Direttiva 98/79/CE sui dispositivi medico-diagnostici in vitro (IVD). La dichiarazione di conformità CE è disponibile su richiesta.



ISTRUZIONI PER L'USO

IVD

Per uso diagnostico *in vitro*

CE



EUREKA S.R.L. LAB DIVISION
Via M. D'Antona 28
60033 Chiaravalle (AN) - Italy
Tel +39 071 7450790
eureka-support@sentinel.it
www.eurekakit.com

INDICE

DESTINAZIONE D'USO	3
CONTENUTO DEL KIT PER 100 TEST	3
ACCESSORI E CONSUMABILI FORNIBILI A PARTE	4
STRUMENTAZIONE	4
MATRICE - PROCEDURA DI RACCOLTA E DI CONSERVAZIONE	5
VALORI DI RIFERIMENTO	5
PROCEDURA ANALITICA	6
GRADIENTE	7
PARAMETRI	7
FRAMMENTAZIONE DEGLI ANALITI E DEGLI STANDARD INTERNI (SI) DEUTERATI	7
CARATTERISTICHE TECNICHE - PARTE I	8
CARATTERISTICHE TECNICHE - PARTE II	9
CARATTERISTICHE TECNICHE - PARTE III	9
CROMATOGRAMMI DI RIFERIMENTO	10
AVVERTENZE GENERALI	12
ABBREVIAZIONI	13
BIBLIOGRAFIA	14
NORME DI RIFERIMENTO	15
SIMBOLI IVD	16

DESTINAZIONE D'USO

Dispositivo Medico diagnostico in vitro per la rilevazione e l'analisi quantitativa di Cortisolo e Cortisone su saliva come monitoraggio di stress psicofisico e come ausilio alla diagnosi della malattia di Cushing. Metodo manuale per uso professionale.

CONTENUTO DEL KIT PER 100 TEST

CONTENUTO	DESCRIZIONE	CONFEZIONAMENTO	AVVERTENZE
Reagente A	Soluzione Standard Interni	1 x 1 ml	Stoccare a  -15 °C -25 °C
Reagente B	Soluzione Chiarificante	1 x 2 ml	Stoccare a  +8 °C +2 °C
Reagente C	Soluzione Stabilizzante	1 x 10 ml	Stoccare a  +8 °C +2 °C
Calibratore salivare multiparametrico		7 x 1 x 3 ml	(confezionato separatamente – Codice LC91116 - vedi scheda tecnica)
Reagente M1	Fase Mobile M1	2 x 500 ml	Stoccare a  +8 °C +2 °C
Reagente M2	Fase Mobile M2	2 x 500 ml	Stoccare a  +8 °C +2 °C

ACCESSORI E CONSUMABILI FORNIBILI A PARTE

CODICE	DESCRIZIONE	CONFEZIONAMENTO
LC91116	Calibratore per Cortisolo e Cortisone salivari	7 x 2 x 3 ml
LC91119	Controlli per Cortisolo e Cortisone salivari – Livelli 1, 2 e 3	3 x 5 x 3 ml
SK91110	Starter kit per Cortisolo e Cortisone salivari	3 x 1 ml
LC91111	Fase mobile M1	4 x 500 ml
LC91121	Fase mobile M2	4 x 500 ml
LC91130	Soluzione Standard Interno deuterato in saliva	1 x 1 ml
L-30-210	Provette di tipo Eppendorf da 1,5 ml con tappo	1 x 1000 Pz
Z699675902	Colonna Analitica Poroshell 120-EC C18 (50 x 2,1 mm - 1,9 µm)	1 Pz
Z51843550	Vial di vetro a volume ridotto da 15 µl 1,5 ml	1 x 100 Pz
Z51820717	Tappi per vial di vetro a volume ridotto da 15 µl 1,5 ml	1 x 100 Pz

STRUMENTAZIONE

DESCRIZIONE	AVVERTENZE
Strumento LC-MS triplo quadrupolo (Modalità MRM) Valvola divert a 6 vie Interfaccia ESI (+) Pompa Binaria	Necessario
Computer gestionale	Necessario
Autocampionatore	Necessario

MATRICE - PROCEDURA DI RACCOLTA E DI CONSERVAZIONE

MATRICE	PROCEDURA
Saliva	Il paziente dovrà essere digiuno e non dovrà svolgere attività sportiva intensa da almeno 2 ore prima del prelievo. 10 minuti prima del prelievo dovrà sciacquare la bocca con acqua fredda, annotare l'ora del prelievo. Il prelievo deve avvenire con dispositivi idonei alla raccolta di campioni salivari quali Salivette Cortisol o similari. Si consiglia di centrifugare immediatamente il dispositivo di raccolta in modo da migliorare la stabilità del campione. I campioni di saliva sono stabili fino a 7 giorni se conservati a $+15^{\circ}\text{C}$  $+25^{\circ}\text{C}$, 3 mesi in frigo e fino ad un anno se conservati a -25°C  -15°C.

VALORI DI RIFERIMENTO

Ormoni	Range di normalità (ng/ml)
Cortisolo	H 7 – 9 a.m.: 1 – 7,5 H 3 – 5 p.m.: < 4,01 H 11 – 12 p.m.: < 1
Cortisone	Mattino: 3,7 – 15,3 Notte: 0,54 – 4,7

PROCEDURA ANALITICA

FASE	DESCRIZIONE																								
1	Preparazione dei campioni: In Eppendorf dispensare in sequenza: <table><tr><td></td><td>Calibratore (µl)</td><td>Campione (µl)</td><td>Controlli (µl)</td></tr><tr><td>Calibratore</td><td>500</td><td></td><td></td></tr><tr><td>Campione</td><td></td><td>500</td><td></td></tr><tr><td>Controlli</td><td></td><td></td><td>500</td></tr><tr><td>Reagente A</td><td>10</td><td>10</td><td>10</td></tr><tr><td>Reagente B</td><td>20</td><td>20</td><td>20</td></tr></table> Vortex per 20 secondi.		Calibratore (µl)	Campione (µl)	Controlli (µl)	Calibratore	500			Campione		500		Controlli			500	Reagente A	10	10	10	Reagente B	20	20	20
	Calibratore (µl)	Campione (µl)	Controlli (µl)																						
Calibratore	500																								
Campione		500																							
Controlli			500																						
Reagente A	10	10	10																						
Reagente B	20	20	20																						
2	Centrifugare a 14.000 rpm per 10 minuti.																								
3	Dispensare in Eppendorf 300 µl di surnatante e aggiungere 100 µl di <u>Reagente C.</u> Vortex per 20 secondi.																								
INIEZIONE	Iniettare 15 µl della soluzione nel Sistema LC.																								

GRADIENTE

TEMPO (min)	% M1 (POMPA A)	% M2 (POMPA B)	FLUSSO (µl/min)
0.0	65	35	400
3.00	45	55	400
4.00	45	55	400
4.01	2	98	400
5.50	2	98	400
5.51	65	35	400
7.50	65	35	400

PARAMETRI

Parametri settati su triplo quadrupolo

	ESI+ (SCIEX 4500)
CURTAIN GAS	25
COLLISION GAS	9
IONSPRAY VOLTAGE	5500 V
TEMPERATURE	600°C
ION SOURCE GAS 1	50
ION SOURCE GAS 1	60

FRAMMENTAZIONE DEGLI ANALITI E DEGLI STANDARD INTERNI (SI) DEUTERATI

ANALITI	RT	FRAMMENTI		SI DEUTERATI USATI PER LA CALIBRAZIONE	RT	FRAMMENTI	
		PARENT ION (Q1)	FRAGMENT ION (Q3)			PARENT ION (Q1)	FRAGMENT ION (Q3)
Cortisolo - 1	2.9	363.1	121.0	Cortisolo-D4	2.9	367.1	121.0
Cortisolo - 2	2.9	363.1	115.1	Cortisolo-D4	2.9	367.1	121.0
Cortisone - 1	2.6	361.2	163.0	Cortisolo-D4	2.9	367.1	121.0
Cortisone - 2	2.6	361.2	121.0	Cortisolo-D4	2.9	367.1	121.0

CARATTERISTICHE TECNICHE - PARTE I

ABBREVIAZIONI	SIGNIFICATO
C LLOQ	Concentrazione al limite minimo di quantificazione
C1	Concentrazione bassa
C2	Concentrazione media
C3	Concentrazione alta
Max C	La più alta concentrazione

ANALITI	CONCENTRAZIONI USATE PER CALCOLARE LA RIPRODUCIBILITÀ E L'ACCURATEZZA (ng/ml)				
	C LLOQ	C1	C2	C3	MAX C
Cortisolo	0,1	1	10	25	50
Cortisone	0,1	1	10	25	50

ANALITI	ACCURATEZZA INTRA SERIE (ERRORE RELATIVO %)		ACCURATEZZA INTER SERIE (ERRORE RELATIVO %)	
	C1 (%)	C3 (%)	C1 (%)	C3 (%)
Cortisolo	3,59	1,03	11,41	2,61
Cortisone	4,94	1,98	6,92	3,82

CARATTERISTICHE TECNICHE - PARTE II

ANALITI	RIPRODUCIBILITÀ INTRA SERIE (COEFFICIENTE DI VARIAZIONE %)			RIPRODUCIBILITÀ INTER SERIE (COEFFICIENTE DI VARIAZIONE %)		
	C LLOQ %	C2 %	Max C %	C LLOQ %	C2 %	Max C %
Cortisolo	5,10	4,76	4,22	10,40	6,44	6,15
Cortisone	3,71	5,51	3,93	8,56	8,87	5,78

CARATTERISTICHE TECNICHE - PARTE III

ANALITI	LLOD (ng/ml)	LINEARITÀ (ng/ml)	COEFFICIENTE DI CORRELAZIONE R2 + DEV STD
Cortisolo	0,03	0,1 – 500	0,9993 ± 0,0003
Cortisone	0,03	0,1 – 500	0,9989 ± 0,0009

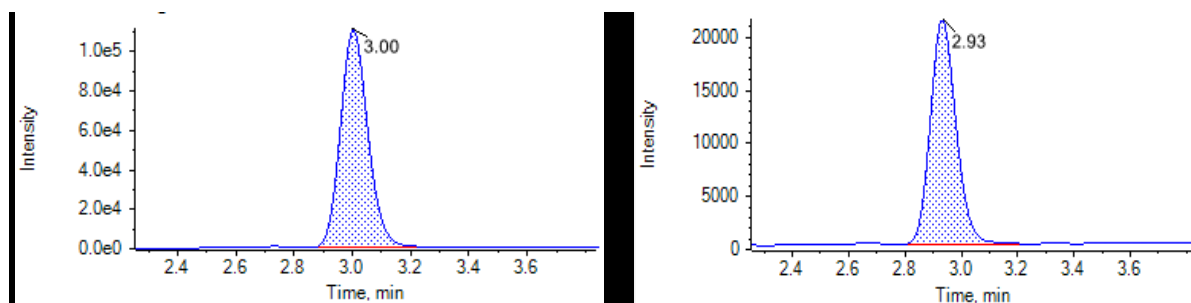
CROMATOGRAMMI DI RIFERIMENTO

Fig. 1 Calibratore Cortisolo 50 ng/ml (pannello a sinistra) e STD interno (pannello a destra)

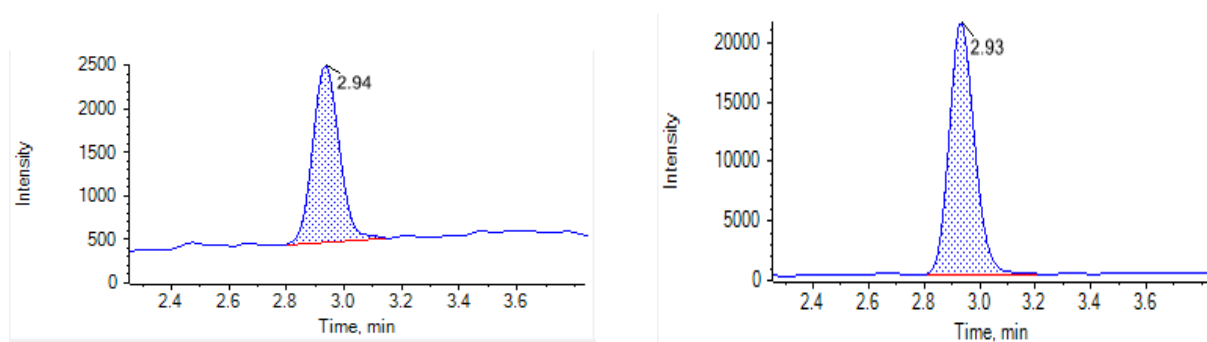


Fig. 2 Livello I Cortisolo 0.5 ng/ml (pannello a sinistra) e STD interno (pannello a destra)

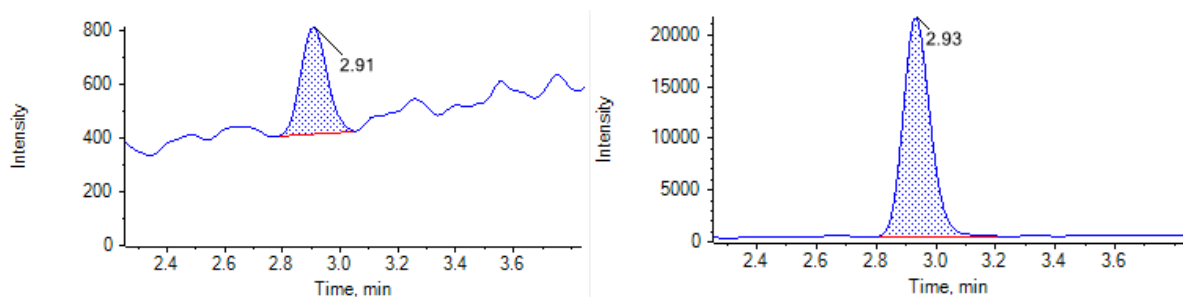


Fig. 3 Campione Salivare Cortisolo 0.2 ng/ml (pannello a sinistra) e STD interno (pannello a destra)

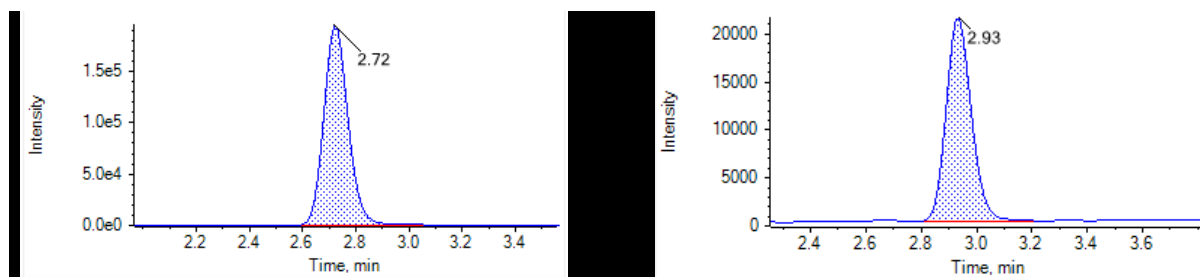


Fig. 4 Calibratore Cortisone 50 ng/ml (pannello a sinistra) e STD interno (pannello a destra)

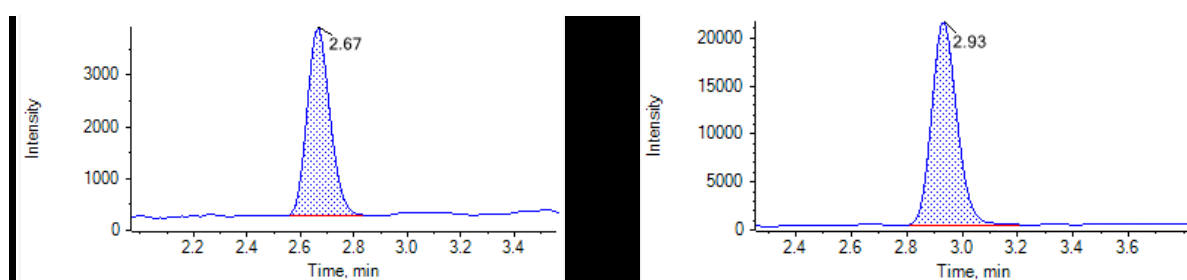


Fig. 5 Livello I Cortisone 0.5 ng/ml (pannello a sinistra) e STD interno (pannello a destra)

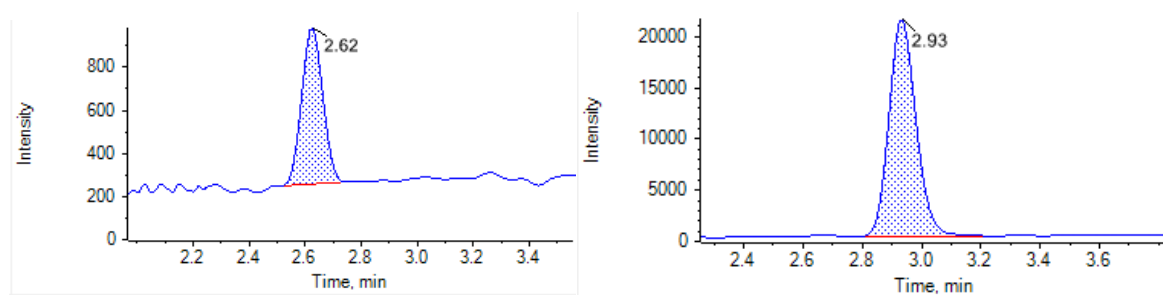


Fig. 6 Campione Salivare Cortisone 0.2ng/ml (pannello a sinistra) e STD interno (pannello a destra)

AVVERTENZE GENERALI

1. STOCCAGGIO E DURATA DI CONSERVAZIONE

Tutti i componenti sono pronti all'uso. Sono stabili per 3 anni a $+2^{\circ}\text{C}$  tranne il Reagente A

(Soluzione Standard interni) che deve essere stoccato a -25°C

Dopo l'apertura la durata dei nostri Standard Interni è di 6 mesi se conservati a -25 °C

2. TRATTAMENTO DELLA NUOVA COLONNA

Installare la nuova colonna analitica Poroshell 120 EC C18 (50 x 2,1 mm - 1,9 µm) termostata a 45°C. Scollegare il rilevatore e fluire una soluzione di Fase Mobile M1: Fase Mobile M2 (20:80 v/v) e impostare il flusso a 400 µl / minuto. Non riciclare le soluzioni di lavaggio.

3. CONDIZIONAMENTO DELLA COLONNA

Condizionare la nuova colonna analitica Poroshell 120 EC C18 (50 x 2,1 mm - 1,9 µm) con Fasi Mobili M1: M2 (20:80 v/v) impostare il flusso a 400 µl / minuto per 10 minuti. Quindi fluxare una soluzione di Fase Mobile M1: Fase Mobile M2 (80:20 v/v) e impostare il flusso a 400 µl / minuto per 5 minuti. Quindi fluxare una soluzione di Fase Mobile M1: Fase Mobile M2 (65:35 v/v) e impostare il flusso a 400 µl / minuto per 10 minuti. Infine, effettuare 3 iniezioni di Fase Mobile prima di lanciare la seduta. Non è possibile effettuare analisi in fase di riciclo. Se la temperatura

ambiente è $>20^{\circ}\text{C}$, conservare la fase mobile $+2^{\circ}\text{C}$ tra una sessione analitica e l'altra.

4. PULIZIA DELLA COLONNA

Scollegare il rilevatore. Flussare una soluzione composta da Fase Mobile M1: Fase Mobile M2 (80:20 v/v) e impostare il flusso a 400 µl / minuto per 5 minuti, scaricandola. Quindi fluxare una soluzione di Fase Mobile M1: Fase Mobile M2 (10:90 v/v) e impostare il flusso a 400 µl / minuto per 15 minuti. La colonna va stoccata in una soluzione di fasi mobili M1: M2 (10:90 v/v).

5. LAVAGGIO SIRINGA AUTOCAMPIONATORE

Lavare la siringa e l'aqo con la Fase Mobile M2.

ABBREVIAZIONI

ABBREVIAZIONI	SIGNIFICATO
Es. 5 x 1 x 1 ml	N° di livelli x N° di vial x volume
Es. confezionamento dello starter kit: 27 x 1 ml	N° di vial x volume Nota: ogni vial contiene una molecola (analita o standard interno deuterato)
SI	Standard Interno
pz	Pezzo/Pezzi
RT	Tempo di Ritenzione
STD DEV	Deviazione Standard

BIBLIOGRAFIA

1. Antonelli G. *et al.* Salivary cortisol and cortisone by LC-MS/MS: Validation, reference intervals and diagnostic accuracy in Cushing's syndrome Clinica Chimica Acta 2015 Volume 451 Parte B
2. Ursula Turpeinen *et al.* Determination of salivary cortisol by liquid chromatography-tandem mass spectrometry Scandinavian Journal of Clinical & Laboratory Investigation Vol. 69, No. 5, September 2009, 592–597
3. José Gilberto Henriques Vieira *et al.* Determination of cortisol and cortisone in human saliva by a liquid chromatography-tandem mass spectrometry method Arq Bras Endocrinol Metab. 2014, 58/8

NORME DI RIFERIMENTO

Sistema di **Garanzia della Qualità** conforme alle normative:

UNI CEI EN ISO 13485:2016,

UNI EN ISO 9001:2015

Ogni modifica apportata al Dispositivo Medico se non autorizzata da Eureka S.r.l. - Lab Division rende la presente dichiarazione non valida.

Si dichiara che i dispositivi in oggetto ottemperano alle seguenti **Norme Tecniche**:

UNI CEI EN ISO 14971:2012

UNI CEI EN ISO 15223-1:2017

UNI EN ISO 18113-2:2012

Si dichiara che il dispositivo in oggetto viene commercializzato in confezione non sterile.

SIMBOLI IVD

NUMERO	SIMBOLO	DESCRIZIONE
1		Fabbricante
2		Numero di catalogo
3		Avvertenze
4		Numero di lotto del prodotto
5		Utilizzare entro
6		Consultare le istruzioni per l'uso
7		Data di fabbricazione
8		Limite di temperatura
9		Per uso diagnostico <i>in vitro</i>
10		Conformità Europea
11		Confezione