



Instructions for Use

Urinary Cortisol ELISA

IVD



REF EIA-2989



96



DRG Instruments GmbH, Germany
Frauenbergstraße. 18, 35039 Marburg
Phone: +49 (0)6421-1700 0, Fax: +49 (0)6421-1700 50
Website: www.drg-diagnostics.de
E-mail: drg@drg-diagnostics.de

Distributed by:



DRG International, Inc., USA
841 Mountain Ave., Springfield, NJ 07081
Phone: (973) 564-7555, Fax: (973) 564-7556
Website: www.drg-international.com
E-mail: corp@drg-international.com

**Please use only the valid version of the Instructions for Use provided with the kit.
Verwenden Sie nur die jeweils gültige, im Testkit enthaltene, Gebrauchsanweisung.
Si prega di usare la versione valida delle istruzioni per l'uso a disposizione con il kit.
Por favor, se usa solo la version valida de la metodico técnico incluido aqui en el kit.
Utilisez seulement la version valide des Instructions d'utilisation fournies avec le kit.**

Table of Contents / Tabella die Contenuti / Tabla de Contenidos

1	INTENDED USE.....	2
2	PRINCIPLE	2
3	REAGENTS, MATERIALS AND INSTRUMENTATION	3
4	WARNINGS	3
5	PRECAUTIONS	4
6	STORAGE AND STABILITY	4
7	PROCEDURE	4
8	QUALITY CONTROL	5
9	RESULTS.....	6
10	REFERENCE VALUES	6
11	PERFORMANCE AND CHARACTERISTICS	6
12	WASTE MANAGEMENT.....	7
13	BIBLIOGRAPHY.....	7
14	TROUBLESHOOTING	8
1	DESTINAZIONE D'USO.....	9
2	PRINCIPIO DEL METODO	9
3	REATTIVI, MATERIALI E STRUMENTAZIONE.....	10
4	AVVERTENZE	10
5	PRECAUZIONI.....	11
6	CONSERVAZIONE E STABILITÀ.....	11
7	PROCEDIMENTO	11
8	CONTROLLO QUALITÀ.....	12
9	RISULTATI.....	13
10	VALORI DI RIFERIMENTO	13
11	PARAMETRI CARATTERISTICI.....	13
12	DISPOSIZIONI PER LO SMALTIMENTO	14
13	BIBLIOGRAFIA	14
14	SUGGERIMENTI PER LA RISOLUZIONE DEI PROBLEMI	15
1	USO PREVISTO	16
2	PRINCIPIO DEL MÉTODO	16
3	REACTIVOS, MATERIAL E INSTRUMENTOS	17
4	ADVERTENCIAS	17
5	PRECAUCIONES.....	18
6	CONSERVACIÓN Y ESTABILIDAD.....	18
7	PROCEDIMIENTO	18
8	CONTROL DE CALIDAD	19
9	RESULTADOS	20
10	VALORES DE REFERENCIA	20
11	CARACTERÍSTICAS DEL ENSAYO	20
12	GESTIÓN DE LOS RESIDUOS	21
13	BIBLIOGRAFÍA	21
14	SUGERENCIAS PARA LA SOLUCIÓN DE PROBLEMAS	22
	SYMBOLS USED.....	23

1 INTENDED USE

Competitive immunoenzymatic colorimetric method for quantitative determination of free Cortisol concentration in urine. Urinary Cortisol ELISA kit is intended for laboratory use only.

1.1 Clinical Significance

Cortisol is a steroid hormone released from the adrenal cortex in response to an hormone called ACTH (produced by the pituitary gland), it is involved in the response to stress; it increases blood pressure, blood sugar levels, may cause infertility in women, and suppresses the immune system.

Cortisol acts through specific intracellular receptors and has effects in numerous physiologic systems, including immune function, glucose-counter regulation, vascular tone, substrate utilization and bone metabolism. Cortisol is excreted primarily in urine in an unbound (free) form.

Cortisol is bound, in plasma, from corticosteroid-binding globulin (CBG, transcortin), with high affinity, and from albumin. Only free cortisol is available to most receptors.

These normal endogenous functions are the basis for the physiological consequences of chronic stress - prolonged cortisol secretion causes muscle wastage, hyperglycaemia, and suppresses immune / inflammatory responses. The same consequences arise from long-term use of glucocorticoid drugs.

The free cortisol fraction represents the metabolically active cortisol. In normal conditions, less than 1% is excreted in urines. In pathological conditions (syndrome of Cushing) the levels of free urinary cortisol are elevated, because the CBG don't bound the plasmatic cortisol in excess and it is removed with urines.

During pregnancy or estrogen-progestogen treatment an increase of plasmatic cortisol caused by an increment of the production of the transport protein, but the levels of free urinary cortisol results normal to indicate a correct surrenic functionality.

This test is very useful to estimate the real surrenic function, because is dose the free cortisol, it is the metabolically active form. Moreover the measurement of free urinary cortisol is the better parameter for the diagnosis of the Cushing's syndrome.

2 PRINCIPLE

The Cortisol (antigen) in the sample competes with the antigenic Cortisol conjugated with horseradish peroxidase (HRP) for binding to the limited number of antibodies anti Cortisol coated on the microplate (solid phase).

After incubation, the bound/free separation is performed by a simple solid-phase washing.

Then, the enzyme HRP in the bound-fraction reacts with the Substrate (H_2O_2) and the TMB Substrate and develops a blue colour that changes into yellow when the Stop Solution (H_2SO_4) is added.

The colour intensity is inversely proportional to the Cortisol concentration of in the sample.

Cortisol concentration in the sample is calculated through a calibration curve.

3 REAGENTS, MATERIALS AND INSTRUMENTATION

3.1 Reagents and materials supplied in the kit

1. **Zero Standard (S0)**, 4.0 mL
2. **Standards (S1 – S4)**, 4 vials, 1.0 mL each
3. **Control Low**, 1 vial, 1.0 mL
Ready to use
4. **Control High**, 1 vial, 1.0 mL
Ready to use
5. **Enzyme Conjugate**, 1 vial, 33 mL
Cortisol conjugated with horseradish peroxidase (HRP)
6. **Microtiterwells**, 1 breakable microplate
Anti-Cortisol antibody adsorbed on the microplate
7. **Substrate Solution**, 1 vial, 15 mL
H₂O₂.TMB, 0.26 g/L (avoid any skin contact)
8. **Stop Solution**, 1 vial, 15 mL
Sulphuric acid, 0.15 mol/L (avoid any skin contact)
9. **Wash Solution 10X Conc.**, 1 vial, 50 mL
Phosphate buffer 0.2 M, Proclin < 0,0015%

3.2 Reagents necessary not supplied

Distilled water

3.3 Auxiliary materials and instrumentation

Automatic dispenser

Microplate reader (450 nm, 620-630 nm)

Note

Store all reagents at 2 °C - 8 °C in the dark.

Open the bag of reagent 6 (Coated Microplate) only when it is at room temperature and close immediately after use.

Once opened, the microplate is stable until expiry date of the kit.

4 WARNINGS

- This kit is intended for in vitro use by professional persons only. Not for internal or external use in Humans or Animals.
- Use appropriate personal protective equipment while working with the reagents provided.
- Follow Good Laboratory Practice (GLP) for handling blood products.
- Material of animal origin used in the preparation of the kit has been obtained from animals certified as healthy and the bovine protein has been obtained from countries not infected by BSE, but these materials should be handled as potentially infectious
- Some reagents contain small amounts of Proclin 300 as preservative. Avoid the contact with skin or mucosa.
- The TMB Substrate contains an irritant, which may be harmful if inhaled, ingested or absorbed through the skin. To prevent injury, avoid inhalation, ingestion or contact with skin and eyes.
- The Stop Solution consists of a diluted sulphuric acid solution. Sulphuric acid is poisonous and corrosive and can be toxic if ingested. To prevent chemical burns, avoid contact with skin and eyes.
- Avoid the exposure of reagent TMB/H₂O₂ to directed sunlight, metals or oxidants. Do not freeze the solution.
- This method allows the determination of Cortisol from 0.47 ng/mL (LOD) to 200 ng/mL.
- The clinical significance of the Cortisol determination can be invalidated if the patient was treated with corticosteroids or natural or synthetic steroids.

5 PRECAUTIONS

- Please adhere strictly to the sequence of pipetting steps provided in this protocol.
The performance data represented here were obtained using specific reagents listed in this Instruction for Use.
- All reagents should be stored refrigerated at 2 °C - 8 °C in their original container. Any exceptions are clearly indicated. The reagents are stable until the expiry date when stored and handled as indicated.
- Allow all kit components and specimens to reach room temperature (22 °C - 28 °C) and mix well prior to use.
- Do not interchange kit components from different lots. The expiry date printed on box and vials labels must be observed. Do not use any kit component beyond their expiry date.
- If you use automated equipment, the user has the responsibility to make sure that the kit has been appropriately tested.
- The incomplete or inaccurate liquid removal from the wells could influence the assay precision and/or increase the background.
To improve the performance of the kit on automatic systems it is recommended to increase the number of washes.
- It is important that the time of reaction in each well is held constant for reproducible results. Pipetting of samples should not extend beyond ten minutes to avoid assay drift. If more than 10 minutes are needed, follow the same order of dispensation. If more than one plate is used, it is recommended to repeat the dose response curve in each plate
- Addition of the TMB Substrate solution initiates a kinetic reaction, which is terminated by the addition of the Stop Solution. Therefore, the TMB Substrate and the Stop Solution should be added in the same sequence to eliminate any time deviation during the reaction.
- Observe the guidelines for performing quality control in medical laboratories by assaying controls samples.
- Maximum precision is required for reconstitution and dispensation of reagents.
- Plate readers measure vertically. Do not touch the bottom of the wells.

6 STORAGE AND STABILITY

Store the kit at 2 °C - 8 °C; the kit is stable until the expiry date claimed on the kit label and in the Certificate of Analysis. Do not use the kit or its components after the expiry date.

7 PROCEDURE

7.1 Preparation of the Standards and Controls

Before use, leave 5 minutes on a rotating mixer.

The standards are ready to use and have the following concentration of Cortisol:

	S0	S1	S2	S3	S4
ng/mL	0	1	5	30	200

The Controls are ready to use.

Once opened the standards and controls are stable 6 months at 2 °C - 8 °C.

7.2 Preparation of Conjugate

The Conjugate is ready to use.

Once opened, it stable 6 months at 2 °C - 8 °C.

7.3 Preparation of the Sample

The determination of Cortisol with this kit should be performed in urine samples.

Important note: The kit has been designed to be used on untreated urine samples; acidification treatments of the urine that lead the pH to values below 5.0 could interfere with the assay and produce aberrant results.

It is not necessary to dilute the sample.

The total volume of urine excreted during 24 hours should be collected and mixed in a single container.

Urine samples which are not to be assayed immediately should be stored at 2 °C - 8 °C or at -20 °C for longer periods (maximum 6 months).

Samples with concentration greater than 200 ng/mL have not to be diluted; such samples have to be reported as "> 200 ng/mL".

7.4 Preparation of Wash Solution

Dilute the content of each vial of the "Wash Solution" 10X concentrate with distilled water to a final volume of 500 mL prior to use.

For smaller volumes respect the 1:10 dilution ratio.

The diluted wash solution is stable for 30 days at 2 °C - 8 °C.

In concentrated wash solution is possible to observe the presence of crystals; in this case mix at room temperature until the complete dissolution of crystals; for greater accuracy, dilute the whole bottle of concentrated wash solution to 500 mL, taking care to transfer completely the crystals, then mix until crystals are completely dissolved.

7.5 Procedure

Allow all reagents to reach room temperature (22 °C - 28 °C) for at least 30 minutes.

Unused coated microwell strips should be released securely in the foil pouch containing desiccant and stored at 2 °C - 8 °C.

To avoid potential microbial and/or chemical contamination, unused reagents should never be transferred into the original vials.

As it is necessary to perform the determination in duplicate in order to improve accuracy of the test results, prepare two wells for each point of the calibration curve (S0-S4), two for each Control, two for each sample, one for Blank.

Reagent	Standards	Samples/Controls	Blank
Standard S0-S4	10 µL		
Samples/Controls		10 µL	
Conjugate	300 µL	300 µL	
Incubate at 37 °C for 1 hour. Remove the contents from each well; wash the wells 3 times with 350 µL of diluted wash solution. Important note: during each washing step, gently shake the plate for 5 seconds and remove excess solution by tapping the inverted plate on an absorbent paper towel. <u>Automatic washer:</u> in case you use an automatic washer, it is advised to do 6 washing steps.			
Substrate Solution	100 µL	100 µL	100 µL
Incubate at room temperature (22 °C - 28 °C) for 15 minutes in the dark			
Stop Solution	100 µL	100 µL	100 µL
Shake the microplate gently. Read the absorbance (E) at 450 nm against a reference wavelength of 620-630 nm or against Blank within 5 minutes.			

8 QUALITY CONTROL

Each laboratory should assay controls at normal, high and low levels range of Urinary Cortisol for monitoring assay performance. These controls should be treated as unknowns and values determined in every test procedure performed. Quality control charts should be maintained to follow the performance of the supplied reagents. Pertinent statistical methods should be employed to ascertain trends. The individual laboratory should set acceptable assay performance limits. Other parameters that should be monitored include the 80, 50 and 20% intercepts of the standard curve for run-to-run reproducibility. In addition, maximum absorbance should be consistent with past experience. Significant deviation from established performance can indicate unnoticed change in experimental conditions or degradation of kit reagents. Fresh reagents should be used to determine the reason for the variations.

9 RESULTS

9.1 Mean Absorbance

Calculate the mean of the absorbance (Em) for each point of the standard curve and of each sample

9.2 Standard Curve

Plot the values of absorbance (Em) of the standards (S0-S4) against concentration. Draw the best-fit curve through the plotted points (e.g.: Four Parameter Logistic).

9.3 Calculation of Results

Interpolate the values of the samples on the standard curve to obtain the corresponding values of the concentrations expressed in ng/mL.

To calculate the cortisol concentration in urine, calculate as above and correct for total volume of volume of urine collected in 24 hours:

$$\text{ng/mL} \times \text{Vol (mL) urine 24 h} / 1000 = \mu\text{g Cortisol}/24 \text{ h}$$

10 REFERENCE VALUES

To determine the normal range for urine samples, 128 apparently healthy male and female adults were tested.

Result:

Normal range urine (24 h)
1.5 $\mu\text{g}/24 \text{ h}$ – 63 $\mu\text{g}/24 \text{ h}$

11 PERFORMANCE AND CHARACTERISTICS

11.1 Analytical sensitivity

Analytical sensitivity was investigated through the LOB (white limit), the LOD (detection limit), the LOQ (quantification limit) and the anal sensitivity (A.S.).

The following table shows the criteria of the study and the results obtained.

	Criteria	Results (ng/mL)
LOB	60 replicates of Cal 0, used as "Blank", have been investigated in 5 different sessions over 3 days	0.28
LOD	6 urine samples with low cortisol concentration have been investigate over 10 assays in duplicate, performed in 5 days	0.47
LOQ	6 urine samples with low cortisol concentration have been investigate over 10 assays in duplicate, performed in 5 days	0.56
A.S.	20 replicates of Cal 0 and 5 replicates of Cal 1 have been assayed. A.S. has been calculated by linear regression	0.22

11.2 Precision and reproducibility (complex precision)

Precision and reproducibility have been assessed through 6 different urine samples with different concentration of Cortisol.

The table below shows the Within Run and Total CV%.

Sample	n°	Mean (ng/mL)	Within Run CV%	Total CV%
PS2	20	112.141	6.6%	12%
PS4	20	64.563	8.1%	12%
CT High	20	50.577	7.3%	11%
PS5	20	25.878	7.6%	10%
PS6	20	9.269	7.6%	11%
CT Low	20	3.438	7.0%	9%

11.3 Analytical specificity

11.3.1 Interfering substances

Interference for Albumin, Acetylsalicylic Acid, Ibuprofen and Ascorbic Acid were studied by adding the interfering substance to the urine sample with a low and high Cortisol concentration, and by comparing its concentration to the unspiked sample. The interference has been evaluated as "significant" if it causes a concentration bias > 10% between spiked and unspiked sample.

The following table shows the results obtained:

Substance	Concentration	Interference
Albumin	5 mg/dL	No
Acetylsalicylic acid	3.62 mmol/L	No
Ibuprofen	2.42 mmol/L	No
Ascorbic Acid	5 mg/L	No

Conclusion: no interference has been found for Albumin, Acetylsalicylic Acid, Ibuprofen and Ascorbic Acid.

11.3.2 Cross-reactivity

The cross-reaction of the antibody calculated at 50% according to Abraham is shown in the table:

Reagent	Cross-reactivity
Cortisol	100 %
Prednisolone	46.2 %
11-Deoxycortisol	4 %
Cortisone	3.69 %
Prednisone	3.10 %
11 α OH Progesterone	1 %
Progesterone	< 0.1 %
Aldosterone	< 0.1 %
Pregnenolone	< 0.1 %
17 β Estradiol	< 0.1 %
Estrone 3-solfato	< 0.1 %
Estriol	< 0.1 %

Reagent	Cross-reactivity
Testosterone	< 0.1 %
Spirolactone	< 0.1 %
DHEA	< 0.1 %
DHEA-S	< 0.1 %
Androstenedione	< 0.1 %
Androsterone	< 0.1 %
DHT	< 0.1 %
Danazol	< 0.1 %
Cholesterol	< 0.1 %
Dexamethasone	< 0.1 %

11.4 Correlation

137 urine samples were tested with the Urinary Cortisol ELISA kit (EIA-2989) and with a LC-MS method (reference)

The linear regression curve is:

$$y = 1,008x - 0.5019$$

$$r^2 = 0.83$$

12 WASTE MANAGEMENT

Reagents must be disposed off in accordance with local regulations.

13 BIBLIOGRAPHY

1. Foster, L. B. and Dunn, R. T. Clin. Chem. 20/3 365(1974)
2. De Lacerda, et al J. Clin. Endocr. and Metab. 36,227 (1973)
3. Roller, E., et al Clin. Chim. Acta 66 319 (1976)
4. Kobayashi, Y., et al Steroids, 32 no 1(1978)
5. Akarawa, et al Anal. Biochem. 97 248 (1979)

14 TROUBLESHOOTING

ERRORS / POSSIBLE CAUSES / SUGGESTIONS

No colorimetric reaction

- no conjugate pipetted
- contamination of conjugates and/or of substrate
- errors in performing the assay procedure (e.g. accidental pipetting of reagents in a wrong sequence or from the wrong vial, etc.)

Too low reaction (too low ODs)

- incorrect conjugate (e.g. not from original kit)
- incubation time too short, incubation temperature too low

Too high reaction (too high ODs)

- incorrect conjugate (e.g. not from original kit)
- incubation time too long, incubation temperature too high
- water quality for wash buffer insufficient (low grade of deionization)
- insufficient washing (conjugates not properly removed)

Unexplainable outliers

- contamination of pipettes, tips or containers
- insufficient washing (conjugates not properly removed)

too high within-run CV%

- reagents and/or strips not pre-warmed to room temperature prior to use
- plate washer is not washing correctly (suggestion: clean washer head)

too high between-run CV %

- incubation conditions not constant (time, temperature)
- controls and samples not dispensed at the same time (with the same intervals) (check pipetting order)
- person-related variation

1 DESTINAZIONE D'USO

Metodo competitivo immunoenzimatico colorimetrico per la determinazione quantitativa della concentrazione del Cortisolo libero nelle urine.

Il kit Urinary Cortisol ELISA è destinato al solo uso di laboratorio.

1.1 SIGNIFICATO CLINICO

Il cortisolo è un ormone steroideo liberato dalla corteccia surrenale in risposta all'ormone ACTH (prodotto dalla ghiandola pituitaria), esso è coinvolto nella risposta allo stress; aumenta la pressione sanguigna, glicemia, può causare la sterilità in donne e sopprime il sistema immunitario.

Il cortisolo agisce tramite i recettori intracellulari specifici ed ha effetti in numerosi sistemi fisiologici, compreso il sistema immunitario, la regolazione del glucosio, il tono vascolare, l'utilizzazione del substrato ed il metabolismo osseo. Il cortisolo è escreto soprattutto nelle urine in forma (libera) non legata. Il cortisolo è legato, nel plasma, dalla globulina legante i corticosteroidi (CBG, transcortin), con alta affinità e dall'albumina. Soltanto il cortisolo libero è disponibile ai recettori. Le funzioni endogene normali sono la base per le conseguenze fisiologiche dello stress cronico - la secrezione prolungata del cortisolo causa lo sforzo del muscolo, iperglicemia e sopprime le risposte immuni/infiammatorie. Le stesse conseguenze risultano dall'uso prolungato di farmaci a base di glucocorticoidi.

Il cortisolo libero rappresenta la frazione di cortisolo metabolicamente attiva.

In condizioni normali, meno dell' 1 % viene escreto come tale nelle urine. In condizioni patologiche (sindrome di Cushing) i livelli di cortisolo libero urinario sono molto elevati perché il cortisolo plasmatico in eccesso non si lega alla CBG e viene eliminato con le urine.

Durante la gravidanza o il trattamento con estro-progestinici si ha un aumento del cortisolo plasmatico dovuto ad un incremento della sintesi della proteina di trasporto, ma i livelli di cortisolo libero urinario risultano normali, ad indicare una corretta funzionalità surrenica.

Tale dosaggio risulta molto utile per valutare la reale funzione surrenica dal momento che viene dosata la quota libera e quindi metabolicamente attiva. Inoltre la valutazione del cortisolo urinario libero è il miglior parametro per la diagnosi della sindrome di Cushing.

2 PRINCIPIO DEL METODO

Il Cortisolo (antigene) presente nel campione, compete con l'antigene marcato con perossidasi di rafano (HRP) nei confronti dell'anticorpo anti Cortisolo adsorbito su micropiastra (fase solida).

Dopo l'incubazione, la separazione libero-legato si ottiene mediante semplice lavaggio della fase solida.

Infine l'enzima presente nella frazione legata, reagendo con il Substrato (H_2O_2) ed il TMB Substrate, sviluppa una colorazione blu che vira al giallo dopo aggiunta dello Stop solution (H_2SO_4).

L'intensità del colore sviluppato è inversamente proporzionale alla concentrazione di Cortisolo presente nel campione.

La concentrazione di Cortisolo nel campione è calcolata sulla base di una curva di calibrazione.

3 REATTIVI, MATERIALI E STRUMENTAZIONE

3.1 Reattivi e materiali forniti nel kit

1. **Zero Standard (S0)**, 1 flacone, 4 mL
2. **Standard (S1 – S4)**, 4 flaconi, 1 mL ciascuno
3. **Control Low**, 1 flacone, 1 mL
Pronto all'uso
4. **Control High**, 1 flacone, 1 mL
Pronto all'uso
5. **Enzyme Conjugate**, 1 flacone, 33 mL
Cortisolo coniugato con perossidasi di rafano (HRP)
6. **Microtiterwells** (1 micropiastra breakable)
Anticorpo anti Cortisolo adsorbito sulla micropiastra
7. **Substrate Solution**, 1 flacone, 15 mL
H₂O₂ -TMB (0,26 g/L) (evitare il contatto con la pelle)
8. **Stop Solution**, 1 flacone, 15 mL
Acido Solforico 0.15 mol/L (evitare il contatto con la pelle)
9. **Wash Solution** 10X Conc.,, 1 flacone, 50 mL
Tampone fosfato 0,2 M, Proclin < 0,0015%

3.2 Reattivi necessari non forniti nel kit

Acqua distillata.

3.3 Materiale e strumentazione ausiliare

Dispensatori automatici.

Lettore per micropiastre (450 nm), 620-630 nm)

Note

Conservare i reattivi a 2 °C - 8 °C, al riparo dalla luce.

Aprire la busta del Reattivo 6 (Coated Microplate) solo dopo averla riportata a temperatura ambiente e chiuderla subito dopo il prelievo delle strip da utilizzare.

Una volta aperta è stabile fino alla data di scadenza del kit

4 AVVERTENZE

- Questo kit è per uso in vitro, da eseguire da parte di personale esperto. Non per uso interno o esterno su esseri Umani o Animali.
- Usare i previsti dispositivi di protezione individuale mentre si lavora con i reagenti forniti.
- Seguire le Buone Pratiche di Laboratorio (GLP) per la manipolazione di prodotti derivati da sangue.
- Materiali di origine animale usati per la preparazione di questo kit sono stati ottenuti da animali sani e le proteine bovine sono state ottenute da paesi non affetti da BSE, ma comunque questi materiali dovrebbero essere usati come potenzialmente contagiosi.
- Alcuni reagenti contengono piccole quantità di Proclin 300R come conservante. Evitare il contatto con la pelle e le mucose.
- Il TMB Substrato contiene un irritante, che può essere dannoso se inalato, ingerito o assorbito attraverso la cute. Per prevenire lesioni, evitare l'inalazione, l'ingestione o il contatto con la cute e con gli occhi.
- La Stop Solution è costituita da una soluzione di acido solforico diluito. L'acido solforico è velenoso e corrosivo e può essere tossico se ingerito. Per prevenire possibili ustioni chimiche, evitare il contatto con la cute e con gli occhi.
- Evitare l'esposizione del reagente TMB/H₂O₂ a luce solare diretta, metalli o ossidanti. Non congelare la soluzione.
- Questo metodo consente di determinare concentrazioni di Cortisolo da 0,47 ng/mL (LOD) a 200 ng/mL.
- La somministrazione di steroidi naturali o sintetici può alterare i livelli urinari di Cortisolo.

5 PRECAUZIONI

- Si prega di attenersi rigorosamente alla sequenza dei passaggi indicata in questo protocollo. I risultati presentati qui sono stati ottenuti usando specifici reagenti elencati in queste Istruzioni per l'Uso.
- Tutti i reattivi devono essere conservati a temperatura controllata di 2 °C - 8 °C nei loro contenitori originali. Eventuali eccezioni sono chiaramente indicate. I reagenti sono stabili fino alla data di scadenza se conservati e trattati seguendo le istruzioni fornite.
- Prima dell'uso lasciare tutti i componenti dei kit e i campioni a temperatura ambiente (22 °C - 28 °C) e mescolare accuratamente.
- Non scambiare componenti dei kit di lotti diversi. Devono essere osservate le date di scadenza riportate sulle etichette della scatola e di tutte le fiale. Non utilizzare componenti oltre la data di scadenza.
- Qualora si utilizzi strumentazione automatica, è responsabilità dell'utilizzatore assicurarsi che il kit sia stato opportunamente validato.
- Un lavaggio incompleto o non accurato dei pozzetti può causare una scarsa precisione e/o un'elevato background. Per migliorare le prestazioni del kit su strumentazione automatica, si consiglia di aumentare il numero di lavaggi.
- Per la riproducibilità dei risultati, è importante che il tempo di reazione di ogni pozzetto sia lo stesso. Per evitare il time shifting durante la dispensazione degli reagenti, il tempo di dispensazione dei pozzetti non dovrebbe estendersi oltre i 10 minuti. Se si protrae oltre, si raccomanda di seguire lo stesso ordine di dispensazione. Se si utilizza più di una piastra, si raccomanda di ripetere la curva di calibrazione in ogni piastra.
- L'aggiunta del TMB Substrato dà inizio ad una reazione cinetica, la quale termina con l'aggiunta della Stop Solution. L'aggiunta del TMB Substrato e della Stop Solution deve avvenire nella stessa sequenza per evitare tempi di reazione differenti.
- Osservare le linee guida per l'esecuzione del controllo di qualità nei laboratori clinici testando campioni di controllo.
- Osservare la massima precisione nella ricostituzione e dispensazione dei reagenti.
- I lettori di micropiastre leggono l'assorbanza verticalmente. Non toccare il fondo dei pozzetti.

6 CONSERVAZIONE E STABILITÀ

Conservare il kit a 2 °C - 8 °C; il kit è stabile fino alla data di scadenza indicata in etichetta e nel Certificato di Analisi. Non utilizzare il kit o i componenti dopo la data di scadenza.

7 PROCEDIMENTO

7.1 Preparazione di Standard e Controlli

Prima dell'uso lasciare almeno 5 minuti su agitatore rotante.

I calibratori sono pronti all'uso ed hanno le seguenti concentrazioni di Cortisolo:

	S0	S1	S2	S3	S4
ng/mL	0	1	5	30	200

I Controlli sono pronti all'uso.

Una volta aperti, calibratori e controlli sono stabili per 6 mesi a 2 °C - 8 °C

7.2 Preparazione del Coniugato

Il Coniugato è pronto all'uso.

Una volta aperto è stabile 6 mesi a 2 °C - 8 °C.

7.3 Preparazione del campione

La determinazione del cortisolo con questo kit deve essere effettuata su campioni di urina.

Nota importante: il kit è stato studiato per il dosaggio del Cortisolo su campioni di urina non trattati; trattamenti di acidificazione delle urine che portano il pH sotto a 5,0 potrebbero interferire con il dosaggio e generare risultati aberranti.

Non è necessario effettuare diluizioni sui campioni di urina.

Raccogliere le urine delle 24 ore in un unico recipiente.

Se il dosaggio non viene effettuato lo stesso giorno del prelievo conservare il campione a 2 °C - 8 °C, dove è stabile per una settimana. Per periodi più lunghi (massimo 6 mesi) conservare a -20 °C.

I campioni con concentrazione maggiore di 200 ng/mL non devono essere diluiti ma devono essere refertati come "> 200 ng/mL".

7.4 Preparazione della Wash Solution

Prima dell'uso, diluire il contenuto di ogni fiala di "10X Conc. Wash Solution" con acqua distillata fino al volume di 500 mL. Per preparare volumi minori rispettare il rapporto di diluizione di 1:10.

La soluzione di lavaggio diluita è stabile a 2 °C - 8 °C per almeno 30 giorni.

Nella wash solution concentrata è possibile osservare la presenza di cristalli; in tal caso agitare a temperatura ambiente fino a completa dissoluzione dei cristalli; per una maggiore precisione diluire tutto il flacone della soluzione di lavaggio concentrata a 500 mL, avendo cura di trasferire anche i cristalli, poi agitare fino a completa dissoluzione dei cristalli.

7.5 Procedimento

Portare tutti i reagenti a temperatura ambiente (22 °C - 28 °C) per almeno 30 minuti.

Al termine del dosaggio riporre immediatamente tutti i reagenti a 2 °C - 8 °C: evitare lunghi periodi a temperatura ambiente.

Le strisce di pozzetti non utilizzate devono essere rimesse immediatamente nella busta richiudibile contenente il materiale essiccante e conservate a 2 °C - 8 °C.

Per evitare potenziali contaminazioni microbiche e/o chimiche non rimettere i reagenti inutilizzati nei flaconi originali.

Al fine di aumentare l'accuratezza dei risultati del test è necessario operare in doppio, allestendo due pozzetti per ogni punto della curva di calibrazione (S0-S4), due per ogni Controllo, due per ogni Campione ed uno per il Bianco.

Reagente	Standard	Campioni / Contolli	Bianco
Standard S0-S4	10 µL		
Campioni / Controlli		10 µL	
Coniugato	300 µL	300 µL	
Incubare 1 h a +37 °C. Allontanare la miscela di reazione; lavare i pozzetti 3 volte aggiungendo 350 µL di wash solution diluita. Nota importante: ad ogni step di lavaggio, agitare delicatamente la piastra per 5 secondi e successivamente rimuovere l'eccesso di soluzione di lavaggio sbattendo delicatamente la micropiastra invertita su fogli di carta assorbente. Lavaggi automatici: se si utilizza un lavatore automatico, effettuare 6 lavaggi.			
Substrate Solution	100 µL	100 µL	100 µL
Incubare 15 minuti a temperatura ambiente (22 °C - 28 °C), al riparo dalla luce			
Stop solution	100 µL	100 µL	100 µL
Agitare delicatamente la piastra. Leggere l'assorbanza (E) a 450 nm contro una lunghezza d'onda di riferimento di 620 - 630 nm oppure contro il Bianco entro 5 minuti.			

8 CONTROLLO QUALITÀ

Ogni laboratorio dovrebbe analizzare i campioni nella gamma dei livelli elevati, normali e bassi di Cortisolo urinario per il controllo delle prestazioni dell'analisi. Questi campioni dovrebbero essere trattati come ignoti ed i valori determinati in ogni test effettuato. Le tabelle di controllo qualità dovrebbero essere effettuate per seguire le prestazioni dei reagenti forniti. Metodi statistici adeguati dovrebbero essere impiegati per accertare il trend. Il laboratorio dovrebbe fissare i limiti di accettabilità di prestazioni dell'analisi. Altri parametri che dovrebbero essere controllati includono le intercette di 80, 50 e 20% della curva di calibrazione per valutare la riproducibilità. In più, la capacità di assorbimento massima dovrebbe essere costante con l'esperienza precedente. La deviazione significativa dalle prestazioni stabilite può indicare il cambiamento non osservato delle condizioni sperimentali o la degradazione dei reagenti del kit. In questo caso si consiglia di utilizzare reagenti freschi per determinare il motivo delle variazioni.

9 RISULTATI

9.1 Estinzione Media

Calcolare l'estinzione media (Em) di ciascun punto della curva di calibrazione (S0 -S4) e di ogni campione.

9.2 Curva di calibrazione

Tracciare il grafico dell'assorbanza in funzione delle concentrazioni dei Calibratori (S0-S4), (es: Four Parameter Logistic).

9.3 Calcolo dei risultati

Interpolare, dal grafico, i valori di assorbanza relativi a ciascun campione e leggerne la corrispondente concentrazione in ng/mL.

Per calcolare le concentrazioni nelle urine applicare la seguente formula:

$$\text{ng/mL} \times \text{Vol (mL) urine 24 h/1000} = \mu\text{g Cortisolo/24 h}$$

10 VALORI DI RIFERIMENTO

Per determinare il range normale per i campioni di urina, sono stati testati 128 adulti maschi e femmine apparentemente sani.

Risultato:

Intervallo normale urine (24 h)
1,5 µg/24 h – 63 µg/24 h

11 PARAMETRI CARATTERISTICI

11.1 Sensibilità analitica

La sensibilità analitica è stata studiata attraverso il LOB (limite del bianco), il LOD (limite di rilevazione), il LOQ (limite di quantificazione) e la sensibilità analitica (A.S.).

La tabella seguente mostra i criteri dello studio e i risultati ottenuti.

	Criteri di studio	Risultato (ng/mL)
LOB	Sono stati effettuati 60 replicati del Cal 0, utilizzato come "Blank", in 5 differenti sessioni per 3 giorni	0,28
LOD	Sono stati analizzati 6 campioni di urina con una bassa concentrazione di cortisolo in 10 differenti sessioni per 5 giorni.	0,47
LOQ	Sono stati analizzati 6 campioni di urina con una bassa concentrazione di cortisolo in 10 differenti sessioni per 5 giorni.	0,56
A.S.	Sono stati testati 20 replicati di Cal 0 e 5 replicati di Cal1. A.S. è stata calcolata attraverso regressione lineare.	0,22

11.2 Precisione e riproducibilità (Complex Precision)

Per determinare precisione e riproducibilità sono stati utilizzati 6 campioni di urina a differenti livelli di concentrazione di Cortisolo.

La tabella seguente mostra il valore "Within Run" e "Total CV%".

Campione	n°	Media (pg/mL)	Within Run CV%	Total CV%
PS2	20	112,141	6,6%	12%
PS4	20	64,563	8,1%	12%
CT High	20	50,577	7,3%	11%
PS5	20	25,878	7,6%	10%
PS6	20	9,269	7,6%	11%
CT Low	20	3,438	7,0%	9%

11.3 Specificità analitica

11.3.1 Sostanze interferenti

Interferenze per Albumina, Acido Acetilsalicilico. Ibuprofene e Acido Ascorbico sono state studiate aggiungendo la sostanza interferente al campione di urina con concentrazione di cortisolo bassa e alta, e confrontando la sua concentrazione con il campione non caricato.

L'interferenza è stata valutata come "significativa" se causa un bias di concentrazione > 10% tra campione caricato e non caricato.

La tabella seguente mostra i risultati ottenuti:

Sostanza	Conc. dosata	Interferenza
Albumina	5 mg/dL	No
Acido Acetilsalicilico.	3,62 mmol/L	No
Ibuprofene	2,42 mmol/L	No
Acido Ascorbico	5 mg/L	No

Conclusione: a seguito dello studio, non vi è alcuna interferenza significativa da Albumina, Acido Acetilsalicilico, Ibuprofene e Acido Ascorbico alla concentrazione saggiata.

11.3.2 Cross-reattività

L'anticorpo impiegato presenta le seguenti reazioni crociate, calcolate al 50% secondo Abraham:

Reagente	Cross-reattività	Reagente	Cross-reattività
Cortisolo	100 %	Testosterone	< 0.1 %
Prednisolone	46.2 %	Spironolactone	< 0.1 %
11-Deoxycortisol	4 %	DHEA	< 0.1 %
Cortisone	3.69 %	DHEA-S	< 0.1 %
Prednisone	3.10 %	Androstenedione	< 0.1 %
11 α OH Progesterone	1 %	Androsterone	< 0.1 %
Progesterone	< 0.1 %	DHT	< 0.1 %
Aldosterone	< 0.1 %	Danazolo	< 0.1 %
Pregnenolone	< 0.1 %	Colesterolo	< 0.1 %
17 β Estradiolo	< 0.1 %	Desametasone	< 0.1 %
Estrone 3-solfato	< 0.1 %		
Estriolo	< 0.1 %		

11.4 Correlazione

137 campioni di urina sono stati testati con il kit Urinary Cortisol ELISA (EIA-2989) in parallelo al metodo di riferimento LC-MS.

La curva di regressione lineare è:

$$y = 1,008x - 0,5019$$

$$r^2 = 0,83$$

12 DISPOSIZIONI PER LO SMALTIMENTO

I reagenti devono essere smaltiti in accordo con le leggi locali.

13 BIBLIOGRAFIA

1. Foster, L. B. and Dunn, R. T. Clin. Chem. 20/3 365(1974)
2. De Lacerda, et al J. Clin. Endocr. and Metab. 36,227 (1973)
3. Rolleri, E., et al Clin. Chim. Acta 66 319 (1976)
4. Kobayashi, Y., et al Steroids, 32 no 1(1978)
5. Akarawa, et al Anal. Biochem. 97 248 (1979)

14 SUGGERIMENTI PER LA RISOLUZIONE DEI PROBLEMI

ERRORE CAUSE POSSIBILI/ SUGGERIMENTI

Nessuna reazione colorimetrica del saggio

- mancata dispensazione del coniugato
- contaminazione del coniugato e/o del Substrato
- errori nell'esecuzione del saggio (es. Dispensazione accidentale dei reagenti in sequenza errata o provenienti da flaconi sbagliati, etc.)

Reazione troppo blanda (OD troppo basse)

- coniugato non idoneo (es. non proveniente dal kit originale)
- tempo di incubazione troppo breve, temperatura di incubazione troppa bassa

Reazione troppo intensa (OD troppo alte)

- coniugato non idoneo (es. non proveniente dal kit originale)
- tempo di incubazione troppo lungo, temperatura di incubazione troppa alta
- qualità scadente dell'acqua usata per la soluzione di lavaggio (basso grado di deionizzazione)
- lavaggi insufficienti (coniugato non completamente rimosso)

Valori inspiegabilmente fuori scala

- contaminazione di pipette, puntali o contenitori- lavaggi insufficienti (coniugato non completamente rimosso)

CV% intrasaggio elevato

- reagenti e/o strip non portate a temperature ambiente prima dell'uso
- il lavatore per micropiastre non lava correttamente (suggerimento: pulire la testa del lavatore)

CV% intersaggio elevato

- condizioni di incubazione non costanti (tempo o temperatura)
- controlli e campioni non dispensati allo stesso tempo (con gli stessi intervalli) (controllare la sequenza di dispensazione)
- variabilità intrinseca degli operatori

1 USO PREVISTO

Método competitivo inmunoenzimático colorimétrico para la determinación cuantitativa de la concentración de cortisol libre en la orina.

El kit Urinary Cortisol ELISA está destinado al uso en laboratorio exclusivamente.

1.1 Significado Clínico

El cortisol es una hormona esteroidea liberada por la corteza suprarrenal en respuesta a la hormona ACTH (producida por la glándula pituitaria) y está involucrada en la respuesta al estrés. Aumenta la presión sanguínea y la glucemia, puede causar infertilidad en mujeres y suprime el sistema inmunitario.

El cortisol actúa a través de los receptores intracelulares específicos, afecta numerosos sistemas fisiológicos incluyendo:

el sistema inmunitario, la regulación de la glucosa, el tono vascular, la utilización de sustratos y el metabolismo óseo. El cortisol se excreta principalmente en la orina en forma (libre) no unida. El cortisol en el plasma es unido a la globulina fijadora de corticosteroides (CBG, transcortina), con alta afinidad, y a la albúmina. Solo el cortisol libre está disponible para los receptores.

Las funciones endógenas normales son la base de las consecuencias fisiológicas del estrés crónico. La secreción prolongada de cortisol provoca esfuerzo muscular, hiperglucemia y suprime las respuestas inmunes/inflamatorias. Estas mismas consecuencias resultan del uso prolongado de fármacos basados en glucocorticoides.

El cortisol libre representa la fracción de cortisol metabólicamente activa.

En condiciones normales, menos del 1% se excreta como tal en la orina. En condiciones patológicas (síndrome de Cushing), los niveles de cortisol libre urinario son muy elevados ya que el cortisol plasmático en exceso no se une a la CBG y se elimina con la orina.

Durante el embarazo o el tratamiento con fármacos con base de estrógenos y progesterona se produce un aumento del cortisol en plasma debido al aumento de la síntesis de la proteína de transporte, pero los niveles de cortisol libre urinario son normales, lo que indica el correcto funcionamiento suprarrenal.

Este ensayo resulta muy útil para evaluar la función suprarrenal real en el momento en que se mide la cuota libre y, por lo tanto, metabólicamente activa. Además, la evaluación del cortisol urinario libre es el mejor parámetro para el diagnóstico del síndrome de Cushing.

2 PRINCIPIO DEL MÉTODO

El cortisol urinario (antígeno) presente en la muestra compete con el antígeno marcado con peroxidasa frente al anticuerpo anti-cortisol absorbido en la microplaca (fase sólida).

La separación libre-unido se obtiene mediante un simple lavado de la fase sólida.

La enzima presente en la fracción unida, que reacciona con el sustrato (H_2O_2) y el sustrato TMB (TMB), desarrolla una coloración azul que cambia a amarillo tras la adición de la solución de parada (H_2SO_4).

La intensidad del color desarrollado inversamente proporcional a la concentración de cortisol urinario presente en la muestra.

La concentración de Cortisol en la muestra se calcula según una curva de calibración.

3 REACTIVOS, MATERIAL E INSTRUMENTOS

3.1 Reactivos y materiales suministrados en el kit

1. **Zero Standard (S0)**, 1 frasco, 4 mL
2. **Estándares de Cortisol (Standards) S1 – S4**; (4 frascos, 1 mL cada uno)
3. **Control Low**, 1 frasco, 1 mL
(control bajo), Listo para usar.
4. **Control High**, 1 frasco, 1 mL
(control alto), listo para usar.
5. **Conjugado (Enzyme Conjugate)**, 1 frasco, 33 mL
Cortisol conjugado con peroxidasa de rabano (HRP)
6. **Microplaca recubierta (Microtiterwells)**, 1 microplaca rompible)
Anticuerpo anti cortisol absorbido en la microplaca
7. **Sustrato TMB (Substrate Solution)**, 1 frasco, 15 mL
H₂O₂-TMB 0.26 g/L (evitar cualquier contacto con la piel)
8. **Solución de parada (Stop Solution)**, 1 frasco, 15 mL
Ácido Sulfúrico 0.15 mol/L (corrosivo: evitar cualquier contacto con la piel)
9. **Wash Solution** Solución de lavado conc.10X (1 frasco, 50 mL)
Tampón fosfato 0,2 M, Proclin < 0,0015%

3.2 Reactivos necesarios no suministrados en el kit

Agua destilada.

3.3 Materiales e instrumentos auxiliares

Dispensador automático.

Lector de microplacas (450 nm)

Notas

Conservar los reactivos a 2 °C - 8 °C, protegidos de la luz.

Abrir la bolsa del reactivo 6 (microplaca recubierta) solo cuando se encuentre a temperatura ambiente y cerrarla inmediatamente después de extraer las tiras que se vayan a utilizar.

Una vez abierto, se mantiene estable hasta la fecha de caducidad indicada en el kit.

4 ADVERTENCIAS

Este kit de ensayo está previsto para usarse in vitro y por personal experto. No es para uso interno o externo en humanos o animales.

Usar los equipos de protección individual previstos al trabajar con los reactivos suministrados.

Siga las Buenas Prácticas de Laboratorio (GLP) en el manejo de las muestras sanguíneas y sus derivados.

Materiales de origen animal utilizadas para la elaboración de este kit se obtuvieron a partir de animales sanos y de las proteínas de bovino se obtuvieron de los países no afectados por la EEB, pero estos materiales se debe utilizar como potencialmente infecciosos.

Algunos reactivos contienen pequeñas cantidades de Proclin 300 como conservante. Evite el contacto con la piel y las mucosas.

El cromógeno TMB contiene un irritante que puede ser dañino si se inhala, se ingiere o se absorbe a través de la piel. Para prevenir lesiones, evitar la inhalación, la ingestión o el contacto con la piel y con los ojos.

La Solución de Parada está formada por una solución de ácido sulfúrico diluido. El ácido sulfúrico es venenoso y corrosivo, y puede ser tóxico si se ingiere. Para prevenir posibles quemaduras químicas, evitar el contacto con la piel y con los ojos.

Evite la exposición de los reactivos TMB/H₂O₂ a la luz solar directa, metales u oxidantes. No congelar la solución.

Este método permite determinar concentraciones de cortisol de 0,47 ng/mL (LOD) a 200 ng/mL.

El suministro de esteroides naturales o sintéticos puede alterar los niveles urinarios de cortisol.

5 PRECAUCIONES

- Respetar rigurosamente la secuencia de los pasos indicados en este protocolo. Los resultados aquí presentados se han obtenido utilizando los reactivos específicos que figuran en estas instrucciones de uso.
- Todos los reactivos deben conservarse a una temperatura controlada de 2 °C - 8 °C en sus recipientes originales. Todas las excepciones están claramente marcadas. Los reactivos son estables hasta la fecha de caducidad cuando se almacenan y manipulan de acuerdo con las instrucciones proporcionadas.
- Antes del uso, esperar hasta que todos los componentes del kit y las muestras se encuentren a temperatura ambiente (22 °C - 28 °C) y mezclar cuidadosamente.
- No mezclar componentes de kits de lotes distintos. Se debe observar la fecha de caducidad indicada en la etiqueta de la caja y de todas las ampollas. No usar componentes después de la fecha de caducidad.
- Si utiliza un equipo automático, es responsabilidad del usuario asegurar que la metodología aplicada haya sido debidamente validada.
- Un lavado incompleto o impreciso y la aspiración insuficiente del líquido de los micropozos ELISA pueden causar una precisión pobre y/o un elevado fondo. Para mejorar el rendimiento del kit en los sistemas automatizados, se recomienda aumentar el número de lavados.
- Para la reproducibilidad de los resultados, es importante que el tiempo de reacción sea igual para cada pocillo. El tiempo de dispensación de los pocillos no debe superar los 10 minutos; si se prolongara más allá de los 10 minutos, respétese el orden de dispensación. Si utiliza más de una placa, se recomienda repetir la curva de calibración en cada placa.
- Al añadir el Sustrato TMB se inicia una reacción cinética que termina al agregar la Solución de Parada. Tanto el Sustrato TMB como la Solución de Parada deben agregarse en la misma secuencia para evitar diferentes tiempos de reacción.
- Observar las directrices para la ejecución del control de calidad en los laboratorios clínicos.
- Observar la máxima precisión en la reconstitución y dispensación de los reactivos.
- Los lectores de microplacas leen las DO verticalmente, por tanto no debe tocarse el fondo de los pocillos.

6 CONSERVACIÓN Y ESTABILIDAD

Almacenar el kit y sus componentes a 2 °C - 8 °C; el kit es estable hasta la fecha de vencimiento indicada en la etiqueta y en el certificado de análisis.

No usar el kit o sus componentes después de la fecha de vencimiento.

7 PROCEDIMIENTO

7.1 Preparación d' Estándar y Controles

Antes del uso, dejar al menos 5 minutos en el agitador giratorio.

Los Calibradores son listo para usar y tienen las siguientes concentraciones:

	S0	S1	S2	S3	S4
ng/mL	0	1	5	30	200

Los controles son listo para usar.

Una vez abiertos calibradores y controles se mantienen estables durante 6 meses a 2 °C - 8 °C.

7.2 Preparación del Conjugado

El Conjugado es listo para usar.

Una vez abiertos se mantienen estables durante 6 meses a 2 °C - 8 °C.

7.3 Preparación de la muestra

La determinación de Cortisol en este kit debe ser realizada con una muestra de orina.

Nota importante: el kit está diseñado para la cuantificación de cortisol en muestras de orina no tratada; tratamientos que traen la acidificación de la orina a pH por debajo de 5,0 pueden interferir con el ensayo y generar resultados aberrantes.

No es necesario diluir las muestras de orina.

Recoger la orina de 24 horas en un único recipiente.

Si el ensayo no se realiza el mismo día de la extracción, conservar la muestra a 2 °C - 8 °C. Estable durante una semana. Para períodos más largos, conservar a -20 °C (máximo de 6 meses).

Las muestras con una concentración superior a 200 ng/mL no deben diluirse, y deben informarse como "> 200 ng/mL".

7.4 Preparación de la solución de lavado

Antes del uso, diluir el contenido del frasco de la "Solución de lavado conc. 10X" con agua destilada hasta un volumen de 500 mL. Para preparar volúmenes menores, respetar la relación de dilución de 1:10.

La solución de lavado diluida se mantiene estable a 2 °C - 8 °C durante al menos 30 días.

En la solución de lavado concentrada es posible observar la presencia de cristales. En ese caso, agitar a temperatura ambiente hasta que los cristales se disuelvan por completo. Para una mayor precisión, diluir todo el frasco de la solución de lavado concentrada en 500 mL teniendo cuidado para transferir también los cristales y, a continuación, agitar hasta que se disuelvan por completo.

7.5 Procedimiento

Esperar hasta que todos los reactivos se encuentren a temperatura ambiente (22 °C - 28 °C) durante al menos 30 minutos.

Al final del ensayo inmediatamente poner todos los reactivos a 2 °C - 8 °C para evitar largos periodos a temperatura ambiente.

Las tiras de pocillos no utilizados se deben guardar de inmediato en la bolsa desechable que contiene desecantes y almacenarse a 2 °C - 8 °C.

Para evitar la contaminación microbiana y/o química no regrese porciones de reactivos no usados en los viales originales.

Para aumentar la precisión de los resultados de la prueba es necesario trabajar en duplicado: preparar dos pocillos para cada punto de la curva de calibración (S0-S4), dos para cada control, dos para cada muestra, uno para el blanco.

Reactivo	Estándar	Muestras/ Controles	Blanco
Estándar S0-S4	10 µL		
Muestras / Controles		10 µL	
Conjugado	300 µL	300 µL	
Incubar 1 h a +37 °C. Retirar la mezcla de reacción. Lave los pozos 3 veces con 0,350 mL de solución de lavado diluida. Nota importante: agite suavemente la placa durante 5 segundos en cada paso del lavado. Después del último lavado asegúrese haber eliminado completamente la solución de lavado de los pozos, invierta la placa y golpéela repetidas veces contra una servilleta de papel absorbente. Lavados automático: si está utilizando una lavadora automática, hacer 6 lavados.			
Sustrato TMB	100 µL	100 µL	100 µL
Incubar 15 minutos a temperatura ambiente (22 °C - 28 °C), protegida de la luz.			
Solución de parada	100 µL	100 µL	100 µL
Agitar la placa con cuidado. Leer la absorbancia (E) a 450 nm frente una segunda lectura de referencia a 620-630 nm o frente al blanco dentro de los 5 minutos.			

8 CONTROL DE CALIDAD

Cada laboratorio debe analizar muestras de control para los rangos bajo, medio y alto de cortisol urinario para supervisar el rendimiento del análisis. Estas muestras deben tratarse como desconocidas y los valores deben determinarse en cada ensayo realizado. Se deben mantener los gráficos de control de calidad para seguir el rendimiento de los reactivos suministrados. Se deben emplear métodos estadísticos adecuados para determinar las tendencias. El laboratorio debe establecer los límites de aceptabilidad del rendimiento del análisis. Entre otros parámetros que se deben controlar, se incluyen las intersecciones de 80, 50 y 20% de la Curva de calibración para evaluar la reproducibilidad. Además, la capacidad de absorción máxima debe ser constante con la experiencia anterior. Una desviación significativa del rendimiento establecido puede indicar un cambio inadvertido en las condiciones experimentales o la degradación de los reactivos del kit. En este caso, se recomienda usar reactivos frescos para determinar la causa de las variaciones.

9 RESULTADOS

9.1 Absorbancia media

Calcular la absorbancia media (Em) de cada punto de la Curva de calibración (S0-S4) y de cada muestra.

9.2 Curva de calibración

Trazar el gráfico de la absorbancia en función de las concentraciones de los Calibradores (S0-S4).
(p. ej.: Logística de cuatro parámetros).

9.3 Cálculo de los resultados

Interpolarse del gráfico los valores de absorbancia relativos a cada muestra y leer la concentración correspondiente en ng/mL.

Para calcular las concentraciones en la orina, aplicar la siguiente fórmula:

$$\text{ng/mL} \times \text{Vol (mL) orina 24 h} / 1000 = \mu\text{g Cortisol} / 24 \text{ horas}$$

10 VALORES DE REFERENCIA

Para determinar el rango normal para las muestras de orina, se analizaron 128 hombres y mujeres adultos aparentemente sanos.

Resultado:

Intervalo urinario normal (24 h)
1,5 µg/24 h – 63 µg/24 h

11 CARACTERÍSTICAS DEL ENSAYO

11.1 Sensibilidad analítica

La sensibilidad analítica se ha estudiado investigando el LOB (Límite de blanco), LOD (Límite de detección), LOQ (Límite de cuantificación) y la sensibilidad analítica (A.S.).

La siguiente tabla muestra los criterios del estudio y los resultados obtenidos.

	Criterios de estudio	Resultado (ng/mL)
LOB	Se realizaron 60 réplicas de Cal 0, utilizadas como "En blanco", en 5 sesiones diferentes durante 3 días.	0,28
LOD	Se analizaron 6 muestras de orina con una baja concentración de cortisol en 10 sesiones diferentes durante 5 días.	0,47
LOQ	Se analizaron 6 muestras de orina con una baja concentración de cortisol en 10 sesiones diferentes durante 5 días.	0,56
A.S.	Se probaron 20 réplicas de Cal 0 y 5 réplicas de Cal1. A. S. Se calculó mediante regresión lineal.	0,22

11.2 Precisión y reproducibilidad

Se utilizaron 6 muestras de orina para determinar la precisión y reproducibilidad.

La tabla indica el "Within Run" y el "Total CV%".

Muestra	n°	Medios (pg/mL)	Within Run CV%	Total CV%
PS2	20	112,141	6,6%	12%
PS4	20	64,563	8,1%	12%
CT High	20	50,577	7,3%	11%
PS5	20	25,878	7,6%	10%
PS6	20	9,269	7,6%	11%
CT Low	20	3,438	7,0%	9%

11.3 Especificidad analítica

11.3.1 Sustancias interferentes

Interferencia por Albúmina, Acido Acetilsalicílico, Ibuprofeno y el Acido ascórbico se estudiaron agregando la sustancia interferente a la muestra de orina con una concentración de cortisol baja y alta. Las respectivas muestras descargadas se utilizaron como referencia.

La interferencia se evaluó como "significativa" si causa una diferencia en la cuantificación > 10% entre la muestra cargada y descargada.

La siguiente tabla muestra los resultados obtenidos:

Sustancia	Concentracion	Interferencia
Albúmina	5 mg/dL	No
Ácido acetilsalicílico	3,62 mmol/L	No
Ibuprofeno	2,42 mmol/L	No
Ácido ascórbico	5 mg/L	No

Conclusión: tras el estudio, no existe una interferencia significativa de la Albúmina, Acido acetilsalicílico, Ibuprofeno y el Acido ascórbico a la concentración analizada.

11.3.2 Reactividad cruzada

El anticuerpo utilizado tiene las siguientes reacciones cruzadas, calculadas al 50% según Abraham:

Sustancia	Reactividad cruzada	Sustancia	Reactividad cruzada
Cortisol	100 %	Testosterona	< 0,1 %
Prednisolona	46,2 %	Spironolactona	< 0,1 %
11-Deoxycortisol	4 %	DHEA	< 0,1 %
Cortisona	3,69 %	DHEA-S	< 0,1 %
Prednisona	3,10 %	Androstenediona	< 0,1 %
11 α OH Progesterona	1 %	Androsterona	< 0,1 %
Progesterona	< 0,1 %	DHT	< 0,1 %
Aldosterona	< 0,1 %	Danazol	< 0,1 %
Pregnenolona	< 0,1 %	Colesterol	< 0,1 %
17 β Estradiol	< 0,1 %	Desametasona	< 0,1 %
Estrone 3-sulfato	< 0,1 %		
Estriol	< 0,1 %		

11.4 Correlación

Se analizaron 137 muestras de orina con el kit Urinary Cortisol ELISA (EIA-2989) y con el método LC-MS (referencia).

La curva de regresión lineal es:

$$y = 1,008x - 0,5019$$

$$r^2 = 0,83$$

12 GESTIÓN DE LOS RESIDUOS

Los reactivos deben eliminarse de acuerdo con las leyes locales.

13 BIBLIOGRAFÍA

1. Foster, L.B. and Dunn, R.T. Clin Chem: 20/3, 365 (1974)
2. De Laceda, L., Kowarski, A., and Migeon, C.J. J. Clin Endocr. and Metab: 36:227 (1973)
3. Rolleri, E., Zannino, M., Orlandini, S., Malvano, R. Clin chim Acta 66 319 (1976)
4. Kobayashi, Y., et al. Steroids, 32 no. 1 (1978)
5. Arakawa, H., Maeda, M., Tsuji, A. Anal. Biochem. 97248 (1979)

14 SUGERENCIAS PARA LA SOLUCIÓN DE PROBLEMAS

ERROR / POSIBLES CAUSAS / SUGERENCIAS

No se produce ninguna reacción colorimétrica del ensayo

- no se ha dispensado el conjugado
- contaminación del conjugado y/o del sustrato
- errores en la ejecución del ensayo (p. ej., dispensación accidental de los reactivos en orden incorrecto o procedentes de frascos equivocados, etc.)

Reacción escasa (DO demasiado bajas)

- conjugado no idóneo (p. ej., no procedente del kit original)
- tiempo de incubación demasiado corto, temperatura de incubación demasiado baja

Reacción demasiado intensa (DO demasiado altas)

- conjugado no idóneo (p. ej., no procedente del kit original)
- tiempo de incubación demasiado largo, temperatura de incubación demasiado alta
- calidad escasa del agua usada para la solución de lavado (bajo grado de desionización)
- lavados insuficientes (el conjugado no se ha retirado completamente)

Valores inexplicablemente fuera de escala

- contaminación de pipetas, puntas o contenedores- lavados insuficientes (el conjugado no se ha retirado completamente)


CV% intraensayo elevado

- los reactivos y/o tiras no se encontraban a temperatura ambiente antes del uso
- el lavador de microplacas no funciona correctamente (sugerencia: limpiar el cabezal del lavador)

CV% interensayo elevado

- condiciones de incubación no constantes (tiempo o temperatura)
- controles y muestras no dispensados al mismo tiempo (con los mismos intervalos) (controlar la secuencia de dispensación)
- variación en función de los operadores

SYMBOLS USED

Symbol	English	Deutsch	Italiano	Español	Français
	European Conformity	CE-Konformitäts-kennzeichnung	Conformità europea	Conformidad europea	Conformité normes européennes
	Consult instructions for use *	Gebrauchsanweisung beachten *	Consultare le istruzioni per l'uso	Consulte las instrucciones de uso	Consulter les instructions d'utilisation
	<i>In vitro</i> diagnostic medical device *	<i>In-vitro</i> -Diagnostikum *	Dispositivo medico-diagnostico in vitro	Producto sanitario para diagnóstico In vitro	Dispositif médical de diagnostic in vitro
	Catalogue number *	Artikelnummer *	Numero di Catalogo	Número de catálogo	Référence de catalogue
	Batch code *	Chargencode *	Codice del lotto	Codigo de lote	Numéro de lot
	Contains sufficient for <n> tests *	Ausreichend für <n> Prüfungen	Contenuto sufficiente per "n" saggi	Contenido suficiente para <n> ensayos	Contenu suffisant pour "n" tests
	Temperature limit *	Temperaturbegrenzung *	Temperatura di conservazione	Temperatura de conservación	Température de conservation
	Use-by date *	Verwendbar bis *	Utilizzare prima del	Establa hasta	Utiliser jusque
	Manufacturer *	Hersteller *	Fabbricante	Fabricante	Fabricant
	Caution *	Achtung *			
	For research use only	Nur für Forschungszwecke	Solo a scopo di ricerca	Sólo para uso en investigación	Seulement dans le cadre de recherches
<i>Distributed by</i>	Distributed by	Vertreiber	Distributore	Distribuidor	Distributeur
<i>Content</i>	Content	Inhalt	Contenuto	Contenido	Contenu
<i>Volume/No.</i>	Volume / No.	Volumen/Anzahl	Volume/Quantità	Volumen/Número	Volume/Quantité