

Instructions for use
Cortisol Urine ELISA

Please use only the valid version of the Instructions for Use provided with the kit

1. INTENDED USE

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

Cortisol Urine ELISA kit is intended for laboratory use only.

1.2 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 estro-progestogen 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 adrenal function.

This test is very useful to estimate the real adrenal function because the free and therefore metabolically active portion is measured. 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_2O_2) and the TMB Substrate and develops a blue colour that changes into yellow when the Stop Solution (H_2SO_4) is added.

The colour intensity is inversely proportional to the Cortisol concentration of in the sample.

Cortisol concentration in the sample is calculated through a standard curve.

3. REAGENTS, MATERIALS AND INSTRUMENTATION**3.1 Reagents and materials supplied in the kit****Standards and Controls**

Cat. no.	Component	Standard	Concentration ng/ml	Volume / vial
MS E-5101	STANDARD A	Standard A	0	4 ml
MS E-5102	STANDARD B	Standard B	1	1 ml
MS E-5103	STANDARD C	Standard C	5	1 ml
MS E-5104	STANDARD D	Standard D	30	1 ml
MS E-5105	STANDARD E	Standard E	200	1 ml
MS E-5151	CONTROL 1	Control 1 *	Refer to vial labels or QC-	1 ml
MS E-5152	CONTROL 2	Control 2 *	Report for expected value and acceptable range!	1 ml

* Control: ready to use

MS E-5140 CONJUGATE Conjugate

Content: Cortisol conjugated with horseradish peroxidase (HRP)

Volume: 1 x 33 ml

MS E-5131 96 Microtiterwells

Content: 1 breakable microplate; Anti-Cortisol-antibody adsorbed on the microplate.

MS E-0030 **WASH-CONC 10x** **Wash Solution 10x**

Content: Phosphate buffer 0.2 M, Proclin < 0.0015%.

Volume: 1 x 50 ml

MS E-0055 **SUBSTRATE** **Substrate Solution**

Content: H₂O₂-TMB, 0.26 g/l (avoid any skin contact).

Volume: 1 x 15 ml

MS E-0080 **STOP-SOLN** **Stop Solution**

Content: Sulphuric acid, 0.15 mol/l (avoid any skin contact).

Volume: 1 x 15 ml

Hazards
identification:



H290 May be corrosive to metals.

H314 Causes severe skin burns and eye damage.

3.2 Reagents necessary not supplied

Distilled water

3.3 Auxiliary materials and instrumentation

Automatic dispenser

Microplate reader (450 nm, 620 – 630 nm)

Note

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

Open the bag of Coated Microplate only when it is at room temperature and close 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 as preservative. Avoid the contact with skin or mucosa.
- The TMB Substrate contains an irritant, which may be harmful if inhaled, ingested or absorbed through the skin. To prevent injury, avoid inhalation, ingestion or contact with skin and eyes.
- The Stop Solution consists of a diluted sulphuric acid solution. Sulphuric acid is poisonous and corrosive and can be toxic if ingested. To prevent chemical burns, avoid contact with skin and eyes.
- Avoid the exposure of reagent TMB/H₂O₂ to directed sunlight, metals or oxidants. Do not freeze the solution.
- This method allows the determination of Cortisol from 0.47 ng/ml to 200 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 °C – 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 °C – 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 it is recommended to increase the number of washes.
- It is important that the time of reaction in each well is held constant for reproducible results. Pipetting of samples should not extend beyond ten minutes to avoid assay drift. If more than 10 minutes are needed, follow the same order of dispensation. If more than one plate is used, it is recommended to repeat the dose response curve in each plate.
- Addition of the TMB Substrate solution initiates a kinetic reaction, which is terminated by the addition of the Stop Solution. Therefore, the TMB Substrate and the Stop Solution should be added in the same sequence to eliminate any time deviation during the reaction.
- Observe the guidelines for performing quality control in medical laboratories by assaying controls samples.
- Maximum precision is required for reconstitution and dispensation of reagents.
- Plate readers measure vertically. Do not touch the bottom of the wells.

6. STORAGE AND STABILITY

Store the kit at 2 °C – 8 °C; the kit is stable until the expiry date claimed on the kit label and the QC-Report. Do not use the kit or its components after the expiry date.

7. PROCEDURE

7.1 Preparation of the Standard and Controls

Before use, leave 5 minutes on a rotating mixer.

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

	Standard A	Standard B	Standard C	Standard D	Standard E
ng/ml	0	1	5	30	200

The Controls are ready to use.

Once opened the standards and controls are stable 6 months at 2 °C – 8 °C.

7.2 Preparation of Conjugate

The Conjugate is ready to use.

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

7.3 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 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 °C – 8 °C or at -20 °C for longer periods (maximum 6 months).

Samples with concentration greater than 200 ng/ml have not to be diluted; such samples have to be reported as "> 200 ng/ml".

7.4 Preparation of Wash Solution

Dilute the content of the vial of the "Wash Solution" 10X concentrate 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 °C – 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.

7.5 Procedure

Allow all reagents to reach room temperature (22 °C – 28 °C) for at least 30 minutes.

Unused coated microwell strips should be released securely in the foil pouch containing desiccant and stored at 2 °C – 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 standard curve (A – E), two for each Control, two for each sample, one for Blank.

Reagent	Standards	Samples/Controls	Blank
Standard A – E	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. Important note: during each washing step, gently shake the plate for 5 seconds and remove excess solution by tapping the inverted plate on an absorbent paper towel. <u>Automatic washer:</u> in case you use an automatic washer, it is advised to do 6 washing steps.			
Substrate Solution	100 µl	100 µl	100 µl
Incubate at room temperature (22 °C – 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.			

8. QUALITY CONTROL

Each laboratory should assay controls at normal, high and low levels range of Urinary Cortisol for monitoring assay performance. These controls should be treated as unknowns and values determined in every test procedure performed. Quality control charts should be maintained to follow the performance of the supplied reagents. Pertinent statistical methods should be employed to ascertain trends. The individual laboratory should set acceptable assay performance limits. Other parameters that should be monitored include the 80, 50 and 20% intercepts of the standard curve for run-to-run reproducibility. In addition, maximum absorbance should be consistent with past experience. Significant deviation from established performance can indicate unnoticed change in experimental conditions or degradation of kit reagents. Fresh reagents should be used to determine the reason for the variations.

9. RESULTS

9.1 Mean Absorbance

Calculate the mean of the absorbance (Em) for each point of the standard curve and of each sample.

9.2 Standard Curve

Plot the values of absorbance (Em) of the standards (A – E) against concentration. Draw the best-fit curve through the plotted points (e.g.: Four Parameter Logistic).

9.3 Calculation of Results

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

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

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

10. REFERENCE VALUES

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

Normal range urine (24 h)
1.5 µg/24h – 63 µg/24h

11. PERFORMANCE AND CHARACTERISTICS

11.1 Analytical Sensitivity

Analytical Sensitivity was investigated through the LOB (blank limit) the LOD (detection limit), the LOQ (quantification limit) and the analytical sensitivity (A.S.).

The following table shows the criteria of the study and the results obtained.

	Criteria	Results (ng/ml)
LOB	60 replicates of Standard A, used as "Blank" have been investigated in 5 different sessions over 3 days	0.28
LOD	6 urine samples with low cortisol concentration have been investigate over 10 assays in duplicate, performed in 5 days.	0.47
LOQ	6 urine samples with low cortisol concentration have been investigate over 10 assays in duplicate, performed in 5 days	0.56
A.S.	20 replicates of Standard A and replicates Standard B have been assayed. A.S has been calculated by linear regression.	0.22

11.2 Precision and reproducibility (complex precision)

Precision and reproducibility have been assessed through 6 different urine samples with different concentration of Cortisol.

The table below shows the Within Run and Total CV%.

Sample	n	Mean (ng/ml)	Within Run CV%	Total CV%
PS 2	20	112.141	6.6%	12%
PS 4	20	64.563	8.1%	12%
CT High	20	50.577	7.3%	11%
PS 5	20	25.878	7.6%	10%
PS 6	20	9.269	7.6%	11%
CT Low	20	3.438	7.0%	9%

11.3 Analytical specificity

Interference for Albumin, Acetylsalicylic Acid, Ibuprofen and Ascorbic Acid were studied by adding the interfering substance to the urine sample with a low and high Cortisol concentration, and by comparing its concentration to the unspiked sample.

The interference has been evaluated as "significant" if it causes a concentration bias > 10% between spiked and unspiked sample.

The following table shows the results obtained:

Substance	Concentration	Interference
Albumin	5 mg/dl	No
Acetylsalicylic acid	3.62 mmol/l	No
Ibuprofen	2.42 mmol/l	No
Ascorbic Acid	5 mg/l	No

Conclusion: no interference has been found for Albumin, Acetylsalicylic Acid, Ibuprofen and Ascorbic Acid.

11.4 Correlation

137 urine samples were tested with the Cortisol Urine ELISA kit and with a LC-MS method (reference)

The linear regression curve is:

$$y = 1,008x - 0.5019$$

$$r^2 = 0.83$$

12. WASTE MANAGEMENT

Reagents must be disposed off in accordance with local regulations.

13. BIBLIOGRAPHY

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

14. TROUBLESHOOTING

ERRORS / POSSIBLE CAUSES / SUGGESTIONS

No colorimetric reaction

- no conjugate pipetted
- 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 CV%

- reagents and/or strips not pre-warmed to room temperature prior to use
- plate washer is not washing correctly (suggestion: clean washer head)

too high between-run CV%

- incubation conditions not constant (time, temperature)
- controls and samples not dispensed at the same time (with the same intervals) (check pipetting order)
- person-related variation

Symbols:

	Storage temperature		Manufacturer		Contains sufficient for <n> tests
	Use-by date		Batch code		For in-vitro diagnostic use only!
	Consult instructions for use		Content		CE marking of conformity
	Caution		Catalogue number		Distributor
	Date of manufacture				

1. VERWENDUNGSZWECK

Kompetitives immunoenzymatisches kolorimetrisches Verfahren zur quantitativen Bestimmung der Konzentration von freiem Cortisol in Urin.

Das Cortisol Urine ELISA Kit ist nur für den Laborgebrauch bestimmt.

1.2 Klinische Bedeutung

Cortisol ist ein Steroidhormon, das von der Nebennierenrinde als Reaktion auf ein Hormon namens ACTH (das von der Hypophyse produziert wird) freigesetzt wird und an der Reaktion auf Stress beteiligt ist; es erhöht den Blutdruck und den Blutzuckerspiegel, kann bei Frauen Unfruchtbarkeit verursachen und unterdrückt das Immunsystem.

Cortisol wirkt über spezifische intrazelluläre Rezeptoren und hat Auswirkungen auf zahlreiche physiologische Systeme, darunter die Immunfunktion, die Regulierung des Glukosegehalts, den Gefäßtonus, die Substratnutzung und den Knochenstoffwechsel. Cortisol wird hauptsächlich in ungebundener (freier) Form mit dem Urin ausgeschieden.

Im Plasma wird Cortisol mit hoher Affinität an Corticosteroid-bindendes Globulin (CBG, Transcortin) und an Albumin gebunden. Nur das freie Cortisol ist für die meisten Rezeptoren verfügbar.

Diese normalen körpereigenen Funktionen sind die Grundlage für die physiologischen Folgen von chronischem Stress – eine verlängerte Cortisolsekretion führt zu Muskelschwund, Hyperglykämie und unterdrückt Immun- und Entzündungsreaktionen. Die gleichen Folgen ergeben sich bei langfristiger Einnahme von Glukokortikoid-Medikamenten.

Der Anteil des freien Cortisols stellt das metabolisch aktive Cortisol dar. Unter normalen Bedingungen wird weniger als 1% davon mit dem Urin ausgeschieden. Unter pathologischen Bedingungen (Cushing-Syndrom) sind die Werte des freien Cortisols im Urin erhöht, da das CBG das plasmatische Cortisol nicht im Übermaß bindet und es mit dem Urin ausgeschieden wird.

Während einer Schwangerschaft oder einer Östro-Gestagen-Behandlung kommt es zu einem Anstieg des plasmatischen Cortisols durch eine vermehrte Produktion des Transportproteins, aber die Werte des freien Cortisols im Urin sind normal, was auf eine korrekte Funktion der Nebennieren hinweist.

Dieser Test ist sehr nützlich, um die tatsächliche Nebennierenfunktion abzuschätzen, da der freie und damit stoffwechselaktive Anteil gemessen wird. Außerdem ist die Messung des freien Cortisols im Urin der bessere Parameter für die Diagnose des Cushing-Syndroms.

2. PRINZIP

Das Cortisol (Antigen) in der Probe konkurriert mit dem antigenen Cortisol, das mit Meerrettichperoxidase (HRP) konjugiert ist, um die Bindung an die begrenzte Anzahl von Antikörpern gegen Cortisol, die auf der Mikroplatte (Festphase) aufgebracht sind.

Nach der Inkubation wird die Trennung von gebundenem und freiem Cortisol durch einfaches Waschen der festen Phase vorgenommen.

Anschließend reagiert das Enzym HRP in der gebundenen Fraktion mit dem Substrat (H_2O_2) und dem TMB-Substrat und entwickelt eine blaue Farbe, die bei Zugabe der Stopplösung (H_2SO_4) in Gelb übergeht.

Die Farbintensität ist umgekehrt proportional zur Cortisolkonzentration in der Probe.

Die Cortisolkonzentration in der Probe wird anhand einer Standardkurve berechnet.

3. REAGENZIEN, MATERIALIEN UND GERÄTE

3.1 Im Kit enthaltene Reagenzien und Materialien

Standards und Kontrollen

Katalognr.	Komponente	Standard	Konzentration ng/ml	Volumen / Fläschchen
MS E-5101	STANDARD A	Standard A	0	4 ml
MS E-5102	STANDARD B	Standard B	1	1 ml
MS E-5103	STANDARD C	Standard C	5	1 ml
MS E-5104	STANDARD D	Standard D	30	1 ml
MS E-5105	STANDARD E	Standard E	200	1 ml
MS E-5151	CONTROL 1	Kontrolle 1 *	Kontrollwerte und -bereiche entnehmen Sie bitte dem Fläschchenetikett oder dem QC-Datenblatt.	1 ml
MS E-5152	CONTROL 2	Kontrolle 2 *		1 ml

* Kontrolle: gebrauchsfertig

MS E-5140 **CONJUGATE** **Conjugate** (Konjugat)
Inhalt: Cortisol konjugiert mit Meerrettichperoxidase (HRP)
Volumen: 1 x 33 ml

MS E-5131 **96** **Microtiterwells** (Mikrotiterplatte)
Inhalt: 1 brechbare Mikrotiterplatte; Anti-Cortisol-Antikörper, adsorbiert auf der Mikroplatte.

MS E-0030 **WASH-CONC 10x** **Wash Solution 10x** (Waschlösung)
Inhalt: Phosphatpuffer 0,2 M, Proclin < 0,0015%.
Volumen: 1 x 50 ml

MS E-0055 **SUBSTRATE** **Substrate Solution** (Substratlösung)
Inhalt: H₂O₂-TMB, 0,26 g/l (vermeiden Sie jeglichen Hautkontakt).
Volumen: 1 x 15 ml

MS E-0080 **STOP-SOLN** **Stop Solution** (Stopplösung)
Inhalt: Schwefelsäure, 0,15 mol/l (vermeiden Sie jeglichen Hautkontakt).
Volumen: 1 x 15 ml

Mögliche
Gefahren:



H290 Kann gegenüber Metallen korrosiv sein.
H314 Verursacht schwere Verätzungen der Haut und schwere Augenschäden.

3.2 Nicht im Kit enthaltene erforderliche Reagenzien

Destilliertes Wasser

3.3 Hilfsmittel und Messgeräte

Automatischer Dispenser

Mikrotiterplatten-Lesegerät (450 nm, 620 – 630 nm)

Hinweis

Alle Kit-Reagenzien zwischen 2 °C und 8 °C im Dunkeln lagern.

Den Beutel mit der beschichteten Mikrotiterplatte erst öffnen, wenn er Raumtemperatur angenommen hat und sofort nach Gebrauch wieder verschließen.

Nach dem Öffnen ist die Mikrotiterplatte bis zum Verfalldatum des Kits haltbar.

4. WARNUNGEN

- Dieses Testkit ist nur für In-vitro-Diagnostik zur Anwendung durch Fachpersonal bestimmt. Nicht zur inneren oder äußeren Anwendung bei Mensch oder Tier geeignet.
- Beim Arbeiten mit den enthaltenen Reagenzien geeignete persönliche Schutzausrüstung verwenden.
- Beim Arbeiten mit Blutprodukten die GLP-("Good laboratory practice") Richtlinien befolgen.
- Das für die Herstellung des Kits verwendete Material tierischen Ursprungs wurde von Tieren gewonnen, die als gesund zertifiziert wurden und das Rinderprotein stammt aus Ländern, die nicht von BSE betroffen waren; diese Materialien sollten jedoch als potenziell infektiös behandelt werden.
- Manche Reagenzien enthalten kleine Mengen an Proclin 300 als Konservierungsmittel. Kontakt mit der Haut oder Schleimhaut vermeiden.
- Das TMB-Substrat enthält eine reizende Substanz, die beim Einatmen, Verschlucken oder der Aufnahme über die Haut gesundheitsschädlich sein kann. Um eine Schädigung zu verhindern, Einatmen, Verschlucken oder Kontakt mit der Haut oder den Augen vermeiden.
- Die Stopplösung besteht aus verdünnter Schwefelsäure. Schwefelsäure ist giftig und ätzend und kann bei Einnahme toxisch sein. Um Verätzungen zu verhindern, Kontakt mit der Haut oder den Augen vermeiden.
- Reagenz TMB/H₂O₂ keinem direkten Sonnenlicht, Metallen oder Oxidationsmitteln aussetzen. Die Lösung nicht einfrieren.
- Diese Methode ermöglicht die Bestimmung von Cortisol im Bereich von 0,47 ng/ml bis 200 ng/ml.
- Die klinische Aussagekraft der Cortisol-Bestimmung kann entkräftet werden, wenn der Patient mit Kortikosteroiden oder natürlichen oder synthetischen Steroiden behandelt wurde.

5. VORSICHTSMASSNAHMEN

- Die Reihenfolge der Pipettierschritte muss genau wie in dieser Anleitung angegeben eingehalten werden. Die hier dargestellten Daten zur Performance wurden unter Verwendung der in dieser Gebrauchsanweisung genannten spezifischen Reagenzien ermittelt.
- Alle Reagenzien im Originalbehälter kühl bei 2 °C – 8 °C lagern. Ausnahmen werden deutlich gekennzeichnet. Bei sachgemäßer Lagerung und Verwendung sind die Reagenzien bis zum Verfalldatum haltbar.
- Vor der Verwendung müssen alle Testkit-Komponenten und Proben Raumtemperatur (22 °C – 28 °C) annehmen und gut gemischt werden.
- Die Testkit-Komponenten zwischen unterschiedlichen Chargen nicht austauschen. Das auf dem Karton und den Fläschchen aufgedruckte Verfalldatum muss eingehalten werden. Die Testkit-Komponenten nach Ablauf ihres Verfalldatums nicht mehr verwenden.
- Wenn Sie automatische Geräte verwenden, unterliegt es Ihrer Verantwortung zu überprüfen, ob die Tests mit dem Kit ordnungsgemäß durchgeführt wurden.
- Eine unvollständige oder ungenaue Flüssigkeitsentnahme aus den Wells kann die Testgenauigkeit beeinflussen und/oder den Hintergrund erhöhen.
Bei Verwendung von automatischen Systemen wird empfohlen, die Anzahl der Waschschriffe zu erhöhen.
- Die Reaktionszeit muss für alle Wells konstant gehalten werden, damit die Ergebnisse reproduzierbar sind. Das Pipettieren der Proben sollte nicht länger als 10 Minuten dauern, um Testabweichungen zu vermeiden. Falls mehr als 10 Minuten benötigt werden, muss die Reihenfolge des Pipettierens eingehalten werden. Bei Verwendung von mehreren Platten wird empfohlen, die Dosis-Wirkungs-Kurve für jede Platte zu wiederholen.
- Durch die Zugabe der TMB-Substratlösung wird eine kinetische Reaktion gestartet, die durch die Zugabe der Stopplösung beendet wird. Deshalb müssen die TMB-Substrat- und die Stopplösung jeweils in derselben Reihenfolge pipettiert werden, um Zeitabweichungen während der Reaktion zu vermeiden.
- Die Richtlinien zur Qualitätskontrolle im medizinischen Labor müssen befolgt werden, indem Kontrollproben mit untersucht werden.
- Beim Lösen und Pipettieren der Reagenzien ist größte Genauigkeit erforderlich.
- Mikrotiterplatten-Lesegeräte lesen vertikal ab. Nicht die Unterseite der Wells berühren.

6. LAGERUNG UND STABILITÄT

Bei 2 – 8 °C aufbewahren; das Kit ist bis zu dem auf dem Kit-Etikett und dem QC-Report angegebenen Verfalldatum haltbar.

Verwenden Sie das Kit oder seine Komponenten nicht mehr nach dem Verfalldatum.

7. VERFAHREN

7.1 Vorbereitung der Standards und Kontrollen

Vor der Verwendung für 5 Minuten auf einem Rotationsmischer legen.

Die Standards sind gebrauchsfertig und haben die folgende Cortisolkonzentration:

	Standard A	Standard B	Standard C	Standard D	Standard E
ng/ml	0	1	5	30	200

Die Kontrollen sind gebrauchsfertig.

Nach dem Öffnen sind die Standards und Kontrollen 6 Monate bei 2 °C – 8 °C haltbar.

7.2 Vorbereitung des Konjugats

Das Konjugat ist gebrauchsfertig.

Nach dem Öffnen ist es bei 2 °C – 8 °C 6 Monate haltbar.

7.3 Vorbereitung der Probe

Die Bestimmung von Cortisol mit diesem Kit sollte in Urinproben durchgeführt werden.

Wichtiger Hinweis: Das Kit wurde für die Verwendung mit unbehandelten Urinproben entwickelt; eine Ansäuerung des Urins, die zu einem pH-Wert unter 5,0 führt, könnte den Test beeinträchtigen und zu abweichenden Ergebnissen führen.

Es ist nicht notwendig, die Probe zu verdünnen.

Das Gesamtvolumen des innerhalb von 24 Stunden ausgeschiedenen Urins sollte in einem einzigen Behälter gesammelt und gemischt werden.

Urinproben, die nicht sofort untersucht werden sollen, sollten bei 2 °C – 8 °C oder bei -20 °C für längere Zeit (maximal 6 Monate) gelagert werden.

Proben mit einer Konzentration von mehr als 200 ng/ml müssen nicht verdünnt werden; solche Proben müssen als "> 200 ng/ml" angegeben werden.

7.4 Vorbereitung der Waschlösung

Verdünnen Sie den Inhalt des Fläschchens des 10fachen Konzentrats der "Waschlösung" vor der Verwendung mit destilliertem Wasser auf ein Endvolumen von 500 ml.

Bei kleineren Volumina ist das Verdünnungsverhältnis 1:10 einzuhalten.

Die verdünnte Waschlösung ist bei 2 °C – 8 °C 30 Tage lang haltbar.

In konzentrierter Waschlösung kann das Vorhandensein von Kristallen beobachtet werden; in diesem Fall bei Raumtemperatur mischen, bis sich die Kristalle vollständig aufgelöst haben; für größere Genauigkeit die gesamte Flasche mit konzentrierter Waschlösung auf 500 ml verdünnen, wobei darauf zu achten ist, dass die Kristalle vollständig überführt werden, und dann mischen, bis sich die Kristalle vollständig aufgelöst haben.

7.5 Verfahren

Alle Reagenzien mindestens 30 Minuten lang Raumtemperatur (22 °C – 28 °C) annehmen lassen.

Unbenutzte beschichtete Mikrotiterstreifen sollten sicher in dem Folienbeutel mit Trockenmittel aufbewahrt und bei 2 °C – 8 °C gelagert werden.

Um eine mögliche mikrobielle und/oder chemische Kontamination zu vermeiden, sollten unbenutzte Reagenzien niemals in die Originalfläschchen umgefüllt werden.

Da es zur Verbesserung der Genauigkeit der Testergebnisse erforderlich ist, die Bestimmung in Doppelbestimmung durchzuführen, sind für jeden Punkt der Standardkurve (A – E) zwei Wells vorzubereiten, zwei für jede Kontrolle, zwei für jede Probe und eine für Blank.

Reagenz	Standards	Proben/Kontrollen	Blank
Standard A – E	10 µl		
Proben/Kontrollen		10 µl	
Konjugat	300 µl	300 µl	
1 Stunde lang bei 37 °C inkubieren. Den Inhalt aus jedem Well entfernen; die Wells dreimal mit 350 µl verdünnter Waschlösung waschen. Wichtiger Hinweis: Bei jedem Waschschriff die Platte 5 Sekunden lang vorsichtig schütteln und überschüssige Flüssigkeit durch Klopfen der umgedrehten Platte auf ein saugfähiges Papiertuch entfernen. <u>Automatisches Waschgerät:</u> Bei Verwendung eines Waschautomaten wird empfohlen, 6 Waschschriffe durchzuführen.			
Substratlösung	100 µl	100 µl	100 µl
15 Minuten lang bei Raumtemperatur (22 °C – 28 °C) im Dunkeln inkubieren			
Stopplösung	100 µl	100 µl	100 µl
Mikrotiterplatte vorsichtig schütteln. Messen Sie die Absorption (E) bei 450 nm gegen eine Referenzwellenlänge von 620 – 630 nm oder gegen den Blank innerhalb von 5 Minuten.			

8. QUALITÄTSKONTROLLE

Jedes Labor sollte zur Überwachung der Testdurchführung Kontrollen im Bereich normaler, hoher und niedriger Cortisolwerte im Urin durchführen. Diese Kontrollen sollten als Unbekannte behandelt und die Werte bei jedem durchgeführten Testverfahren bestimmt werden. Es sollten Qualitätskontrollkarten geführt werden, um die Leistung der gelieferten Reagenzien zu verfolgen. Zur Ermittlung von Trends sollten einschlägige statistische Methoden angewandt werden. Das einzelne Labor sollte akzeptable Grenzen für die Testleistung festlegen. Zu den weiteren Parametern, die überwacht werden sollten, gehören die 80-, 50- und 20%-Abschnitte der Standardkurve für die Reproduzierbarkeit von Lauf zu Lauf. Darüber hinaus sollte die maximale Absorption mit den bisherigen Erfahrungen übereinstimmen. Eine signifikante Abweichung von der etablierten Leistung kann auf eine unbemerkte Änderung der Versuchsbedingungen oder auf einen Abbau der Kit-Reagenzien hinweisen. Um den Grund für die Abweichungen zu ermitteln, sollten frische Reagenzien verwendet werden.

9. ERGEBNISSE

9.1 Mittlere Extinktion

Berechnen Sie den Mittelwert der Extinktion (E_m) für jeden Punkt der Standardkurve und für jede Probe.

9.2 Standardkurve

Tragen Sie die Werte der Absorption (E_m) der Standards (A – E) gegen die Konzentration auf. Zeichnen Sie die Kurve, die am besten passt, durch die aufgezeichneten Punkte (z.B.: Vier-Parameter-Logistik).

9.3 Berechnung der Ergebnisse

Interpolieren Sie die Werte der Proben auf der Standardkurve, um die entsprechenden Werte der Konzentrationen in ng/ml zu erhalten.

Um die Cortisolkonzentration im Urin zu berechnen, rechnen Sie wie oben beschrieben und korrigieren Sie das Gesamtvolumen des in 24 Stunden gesammelten Urins:

$$\text{ng/ml} \times \text{Volumen (ml) Urin 24 h} / 1000 = \mu\text{g Cortisol/24 h}$$

10. REFERENZWERTE

Um den Normalbereich für Urinproben zu bestimmen, wurden 128 scheinbar gesunde männliche und weibliche Erwachsene untersucht.

Ergebnis:

Normalbereich Urin (24 h)
1,5 $\mu\text{g}/24\text{h}$ – 63 $\mu\text{g}/24\text{h}$

11. LEISTUNG UND EIGENSCHAFTEN

11.1 Analytische Sensitivität

Die analytische Sensitivität wurde anhand der LOB (Blankgrenze), der LOD (Nachweisgrenze), der LOQ (Quantifizierungsgrenze) und der analytischen Sensitivität (A.S.) untersucht.

Die folgende Tabelle zeigt die Kriterien der Studie und die erzielten Ergebnisse.

	Kriterium	Ergebnisse (ng/ml)
LOB	60 Wiederholungen von Standard A, der als "Blank" verwendet wurde, wurden in 5 verschiedenen Ansätzen über 3 Tage untersucht.	0,28
LOD	6 Urinproben mit niedriger Cortisolkonzentration wurden in 10 Ansätzen in Doppelbestimmung untersucht, die innerhalb von 5 Tagen durchgeführt wurden.	0,47
LOQ	6 Urinproben mit niedriger Cortisolkonzentration wurden in 10 Ansätzen in Doppelbestimmung untersucht, die innerhalb von 5 Tagen durchgeführt wurden.	0,56
A.S.	Es wurden 20 Wiederholungen von Standard A und Wiederholungen von Standard B untersucht. Die A.S. wurde durch lineare Regression berechnet.	0,22

11.2 Präzision und Reproduzierbarkeit (komplexe Präzision)

Präzision und Reproduzierbarkeit wurden anhand von 6 verschiedenen Urinproben mit unterschiedlichen Cortisolkonzentrationen bewertet.

Die nachstehende Tabelle zeigt den Intra-CV% und den Gesamt-CV%.

Probe	n	Mittelwert (ng/ml)	Intra-CV%	Gesamt-CV%
PS 2	20	112,141	6,6%	12%
PS 4	20	64,563	8,1%	12%
CT High	20	50,577	7,3%	11%
PS 5	20	25,878	7,6%	10%
PS 6	20	9,269	7,6%	11%
CT Low	20	3,438	7,0%	9%

11.3 Analytische Spezifität

Die Interferenz für Albumin, Acetylsalicylsäure, Ibuprofen und Ascorbinsäure wurde untersucht, indem die Störsubstanz der Urinprobe mit einer niedrigen und einer hohen Cortisolkonzentration zugesetzt und ihre Konzentration mit der nicht aufgestockten Probe verglichen wurde.

Die Störung wurde als "signifikant" eingestuft, wenn sie eine Konzentrationsabweichung von mehr als 10% zwischen der aufgestockten und der nicht aufgestockten Probe aufweist.

Die folgende Tabelle zeigt die erzielten Ergebnisse:

Substanz	Konzentration	Interferenz
Albumin	5 mg/dl	Nein
Acetylsalicylsäure	3,62 mmol/l	Nein
Ibuprofen	2,42 mmol/l	Nein
Ascorbinsäure	5 mg/l	Nein

Schlussfolgerung: Für Albumin, Acetylsalicylsäure, Ibuprofen und Ascorbinsäure wurden keine Interferenzen festgestellt.

11.4 Korrelation

137 Urinproben wurden mit dem Cortisol Urine ELISA Kit und mit einer LC-MS-Methode (Referenz) untersucht. Die lineare Regressionskurve lautet:

$$y = 1,008x - 0,5019$$

$$r^2 = 0,83$$

12. ABFALLENTSORGUNG

Die Reagenzien müssen in Übereinstimmung mit den örtlichen Vorschriften entsorgt werden.

13. BIBLIOGRAPHIE

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

14. FEHLERBEHEBUNG

FEHLER / MÖGLICHE URSACHEN / VORSCHLÄGE

Keine kolorimetrische Reaktion

- Kein Konjugat pipettiert
- Kontamination des Konjugats und/oder Substrats
- Fehler bei der Durchführung des Testverfahrens (z.B. versehentliches Pipettieren der Reagenzien in der falschen Reihenfolge oder aus einem falschen Fläschchen, usw.)

Zu geringe Reaktion (OD-Werte zu niedrig)

- Falsches Konjugat (z.B. nicht aus dem Original-Testkit stammend)
- Inkubationszeit zu kurz, Inkubationstemperatur zu niedrig

Zu starke Reaktion (OD-Werte zu hoch)

- Falsches Konjugat (z.B. nicht aus dem Original-Testkit stammend)
- Inkubationszeit zu lang, Inkubationstemperatur zu hoch
- Wasserqualität für den Waschpuffer nicht ausreichend (entionisiertes Wasser)
- Unzureichendes Waschen (Konjugat nicht ordnungsgemäß entfernt)

Unerklärliche Ausreißer

- Kontamination der Pipetten, Spitzen oder Behälter
- Unzureichendes Waschen (Konjugat nicht ordnungsgemäß entfernt)

Zu hoher Intra-CV%

- Reagenzien und/oder Streifen wurden vor Gebrauch nicht auf Raumtemperatur aufgewärmt
- Mikrotiterplatten-Waschgerät wäscht nicht ordnungsgemäß (Vorschlag: Waschkopf reinigen)

Zu hoher Inter-CV%

- Inkubationsbedingungen nicht konstant (Zeit, Temperatur)
- Kontrollen und Proben nicht zur selben Zeit pipettiert (mit denselben Intervallen) (Pipettierreihenfolge überprüfen)
- Personenabhängige Abweichungen

Symbole:

	Lagertemperatur		Hersteller		Enthält Testmaterial für <n> Teste
	Verwendbar bis		Chargennummer		In vitro Diagnostikum
	Gebrauchsanweisung beachten		Inhalt		CE-Kennzeichnung
	Achtung		Katalognummer		Vertriebspartner
	Herstellungsdatum				