

Urinary Cortisol

CE

Enzyme immunoassay for the quantitative determination of free Cortisol in human urine

Inmunoensayo enzimático para la determinación cuantitativa de Cortisol libre en orina humana

Only for in-vitro diagnostic use

English:	Page	2 to 7
Espanol:	Página	8 a 14

Bibliography/ Bibliografía	Page / Página	18
----------------------------	---------------	----

Packaging materials/ Materiales de embalaje	Page / Página	18
---	---------------	----

Symbols Key / Símbolos	Page/ Página	19
------------------------	--------------	----

Summary of Test Procedure/ Resumen de la técnica	Page / Página	20
--	---------------	----

1. INTRODUCTION

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 urine. In pathological conditions (syndrome of Cushing) the levels of free urinary cortisol are elevated, because the CBG doesn't bound the plasma cortisol in excess and it is removed with urine.

During pregnancy or estrogen treatment an increase of plasma cortisol is caused by an increment of the production of the transport protein, but the levels of free urinary cortisol remain normal to indicate correct suprarenal functionality.

This test is very useful to estimate the real suprarenal function, because it measures 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. INTENDED USE

Competitive immunoenzymatic colorimetric method for quantitative determination of "free" Cortisol in urine.

3. PRINCIPLE OF THE ASSAY

Microtiter strip wells are precoated with anti-Cortisol antibodies (solid-phase). Cortisol in the sample competes with added horseradish peroxidase labelled Cortisol (enzyme-labelled antigen) for antibody binding. After incubation a bound/free separation is performed by solid-phase washing. The immune complex formed by enzyme-labelled antigen is visualized by adding Tetramethylbenzidine (TMB) substrate which gives a blue reaction product. The intensity is **inversely** proportional to the amount of Cortisol in the sample. Sulphuric acid is added to stop the reaction. This produces a yellow endpoint colour. Absorption at 450 nm is read using an ELISA microwell plate reader.

4. MATERIALS

4.1. Reagents supplied

- **Anti-Cortisol IgG Coated Wells:** 12 breakapart 8-well snap-off strips coated with anti-Cortisol antibodies; in resealable aluminium foil.
- **Stop Solution:** 1 bottle containing 15 ml sulphuric acid, 0.15 mol/l (avoid any skin contact), ready to use.
- **Cortisol-HRP Conjugate:** 1 bottle containing 33 ml of horseradish peroxidase labelled Cortisol, ready to use.
- **TMB Substrate Solution:** 1 bottle containing 15 ml 3, 3', 5, 5'-tetramethylbenzidine (H₂O₂-TMB 0.26 g/l) (avoid any skin contact), ready to use.
- **Wash solution 10x conc:** 1 bottle containing 50 ml (phosphate buffer 0.2M, Proclin <0.0015%)
- **Low control:** 1 vial containing 1 ml, refer to label for exact value, ready to use.
- **High control:** 1 vial containing 1 ml, refer to label for exact value, ready to use.
- **Cortisol Standards:** 5 bottles, ready to use.

Standard 0:	(4 ml)	0 ng/ml
Standard 1:	(1 ml)	1 ng/ml
Standard 2:	(1 ml)	5 ng/ml
Standard 3:	(1 ml)	30 ng/ml
Standard 4:	(1 ml)	200 ng/ml

4.2. Materials supplied

- 1 Cover foil
- 1 Instructions for use (IFU)

4.3. Materials and Equipment needed

- 37° C Incubator
- ELISA microwell plate reader, equipped for the measurement of absorbance at 450 nm, 620-630 nm
- Automatic dispenser
- Distilled water
- Disposable tubes
- Timer
- Rotating mixer

5. STABILITY AND STORAGE

The reagents are stable up to the expiry date stated on the label when stored at +2...+8 °C in the dark. At the end of the assay, store immediately the reagents at 2...8 °C; avoid long exposure to room temperature.

6. REAGENT PREPARATION

It is very important to bring all reagents, samples and standards to room temperature (22...28 °C) for at least 30 minutes before starting the test run and mix well prior to use! At the end of the assay, store immediately the reagents at 2-8 °C; avoid long exposure to room temperature.

6.1. Coated snap-off Strips

The ready to use break-apart snap-off strips are coated with anti-Cortisol antibodies. Store at +2...+8 °C. Open the bag only when it is at room temperature. *Immediately after removal of strips, the remaining strips should be resealed in the aluminium foil along with the desiccant supplied and stored at 2...8 °C; stability until expiry date.*

6.2. Cortisol-HRP Conjugate

The conjugate is ready to use. Once opened, it is stable 6 months at 2-8 °C.

6.3. Cortisol Standards

Before use, leave 5 minutes on a rotating mixer. The standards are ready to use and have the following concentration of Cortisol:

Standard 0:	0 ng/ml
Standard 1:	1 ng/ml
Standard 2:	5 ng/ml
Standard 3:	30 ng/ml
Standard 4:	200 ng/ml

After first opening stable for another 6 months at 2...8 °C.

6.4. TMB Substrate Solution

The bottle contains 15 ml of a tetramethylbenzidine/hydrogen peroxide system. The reagent is ready to use and has to be stored at 2...8 °C in the dark. *The solution should be colourless or could have a slight blue tinge. If the substrate turns into blue, it may have become contaminated and should be thrown away.*

6.5. Stop Solution

The bottle contains 15 ml 0.15 mol/l sulphuric acid solution. This ready to use solution has to be stored at 2...8 °C.

6.6. Wash Solution

Dilute the concentrated solution with distilled water to a final volume of 500 ml prior to use. For smaller volumes respect the 1:10 dilution ratio. The diluted solution is stable for 30 days at 2...8 °C. In the concentrated solution it is possible to observe the presence of crystals, in this case mix at room temperature until complete dissolution of crystals. For greater accuracy dilute the whole bottle of concentrated wash solution to 500 ml and take care that all crystals are transferred by washing the bottle, then mix until crystals are completely dissolved.

6.7. Controls

The controls are ready to use.

7. SPECIMEN COLLECTION AND PREPARATION

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...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.

7.1. Precaution

- Some reagents contain a small amount of Proclin 300® as preservative. Avoid contact with skin or mucosa.
- Maximum precision is required for reconstitution and dispensation of the reagents.
- Avoid the exposure of TMB substrate to direct sunlight, metal or oxidants. Do not freeze the solution.
- This method allows the determination of Cortisol from 0,47 ng/ml (LOD) to 200 ng/ml.
- Treatment of the patient with corticosteroids, natural or synthetic steroids can impair Cortisol determination.

8. ASSAY PROCEDURE

8.1. Test Preparation

Please read the test instructions for use carefully **before** performing the assay. Result reliability depends on strict adherence to the instructions for use as described. Prior to commencing the assay, the distribution and identification plan for all standards, specimens and controls should be carefully established. Select the required number of microtiter strips or wells and insert them into the holder. Please allocate at least:

1 well	(e.g. A1)	for the substrate blank
2 wells	(e.g. B1+C1)	for standard 0
2 wells	(e.g. D1+E1)	for standard 1
2 wells	(e.g. F1+G1)	for standard 2
2 wells	(e.g. H1+A2)	for standard 3
2 wells	(e.g. B2+C2)	for standard 4
2 wells	(e.g. D2+E2)	for low control
2 wells	(e.g. F2+G2)	for high control

It is recommended to determine standards and patient samples in duplicate.

Perform all assay steps in the order given and without any appreciable delays between the steps.

A clean, disposable tip should be used for dispensing each standard and each patient sample.

1. Dispense 10 µl standards, controls and samples into their respective wells.
2. Add 300 µl Cortisol-HRP Conjugate to each well. Leave well A1 for substrate blank.
3. Cover wells with the foil supplied in the kit.
4. **Incubate for 1 hour at 37 °C.**
5. When incubation has been completed, remove the foil, aspirate the content of the wells. Wash the wells 3 times with 350 µl of diluted wash solution. Avoid overflows from the reaction wells. 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.

Automatic washer: In case you use an automatic washer, it is advised to do 6 washing steps.

Note: Washing is critical! Insufficient washing results in poor precision and falsely elevated absorbance values.

6. Dispense 100 µl TMB Substrate Solution into all wells.
7. **Incubate for exactly 15 min at room temperature (22 – 28 °C) in the dark.**
8. Dispense 100 µl Stop Solution into all wells in the same order and at the same rate as for the TMB Substrate Solution. Shake the microplate gently.
Any blue colour developed during the incubation turns into yellow.
9. Measure the absorbance of the specimen at 450 nm against reference wavelength of 620-630 nm or against Blank within 5 minutes.

8.2. Measurement

Adjust the ELISA Microwell Plate Reader **to zero** using the **substrate blank in well A1**.

If - due to technical reasons - the ELISA reader cannot be adjusted to zero using the substrate blank in well A1, subtract the absorbance value of well A1 from all other absorbance values measured in order to obtain reliable results!

Measure the absorbance of all wells at **450 nm** and record the absorbance values for each standard and patient sample.

Where applicable calculate the **mean absorbance values** of all duplicates.

9. RESULTS

9.1. Calculation of results

Calculate the mean absorbance for each point of the standard curve and each sample. Plot the mean value of absorbance of the standards against concentration. Draw the best-fit curve through the plotted points. (Four Parameter Logistic). 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:

$$\text{ng/ml} \times \text{Vol(ml) urine 24 h} / 1.000 = \mu\text{g Cortisol/24h}$$

9.2. Reference values

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

Result:

Normal range urine (24h)
1,5 - 63 $\mu\text{g}/24\text{h}$

10. 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.

11. SPECIFIC PERFORMANCE CHARACTERISTICS

11.1. Analytical sensitivity

Analytical sensitivity was investigated through the LOB (limit of blank), 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:

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 beta Estradiol	< 0.1 %
Estrone 3-sulfate	< 0.1 %
Estriol	< 0.1 %
Testosterone	< 0.1 %
Spironolactone	< 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 and with a LC-MS method (reference)
The linear regression curve is:

$$Y = 1,008X - 0,5019$$

$$r^2 = 0,83$$

12. LIMITATIONS OF THE PROCEDURE

Sample(s), which are contaminated microbiologically, should not be used in the assay. 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 one plate is used, it is recommended to repeat the dose response curve. Addition of the substrate solution initiates a kinetic reaction, which is terminated by the addition of the stop solution. Therefore, the addition of the substrate and the stopping solution should be added in the same sequence to eliminate any time deviation during reaction. Plate readers measure vertically. Do not touch the bottom of the wells. 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 is recommended to increase the number of washes.

13. PRECAUTIONS AND WARNINGS

- The test procedure, the information, the precautions and warnings in the instructions for use have to be strictly followed. The use of the testkits with analyzers and similar equipment has to be validated. Any change in design, composition and test procedure as well as for any use in combination with other products not approved by the manufacturer is not authorized; the user himself is responsible for such changes. The manufacturer is not liable for false results and incidents for these reasons. The manufacturer is not liable for any results by visual analysis of the patient samples.
- Only for in-vitro diagnostic use.
- All components of human origin used for the production of these reagents have been tested for anti-HIV antibodies, anti-HCV antibodies and HBsAg and have been found to be non-reactive. Nevertheless, all materials should still be regarded and handled as potentially infectious.
- 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 nevertheless these materials should be handled as potentially infectious.
- Do not interchange reagents or strips of different production lots.
- No reagents of other manufacturers should be used along with reagents of this test kit.
- Do not use reagents after expiry date stated on the label.
- Use only clean pipette tips, dispensers, and lab ware.
- Do not interchange screw caps of reagent vials to avoid cross-contamination.
- Close reagent vials tightly immediately after use to avoid evaporation and microbial contamination.
- After first opening and subsequent storage check conjugate and control vials for microbial contamination prior to further use.
- To avoid cross-contamination and falsely elevated results pipette patient samples and dispense conjugate without splashing accurately to the bottom of wells.
- 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.
- Some reagents contain a small amount of Proclin300® as preservative. Avoid contact with skin or mucosa.
- The ELISA is only designed for qualified personnel who are familiar with good laboratory practice.

WARNING:	Sulphuric acid irritates eyes and skin. Keep out of the reach of children. Upon contact with the eyes, rinse thoroughly with water and consult a doctor!
-----------------	--

13.1. Disposal Considerations

Residues of chemicals and preparations are generally considered as hazardous waste. The disposal of this kind of waste is regulated through national and regional laws and regulations. Contact your local authorities or waste management companies which will give advice on how to dispose hazardous waste.

For information about the packaging materials refer to PACKAGING MATERIALS.

14. ORDERING INFORMATION

REF

DNOV010

Urinary Cortisol

(96 Determinations)

1. INTRODUCCIÓN

El cortisol es una hormona esteroide liberada por la corteza suprarrenal en respuesta a una hormona llamada ACTH (producida por la glándula pituitaria), que está involucrada en la respuesta al estrés, aumenta la presión arterial, los niveles de azúcar en la sangre, puede causar infertilidad en las mujeres, y suprime el sistema inmunológico. El cortisol actúa a través de receptores intracelulares específicos y tiene efectos en numerosos sistemas fisiológicos, incluyendo la función inmune, la regulación en los niveles de glucosa, el tono vascular, la utilización de sustratos y el metabolismo óseo. El cortisol es excretado principalmente en la orina de forma libre. El cortisol se une, en el plasma, a partir de la globulina transportadora de corticosteroides (CBG, transcortin), con una alta afinidad, por la albúmina. La secreción de cortisol provoca desgaste muscular, la hiperglucemia, y suprime la respuesta inmunitaria / inflamatoria. La misma consecuencia que se derivan de un uso prolongado de medicamentos glucocorticoides. La fracción de cortisol libre representa el cortisol activo metabólicamente. En condiciones normales, menos del 1% se trata de excretaren la orina. En condiciones patológicas (síndrome de Cushing) los niveles de cortisol libre en orina se elevan, debido a que el CBG no limitan el cortisol plasmático en exceso y se elimina con la orina. Durante el embarazo o el tratamiento estro-progestágeno aumenta los niveles de cortisol plasmático causado por un incremento de la producción de la proteína de transporte, pero los niveles de cortisol libre en orina dan resultados normales para indicar correctamente la normalidad de las glándulas suprarrenales. Esta prueba es muy útil para estimar la función suprarrenal real, porque se determine la dosis de cortisol libre metabólicamente activo. Por otra parte la medición de cortisol libre en orina es el mejor parámetro para el diagnóstico del síndrome Cushing.

2. USO

Método inmunoenzimático competitivo y colorimétrico para la determinación cuantitativa de Cortisol Libre en orina humano.

3. FUNDAMENTO DE LA PRUEBA

Los pozos de microtitulación de las tiras se encuentran recubiertos con anticuerpos anti-Cortisol (fase sólida). El cortisol en la muestra compete por la unión a éstos anticuerpos con Cortisol marcado con peroxidasa de rábano picante (HRP por sus siglas en inglés *horseradish peroxidase*) o antígeno marcado con enzima. Una vez finalizada la incubación, se lleva a cabo una separación del complejo unido/libre mediante el lavado de la fase sólida. El complejo inmune formado por el antígeno marcado con enzima se visualiza mediante la adición de tetrametilbencidina (TMB), la cual produce un producto de reacción azul. La intensidad del color es **inversamente** proporcional a la cantidad de Cortisol presente en la muestra. El ácido sulfúrico se agrega para detener la reacción. Esto produce un color amarillo estable. La absorción a 450 nm se lee con un lector de microplacas de ELISA.

4. MATERIALES

4.1. Reactivos suministrados

- **Pozos recubiertos con anti-Cortisol:** 12 tiras de 8 pozos separables. Los pozos están recubiertas con anticuerpos anti-Cortisol y vienen empacados en una bolsa de papel de aluminio resellable.
- **Solución de parada:** 1 vial con 15 ml de ácido sulfúrico 0,15 mol/l (evitar cualquier contacto con la piel).
- **Conjugado Cortisol-HRP:** 1 vial con 33 ml de Cortisol marcada con peroxidasa de rábano, listo para el uso.
- **Solución de sustrato TMB:** 1 vial con 15 ml de 3, 3', 5, 5'-tetrametilbencidina (H_2O_2 -TMB 0,26 g/l) (evitar cualquier contacto con la piel).
- **Solución de lavado concentrada 10x:** 1 vial con 50 ml de una solución concentrada de buffer de fosfatos 0,2 M, Proclin < 0.0015 %.
- **Control bajo:** 1 vial contiene 1 ml; consulte la etiqueta para el valor exacto, listo para el uso
- **Control alto:** 1 vial contiene 1 ml; consulte la etiqueta para el valor exacto, listo para el uso.
- **Estándares de Cortisol:** 5 botellas, listo para el uso.

Estándar 0:	(4 ml)	0 ng/ml
Estándar 1:	(1 ml)	1 ng/ml
Estándar 2:	(1 ml)	5 ng/ml
Estándar 3:	(1 ml)	30 ng/ml
Estándar 4:	(1 ml)	200 ng/ml

4.2. Materiales suministrados

- 1 lámina autoadhesiva
- 1 instrucciones de uso

4.3. Materiales y equipos necesarios

- Incubadora de 37°C
- Lector de de ELISA equipado para medir absorbancia a 450 nm, 620-630 nm
- Equipo manual o automático para el lavado de los pozos
- Pipetas
- Agua destilada
- Tubos desechables
- Temporizador
- Agitador

5. ESTABILIDAD Y ALMACENAMIENTO

Los reactivos son estables hasta la fecha de caducidad indicada en la etiqueta cuando se almacenan a 2...8 °C en oscuridad.

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

6. PREPARACION DE LOS REACTIVOS

¡Es muy importante que tenga todos los reactivos, muestras y patrones a temperatura ambiente (22...28 °C) durante al menos 30 minutos antes de iniciar la ejecución de la prueba y mezclar cuidadosamente! ¡Al final del ensayo inmediatamente poner todos los reactivos a 2 – 8° C para evitar largos periodos a temperatura ambiente!

6.1. Tiras recubiertas rompibles

Las tiras vienen listas para ser usadas y se rompen para separar los pozos. Están recubiertas con anticuerpos anti-Cortisol. Se deben conservar a una temperatura de entre 2...8 °C. Abra la bolsa sólo cuando ésta se encuentre a temperatura ambiente. *Inmediatamente después de retirar las tiras que va a utilizar, asegúrese de guardar las tiras que no van a ser usados dentro de la bolsa de aluminio resellable junto con el desecante suministrado y almacenarla a una temperatura entre 2...8 °C; las tiras son estables hasta la fecha de caducidad.*

6.2. Conjugado Cortisol-HRP

La solución de conjugado de Cortisol HRP está lista para su uso. Mezclar suavemente durante 5 minutos en un mezclador.

Después de abierto es estable por 6 meses almacenado de 2 a 8 ° C.

6.3. Estándares de Cortisol

Los estándares están listos para ser usados y tienen las siguientes concentraciones de Cortisol:

Estándar 0:	0 ng/ml
Estándar 1:	1 ng/ml
Estándar 2:	5 ng/ml
Estándar 3:	30 ng/ml
Estándar 4:	200 ng/ml

Después de la primera apertura son estables por 6 meses de 2...8 °C.

6.4. Solución de sustrato TMB

El frasco contiene 15 ml de un sistema de tetrametilbencidina/peróxido de hidrógeno. El reactivo está listo para ser usado y debe ser almacenado a 2...8 °C en oscuridad. *La solución debe estar incolora o puede tener un ligero tinte azul. Si el sustrato se torna azul, esto indica que puede haberse contaminado y por lo tanto debe desecharse.*

6.5. Solución de lavado

Diluir la solución de lavado concentrada con agua destilada para alcanzar un volumen final de 500 ml antes de emplearla. Para volúmenes más pequeños, asegúrese de respetar una relación de 1:10. La solución de lavado diluida es estable durante 30 días si se almacena a 2...8 °C. 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.

6.6. Solución de parada

El frasco contiene 15 ml de solución de ácido sulfúrico 0,15 mol/l. Esta solución está lista para ser usada y debe ser almacenada a 2...8 °C.

6.7. Controls

Los controls están listos para ser usados.

7. RECOLECCIÓN Y PREPARACIÓN DE LAS MUESTRAS

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

Nota Importante: el Kit ha sido diseñado a ser usado en muestras de orina sin tratamiento; tratamientos de acidificación en la orina hacen que el valor del pH sea menor a 5.0 y esto puede interferir con el ensayo y producir resultados anormales.

No es necesario diluir las muestras de orina.

El volumen total de orina excretada en 24 horas debe ser recogido y mezclado en un contenedor de orina.

Las muestras que no se vayan a analizar inmediatamente deben almacenarse de 2...8 °C por un máximo de tiempo hasta de dos semanas. 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

7.1. Precauciones

- Algunos reactivos contienen pequeñas cantidades de Proclin 300^R como conservante. Evite el contacto con la piel o mucosas.
- La máxima precisión es necesaria al momento de dispensar los reactivos
- Evitar la exposición del sustrato TMB a la luz solar directa, metal u oxidantes. No congelan la solución
- Este método permite la determinación de Cortisol a partir de 0,47 ng/ml (LOD) a 200 ng/ml.
- El tratamiento del paciente con corticosteroides, esteroides sintéticos o naturales pueden afectar la determinación de Cortisol.

8. PROCEDIMIENTO

8.1. Preparación para la prueba

Por favor, leer cuidadosamente las instrucciones de uso del ensayo **antes** de realizar el ensayo. Para el buen funcionamiento de la técnica es necesario seguir las instrucciones. Antes de comenzar, especificar exactamente la repartición y posición de las muestras y de los estándares/controles. Seleccione el número necesario de tiras de microtitulación o pozos e insértelos en el soporte. El pipeteo de muestras no debe tomar más de diez minutos para evitar la deriva del análisis. Si utiliza más de una placa, se recomienda repetir la curva dosis-respuesta. Por favor, destinar al menos:

1 pozo (por ejemplo, A1)	para el blanco del sustrato
2 pozos (por ejemplo, B1+C1)	para el estándar 0
2 pozos (por ejemplo, D1+E1)	para el estándar 1
2 pozos (por ejemplo, F1+G1)	para el estándar 2
2 pozos (por ejemplo, H1+A2)	para el estándar 3
2 pozos (por ejemplo, B2+C2)	para el estándar 4
2 pozos (por ejemplo, D2+E2)	para el control bajo
2 pozos (por ejemplo, F2+G2)	para el control alto

Se recomienda determinar los estándares y muestras por duplicado.

Realice todos los pasos del ensayo en el orden indicado y sin retrasos apreciables entre los pasos.

Debe usar una punta desechable limpia para la dosificación de cada estándar y cada muestra.

1. Agregue 10 µl de estándares y muestras en sus respectivos pozos.
2. Agregue 300 µl de conjugado Cortisol-HRP a cada pozo excepto al pozo destinado para el blanco.
3. Cubra los pozos con la lámina autoadhesiva kit.
4. **Incube durante 1 hora a 37 °C.**
5. Cuando se complete el tiempo de incubación, retire la lámina autoadhesiva, aspire el contenido de los pozos. Lave cada pozo tres veces con 350 µl de solución de lavado diluida. Evite desbordamientos entre los pozos de reacción. 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.

Nota: ¡El lavado es crítico! Un lavado insuficiente resulta en una mala precisión y valores de absorbancia falsamente elevados.

6. Agregue 100 µl de solución de sustrato TMB en todos los pozos.
7. **Incube durante exactamente 15 minutos a temperatura ambiente (22...28 °C) en oscuridad.**
8. Agregue 100 µl de solución de parada en todos los pozos en el mismo orden y a la misma velocidad que agregó la solución de sustrato TMB. Agite la microplaca suavemente
Cualquier color azul desarrollado durante la incubación se convertirá en amarillo.
9. Mida la absorbancia de la muestra a 450 nm frente una segunda lectura de referencia a 620-630 nm o frente al blanco dentro de los 5 minutos.

8.2. Lectura

Ajuste el lector de placas de micropozos de ELISA a **cero** el pozo del **blanco del sustrato en el pozo A**.

¡Si por razones técnicas el lector de ELISA no se puede ajustar a cero con el blanco del sustrato en el pozo A1, restar el valor de absorbancia del pocillo A1 de todos los valores de absorbancia de las otras medidas con el fin de obtener resultados fiables!

Mida la absorbancia de todos los pozos a **450 nm** y registre los valores de absorbancia para cada estándar y muestras. Cuando sea necesario, calcule la **absorbancia media** de los duplicados.

9. RESULTADOS

9.1. Cálculo de los resultados

Calcule la absorbancia media para cada punto de la curva estándar y cada muestra. Grafique el valor medio de absorbancia de los estándares versus la concentración. Dibuje la curva que mejor se ajuste a los puntos trazados (Ej.: Logística de cuatro parámetros). Interpolar los valores de las muestras en la curva estándar para obtener los valores correspondientes para las concentraciones expresadas en ng/ml.

Para calcular la concentración de cortisol en la orina, se calcula con el valor del volumen total del volumen de orina recogidos en 24 horas:

$$\text{ng/ml} \times \text{Vol(ml)orina 24 h} / 1.000 = \mu\text{g Cortisol}/24 \text{ h}$$

9.2. 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 (24h)
1,5 - 63 $\mu\text{g}/24\text{h}$

10. CONTROL DE CALIDAD

Cada laboratorio debe evaluar controles bajos, normales y altos del cortisol en orina para supervisar el desempeño del ensayo. Estos controles deben ser tratados como muestras desconocidas y se deben determinar sus valores cada vez que se realice el ensayo. Se deben llevar gráficas de éstos controles de calidad para hacerle seguimiento al desempeño de los reactivos. Se deben emplear los métodos estadísticos pertinentes para verificar las tendencias. Cada laboratorio debe establecer los límites aceptables de desempeño para el ensayo. Otros parámetros que se deben controlar son los interceptos al 80, 50 y 20% de la curva estándar para evaluar la reproducibilidad intercorrida. Además, la absorción máxima debe ser consistente con la experiencia del laboratorio. Una desviación significativa del desempeño establecido puede indicar un cambio en las condiciones experimentales o la degradación de los reactivos. Deben usarse reactivos frescos para determinar la razón de las variaciones.

11. CARACTERÍSTICAS ESPECÍFICAS DE DESEMPEÑO

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, ácido acetilsalicílico, ibuprofeno y el ácido 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, ácido acetilsalicílico, ibuprofeno y el ácido ascórbico a la concentración analizada.

11.3.2. Reacción Cruzada

La reactividad cruzada fue calculada en el 50% de acuerdo a Abraham y se muestra a continuación:

Cortisol	100 %
Prednisolona	46.2 %
11 α Deoxicortisol	4 %
Cortisona	3.69 %
Prednisona	3.10 %
11αOH Progesterona	1 %
Progesterona	< 0.1 %
Aldosterona	< 0.1 %
Pregnenolona	< 0.1 %
17 beta Estradiol	< 0.1 %
Estrona 3-sulfato	< 0.1 %
Estriol	< 0.1 %
Testostérona	< 0.1 %
Espironolactona	< 0.1 %
DHEA	< 0.1 %
DHEA-S	< 0.1 %
Androstenodiona	< 0.1 %
Androsterona	< 0.1 %
DHT	< 0.1 %
Danazol	< 0.1 %
Colesterol	< 0.1 %
Dexamethasona	< 0.1 %

11.4. Correlación

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

La curva de regresión lineal es:

$$Y = 1,008X - 0,5019$$

$$r^2 = 0,83$$

12. LIMITACIONES DEL PROCEDIMIENTO

Muestras que es contaminada microbiológicamente, no deben utilizarse en el ensayo. Es importante que el tiempo de reacción en cada pozo se mantenga constante para obtener resultados reproducibles. El pipeteo de las muestras no debe tomar más de diez minutos para evitar la deriva del análisis. Se recomienda repetir la curva dosis-respuesta si se utiliza más de una placa. La adición de la solución de sustrato inicia una reacción cinética que es finalizada por la adición de la solución de parada. Por lo tanto, el sustrato y la solución de parada se deben agregar siguiendo la misma secuencia para eliminar cualquier desviación de tiempo durante la reacción. Los lectores de placa miden verticalmente. No toque el fondo de los pozos. 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 de ELISA, se recomienda aumentar el número de lavados.

13. PRECAUCIONES Y ADVERTENCIAS

- En cumplimiento con el Artículo 1, Párrafo 2b de la Directiva 98/79/CE del Parlamento Europeo sobre el uso de dispositivos médicos para diagnóstico in vitro, es responsabilidad del fabricante asegurar la idoneidad, desempeño y seguridad del producto. Por lo tanto, el procedimiento de prueba, la información, precauciones y advertencias contenidas en las instrucciones de uso deben ser seguidas estrictamente. El uso de los kits con analizadores y equipos similares debe ser validado. No está autorizado realizar ningún cambio en el diseño, composición y procedimiento del ensayo, así como ningún uso en combinación con otros productos no aprobados por el fabricante; el usuario es responsable de tales cambios. El fabricante no se hace responsable por resultados falsos o por cualquier incidente causado por esta razón. El fabricante no se responsabiliza por los resultados obtenidos mediante el análisis visual de las muestras de los pacientes.
- Sólo para uso en diagnóstico in vitro.
- Todos los componentes de origen humano utilizados para la producción de estos reactivos han sido examinados para determinar la presencia de anticuerpos anti-VIH, anticuerpos anti-HCV y anticuerpos anti-HBsAg y se ha determinado que no son reactivos. Sin embargo, todo el material debe ser considerado y tratado como potencialmente infeccioso.
- El material de origen animal utilizado en la preparación del kit se ha obtenido de animales certificados como sanos y la proteína bovina se ha obtenido de países no infectados con EEB, sin embargo, este material debe ser considerado y tratado como potencialmente infeccioso.
- No intercambiar reactivos o tiras de diferentes lotes de producción.
- No se deben utilizar reactivos de otros fabricantes en combinación con los reactivos de este kit.
- No utilizar los reactivos después de la fecha de caducidad indicada en la etiqueta.
- Use sólo puntas para micropipeta, dispensadores y material de laboratorio limpio.
- No intercambie las tapas de los viales. Esto evita la contaminación cruzada.
- Cierre los viales de los reactivos con fuerza inmediatamente después de usarlos para evitar la evaporación y contaminación microbiana.
- Después de abrir el kit por primera vez y almacenarlo, verifique que los viales del conjugado y los estándares no presenten contaminación microbiana antes de continuar usándolo.
- Para prevenir la contaminación cruzada y la obtención de resultados falsamente elevados, pipetee las muestras de los pacientes y dispense el conjugado con exactitud hacia el fondo de los pozos evitando que se produzcan salpicaduras.
- El sustrato de TMB contiene un irritante, que puede ser nocivo si es inhalado, ingerido o absorbido por la piel. Para evitar lesiones, evite la inhalación, ingestión o contacto con la piel y los ojos.
- La solución de parada consiste en una solución de ácido sulfúrico diluido. El ácido sulfúrico es venenoso y corrosivo y se puede tóxico si se ingiere. Para evitar quemaduras, evite contacto con la piel y los ojos.
- Además de la solución de sustrato TMB inicia una reacción cinética, que es terminada por la adición de la solución de parada. Por lo tanto, el sustrato TMB y la solución de parada debe ser añadido en la misma secuencia para eliminar cualquier desviación de tiempo durante la reacción.
- Algunos reactivos contienen pequeñas cantidades de Proclin 300® como conservante. Evite el contacto con la piel o mucosas.
- La prueba por ELISA es únicamente para personal calificado que esté familiarizado con buenas prácticas de laboratorio.

ADVERTENCIA:

El ácido sulfúrico irrita los ojos y la piel. Manténgalo fuera del alcance de los niños. ¡Si entra en contacto con los ojos, lavar con abundante agua y consultar a un médico!

13.1. CONSIDERACIONES PARA EL DESCARTE

Los residuos de productos y preparaciones químicos generalmente son considerados como residuos peligrosos. La eliminación de éste tipo de residuos está regulada por leyes y regulaciones nacionales y regionales. Póngase en contacto con las autoridades locales o empresas de manejo de residuos para que lo asesoren sobre cómo eliminar los residuos peligrosos.

Para obtener información sobre los materiales de embalaje, consulte MATERIALES DE EMBALAJE.

14. INFORMACIÓN PARA PEDIDOS

REF	DNOV010	Urinary Cortisol	(96 Determinaciones)
------------	---------	------------------	----------------------

LITERATURE/ BIBLIOGRAFÍA

Foster, L. B. and Dunn, R.T. (1974) Clin. Chem 20 (3), 365.


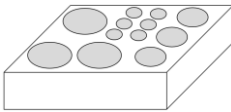


De Lacerda, L., Kowarski, A., and Migeon, C.J. (1973) J. Clin. Endocr. and Metab 36, 227.

Rolleri, E., Zannino, M., Orlandini, S. and Malvano, R. (1976) Clin chim Acta 66, 319.







Kobayashi, Y. et al. (1978) Steroids 32 (1), 137 – 44.

Arakawa, H., Maeda, M., Tsuji, A. (1979) Anal. Biochem. 97, 248.

Packaging materials/ Materiales de embalaje

 <p>PAP 21</p>	 <p>PAP 21</p>	 <p>PAP 22</p>	<div style="border: 1px solid black; padding: 2px; text-align: center;">MTP</div>  <p>ALU / LDPE 90</p>
--	--	--	--

SYMBOLS KEY / SIMBOLOS

	Manufactured by / Fabricado por
IVD	In Vitro Diagnostic Medical Device/ Producto para diagnóstico in vitro
LOT	Lot Number/ Número de lote
	Expiration Date/ Fecha de caducidad
	Storage Temperature / Temperatura de almacenamiento
	Keep away from sunlight / Mantener alejado de la luz solar
CE	CE Mark/ Marca CE
UDI	Unique Device Identifier/ identificación única del producto /
REF	Catalogue Number/ Número de Catálogo
	Consult Instructions for Use / Consulte las Instrucciones de Uso
MTP	Microplate/ / Microplaca
CONJ	Conjugate/ / Conjugado
WASH BUF 10x	Washing solution 10x concentrated / solución de lavado concentrado x10
CONTROL H	High Control/ control bajo
CONTROL L	Low Control / control alto
CAL	Standard / Estándar
SOLN STOP	Stop solution/ / Solución de parada
SUB TMB	TMB Substrate solution/ solución substrato TMB
	Contains sufficient for "n" tests / Contenido suficiente para "n" tests

SCHEME OF THE ASSAY

Urinary Cortisol

Test Preparation

Prepare reagents and samples as described.
Establish the distribution and identification plan for all specimens and controls.
Select the required number of microtiter strips or wells and insert them into the holder.

Assay Procedure

	Substrate blank	Standard 0	Standard 1	Standard 2	Standard 3	Standard 4	Sample/ Controls
Standard 0	-	10 µl	-	-	-	-	-
Standard 1	-	-	10 µl	-	-	-	-
Standard 2	-	-	-	10 µl	-	-	-
Standard 3	-	-	-	-	10 µl	-	-
Standard 4	-	-	-	-	-	10 µl	-
Sample/ Controls	-	-	-	-	-	-	10 µl
Conjugate	-	300 µl	300 µl	300 µl	300 µl	300 µl	300 µl
<p>Cover wells with foil supplied in the kit</p> <p>Incubate for 1 h at 37 °C</p> <p>Wash each well three times with 350 µl diluted wash solution</p> <p>Important note: Gently shake the plate for 5 sec at each washing step to ensure proper cleaning. At the end carefully remove remaining fluid by tapping strips on tissue paper prior to the next step!</p> <p>Automatic washer: In case you use automatic equipment, wash the wells at least 6 times.</p>							
TMB Substrate	100 µl	100 µl	100 µl	100 µl	100 µl	100 µl	100 µl
<p>Incubate for exactly 15 min at room temperature (22-28 °C) in the dark</p>							
Stop Solution	100 µl	100 µl	100 µl	100 µl	100 µl	100 µl	100 µl
<p>Shake the microplate gently.</p> <p>Photometric measurement at 450 nm, 620 – 630 nm</p>							



Gold Standard Diagnostics Frankfurt GmbH

Waldstrasse 23 A6

63128 Dietzenbach, Germany

Tel.: +49 6074 23698-0

Fax: +49 6074 23698-900

E-Mail: info.frankfurt@eu.goldstandarddiagnostics.com

Website: clinical.goldstandarddiagnostics.com

DNOV010_uCORT_IFU_rev01_fromLot_6130AN