

Cortisol Elisa

KAPDB270



History

Summary of change :

Previous Version :	Current Version :
110225/1	200224/1
Multilanguage IFU	Addition of the following sentence at the end of the English IFU: "Other translations of this Instructions for Use can be downloaded from our website: https://www.diasource-diagnostics.com/ "
Old Diasource logo	New Diasource logo
No IVD symbol	IVD symbol added
LOT : 110225/1	Version: 200224/1
PI number : 1701239	No PI number
No manufacturer symbol	Manufacturer symbol added



Cortisol Elisa

en

For the direct quantitative determination of Cortisol by enzyme immunoassay in human serum.

KAPDB270 IN VITRO DIAGNOSTIC

DIAsource ImmunoAssays SA - Rue du Bosquet 2, B-1348 Louvain-la-Neuve, Belgium - Tel: +32 10 84 99 11 - Fax : +32 10 84 99 90

INTENDED USE

For the direct quantitative determination of Cortisol by enzyme immunoassay in human serum.

For *in vitro* diagnostic use only.

PRINCIPLE OF THE TEST

The principle of the following enzyme immunoassay test follows the typical competitive binding scenario. Competition occurs between an unlabeled antigen (present in calibrators, control and patient samples) and an enzyme-labelled antigen (conjugate) for a limited number of antibody binding sites on the microwell plate. The washing and decanting procedures remove unbound materials. After the washing step, the enzyme substrate is added. The enzymatic reaction is terminated by addition of the stopping solution. The absorbance is measured on a microtiter plate reader. The intensity of the colour formed is inversely proportional to the concentration of cortisol in the sample. A set of calibrators is used to plot a calibration curve from which the amount of cortisol in patient samples and controls can be directly read.

CLINICAL APPLICATIONS

Cortisol is the most abundant circulating steroid and the major glucocorticoid secreted by the adrenal cortex. Cortisol is physiologically effective in blood pressure maintenance and anti-inflammatory activity. It is also involved in calcium absorption, gluconeogenesis as well as the secretion of gastric acid and pepsin.

Measurement of blood cortisol levels can be used as an indicator of adrenal function and the differential diagnosis of Addison's and Cushing's diseases as well as adrenal hyperplasia and carcinoma.

Most circulating cortisol is bound to cortisol binding globulin or transcortin. Therefore, the free cortisol concentration excreted in the urine is very small, and the 24-hour collection of urine is a must in order to obtain an accurate measurement of urinary cortisol. Cortisol in blood shows a diurnal rhythm with the highest levels in the morning and the lowest levels at night.

PROCEDURAL CAUTIONS AND WARNINGS

1. Users should have a thorough understanding of this protocol for the successful use of this kit. Reliable performance will only be attained by strict and careful adherence to the instructions provided.
2. Control materials or serum pools should be included in every run at a high and low level for assessing the reliability of results.
3. When the use of water is specified for dilution or reconstitution, use deionized or distilled water.
4. In order to reduce exposure to potentially harmful substances, gloves should be worn when handling kit reagents and human specimens.
5. All kit reagents and specimens should be brought to room temperature and mixed gently but thoroughly before use. Avoid repeated freezing and thawing of reagents and specimens.
6. A calibration curve must be established for every run.
7. The control should be included in every run and fall within established confidence limits.
8. Improper procedural techniques, imprecise pipetting, incomplete washing as well as improper reagent storage may be indicated when assay values for the control do not reflect established ranges.
9. When reading the microplate, the presence of bubbles in the microwells will affect the optical densities (ODs). Carefully remove any bubbles before performing the reading step.
10. The substrate solution (TMB) is sensitive to light and should remain colourless if properly stored. Instability or contamination may be indicated by the development of a blue colour, in which case it should not be used.
11. When dispensing the substrate and stopping solution, do not use pipettes in which these liquids will come into contact with any metal parts.
12. To prevent contamination of reagents, use a new disposable pipette tip for dispensing each reagent, sample, calibrator and control.
13. Do not mix various lot numbers of kit components within a test and do not use any component beyond the expiration date printed on the label.
14. Kit reagents must be regarded as hazardous waste and disposed of according to national regulations.

LIMITATIONS

1. All the reagents within the kit are calibrated for the direct determination of cortisol in human serum. The kit is not calibrated for the determination of cortisol in saliva, plasma or other specimens of human or animal origin.
2. Do not use grossly hemolyzed, grossly lipemic, icteric or improperly stored serum.
3. Any samples or control sera containing azide are not compatible with this kit, as they may lead to false results.
4. Only calibrator 0 may be used to dilute any high serum samples. The use of any other reagent may lead to false results.
5. The results obtained with this kit should never be used as the sole basis for a clinical diagnosis. For example, the occurrence of heterophilic antibodies in patients regularly exposed to animals or animal products has the potential of causing interferences in immunological tests. Consequently, the clinical diagnosis should include all aspects of a patient's background including the frequency of exposure to animals/products if false results are suspected.

SAFETY CAUTIONS AND WARNINGS

POTENTIAL BIOHAZARDOUS MATERIAL

Human serum that may be used in the preparation of the calibrators and control has been tested and found to be non-reactive for Hepatitis B surface antigen and has also been tested for the presence of antibodies to HCV and Human Immunodeficiency Virus (HIV) and found to be negative. However no test method can offer complete assurance that HIV, HCV and Hepatitis B virus or any infectious agents are absent. The reagents should be considered a potential biohazard and handled with the same precautions as applied to any blood specimen.

CHEMICAL HAZARDS

Avoid contact with reagents containing TMB, hydrogen peroxide and sulfuric acid. If contacted with any of these reagents, wash with plenty of water. TMB is a suspected carcinogen.

SPECIMEN COLLECTION AND STORAGE

Approximately 0.1 ml of serum is required per duplicate determination. Collect 4-5 ml of blood into an appropriately labelled tube and allow it to clot. Centrifuge and carefully remove the serum layer. Store at 4°C for up to 24 hours or at -10°C or lower if the analyses are to be done at a later date. Consider all human specimens as possible biohazardous materials and take appropriate precautions when handling.


SERUM PRETREATMENT

This assay is a direct system; no specimen pretreatment is necessary.

REAGENTS AND EQUIPMENT NEEDED BUT NOT PROVIDED

1. Precision pipettes to dispense 20, 50, 100, 150 and 300 µl
2. Disposable pipette tips
3. Distilled or deionized water
4. Plate shaker
5. Microwell plate reader with a filter set at 450nm and an upper OD limit of 3.0 or greater* (see assay procedure step 10).

REAGENTS PROVIDED

 **Rabbit Anti-Cortisol Antibody Coated Microwell Plate-Break Apart Wells - Ready To Use.**

Contents: One 96 well (12x8) polyclonal antibody-coated microwell plate in a resealable pouch with desiccant.

Storage: Refrigerate at 2-8°C

Stability: 12 months or as indicated on label.

AG	HRP	CONC
----	-----	------

Cortisol-Horseradish Peroxidase (HRP) Conjugate Concentrate - X100

Contents: Cortisol-HRP conjugate in a protein-based buffer with a non-mercury preservative.

Volume: 300 µl/vial

Storage: Refrigerate at 2-8°C

Stability: 12 months or as indicated on label.

Preparation: Dilute 1:100 in assay buffer before use (eg. 20 µl of HRP in 2 ml of assay buffer). If the whole plate is to be used dilute 120 µl of HRP in 12ml of assay buffer. Discard any that is left over.

CAL **N** **Cortisol Calibrators** - Ready To Use. N = 0 to 6

Contents: Seven vials containing cortisol in a human serum-based buffer with a non-mercury preservative. Prepared by spiking serum with a defined quantity of cortisol.

*Listed are approximate concentrations, please refer to vial labels for exact concentrations.

Calibrator	Concentration	Volume/Vial
Calibrator 0	0 µg/dl	1.0 mL
Calibrator 1	0.5 µg/dl	0.3 mL
Calibrator 2	2 µg/dl	0.3 mL
Calibrator 3	5 µg/dl	0.3 mL
Calibrator 4	10 µg/dl	0.3 mL
Calibrator 5	30 µg/dl	0.3 mL
Calibrator 6	60 µg/dl	0.3 mL

Storage: Refrigerate at 2-8°C

Stability: 12 months in unopened vials or as indicated on label. Once opened, the calibrators should be used within 14 days or aliquoted and stored frozen. Avoid multiple freezing and thawing cycles.

CONTROL **Control** - Ready To Use.

Contents: One vial containing cortisol in a human serum-based buffer with a non-mercury preservative. Prepared by spiking serum with a defined quantity of cortisol. Refer to vial label for expected value and acceptable range.

Volume: 0.3 ml/vial

Storage: Refrigerate at 2-8 °C

Stability: 12 months in unopened vial or as indicated on label. Once opened, the control serum should be used within 14 days or aliquoted and stored frozen. Avoid multiple freezing and thawing cycles.

WASH **SOLN** **CONC** **Wash Buffer Concentrate** - **X10**

Contents: One bottle containing buffer with a non-ionic detergent and a non-mercury preservative.

Volume: 50 ml/bottle

Storage: Refrigerate at 2-8 °C

Stability: 12 months or as indicated on label.

Preparation: Dilute 1:10 in distilled water before use. If the whole plate is to be used dilute 50 ml of the wash buffer concentrate in 450 ml of distilled water.

ASS **BUF** **Assay Buffer** - Ready To Use.

Contents: One vial containing a protein-based buffer with a non-mercury preservative.

Volume: 15 ml/vial

Storage: Refrigerate at 2-8°C

Stability: 12 months or as indicated on label.

CHROM **TMB** **TMB Substrate** - Ready To Use.

Contents: One bottle containing tetramethylbenzidine and hydrogen peroxide in a non-DMF or DMSO containing buffer.

Volume: 16 ml/bottle

Storage: Refrigerate at 2-8 °C

Stability: 12 months or as indicated on label.

STOP **SOLN** **Stopping Solution** - Ready To Use.

Contents: One vial containing 1M sulfuric acid.

Volume: 6 ml/vial

Storage: Refrigerate at 2-8 °C

Stability: 12 months or as indicated on label.

Specimen Pretreatment: None.

All reagents must reach room temperature before use. Calibrators, controls and specimen samples should be assayed in duplicate. Once the procedure has been started, all steps should be completed without interruption.

1. Prepare working solutions of the cortisol-HRP conjugate and wash buffer.
2. Remove the required number of microwell strips. Reseal the bag and return any unused strips to the refrigerator.
3. Pipette 20 µl of each calibrator, control and specimen sample into correspondingly labelled wells in duplicate.
4. Pipette 100 µl of the conjugate working solution into each well (We recommend using a multichannel pipette).
5. Incubate on a plate shaker (approximately 200 rpm) for 45 minutes at room temperature.
6. Wash the wells 3 times with 300 µl of diluted wash buffer per well and tap the plate firmly against absorbent paper to ensure that it is dry (The use of a washer is recommended).
7. Pipette 150 µl of TMB substrate into each well at timed intervals.
8. Incubate on a plate shaker for 15-20 minutes at room temperature (or until calibrator 0 attains dark blue colour for desired OD).
9. Pipette 50 µl of stopping solution into each well at the same timed intervals as in step 7.
10. Read the plate on a microwell plate reader at 450 nm within 20 minutes after addition of the stopping solution.

* If the OD exceeds the upper limit of detection or if a 450 nm filter is unavailable, a 405 or 415 nm filter may be substituted. The optical densities will be lower, however, this will not affect the results of patient/control samples.

CALCULATIONS

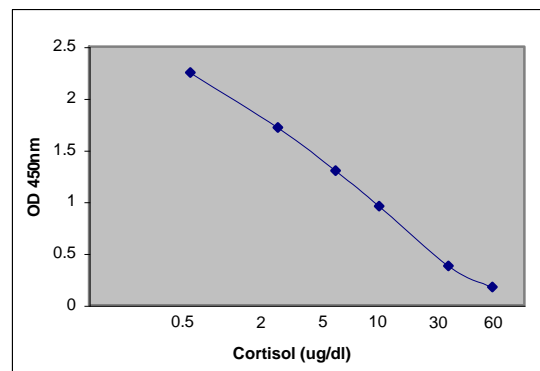
1. Calculate the mean optical density of each calibrator duplicate.
2. Draw a calibration curve on semi-log paper with the mean optical densities on the Y-axis and the calibrator concentrations on the X-axis. If immunoassay software is being used, a 4-parameter curve is recommended.
3. Calculate the mean optical density of each unknown duplicate.
4. Read the values of the unknowns directly off the calibration curve.
5. If a sample reads more than 60 µg/dl then dilute it with calibrator 0 at a dilution of no more than 1:8. The result obtained should be multiplied by the dilution factor.

TYPICAL TABULATED DATA

Calibrator	OD 1	OD 2	Mean OD	Value (µg/dl)
0	2.263	2.183	2.223	0
1	2.071	2.001	2.036	0.5
2	1.717	1.719	1.718	2
3	1.382	1.402	1.395	5
4	0.985	0.933	0.959	10
5	0.385	0.373	0.379	30
6	0.174	0.176	0.175	60
Unknown	0.697	0.722	0.710	15.3

TYPICAL CALIBRATION CURVE

Sample curve only. **Do not** use to calculate results.



PERFORMANCE CHARACTERISTICS

SENSITIVITY

The lower detection limit is calculated from the calibration curve by determining the resulting concentration of the mean OD of Calibrator 0 (based on 10 replicate analyses) minus 2 SD. Therefore, the sensitivity of the DIAsource Direct Cortisol ELISA kit is **0.4 µg/dl**.

SPECIFICITY (CROSS REACTIVITY)

The following compounds were tested for cross-reactivity with the Direct Cortisol ELISA kit with cortisol cross-reacting at 100%.

Steroid	%Cross Reactivity
Cortisol	100
Prednisolone	13.6
Corticosterone	7.6
Deoxycorticosterone	7.2
Progesterone	7.2
Cortisone	6.2
Deoxycortisol	5.6
Pednisone	5.6
Dexamethasone	1.6

No cross reaction was detected with DHEAS and Tetrahydrocortisone.

Please note that there is an observed cross-reactivity of 13.6% with prednisolone. Since prednisone is converted to prednisolone in vivo, caution must be exercised when assaying the cortisol levels of patients undergoing either therapy.

INTRA-ASSAY PRECISION

Three samples were assayed ten times each on the same calibration curve. The results (in µg/dl) are tabulated below:

Sample	Mean	SD	CV%
1	1.44	0.14	9.4
2	14.06	0.41	2.9
3	37.55	1.87	5.0

INTER-ASSAY PRECISION

Three samples were assayed ten times over a period of four weeks. The results (in µg/dl) are tabulated below:

Sample	Mean	SD	CV%
1	1.60	0.13	8.1
2	15.01	0.74	5.0
3	38.18	1.43	3.8

RECOVERY

Spiked samples were prepared by adding defined amounts of cortisol to three patient serum samples (1:1). The results (in µg/dl) are tabulated below:

Sample	Obs.Result	Exp.Result	Recovery%
1 Unspiked	3.86	-	-
+2.0	3.61	2.93	123.2
+10.0	7.63	6.93	110.1
+30.0	16.93	18.72	90.4
2 Unspiked	6.06	-	-
+5.0	3.74	3.28	114.0
+10.0	9.06	8.03	112.8
+60.0	32.49	33.03	98.4
3 Unspiked	10.91	-	-
+0.5	6.58	5.70	115.4
+5.0	8.74	7.95	109.9
+60.0	39.04	35.40	110.3

LINEARITY

Three patient serum samples were diluted with calibrator 0. The results (in µg/dl) are tabulated below:

Sample	Obs.Result	Exp.Result	Recovery%
1	10.94	-	-
1:2	6.13	5.47	112.1
1:4	3.19	2.74	116.4
1:8	1.55	1.37	113.1
2	18.92	-	-
1:2	9.64	9.46	101.9
1:4	4.61	4.73	97.5
1:8	1.98	2.37	83.7
3	42.00	-	-
1:2	20.44	21.00	97.8
1:4	9.57	10.50	94.0
1:8	4.76	5.25	90.7

EXPECTED VALUES

As for all clinical assays each laboratory should collect data and establish their own range of expected normal values.

Group	Mean (µg/dl)	Range (µg/dl)
Males and Females – AM	15.59	3.95-27.23
Males and Females – PM	5.93	1.45-10.41

REFERENCES

1. Brock P., et al., Clinical Chemistry 24/9:1595, 1978.
2. Morris R., Annals of Clinical Biochemistry 15:178, 1978.
3. Silver A.C., et al., Clinical Chemistry 29:1869, 1983.
4. Vecsei P., et al., Experimentia 28:1104, 1972.
5. Abraham G.E. et al., Anal Lett. 5:757, 1972.
6. Gomez-Sanchez C., et al., J. Lab. Clin. Med 89:902, 1977.
7. Demeris L.M., et al., Clin. Biochem. 10:104, 1977.
8. Poland R.E., et al., Life Sci. 30:177, 1982.
9. Peters J.R., et al., Clin Endocrinol. 17:583, 1982.
10. Papanicolaou, D.A. et al J. Clin Endocrinol Metab 87(10):4515-4521.
11. Check, J.H., et al, Falsely elevated steroidal assay levels related to heterophile antibodies against various animal species. Gynecol Obstet Invest 40:139-140, 1995.

Revision date : 2020-02-24

Other translations of this Instructions for Use can be downloaded from our website: <https://www.diasource-diagnostics.com/>



Para la determinación cuantitativa directa de cortisol con un inmunoensayo enzimático en suero humano.

KAPDB270 DIAGNOSTICO IN VITRO

DIAsource ImmunoAssays SA - Rue du Bosquet 2, B-1348 Louvain-la-Neuve, Bélgica - Tel: +32 10 84 99 11 - Fax : +32 10 84 99 90

USO PREVISTO

Para la determinación cuantitativa directa de cortisol con un inmunoensayo enzimático en suero humano.
Solo para uso de diagnóstico *in vitro*.

PRINCIPIO DE LA PRUEBA

El principio del siguiente inmunoensayo enzimático sigue el típico patrón de unión competitiva. La competencia ocurre entre un antígeno no marcado (presente en los calibradores, control y muestras de los pacientes) y un antígeno marcado con una enzima (conjugado) por un número limitado de sitios de unión de anticuerpos en la pared de los pocillos de la microplaca. Los procedimientos de lavado y decantado eliminan el material que no se ha unido. Después del paso de lavado, se añade el sustrato de la enzima. La reacción enzimática se detiene añadiendo la solución de parada. La absorbancia se mide en un lector de microplacas. La intensidad del color formado es inversamente proporcional a la concentración de cortisol en la muestra. Se utiliza un grupo de calibradores para dibujar una curva de calibración desde donde se puede leer directamente la cantidad de cortisol en las muestras de los pacientes y los controles.

APLICACIONES CLÍNICAS

El cortisol es el esteroide circulante más abundante y el glucocorticoide más importante secretado por la corteza suprarrenal. El cortisol es fisiológicamente efectivo en la mantención de la presión sanguínea y la actividad anti inflamatoria. Asimismo está relacionado con la absorción de calcio, glucogénesis así como la secreción de ácido gástrico y pepsina.

La medición del cortisol en la sangre puede utilizarse como un indicador de la función suprarrenal y el diagnóstico diferencial entre la enfermedad de Addison y la enfermedad de Cushing así como la hiperplasia suprarrenal y el carcinoma.

La mayoría del cortisol circulante está unido a una globulina de unión o transcortina, por lo tanto la concentración del cortisol libre excretado en la orina es muy pequeña y la colección de orina por 24 horas es obligatoria para obtener una medición precisa del cortisol urinario. El cortisol sanguíneo presenta un ritmo diurno con los niveles más altos en la mañana y los niveles más bajos en la noche

PRECAUCIONES Y ADVERTENCIAS SOBRE EL PROCEDIMIENTO

1. Los usuarios deben adquirir una comprensión a fondo de este protocolo para la utilización exitosa de este kit. Solo se obtendrá un rendimiento confiable si se adhieren estricta y cuidadosamente a las instrucciones suministradas.
2. Se deben incluir materiales de control o combinaciones de sueros en cada serie en concentraciones altas y bajas para comprobar la confiabilidad de los resultados.
3. Cuando se especifica el uso de agua para diluir o reconstituir, utilizar agua desionizada o destilada.
4. Para reducir la exposición a sustancias potencialmente dañinas, se deben usar guantes al manipular los reactivos del kit y las muestras humanas.
5. Todos los reactivos del kit y las muestras deben estar a temperatura ambiente y deben mezclarse suavemente pero completamente antes de utilizar. Evitar congelar y descongelar repetidamente los reactivos y las muestras.
6. Se debe crear una curva de calibración para cada serie.
7. Se debe incluir un control en cada serie y debe estar entre los límites de confianza establecidos.
8. Procedimientos técnicos inadecuados, pipeteo impreciso, lavado incompleto así como almacenamiento inadecuado de los reactivos pueden ser la causa de que los valores del ensayo para el control no reflejen los rangos establecidos.
9. Al leer la microplaca, la presencia de burbujas afectará la densidad óptica (DO). Remover cuidadosamente todas las burbujas antes de realizar la lectura.
10. La solución del sustrato (TMB) es sensible a la luz y debe permanecer incolora si se almacena adecuadamente. El desarrollo de un color azul puede indicar inestabilidad o contaminación, en cuyo caso no debe utilizarse.
11. Al dispensar el sustrato y la solución de parada, no utilizar pipetas en las que estos líquidos tomen contacto con partes metálicas.
12. Para prevenir la contaminación de los reactivos, utilizar una punta de pipeta nueva desechable para dispensar cada reactivo, muestra, calibrador y control.
13. No mezclar los componentes del kit con números de lote diferentes en una prueba y no utilizar ningún componente pasada su fecha de caducidad impresa en la etiqueta.
14. Los reactivos del kit deben considerarse como desechos peligrosos y deben eliminarse según las directrices nacionales.

LIMITACIONES

1. Todos los reactivos en el kit están calibrados para la determinación directa de cortisol en suero humano. El kit no está calibrado para la determinación de cortisol en saliva, plasma u otras muestras de origen humano o animal.
2. No utilizar suero excesivamente hemolizado, excesivamente lipémico, icterico o almacenado en forma inadecuada.
3. Cualquier muestra o suero de control que contenga azida, no es compatible con este kit, ya que pueden producir resultados falsos.
4. Para diluir cualquier muestra de suero de alta concentración, solo utilizar el calibrador 0. La utilización de cualquier otro reactivo puede producir resultados falsos.
5. Nunca se deben utilizar los resultados obtenidos con este kit, como la única base para un diagnóstico clínico. Por ejemplo, la ocurrencia de anticuerpos heterófilos en pacientes que habitualmente están expuestos a animales o productos animales, potencialmente pueden causar interferencias en pruebas inmunológicas. Por lo tanto, el diagnóstico clínico debe incluir todos los aspectos de los antecedentes de un paciente incluyendo la frecuencia de la exposición a animales / productos si se sospecha que hay resultados falsos.

PRECAUCIONES DE SEGURIDAD Y ADVERTENCIAS SOBRE MATERIAL POTENCIALMENTE BIPELIGROSO

El suero humano que puede haberse utilizado en la preparación de los calibradores y control, ha sido analizado y ha resultado no reactivo para el antígeno de superficie de la hepatitis B, asimismo ha sido analizado para la presencia de anticuerpos anti VHC y el virus de inmunodeficiencia humana (VIH) y ha resultado negativo. Sin embargo, ningún método ofrece una seguridad absoluta de la ausencia de VIH, VHC y hepatitis B o de ningún otro agente infeccioso. Los reactivos deben considerarse como potencialmente biopeligrosos y deben manipularse con las mismas precauciones aplicadas a cualquier muestra de sangre.

PELIGROS QUÍMICOS

Evitar el contacto con reactivos que contienen TMB, peróxido de hidrógeno y ácido sulfúrico. Si se produce contacto con cualquiera de estos reactivos, lavar con abundante agua. Se sospecha que TMB es carcinogénico.

TOMA DE MUESTRA Y ALMACENAJE

Se necesita aproximadamente 0,1 ml de suero por determinación en duplicado. Extraer 4-5 ml de sangre en un tubo debidamente etiquetado y dejar que coagule. Centrifugar y extraer cuidadosamente el suero sobrenadante. Almacenar a 4°C hasta por 24 horas o a -10°C o menos si el análisis se realizará más adelante. Considerar todas las muestras humanas como posible material biopeligroso y tomar las medidas adecuadas al manipularlas.


TRATAMIENTO PREVIO DEL SUERO

Este ensayo es un sistema directo; no es necesario el tratamiento previo de la muestra.

REACTIVOS Y EQUIPO NECESARIO PERO NO SUMINISTRADO

1. Pipetas de precisión para dispensar 20, 50, 100, 150 y 300 µl
2. Puntas de pipetas desechables
3. Agua destilada o desionizada
4. Agitador de microplacas.
5. Lector de microplacas con un filtro a 450 nm y límite superior de DO de 3,0 o mayor* (ver procedimiento del ensayo paso 10).

REACTIVOS SUMINISTRADOS

 **Microplaca con pocillos desprendibles recubiertos con anticuerpo anti cortisol de conejo** – Listo para usar.

Contenido: Una microplaca de 96 pocillos (12x8) recubiertos con anticuerpos en una bolsa re sellable don desecante.

Almacenaje: Refrigerar a 2-8°C

Estabilidad: 12 meses o según lo indicado en la etiqueta.

AG	HRP	CONC	Conjugado concentrado de peroxidasa de rábano picante - cortisol - X100
----	-----	------	--

Contenido: Conjugado cortisol-HRP en un tampón de base proteica con un conservante sin mercurio.

Volumen: 300 µl/vial

Almacenaje: Refrigerar a 2-8°C

Estabilidad: 12 meses o según lo indicado en la etiqueta.

Preparación: Diluir 1:100 en tampón del ensayo antes de utilizar (p. ej. 20 µl de HRP en 2 ml de tampón del ensayo). Si va a utilizar toda la microplaca, diluir 120 µl de HRP en 12 ml de tampón del ensayo. Eliminar cualquier remanente.

CAL	N	Calibradores de cortisol – Listos para usar. N = 0 a 6
-----	---	---

Contenido: Siete viales con cortisol en un tampón en base a suero humano con un conservante sin mercurio. Preparado añadiendo una cantidad definida de cortisol al suero.

*En la lista a continuación están las concentraciones aproximadas, ver las etiquetas en los viales para concentraciones exactas.

Calibrador	Concentración	Volumen/Vial
Calibrador 0	0 µg/dl	1,0 ml
Calibrador 1	0,5 µg/dl	0,3 ml
Calibrador 2	2 µg/dl	0,3 ml
Calibrador 3	5 µg/dl	0,3 ml
Calibrador 4	10 µg/dl	0,3 ml
Calibrador 5	30 µg/dl	0,3 ml
Calibrador 6	60 µg/dl	0,3 ml

Almacenaje: Refrigerar a 2-8°C

Estabilidad: 12 meses en viales sellados o según lo indicado en la etiqueta. Una vez abiertos, los calibradores deben utilizarse dentro de 14 días o alicuotados y almacenados congelados. Evitar múltiples ciclos de congelación y descongelación.

CONTROL	Control – Listo para usar.
---------	-----------------------------------

Contenido: Un vial con cortisol en un tampón en base a suero humano con un conservante sin mercurio. Preparado añadiendo una cantidad definida de cortisol al suero. Ver la etiqueta del vial para valor esperado y rango aceptable.

Volumen: 0,3 ml/vial

Almacenaje Refrigerar a 2-8 °C

Estabilidad: 12 meses en viales sellados o según lo indicado en la etiqueta. Una vez abiertos, el suero de control debe utilizarse dentro de 14 días o alicuotado y almacenado congelado. Evitar múltiples ciclos de congelación y descongelación.

WASH	SOLN	CONC	Concentrado de tampón de lavado - X10
------	------	------	--

Contenido: Una botella con tampón con detergente no iónico y conservante sin mercurio.

Volumen: 50 ml/botella

Almacenaje: Refrigerar a 2-8 °C

Estabilidad: 12 meses o según lo indicado en la etiqueta

Preparación: Diluir 1:10 en agua destilada antes de utilizar Si va a utilizar toda la microplaca, diluir 50 ml del tampón de lavado concentrado en 450 ml de agua destilada.

ASS	BUF	Tampón del ensayo - Listo para usar.
-----	-----	---

Contenido: Un vial con un tampón en base proteica con un conservante sin mercurio.

Volumen: 15 ml/vial

Almacenaje: Refrigerar a 2-8°C

Estabilidad: 12 meses o según lo indicado en la etiqueta.

CHROM	TMB	Sustrato TMB - Listo para usar.
-------	-----	--

Contenido: Una botella con tetrametilbencidina y peróxido de hidrógeno en un tampón sin DMF o DMSO.

Volumen: 16 ml/botella

Almacenaje: Refrigerar a 2-8 °C

Estabilidad: 12 meses o según lo indicado en la etiqueta.

STOP	SOLN	Solución de parada - Lista para usar.
------	------	--

Contenido: Un vial con ácido sulfúrico 1M.

Volumen: 6 ml/vial

Almacenaje: Refrigerar a 2-8 °C

Estabilidad: 12 meses o según lo indicado en la etiqueta.

Tratamiento previo de la muestra: Ninguno.

Todos los reactivos deben estar a temperatura ambiente antes de utilizarlos. Los calibradores, controles y muestras deben analizarse en duplicado. Una vez que el procedimiento se ha iniciado, se deben completar todos los pasos sin interrupción.

- 1.Preparar las soluciones de trabajo para el conjugado cortisol-HRP y tampón de lavado.
- 2.Sacar el número de tiras necesario de tiras de microplacas. Volver a sellar la bolsa y almacenar las tiras no utilizadas en refrigeración.
- 3.Pipetear 20 µl de cada calibrador, control y muestra en los pocillos etiquetados correspondientes en duplicado.
- 4.Pipetear 100 µl de la solución de trabajo del conjugado en cada pocillo (se recomienda utilizar una pipeta multicanal).
- 5.Incubar en un agitador de placas(aproximadamente 200 rpm) por 45 minutos a temperatura ambiente.
- 6.Lavar los pocillos 3 veces con 300 µl de tampón de lavado diluido por pocillo y golpear la placa con firmeza contra un papel absorbente para asegurar que esté seca (se recomienda utilizar una lavadora).
- 7.Pipetear 150 µl de sustrato TMB en cada pocillo a intervalos regulares.
- 8.Incubar en un agitador de placas por 15-20 minutos a temperatura ambiente (o hasta que el calibrador 0 adquiera un color azul oscuro para la DO deseada).
- 9.Pipetear 50 µl de solución de parada en cada pocillo a los mismos intervalos regulares utilizados en el paso 7.
10. Leer la placa en un lector de placas a 450 nm dentro de 20 minutos después de añadir la solución de parada.

* Si la DO sobrepasa el nivel superior de detección o si no hay un filtro de 450 nm disponible, se puede sustituir por uno de 405 o 415 nm. Las densidades ópticas serán más bajas, sin embargo, esto no afectará los resultados de las muestras de los pacientes/control.

CÁLCULOS

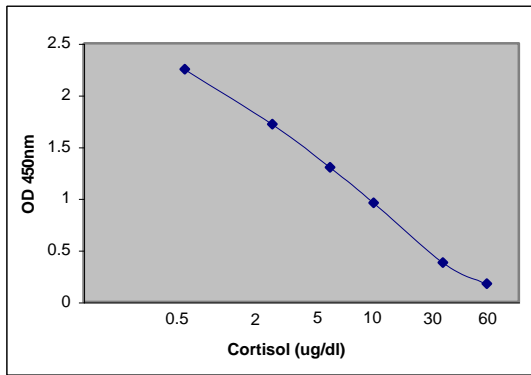
1. Calcular la densidad óptica promedio de cada calibrador en duplicado.
2. Dibujar una curva de calibración en papel semi log con las densidades ópticas promedio en el eje Y y las concentraciones de los calibradores en el eje X. Si se utiliza software para inmunoensayo, se recomienda una curva de 4 parámetros.
3. Calcular la densidad óptica promedio de cada duplicado de las muestras desconocidas
4. Leer los valores de las muestras desconocidas directamente de la curva de calibración.
5. Si la lectura de la muestra resulta más de 60 µg/dl, diluir la muestra con calibrador 0 a una dilución no mayor de 1:8. El resultado obtenido debe multiplicarse por el factor de dilución.

DATOS TÍPICOS EN UNA TABLA

Calibrador	DO 1	DO 2	DO promedio	Valor (µg/dl)
0	2,263	2,183	2,223	0
1	2,071	2,001	2,036	0,5
2	1,717	1,719	1,718	2
3	1,382	1,402	1,395	5
4	0,985	0,933	0,959	10
5	0,385	0,373	0,379	30
6	0,174	0,176	0,175	60
Desconocido	0,697	0,722	0,710	15,3

CURVA DE CALIBRACIÓN TÍPICA

Curva de ejemplo solamente. **No utilizar** para calcular resultados.



CARACTERÍSTICAS DEL RENDIMIENTO

SENSIBILIDAD

El límite de detección mínimo se calcula a partir de la curva de calibración determinando la concentración resultante de la DO promedio del calibrador 0 (basado en 10 análisis repetidos) menos 2 SD. Por lo tanto la sensibilidad del kit DAsource Direct Cortisol ELISA es de **0,4 µg/dl**.

ESPECIFICIDAD (REACCIÓN CRUZADA)

Los siguientes compuestos fueron analizados para comprobar reactividad cruzada con el kit Direct Cortisol ELISA con cortisol con reacción cruzada al 100%.

Esteroides	%Reactividad cruzada
Cortisol	100
Prednisolona	13,6
Corticoesterona	7,6
Desoxicorticoesterona	7,2
Progesterona	7,2
Cortisona	6,2
Desoxicortisol	5,6
Pednisona	5,6
Dexametasona	1,6

No se detectó reacción cruzada con DHEAS y Tetrahydrocortisona.

Tener en cuenta que se observa una reacción cruzada de 13,6% con prednisolona. Debido a que la prednisona es convertida a prednisolona in vivo, se debe tener precaución al analizar los niveles de cortisol en pacientes que estén sometidos a cualquiera de los dos tratamientos.

PRECISIÓN INTRA ENSAYO

Se analizaron tres muestras 10 veces cada una con la misma curva de calibración. Los resultados (en µg/dl) están en la tabla a continuación:

Muestra	Promedio	SD	CV%
1	1,44	0,14	9,4
2	14,06	0,41	2,9
3	37,55	1,87	5,0

PRECISIÓN ENTRE ENSAYOS

Se analizaron tres muestras 10 veces en un lapso de cuatro semanas. Los resultados (en µg/dl) están en la tabla a continuación:

Muestra	Promedio	SD	CV%
1	1,60	0,13	8,1
2	15,01	0,74	5,0
3	38,18	1,43	3,8

RECUPERACIÓN

Se prepararon muestras añadiendo cantidades definidas de cortisol a muestras de suero de tres pacientes (1:1). Los resultados (en µg/dl) están en la tabla a continuación:

Muestra	Resultados observados	Resultados esperados	Recuperación%	
1 añadido	Sin	3,86	-	
	+2,0	3,61	2,93	123,2
	+10,0	7,63	6,93	110,1
	+30,0	16,93	18,72	90,4
2 añadido	Sin	6,06	-	
	+5,0	3,74	3,28	114,0
	+10,0	9,06	8,03	112,8
	+60,0	32,49	33,03	98,4
3 añadido	Sin	10,91	-	
	+0,5	6,58	5,70	115,4
	+5,0	8,74	7,95	109,9
	+60,0	39,04	35,40	110,3

LINEALIDAD

Suero de tres pacientes. Las muestras se diluyeron con el calibrador 0. Los resultados (en µg/dl) están en la tabla a continuación:

Muestra	Resultados observados	Resultados esperados	Recuperación%	
1	1:2	10,94	-	
	1:4	6,13	5,47	112,1
	1:8	3,19	2,74	116,4
	1:8	1,55	1,37	113,1
2	1:2	18,92	-	
	1:4	9,64	9,46	101,9
	1:4	4,61	4,73	97,5
	1:8	1,98	2,37	83,7
3	1:2	42,00	-	
	1:4	20,44	21,00	97,8
	1:4	9,57	10,50	94,0
	1:8	4,76	5,25	90,7

VALORES ESPERADOS

Como en todos los ensayos clínicos, cada laboratorio debe reunir datos y establecer su propio rango de valores normales esperados.

Grupo	Promedio (µg/dl)	Rango (µg/dl)
Hombres y mujeres – AM	15,59	3,95-27,23
Hombres y mujeres – PM	5,93	1,45-10,41

REFERENCIAS

1. Brock P., et al., Clinical Chemistry 24/9:1595, 1978.
2. Morris R., Annals of Clinical Biochemistry 15:178, 1978.
3. Silver A.C., et al., Clinical Chemistry 29:1869, 1983.
4. Vecsei P., et al., Experimentia 28:1104, 1972.
5. Abraham G.E. et al., Anal Lett. 5:757, 1972.
6. Gomez-Sanchez C., et al., J. Lab. Clin. Med 89:902, 1977.
7. Demeris L.M., et al., Clin. Biochem. 10:104, 1977.
8. Poland R.E., et al., Life Sci. 30:177, 1982.
9. Peters J.R., et al., Clin Edocrinol. 17:583, 1982.
10. Papanicolaou, D.A. et al J. Clin Endocrinol Metab 87(10):4515-4521.
11. Check, J.H., et al, Falsely elevated steroidal assay levels related to heterophile antibodies against various animal species. Gynecol Obstet Invest 40:139-140, 1995.

fecha de revisión : 2020-02-24