



DCM001-12
Ed. 11/2016

CORTISOL ELISA

per analisi di routine

Determinazione immunoenzimatica diretta del Cortisolo nel siero o plasma umano

IVD



LOT

Vedere etichetta esterna

2°C 8°C



Σ = 96 test

REF DKO001

DESTINAZIONE D'USO

Metodo competitivo immunoenzimatico colorimetrico per la determinazione quantitativa della concentrazione del Cortisolo nel siero o plasma umano.

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

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 nel plasma è legato dalla globulina legante i corticosteroidi (CBG, transcortin) con alta affinità e dall'albumina. Soltanto il cortisolo libero è disponibile ai recettori.

La quantità di cortisolo presente nel siero subisce variazioni durante la giornata: sono presenti livelli elevati al mattino presto e livelli più bassi di sera, parecchie ore dopo l'inizio di sonno. I livelli elevati sono presenti circa tra le 6 e le 8 ed i più bassi livelli sono presenti intorno a mezzanotte. 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.

2. PRINCIPIO DEL METODO

Il cortisolo (antigene) presente nel campione compete con il cortisolo antigenico 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. Successivamente, l'enzima HRP presente nella frazione legata catalizza la reazione tra il Substrato

(H₂O₂) ed il TMB-Substrate (TMB), sviluppando una colorazione blu che vira al giallo dopo aggiunta della Stop Solution (H₂SO₄).

L'intensità del colore sviluppato è inversamente proporzionale alla concentrazione del 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. Calibrators (5 flaconi, 1 mL ciascuno)

CAL0	REF DCE002/0106-0
CAL1	REF DCE002/0107-0
CAL2	REF DCE002/0108-0
CAL3	REF DCE002/0109-0
CAL4	REF DCE002/0110-0

2. Control (1 flacone, 1 mL)

La concentrazione del Controllo è indicata sul Certificato di Analisi REF DCE045/0103-0

3. Conjugate (1 flacone, 21 mL)

Cortisolo coniugato con Perossidasi di rafano (HRP) REF DCE002/0102-0

4. Coated Microplate (1 micropiastra breakable)

Anticorpi anti Cortisolo adsorbiti sulla micropiastra REF DCE002/0103-0

5. TMB Substrate (1 flacone, 15 mL)

H₂O₂-TMB (0,26 g/L) (evitare il contatto con la pelle) REF DCE004-0

6. Stop Solution (1 flacone, 15 mL)

Acido Solforico 0,15 mol/L (evitare il contatto con la pelle) REF DCE005-0

7. 10X Conc. Wash Solution (1 flacone, 50 mL)

Tampone fosfato 0,2M, pH 7.4 REF DCE054-0

3.2. Reattivi necessari non forniti nel kit

Acqua distillata.

3.3. Materiale e strumentazione ausiliari

Dispensatori automatici.

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

Note

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

Aprire la busta del Reattivo 4 (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 test 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 300^R 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 10 ng/mL a 500 ng/mL.
- La somministrazione di steroidi naturali o sintetici può alterare i livelli ematici 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 2-8°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 (22-28°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 controlli e/o pool di sieri.
- Osservare la massima precisione nella ricostituzione e dispensazione dei reagenti.
- Non usare campioni microbiologicamente contaminati, altamente lipemici o emolizzati.
- I lettori di micropiastre leggono l'assorbanza verticalmente. Non toccare il fondo dei pozzetti.

6. PROCEDIMENTO

6.1. Preparazione dei Calibratori (C₀...C₄)

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

	C ₀	C ₁	C ₂	C ₃	C ₄
ng/mL	0	10	50	150	500

I Calibratori sono stabili fino alla data di scadenza riportata in etichetta. Dopo l'apertura dei flaconi sono stabili 6 mesi a 2-8°C.

6.2. Preparazione del Coniugato

Coniugato pronto all'uso. Mescolare delicatamente per almeno 5 minuti su agitatore rotante. Dall'apertura del flacone è stabile 6 mesi a 2-8°C.

6.3. Preparazione del Campione

La determinazione del Cortisolo con questo kit può essere effettuata su plasma o su siero umano. Se il dosaggio non viene effettuato lo stesso giorno del prelievo conservare il campione a -20°C. Evitare cicli di congelamento e scongelamento del campione. Il Controllo è pronto all'uso.

6.4. 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 2-8°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.

6.5. Procedimento

- **Portare tutti i reagenti a temperatura ambiente (22-28°C) per almeno 30 minuti.** Al termine del dosaggio riporre immediatamente tutti i reagenti a 2-8°C: evitare lunghi periodi a temperatura ambiente.
- Le strisce di pozzetti non utilizzate devono essere rimesse immediatamente nella busta richiudibile contenente il materiale essicante e conservate a 2-8°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 (C₀-C₄), due per ogni Controllo, due per ogni Campione ed uno per il Bianco.

Reagente	Calibratore	Campione /Controllo	Bianco
Calibratore C ₀ -C ₄	20 µL		
Campione/ Controllo		20 µL	
Conjugate	200 µL	200 µL	
Incubare 1 ora a 37°C. Allontanare la miscela di reazione. Lavare i pozzetti 3 volte con 0,3 mL 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.			
TMB Substrate	100 µL	100 µL	100 µL
Incubare 15 minuti al buio a temperatura ambiente (22÷28°C).			
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.			

7. CONTROLLO QUALITA'

Ogni laboratorio dovrebbe analizzare i campioni nella gamma dei livelli elevati, normali e bassi di Cortisolo per il controllo delle prestazioni dell'analisi. Questi campioni dovrebbero essere trattati come ignoti ed i valori determinati in ogni test effettuato.

Occorrerebbe compilare delle tabelle di controllo di qualità per seguire le prestazioni dei reagenti forniti. Si suggerisce di utilizzare metodi statistici adeguati per verificare 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. Inoltre, la capacità di assorbimento massima dovrebbe essere costante con le prove precedenti. 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.

8. RISULTATI

8.1. Estinzione Media

Calcolare l'estinzione media (Em) di ciascun punto della curva di calibrazione (C₀-C₄) e di ogni campione.

8.2. Curva di calibrazione

Tracciare su un grafico delle assorbanze i valori calcolati delle estinzioni medie (Em) di ciascun calibratore (C₀-C₄) in funzione delle concentrazioni. Tracciare la miglior curva passante per i punti di calibrazione (es: Four Parameter Logistic).

8.3. Calcolo dei risultati

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

9. VALORI DI RIFERIMENTO

Le concentrazioni seriche o plasmatiche di Cortisolo sono comprese nei seguenti intervalli:

60 - 230 ng/mL prelievo effettuato tra le 8 e le 10 A.M.
30 - 150 ng/mL prelievo effettuato alle 4 P.M.

Pazienti trattati con ACTH: 280 - 600 ng/mL

Pazienti trattati con desametasone: 0 - 50 ng/mL

10. PARAMETRI CARATTERISTICI

10.1. Precisione

10.1.1. Intra-Assay

La variabilità all'interno dello stesso dosaggio è stata determinata replicando (16x) la misura di tre differenti sieri. La variabilità intra-assay è $\leq 5,1\%$.

10.1.2. Inter-Assay

La variabilità tra dosaggi differenti è stata determinata replicando (10x) la misura di tre differenti sieri con kit appartenenti a lotti diversi. La variabilità inter-assay è $\leq 11,0\%$.

10.2. Specificità: cross reagenti

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

Cross Reagent	% Cross Reactivity
Cortisol	100 %
Prednisolone	46,20 %
11-Deoxycortisol	4,00 %
Cortisone	3,69 %
Prednisone	3,10 %
Corticosterone	1,34 %
11 α OH Progesterone	1,00 %
Progesterone	< 0,01 %
Aldosterone	< 0,01 %
Pregnenolone	< 0,01 %
17 β Estradiolo	< 0,01 %
Estrone 3-solfato	< 0,01 %
Estriolo	< 0,01 %
Testosterone	< 0,01 %
Spironolactone	< 0,01 %
DHEA	< 0,01 %
DHEA-S	< 0,01 %
Androstenedione	< 0,01 %
Androsterone	< 0,01 %
DHT	< 0,01 %
Danazolo	< 0,01 %
Colesterolo	< 0,01 %
Desametasone	< 0,01 %

10.3. Specificità: sostanze interferenti

L'interferenza da Bilirubina, Emoglobina e Trigliceridi è stata testata con il kit Diametra Cortisol ELISA:

Sostanza	Conc. testata	Interferenza
Bilirubina	0,2 mg/mL	No
Emoglobina	2 mg/mL	No
Trigliceridi	6 mg/mL	No

Non è stata osservata interferenza con nessuna delle sostanze indagate; per le buone pratiche di laboratorio, si raccomanda comunque di non utilizzare campioni altamente lipemici o emolizzati.

10.4. Specificità: plasma e SST tube

È stata valutata l'interferenza in campioni plasmatici e in campioni ottenuti con SST (serum separation tube). Come riferimento è stato utilizzato siero ottenuto dal medesimo paziente.

Campione	Interferenza
SST (serum separation tube)	No
EDTA plasma	No
Litio-eparina plasma	No
Sodio-eparina plasma	No

Non sono state osservate interferenze.

10.5. Accuratezza

La prova di recupero condotta su campioni arricchiti con 15 - 35 - 70 ng/mL di Cortisolo, ha dato un valore medio ($\pm$ SD) di $101,61\% \pm 4,42\%$.

La prova di diluizione condotta su 3 campioni di siero diluiti 2, 4, e 8 volte ha dato un valore medio di $106,18\% \pm 4,68\%$.

10.6. Sensibilità

La concentrazione minima di cortisolo misurabile che può essere distinta dal Calibratore 0 è 2,42 ng/mL con un limite di confidenza del 95%.

10.7. Correlazione

Il kit Cortisol ELISA Diametra è stato comparato con un kit disponibile in commercio.

Sono stati testati 61 campioni di siero.

La curva di regressione è:

$$Y = 1,09 \cdot X - 19,23$$

$$r^2 = 0,904$$

11. DISPOSIZIONI PER LO SMALTIMENTO

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

BIBLIOGRAFIA

1. Foster, L. B. and Dunn, R.T.
Clin. Chem: 20/3, 365 (1974)
2. De Lacerda, L., Kowarski, A., and Migeon, C.J.
J. Clin. Endocr. and Metab: 36, 227 (1973)
3. Roller, 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. 97 248 (1979)

Ed. 11/2016

DCM001-12

DiaMetra S.r.l. Headquater: Via Calabria 15,
20090 SEGRATE (MI) Italy

Tel. +39-02-2139184 / Fax +39-02-2133354

Manufactory: Via Pozzuolo 14,
06038 SPELLO (PG) Italy

Tel. +39-0742-24851 / Fax +39-0742-316197

E-mail: info@diametra.com



DCM001-12
Ed. 11/2016

CORTISOL ELISA

Direct immunoenzymatic determination of Cortisol in human serum or plasma

for routine analysis

IVD



LOT

See external label

2°C 8°C



$\Sigma = 96$ tests

REF DKO001

INTENDED USE

Competitive immunoenzymatic colorimetric method for quantitative determination of Cortisol concentration in human serum or plasma.

Cortisol ELISA kit is intended for laboratory use only.

1. CLINICAL SIGNIFICANCE

Cortisol is a steroid hormone released from the adrenal cortex in response to a 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.

The amount of cortisol present in the serum undergoes diurnal variation, with the highest levels present in the early morning, and lower levels in the evening, several hours after the onset of sleep. Highest levels are at about 6-8 a.m. and lowest levels are at about midnight. 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.

2. PRINCIPLE OF THE METHOD

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 blu color 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. Calibrators (5 vials, 1 mL each)

CAL0	REF DCE002/0106-0
CAL1	REF DCE002/0107-0
CAL2	REF DCE002/0108-0
CAL3	REF DCE002/0109-0
CAL4	REF DCE002/0110-0

2. Control (1 vial, 1 mL)

See Control concentration on the Certificate of Analysis
REF DCE045/0103-0

3. Conjugate (1 vial, 21 mL)

Cortisol conjugated with Horseradish peroxidase (HRP)
REF DCE002/0102-0

4. Coated Microplate (1 breakable microplate)

Microplate coated with anti Cortisol antibodies
REF DCE002/0103-0

5. TMB Substrate (1 vial, 15 mL)

H_2O_2 -TMB 0.26 g/L (avoid any skin contact)
REF DCE004-0

6. Stop Solution (1 vial, 15 mL)

Sulphuric acid 0.15 mol/L (avoid any skin contact)
REF DCE005-0

7. 10X Conc. Wash Solution (1 vial, 50 mL)

Phosphate buffer 0.2M pH 7.4
REF DCE054-0

3.2. Reagents necessary not supplied

Distilled water.

3.3. Auxiliary materials and instrumentation

Automatic dispenser.

Microplates reader (450 nm, 620-630 nm)

Notes

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

Open the bag of reagent 4 (Coated Microplate) only when it is at room temperature and close it immediately after use; once opened, it is stable up to 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^R 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 10 ng/mL to 500 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 2-8°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 (22-28°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 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 and/or pooled sera.
- Maximum precision is required for reconstitution and dispensation of the reagents.
- Samples microbiologically contaminated, highly lipemic or haemolysed should not be used in the assay.
- Plate readers measure vertically. Do not touch the bottom of the wells.

6. PROCEDURE

6.1. Preparation of the Calibration (C₀...C₄)

The Calibrators are ready for use and have the following concentration of Cortisol:

	C ₀	C ₁	C ₂	C ₃	C ₄
ng/mL	0	10	50	150	500

The Calibrators are stable until the expiry date printed on the label. Once opened, the Calibrators are stable 6 months at 2-8°C.

6.2. Preparation of the conjugate

The conjugate is ready to use. Mix gently, for 5 minutes, with a rotating mixer.

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

6.3. Preparation of the Sample

The determination of Cortisol with this kit can be performed in human plasma as well as in serum.

Store the sample at -20°C if the determination is not performed on the same day of the sample collection. Avoid repetitive freezing and thawing of samples.

The Control is ready for use.

6.4. Preparation of Wash Solution

Dilute the content of each vial of the "10X Conc. Wash 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 wash solution is stable for 30 days at 2-8°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.

6.5. Procedure

- **Allow all reagents to reach room temperature (22-28°C) for at least 30 minutes.** At the end of the assay, store immediately the reagents at 2-8°C: avoid long exposure to room temperature.
- Unused coated microwell strips should be released securely in the foil pouch containing desiccant and stored at 2-8°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 (C₀-C₄), two for each Control, two for each sample, one for Blank.

Reagent	Calibrator	Sample/ Control	Blank
Calibrator C ₀ -C ₄	20 µL		
Sample/ Control		20 µL	
Conjugate	200 µL	200 µL	
Incubate 1 hour at 37°C. Remove the contents from each well. Wash the wells 3 times with 300 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. Automatic washer: in case you use an automatic washer, it is advised to do 6 washing steps.			
TMB Substrate	100 µL	100 µL	100 µL
Incubate 15 minutes in the dark at room temperature (22÷28°C).			
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.			

7. QUALITY CONTROL

Each laboratory should assay controls at normal, high and low levels range of 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 calibration 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.

8. RESULTS

8.1. Mean Absorbance

Calculate the mean of the absorbance (Em) for each point of the calibration curve (C₀-C₄) and of each sample.

8.2. Calibration Curve

Plot the mean value of absorbance (Em) of the calibrators (C₀-C₄) against concentration. Draw the best-fit curve through the plotted points. (es: Four Parameter Logistic).

8.3. Calculation of Results

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

9. REFERENCE VALUES

The serum or plasma Cortisol reference values are:

60 - 230 ng/mL beetwen 8.00 – 10.00 A.M.
 30 – 150 ng/mL at 4.00 P.M.

Patient treated with ACTH: 280 - 600 ng/mL
 Patient treated with dexamethasone: 0 - 50 ng/mL

10. PERFORMANCE AND CHARACTERISTICS

10.1. Precision

10.1.1. Intra Assay

Within run variation was determined by replicate (16x) the measurement of three different sera in one assay. The within assay variability is ≤ 5.1%.

10.1.2. Inter Assay

Between run variation was determined by replicate (10x) the measurement of three different sera in different lots. The between assay variability is ≤ 11.0%.

10.2. Specificity: cross reagents

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

Cross Reagent	% Cross Reactivity
Cortisol	100 %
Prednisolone	46.20 %
11-Deoxycortisol	4.00 %
Cortisone	3.69 %
Prednisone	3.10 %
Corticosterone	1.34 %
11 α OH Progesterone	1.00 %
Progesterone	< 0.01 %
Aldosterone	< 0.01 %
Pregnenolone	< 0.01 %
17 β Estradiol	< 0.01 %
Estrone 3-solfato	< 0.01 %
Estriol	< 0.01 %
Testosterone	< 0.01 %
Spironolactone	< 0.01 %
DHEA	< 0.01 %
DHEA-S	< 0.01 %
Androstenedione	< 0.01 %
Androsterone	< 0.01 %
DHT	< 0.01 %
Danazol	< 0.01 %
Cholesterol	< 0.01 %
Dexamethasone	< 0.01 %

10.3. Specificity: interfering substances

Interference by Bilirubin, Hemoglobin and Triglycerides has been investigated in Diametra Cortisol ELISA kit:

Substance	Assayed Conc.	Interference
Bilirubina	0.2 mg/mL	No
Emoglobina	2 mg/mL	No
Trigliceridi	6 mg/mL	No

No interference has been observed with the substances under investigation; anyway, according to good laboratory practices, avoid to use highly lipemic or haemolysed samples.

10.4. Specificity: plasma and SST tube

Interference in plasma and SST (serum separation tube) samples has been evaluated. Serum obtained from the same patient has been used as reference.

Sample	Interference
SST (serum separation tube)	No
EDTA plasma	No
Litio-eparina plasma	No
Sodio-eparina plasma	No

No interference has been observed.

10.5. Accuracy

The recovery of 15 - 35 - 70 ng/mL of Cortisol added to samples gave an average value ($\pm$ SD) of 101.61% $\pm$ 4.42% with reference to the original concentrations.

The dilution test performed on three sera diluted 2 - 4 and 8 times gave an average value ($\pm$ SD) of 106.18% $\pm$ 4.68%.

10.6. Sensitivity

The lowest detectable concentration of cortisol that can be distinguished from the Calibrator zero is 2.42 ng/mL at the 95% confidence limit.

10.7. Correlation

Diametra Cortisol ELISA kit has been compared to a commercially available chemiluminescence Cortisol kit. 61 serum samples have been analysed.

The linear regression curve has been calculated:

$$Y = 1.09 \cdot X - 19.23$$

$$r^2 = 0.904$$

11. WASTE MANAGEMENT

Reagents must be disposed off in accordance with local regulations.

BIBLIOGRAPHY

1. Foster, L. B. and Dunn, R.T.
Clin. Chem: 20/3, 365 (1974)
2. De Lacerda, L., Kowarski, A., and Migeon, C.J.
J. Clin. Endocr. and Metab: 36, 227 (1973)
3. Roller, 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. 97 248 (1979)

Ed. 11/2016

DCM001-12

DiaMetra S.r.l. Headquarter: Via Calabria 15,
20090 SEGRATE (MI) Italy
Tel. +39-02-2139184
Fax +39-02-2133354
Manufactory: Via Pozzuolo 14,
06038 SPELLO (PG) Italy
Tel. +39-0742-24851
Fax +39-0742-316197
E-mail: info@diametra.com



DCM001-12
Ed. 11/2016

CORTISOL ELISA

para análisis de rutina

Determinación inmunoenzimática directa de Cortisol en suero o plasma humano

IVD



Ver etiqueta externa

LOT

2°C 8°C



Σ = 96 ensayos

REF DKO001

USO PREVISTO

Método inmunoenzimático colorimétrico competitivo para la determinación cuantitativa de la concentración de cortisol en suero y plasma.

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

1. IMPORTANCIA CLÍNICA

El cortisol es una hormona esteroide liberada por la corteza suprarrenal en respuesta a la hormona ACTH (producida por la glándula pituitaria), está involucrado en la respuesta al estrés, aumenta la presión arterial, la azúcar en la sangre, puede causar infertilidad en las mujeres, y suprime el sistema inmunológico.

El cortisol actúa a través de receptores específicos intracelulares y tiene efectos en muchos sistemas fisiológicos, incluyendo el sistema inmune, regulación de la glucosa, el tono vascular, la utilización de sustratos y el metabolismo óseo. El cortisol se excreta principalmente en orina en su forma libre, no unida a proteína de transporte. El cortisol en el plasma se une a globulina transportadora de corticosteroides (CBG, transcortin) con gran afinidad y a la albumina. Sólo el cortisol libre está disponible para los receptores.

La cantidad de cortisol en el suero es sujeta a cambios durante el día: está presente en altos niveles en la mañana y los niveles más bajos por la noche, varias horas después del inicio del sueño. Los niveles mas altos se alcanzan entre las 6:00 y 8:00 horas AM y los niveles más bajos alrededor de la medianoche. 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.

2. PRINCIPIO DEL MÉTODO

El cortisol (antígeno) de la muestra compete con el cortisol antigénico marcado con peroxidasa de rabano (HRP) qui es en el Conjugato por la unión al anticuerpo anti-cortisol adsorbido en la microplaca (fase sólida).

Después de la incubación, la separación de las fracciones libre y unida se obtiene mediante un simple lavado de la fase sólida.

Por ultimo, al reaccionar con el sustrato (H₂O₂) y el sustrato TMB (TMB), la enzima HRP presente en la fracción unida desarrolla una coloración azul que se torna amarilla tras añadir la solución de interrupción (H₂SO₄).

La intensidad del color desarrollado es inversamente proporcional a la concentración de Cortisol en la muestra.

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

3. REACTIVOS, MATERIALES E INSTRUMENTOS

3.1 Reactivos y materiales incluidos en el kit

1. Calibradores (5 frascos, 1 ml cada uno)

CAL0

REF DCE002/0106-0

CAL1

REF DCE002/0107-0

CAL2

REF DCE002/0108-0

CAL3

REF DCE002/0109-0

CAL4

REF DCE002/0110-0

2. Control (1 frasco, 1 mL)

La concentración del Control se indica en el certificado de análisis (Certificate of Analysis)

REF DCE045/0103-0

3. Conjugado (1 frasco, 21 mL)

Cortisol conjugado con peroxidasa de rábano (HRP)

REF DCE002/0102-0

4. Microplaca recubierta (1 microplaca divisible)

Anticuerpo anti cortisol absorbido en la microplaca

REF DCE002/0103-0

5. Sustrato TMB (1 frasco, 15 mL)

H₂O₂ -TMB (0,26 g/L) (evítese el contacto con la piel)

REF DCE004-0

6. Solución de parada (1 frasco, 15 mL)

Ácido sulfúrico 0,15 mol/L (evítese el contacto con la piel)

REF DCE005-0

7. Solución de lavado conc.10X (1 frasco, 50 mL)

Tampón fosfato 0,2M pH 7.4

REF DCE054-0

3.2 Reactivos necesarios no incluidos en el kit

Agua destilada

3.3 Material e instrumental auxiliar

Dispensadores automáticos

Lector de microplacas (450 nm, 620-630 nm).

Notas

Conservar los reactivos a oscuras, a temperatura entre 2 y 8 °C.

Llevar a temperatura ambiente la bolsa del reactivo 4 (microplaca recubierta) antes de abrirla; cerrarla de inmediato después de sacar las tiras que se han de utilizar; una vez abierta, la microplaca se mantiene estable hasta la fecha de caducidad indicada.

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 utilizados para la elaboración de este kit se obtuvieron a partir de animales sanos y las proteínas de bovino se obtuvieron de los países no afectados por la EEB, aun así estos materiales se deben manejar como potencialmente infecciosos.
- Algunos reactivos contienen pequeñas cantidades de Proclin 300^R 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 la determinación de cortisol de 10 ng/mL hasta 500 ng/mL.
- La administración de esteroides naturales o sintéticos, pueden alterar los niveles de cortisol en sangre.

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 2-8 °C en sus recipientes originales. Todas las excepciones están claramente marcados. 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 (22-28°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 ha 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 inicia una reacción cinética que termina al agregar la solución de Parada. Tanto el sustrato 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 al comprobar controles y/o pool de sueros.
- Observar la máxima precisión en la reconstitución y dispensación de los reactivos.
- No use muestras con contaminación microbiana, altamente lipémicas o hemolizadas.
- Los lectores de microplacas leen las DO verticalmente, por tanto no debe tocarse el fondo de los pocillos.

6. PROCEDIMIENTO

6.1. Preparación de los Calibradores (C₀...C₄)

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

	C ₀	C ₁	C ₂	C ₃	C ₄
ng/mL	0	10	50	150	500

Los Calibradores son estables hasta la fecha de caducidad impresa en la etiqueta. Una vez abiertos, los Calibradores permanecen estables 6 meses conservados a 2-8 °C.

6.2. Preparación del Conjugado

Conjugado listo para usar. Mezclar suavemente durante 5 minutos en un agitador rotatorio. Desde la apertura de la botella es estable 6 meses a 2-8°C.

6.3. Preparación de la muestra

La determinación de cortisol se puede realizar en el plasma o suero humano.

Si la dosis no se llevó a cabo el mismo día de la recolección, mantener la muestra a -20°C. Se recomienda no congelar y descongelar repetidamente las muestras.

El Control está listo para usar.

6.4. 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÷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.

6.5. Procedimiento

- **Esperar hasta que todos los reactivos se encuentren a temperatura ambiente (22-28°C) durante al menos 30 minutos.** Al final del ensayo inmediatamente poner todos los reactivos a 2-8°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 2-8°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 (C₀-C₄), dos para cada control, dos para cada muestra, uno para el blanco.

Reactivo	Calibrad.	Muestra/ Control	Blanco
Calibradores C ₀ -C ₄	20 µL		
Muestra/ Control		20 µL	
Conjugado	200 µL	200 µL	
Incubar 1 h a 37°C. Retirar la mezcla de reacción. Lave los pozos 3 veces con 0,3 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.			
Substrato TMB	100 µL	100 µL	100 µL
Incubar 15 minutos a temperatura ambiente (22÷28°C), protegida de la luz.			
Solución de parada	100 µL	100 µL	100 µL
Agitar suavemente la placa. Leer la absorbancia (E) a 450 nm frente una segunda lectura de referencia a 620-630 nm o frente al blanco entre 5 minutos.			

7. CONTROL DE CALIDAD

Cada laboratorio debe analizar sueros control para los rangos bajo, medio y alto de Cortisol 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. Se deben usar reactivos frescos para determinar la causa de las variaciones.

8. RESULTADOS

8.1 Absorbancia media

Calcular la extinción media (E_m) de cada punto de la curva de calibración (C_0 - C_4) y de cada muestra.

8.2 Curva de calibración

Trazar el gráfico de la absorbancia en función de las concentraciones de los calibradores (C_0 - C_4). Trazar la curva de ajuste óptimo para los puntos de calibración (p. ej.: Logística de cuatro parámetros).

8.3 Cálculo de los resultados

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

9. VALORES DE REFERENCIA

Las concentraciones de cortisol en suero o plasma están incluidas en los siguientes intervalos:

60 - 230 ng/mL entre las 8:00 y 10:00 horas

30 - 150 ng/mL a las 16:00 horas

Pacientes tratados con ACTH: 280 - 600 ng/mL

Pacientes tratados con dexametazona: 0 - 50 ng/mL

10. CARACTERÍSTICAS DEL ENSAYO

10.1 Precisión

10.1.1 Intra ensayo

La variabilidad dentro del mismo kit se determinó repitiendo (16x) tres niveles diferentes de sueros. La variabilidad dentro del ensayo es $\leq 5,1\%$.

10.1.2 Entre ensayos

La variabilidad entre kits diferentes se determinó repitiendo (10x) tres niveles diferentes de suero con kit de lotes diferentes. La variabilidad entre ensayos es $\leq 11,0\%$.

10.2 Especificidad: reactividad cruzada

El anticuerpo empleado presenta las siguientes reacciones cruzadas, calculadas al 50% según el método de Abraham:

Reactivo	Reactividad %
Cortisol	100 %
Prednisolona	46,20 %
11-Deoxycortisol	4,00 %
Cortisona	3,69 %
Prednisona	3,10 %
Corticosterone	1,34 %
11 α OH Progesterona	1,00 %
Progesterona	< 0,01 %
Aldosterona	< 0,01 %
Pregnenolona	< 0,01 %
17b Estradiol	< 0,01 %
Estrona 3-sulfato	< 0,01 %
Estriol	< 0,01 %
Testosterona	< 0,01 %

Spironolactona	< 0,01 %
DHEA	< 0,01 %
DHEA-S	< 0,01 %
Androstenediona	< 0,01 %
Androsterona	< 0,01 %
DHT	< 0,01 %
Danazol	< 0,01 %
Cholesterol	< 0,01 %
Desametasona	< 0,01 %

10.3 Especificidad: sustancias interferentes

Se investigó la interferencia de la Bilirrubina, Hemoglobina y Triglicéridos:

Sustancia	Concentración	Interferencia
Bilirrubina	0,2 mg/mL	No
Hemoglobina	2 mg/mL	No
Triglicéridos	6 mg/mL	No

Las sustancias investigadas no presentan interferencia con el Kit Diametra Cortisol ELISA; sin embargo para las buenas prácticas de laboratorio se recomienda no utilizar muestras altamente lipémicas o hemolizadas.

10.4 Especificidad: plasma y "SST Tube"

Se investigó si muestras plasmáticas o muestras obtenidas con "tubos separadores de suero" (SST Tube) presenten algún tipo de interferencia (como referencia se utilizó una muestra del mismo paciente).

Muestra	Interferencia
SST (tubos separadores de suero)	No
EDTA plasma	No
Litio-heparina plasma	No
Sodio-heparina plasma	No

El Kit Diametra Cortisol ELISA no presenta interferencia.

10.5 Exactitud

La prueba de recuperación realizada en muestras enriquecidas con 15 - 35 - 70 ng/mL de Cortisol ha dado un valor medio ($\pm$ SE) de $101,61\% \pm 4,42\%$.

La prueba de dilución conductada en tres muestras diluidas 2, 4 y 8 veces ha dado un valor medio ($\pm$ SE) de $106,18\% \pm 4,68\%$.

10.6 Sensibilidad

La concentración mínima de Cortisol detectable que puede distinguirse del Calibrador 0 es de 2,42 ng/mL con un límite de confianza del 95%.

10.7 Correlación

El kit Diametra Cortisol ELISA fue comparado con otro ensayo comercial de Cortisol en quimioluminiscencia. Con ambos sistemas de prueba, se analizaron 61 muestras de suero.

Se calculó la curva de regresión lineal.

$$y = 1,09x - 19,23$$

$$r^2 = 0,904$$

11. INDICACIONES PARA LA ELIMINACIÓN

Eliminar los reactivos conforme con la normativa local sobre la materia.

BIBLIOGRAFÍA

1. Foster, L. B. and Dunn, R.T.
Clin. Chem: 20/3, 365 (1974)
2. De Lacerda, L., Kowarski, A., and Migeon, C.J.
J. Clin. Endocr. and Metab: 36, 227 (1973)
3. Roller, 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. 97 248 (1979)

Ed. 11/2016

DCM001-12

DiaMetra S.r.l. Headquater: Via Calabria 15,
20090 SEGRATE (MI) Italy
Tel. +39-02-2139184
Fax +39-02-2133354

Manufactory: Via Pozzuolo 14,
06038 SPELLO (PG) Italy
Tel. +39-0742-24851
Fax +39-0742-316197
E-mail: info@diametra.com

DiaMetra	Packaging Information Sheet	Mod. PIS000-1
-----------------	------------------------------------	----------------------

	DE ES FR GB IT PT	In vitro Diagnostikum Producto sanitario para diagnóstico In vitro Dispositif medical de diagnostic in vitro In vitro Diagnostic Medical Device Dispositivo medico-diagnostico in vitro Dispositivos medicos de diagnostico in vitro		DE ES FR GB IT PT	Hergestellt von Elaborado por Fabriqué par Manufacturer Produttore Produzido por
	DE ES FR GB IT PT	Achtung, Begleitdokumente Precaución, consulte los documentos adjuntos Attention, veuillez consulter les documents d'accompagnement Caution, consult accompanying documents Attenzione, consultare la documentazione allegata Atenção, consultar os documentos de acompanhamento	 yyyy-mm	DE ES FR GB IT PT	Herstellungs datum Fecha de fabricacion Date de fabrication Date of manufacture Data di produzione Data de produção
 yyyy-mm-dd	DE ES FR GB IT PT	Verwendbar bis Estable hasta (usar antes de último día del mes) Utiliser avant (dernier jour du mois indiqué) Use by (last day of the month) Utilizzare prima del (ultimo giorno del mese) Utilizar (antes ultimo dia do mês)		DE ES FR GB IT PT	Biogefährdung Riesco biológico Risque biologique Biological risk Rischio biologico Risco biológico
	DE ES FR GB IT PT	Gebrauchsanweisung beachten Consultar las instrucciones Consulter le mode d'emploi Consult instructions for use Consultare le istruzioni per l'uso Consultar instruções para uso		DE ES FR GB IT PT	Chargenbezeichnung Codigo de lote Numero de lot Batch code Codice del lotto Codigo do lote
 $\Sigma = xx$	DE ES FR GB IT PT	Ausreichend für "n" Tests Contenido suficiente para "n" tests Contenu suffisant pour "n" tests Contains sufficient for "n" tests Contenuto sufficiente per "n" saggi Contém o suficiente para "n" testes		DE ES FR GB IT PT	Inhalt Contenido del estuche Contenu du coffret Contents of kit Contenuto del kit Conteúdo do kit
 Max Min	DE ES FR GB IT PT	Temperaturbereich Limitación de temperatura Limites de température de conservation Temperature limitation Limiti di temperatura Temperaturas limites de conservação		DE ES FR GB IT PT	Bestellnummer Número de catálogo Références du catalogue Catalogue number Numero di Catalogo Número do catálogo
	DE ES FR GB IT PT	Vor direkter sonneneinstrahlung schützen Mantener alejado de la luz solar Tenir à l'écart de la lumière du soleil Keep away from sunlight Tenere lontano dalla luce solare Mantenha longe da luz solar			

SUGGERIMENTI PER LA RISOLUZIONE DEI PROBLEMI/TROUBLESHOOTING**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 temperatura 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

ERROR POSSIBLE CAUSES / SUGGESTIONS**No colorimetric reaction**

- no conjugate pipetted reaction after addition
- 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
- reagents and/or strips not pre-warmed to CV% Room Temperature prior to use
- plate washer is not washing correctly (suggestion: clean washer head)
- too high between-run - incubation conditions not constant (time, CV % temperature)
- controls and samples not dispensed at the same time (with the same intervals) (check pipetting order)
- person-related variation

DiaMetra	Packaging Information Sheet	Mod. PIS000-1
-----------------	------------------------------------	----------------------

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

ERREUR CAUSES POSSIBLES / SUGGESTIONS

Aucune réaction colorimétrique de l'essai

- non distribution du conjugué
- contamination du conjugué et/ou du substrat
- erreurs dans l'exécution du dosage (par ex., distribution accidentelle des réactifs dans le mauvais ordre ou en provenance des mauvais flacons, etc.)

Réaction trop faible (DO trop basse)

- conjugué non approprié (par ex., ne provenant pas du coffret original)
- temps d'incubation trop court, température d'incubation trop basse

Réaction trop intense (DO trop élevée)

- conjugué non approprié (par ex., ne provenant pas du coffret original)
- temps d'incubation trop long, température d'incubation trop élevée
- mauvaise qualité de l'eau utilisée pour la solution de lavage (bas degré de déionisation)
- lavages insuffisants (conjugué non entièrement éliminé)

Valeurs inexplicablement hors plage

- contamination des pipettes, embouts ou récipients - lavages insuffisants (conjugué non entièrement éliminé)

CV% intra-essai élevé

- les réactifs et/ou les bandes n'ont pas atteint la température ambiante avant usage
- le laveur de microplaques ne lave pas correctement (suggestion : nettoyer la tête du laveur)

CV% inter-essai élevé

- conditions d'incubation non constantes (temps ou température)
- contrôles et échantillons non distribués en même temps (avec les mêmes intervalles) (contrôler l'ordre de distribution)
- variabilité intrinsèque des opérateurs