

Cortisol



Enzyme immunoassay for the quantitative determination of Cortisol in human serum or plasma

Inmunoensayo enzimático para la determinación cuantitativa de Cortisol en suero o plasma humano

Only for in-vitro diagnostic use

English:	Page	2 to 6
Espanol:	Página	7 a 11

Bibliography/ Bibliografía	Page / Página	14
Symbols Key / Símbolos	Page/ Página	15
Summary of Test Procedure/ Resumen de la técnica	Page / Página	16

1. INTRODUCTION

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 with high affinity in plasma from corticosteroid-binding globulin (CBG, transcortin) 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 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. INTENDED USE

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

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 of this product 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 IgG; in resealable aluminium foil.
- **Stop Solution:** 1 bottle containing 15 ml sulphuric acid, 0.15 mol/l (avoid any skin contact).
- **Cortisol-HRP Conjugate.:** 1 bottle containing 21 ml of horseradish peroxidase labelled Cortisol.
- **TMB Substrate Solution:** 1 bottle containing 15 ml 3, 3', 5, 5'-tetramethylbenzidine (H₂O₂-TMB 0.26 g/l) (avoid any skin contact).
- **Wash solution 10 x conc.:** 1 bottle containing 50 ml of a 10 x concentrated solution of phosphate buffer 0.2 M, Proclin < 0.0015%.
- **Cortisol control:** 1 bottle containing 1 ml of a lot-specific control solution. The concentration is indicated on the label of the bottle.
- **Cortisol Standards:** 5 bottles, 1 ml each
 - Standard 0: 0 ng/ml
 - Standard 1: 10 ng/ml
 - Standard 2: 50 ng/ml
 - Standard 3: 150 ng/ml
 - Standard 4: 500 ng/ml

4.2. Materials supplied

- 1 Strip holder
- 1 Cover foils
- 1 Test protocol
- 1 Distribution and identification plan

4.3. Materials and Equipment needed

- ELISA microwell plate reader, equipped for the measurement of absorbance at 450 nm,
- Manual or automatic equipment for rinsing wells
- Pipettes to deliver volumes between 10 and 1000 µl
- Vortex tube mixer
- Distilled water
- Disposable tubes
- Timer

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.

6. REAGENT PREPARATION

It is very important to bring all reagents, samples and standards to room temperature (22...28°C) before starting the test run!

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 IgG 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. Mix gently for 5 minutes with rotating mixer. After first opening stable for another 6 months at 2...8°C.

6.3. Cortisol Standards

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

Standard 0:	0 ng/ml
Standard 1:	10 ng/ml
Standard 2:	50 ng/ml
Standard 3:	150 ng/ml
Standard 4:	500 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 M sulphuric acid solution (R 36/38, S 26). 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. Cortisol Control

The bottle contains 1 ml of a lot-specific control solution. The concentration is indicated on the label.

7. SPECIMEN COLLECTION AND PREPARATION

The determination of Cortisol can be performed in plasma as well as in serum.

Store the sample at -20°C if the determination is not performed on the same day as the sample collection.

Avoid repeated freezing and thawing.

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 protocol carefully **before** performing the assay. Result reliability depends on strict adherence to the test protocol as described. Prior to commencing the assay, the distribution and identification plan for all specimens and controls should be carefully established on the result sheet supplied in the kit. 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 control

It is recommended to determine standards, control 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 20 µl standards, control and samples into their respective wells.
2. Add 200 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.**

When incubation has been completed, remove the foil, aspirate the content of the wells and wash each well three times with 300 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.

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.

5. Dispense 100 µl TMB Substrate Solution into all wells.
6. **Incubate for exactly 15 min at room temperature (22...28°C) in the dark.**
7. 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.*
8. Measure the absorbance (E) of the specimen at 450 nm against a 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 in the distribution and identification plan.

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

9. 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 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.

10. RESULTS

10.1. 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. (e. g.: 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.

10.2. Reference values

Serum or plasma cortisol reference values are:

60 – 230 ng/ml between 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

Please pay attention to the fact that the determination of a range of expected values for a “normal” population in a given method is dependent on many factors, such as specificity and sensitivity of the method used and type of population under investigation. Therefore each laboratory should consider the range given by the manufacturer as a general indication and produce their own range of expected values based on the indigenous population where the laboratory works

11. SPECIFIC PERFORMANCE CHARACTERISTICS

11.1. Precision

Intra Assay Variation

Within run variation was determined by replicate determination (20x) of three different control sera in one assay. The within assay variability is $\leq 9.0\%$.

Inter Assay Variation

Between run variation was determined by replicate measurements (10x) of three different control sera in different lots. The between assay variability is $\leq 9.8\%$.

11.2. 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 %

11.3. Analytic Sensitivity

The lowest detectable concentration of Cortisol that can be distinguished from the 0 standard is 2.44 ng/ml at the 95 % confidence limit.

11.4. Accuracy

The recovery of 12.5 – 25 – 50 – 100 ng/mL of Cortisol added to samples gave an average value ($\pm$ SD) of $103.56\% \pm 8.17\%$ with reference to the original concentrations.

11.5. Correlation

The new NovaTec Cortisol ELISA kit was compared to a chemiluminescence Cortisol kit commercially available. 19 serum samples were analyzed.

The linear regression curve was calculated:

$$Y = 1.30 \cdot X - 61.96$$

$$r^2 = 0.900$$

The new NovaTec Cortisol ELISA kit was compared to the old NovaTec Cortisol ELISA kit. 60 serum samples were analyzed.

The linear regression curve was calculated:

$$Y = 0.88 \cdot X + 15.71$$

$$r^2 = 0.933$$

12. PRECAUTIONS AND WARNINGS

- In compliance with article 1 paragraph 2b European directive 98/79/EC the use of the in vitro diagnostic medical devices is intended by the manufacturer to secure suitability, performances and safety of the product. Therefore 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.
- 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.
- 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.
- Maximum precision is required for dispensation of the reagents.
- This method allows the determination of Cortisol from 10 to 500 ng/ml
- 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.
- 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.
- Avoid the exposure of TMB substrate to direct sunlight, metal or oxidants. Do not freeze the solution.
- Observe the guidelines for performing quality control in medical laboratories by assaying controls and/or pooled sera.
- Microbiologically contaminated samples should not be used in the assay. Highly lipemic or haemolysed specimens should also not be used.
- Plate readers measure vertically. Do not touch the bottom of the wells.
- 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.
- The incomplete or inaccurate liquid removal from the wells could influence the assay precision and/or increase the background.
- Some reagents contain small amounts of Proclin 300® as preservative. Avoid contact with skin or mucosa.
- The NovaTec ELISA is only designed for qualified personnel who are familiar with good laboratory practice.

12.1. 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.

13. ORDERING INFORMATION

Prod. No.:

DNOV001

Cortisol Determination (96 Determinations)

1. INTRODUCCIÓN

El cortisol es una hormona esteroide liberada por la corteza adrenal 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 supresión del sistema inmunológico.

El cortisol actúa a través de receptores intracelulares específicos y tiene numerosos efectos en el sistema fisiológico, incluyendo la función inmune, contra regulación de la glucosa, tono vascular, la utilización de sustratos y el metabolismo óseo. El cortisol es excretado principalmente en orina en forma libre.

El cortisol se une con una alta afinidad en el plasma a la globulina transportadora de corticosteroides (CBG, transcortin) y a la albúmina. Sólo cortisol libre está disponible para la mayoría de los receptores.

La cantidad de cortisol en el suero muestra variaciones durante el día, con los niveles más altos en la mañana, y niveles más bajos en la noche, varias horas después del inicio del sueño. Los niveles más altos se encuentran alrededor de 6 - 8 am y los niveles más bajos se presentan cerca de la medianoche. Esta función endógena normal es la base de las consecuencias fisiológicas de la secreción de cortisol crónica por estrés prolongado provocando desgaste muscular, la hiperglucemia, y suprime la respuesta inmune / inflamatoria. Las mismas consecuencias que se derivan de un uso prolongado de medicamentos glucocorticoides.

2. USO

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

3. FUNDAMENTO DE LA PRUEBA

Los pocillos de microtitulación están recubiertos con anticuerpos anti-cortisol (fase sólida). El cortisol en la muestra compete por la unión a éstos anticuerpos con cortisol marcada 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 de este producto 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 IgG:** 12 tiras de 8 pozos separables. Los pozos están recubiertas con anti-cortisol IgG, 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 contiene 21 ml de cortisol marcada con peroxidasa de rábano.
- **Solución de sustrato TMB:** 1 vial con 15 ml de 3, 3', 5, 5'-tetrametilbenzidina (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, Proclín < 0.0015 %.
- **Control del Cortisol:** 1 vial con 1 ml de una solución específica para el lote de control. La concentración se indica en la etiqueta de la botella
- **Estándares de Cortisol:** 5 botellas, de 1 ml cada una
- Estándar 0: 0 ng/ml
- Estándar 1: 10 ng/ml
- Estándar 2: 50 ng/ml
- Estándar 3: 150 ng/ml
- Estándar 4: 500 ng/ml

4.2. Materiales suministrados

- 1 Soporte para tiras
- 1 Lámina sellante
- 1 Protocolo de procesamiento
- 1 Plan de distribución e identificación

4.3. Materiales y equipos necesarios

- 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 para agregar volúmenes de entre 10 y 1000 µl
- Vórtex para mezclar los tubos
- Agua destilada
- Tubos desechables
- Temporizador

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.

6. PREPARACION DE LOS REACTIVOS

¡Es muy importante tener todos los reactivos, muestras, controles y estándares a temperatura ambiente (22...28 °C) antes de iniciar la ejecución de la prueba!

¡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 IgG 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 uso y tienen la siguiente concentración de cortisol:

- Estándar 0: 0 ng/ml
- Estándar 1: 10 ng/ml
- Estándar 2: 50 ng/ml
- Estándar 3: 150 ng/ml
- Estándar 4: 500 ng/ml

Después de abiertos son estables por 6 meses almacenados de 2 a 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 parada

El frasco contiene 15 ml de solución de ácido sulfúrico 0,15 M (R 36/38, S 26). Esta solución esta lista para ser usada y debe ser almacenada a 2...8 °C.

6.6. 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.

6.7. Control del Cortisol

El vial contiene 1 ml de una solución de control específica para el lote. La concentración se indica en la etiqueta.

7. RECOLECCIÓN Y PREPARACIÓN DE LAS MUESTRAS

La determinación de cortisol se puede realizar en el plasma, así como en el suero. Almacenar las muestras a -20 ° C si la determinación no se realiza en el mismo día de la toma de muestras. **El paciente tratado con corticoides, esteroides sintéticos o naturales pueden afectar la determinación de cortisol.**

8. PROCEDIMIENTO

8.1. Preparación para la prueba

Por favor, lea detenidamente el protocolo de la prueba **antes** de realizar el ensayo. La confiabilidad de los resultados depende del seguimiento estricto del protocolo de la prueba tal cual se describe en el inserto. Antes de comenzar el ensayo, se debe establecer cuidadosamente la distribución e identificación de las muestras y los estándares en la hoja Plan de distribución e identificación suministrada con el kit. Seleccione el número necesario de tiras de microtitulación o pozos e insértelos en el soporte. Por favor asigne por lo menos:

1 pozo (por ejemplo, A1)	para el blanco
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

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 del paciente.

1. Agregue 20 µl de estándares, controles y muestras en sus respectivos pozos
2. Agregue 200 µl de conjugado Cortisol-HRP a cada pozo. Deje el pozo A1 libre para el blanco del sustrato.
3. Cubra los pozos con la lámina sellante incluida en el paquete.
4. **Incube durante 1 hora a 37°C**
5. Cuando se complete el tiempo de incubación, retire la lámina sellante, aspire el contenido de los pozos y lave cada pozo tres veces con 300 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 golpéea 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. *Cualquier color azul desarrollado durante la incubación se convertirá en amarillo.*
9. Leer la absorbancia a 450 nm frente una segunda lectura de referencia a 620-630 nm o frente al blanco entre 5 minutos.

8.2. Lectura

Ajuste el lector de placas de micropozos de ELISA a cero usando el blanco de sustrato del pozo A1.

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 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 muestra de paciente indicado en el plan de distribución e identificación.

Cuando sea necesario, calcule la **absorbancia media** de los duplicados.

9. CONTROL DE CALIDAD

Cada laboratorio debe evaluar sus controles que correspondan a niveles normal, alto y bajo del cortisol 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.

Si se emplea una reducción controlada de los datos por computador para calcular los resultados de la prueba, es imperativo que los valores predichos para los calibradores se encuentren dentro del 10% de las concentraciones asignadas.

10. RESULTADOS

10.1. 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). Interpole los valores de las muestras en la curva estándar para obtener los valores correspondientes para las concentraciones expresadas en ng/ml.

10.2. Valores de referencia

Los valores de referencia en suero o plasma del cortisol son los siguientes:

60-230 ng/ml entre 8:00 -10:00 a.m.
30-150 ng/ml a las 4:00 p.m.

Paciente tratado con ACTH 280-600 ng/ml
Paciente tratado con dexametasona 0-50 ng/ml

11. CARACTERÍSTICAS ESPECÍFICAS DE DESEMPEÑO

11.1. Precisión

Variación intraensayo

La variación intracorrída fue determinada por mediciones repetidas (20x) de dos sueros control diferentes en un mismo ensayo. La variación intracorrída del ensayo es $\leq 9.0\%$.

Variación interensayo

La variación intercorrída fue determinada por mediciones repetidas (10x) de tres sueros control diferentes con lotes distintos.

La variabilidad interensayo es $\leq 9.8\%$.

11.2. Reacciones Cruzadas

La reacción cruzada de los anticuerpos fue calcula para el 50% de acuerdo con Abraham y es la siguiente:

Cortisol	100 %
Prednisolona	46.2 %
11 α Deoxicortisol	4 %
Cortisona	3.69 %
Prednisona	3.10 %
11 α OH Progesterona	1 %
Progesterona	< 0.1 %
Aldosterona	< 0.1 %
Pregnenolona	< 0.1 %
17 beta Estradiol	< 0.1 %
Estrona 3-sulfato	< 0.1 %
Estriol	< 0.1 %
Testostéróna	< 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 %

11.3. Sensibilidad Analítica

La concentración detectable más baja de Cortisol que se puede distinguir del estándar 0 es 2.44 ng/ml con un límite de confianza del 95%.

11.4. Exactitud

La recuperación de 12.5 – 25 -50 -100 ng/ml de Cortisol añadidos a una muestra resulto en un valor medio ($\pm$ DE) de 103.56 % $\pm$ 8.17% con respecto a la concentración original.

11.5. Comparación

El kit NovaTec Cortisol ELISA fue comparado con otro eneyda commercial de Cortisol en quimioluminiscencia. Con ambos sistemas de prueba, se analizaron 19 muestras de suero.

Se calculó la curva de regresión lineal.

$$Y = 1.30 \cdot X - 61.96$$

$$r^2 = 0.900$$

El kit NovaTec Cortisol ELISA se ha comparado con el kit NovaTec Cortisol ELISA del método anterior. Se probaron 60 muestras de suero.

La curva de regresión es la siguiente:

$$Y = 0.88 \cdot X + 15.71$$

$$r^2 = 0.933.$$

12. 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.
- 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, pipeteo las muestras de los pacientes y dispense el conjugado con precisión hacia el fondo de los pozos evitando que se produzcan salpicaduras.
- El material de origen animal usado en la preparación del kit han sido obtenidos de animales certificados como saludables y las proteínas bovinas fueron obtenidas de países no infectados por BSE, pero estos materiales deben ser manejados como potencialmente infecciosos.
- La máxima precisión es necesaria para la dispensación de los reactivos.
- Este método permite la determinación de cortisol de 10 a 500 ng/ml
- 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.
- Evite la exposición del sustrato TMB a la luz solar directa, metal u oxidantes. No congelar la solución.
- Tenga en cuenta las directrices del control de calidad en los laboratorios médicos para los controles de ensayo y / o pools de sueros para determinar su desempeño.
- Muestras con contaminación microbiana no debe ser utilizado en el ensayo. Muestras altamente hemolizadas o lipémicas
- Realizar la lectura verticalmente. No toque el fondo de los pozos.
- Es importante que el tiempo de reacción en cada pozo se mantiene constante para obtener resultados reproducibles. El pipeteo de las muestras no debe prolongarse más de diez minutos para evitar la deriva del análisis. Si hay más de 10 minutos son necesarios, siga el mismo orden de dispensación. Si más de una placa se utiliza, se recomienda repetir la curva dosis-respuesta en cada placa.
- La eliminación de líquidos incompleta o inexacta de los pozos podría influir en la precisión del ensayo y / o aumentar el background.
- Algunos reactivos contienen pequeñas cantidades de Proclin 300® como conservante. Evite el contacto con la piel o mucosas.
- La prueba por NovaTec ELISA es únicamente para personal calificado que esté familiarizado con buenas prácticas de laboratorio.

12.1. 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.

13. INFORMACIÓN PARA PEDIDOS

Prod. No.:	DNOV001	Cortisol (96 Determinaciones)
------------	---------	-------------------------------

LITERATURE/ BIBLIOGRAFIA

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.

Symbols Key/ Symbolschlüssel/ Explication des symboles / Legenda / Símbolos/ Tabela de símbolos	
	Manufactured by / Hergestellt von/ Fabriqué par/ Prodotto da/ Fabricado por / Fabricado por
	In Vitro Diagnostic Medical Device/ In Vitro Diagnosticum/ Dispositif médical de diagnostic <i>in vitro</i> / Diagnostico <i>in vitro</i> / Producto para diagnóstico in vitro / Dispositivo Médico para Diagnóstico in vitro
	Lot Number/ Chargenbezeichnung/ Numéro de lot/ Lotto/ Número de lote / Número de lote
	Expiration Date/ Verfallsdatum/ Date de péremption/ Scadenza/ Fecha de caducidad / Data de Validade
	Storage Temperature/ Lagertemperatur/ Température de conservation/ Temperatura di conservazione / Temperatura de almacenamiento / Temperatura de Armazenamento
	CE Mark/ CE-Zeichen/ Marquage CE / Marchio CE/ Marca CE / Marca CE
	Catalogue Number/ Katalog Nummer/ Référence du catalogue/ Numero di codice/ Número de Catálogo / Número de Catálogo
	Consult Instructions for Use/ Gebrauchsanweisung beachten/ Consulter la notice d'utilisation/ Consultare le istruzioni/ Consulte las Instrucciones de Uso / Consultar as Instruções de Utilização
	Microplate/ Mikrotiterplatte/ Microplaque/ Micropiastra/ Microplaca/ Microplaca
	Conjugate/ Konjugat/ Conjugué/ Coniugato/ Conjugado / Conjugado
	Control/ Kontrolle/ contrôle / controllo / control / controle/ controllo
	Calibrator resp. Standard/ Kalibrator bzw. Standard/ Calibrateur resp Etalon / Calibratore ossia Standard / Calibrador o bien Estándar
	Stop solution/ Stopplösung/ Solution d'arrêt/Soluzione bloccante / Solução de paragem
	TMB Substrate solution/ TMB-Substratlösung/ Substrat TMB/ soluzione substrato TMB/ solción substrato TMB / Solução substrato TMB
	Contains sufficient for "n" tests/ Ausreichend für "n" Tests/ Contenu suffisant pour "n" tests/ Contenuto sufficiente per "n" saggi/ Contenido suficiente para "n" tests / Conteúdo suficiente para "n" testes

SCHEME OF THE ASSAY

Cortisol

Test Preparation

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

Assay Procedure

	Substrate blank	Standard 0 - 4	Control	Sample
Standard 0 - 4	-	20µl	-	-
Control	-	-	20 µl	-
Sample	-	-	-	20 µl
Conjugate	-	200 µl	200 µl	200 µl
Cover wells with foil supplied in the kit Incubate for 1 h at 37°C Wash each well three times with 300 µl diluted wash solution 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!				
TMB Substrate	100 µl	100 µl	100 µl	100 µl
Incubate for exactly 15 min at room temperature (22...28°C) in the dark				
Stop Solution	100 µl	100 µl	100 µl	100 µl
Shake the microplate gently Photometric measurement at 450 nm				

NovaTec Immundiagnostica GmbH Technologie & Waldpark

Waldstr. 23 A6
D-63128 Dietzenbach, Germany

Tel.: +49 (0) 6074-48760 Fax: +49 (0) 6074-487629
Email : info@NovaTec-ID.com
Internet: www.NovaTec-ID.com

DNOV001engl,es-18042013-CS