



DCM018-12  
Ed. 12/2017

# URINARY CORTISOL ELISA

per analisi di routine

Determinazione immunoenzimatica del Cortisolo urinario libero

IVD



LOT

Vedere etichetta esterna

2°C - 8°C



Σ = 96 test

REF DKO018

## DESTINAZIONE D'USO

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

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

## 1. SIGNIFICATO CLINICO

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

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

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

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

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

## 2. PRINCIPIO DEL METODO

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

Dopo l'incubazione, la separazione libero-legato si ottiene mediante semplice lavaggio della fase solida. Infine l'enzima presente nella frazione legata, reagendo con il Substrato (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>) ed il TMB Substrate, sviluppa una colorazione blu che vira al giallo dopo aggiunta dello Stop solution (H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>).

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

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

## 3. REATTIVI, MATERIALI E STRUMENTAZIONE

### 3.1. Reattivi e materiali forniti nel kit

#### 1. Calibrators (5 flaconi)

CAL0	(4 mL)	REF DCE002/1806-0
CAL1	(1 mL)	REF DCE002/1807-0
CAL2	(1 mL)	REF DCE002/1808-0
CAL3	(1 mL)	REF DCE002/1809-0
CAL4	(1 mL)	REF DCE002/1810-0

#### 2. Controls (2 flaconi, 1 mL ciascuno, pronti all'uso)

Low Control	REF DCE045/1801-0
High Control	REF DCE045/1802-0

#### 3. Conjugate (1 flacone, 33 mL)

Cortisolo coniugato con perossidasi di rafano (HRP)  
REF DCE002/1802-0

#### 4. Coated Microplate (1 micropiastra breakable)

Anticorpo anti Cortisolo adsorbito sulla micropiastra  
REF DCE002/1803-0

#### 5. TMB Substrate (1 flacone, 15 mL)

H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>-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, Proclin < 0,0015%  
REF DCE054-0

### 3.2. Reattivi necessari non forniti nel kit

Acqua distillata.

### 3.3. Materiale e strumentazione ausiliare

Dispensatori automatici.

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

#### Note

Conservare 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 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<sup>R</sup> 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/H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 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 urinari di Cortisolo.

#### 5. PRECAUZIONI

- Si prega di attenersi rigorosamente alla sequenza dei passaggi indicata in questo protocollo. I risultati presentati qui sono stati ottenuti usando specifici reagenti elencati in queste Istruzioni per l'Uso.
- Tutti i reattivi devono essere conservati a temperatura controllata di 2-8°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 campioni di controllo.
- Osservare la massima precisione nella ricostituzione e dispensazione dei reagenti.
- I lettori di micropiastre leggono l'assorbanza verticalmente. Non toccare il fondo dei pozzetti.

#### 6. PROCEDIMENTO

##### 6.1. Preparazione dei Calibratori (C<sub>0</sub>...C<sub>4</sub>)

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

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

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

Una volta aperti sono stabili per 6 mesi a 2-8°C.

##### 6.2. Preparazione del Coniugato

Il Coniugato è pronto all'uso.

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

##### 6.3. Preparazione del campione

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

**Nota importante:** il kit è stato studiato per il dosaggio del Cortisolo su campioni di urina non trattati; trattamenti di acidificazione delle urine che portano il pH sotto a 5.0 potrebbero interferire con il dosaggio e generare risultati aberranti.

Non è necessario effettuare diluizioni sui campioni di urina. Raccogliere le urine delle 24 ore in un unico recipiente.

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

I Controlli sono pronti all'uso.

I campioni con concentrazione maggiore di 500 ng/mL non devono essere diluiti ma devono essere refertati come "> 500 ng/mL".

#### 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 (C<sub>0</sub>-C<sub>4</sub>), due per ogni Controllo, due per ogni Campione ed uno per il Bianco.

Reagente	Calibratore	Campioni /Controlli	Bianco
Calibratore C <sub>0</sub> -C <sub>4</sub>	10 µL		
Campioni /Controlli		10 µL	
Coniugato	300 µL	300 µL	
Incubare 1 h a +37°C. Allontanare la miscela di reazione; lavare i pozzetti 3 volte aggiungendo 0,350 mL di wash solution diluita. <b>Nota importante:</b> 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. <b>Lavaggi automatici:</b> se si utilizza un lavatore automatico, effettuare 6 lavaggi.			
TMB Substrate	100 µL	100 µL	100 µL
Incubare 15 minuti a temperatura ambiente (22÷28°C), al riparo dalla luce			
Stop Solution	100 µL	100 µL	100 µL
Agitare delicatamente la piastra. Leggere l'assorbanza (E) a 450 nm contro una lunghezza d'onda di riferimento di 620-630 nm oppure contro il Bianco entro 5 minuti.			

#### 7. CONTROLLO QUALITA'

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

## 8. RISULTATI

### 8.1. Estinzione Media

Calcolare l'estinzione media (Em) di ciascun punto della curva di calibrazione (C<sub>0</sub>-C<sub>4</sub>) e di ogni campione.

### 8.2. Curva di calibrazione

Tracciare il grafico dell'assorbanza in funzione delle concentrazioni dei Calibratori (C<sub>0</sub>-C<sub>4</sub>). (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.

**Per calcolare le concentrazioni nelle urine applicare la seguente formula:**

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

## 9. VALORI DI RIFERIMENTO

Le concentrazioni urinarie delle 24 ore di Cortisolo sono comprese nei seguenti intervalli:

50 - 190 $\mu\text{g}$ / 24 ore
---------------------------------

## 10. PARAMETRI CARATTERISTICI

### 10.1. Precisione

#### 10.1.1. Intra-Assay

La variabilità all'interno dello stesso kit è stata determinata replicando (20x) la misura di tre differenti urine. La variabilità intra-assay è 6.5%.

#### 10.1.2. Inter-Assay

La variabilità tra kit differenti è stata determinata replicando (10x) la misura di tre differenti urine con kit appartenenti a lotti diversi. La variabilità inter-assay è 7.2%.

### 10.2. Accuratezza

La prova di recupero condotta su un campione arricchito con 12.5 - 25 - 50 - 100 ng/mL di Cortisolo, ha dato un valore medio ( $\pm$ SD) di 107,48%  $\pm$  8,16%.

### 10.3. Sensibilità

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

### 10.4. Specificità

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

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

### 10.5. Correlazione

Il nuovo kit Urinary Cortisol Diametra è stato comparato con il precedente kit Urinary Cortisol Diametra. Sono stati testati 100 campioni di urine.

La curva di regressione è:

$$Y = 0,90 \cdot X + 9,95$$

$$r^2 = 0,836$$

## 11. DISPOSIZIONI PER LO SMALTIMENTO

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

## BIBLIOGRAFIA

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

Ed. 12/2017

DCM018-12

**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](mailto:info@diametra.com)



DCM018-12  
Ed. 12/2017

1 11 1 1 1

# URINARY CORTISOL ELISA

for routine analysis

Direct immunoenzymatic determination of free Cortisol in urine

IVD



LOT

See external label

2°C 8°C



Σ = 96 tests

REF DKO018

## INTENDED USE

Competitive immunoenzymatic colorimetric method for quantitative determination of free Cortisol concentration in Urine.

Urinary Cortisol ELISA kit is intended for laboratory use only.

## 1. CLINICAL SIGNIFICANCE

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

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

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

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

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

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

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

## 2. PRINCIPLE

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

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

Then, the enzyme HRP in the bound-fraction reacts with the Substrate (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>) and the TMB Substrate and develops a blue color that changes into yellow when the Stop Solution (H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>) 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)

CAL0	(4 mL)	REF DCE002/1806-0
CAL1	(1 mL)	REF DCE002/1807-0
CAL2	(1 mL)	REF DCE002/1808-0
CAL3	(1 mL)	REF DCE002/1809-0
CAL4	(1 mL)	REF DCE002/1810-0

#### 2. Controls (2 vial, 1 mL each, ready to use)

Low Control	REF DCE045/1801-0
High Control	REF DCE045/1802-0

#### 3. Conjugate (1 vial, 33 mL)

Cortisol conjugated with horseradish peroxidase (HRP)  
REF DCE002/1802-0

#### 4. Coated Microplate (1 breakable microplate)

Anti Cortisol antibody adsorbed on the microplate  
REF DCE002/1803-0

#### 5. TMB Substrate (1 vial, 15 mL)

H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>-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, Proclin < 0,0015%  
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)

#### Note

Store all reagents at 20±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, the microplate is stable until expiry date of the kit.

## 4. WARNINGS

- This kit is intended for in vitro use by professional persons only. Not for internal or external use in Humans or Animals.
- Use appropriate personal protective equipment while working with the reagents provided.
- Follow Good Laboratory Practice (GLP) for handling blood products.
- Material of animal origin used in the preparation of the kit has been obtained from animals certified as healthy and the bovine protein has been obtained from countries not infected by BSE, but these materials should be handled as potentially infectious.
- Some reagents contain small amounts of Proclin 300<sup>R</sup> 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/H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> to direct 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 control samples.
- Maximum precision is required for reconstitution and dispensation of reagents.
- Plate readers measure vertically. Do not touch the bottom of the wells.

## 6. PROCEDURE

### 6.1. Preparation of the Calibrators (C<sub>0</sub>...C<sub>4</sub>)

Before use, leave 5 minutes on a rotating mixer.

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

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

Once opened, the Calibrators are stable 6 months at 2-8°C.

### 6.2. Preparation of the Conjugate

The Conjugate is ready to use.

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

### 6.3. Preparation of the Sample

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

**Important note:** the kit has been designed to be used on untreated urine samples; acidification treatments of the urine that lead the pH to values below 5.0 could interfere with the assay and produce aberrant results. It is not necessary to dilute the sample. The total volume of urine excreted during a 24 hours should be collected and mixed in a single container.

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

The Controls are ready to use.

Samples with concentration greater than 500 ng/mL has not to be diluted; such samples has to be reported as "> 500 ng/mL".

#### 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 (C<sub>0</sub>-C<sub>4</sub>), two for each Control, two for each sample, one for Blank.

Reagent	Calibrator	Samples/ Controls	Blank
Calibrator C <sub>0</sub> -C <sub>4</sub>	10 µL		
Samples/ Controls		10 µL	
Conjugate	300 µL	300 µL	
Incubate at 37°C for 1 hour. Remove the contents from each well. Wash the wells 3 times with 350 µL of diluted wash solution. <b>Important note:</b> 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. <b>Automatic washer:</b> in case you use an automatic washer, it is advised to do 6 washing steps.			
TMB Substrate	100 µL	100 µL	100 µL
Incubate at room temperature (22÷28°C) for 15 minutes in the dark.			
Stop Solution	100 µL	100 µL	100 µL
Shake the microplate gently. Read the absorbance (E) at 450 nm against a reference wavelength of 620-630 nm or against Blank within 5 minutes.			

#### 7. QUALITY CONTROL

Each laboratory should assay controls at normal, high and low levels range of urinary Cortisol for monitoring assay performance. These controls should be treated as unknowns and values determined in every test procedure performed. Quality control charts should be maintained to follow the performance of the supplied reagents. Pertinent statistical methods should be employed to ascertain trends. The individual laboratory should set acceptable assay performance limits. Other parameters that should be monitored include the 80, 50 and 20% intercepts of the 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 (E<sub>m</sub>) for each point of the calibration curve (C<sub>0</sub>-C<sub>4</sub>) and of each sample.

##### 8.2. Calibration curve

Plot the values of absorbance (E<sub>m</sub>) of the Calibrators (C<sub>0</sub>-C<sub>4</sub>) 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.

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

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

#### 9. REFERENCE VALUES

The urinary Cortisol concentration during the 24 hours are included in the following range:

50 - 190 µg / 24 hours
------------------------

## 10. PERFORMANCE AND CHARACTERISTICS

### 10.1. Precision

#### 10.1.1. Intra Assay Variation

Within run variation was determined by replicate (20x) the measurement of three different urine samples in one assay. The within assay variability is 6.5%.

#### 10.1.2. Inter Assay Variation

Between run variation was determined by replicate (10x) the measurement of three different urine samples in different lots of kit. The between assay variability is 7.2%.

### 10.2. Accuracy

The recovery of 12.5 - 25 - 50 - 100 ng/mL of Cortisol added to a sample gave an average value ( $\pm$ SD) of 107.48%  $\pm$  8.16% with reference to the original concentrations.

### 10.3. Sensitivity

The lowest detectable concentration of urinary Cortisol that can be distinguished from the Calibrator 0 is 2.95 ng/mL at the 95% confidence limit.

### 10.4. Specificity

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

Reagent	Cross-reactivity
Cortisol	100 %
Prednisolone	46.2 %
11-Deoxycortisol	4 %
Cortisone	3.69 %
Prednisone	3.10 %
11 $\alpha$ OH Progesterone	1 %
Progesterone	< 0.1 %
Aldosterone	< 0.1 %
Pregnenolone	< 0.1 %
17 $\beta$ Estradiol	< 0.1 %
Estrone 3-solfato	< 0.1 %
Estriol	< 0.1 %
Testosterone	< 0.1 %
Spirolactone	< 0.1 %
DHEA	< 0.1 %
DHEA-S	< 0.1 %
Androstenedione	< 0.1 %
Androsterone	< 0.1 %
DHT	< 0.1 %
Danazol	< 0.1 %
Cholesterol	< 0.1 %
Dexamethasone	< 0.1 %

### 10.5. Correlation

The new Diametra Urinary Cortisol ELISA kit was compared to the old Diametra Urinary Cortisol ELISA kit. 100 urine samples were analysed.

The linear regression curve was calculated:

$$Y = 0.90 \cdot X + 9.95$$

$$r^2 = 0.836$$

## 11. WASTE MANAGEMENT

Reagents must be disposed off in accordance with local regulations.

## BIBLIOGRAPHY

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

Ed. 12/2017

DCM018-12

**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](mailto:info@diametra.com)





DCM018-12  
Ed. 12/2017

1

# URINARY CORTISOL ELISA

para análisis de rutina

(CORTISOL URINARIO)

Determinación inmunoenzimática del cortisol urinario libre

IVD



LOT

Ver etiqueta externa



$\Sigma = 96$  ensayos

REF DKO018

## USO PREVISTO

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

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

## 1. SIGNIFICADO CLÍNICO

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

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

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

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

El cortisol libre representa la fracción de cortisol metabólicamente activa.

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

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

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

## 2. PRINCIPIO DEL MÉTODO

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

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

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

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

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

## 3. REACTIVOS, MATERIALES E INSTRUMENTACIÓN

### 3.1. Reactivos y materiales suministrados en el kit

#### 1. Calibradores (5 frascos)

CAL0	(4 mL)	REF DCE002/1806-0
CAL1	(1 mL)	REF DCE002/1807-0
CAL2	(1 mL)	REF DCE002/1808-0
CAL3	(1 mL)	REF DCE002/1809-0
CAL4	(1 mL)	REF DCE002/1810-0

#### 2. Controles (2 frascos, 1 mL cada uno, listo para usar)

Control bajo	REF DCE045/1801-0
Control alto	REF DCE045/1802-0

#### 3. Conjugado (1 frasco, 33 mL)

Cortisol conjugado con peroxidasa de rabano (HRP)	REF DCE002/1802-0
---	-------------------

#### 4. Microplaca recubierta (1 microplaca rompible)

Anticuerpo anti Cortisol absorbido en la microplaca	REF DCE002/1803-0
---	-------------------

5. Substrato TMB (1 frasco, 15 mL)  
 $H_2O_2$ -TMB (0,26 g/L) (*evitar el contacto con la piel*)  
**REF DCE004-0**
6. Solución de parada (1 frasco, 15 mL)  
 Ácido sulfúrico 0,15 mol/L (*evitar el contacto con la piel*)  
**REF DCE005-0**
7. Solución de lavado conc.10X (1 frasco, 50 mL)  
 Tampón fosfato 0,2 M, Proclin < 0,0015%  
**REF DCE054-0**

### 3.2. Reactivos necesarios no suministrados en el kit

Agua destilada.

### 3.3. Material e instrumentación auxiliares

Dispensadores automáticos.

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

### Nota

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

*Abrir la bolsa del reactivo 4 (microplaca recubierta) solo cuando se encuentre a temperatura ambiente y cerrarla inmediatamente después de extraer las tiras que se vayan a utilizar; una vez abierto, se mantiene estable hasta la fecha de caducidad indicada en el kit.*

## 4. ADVERTENCIAS

- Este kit de ensayo está previsto para usarse in vitro y por personal experto. No es para uso interno o externo en humanos o animales.
- Usar los equipos de protección individual previstos al trabajar con los reactivos suministrados.
- Siga las Buenas Prácticas de Laboratorio (GLP) en el manejo de las muestras sanguíneas y sus derivados.
- Materiales de origen animal utilizadas para la elaboración de este kit se obtuvieron a partir de animales sanos y de las proteínas de bovino se obtuvieron de los países no afectados por la EEB, pero estos materiales se debe utilizar como potencialmente infecciosos.
- Algunos reactivos contienen pequeñas cantidades de Proclin 300<sup>R</sup> 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/ $H_2O_2$  a la luz solar directa, metales u oxidantes. No congelar la solución.
- Este método permite determinar concentraciones de cortisol de 10 ng/mL a 500 ng/mL.
- El suministro de esteroides naturales o sintéticos puede alterar los niveles urinarios de Cortisol.

## 5. PRECAUCIONES

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

## 6. PROCEDIMIENTO

### 6.1. Preparación de los Calibradores (C<sub>0</sub>...C<sub>4</sub>)

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

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

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

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

## 6.2. Preparación del Conjugado

El Conjugado es listo para usar.

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

## 6.3. Preparación de la muestra

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

**Nota importante:** el kit está diseñado para la cuantificación de cortisol en muestras de orina no tratada; tratamientos que traen la acidificación de la orina a pH por debajo de 5.0 pueden interferir con el ensayo y generar resultados aberrantes.

No es necesario diluir las muestras de orina. Recoger la orina de 24 horas en un único recipiente.

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

Los controles son listo para usar.

Las muestras con una concentración superior a 500 ng/mL no deben diluirse, y deben informarse como "> 500 ng/mL".

## 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 (C<sub>0</sub>-C<sub>4</sub>), dos para cada Control, dos para cada muestra, uno para el blanco.

Reactivo	Calibrador	Muestras/ Controles	Blanco
Calibradores C <sub>0</sub> -C <sub>4</sub>	10 µL		
Muestras/ Controles		10 µL	
Conjugado	300 µL	300 µL	
Incubar 1 h a +37°C. Retirar la mezcla de reacción. Lave los pozos 3 veces con 0,350 mL de solución de lavado diluida. <b>Nota importante:</b> 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. <b>Lavados automático:</b> 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 la placa con cuidado. Leer la absorbancia (E) a 450 nm frente una segunda lectura de referencia a 620-630 nm o frente al blanco dentro de los 5 minutos.			

## 7. CONTROL DE CALIDAD

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

## 8. RESULTADOS

### 8.1. Absorbancia media

Calcular la absorbancia media (Em) de cada punto de la Curva de calibración (C<sub>0</sub>-C<sub>4</sub>) y de cada muestra.

### 8.2. Curva de calibración

Trazar el gráfico de la absorbancia en función de las concentraciones de los Calibradores (C<sub>0</sub>-C<sub>4</sub>). (p. ej.: Logística de cuatro parámetros).

### 8.3. Cálculo de los resultados

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

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

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

## 9. VALORES DE REFERENCIA

Las concentraciones urinarias de 24/h de cortisol se incluyen en los siguientes intervalos:

50 - 190  $\mu\text{g}/24 \text{ horas}$

## 10. PARÁMETROS CARACTERÍSTICOS

### 10.1. Precisión

#### 10.1.1. Intraensayo

La variabilidad dentro del mismo kit se ha determinado replicando (20x) la medición de tres muestras de orina distintos. La variabilidad intraensayo es 6,5%.

#### 10.1.2. Interensayo

La variabilidad entre distintos kits se ha determinado replicando (10x) la medición de tres muestras de orina distintos con kits pertenecientes a lotes distintos. La variabilidad interensayo es 7,2%.

### 10.2. Exactitud

La prueba de recuperación realizada en una muestra enriquecida con 12,5 - 25 - 50 - 100 ng/mL de cortisol ha dado un valor medio ( $\pm$ SD) de 107,48%  $\pm$  8,16%.

### 10.3. Sensibilidad

La concentración mínima de cortisol urinario medible es 2,95 ng/mL con un límite de confianza del 95%.

### 10.4. Especificidad

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

Sustancia	Reactividad cruzada
Cortisol	100 %
Prednisolona	46,2 %
11-Deoxycortisol	4 %
Cortisona	3,69 %
Prednisona	3,10 %
11 $\alpha$ OH Progesterona	1 %
Progesterona	< 0,1 %
Aldosterona	< 0,1 %
Pregnenolona	< 0,1 %
17b Estradiol	< 0,1 %
Estrona 3-sulfato	< 0,1 %
Estriol	< 0,1 %
Testosterona	< 0,1 %
Spirolactona	< 0,1 %
DHEA	< 0,1 %
DHEA-S	< 0,1 %
Androstenediona	< 0,1 %
Androsterona	< 0,1 %
DHT	< 0,1 %
Danazol	< 0,1 %
Cholesterol	< 0,1 %
Desametasona	< 0,1 %

### 10.5. Correlación

El kit Diametra Urinary Cortisol ELISA se ha comparado con el kit Diametra Urinary Cortisol ELISA del método anterior. Se probaron 100 muestras de orina.

La curva de regresión es la siguiente:

$$Y = 0,90 \cdot X + 9,95$$

$$r^2 = 0,836$$

## 11. DISPOSICIONES PARA LA ELIMINACIÓN

Los reactivos deben eliminarse de acuerdo con las leyes locales.

## BIBLIOGRAFÍA

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

Ed. 12/2017

DCM018-12

**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](mailto:info@diametra.com)

	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 Establa 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	<b>LOT</b>	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	<b>CONT</b>	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 Límitación de temperatura Limites de température de conservation Temperature limitation Limiti di temperatura Temperaturas limites de conservação	<b>REF</b>	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

**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