

**Instructions for use / Gebrauchsanweisung****Cortisol Urine ELISA**

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

## 1. INTENDED PURPOSE

For In Vitro Diagnostic Use.

For Laboratory Professional Use.

Cortisol Urine ELISA is a manual in vitro diagnostic device intended for the quantitative determination of free Cortisol in human urine from an adult population.

## 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% is excreted in urine. In pathological conditions (Cushing syndrome) free urinary cortisol levels are very high as excess plasma cortisol doesn't bind to the CBG, so is excreted in urine.

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 is dose the free cortisol, it is the metabolically active form. Moreover, the measurement of free urinary cortisol is the better parameter for the diagnosis of the Cushing's syndrome.

## 3. PRINCIPLE

The Cortisol Urine ELISA is a competitive enzyme immuno-metric assay (ELISA) where 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 the 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 in the sample.

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

## 4. REAGENTS, MATERIALS AND INSTRUMENTATION

### 4.1 Reagents and materials supplied in the kit

#### Standards and Controls

Cat. no.	Symbol	Standard	Concentration	Volume/Vial
MS E-5101	STANDARD A	Standard A	0 ng/ml	4 ml
MS E-5102	STANDARD B	Standard B	1 ng/ml	1 ml
MS E-5103	STANDARD C	Standard C	5 ng/ml	1 ml
MS E-5104	STANDARD D	Standard D	30 ng/ml	1 ml
MS E-5105	STANDARD E	Standard E	200 ng/ml	1 ml
MS E-5151	CONTROL 1	Control 1	Concentrations of Controls are indicated on the QC-Report.	1 ml
MS E-5152	CONTROL 2	Control 2		1 ml

Content: ProClin > 0.0015%, BSA 0.01%

#### MS E-5140 CONJUGATE Enzyme Conjugate

Content: Cortisol conjugated with horseradish peroxidase (HRP);

ProClin > 0.0015%, BSA 0.1%

Volume: 1 x 33 ml

**MS E-5131**  **Microtiterwells**  
 Content: 1 breakable microplate; Anti-Cortisol antibody adsorbed on the microplate

**MS E-0055** **SUBSTRATE** **Substrate Solution**  
 Content: H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>-TMB, 0.26 g/l (avoid any skin contact);  
 ProClin < 0.0015%  
 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

**MS E-0030** **WASH-CONC** **10x** **Wash Solution – 10x Conc.**  
 Content: Phosphate buffer 0.2 M pH 7.4;  
 ProClin > 0.0015%  
 Volume: 1 x 50 ml


#### 4.2 Materials required but not provided

- Distilled water

#### 4.3 Auxiliary materials and instrumentation

- Automatic dispenser
- Precision Pipetting Devices
- Microplate reader (450 nm, 620 – 630 nm)

#### 5. 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.
-  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 (standards, controls, conjugate and wash solution) contain small amounts of ProClin™ 300 (> 0.0015%, < 0.06%) as preservative. Avoid the contact with skin or mucosa.

- Classification according to Regulation (EC) No. 1272/2008 [CLP]  
 Skin sensitivity, Category 1



Contains: ProClin 300

Warning

Hazard statements:

H317 – May cause an allergic skin reaction.

Precautionary statements:

P261 – Avoid breathing dust/fume/gas/mist/vapours/spray.

P280 – Wear protective gloves/protective clothing/eye protection/face protection/hearing protection.

P321 – Specific treatment (see supplemental first aid instruction on this label).

P333+P313 – If skin irritation or rash occurs: Get medical advice/attention.

P362+P364 – Take off contaminated clothing and wash it before reuse.

- The TMB Substrate contains an irritant, which may be harmful if inhaled, ingested or absorbed through the skin. To prevent injury, avoid inhalation, ingestion or contact with skin and eyes.
- The Stop Solution consists of a diluted sulphuric acid solution. Sulphuric acid is poisonous and corrosive and can be toxic if ingested. To prevent chemical burns, avoid contact with skin and eyes.
- Avoid the exposure of reagent TMB/H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> to directed sunlight, metals or oxidants. Do not freeze the solution.
- This method allows the determination of Cortisol from 0.47 ng/ml (LOD) 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.

## 6. 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 validated for its intended use/purpose.
- 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 and/or pooled urine.
- Maximum precision is required for reconstitution and dispensation of the reagents.
- Samples microbiologically contaminated, highly lipemic, icteric or haemolysed should not be used in the assay.
- Plate readers measure vertically. Do not touch the bottom of the wells.
- Fresh disposable tips must be used when pipetting assay reagents including samples, standards and controls to mitigate the risk of carryover contamination. Failure to do so may lead to invalid results.

## 7. REAGENT STORAGE AND STABILITY

Store the kit at 2 – 8 °C in the dark.

- The kit is stable at 2 – 8 °C until the expiry date stated on the external kit label.
- Once opened, the standards are stable at 2 – 8 °C for 6 months.
- Once opened, the conjugate is at 2 – 8 °C for 6 months.
- The diluted wash solution is stable for 30 days at 2 – 8 °C.

Important note: open the bag containing the Coated Microplate only when it is at room temperature and close it immediately after use.

## 8. SAMPLE COLLECTION AND STORAGE

The assay should be performed using urine samples.

Sample Storage	Duration
-20 °C	< 6 months

## 9. PROCEDURE

### 9.1 Preparation of the Standards and Controls

Before use, mix for 5 minutes with a rotating mixer.

The standards are ready for use and have the following concentration:

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

The controls are ready to use; the concentration is printed on the label.

### 9.2 Preparation of Conjugate

The conjugate is ready to use. Mix gently, for 5 minutes, on a roller mixer.

### 9.3 Preparation of Wash Solution

Dilute the content of the vial **WASH-CONC 10x** with distilled water to a final volume of 500 ml prior to use. For smaller volumes respect the 1:10 dilution ratio.

It is possible to observe the presence of crystals within the concentrated wash solution; 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 also to transfer crystals completely by rinsing of the bottle, then mix until crystals are completely dissolved.

### 9.4 Preparation of the Sample

The determination of cortisol can be performed in human urine samples.

Important note: the kit has been designed to be used on untreated urine samples; acidification treatments of the urine that lead the pH to values below 5.0 could interfere with the assay and produce aberrant results.

It is not necessary to dilute the sample. The total volume of urine excreted during a 24-hour should be collected and mixed in a single container.

Store the sample at -20 °C if the determination is not performed on the same day of the sample collection. Before using, mix gently, for 5 minutes, with a roller mixer.

### 9.5 Procedure

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

At the end of the assay, immediately store the reagents at 2 – 8 °C: avoiding long exposure to room temperature.

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 (Standard A – E), two for each Control, two for each sample, one for Blank.

Reagent	Standard	Sample/Control	Blank
Standard A – E	10 µl		
Sample/Control		10 µl	
Conjugate	300 µl	300 µl	
Incubate 1 h at +37 °C ± 0.5 °C. Remove the contents from each well; wash the wells <b>3 times with 350 µl</b> of diluted wash solution. <b>Important note:</b> during each washing step, gently shake the plate for 5 seconds and remove excess solution by tapping the inverted plate on an absorbent paper towel. <u>Automatic washer:</u> if you use automated equipment, wash the wells at least 6 times.			
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 gently the microplate. Read the absorbance (E) at 450 nm against a reference wavelength of 620 – 630 nm or against Blank within 5 minutes.			

## 10. QUALITY CONTROL

Good Laboratory Practice (GLP) requires the use of quality control specimens in each series of assays in order to check the performance of the assay. Controls should be treated as unknown samples, and the results analysed with appropriate statistical methods.

The kit controls provided in the kit should be tested as unknowns and are intended to assist in assessing the validity of results obtained with each assay plate.

The mean concentration of each control level is documented in the QC report included with each kit. These mean concentration levels are determined over several assays which are run in duplicate in multiple locations across each plate.

The manufacturer recommends the users to maintain graphic records of the control values generated with each assay run, including the running means, SDs and %CVs. This information will facilitate the controls trending analysis relating to the performance of current and historical control lots relative to the supplied Quality Control data. The trending will assist in the identification of assays which give control values significantly different from their average range.

When interpreting control data, users should note that this product was designed and developed as a manual product. The range stated on the QC certificate should be appropriate for assays that are performed manually

and with strict adherence to the Assay Procedure described above. It is recognised by Quality Control professionals, that as a result of differences in conditions and practices, there will always be variability in the mean values and precision of control measurements between different laboratories<sup>6</sup>.

## 11. CALCULATION OF RESULTS

A variety of data reduction software packages are available, which may be employed to generate the mean standard curve and to calculate the mean concentrations of unknown samples and controls. A 4-parameter logistic (4PL) curve fit, including Standard A is required. Other curve fitting algorithms are not recommended. Alternatively, a standard curve may be prepared on semi-log graph paper by plotting mean absorbance on the Y-axis against concentration of analyte on the X-axis. Standard A should be included in the standard curve. Read the mean absorbance value of each unknown sample off the curve.

In order for the assay results to be considered valid the kit standards and control must fall within the specifications detailed in the lot specific certificate of analysis.

If a control is out of its specified range, the associated test results are invalid and samples must be retested.

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

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

## 12. EXPECTED VALUES

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

	n	Normal range urine (24 h)
Adults	128	1.5 – 63 µg/24h

## 13. PERFORMANCE AND CHARACTERISTICS

Representative performance data are shown. Results obtained at individual laboratories may vary.

### 13.1 Analytical sensitivity

Analytical sensitivity was investigated through the LOB (white limit), the LOD (detection limit), the LOQ (quantification limit) and the anal sensitivity (A.S.).

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

	Criteria	Result (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 5 replicates of Standard B have been assayed. A.S. has been calculated by linear regression.	0.22

### 13.2 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%
PS2	20	112.141	6.6%	12%
PS4	20	64.563	8.1%	12%
CT High	20	50.577	7.3%	11%
PS5	20	25.878	7.6%	10%
PS6	20	9.269	7.6%	11%
CT Low	20	3.438	7.0%	9%

### 13.3 Analytical specificity

#### 13.3.1 Interfering substances

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.

#### 13.3.2 Cross-reactivity

The cross-reaction of the antibody calculated at 50% according to Abraham is shown in the table:

Reagent	Cross-reactivity
Cortisol	100%
Prednisolone	46.2%
11-Deoxycortisol	4%
Cortisone	3.69%
Prednisone	3.10%
11 $\alpha$ OH Progesterone	1%
Progesterone	< 0.1%
Aldosterone	< 0.1%
Pregnenolone	< 0.1%
17 $\beta$ Estradiol	< 0.1%
Estrone 3-sulfato	< 0.1%
Estriol	< 0.1%

Reagent	Cross-reactivity
Testosterone	< 0.1%
Spironolactone	< 0.1%
DHEA	< 0.1%
DHEA-S	< 0.1%
Androstenedione	< 0.1%
Androsterone	< 0.1%
DHT	< 0.1%
Danazol	< 0.1%
Cholesterol	< 0.1%
Dexamethasone	< 0.1%

### 13.4 Correlation

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

The linear regression curve is:

n	Slope	Intercept (ng/ml)	R <sup>2</sup>
137	1.008	-0.5019	0.83

### 14. LIMITATIONS OF USE

- As in the case of any diagnostic procedure, results must be interpreted in conjunction with the patient's clinical presentation and other information available to the physician.
- The performance characteristics of this assay have not been established in a paediatric population.

### 15. WASTE MANAGEMENT

Reagents must be disposed of in accordance with local regulations.

All materials that have come into contact with samples and reagents must be disposed of in accordance with country, state and local regulations.














### 16. 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. 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)
6. Basic QC Practices On-line Course; <http://www.Westgard.com>.

17. PRODUCT COMPLAINTS AND TECHNICAL SUPPORT

For a patient/user/third party in the European Union and in countries with similar regulatory regime (Regulation 2017/746/EU on IVD Medical Devices); if, during the use of this device or as a result of its use, a serious incident has occurred, please report it to the manufacturer and/or its authorised representative and to your national regulatory authority.  
The manufacturer can be contacted through their customer service or technical support team. The contact details can be found on the company website.

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

Für die In-vitro-Diagnostik.

Für den professionellen Gebrauch im Labor.

Der Cortisol Urine ELISA ist ein manuelles In-vitro-Diagnostikum zur quantitativen Bestimmung von freiem Cortisol in humanem Urin von Erwachsenen.

## 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) ist der Anteil des freien Cortisols im Urin sehr hoch, da überschüssiges Plasmacortisol nicht an das CBG bindet und daher 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 Nebennierenfunktion hinweist.

Dieser Test ist sehr nützlich, um die tatsächliche Nebennierenfunktion abzuschätzen, da das freie Cortisol dosiert wird, es ist die metabolisch aktive Form. Außerdem ist die Messung des freien Cortisols im Urin der bessere Parameter für die Diagnose des Cushing-Syndroms.

## 3. PRINZIP

Der Cortisol Urine ELISA ist ein kompetitiver enzymimmunometrischer Test (ELISA), bei dem das Cortisol (Antigen) in der Probe mit dem antigenen, mit Meerrettichperoxidase (HRP) konjugierten Cortisol um die Bindung an die begrenzte Anzahl von Antikörpern gegen Cortisol konkurriert, die auf der Mikrotiterplatte (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.

## 4. REAGENZIEN, MATERIALIEN UND GERÄTE

### 4.1 Im Kit enthaltene Reagenzien und Materialien

#### Standards und Kontrollen

Artikelnr.	Komponente	Standard	Konzentration	Volumen/Fläschchen
MS E-5101	STANDARD A	Standard A	0 ng/ml	4 ml
MS E-5102	STANDARD B	Standard B	1 ng/ml	1 ml
MS E-5103	STANDARD C	Standard C	5 ng/ml	1 ml
MS E-5104	STANDARD D	Standard D	30 ng/ml	1 ml
MS E-5105	STANDARD E	Standard E	200 ng/ml	1 ml
MS E-5151	CONTROL 1	Kontrolle 1	Die Konzentrationen der Kontrollen sind auf dem QC-Report angegeben.	1 ml
MS E-5152	CONTROL 2	Kontrolle 2		1 ml

Inhalt: ProClin > 0,0015%, BSA 0,01%

**MS E-5140**    **CONJUGATE**    **Enzyme Conjugate** (Enzymkonjugat)

Inhalt: Cortisol konjugiert mit Meerrettichperoxidase (HRP);

ProClin > 0,0015%, BSA 0,1%

Volumen: 1 x 33 ml

**MS E-5131**    **96**    **Microtiterwells** (Mikrotiterplatte)

Inhalt: 1 brechbare Mikrotiterplatte; Anti-Cortisol-Antikörper an die Mikrotiterplatte gebunden

**MS E-0055**    **SUBSTRATE**    **Substrate Solution** (Substratlösung)

Inhalt: H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>-TMB, 0,26 g/l (vermeiden Sie jeglichen Hautkontakt);

ProClin < 0,0015%

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

**MS E-0030**    **WASH-CONC** **10x**    **Wash Solution** – 10x Konz. (Waschlösung)

Inhalt: Phosphatpuffer 0,2 M pH 7,4;

ProClin > 0,0015%

Volumen: 1 x 50 ml

**4.2 Nicht im Kit enthaltene, aber erforderliche Reagenzien**


- Destilliertes Wasser

**4.3 Erforderliche Hilfsmittel und Messgeräte**

- Automatischer Dispenser
- Präzisionspipetten
- Mikrotiterplatten-Lesegerät (450 nm, 620 – 630 nm)

**5. 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.

-  Das für die Herstellung des Kits verwendete Material tierischen Ursprungs stammt von Tieren, die als gesund zertifiziert wurden und das Rinderprotein wurde aus Ländern gewonnen, die nicht mit BSE infiziert sind, aber diese Materialien sollten als potentiell infektiös behandelt werden.
- Manche Reagenzien (Standards, Kontrollen, Konjugat und Waschlösung) enthalten kleine Mengen an ProClin™ 300 (> 0,0015%, < 0,06%) als Konservierungsmittel. Kontakt mit der Haut oder Schleimhaut vermeiden.

- Einstufung gemäß der Verordnung (EG) Nr. 1272/2008 [CLP]

Skin sens 1



Enthält: ProClin 300

Achtung  
Gefahrenhinweise:

H317 – Kann allergische Hautreaktionen verursachen.

Sicherheitshinweise:

P261 – Einatmen von Staub/Rauch/Gas/Nebel/Dampf/Aerosol vermeiden.

P280 – Schutzhandschuhe/Schutzkleidung/Augenschutz/Gesichtsschutz tragen.

P321 – Besondere Behandlung (siehe Erste Hilfe Anweisungen auf diesem Kennzeichnungsetikett).

P333+P313 – Bei Hautreizung oder -ausschlag: Ärztlichen Rat einholen/ärztliche Hilfe hinzuziehen.

P362+P364 – Kontaminierte Kleidung ausziehen und vor erneutem Tragen waschen.

- 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/H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> keinem direkten Sonnenlicht, Metallen oder Oxidationsmitteln aussetzen. Die Lösung nicht einfrieren.
- Diese Methode ermöglicht die Bestimmung von Cortisol von 0,47 ng/ml (LOD) bis 200 ng/ml.
- Die klinische Aussagekraft der Cortisolbestimmung kann entkräftet werden, wenn der Patient mit Kortikosteroiden oder natürlichen oder synthetischen Steroiden behandelt wurde.

## 6. 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 automatisierte Geräte verwenden, ist der Benutzer dafür verantwortlich, dass das Kit für den vorgesehenen Verwendungszweck entsprechend validiert wurde.
- 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 Waschschrte 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 Kontrollen und/oder vereinigte Urinproben mit untersucht werden.
- Beim Lösen und Pipettieren der Reagenzien ist größte Genauigkeit erforderlich.
- Mikrobiell kontaminierte, stark lipämische, ikterische oder hämolysierte Proben nicht im Test verwenden.
- Mikrotiterplatten-Lesegeräte lesen vertikal ab. Nicht die Unterseite der Wells berühren.
- Beim Pipettieren von Testreagenzien, einschließlich Proben, Standards und Kontrollen, müssen frische Einwegspitzen verwendet werden, um das Risiko einer Verschleppungskontamination zu verringern. Andernfalls kann dies zu ungültigen Ergebnissen führen.

## 7. LAGERUNG UND STABILITÄT DER REAGENZIEN

Lagern Sie das Kit bei 2 – 8 °C im Dunkeln.

- Das Kit ist bei 2 – 8 °C bis zu dem auf dem Etikett angegebenen Verfalldatum haltbar.
- Nach dem Öffnen sind die Standards bei 2 – 8 °C für 6 Monate stabil.
- Nach dem Öffnen ist das Konjugat bei 2 – 8 °C für 6 Monate stabil.
- Die verdünnte Waschlösung ist bei 2 – 8 °C 30 Tage lang stabil.

Wichtiger Hinweis: Den Beutel mit der beschichteten Mikrotiterplatte nur öffnen, wenn er Raumtemperatur angenommen hat und sofort nach Gebrauch verschließen.

## 8. PROBENENTNAHME UND -LAGERUNG

Der Test sollte mit Urinproben durchgeführt werden.

Probenlagerung	Dauer
-20 °C	< 6 Monate

## 9. VERFAHREN

### 9.1 Vorbereitung der Standards und Kontrollen

Vor der Verwendung 5 Minuten lang mit einem rotierenden Mixer mischen.  
Die Standards sind gebrauchsfertig und haben die folgende Konzentration:

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

Die Kontrollen sind gebrauchsfertig; die Konzentrationen sind auf dem Etikett angegeben.

## 9.2 Vorbereitung des Konjugats

Das Konjugat ist gebrauchsfertig. Vorsichtig 5 Minuten lang mit einem Rollmischer mischen.

## 9.3 Vorbereitung der Waschlösung

Den Inhalt des Fläschchens **WASH-CONC 10x** vor dem Gebrauch mit destilliertem Wasser auf ein Endvolumen von 500 ml verdünnen. Bei kleineren Volumina ist das Verdünnungsverhältnis 1:10 einzuhalten.

Es ist möglich, dass in der konzentrierten Waschlösung Kristalle vorhanden sind; in diesem Fall bei Raumtemperatur mischen, bis sich die Kristalle vollständig aufgelöst haben. Für eine größere Genauigkeit die gesamte Flasche mit konzentrierter Waschlösung auf 500 ml verdünnen, wobei darauf zu achten ist, dass die Kristalle durch Ausspülen der Flasche vollständig entfernt werden und dann mischen, bis die Kristalle vollständig aufgelöst sind.

## 9.4 Vorbereitung der Probe

Die Bestimmung von Cortisol kann in humanen Urinproben durchgeführt werden.

Wichtiger Hinweis: Der Testkit ist für die Verwendung mit unbehandelten Urinproben konzipiert; 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. Die gesamte Urinmenge, die während eines 24-Stunden-Tages ausgeschieden wird, sollte in einem einzigen Behälter gesammelt und gemischt werden.

Die Probe ist bei -20 °C zu lagern, wenn die Bestimmung nicht am Tag der Probenahme durchgeführt wird. Vor der Verwendung wird die Probe 5 Minuten lang mit einem Rollmischer vorsichtig gemischt.

## 9.5 Verfahren

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

Nach Beendigung des Tests sind die Reagenzien sofort bei 2 °C – 8 °C zu lagern: eine längere Lagerung bei Raumtemperatur ist zu vermeiden.

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 zwei Wells für jeden Punkt der Standardkurve (Standard A – E), zwei für jede Kontrolle, zwei für jede Probe und eine für den Blank vorzubereiten.

Reagenz	Standard	Probe/Kontrolle	Blank
Standard A – E	10 µl		
Probe/Kontrolle		10 µl	
Konjugat	300 µl	300 µl	
1 Stunde bei +37 °C ± 0,5 °C inkubieren. Den Inhalt aus jedem Well entfernen; die Wells <b>dreimal mit 350 µl</b> verdünnter Waschlösung waschen. <b>Wichtiger Hinweis:</b> Bei jedem Waschschrift die Platte 5 Sekunden lang vorsichtig schütteln und überschüssige Flüssigkeit durch Klopfen der umgedrehten Platte auf ein saugfähiges Papiertuch entfernen. <b>Automatisches Waschgerät:</b> Bei Verwendung eines Waschautomaten die Wells mindestens 6-mal waschen.			
Substratlösung	100 µl	100 µl	100 µl
15 Minuten im Dunkeln bei Raumtemperatur (22 °C – 28 °C) 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.			

## 10. QUALITÄTSKONTROLLE

Die Gute Laborpraxis (GLP) erfordert die Verwendung von Qualitätskontrollproben in jeder Testreihe, um die Leistungsfähigkeit des Tests zu überprüfen. Die Kontrollen sollten wie unbekannte Proben behandelt und die Ergebnisse mit geeigneten statistischen Methoden ausgewertet werden.

Die im Kit enthaltenen Kontrollen sollten als unbekannte Proben getestet werden und dienen dazu, die Gültigkeit der mit jeder Testplatte erzielten Ergebnisse zu beurteilen.

Die mittlere Konzentration jeder Kontrollstufe wird im QC-Bericht dokumentiert, der jedem Kit beiliegt. Diese mittleren Konzentrationen werden über mehrere Assays ermittelt, die an mehreren Stellen auf jeder Platte in Doppelbestimmung durchgeführt werden.

Der Hersteller empfiehlt den Anwendern, grafische Aufzeichnungen der Kontrollwerte zu führen, die bei jedem Assay-Lauf erzeugt werden, einschließlich der laufenden Mittelwerte, SDs und %CVs. Diese Informationen erleichtern die Trendanalyse der Kontrollen in Bezug auf die Leistung der aktuellen und historischen Kontrollchargen im Vergleich zu den gelieferten Qualitätskontrolldaten. Die Trendanalyse hilft bei der Identifizierung von Assays, die Kontrollwerte liefern, die signifikant von ihrem Durchschnittsbereich abweichen. Bei der Interpretation der Kontrolldaten sollten die Benutzer beachten, dass dieses Produkt als manuelles Produkt konzipiert und entwickelt wurde. Der auf dem QC-Report angegebene Bereich sollte für Assays geeignet sein, die manuell und unter strikter Einhaltung des oben beschriebenen Assay-Verfahrens durchgeführt werden. Fachleute für Qualitätskontrolle sind sich darüber im Klaren, dass es aufgrund unterschiedlicher Bedingungen und Praktiken immer zu Schwankungen bei den Mittelwerten und der Präzision der Kontrollmessungen zwischen verschiedenen Laboren kommen wird<sup>6</sup>.

## 11. BERECHNUNG DER ERGEBNISSE

Es gibt eine Reihe von Softwarepaketen zur Datenreduzierung, die zur Erstellung der mittleren Standardkurve und zur Berechnung der mittleren Konzentrationen der unbekannten Proben und Kontrollen verwendet werden können. Eine logistische 4-Parameter-Kurvenanpassung (4PL), einschließlich Standard A, ist erforderlich. Andere Algorithmen zur Kurvenanpassung werden nicht empfohlen.

Alternativ kann eine Standardkurve auf halblogarithmischem Millimeterpapier erstellt werden, indem die mittlere Absorption auf der Y-Achse gegen die Konzentration des Analyten auf der X-Achse aufgetragen wird. Standard A sollte in die Standardkurve aufgenommen werden. Lesen Sie den mittleren Absorptionswert jeder unbekannten Probe an der Kurve ab.

Damit die Testergebnisse als gültig angesehen werden können, müssen die Kit-Standards und die Kontrolle innerhalb der Spezifikationen liegen, die im lotspezifischen Analysenzertifikat angegeben sind.

Liegt eine Kontrolle außerhalb ihres spezifizierten Bereichs, sind die zugehörigen Testergebnisse ungültig und die Proben müssen erneut getestet werden.

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

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

## 12. ERWARTETE WERTE

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

	n	Normalbereich Urin (24 h)
Erwachsene	128	1,5 – 63 $\mu\text{g}/24\text{h}$

## 13. LEISTUNG UND EIGENSCHAFTEN

Es werden repräsentative Leistungsdaten gezeigt. Die in den einzelnen Laboren erzielten Ergebnisse können abweichen.

### 13.1 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.

	Kriterien	Ergebnis (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 5 Wiederholungen von Standard B getestet. Der A.S. wurde durch lineare Regression berechnet.	0,22

### 13.2 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%
PS2	20	112,141	6,6%	12%
PS4	20	64,563	8,1%	12%
CT High	20	50,577	7,3%	11%
PS5	20	25,878	7,6%	10%
PS6	20	9,269	7,6%	11%
CT Low	20	3,438	7,0%	9%

### 13.3 Analytische Spezifität

#### 13.3.1 Störsubstanzen

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 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.

#### 13.3.2 Kreuzreaktivität

Die Kreuzreaktion des Antikörpers, die nach Abraham zu 50% berechnet wurde, ist in der Tabelle aufgeführt:

Reagenz	Kreuzreaktivität
Kortisol	100%
Prednisolon	46,2%
11-Desoxycortisol	4%
Cortison	3,69%
Prednison	3,10%
11 $\alpha$ OH Progesteron	1%
Progesteron	< 0,1%
Aldosteron	< 0,1%
Pregnenolon	< 0,1%
17 $\beta$ -Estradiol	< 0,1%
Estron-3-Sulfat	< 0,1%
Estriol	< 0,1%

Reagenz	Kreuzreaktivität
Testosteron	< 0,1%
Spirolacton	< 0,1%
DHEA	< 0,1%
DHEA-S	< 0,1%
Androstendion	< 0,1%
Androsteron	< 0,1%
DHT	< 0,1%
Danazol	< 0,1%
Cholesterin	< 0,1%
Dexamethason	< 0,1%

### 13.4 Korrelation

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

n	Steigung	Schnittpunkt (ng/ml)	R <sup>2</sup>
137	1,008	-0,5019	0,83

### 14. GRENZEN DES TESTS

- Wie bei jedem diagnostischen Verfahren müssen die Ergebnisse in Verbindung mit dem klinischen Bild des Patienten und anderen dem Arzt vorliegenden Informationen interpretiert werden.
- Die Leistungsmerkmale dieses Tests wurden nicht in einer pädiatrischen Bevölkerungsgruppe ermittelt.

## 15. ABFALLENTSORGUNG

Die Reagenzien müssen in Übereinstimmung mit den örtlichen Vorschriften entsorgt werden. Alle Materialien, die mit Proben und Reagenzien in Berührung gekommen sind, müssen gemäß den Vorschriften des Landes, des Staates und der Gemeinde entsorgt werden.














## 16. 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)
6. Basic QC Practices On-line Course; <http://www.Westgard.com>.

## 17. PRODUKTREKLAMATIONEN UND TECHNISCHE UNTERSTÜTZUNG

Für Patienten/Anwender/Dritte in der Europäischen Union und in Ländern mit ähnlichen Vorschriften (Verordnung 2017/746/EU über IVD-Medizinprodukte): Wenn während der Verwendung dieses Produkts oder als Folge seiner Verwendung ein schwerwiegender Zwischenfall aufgetreten ist, melden Sie dies bitte dem Hersteller und/oder seinem bevollmächtigten Vertreter sowie Ihrer nationalen Aufsichtsbehörde. Der Hersteller kann über seinen Kundendienst oder sein technisches Supportteam kontaktiert werden. Die Kontaktdaten finden Sie auf der Website des Unternehmens.

### Symbole:

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