

Product information

Information about other products is available at: www.demeditec.com



Cortisol ELISA



DEH3388



96



Demeditec Diagnostics GmbH
Lise-Meitner-Strasse 2
24145 Kiel – Germany
www.demeditec.com

CONTENTS / INHALTSVERZEICHNIS / CONTENIDO

1	INTRODUCTION	3
2	PRINCIPLE	3
3	WARNINGS AND PRECAUTIONS	3
4	REAGENTS	4
5	SPECIMEN COLLECTION AND STORAGE	5
6	ASSAY PROCEDURE	5
7	EXPECTED VALUES.....	6
8	QUALITY CONTROL	7
9	PERFORMANCE CHARACTERISTICS	7
10	LIMITATIONS OF PROCEDURE.....	9
11	LEGAL ASPECTS.....	10
12	REFERENCES	10
1	EINLEITUNG	11
2	TESTPRINZIP.....	11
3	WARNUNGEN & VORSICHTSHINWEISE	11
4	BESTANDTEILE DES KITS	12
5	PROBENENTNAHME UND VORBEREITUNG	13
6	TESTDURCHFÜHRUNG	14
7	ERWARTETE WERTE.....	15
8	QUALITÄTSKONTROLLE	15
9	ASSAY CHARACTERISTIKA	16
10	GRENZEN DES TESTS.....	18
11	RECHTLICHE GRUNDLAGEN.....	18
12	REFERENZEN.....	19
1	INTRODUCCIÓN	20
2	PRINCIPIO.....	20
3	ADVERTENCIAS Y PRECAUCIONES	20
4	REACTIVOS	21
6	PROCEDIMIENTO DE ENSAYO.....	23
7	VALORES ESPERADOS.....	24
8	CONTROL DE CALIDAD	24
9	CARACTERISTICAS DE RENDIMIENTO	25
10	LIMITACIONES DEL PROCEDIMIENTO.....	27
11	ASPECTOS LEGALES	27
12	REFERENCIAS	28

1 INTRODUCTION

1.1 Intended Use

The **DEMEDITEC Cortisol ELISA** is a competitive immunoassay for the quantitative measurement of cortisol in serum and plasma (EDTA, Li-Heparin).

The assay is intended for in vitro diagnostic use by professional users only. Manual processing is validated. The usage of laboratory automats is the user's sole responsibility. The kit is intended for single use only.

1.2 Description of the analyte

Cortisol is a corticosteroid hormone or glucocorticoid produced by the adrenal cortex that is part of the adrenal gland (in the Zona fasciculata and the Zona reticularis of the adrenal cortex). It is usually referred to as the "stress hormone" as it is involved in response to stress.

90% of the cortisol is bound to cortisol-binding globulins (CBG), around 7% to Albumin and the rest is free (1). Among the products of the human adrenal cortex, only cortisol is involved in the regulation of ACTH secretion. As the level of free (non-protein bound) cortisol in blood rises, the release of ACTH is inhibited by the negative feedback effect. Conversely, if cortisol levels are subnormal, the negative feedback decreases, ACTH levels rise, and the adrenal cortex secretes cortisol until normal blood levels are restored. The release of ACTH is under control of hypothalamic corticotropin-releasing hormone (CRH); the negative feedback system involving cortisol has been identified at both hypothalamic and pituitary levels.

Normally during the day there is a fluctuation of cortisol achieving the highest level in the morning and the lowest in the night. Useful information is given when cortisol measurement is done in samples withdrawn at a fixed hour (8.00 a.m.). The main biological effects of cortisol are: promotion of gluconeogenesis, deposition of liver glycogen, increase in blood glucose concentration when the carbohydrate utilization is reduced, effect on fat metabolism and anti-inflammatory action. Cortisol measurement is a powerful tool for the evaluation of suspected abnormalities in glucocorticoid production, for example Cushing's Syndrome (hypercortisolism), Addison's disease or secondary adrenal insufficiency (hypocortisolism). In many cases, it is necessary to perform dynamic tests (suppression or stimulation) in order to localize the defect at one of the three main levels (i.e. adrenal, pituitary, hypothalamus).

2 PRINCIPLE

The DEMEDITEC Cortisol ELISA Kit is a solid phase enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA), based on the principle of competitive binding.

The microtiter wells are coated with an anti-cortisol antibody. An unknown amount of cortisol present in the sample competes with a cortisol-horseradish peroxidase conjugate for binding to the coated antibody. After incubation the unbound conjugate is washed off. The amount of bound peroxidase conjugate is inversely proportional to the concentration of cortisol in the sample. After addition of the substrate solution, the intensity of color developed is inversely proportional to the concentration of cortisol in the sample.

3 WARNINGS AND PRECAUTIONS

1. This kit is for in vitro diagnostic use only. For professional use only.
2. Before starting the assay, read the instructions completely and carefully. Use the valid version of the package insert provided with the kit. Be sure that everything is understood.
3. All human source material used in the preparation of the reagents has been tested and found negative for antibody to HIV 1&2, HbsAg, and HCV. No test method however can offer complete assurance that HIV, HBV, HCV or other infectious agents are absent. Therefore, the reagents must be handled in the same manner as potentially infectious material.
4. The microplate contains break-apart strips. Unused wells must be stored at 2-8°C in the sealed foil pouch and used in the frame provided.
5. Pipetting of samples and reagents must be done as quickly as possible and in the same sequence for each step.
6. Use reservoirs only for single reagents. This especially applies to the substrate reservoirs. Using a reservoir for dispensing substrate solution that had previously been used for conjugate solution may turn solution colored. Do not pour reagents back into vials as reagent contamination may occur.
7. Mix the contents of the microplate wells thoroughly to ensure good test results. Do not reuse microwells.
8. Do not let wells dry during assay; add reagents immediately after completing the washing steps.
9. Allow the reagents to reach room temperature (18-25°C) before starting the test. Temperature will affect the absorbance readings of the assay.

10. Never pipet by mouth and avoid contact of reagents and specimens with skin and mucous membranes.
11. Do not smoke, eat, drink or apply cosmetics in areas where specimens or kit reagents are handled.
12. Wear disposable protective gloves when handling specimens and reagents. Microbial contamination of reagents or specimens may give false results.
13. Handling should be done in accordance with the procedures defined by an appropriate national biohazard safety guideline or regulation.
14. Do not use reagents beyond expiry date as shown on the kit labels.
15. All indicated volumes have to be performed according to the protocol. Optimal test results are only obtained when using calibrated pipettes and microtiterplate readers.
16. Do not mix or use components from kits with different lot numbers. It is advised not to exchange wells of different plates even of the same lot. The kits may have been shipped or stored under different conditions and the binding characteristics of the plates may be slightly different.
17. Avoid contact with Stop Solution. It may cause skin irritation and burns.
18. Some reagents contain Proclin 300, CMIT and/or MIT as preservatives. In case of contact with eyes or skin, flush immediately with water.
19. Chemicals and prepared or used reagents have to be treated as hazardous waste according to the national biohazard safety guideline or regulation.
20. For information on hazardous substances included in the kit please refer to Safety Data Sheets. Safety Data Sheets for this product are available upon request directly from Demeditec Diagnostics GmbH or on Demeditec homepage (www.demeditec.com).
21. All serious incidents occurring in relation to products made available on the EU market in accordance with Article 2(61) of Regulation (EU) 2017/746 shall be notified to the manufacturer and to the competent authority of the Member State where the user or patient is established in accordance with Article 82 of Regulation (EU) 2017/746.
22. If product information, including labeling, is incorrect or inaccurate, please contact the kit manufacturer or supplier.

4 REAGENTS

4.1 Reagents provided

1. **SORB MT** Microtiter Plate, 12 x 8 (break-apart) strips with 96 wells; wells coated with anti-cortisol antibody.
2. **CAL 0 – 5** Calibrators (Calibrator 0-5), 6 vials, 0.3 ml each, ready to use; contain cortisol in human serum. Concentrations: 0 - 10 - 30 - 90 - 270 - 800 ng/ml.
3. **CONTROL 1 & 2** Control 1 (low) / Control 2 (high), 2 vials, 0.3 ml each, ready to use; contain cortisol in human serum. For control values and ranges please refer to QC-Datasheet.
4. **ENZ CONJ** Enzyme Conjugate, 1 vial, 22 ml, color: red, ready to use; horseradish peroxidase-labeled cortisol in buffered matrix.
5. **SUB TMB** Substrate Solution, 1 vial, 22 ml, ready to use; contains Tetramethylbenzidine (TMB).
6. **STOP SOLN** Stop Solution, 1 vial, 7 ml, ready to use; contains 2 N hydrochloric acid solution. Avoid contact with the Stop Solution. It may cause skin irritations and burns.
7. **WASH SOLN 10x** Wash Solution, 1 vial, 50 ml (10x concentrated); see “Reagent Preparation” (4.4).

4.2 Materials required but not provided

- A microtiter plate reader capable for endpoint measurement at 450 nm
- Calibrated variable precision micropipettes and multichannel pipettes with disposable pipette tips
- Microplate mixer operating at 900 rpm
- Manual or automatic equipment for microtiter plate washing
- Absorbent paper
- Distilled or deionized water
- Timer
- Semilogarithmic graph paper or software for data reduction

4.3 Storage conditions

When stored at 2-8°C unopened reagents will be stable until expiration date. Do not use reagents beyond this date. Opened reagents must be stored at 2-8°C. After first opening the reagents are stable for 30 days if used and stored properly. Keep away from heat and direct sunlight.

Microtiter wells must be stored at 2-8°C. Take care that the foil bag is sealed tightly.

4.4 Reagent preparation

Allow the reagents and the required number of wells to reach room temperature (18-25°C) before starting the test.

Wash Solution:

Dilute 50 ml of 10x concentrated Wash Solution with 450 ml deionized water to a final volume of 500 ml. The diluted Wash Solution is stable for at least 12 weeks at room temperature (18-25°C). Precipitates may form when stored at 2-8°C, which should dissolve again by swirling at room temperature (18-25°C). The Wash Solution should only be used when the precipitates have completely dissolved.

4.5 Disposal of the kits

The disposal of the kit must be made according to the national regulations. Special information for this product is given in the Safety Data Sheet.

4.6 Damaged test kits

In case of any severe damage of the test kit or components, Demeditec Diagnostics GmbH has to be informed in writing within one week after receiving the kit. Severely damaged single components should not be used for a test run. They have to be stored until a final solution has been found. After this, they should be disposed according to the official regulations.

5 SPECIMEN COLLECTION AND STORAGE

For determination of cortisol **serum and plasma (EDTA, Li-Heparin)** can be used.

The usual precautions for venipuncture should be observed (1). It is important to preserve the chemical integrity of a blood specimen from the moment it is collected until it is assayed. Do not use hemolytic, icteric or lipemic specimens. Furthermore, we recommend special caution when using gel collection systems, as an influence on the measurement results cannot be excluded in case of improper handling. Samples containing sodium azide should not be used in the assay.

The procedure calls for 10 µl sample per well. The samples should be assayed immediately or aliquoted and stored at ≤ -20°C. Avoid repeated freeze-thaw cycles. Samples expected to contain cortisol concentrations higher than the highest calibrator (800 ng/ml) must be diluted with the zero calibrator before assay. The additional dilution step has to be taken into account for the calculation of the results.

6 ASSAY PROCEDURE

6.1 General remarks

- All reagents and specimens must be allowed to come to room temperature before use. All reagents must be mixed without foaming.
- Once the test has been started, all steps should be completed without interruption.
- Use new disposal plastic pipette tips for each standard, control or sample in order to avoid cross-contamination.
- Optical density is a function of the incubation time and temperature. Before starting the assay, it is recommended that all reagents are ready, caps removed, all needed wells secured in holder, etc. This will ensure equal elapsed time for each pipetting step without interruption.
- As a general rule the enzymatic reaction is linearly proportional to time and temperature.
- Respect the incubation times as stated in this instructions for use.
- Calibrators, controls, and samples should at least be assayed in double determinations.
- Microtiter plate washing is important. Improperly washed wells will give erroneous results. It is recommended to use a multichannel pipette or a multistepper, respectively, or an automatic microtiter plate washing system. Do not allow the wells to dry between incubations. Do not scratch coated wells during rinsing and aspiration. Rinse and fill all reagents with care. While rinsing, check that all wells are filled precisely with wash solution, and that there are no residues in the wells.
- A calibrator curve must be established for every run.

6.2 Assay procedure

1. Prepare a sufficient number of microplate wells to accommodate Calibrators, Controls and Samples in duplicates.
2. Dispense **10 µl** of each **Calibrator, Sample and Control** with new disposable tips into appropriate wells.
3. Dispense **200 µl** of **Enzyme Conjugate** into each well.
4. Incubate for **60 minutes** at room temperature (18-25°C) on a plate shaker (900 rpm).
5. Discard the content of the wells and rinse the wells **4 times** with diluted **Wash Solution** (300 µl per well). Remove as much Wash Solution as possible by beating the microplate on absorbent paper.

Important note:

The sensitivity and precision of the assay is markedly influenced by the correct performance of the washing procedure!

6. Add **200 µl** of **Substrate Solution** to each well.
7. Incubate without shaking for **30 minutes** at room temperature (18-25°C) in the dark.
8. Stop the reaction by adding **50 µl** of **Stop Solution** to each well.
9. Determine the optical density of each well at 450 nm and read the wells within 15 minutes.

6.3 Calculation of results

1. Calculate the average absorbance values for each set of calibrators, controls and samples.
2. The obtained optical density of the standards (y-axis, linear) are plotted against their corresponding concentrations (x-axis, logarithmic) either on semilogarithmic paper or using an automated method.
3. Using the mean optical density value for each sample, determine the corresponding concentration from the calibration curve.
4. Automated method: The results in the package insert have been calculated automatically using a 4 PL (4 Parameter Logistics) curve fit. 4 Parameter Logistics is the preferred calculation method. Other data reduction functions may give slightly different results.
5. The concentration of the samples can be determined directly from this calibrator curve. Samples with concentrations higher than that of the highest calibrator have to be further diluted. For the calculation of the concentrations, this dilution factor has to be taken into account.

Example of typical calibrator curve

Following data are intended for illustration only and must not be used to calculate results from another run.

Standard	Optical Density (450 nm)
Calibrator 0 (0 ng/ml)	3.068
Calibrator 1 (10 ng/ml)	2.380
Calibrator 2 (30 ng/ml)	1.742
Calibrator 3 (90 ng/ml)	1.112
Calibrator 4 (270 ng/ml)	0.608
Calibrator 5 (800 ng/ml)	0.289

7 EXPECTED VALUES

It is strongly recommended that each laboratory should determine its own normal and abnormal values. The following values are observed with serum samples collected in the morning of apparently healthy adults:

Population	n	ng/ml			
		Range	Median	2.5 percentile	97.5 percentile
Female <50 years	40	55 - 396	149	82	341
Female ≥50 years	20	60 - 312	171	81	295
Male <50 years	20	103 - 278	169	104	271
Male ≥50 years	19	50 - 234	153	65	226

On average EDTA plasma seem to be approx. 10% and Li-Heparin approx. 5% lower than serum values. The results alone should not be the only reason for any therapeutic consequences. They have to be correlated to other clinical observations and diagnostic tests.

8 QUALITY CONTROL

Good laboratory practice requires that controls are run with each calibration curve. A statistically significant number of controls should be assayed to establish mean values and acceptable ranges to assure proper performance.

It is recommended to use control samples according to state and federal regulations. The use of control samples is advised to assure the day-to-day validity of results. Use controls at both normal and pathological levels. The controls and the corresponding results of the QC laboratory are stated in the QC certificate included in the kit. The values and ranges stated on the QC certificate always refer to the current kit lot and should be used for direct comparison of the results.

It is also recommended to make use of national or international Quality Assessment programs in order to ensure the accuracy of the results. Employ appropriate statistical methods for analysing control values and trends. If the results of the assay do not fit to the established acceptable ranges of control materials patient results should be considered invalid. In this case, please check the following technical areas: Pipetting and timing devices, microtiter plate reader, expiration dates of reagents, storage and incubation conditions, aspiration and washing methods. After checking the above mentioned items without finding any error contact your distributor or Demeditec directly.

9 PERFORMANCE CHARACTERISTICS

9.1 Analytical Sensitivity

The lowest analytical detectable level of cortisol that can be distinguished from the Zero Calibrator is 0.38 ng/ml at the 2SD confidence limit.

9.2 Specificity (Cross Reactivity)

The following materials have been evaluated for cross reactivity. The percentage indicates cross reactivity at 50% displacement compared to cortisol.

Steroid	% Cross reaction
Pregnenolone	<0.3%
Estrone	<0.3%
Estradiol	<0.3%
DHEA	<0.3%
17-Hydroxyprogesterone	0.8%
Prednisolone	100%
Testosterone	<0.3%
Cortisone	76.9%
Corticosterone	0.4%
Danazole	<0.3%
Androstenedione	<0.3%
Prednisone	70%
11-Deoxycortisol	39.9%
Estriol	<0.3%
Dexamethasone	<0.3%
11-Deoxycorticosterone	<0.3%
Progesterone	<0.3%
DHEA-S	<0.3%

9.3 Assay dynamic range

The range of the assay is between 10 - 800 ng/ml.

9.4 Reproducibility**9.4.1 Intra-Assay**

The intra-assay variation was determined by 20 replicate measurements of three serum samples within one run. The within-assay variability is shown below:

	Serum 1	Serum 2	Serum 3
Mean (ng/ml)	60.9	102.1	264.1
SD	4.2	6.9	19.0
CV (%)	7.0	6.8	7.2
n =	20	20	20

9.4.2 Inter-Assay

The inter-assay (between-run) variation was determined by duplicate measurements of three serum samples in 10 different tests.

	Serum 1	Serum 2	Serum 3
Mean (ng/ml)	57.3	106.7	287.3
SD	3.0	8.3	26.3
CV (%)	5.2	7.8	9.2
n =	10	10	10

9.5 Recovery

Recovery was determined by adding increasing amounts of the analyte to three different samples containing different amounts of endogenous analyte. Each sample (non-spiked and spiked) was assayed and analyte concentrations of the samples were calculated from the standard curve. The percentage recoveries were determined by comparing expected and measured values of the samples.

Sample	Spiking (ng/ml)	Measured (ng/ml)	Expected (ng/ml)	Recovery (%)
1	native	204.3	-	-
	100	306.2	304.3	101%
	200	394.1	404.3	97%
	300	527.7	504.3	105%
2	native	76.4	-	-
	100	186.7	176.4	106%
	200	272.8	276.4	99%
	300	415.5	376.4	110%
3	native	110.3	-	-
	100	222.6	210.3	106%
	200	329.3	310.3	106%
	300	440.5	410.3	107%

9.6 Linearity

Four serum samples containing different amounts of analyte were serially diluted with Calibrator 0 and assayed. The percentage linearity was calculated by comparing the expected and measured values.

Serum	Dilution	Measured (ng/ml)	Expected (ng/ml)	Linearity (%)
1	native	465.8	-	-
	1 : 2	232.0	232.9	100%
	1 : 4	100.5	116.4	86%
	1 : 8	64.1	58.2	110%
2	-	224.4	-	-
	1 : 2	132.9	112.2	118%
	1 : 4	70.7	56.1	126%
	1 : 8	36.2	28.1	129%
3	native	226.3	-	-
	1 : 2	136.6	113.1	121%
	1 : 4	69.9	56.6	123%
	1 : 8	36.0	28.3	127%
4	native	321.7	-	-
	1 : 2	179.7	160.8	112%
	1 : 4	92.1	80.4	115%
	1 : 8	41.9	40.2	104%

10 LIMITATIONS OF PROCEDURE

Reliable and reproducible results will be obtained when the assay procedure is performed with complete understanding of the package insert instruction and adherence to good laboratory practice. Any improper handling of samples or modification of this test might influence the results.

10.1 Interfering Substances

- Hemoglobin (up to 1000 mg/dl), Bilirubin (up to 40 mg/dl), and Lipids (up to 30 mg/ml) show no significant influence on the assay results. However, we recommend not to use any hemolytic, icteric or lipemic specimens to avoid any interferences.
- Samples containing sodium azide should not be used in the assay.
- The result of any immunological test system may be affected by heterophilic antibodies, anti-species antibodies or rheumatoid factors present in human samples (2-4). For example, the presence of heterophilic antibodies in patients who are regularly exposed to animals or animal products may interfere with immunological tests. Therefore, interference with this in vitro immunoassay cannot be excluded. If unplausible results are suspected, they should be considered invalid and verified by further testing. For diagnostic purposes, results should always be considered only in conjunction with the patient's clinical picture and further diagnostic tests.

10.2 Drug Interferences

Any medication (cream, oil, pill, etc.) containing cortisol will significantly influence the measurement of this analyte. The same is true for any medication containing Prednisolone and Cortisone. Any medication should be taken into account when assessing the results.

10.3 High Dose Hook Effect

"High Dose Hook Effect" is not detected in the range between 0 – 10,000 ng/ml.

11 LEGAL ASPECTS

11.1 Reliability of Results

The test must be performed exactly as per the manufacturer's instructions for use. Moreover the user must strictly adhere to the rules of GLP (Good Laboratory Practice) or other applicable national standards and/or laws. This is especially relevant for the use of control reagents. It is important to always include a sufficient number of controls within the test procedure for validating the accuracy and precision of the test. The test results are valid only if all controls are within the specified ranges and if all other test parameters are also within the given assay specifications. In case of any doubt or concern please contact Demeditec.

11.2 Therapeutic Consequences

Therapeutic consequences should never be based on laboratory results alone even if all test results are in agreement with the items as stated under point 11.1. Any laboratory result is only a part of the total clinical picture of a patient. Only in cases where the laboratory results are in acceptable agreement with the overall clinical picture of the patient therapeutic consequences should be derived.

The test result itself should never be the sole determinant for deriving any therapeutic consequences.

11.3 Liability

Any modification of the test kit and/or exchange or mixture of any components of different lots from one test kit to another could negatively affect the intended results and validity of the overall test. Such modification and/or exchanges invalidate any claim for replacement.

Claims submitted due to customer misinterpretation of laboratory results subject to point 11.2 are also invalid. Regardless, in the event of any claim, the manufacturer's liability is not to exceed the value of the test kit. Any damage caused to the test kit during transportation is not subject to the liability of the manufacturer.

12 REFERENCES

1. Lothar Thomas: Labor und Diagnose 2020
2. Marks V.: False-Positive Immunoassay Results: A Multicenter Survey of Erroneous Immunoassay Results from Assays of 74 Analytes in 10 Donors from 66 Laboratories in Seven Countries *Clinical Chemistry* 2002, 48:11: 2008-2016
3. Tate & Ward (2004) Interferences in Immunoassays, *Clin. Biochem Rev* Vol 25, May 2004
4. Selby (1999): Interference in immunoassays; *Ann. Clin. Biochem* 1999, 36: 704-721

1 EINLEITUNG

1.1 Verwendungszweck

Der **DEMEDIATEC Cortisol ELISA** ist ein kompetitiver Enzymimmunoassay zur quantitativen Bestimmung von Cortisol in Serum und Plasma (EDTA, Li-Heparin).

Dieser Test ist nur für in-vitro-diagnostische Anwendungen durch geschultes Laborpersonal bestimmt. Die manuelle Abarbeitung ist validiert worden. Der Einsatz von Laborautomaten liegt in der Verantwortung des Anwenders. Das Kit ist zum einmaligen Gebrauch bestimmt.

1.2 Beschreibung des Analyten

Cortisol ist ein Steroidhormon der Nebennierenrinde (NNR) in der Zona fasciculata und der Zona reticularis. Es wird üblicherweise als „Stresshormon“ bezeichnet, da dieses an der Regulation von Stresssituationen beteiligt ist. 90% des Cortisols sind an Cortisol-bindende Globuline (CBG) gebunden, etwa 7% an Albumin, der Rest liegt in freier Form vor (1). Das Cortisol spielt eine Rolle bei der Regulation der ACTH-Sekretion. Wenn die Menge des freien, nicht an Protein gebundenen Cortisols im Blut ansteigt, wird die Freisetzung des ACTH durch die negative Rückkopplung gehemmt. Umgekehrt nimmt der negative Rückkopplungseffekt bei erniedrigtem Cortisol-Spiegel ab, der ACTH-Spiegel steigt und die NNR sondert Cortisol ab, bis der normale Blutspiegel wiederhergestellt ist. Die Freisetzung von ACTH ist unter der Kontrolle des hypothalamischen Corticotropin-Releasing-Hormons (CRH); das negative Feedback-System des Cortisols wurde auf Ebene des Hypothalamus und der Hypophyse identifiziert.

Die Cortisol-Werte weisen eine typische Schwankung im Tagesverlauf auf (zirkadiane Rhythmik), wobei die höchsten Werte morgens und die niedrigsten Werte abends gefunden werden. Die Cortisol-Messungen sollten am besten in Proben bestimmt werden, die zu einer bestimmten, festen Uhrzeit (z.B. 8:00 Uhr) abgenommen worden sind.

Die wichtigsten biologischen Wirkungen von Cortisol sind Förderung der Glukoneogenese in der Leber, Erhöhung der Blutglukosekonzentration bei reduzierter Kohlenhydratverwertung, Einfluss auf den Fettstoffwechsel sowie entzündungshemmende Wirkung.

Die Bestimmung von Cortisol ist eine gute Methode für die Bewertung des Verdachts auf Anomalien in der Glucocorticoid-Produktion wie Cushing-Syndrom (Hypercortisolismus), Addison-Krankheit oder sekundäre Nebennierenrindeninsuffizienz (Hypocortisolismus). In vielen Fällen ist es notwendig, dynamische Tests (Suppression oder Stimulation) durchzuführen, um den Mangel auf einer der drei Hauptebenen (d.h. Nebenniere, Hypophyse, Hypothalamus) lokalisieren zu können.

2 TESTPRINZIP

Der DEMEDIATEC Cortisol ELISA ist ein Festphasen-Enzymimmunoassay, der auf dem Prinzip der kompetitiven Bindung basiert. Die Vertiefungen der Mikrotiterplatten sind mit einem Antikörper beschichtet, der gegen das Cortisol-Molekül gerichtet ist.

Die Proben werden in die beschichteten Vertiefungen gegeben und zusammen mit einem Cortisol-Enzymkonjugat inkubiert. Während der Inkubation konkurriert das Cortisol aus der Probe mit dem Cortisol-Enzymkonjugat um die freien Bindungsstellen des Antikörpers auf den beschichteten Vertiefungen. Das nicht gebundene Konjugat wird durch Waschen der Vertiefungen entfernt. Anschließend wird die Substratlösung zugegeben und die Farbentwicklung nach einer definierten Zeit gestoppt. Die Intensität der gebildeten Farbe ist umgekehrt proportional der Cortisol-Konzentration in der Probe. Die Extinktion wird bei 450 nm mit einem Mikrotiterplatten-Lesegerät gemessen.

3 WARNUNGEN & VORSICHTSHINWEISE

1. Dieses Kit ist nur zum in-vitro-diagnostischen Gebrauch geeignet und sollte nur von medizinischem Fachpersonal durchgeführt werden.
2. Vor der Testdurchführung muss die Arbeitsanleitung vollständig und sorgfältig gelesen werden und verstanden worden sein. Die gültige Version aus dem Kit verwenden.
3. Humanes Material, das bei der Herstellung verwendet wird, wurde negativ auf Antikörper gegen HIV 1&2, HbsAg und HCV getestet. Keine Testmethode kann jedoch die vollständige Sicherheit bieten, dass HIV, HBV, HCV oder andere infektiöse Erreger nicht vorhanden sind. Daher müssen die Reagenzien genauso behandelt werden wie potenziell infektiöses Material.
4. Die Mikrotiterplatte enthält teilbare, einzeln brechbare Mikrotiterstreifen. Unbenutzte Mikrotiterstreifen müssen im verschlossenen Folienbeutel bei 2-8°C aufbewahrt werden und im mitgelieferten Rahmen verwendet werden.
5. Proben und Reagenzien müssen so schnell wie möglich und in einer gleichbleibenden Sequenz pipettiert werden.

6. Für jedes Reagenz ein separates Gefäß verwenden. Das gilt besonders für die Substratlösung. Wenn das Gefäß der Substratlösung vorher z.B. für das Konjugat verwendet wurde, kommt es zu einem Farbumschlag der Substratlösung. Reagenzien nie zurück ins Fläschchen überführen, da so Reagenz-Kontaminationen verursacht werden können.
7. Den Inhalt der Mikrotiterplatte sorgfältig mischen, um gute Testergebnisse zu gewährleisten. Mikrotiterplatten nicht wiederverwenden!
8. Mikrotiterstreifen nicht austrocknen lassen während des Testlaufes. Nach jedem Waschschrift zügig im Testprotokoll fortfahren.
9. Reagenzien vor dem Testansatz auf Raumtemperatur (18-25°C) bringen. Die Temperatur hat einen Einfluss auf die Bestimmung der Optischen Dichte.
10. Nicht mit dem Mund pipettieren und Kontakt von Kitbestandteilen und Proben mit Haut und Schleimhäuten vermeiden.
11. In den Bereichen, in denen Proben oder Kitbestandteile verwendet werden, nicht rauchen, essen, trinken oder Kosmetika verwenden.
12. Beim Umgang mit Proben oder Reagenzien Einweg-Handschuhe tragen. Die Verunreinigung von Reagenzien oder Proben mit Mikroben kann zu falschen Ergebnissen führen.
13. Der Gebrauch sollte in Übereinstimmung mit den Verfahren erfolgen, welche durch eine nationale Gefahrenstoff-Sicherheitsrichtlinie festgelegt sind.
14. Reagenzien nicht nach dem auf dem Kit-Etikett angegebenen Verfallsdatum verwenden.
15. Alle in der Packungsbeilage angegebenen Mengen müssen genau eingehalten werden. Optimale Ergebnisse können nur durch Verwendung kalibrierter Pipetten und Mikrotiterplatten-Lesegeräte erreicht werden.
16. Komponenten von Kits mit unterschiedlichen Lotnummern nicht untereinander austauschen oder mischen. Es wird empfohlen, keine Wells von verschiedenen Platten zu verwenden, auch nicht, wenn es sich um die selbe Lot handelt. Die Kits können unter anderen Bedingungen gelagert oder transportiert worden sein, so dass die Bindungscharakteristika der Platten leicht unterschiedlich ausfallen können.
17. Der Kontakt mit der Stopplösung sollte vermieden werden, da sie Hautreizungen und Verätzungen verursachen kann.
18. Einige Reagenzien enthalten ProClin 300, CMIT und/oder MIT als Konservierungsmittel. Bei Kontakt mit Augen oder Haut sofort mit Wasser spülen.
19. Die Reagenzien des Kits sind als gesundheitsgefährdende Abfälle zu betrachten und gemäß den nationalen Vorschriften zu entsorgen.
20. Informationen zu im Kit enthaltenen gefährlichen Substanzen entnehmen Sie bitte dem Material Sicherheitsdatenblatt. Material Sicherheitsdatenblätter für dieses Produkt sind auf Anfrage direkt von der Firma Demeditec Diagnostics GmbH erhältlich. Sie finden diese auch unter www.demeditec.de zum Herunterladen.
21. Alle im Zusammenhang mit den Produkten, die auf dem EU-Markt bereitgestellt werden, auftretende schwerwiegende Ereignisse gemäß VERORDNUNG (EU) 2017/746 Artikel 2, Absatz 61 sind dem Hersteller und der zuständigen Behörde des Mitgliedstaates, in dem der Anwender oder Patient niedergelassen ist, gemäß VERORDNUNG (EU) 2017/746 Artikel 82 zu melden.
22. Sollten Produktinformationen, einschließlich Etikettierung falsch oder inkorrekt sein, bitte den Hersteller oder den Lieferanten des Kits kontaktieren.

4 BESTANDTEILE DES KITS

4.1 Kitinhalt

1. **SORB** **MT** **Mikrotiterplatte**, 12 x 8 (einzeln brechbare) Mikrotiterstreifen mit 96 Vertiefungen beschichtet mit einem anti-Cortisol-Antikörper.
2. **CAL** **1** – **5** **Standard (Standard 0-5)**, 6 Fläschchen, je 0,3 ml, gebrauchsfertig; enthält Cortisol in Serum. Konzentrationen: 0 - 10 - 30 - 90 - 270 - 800 ng/ml
3. **CONTROL** **1** & **2** **Kontrolle 1 (niedrig) / Kontrolle 2 (hoch)**, 2 Fläschchen, je 0,3 ml, gebrauchsfertig; enthält Cortisol in Serum. Kontrollwerte und -bereiche entnehmen Sie bitte dem QC-Datenblatt.
4. **ENZ** **CONJ** **Enzymkonjugat**, 1 Fläschchen, 22 ml, gebrauchsfertig; Farbe: rot; Cortisol mit Meerrettichperoxidase konjugiert.
5. **SUB** **TMB** **Substratlösung**, 1 Fläschchen, 22 ml, gebrauchsfertig; enthält Tetramethylbenzidin (TMB).
6. **STOP** **SOLN** **Stopplösung**, 1 Fläschchen, 7 ml, gebrauchsfertig; enthält 2 N Salzsäure. Kontakt mit der Stopplösung vermeiden! Kann Hautreizungen und Verbrennungen verursachen.
7. **WASH** **SOLN** **10x** **Waschlösung**, 1 Fläschchen, 50 ml (10x konzentriert); siehe „Vorbereitung der Reagenzien“ (4.4).

4.2 Nicht im Kit enthaltene aber erforderliche Geräte und Materialien

- Kalibriertes Mikrotiterplatten-Lesegerät mit 450 nm Filter
- Kalibrierte variable Präzisions-Mikropipetten und Mehrkanalpipetten mit Einwegspitzen
- Mikrotiterplatten-Schüttler (900 rpm)
- Manuelle oder automatische Geräte zum Waschen von Mikrotiterplatten
- Saugfähiges Papier
- Aqua dest.
- Zeitnahmegerät
- Semilogarithmisches Papier oder Software zur Datenverarbeitung

4.3 Lagerung und Haltbarkeit des Kits

Die ungeöffneten Reagenzien behalten bei Lagerung um 2-8°C ihre Reaktivität bis zum Verfallsdatum. Nach dem Verfallsdatum die Reagenzien nicht mehr verwenden. Nach dem Öffnen sollten alle Reagenzien bei 2-8°C gelagert werden. Nach dem ersten Öffnen sind die Reagenzien bei sachgemäßer Abarbeitung und Lagerung 30 Tage stabil. Vor Hitze und direkter Sonneneinstrahlung schützen. Die Mikrotiterstreifen sollten bei 2-8°C gelagert werden. Der einmal geöffnete Folienbeutel sollte stets sehr sorgfältig wieder verschlossen werden.

4.4 Vorbereitung der Reagenzien

Alle Reagenzien sowie die benötigte Anzahl von Mikrotiterstreifen sollen vor dem Gebrauch auf Raumtemperatur (18-25°C) gebracht werden.

Waschlösung

Die 10-fach konzentrierte Waschlösung (50 ml) mit 450 ml deionisiertem Wasser auf ein Gesamtvolumen von 500 ml verdünnen. Die verdünnte Waschlösung ist bei Raumtemperatur (18-25°C) für mindestens 12 Wochen stabil. Bei einer Lagerung bei 2-8°C können sich Präzipitate bilden, die sich durch Schwenken bei Raumtemperatur wieder auflösen sollten (18-25°C). Die Waschlösung darf erst verwendet werden, wenn sich die Präzipitate komplett aufgelöst haben.

4.5 Entsorgung des Kits

Die Entsorgung des Kits muss gemäß den nationalen gesetzlichen Vorschriften erfolgen. Spezielle Informationen für dieses Produkt finden Sie im Materialsicherheitsdatenblatt.

4.6 Beschädigte Testkits

Im Falle einer starken Beschädigung des Testkits oder der Komponenten muss die Firma DEMEDITEC DIAGNOSTICS GmbH in schriftlicher Form spätestens eine Woche nach Erhalt des Kits informiert werden. Stark beschädigte Einzelkomponenten sollten nicht für den Testlauf verwendet werden. Sie müssen gelagert werden, bis eine endgültige Lösung gefunden wurde. Danach sollten sie gemäß den offiziellen Richtlinien entsorgt werden.

5 PROBENENTNAHME UND VORBEREITUNG

Zur Bestimmung von Cortisol ist **Serum oder Plasma (EDTA, Li-Heparin)** geeignet. Es sollten die üblichen Vorsichtsmaßnahmen für die Venenpunktion beachtet werden (1). Es ist wichtig, die chemische Integrität einer Blutprobe vom Zeitpunkt der Entnahme bis zur Untersuchung zu erhalten. Keine hämolytischen, ikterischen oder lipämischen Proben verwenden. Des Weiteren ist bei der Verwendung von Gel-Entnahmesystemen besondere Vorsicht geboten, da bei unsachgemäßer Handhabung eine Beeinflussung der Messergebnisse nicht ausgeschlossen werden kann. Proben, die Natriumazid enthalten, sollten nicht verwendet werden.

Für eine Bestimmung werden 10 µl Probenvolumen benötigt. Die Proben sollten unverzüglich verwendet oder aliquotiert bei -20°C gelagert werden. Wiederholte Gefrierzyklen sollten vermieden werden. Proben mit einer erwarteten Cortisol-Konzentration höher als der höchste Standard (800 ng/ml) sollten vor Durchführung des Tests mit Nullstandard verdünnt werden. Die zusätzliche Verdünnung muss bei der Kalkulation der Ergebnisse mit berücksichtigt werden.

6 TESTDURCHFÜHRUNG

6.1 Allgemeine Hinweise

- Alle Reagenzien und Proben müssen vor Gebrauch auf Raumtemperatur (18-25°C) gebracht und gut durchgemischt werden. Dabei sollte Schaumbildung vermieden werden.
- Nach Beginn der Testdurchführung muss sie ohne Unterbrechung zu Ende geführt werden.
- Für jeden Standard, jede Kontrolle und Probe sollte eine neue Pipettenspitze verwendet werden, um Verschleppungen zu vermeiden.
- Die Optische Dichte ist abhängig von Inkubationszeit und Temperatur. Deshalb ist es notwendig, vor Beginn der Testdurchführung alle Reagenzien in einen arbeitsbereiten Zustand zu bringen, die Deckel der Fläschchen zu öffnen, alle benötigten Vertiefungen in den Halter zu setzen. Nur eine solche Vorbereitung garantiert gleiche Zeiten für jeden Pipettiervorgang ohne Pausen.
- Als generelle Regel gilt, dass die enzymatische Reaktion linear proportional zu Zeit und Temperatur ist.
- Die in der Gebrauchsanweisung angegebenen Inkubationszeiten müssen eingehalten werden.
- Standards, Kontrollen und Proben sollten mindestens in Doppelansätzen bestimmt werden.
- Die korrekte Durchführung der Waschstreps ist entscheidend. Ungenügend gewaschene Wells ergeben falsche Ergebnisse. Die Verwendung einer Multikanalpipette bzw. Multistepers oder eines automatischen Waschgerätes für Mikrotiterplatten wird empfohlen. Zwischen den Inkubationen die Wells nicht austrocknen lassen. Beim Waschen und Ausschütteln dürfen die beschichteten Wells nicht beschädigt werden. Alle Reagenzien müssen daher mit Vorsicht pipettiert werden. Beim Waschvorgang ist es wichtig, dass alle Vertiefungen vollständig und gleichmäßig mit Waschlösung gefüllt werden und nach dem Ausschütteln kein Rückstand an Flüssigkeit zurückbleibt.
- Jeder Testlauf muss eine eigene Standardkurve beinhalten.

6.2 Testdurchführung

1. Die benötigte Anzahl an **Mikrotiterstreifen** in der Halterung befestigen.
2. Je **10 µl Standards, Kontrollen und Proben mit neuen Plastikspitzen** in die entsprechenden Vertiefungen geben.
3. **200 µl Enzymkonjugat** in jede Vertiefung geben.
4. **60 Minuten** bei Raumtemperatur (18-25°C) auf einem Mikrotiterplatten-Schüttler (900 rpm) inkubieren.
5. Den Inhalt der Vertiefungen kräftig ausschütten. Vertiefungen **4mal** mit verdünnter **Waschlösung** (300 µl pro Vertiefung) waschen. Restliche Flüssigkeit durch Ausklopfen der Mikrotiterplatte auf saugfähigem Papier entfernen.
Achtung: Die Sensitivität und Präzision dieses Assays wird erheblich beeinflusst von der korrekten Durchführung des Waschschrilles!
6. **200 µl Substratlösung** in jede Vertiefung geben.
7. **30 Minuten** ohne Schütteln bei Raumtemperatur (18-25°C) im Dunkeln inkubieren.
8. Die enzymatische Reaktion durch Zugabe von **50 µl Stopplösung** in jede Vertiefung abstoppen.
9. Die Optische Dichte bei **450 nm** mit einem Mikrotiterplatten-Lesegerät innerhalb von 15 Minuten nach Zugabe der Stopplösung bestimmen.

6.3 Ergebnisermittlung

1. Die durchschnittlichen Werte der Optischen Dichte (OD) für jedes Set von Standards und Proben bestimmen.
2. Die erhaltenen OD-Werte der Standards (y-Achse, linear) gegen ihre Konzentration (x-Achse, logarithmisch) entweder auf semi-logarithmischem Papier oder mit einer automatisierten Methode auswerten.
3. Unter Verwendung der mittleren OD wird für jede Probe die entsprechende Konzentration aus der Standardkurve ermittelt.
4. Automatische Methode: Die in der Arbeitsanleitung ermittelten Werte wurden automatisch mit Hilfe der 4 Parameter-Gleichung (4PL, 4 Parameter Logistics) bestimmt. Andere Auswertungsfunktionen können leicht abweichende Werte ergeben.
5. Die Konzentration der Proben kann direkt von der Standardkurve abgelesen werden. Proben, die eine höhere Konzentration als die des höchsten Standards enthalten, müssen verdünnt werden. Dieser Verdünnungsfaktor muss bei der Berechnung der Konzentration beachtet werden.

Beispiel für eine Standardkurve

Nachfolgend wird ein typisches Beispiel für eine Standardkurve mit dem DEMEDITEC Cortisol ELISA gezeigt. Diese darf aber nicht zur Kalkulation eines anderen Testlaufes verwendet werden.

Standard	Optische Dichte (450 nm)
Calibrator 0 (0 ng/ml)	3,068
Calibrator 1 (10 ng/ml)	2,380
Calibrator 2 (30 ng/ml)	1,742
Calibrator 3 (90 ng/ml)	1,112
Calibrator 4 (270 ng/ml)	0,608
Calibrator 5 (800 ng/ml)	0,289

7 ERWARTETE WERTE

Es wird dringend empfohlen, dass jedes Labor seine eigenen normalen und abnormalen Bereiche ermittelt. Bei Serumproben, die am Morgen von scheinbar gesunden Erwachsenen entnommen wurden, wurden folgende Werte festgestellt:

Population	n	ng/ml			
		Bereich	Median	2.5 Perzentile	97.5 Perzentile
Frauen <50 years	40	55 - 396	149	82	341
Frauen ≥50 years	20	60 - 312	171	81	295
Männer <50 years	20	103 - 278	169	104	271
Männer ≥50 years	19	50 - 234	153	65	226

Im Durchschnitt liegen die Ergebnisse von EDTA-Plasma ca. 10% und Li-Heparin ca. 5% unter den Serumwerten.

Therapeutische Konsequenzen sollten nicht allein auf Basis der mit diesem Test ermittelten Werte getroffen werden, sondern unter Berücksichtigung klinischer Beobachtungen und weiterer diagnostischer Tests.

8 QUALITÄTSKONTROLLE

Es wird empfohlen, Kontrollproben gemäß den nationalen gesetzlichen Bestimmungen einzusetzen. Durch die Verwendung von Kontrollproben wird eine Tag-zu-Tag-Überprüfung der Ergebnisse erzielt. Es sollten Kontrollen sowohl mit normalen als auch pathologischen Werten eingesetzt werden.

Die Kontrollen mit den entsprechenden Ergebnissen des QC-Labors sind im QC-Zertifikat, das dem Kit beiliegt, aufgeführt. Die im QC-Zertifikat angegebenen Werte und Bereiche beziehen sich stets auf die aktuelle Kitcharge und sollten zum direkten Vergleich der Ergebnisse verwendet werden. Es wird empfohlen, an einschlägigen Ringversuchen teilzunehmen.

Es sollten geeignete statistische Methoden zur Analyse von Kontroll-Werten und Trends angewendet werden. Wenn die Ergebnisse des Assays nicht mit den angegebenen Akzeptanzbereichen des Kontrollmaterials übereinstimmen, sollten die Patientenergebnisse als ungültig eingestuft werden.

In diesem Fall überprüfen Sie bitte die folgenden Bereiche: Pipetten und Zeitnehmer, Photometer, Verfallsdatum der Reagenzien, Lagerungs- und Inkubationsbedingungen, Absaug- und Waschmethode. Sollten Sie nach Überprüfung der vorgenannten Bereiche keinen Fehler erkannt haben, setzen Sie sich bitte mit Ihrem Lieferanten oder direkt mit der Firma Demeditec in Verbindung.

9 ASSAY CHARACTERISTIKA

9.1 Analytische Sensitivität

Die analytische Sensitivität, definiert als Mittelwert abzüglich der zweifachen Standardabweichung des Standards 0, beträgt 0,38 ng/ml.

9.2 Spezifität der Antikörper (Kreuzreaktivität)

Die folgenden Substanzen wurden auf ihre Kreuzreaktivität untersucht. Der Prozentsatz gibt die Kreuzreaktivität bei 50 % Verdrängung im Vergleich zu Cortisol an.

Steroid	% Kreuzreaktivität
Pregnenolon	<0,3%
Estron	<0,3%
Estradiol	<0,3%
DHEA	<0,3%
17-Hydroxyprogesteron	0,8%
Prednisolon	100%
Testosteron	<0,3%
Cortison	76,9%
Corticosteron	0,4%
Danazol	<0,3%
Androstenedion	<0,3%
Prednison	70%
11-Deoxycortisol	39,9%
Estriol	<0,3%
Dexamethason	<0,3%
11-Deoxycorticosteron	<0,3%
Progesteron	<0,3%
DHEA-S	<0,3%

9.3 Messbereich

Der Messbereich des Testes liegt zwischen 10 - 800 ng/ml.

9.4 Präzision

9.4.1 Intra-Assay

Die Intra-Assay-Variation wurde ermittelt durch die Bestimmung von 20 Wiederholungsmessungen von drei Serumproben in einem Testansatz. Die Variation innerhalb des Assays ist nachfolgend dargestellt:

	Serum 1	Serum 2	Serum 3
Mittelwert (ng/ml)	60,9	102,1	264,1
SD	4,2	6,9	19,0
CV (%)	7,0	6,8	7,2
n =	20	20	20

9.4.2 Inter-Assay

Die Inter-Assay-Variation wurde durch Doppelbestimmungen von drei Serumproben in 10 verschiedenen Tests bestimmt.

	Serum 1	Serum 2	Serum 3
Mittelwert (ng/ml)	57,3	106,7	287,3
SD	3,0	8,3	26,3
CV (%)	5,2	7,8	9,2
n =	10	10	10

9.5 Wiederfindung

Die Wiederfindungsrate wurde durch Zugabe zunehmender Mengen des Analyten zu drei verschiedenen Proben, die unterschiedliche Mengen an endogenem Analyten enthielten, bestimmt. Jede Probe (nativ und nach Zugabe von definierten Mengen) wurde mit dem Demeditec Cortisol ELISA gemessen. Die prozentualen Wiederfindungen wurden durch Vergleich der erwarteten und gemessenen Ergebnisse der Proben ermittelt.

Probe	Zugefügtes Cortisol (ng/ml)	Gemessener Wert (ng/ml)	Erwarteter Wert (ng/ml)	Wiederfindung (%)
1	nativ	204,3	-	-
	100	306,2	304,3	101%
	200	394,1	404,3	97%
	300	527,7	504,3	105%
2	nativ	76,4	-	-
	100	186,7	176,4	106%
	200	272,8	276,4	99%
	300	415,5	376,4	110%
3	nativ	110,3	-	-
	100	222,6	210,3	106%
	200	329,3	310,3	106%
	300	440,5	410,3	107%

9.6 Linearität

Drei Serumproben wurden unverdünnt und mit dem Null-Kalibrator verdünnt untersucht. Die prozentuale Linearität wurde durch Vergleich der erwarteten und gemessenen Werte berechnet.

Serum	Verdünnung	Gemessener Wert (ng/ml)	Erwarteter Wert (ng/ml)	Linearität (%)
1	nativ	465,8	-	-
	1 : 2	232,0	232,9	100%
	1 : 4	100,5	116,4	86%
	1 : 8	64,1	58,2	110%
2	-	224,4	-	-
	1 : 2	132,9	112,2	118%
	1 : 4	70,7	56,1	126%
	1 : 8	36,2	28,1	129%
3	nativ	226,3	-	-
	1 : 2	136,6	113,1	121%
	1 : 4	69,9	56,6	123%
	1 : 8	36,0	28,3	127%
4	nativ	321,7	-	-
	1 : 2	179,7	160,8	112%
	1 : 4	92,1	80,4	115%
	1 : 8	41,9	40,2	104%

10 GRENZEN DES TESTS

Zuverlässige und reproduzierbare Ergebnisse werden erzielt, wenn das Testverfahren mit Verständnis der Packungsbeilage und die Einhaltung der Guten Laborpraxis durchgeführt wird. Jede unsachgemäße Behandlung von Proben oder Modifikationen dieses Tests können die Ergebnisse beeinflussen.

10.1 Interferenzen

- Hämoglobin (bis zu 1000 mg/dl), Bilirubin (bis zu 40 mg/dl), und Lipide (bis zu 30 mg/ml) zeigen keinen signifikanten Einfluss auf die Ergebnisse des Tests. Wir empfehlen dennoch, keine hämolytischen, ikterischen oder lipämischen Proben zu verwenden, um Interferenzen auszuschließen.
- Proben, die Natriumazid enthalten, sollten nicht für den Assay verwendet werden.
- Das Ergebnis eines jeden immunologischen Testsystems kann durch heterophile Antikörper, Anti-Spezies-Antikörper oder Rheumafaktoren, die in menschlichen Proben vorhanden sind, beeinflusst werden (2-4). Das Auftreten von heterophilen Antikörpern bei Patienten, die regelmäßig mit Tieren oder tierischen Produkten in Berührung kommen, kann beispielsweise zu Störungen bei immunologischen Tests führen. Daher können Interferenzen mit diesem In-vitro-Immunoassay nicht ausgeschlossen werden. Bei Verdacht auf unplausible Ergebnisse sollten diese als nicht gültig betrachtet und durch weitere Untersuchungen überprüft werden.
Zu diagnostischen Zwecken sollten die Ergebnisse immer nur in Verbindung mit dem klinischen Bild des Patienten und weiteren diagnostischen Tests betrachtet werden.

10.2 Beeinflussung durch Medikamente

Medikationen wie Cremes, Öle oder Pillen, die Cortisol enthalten, haben einen entsprechenden Einfluss auf die Bestimmung des Analyten. Das Gleiche gilt für alle Medikamente, die Prednisolon und Kortison enthalten. Alle Medikamente sollten bei der Bewertung der Ergebnisse berücksichtigt werden.

10.3 High Dose Hook Effekt

Ein Hook-Effekt ist im Bereich von 0 bis 10.000 ng/ml nicht nachweisbar.

11 RECHTLICHE GRUNDLAGEN

11.1 Zuverlässigkeit der Ergebnisse

Der Test muss exakt gemäß der Testanleitung des Herstellers abgearbeitet werden. Darüber hinaus muss der Benutzer sich strikt an die Regeln der GLP (Good Laboratory Practice) oder andere eventuell anzuwendende Regeln oder nationale gesetzliche Vorgaben halten. Dies betrifft besonders den Gebrauch der Kontrollreagenzien. Es ist sehr wichtig, bei der Testdurchführung stets eine ausreichende Anzahl Kontrollen zur Überprüfung der Genauigkeit und Präzision mitlaufen zu lassen.

Die Testergebnisse sind nur gültig, wenn alle Kontrollen in den vorgegebenen Bereichen liegen und alle anderen Testparameter die vorgegebenen Spezifikationen für diesen Assay erfüllen. Wenn Sie bezüglich eines Ergebnisses Zweifel oder Bedenken haben, setzen Sie sich bitte mit der Firma Demeditec Diagnostics GmbH in Verbindung.

11.2 Therapeutische Konsequenzen

Therapeutische Konsequenzen sollten keinesfalls nur aufgrund von Laborergebnissen erfolgen, selbst dann nicht, wenn alle Testergebnisse mit den in 11.1. genannten Voraussetzungen übereinstimmen. Jedes Laborergebnis ist nur ein Teil des klinischen Gesamtbildes eines Patienten. Nur in Fällen, in denen die Laborergebnisse in akzeptabler Übereinstimmung mit dem allgemeinen klinischen Bild des Patienten stehen, sollten therapeutische Konsequenzen eingeleitet werden. Das Testergebnis allein sollte niemals als alleinige Grundlage für die Einleitung therapeutischer Konsequenzen dienen.

11.3 Haftung

Jegliche Veränderungen des Testkits und/oder Austausch oder Vermischung von Komponenten unterschiedlicher Chargen von einem Testkit zu einem anderen können die gewünschten Ergebnisse und die Gültigkeit des gesamten Tests negativ beeinflussen. Solche Veränderungen und/oder Austausch haben den Ausschluss jeglicher Ersatzansprüche zur Folge. Reklamationen, die aufgrund von Falschinterpretation von Laborergebnissen durch den Kunden gemäß Punkt 11.2. erfolgen, sind ebenfalls abzuweisen. Im Falle jeglicher Reklamation ist die Haftung des Herstellers maximal auf den Wert des Testkits beschränkt. Jegliche Schäden, die während des Transports am Kit entstanden sind, unterliegen nicht der Haftung des Herstellers

12 REFERENZEN

1. Lothar Thomas: Labor und Diagnose 2020
2. Marks V.: False-Positive Immunoassay Results: A Multicenter Survey of Erroneous Immunoassay Results from Assays of 74 Analytes in 10 Donors from 66 Laboratories in Seven Countries
Clinical Chemistry 2002, 48:11: 2008-2016
3. Tate & Ward (2004) Interferences in Immunoassays, *Clin. Biochem Rev* Vol 25, May 2004
4. Selby (1999): Interference in immunoassays; *Ann. Clin. Biochem* 1999, 36: 704-721

1 INTRODUCCIÓN

1.1 Intención de Uso

El kit de **CORTISOL ELISA** de **DEMEDIATEC** es un inmunoensayo competitivo para la determinación cuantitativa de Cortisol en suero o plasma (EDTA, heparina de litio).

El ensayo está diseñado para su uso en diagnóstico in vitro y ha de realizarse solamente por profesionales. Se recomienda el procesamiento manual. La utilización de sistemas automatizados de laboratorio será bajo la única responsabilidad del usuario. El kit está diseñado para un único uso.

1.2 Descripción del analito

El Cortisol es una hormona corticoesteroide o glucocorticoide producida por la corteza adrenal la cual forma parte de la glándula adrenal (Zona fasciculada y zona reticulada de la corteza adrenal). Es usualmente denominada la hormona del estrés, ya que está implicada en respuestas a este.

El 90% del cortisol está unido a las globulinas ligantes a cortisol (CBG), alrededor de un 7% a albumina y el resto se encuentra libre (1). Entre los productos de la corteza adrenal humana, solo el cortisol está involucrado en la regulación de la secreción de ACTH, si el nivel de cortisol libre (no unido a proteínas) en sangre aumenta, la liberación de ACTH es inhibida por un efecto de retroalimentación negativa. Por el contrario, si los niveles de cortisol son bajos, la retroalimentación negativa disminuye, los niveles de ACTH aumentan, y la corteza adrenal secreta cortisol hasta restaurar los niveles normales en sangre. La liberación de ACTH está bajo el control de la hormona corticotrópica (CRH) del hipotálamo, la retroalimentación negativa que involucra al cortisol ha sido identificada en niveles hipotalámicos y pituitarios.

Normalmente durante el día hay una fluctuación de cortisol, alcanzando su nivel más alto en la mañana y el más bajo en la noche. Información importante es obtenida cuando la determinación de cortisol es realizada a las 8:00am. Los principales efectos biológicos del cortisol son: promoción de la gluconeogénesis, deposición de la glucosa hepática, incremento de los niveles de glucosa en sangre cuando la utilización de carbohidratos es reducida, efectos en el metabolismo de los lípidos y acción anti-inflamatoria. La determinación de cortisol es una poderosa herramienta para la evaluación de supuestas anomalías de producción de glucocorticoides, por ejemplo: Síndrome de Cushing (hipercortisolismo). Enfermedad de Addison o insuficiencia adrenal secundaria (hipocortisolismo). En muchos casos, es necesario realizar test dinámicos (supresión o estimulación) con el objeto de localizar el defecto y en cuál de los tres principales niveles se encuentra (adrenal, pituitaria, hipotálamo).

2 PRINCIPIO

El kit de Cortisol ELISA de DEMEDIATEC es un ensayo inmunoabsorbente ligado a enzimas en fase sólida (ELISA) basado en el principio de unión competitiva. Los pocillos de microtitulación se recubren con un anticuerpo anti-cortisol. Una cantidad desconocida de cortisol presente en la muestra compete con un conjugado de cortisol-peroxidasa de rábano picante para la unión al anticuerpo que recubre los pocillos. Después de la incubación, el conjugado no unido se elimina por lavado. La cantidad de conjugado de peroxidasa unida es inversamente proporcional a la concentración de cortisol en la muestra. Después de la adición de la solución de sustrato, la intensidad de color desarrollada es inversamente proporcional a la concentración de cortisol en la muestra.

3 ADVERTENCIAS Y PRECAUCIONES

1. Este kit es para uso de diagnóstico in vitro únicamente. Solo para uso profesional.
2. Antes de comenzar el ensayo, lea las instrucciones por completo y cuidadosamente. Utilice la versión validada del prospecto que se proporciona con el kit. Asegúrese de que todo se entienda.
3. Todo el material de origen humano utilizado en la preparación de los reactivos se ha probado y ha resultado negativo en cuanto a anticuerpos contra VIH 1 y 2, HbsAg y VHC. Sin embargo, ningún método de prueba puede ofrecer una garantía completa de la ausencia del VIH, VHB, VHC u otros agentes infecciosos. Por lo tanto, los reactivos deben manipularse de la misma manera que el material potencialmente infeccioso.
4. La microplaca contiene tiras separables. Los pocillos no utilizados deben almacenarse de 2 a 8°C en la bolsa de aluminio sellada y usarse bajo las condiciones provistas.
5. El pipeteo de la muestra y reactivos debe realizarse lo más rápido posible y en la misma secuencia para cada paso.
6. Utilice los depósitos solo para reactivos individuales. Esto se aplica especialmente para los depósitos de sustrato. El uso de un depósito para dispensar la solución de sustrato que se haya usado previamente para la solución conjugada puede cambiar el color de la solución. No vuelva a verter los reactivos en los viales, ya que podrían contaminarse con los reactivos.

7. Mezcle bien el contenido de los pocillos de la microplaca para asegurar buenos resultados de la prueba. No reutilice los micropocillos.
8. No deje que los pocillos se sequen durante el ensayo; agregue los reactivos inmediatamente después de completar los pasos de lavado.
9. Deje que los reactivos alcancen la temperatura ambiente (18-25°C) antes de comenzar la prueba. La temperatura afectará las lecturas de absorbancia del ensayo.
10. Nunca pipetee con la boca, evite el contacto de la piel y membranas mucosas con los reactivos y las muestras.
11. No fume, coma, beba ni aplique cosméticos en las áreas donde se manipulan las muestras o los reactivos del kit.
12. Utilice guantes protectores desechables cuando manipule muestras y reactivos. La contaminación microbiana de reactivos o muestras puede dar resultados erróneos.
13. La manipulación debe realizarse de acuerdo con los procedimientos definidos por una directriz o reglamentación nacional apropiada de seguridad sobre peligros biológicos.
14. No utilice reactivos después de la fecha de caducidad que se muestra en las etiquetas del kit.
15. Todos los volúmenes indicados deben realizarse de acuerdo con el protocolo. Los resultados de prueba óptimos solo se obtienen cuando se utilizan pipetas calibradas y lectores de placas de microvaloración.
16. No mezcle ni utilice componentes de kits con diferentes números de lote. Se recomienda no intercambiar pocillos de placas diferentes ni siquiera del mismo lote. Los kits pueden haber sido enviados o almacenados en diferentes condiciones y las características de unión de las placas pueden resultar ligeramente diferentes.
17. Evite el contacto con la solución de paro. Puede causar irritación y quemaduras en la piel.
18. Algunos reactivos contienen ProClin 300, CMIT y/o MIT como conservantes. En caso de contacto con los ojos o la piel aclarar inmediatamente con agua.
19. Los productos químicos y los reactivos preparados o usados deben tratarse como residuos peligrosos de acuerdo con las directrices o reglamentaciones nacionales de seguridad sobre peligros biológicos.
20. Para obtener información consulte las fichas de datos de seguridad. Las fichas de datos de seguridad de este producto están disponibles bajo pedido directamente con Demeditec Diagnostics GmbH o en la página de inicio de Demeditec (www.demeditec.com).
21. Todos los incidentes graves que se produzcan en relación con productos comercializados en la UE de conformidad con el artículo 2, apartado 61, del Reglamento (UE) 2017/746 se notificarán al fabricante y a la autoridad competente del Estado miembro donde el usuario o paciente está establecido de conformidad con el artículo 82 del Reglamento (UE) 2017/746.
22. Si la información del producto, incluido el etiquetado, es incorrecta o inexacta, comuníquese con el fabricante o proveedor del kit.

4 REACTIVOS

4.1 Reactivos provistos

1. **SORB | MT | Microplaca**, 12 x 8 (desmontables) tiras de 96 pocillos; impregnadas con anticuerpos anti-cortisol.
2. **CAL | 0-5 | Calibradores (Calibrador 0-5)**, 6 viales, 0.3 ml cada uno, listo para su uso; contienen cortisol humano en suero. Concentraciones: 0 - 10 - 30 - 90 - 270 - 800 ng/ml.
3. **CONTROL | 1-2 | Control 1 (bajo) / Control 2 (alto)**, 2 viales, 0.3 ml cada uno, listo para su uso; contienen cortisol humano en suero, para valores de control y rangos de referencia, por favor refiérase a la hoja de datos de control de calidad.
4. **ENZ | CONJ | Conjugado Enzimático**, 1 vial, 22 ml, color: rojo, listo para su uso; cortisol marcado con peroxidasa de rábano picante en matriz tamponada.
5. **SUB | TMB | Solución de Sustrato**, 1 vial, 22 ml, Listo para su uso; contiene tetrametilbenzidina (TMB).
6. **STOP | SOLN | Solución de Parada**, 1 vial, 7 ml, listo para su uso; contiene solución de ácido clorhídrico 2N. Evitar el contacto con la Solución de parada. Puede causar irritación y quemaduras en la piel.
7. **WASH | SOLN | 10x | Solución de Lavado**, 1 vial, 50 ml (10x concentrado); ver preparación de reactivos (4.4)

4.2 Materiales requeridos pero no provistos

- Un lector de placas de microtitulación capaz de medir puntos finales a 450 nm
- Micropipetas calibradas de precisión variable y pipetas multicanal con puntas desechables,
- Dispositivos manuales o automáticos para el lavado de placas de microtitulación
- Mezclador de microplacas que funcione a 900 rpm
- Papel Absorbente
- Agua destilada o desionizada
- Contador
- Papel gráfico semi-logarítmico o software para la reducción de datos.

4.3 Condiciones de Almacenamiento

Cuando se almacena de 2-8°C los reactivos sin abrir son estables hasta la fecha de caducidad. No utilizar los reactivos después de esta fecha. Los reactivos abiertos deben conservarse de 2-8°C. Una vez abiertos los reactivos son estables durante 30 días si se almacenan correctamente.

Proteger del calor y de la luz solar directa.

Los pocillos se deben almacenar de 2-8°C. Una vez que la bolsa de aluminio se ha abierto, se debe tener cuidado para cerrarla herméticamente de nuevo.

4.4 Preparación de reactivos

Permita que los reactivos y el número de pocillos a utilizar alcancen temperatura ambiente (18-25°C) antes de comenzar el test.

Solución de Lavado:

Diluir 50 ml del concentrado 10x de Solución de lavado con 450 ml de agua desionizada hasta un volumen final de 500 ml. La solución de lavado diluida es estable durante al menos 12 semanas a temperatura ambiente (de 18-25°C). Podrían formarse precipitados cuando se conserve a 2-8°C, que deberían disolverse de nuevo mediante agitación suave a temperatura ambiente (18-25°C). La solución de lavado solamente debe utilizarse cuando dichos precipitados se hayan disuelto por completo.

4.5 Eliminación de los kits

La eliminación de los insumos utilizados debe realizarse de acuerdo a la normativa nacional de bioseguridad, información especial para este producto se da en la Hoja de Datos de Seguridad del Material.

4.6 Kits de prueba Dañados

En caso de daños graves del equipo o componentes de la prueba Demeditec Diagnostics GmbH debe ser informado por escrito dentro de una semana después de recibir el kit. Los componentes individuales gravemente dañados no deben usarse para una prueba. Deben almacenarse hasta que se encuentre una solución final. Después de esto deben ser eliminados de acuerdo a las regulaciones oficiales

5 TOMA Y ALMACENAMIENTO DE LAS MUESTRAS

Para la determinación de cortisol pueden utilizarse muestras de **suero y plasma (EDTA, heparina de litio)**. Deben observarse las precauciones habituales para la venopunción. Es importante preservar la integridad química de una muestra de sangre desde el momento en que se recoge hasta que se analiza. No utilice muestras hemolíticas, ictéricas o lipémicas. Además, se recomienda tener especial precaución al utilizar sistemas de recogida en gel, ya que no se puede excluir una influencia en los resultados de la medición en caso de manipulación inadecuada. No deben usarse muestras que contengan acida sódica.

El procedimiento requiere una muestra de 10 µl por pocillo. Las muestras deben ser procesadas inmediatamente o ser alicuotadas y almacenadas a $\leq -20^{\circ}\text{C}$. Evitar ciclos repetidos de congelación y descongelación. Las muestras que se esperan que tengan concentraciones de cortisol superiores al calibrador más alto (800 ng/ml) deben diluirse con el calibrador cero (0) antes del ensayo. El paso de dilución adicional debe tenerse en cuenta para el cálculo de resultados.

6 PROCEDIMIENTO DE ENSAYO

6.1 Observaciones Generales

- Se debe permitir que todos los reactivos y componentes lleguen a temperatura ambiente antes de utilizarlos. Todos los reactivos deben mezclarse sin generar espuma.
- Una vez comenzado el estudio todos los pasos deben completarse sin interrupción.
- Utilizar nuevas puntas de pipeta para cada calibrador, muestra o control para evitar contaminación.
- La Absorbancia es una función del tiempo y la temperatura de incubación. Antes de comenzar el ensayo, se recomienda que todos los reactivos estén listos, que se hayan retirado las tapas, que todos los pocillos necesarios estén asegurados en el soporte, etc. Esto garantizará el tiempo transcurrido en el pipeteo sin interrupción.
- Como regla general la reacción enzimática es linealmente proporcional al tiempo y a la temperatura.
- Respetar los tiempos de incubación como se indica en estas instrucciones de uso.
- Los calibradores, controles y muestras deben probarse en determinaciones dobles como mínimo.
- El lavado de la placa de microtitulación es un paso importante. Los pocillos insuficientemente lavados conllevan a resultados erróneos. Se recomienda emplear una pipeta multicanal o un sistema automático de lavado. No deje secar los pocillos entre incubaciones. Cuide de no dañar el recubrimiento de las placas durante el enjuague y/o la aspiración. Enjuague y agregue los reactivos cuidadosamente. Al enjuagar cerciórese que todos los pocillos estén completamente llenos con la Solución Buffer de Lavado y que no haya residuos en ellos.
- Cada serie de ensayos debe incluir una curva de calibración.

6.2 Procedimiento de ensayo

1. Preparar un número suficiente de pocillos en el soporte para analizar calibradores, controles y muestras.
2. Dispense **10 µl** de cada **Calibrador, Muestra y Control** con puntas descartables nuevas en el pocillo que corresponda.
3. Dispense **200 µl** de **Conjugado Enzimático** en cada pocillo.
4. Incubar por **60 minutos** a temperatura ambiente (18-25°C) en un agitador de placas (900 rpm).
5. Descarte el contenido de los pocillos y lave **4 veces** con la **Solución de Lavado** diluida (300 µl por pocillo). Retire la mayor cantidad posible de Solución de Lavado batiendo la microplaca sobre papel absorbente.
Nota importante: ¡La sensibilidad y la precisión de este ensayo se ven marcadamente influenciadas por la realización correcta del proceso de lavado!
6. Añada **200 µl** de **Solución de Sustrato** en cada pocillo.
7. Incube sin agitar durante **30 minutos** a temperatura ambiente (18-25°C) en oscuridad.
8. Detenga la reacción añadiendo **50 µl** de **Solución de Parada** a cada pocillo.
9. Determine la absorbancia de cada pocillo a una longitud de onda de 450 nm. Es recomendable leer las placas durante los primeros 15 minutos.

6.3 Cálculo de los Resultados

1. Calcular los valores de absorbancia para cada calibrador, control y muestra.
2. Usando papel semi-logarítmico construya una curva estándar trazando la absorbancia obtenida para cada estándar en función de su concentración con el valor de absorbancia en el eje vertical (Y) y la concentración en el eje horizontal (X).
3. Usando el valor de absorbancia para cada muestra, determine la concentración correspondiente de la curva de calibración.
4. Método Automatizado: Los resultados en el prospecto se han calculado automáticamente utilizando un ajuste de la curva 4 PL (Logística de Parámetros), el cual es el método de cálculo preferido. Otras funciones de reducción de datos pueden dar resultados ligeramente diferentes.
5. La concentración de las muestras puede determinarse directamente a partir de la curva del calibrador. Las muestras con concentraciones superiores al calibrador más alto deben ser diluidas. Para el cálculo de las concentraciones este factor de dilución debe tenerse en cuenta.

Ejemplo de una típica curva de calibración

Los datos siguientes son solo ilustrativos y no deben utilizarse para calcular los resultados de otra ejecución.

Estándar	Unidades Ópticas (450 nm)
Calibrador 0 (0 ng/ml)	3.068
Calibrador 1 (10 ng/ml)	2.380
Calibrador 2 (30 ng/ml)	1.742
Calibrador 3 (90 ng/ml)	1.112
Calibrador 4 (270 ng/ml)	0.608
Calibrador 5 (800 ng/ml)	0.289

7 VALORES ESPERADOS

Se recomienda que cada Laboratorio determine sus valores normales y anormales.

Las muestras de adultos normales aparentemente sanos, recogidas por la mañana, fueron analizadas utilizando el ELISA de Demeditec y se observaron los siguientes valores:

Población	n	ng/ml			
		Rango	Mediana	2.5 Percentil	97.5 Percentil
Mujer <50 años	40	55 - 396	149	82	341
Mujer ≥50 años	20	60 - 312	171	81	295
Hombre <50 años	20	103 - 278	169	104	271
Hombre ≥50 años	19	50 - 234	153	65	226

Por término medio, los valores plasmáticos de EDTA parecen ser aproximadamente un 10% y los de Li-Heparina un 5% inferiores a los del suero.

Los resultados por sí solos no deben ser la única razón para cualquier consecuencia terapéutica. Tienen que estar correlacionadas con otras observaciones clínicas y pruebas diagnósticas.

8 CONTROL DE CALIDAD

Las buenas prácticas de laboratorio requieren que los controles se procesen con cada curva de calibración. Un número estadísticamente significativo de los controles debe ser analizado para establecer los valores medios y rangos aceptables para asegurar un rendimiento adecuado. Se recomienda el uso de muestras de control de acuerdo con las regulaciones estatales y federales. Se recomienda el uso de muestras de control para asegurar la validez de los resultados en el día a día. Utilice los controles en ambos niveles (normales y patológicos).

Los controles y los resultados correspondientes del control de calidad del laboratorio se indican en el certificado de control de calidad añadido al kit. Los valores y rangos indicados en la hoja de control de calidad se refieren siempre al lote del kit actual y deben ser utilizados para la comparación directa de los resultados.

También se recomienda hacer uso de los programas nacionales o internacionales de evaluación de calidad con el fin de asegurar la exactitud de los resultados. Emplear métodos estadísticos apropiados para analizar los valores de control y las tendencias. Si los resultados del ensayo no se ajustan a los rangos aceptables establecidos de materiales de control, los resultados del paciente deben considerarse inválidos. En este caso, consulte las siguientes áreas técnicas: Dispositivos de pipeteo y temporización, lector de placas de microtitulación, fechas de caducidad de los reactivos, condiciones de almacenamiento e incubación, métodos de aspiración y lavado. Después de comprobar los elementos mencionados anteriormente sin encontrar ningún error, póngase en contacto con su distribuidor o con Demeditec directamente.

9 CARACTERISTICAS DE RENDIMIENTO

9.1 Sensibilidad Analítica

El nivel analítico de cortisol más bajo que se puede distinguir del calibrador cero (0) es el de 0,38 ng/mL en el límite de confianza de 2DS.

9.2 Especificidad (Reacción Cruzada)

Los siguientes materiales han sido evaluados para la reactividad cruzada. El porcentaje indica la reactividad cruzada al 50% de desplazamiento en comparación con el cortisol.

Esteroide	% Reacción Cruzada
Pregnenolona	<0,3%
Estrona	<0,3%
Estradiol	<0,3%
DHEA	<0,3%
17-Hidroxiprogesterona	0,8%
Prednisolona	100%
Testosterona	<0,3%
Cortisona	76,9%
Corticosterona	0,4%
Danazol	<0,3%
Androstenediona	<0,3%
Prednisona	70%
11-Desoxicortisol	39,9%
Estriol	<0,3%
Dexametasona	<0,3%
11-Desoxicorticosterona	<0,3%
Progesterona	<0,3%
DHEA-S	<0,3%

9.3 Rango dinámico del ensayo

El rango del ensayo se encuentra entre 10 - 800 ng/ml.

9.4 Reproducibilidad

9.4.1 Intra-Ensayo

La variación intra-ensayo se determinó mediante 20 mediciones repetidas de tres (3) muestras de suero dentro de un ensayo. La variabilidad dentro del ensayo se muestra a continuación:

	Suero 1	Suero 2	Suero 3
Media (ng/ml)	60,9	102,1	264,1
SD	4,2	6,9	19,0
CV (%)	7,0	6,8	7,2
n =	20	20	20

9.4.2 Inter-Ensayo

La variación inter-ensayo (entre series de pruebas) fue determinada por mediciones de 3 muestras de suero en 10 diferentes ensayos.

	Suero 1	Suero 2	Suero 3
Media (ng/ml)	57,3	106,7	287,3
SD	3,0	8,3	26,3
CV (%)	5,2	7,8	9,2
n =	10	10	10

9.5 Recuperación

La recuperación se determinó agregando cantidades crecientes del analito a tres muestras diferentes que contenían diferentes cantidades del analito endógeno. Se ensayó cada muestra (modificadas y no modificadas) y las concentraciones del analito se calcularon a partir de la curva patrón. El porcentaje de recuperación se determinó comparando los valores esperados y medidos de las muestras.

Muestra	Concentración (ng/ml)	Medida (ng/ml)	Esperada (ng/ml)	Recuperación (%)
1	natural	204,3	-	-
	100	306,2	304,3	101%
	200	394,1	404,3	97%
	300	527,7	504,3	105%
2	natural	76,4	-	-
	100	186,7	176,4	106%
	200	272,8	276,4	99%
	300	415,5	376,4	110%
3	natural	110,3	-	-
	100	222,6	210,3	106%
	200	329,3	310,3	106%
	300	440,5	410,3	107%

9.6 Linealidad

Cuatro muestras de suero que contenían diferentes cantidades del analito se diluyeron en serie con el Calibrador 0 y se ensayaron. El porcentaje de linealidad se calculó comparando los valores esperados y medidos

Suero	Dilución	Medición (ng/ml)	Esperado (ng/ml)	Linealidad (%)
1	-	465,8	-	-
	1 : 2	232,0	232,9	100%
	1 : 4	100,5	116,4	86%
	1 : 8	64,1	58,2	110%
2	-	224,4	-	-
	1 : 2	132,9	112,2	118%
	1 : 4	70,7	56,1	126%
	1 : 8	36,2	28,1	129%
3	-	226,3	-	-
	1 : 2	136,6	113,1	121%
	1 : 4	69,9	56,6	123%
	1 : 8	36,0	28,3	127%
4	-	321,7	-	-
	1 : 2	179,7	160,8	112%
	1 : 4	92,1	80,4	115%
	1 : 8	41,9	40,2	104%

10 LIMITACIONES DEL PROCEDIMIENTO

Se obtendrán resultados confiables y reproducibles cuando se realice el procedimiento de ensayo con una comprensión completa de las instrucciones del ensayo y la adhesión a las buenas prácticas en el laboratorio. Cualquier manipulación incorrecta de las muestras o modificación de esta prueba podría influir en los resultados.

10.1 Interferencia de sustancias

- La hemoglobina (hasta 1000 mg/dl), la bilirrubina (hasta 40 mg/dl) y los lípidos (hasta 30 mg/ml) no muestran una influencia significativa en los resultados de la prueba. Sin embargo, se recomienda no utilizar muestras hemolíticas, ictericas o lipémicas para evitar interferencias.
- Las muestras que contengan azida sódica no deben ser utilizadas en este ensayo.
- El resultado de cualquier test inmunológico puede resultar afectado por anticuerpos heterófilos, anticuerpos anti-especies o factores reumatoides presentes en las muestras humanas (2-4). Por ejemplo, la presencia de anticuerpos heterófilos en pacientes regularmente expuestos a animales o a productos animales pueden interferir con los test inmunológicos. Por tanto, no pueden descartarse las interferencias con este inmunoensayo in vitro. Si se sospecha de la existencia de resultados inverosímiles, deberían considerarse inválidos y ser verificados por pruebas adicionales. Para fines diagnósticos, los resultados siempre deben ser considerados solamente en conjunción con el cuadro clínico del paciente y pruebas diagnósticas adicionales.

10.2 Interferencia de drogas

Cualquier medicación (cremas, aceites, píldoras, etc.) que contenga cortisol, por supuesto influirá significativamente en la medición de este ensayo. Lo mismo ocurre con cualquier medicamento que contenga Prednisolona y Cortisona. Hay que tener en cuenta cualquier medicación a la hora de evaluar los resultados.

10.3 Efecto Hook

No se detecta un "Efecto Hook" en el rango entre 0 - 10000 ng/ml.

11 ASPECTOS LEGALES

11.1 Fiabilidad de los Resultados

La prueba debe realizarse exactamente según las instrucciones de uso del fabricante, además el usuario debe cumplir estrictamente las normas BPL (Buenas Prácticas en el Laboratorio) u otras normas y/o leyes aplicables. Esto es especialmente relevante para el uso de reactivos de control. Es importante incluir siempre un número suficiente de controles dentro del procedimiento de prueba para validar la exactitud y la precisión de la prueba.

Los resultados de la prueba son válidos solo si todos los controles están dentro de los rangos especificados y si todos los demás parámetros de la prueba están dentro de las especificaciones del ensayo mencionadas. En caso de duda o inquietud, póngase en contacto con Demeditec.

11.2 Consecuencias terapéuticas

Las consecuencias terapéuticas nunca deben basarse en resultados de Laboratorio, incluso si todos los resultados de las pruebas de Laboratorio están de acuerdo con lo indicado en el punto 11.1. Cualquier resultado de Laboratorio es solo una parte del cuadro clínico total de un paciente.

Sólo en los casos que los resultados de Laboratorio estén en un acuerdo aceptable con el cuadro clínico general del paciente deben derivarse las consecuencias terapéuticas.

El resultado de la prueba en sí mismo nunca debe ser el único determinante para derivar cualquier consecuencia terapéutica.

11.3 Responsabilidad


Cualquier modificación del kit de prueba y / o intercambio o mezcla de cualquier componente de diferentes lotes de un kit de prueba a otros podría afectar negativamente los resultados pretendidos y la validez del ensayo general. Dicha modificación y / o intercambio invalidan cualquier reclamo de reemplazo.

Las reclamaciones presentadas debido a una interpretación errónea por parte del cliente de los resultados de laboratorio sujetos al punto 11.2 también son inválidas. Independientemente de ello en el caso de cualquier reclamación, la responsabilidad del fabricante no debe exceder el valor del kit de prueba. Cualquier daño causado al equipo de prueba durante el transporte no está sujeto a la responsabilidad del fabricante.

12 REFERENCIAS

1. Lothar Thomas: Labor und Diagnose, 2020
2. Marks V.: False-Positive Immunoassay Results: A Multicenter Survey of Erroneous Immunoassay Results from Assays of 74 Analytes in 10 Donors from 66 Laboratories in Seven Countries *Clinical Chemistry* 2002, 48:11: 2008-2016
3. Tate & Ward (2004) Interferences in Immunoassays, *Clin. Biochem Rev* Vol 25, May 2004
4. Selby (1999): Interference in immunoassays; *Ann. Clin. Biochem* 1999, 36: 704-721

SYMBOLS USED WITH DEMEDITEC ASSAYS

Symbol	English	Deutsch	Française	Español	Italiano
	European Conformity	CE-Konformitätskennzeichnung	Conforme aux normes européennes	Conformidad europea	Conformità europea
	Consult instructions for use	Gebrauchsanweisung beachten	Consulter les instructions d'utilisation	Consulte las Instrucciones	Consultare le istruzioni per l'uso
	In vitro diagnostic device	In-vitro-Diagnostikum	utilisation Diagnostic in vitro	Diagnóstico in vitro	Per uso Diagnostica in vitro
	For research use only	Nur für Forschungszwecke	Seulement dans le cadre de recherches	Sólo para uso en investigación	Solo a scopo di ricerca
	Catalogue number	Katalog-Nr.	Référence	Número de catálogo	No. di catalogo
	Lot. No. / Batch code	Chargen-Nr.	No. de lot	Número de lote	Lotto no
	Contains sufficient for <n> tests/	Ausreichend für "n" Ansätze	Contenu suffisant pour "n" tests	Contenido suficiente para <n> ensayos	Contenuto sufficiente per "n" saggi
	Note warnings and precautions	Warnhinweise und Vorsichtsmaßnahmen beachten	Avertissements et mesures de précaution font attention	Tenga en cuenta advertencias y precauciones	Annoti avvisi e le precauzioni
	Storage Temperature	Lagerungstemperatur	Température de conservation	Temperatura de conservación	Temperatura di conservazione
	Expiration Date	Mindesthaltbarkeitsdatum	Date limite d'utilisation	Fecha de caducidad	Data di scadenza
	Legal Manufacturer	Hersteller	Fabricant	Fabricante	Fabbricante
<i>Distributed by</i>	Distributed by	Vertrieb durch	Distribution par	Distribución por	Distribuzione da parte di
	Version	Version	Version	Versión	Versione
	Single-use	Einmalverwendung	À usage unique	Uso único	Uso una volta