



DCM001-13  
Ed. 09/2022

# CORTISOL ELISA

per analisi di routine

Determinazione immunoenzimatica diretta di cortisolo nel siero o plasma umano

IVD



LOT

Vedere l'etichetta  
esterna

2°C - 8°C



$\Sigma = 96$  test

REF DKO001

## 1. SCOPO PREVISTO

Per uso diagnostico *in vitro*

Per uso professionale in laboratorio

Cortisol ELISA è un dispositivo diagnostico manuale *in vitro* destinato alla determinazione quantitativa di cortisolo nel siero o nel plasma umano.

## 2. RILEVANZA CLINICA

Il cortisolo è un ormone steroideo glucocorticoide sintetizzato a partire dal colesterolo nella zona fascicolata della corteccia surrenale. I glucocorticoidi sono principalmente ormoni dello stress che regolano diversi processi fisiologici legandosi ai recettori dei glucocorticoidi espressi in tutto l'organismo<sup>1</sup>. I glucocorticoidi endogeni come il cortisolo svolgono un ruolo cruciale nel mantenere l'omeostasi del corpo dopo uno stress fisico o psicologico. Inoltre, il cortisolo è coinvolto nel metabolismo di carboidrati, lipidi e proteine, nel mantenimento della funzione del miocardio<sup>2</sup>, nonché nello sviluppo e nel funzionamento del sistema nervoso centrale, del sistema immunitario e del sistema gastrointestinale<sup>3</sup>.

Circa l'80–90% del cortisolo circola nel plasma legato alla globulina legante il cortisolo (CBG), una  $\alpha_2$ -globulina nota anche come transcortina. Della quantità residua, il 5–15% è legato all'albumina e appena il 5% circola libero. Il cortisolo libero non legato a proteine è quello biologicamente attivo, con livelli più alti di CBG a protezione dalle concentrazioni elevate di cortisolo<sup>2,3</sup>. L'aumento del livello di cortisolo circolante invia un segnale all'ipotalamo e all'ipofisi che porta alla riduzione dei livelli di ACTH e ormone di rilascio della corticotropina in un classico ciclo di feedback negativo<sup>4</sup>. L'asse ipotalamo-ipofisi-surrene (HPA), e quindi il cortisolo, è controllato da tre fattori principali: i livelli di stress, il ciclo di feedback negativo e il ritmo circadiano<sup>2</sup>. La determinazione dei livelli di cortisolo è spesso usata nella valutazione della funzionalità del surrene e di altri disturbi dell'asse HPA. Tali disturbi possono sfociare in una sotto- o sovrapproduzione di glucocorticoidi, meglio noti rispettivamente come malattia di Addison e sindrome di Cushing<sup>3</sup>. La malattia di Addison colpisce la ghiandola surrenale, che non riesce a produrre cortisolo a causa soprattutto di una insufficienza surrenalica primaria, causata in genere da adenoliti autoimmuni. L'insufficienza surrenalica secondaria è dovuta a una

regolazione alterata della ghiandola surrenale da parte dell'asse HPA. Se l'insufficienza surrenalica primaria è diagnosticabile con la misurazione combinata dei livelli mattutini di cortisolo sierico e ACTH plasmatico, l'insufficienza surrenalica secondaria richiede in genere dei test dinamici, come il test di tolleranza all'insulina o il test al metirapone effettuato durante la notte<sup>5-7</sup>. La sindrome di Cushing (CS) è caratterizzata da un vasto quadro di segni e sintomi dovuto all'esposizione prolungata e inappropriata ai glucocorticoidi<sup>8</sup>. La causa più comune è iatrogena dovuta all'assunzione di farmaci contenenti corticosteroidi. La CS endogena può essere causata da una produzione eccessiva di ACTH (80–85% dei casi) o essere indipendente dall'ACTH per una secrezione eccessiva di cortisolo da parte del surrene<sup>9</sup>.

In condizioni fisiologiche normali, l'asse HPA mostra un ritmo circadiano caratteristico, con i livelli più alti di cortisolo al mattino e più bassi alla sera tardi<sup>10,11</sup>. Poiché la secrezione del cortisolo è pulsatile, la valutazione dei livelli in un singolo campione potrebbe non fornire un'adeguata accuratezza diagnostica. L'assenza del normale ritmo diurno è una buona indicazione della presenza di CS<sup>12</sup>. Mentre negli individui sani i livelli nelle ore notturne non sono rilevabili, i pazienti con iperattività del surrene perdono il normale ritmo circadiano e hanno livelli di cortisolo rilevabili a mezzanotte<sup>9</sup>. Il momento della raccolta è pertanto un aspetto importante nella valutazione dei livelli di cortisolo. Inoltre, le concentrazioni dovrebbero essere riferite ai profili di riferimento dell'intervallo normale specifico del dosaggio e ai livelli decisionali clinici.

## 3. PRINCIPIO DEL METODO

Il test Cortisol ELISA è un dosaggio immunometrico enzimatico competitivo (ELISA) in cui il cortisolo (antigene) nel campione compete con il cortisolo antigenico coniugato con perossidasi di rafano (HRP) per il legame al numero limitato di anticorpi anti-cortisolo rivestiti sulla micropiastra (fase solida).

Dopo l'incubazione, la separazione del legato dal libero viene eseguita con un semplice lavaggio della fase solida. Quindi, l'enzima HRP nella parte libera reagisce con il substrato ( $H_2O_2$ ) e il substrato TMB e sviluppa un colore blu che cambia in giallo quando viene aggiunta la soluzione di arresto ( $H_2SO_4$ ). L'intensità del colore è inversamente proporzionale alla concentrazione di cortisolo nel campione.

La concentrazione di cortisolo nel campione viene calcolata attraverso una curva di calibrazione.

#### 4. REAGENTI, MATERIALI E STRUMENTAZIONE

##### 4.1. Reagenti e materiali forniti nel kit

###### 1. Calibratori (5 fiale, 1 mL ciascuna)

CAL0	REF DCE002/0106-0
CAL1	REF DCE002/0107-0
CAL2	REF DCE002/0108-0
CAL3	REF DCE002/0109-0
CAL4	REF DCE002/0110-0

###### 2. Controllo (1 fiala, 1 mL)

La concentrazione del controllo è indicata sul Certificato di analisi

REF DCE045/0103-0

###### 3. Coniugato (1 fiala, 21 mL)

Cortisolo coniugato con perossidasi di rafano (HRP)

REF DCE002/0102-0

###### 4. Micropiastra rivestita (1 micropiastra frangibile)

Micropiastra rivestita con anticorpi anti-cortisolo

REF DCE002/0103-0

###### 5. Substrato TMB (1 fiala, 15 mL)

H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>-TMB 0,26 g/L (evitare qualsiasi contatto con la pelle)

REF DCE004-0

###### 6. Soluzione di arresto (1 fiala, 15 mL)

Acido solforico 0,15 mol/L (evitare qualsiasi contatto con la pelle)

REF DCE005-0

###### 7. Soluzione di lavaggio conc. 10X (1 fiala, 50 mL)

Tampone fosfato 0,2 M, pH 7,4

REF DCE054-0

##### 4.2. Materiali richiesti ma non forniti

Acqua distillata

##### 4.3. Materiali e strumentazione ausiliari

Erogatore automatico

Pipette di precisione

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

##### 5. AVVERTENZE

- Questo kit è destinato all'uso *in vitro* esclusivamente da parte di professionisti. Non per uso interno o esterno in esseri umani o animali.
- Utilizzare adeguati dispositivi di protezione individuale mentre si lavora con i reagenti forniti.
- Seguire le buone prassi di laboratorio (GLP, Good Laboratory Practice) per la manipolazione di emoderivati.
- Il materiale di origine animale utilizzato nella preparazione del kit è stato ottenuto da animali certificati come sani e la proteina bovina è stata ottenuta da Paesi non infettati dalla BSE, ma tali materiali devono essere trattati come potenzialmente infettivi.
- Alcuni reagenti contengono piccole quantità di ProClin™ 300 come conservante. Evitare il contatto con pelle o mucose.

##### Classificazione CLP

Sens. cutanea 1

##### Indicazioni di pericolo

H317: può provocare una reazione allergica cutanea.

##### Indicazioni di precauzione

P261: evitare di respirare la polvere/i fumi/i gas/la nebbia/i vapori/gli aerosol.

P272: gli indumenti da lavoro contaminati non devono essere portati fuori dal luogo di lavoro.

P280: indossare guanti/indumenti protettivi/proteggere gli occhi/proteggere il viso.

P302/352 IN CASO DI CONTATTO CON LA PELLE: lavare con abbondante acqua/sapone e acqua.

P321: trattamento specifico (vedere istruzioni su questa etichetta)

P333/313: in caso di irritazione o eruzione cutanea: consultare un medico.

- Il substrato TMB contiene un irritante, che può essere dannoso se inalato, ingerito o assorbito per via cutanea. Per prevenire lesioni, evitare l'inalazione, l'ingestione o il contatto con pelle e occhi.
- La soluzione di arresto consiste in una soluzione diluita di acido solforico. L'acido solforico è velenoso e corrosivo e può essere tossico se ingerito. Per prevenire ustioni chimiche, evitare il contatto con pelle e occhi.
- Evitare l'esposizione del reagente TMB/H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> a luce solare diretta, metalli o ossidanti. Non congelare la soluzione.

##### 6. PRECAUZIONI

- Attenersi rigorosamente alla sequenza dei passaggi di pipettaggio forniti in questo protocollo. I dati sulle prestazioni qui rappresentati sono stati ottenuti utilizzando i reagenti specifici elencati in queste istruzioni per l'uso.
- Tutti i reagenti devono essere conservati refrigerati a 2-8 °C nel contenitore originale. Tutte le eccezioni sono chiaramente indicate.
- Lasciare che tutti i componenti del kit e i campioni raggiungano la temperatura ambiente (22-28 °C) e mescolare bene prima dell'uso.
- Non scambiare i componenti di kit di lotti diversi. La data di scadenza stampata sulle etichette della confezione e delle fiale deve essere rispettata. Non utilizzare alcun componente del kit dopo la data di scadenza.
- Se si utilizzano apparecchiature automatizzate, l'utente ha la responsabilità di assicurarsi che il kit sia stato adeguatamente testato.
- La rimozione incompleta o imprecisa del liquido dai pozzetti potrebbe influenzare la precisione del dosaggio e/o aumentare il background. Per migliorare le prestazioni del kit sui sistemi automatici, si raccomanda di aumentare il numero di lavaggi.
- È importante che il tempo di reazione in ogni pozzetto sia mantenuto costante per ottenere risultati riproducibili. Il pipettaggio dei campioni non deve andare oltre i dieci minuti per evitare deviazioni del dosaggio. Se sono necessari più di 10 minuti, seguire lo stesso ordine di erogazione. Se si utilizza più di una piastra, si raccomanda di ripetere la curva dose-risposta in ogni piastra.
- L'aggiunta della soluzione di substrato TMB avvia una reazione cinetica, che viene terminata dall'aggiunta della soluzione di arresto. Pertanto, il substrato TMB e la soluzione di arresto devono essere aggiunti nella stessa sequenza per eliminare qualsiasi deviazione temporale durante la reazione.

- Osservare le linee guida per l'esecuzione del controllo di qualità nei laboratori medici analizzando i controlli e/o i sieri in pool.
- La massima precisione è richiesta per la ricostituzione e l'erogazione dei reagenti.
- I campioni microbiologicamente contaminati, altamente lipemici o emolizzati non devono essere utilizzati nel dosaggio.
- I lettori di piastre misurano verticalmente. Non toccare il fondo dei pozzetti.

## 7. CONSERVAZIONE E STABILITÀ DEI REAGENTI

Conservare il kit a 2-8 °C, al buio.

- Il kit è stabile a 2-8 °C fino alla data di scadenza indicata sull'etichetta esterna del kit.
- Una volta aperto, il kit è stabile a 2-8 °C per 5 mesi.
- La soluzione di lavaggio diluita è stabile per 30 giorni a 2-8 °C.

Nota importante: aprire il sacchetto contenente la micropiastra rivestita solo quando è a temperatura ambiente e chiuderlo immediatamente dopo l'uso.

## 8. RACCOLTA E CONSERVAZIONE DEI CAMPIONI

Il dosaggio deve essere effettuato su campioni di siero (provette di campionamento standard o provette contenenti gel per la separazione del siero) o plasma (litio eparina, sodio eparina, EDTA di potassio).

Conservazione dei campioni	Durata
2-8 °C	96 ore
Cicli di congelamento/scongelo	3 cicli

## 9. PROCEDURA

### 9.1. Preparazione di calibratori e controlli

I calibratori sono pronti per l'uso e hanno la seguente concentrazione di cortisolo:

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

Il calibratore è pronto per l'uso; la concentrazione del calibratore è stampata sull'etichetta.

Il controllo è pronto per l'uso.

### 9.2. Preparazione del coniugato

Il coniugato è pronto per l'uso. Miscelare delicatamente per 5 minuti in un mixer a rotazione.

### 9.3. Preparazione della soluzione di lavaggio

Diluire il contenuto della fiala "Soluzione di lavaggio conc. 10X" con acqua distillata fino a un volume finale di 500 mL prima dell'uso. Per i volumi più piccoli, rispettare il rapporto di diluizione 1:10.

È possibile osservare la presenza di cristalli all'interno della soluzione di lavaggio concentrata; in tal caso, mescolare a temperatura ambiente fino alla completa dissoluzione dei cristalli. Per una maggiore precisione, diluire l'intero flacone di soluzione di lavaggio concentrata a 500 mL, avendo cura

anche di trasferire completamente i cristalli sciocquando il flacone, quindi mescolare fino a quando i cristalli non si dissolvono completamente.

### 9.4. Preparazione dei campioni

Conservare il campione a -20 °C se la determinazione non viene eseguita lo stesso giorno della raccolta del campione. Evitare di congelare e scongelare ripetutamente i campioni.

### 9.5. Procedura

- **Lasciare che tutti i reagenti raggiungano la temperatura ambiente (22-28 °C) per almeno 30 minuti.** Alla fine del dosaggio, conservare immediatamente i reagenti a 2-8 °C: evitare una lunga esposizione a temperatura ambiente.
- Le strisce di micropozzetti rivestiti non utilizzate devono essere rilasciate in modo sicuro nella busta di alluminio contenente l'essiccante e conservate a 2-8 °C.
- Per evitare potenziali contaminazioni microbiche e/o chimiche, i reagenti inutilizzati non devono mai essere trasferiti nelle fiale originali.
- Poiché è necessario eseguire la determinazione in duplicato per migliorare la precisione dei risultati della prova, preparare due pozzetti per ogni punto della curva di calibrazione (C<sub>0</sub>-C<sub>5</sub>), due per ogni controllo, due per ogni campione, uno per il bianco.

Reagente	Calibratore	Campione/Controllo	Bianco
Calibratore C <sub>0</sub> -C <sub>4</sub>	20 µL		
Campione/Controllo		20 µL	
Coniugato	200 µL	200 µL	

Incubare 1 ora a 37 °C.

Rimuovere il contenuto da ogni pozzetto. Lavare i pozzetti 3 volte con 300 µL di soluzione di lavaggio diluita.

**Nota importante:** durante ogni fase di lavaggio, agitare delicatamente la piastra per 5 secondi e rimuovere la soluzione in eccesso picchiando la piastra capovolta su un tovagliolo di carta assorbente.

**Lavatore automatico:** se si utilizza un lavatore automatico, si consiglia di eseguire 6 fasi di lavaggio.

Substrato TMB	100 µL	100 µL	100 µL
Soluzione di arresto	100 µL	100 µL	100 µL

Incubare per 15 minuti, al buio, a temperatura ambiente (22÷28 °C).

Agitare delicatamente la micropiastra.

Leggere l'assorbanza (E) a 450 nm contro una lunghezza d'onda di riferimento di 620-630 nm o contro il bianco entro 5 minuti.

## 10. CONTROLLO QUALITÀ

Le buone prassi di laboratorio (GLP) richiedono l'inclusione di campioni per il controllo della qualità in ogni serie di dosaggi al fine di verificare le prestazioni del dosaggio. I controlli devono essere trattati come campioni sconosciuti e

i risultati devono essere analizzati con metodi statistici appropriati.

I controlli forniti nel kit devono essere testati come se fossero sconosciuti e hanno lo scopo di agevolare la valutazione della validità dei risultati ottenuti in ogni piastra di dosaggio.

La concentrazione media di ciascun livello di controllo è documentata nel rapporto del controllo di qualità incluso in ciascun kit. Tali livelli di concentrazione media sono determinati in base a diversi dosaggi eseguiti in duplicato in più posizioni su ciascuna piastra.

DiaMetra raccomanda agli utenti di conservare le annotazioni grafiche dei valori di controllo generati con ciascun dosaggio, tra cui medie mobili, DS e % CV. Queste informazioni faciliteranno l'analisi delle tendenze dei controlli per quanto riguarda le prestazioni dei lotti di controllo attuali e pregressi rispetto ai dati forniti nel controllo di qualità. Le tendenze aiuteranno a identificare i dosaggi che generano valori di controllo significativamente diversi dal rispettivo intervallo medio.

Quando si interpretano i dati dei controlli, occorre tenere conto del fatto che il prodotto è stato progettato e sviluppato come prodotto per l'utilizzo manuale. L'intervallo riportato sul certificato del controllo di qualità deve essere appropriato per i dosaggi eseguiti manualmente e rispettando rigorosamente la procedura di dosaggio descritta sopra. Gli esperti del controllo di qualità riconoscono che, a causa delle differenze di condizioni e di prassi, si avrà sempre una variabilità nei valori medi e nella precisione delle misurazioni dei controlli eseguite da laboratori diversi<sup>13</sup>.

## 11. CALCOLO DEI RISULTATI

Sono disponibili vari pacchetti software di elaborazione dei dati, che possono essere utilizzati per generare la curva di calibrazione media e per calcolare le concentrazioni medie di campioni e controlli sconosciuti. È necessario un adattamento della curva logistica a 4 parametri (4PL) **che includa il calibratore 0**.

In alternativa, è possibile preparare una curva di calibrazione su carta millimetrata semilogaritmica tracciando un grafico con l'assorbanza media sull'asse delle ordinate e la concentrazione dell'analita sull'asse delle ascisse. Nella curva di calibrazione deve essere incluso il calibratore 0. Leggere il valore medio dell'assorbanza di ciascun campione sconosciuto dalla curva.

### Conversione delle unità

Per convertire i risultati in unità SI:  
 $\text{nmol/L} = \text{ng/mL} \times 2,7586$

Per convertire i risultati in unità di massa:  
 $\text{ng/mL} = \text{nmol/L} \times 0,3625$

## 12. INTERVALLO DI MISURAZIONE

L'intervallo di misurazione del dosaggio (AMR) è 7,16-500 ng/mL (19,75-1379,3 nmol/L).

Tutti i valori inferiori a 7,16 ng/mL (19,75 nmol/L) devono essere refertati come "< 7,16 ng/mL (19,75 nmol/L)". Tutti i valori superiori a 500 ng/mL (1379,3 nmol/L) devono essere refertati come "> 500 ng/mL (1379,3 nmol/L)".

## 13. METROLOGIA E TRACCIABILITÀ

I calibratori di questo kit sono tracciabili a un dosaggio commerciale di cortisolo che a sua volta è tracciabile al pannello del siero di riferimento del cortisolo [ERM DA541\_IFCC].

## 14. VALORI ATTESI

I seguenti intervalli sono stati determinati utilizzando il test Cortisol ELISA e sono forniti unicamente a scopo informativo. Il 95% degli intervalli di riferimento per adulti apparentemente sani è stato calcolato attraverso un metodo non parametrico secondo le linee guida tratte dal documento CLSI C28-A3 "Defining, Establishing and Verifying Reference Intervals in the Clinical Laboratory".

	Mattina Dalle 6 alle 10	Sera Dalle 16 alle 20
N. di soggetti	41	51
Media (ng/mL)	108,41	66,81
SD (ng/mL)	42,16	25,06
Mediana (ng/mL)	112,64	61,95
Intervallo di riferimento (ng/mL)	47,1 - 187	31,4 - 114,2

Gli intervalli sopraindicati devono essere considerati solo come linee guida; si raccomanda a ogni laboratorio di stabilire i propri intervalli di valori attesi sulla base della propria popolazione di pazienti.

## 15. CARATTERISTICHE DI AZIONE

Sono mostrati i dati più rappresentativi delle prestazioni. I risultati ottenuti nei singoli laboratori possono variare.

### 15.1. Capacità di rilevamento

Il limite del bianco (LoB), il limite di rilevamento (LoD) e il limite della determinazione quantitativa (LoQ) sono stati definiti basandosi sulla procedura CLSI EP17-A, "Protocols for Determination of Limits of Detection and Limits of Quantitation" utilizzando 6 bianchi e 6 campioni a basso livello.

Sensibilità	Concentrazione
Limite del bianco (LoB)	3,47 ng/mL
Limite di rilevamento (LoD)	5,79 ng/mL
Limite della determinazione quantitativa (LoQ)	7,16 ng/mL

## 15.2. Esattezza

L'esattezza è stata dimostrata confrontando il test Cortisol ELISA con un test del cortisolo disponibile in commercio, a sua volta tracciabile all'ID GC-MS, con un totale di 34 campioni di siero nativo di singoli donatori.

n	Pendenza [IC 95%]	Intercetta (ng/mL) [IC 95%]	Coefficiente di correlazione (r)
34	1,03 [0,98 – 1,10]	-0,13 [-0,62 – 0,36]	0,99

## 15.3. Precisione

La precisione del test Cortisol ELISA è stata determinata eseguendo un complesso studio di precisione.

**Ripetibilità:** un totale di 5 campioni di siero è stato analizzato in 5 repliche, una volta al giorno per 5 giorni da 3 operatori.

I dati di un lotto rappresentativo sono mostrati di seguito:

Campione	n	Conc. media (ng/mL)	Intra-test (ripetibilità)	
			DS	% CV
1	75	38,38	3,43	8,9%
2	75	88,34	3,92	4,4%
3	75	156,08	13,08	8,4%
4	75	257,48	21,89	8,5%
5	75	379,41	31,18	8,4%
6	75	393,23	37,78	9,5%

**Riproducibilità:** un totale di 5 campioni di siero è stato analizzato in 5 repliche, una volta al giorno per 5 giorni da 3 operatori. I risultati per i dati combinati di due lotti sono mostrati di seguito:

Campione	n	Conc. media (ng/mL)	All'interno del laboratorio (riproducibilità)	
			DS	% CV
1	150	37,93	4,63	12,2%
2	150	88,06	7,06	8,0%
3	150	156,98	18,26	11,6%
4	150	261,15	33,44	12,8%
5	150	385,80	52,37	13,6%
6	150	400,14	56,95	14,2%

## 15.4. Linearità

La linearità è stata valutata secondo le linee guida basate su CLSI EP-06, "Evaluation of the Linearity of Quantitative Measurement Procedures". Per la concentrazione di cortisolo mediante il test Cortisol ELISA, la procedura di misurazione mostra linearità per l'intervallo da 7,16 a 500 ng/mL (da 19,75 a 1379,3 nmol/L) entro la deviazione ammissibile di linearità (ADL) di  $\pm 15\%$ .

## 15.5. Confronto del metodo

Il test Cortisol ELISA è stato confrontato con un dosaggio automatico quantitativo disponibile in commercio, in base al documento CLSI EP-9A, "Method Comparison and Bias Estimation Using Patient Samples". Ogni metodo ha esaminato un totale di 100 campioni, selezionati per rappresentare un ampio intervallo di concentrazioni di cortisolo. L'analisi di regressione di Passing-Bablok è stata effettuata sui dati comparativi:

n	Pendenza [IC 95%]	Intercetta (ng/mL) [IC 95%]	Coefficiente di correlazione (r)
100	1,06 [1,01 – 1,10]	-4,33 [-8,33 – 0,44]	0,98

## 15.6. Specificità analitica

La specificità è stata valutata con i seguenti reagenti crociati.

Reagente crociato	Concentrazione testata (unità)	Reattività crociata media %
Prednisolone	200 ng/mL	79%
11-deossicortisolo	100 ng/mL	67%
21-deossicortisolo	1000 ng/mL	14%
Cortisone	1000 ng/mL	14%
Corticosterone	1000 ng/mL	11%
6- $\beta$ -idrossicortisolo	1000 ng/mL	3%
17 $\alpha$ -OH progesterone	10.000 ng/mL	2%
11-deossicorticosterone	10.000 ng/mL	1%
Aldosterone	10.000 ng/mL	1%
Desametasone	10.000 ng/mL	1%
Prednisone	10.000 ng/mL	3%
Progesterone	10.000 ng/mL	1%

Le seguenti sostanze non interferiscono con un bias  $> \pm 15\%$  nel dosaggio Cortisol ELISA quando le concentrazioni sono inferiori alla soglia dichiarata presentata nella tabella seguente.

Reagente potenzialmente interferente	Concentrazione di soglia
Bilirubina, coniugata	40 mg/dL
Bilirubina, non coniugata	40 mg/dL
Emoglobina	200 mg/dL
Proteine totali	15 g/dL
Trigliceridi	1500 mg/dL

### 15.7. Studio su siero-plasma

È stato condotto uno studio di confronto tra matrici del test Cortisol ELISA per valutare la differenza tra i tipi di provette (provette per la separazione del siero (SST), per plasma in litio eparina, per plasma in sodio eparina e plasma in K2 EDTA) rispetto ai campioni di controllo (siero tappo rosso, senza additivo) secondo le linee guida CLSI EP9-A3. È stato valutato un totale di 20 campioni (16 nativi, 4 additivati) per coprire l'intervallo del test. L'analisi di regressione di Passing-Bablok è stata effettuata sui dati comparativi:

Tipo di campione	Pendenza [IC 95%]	Intercetta (ng/mL) [IC 95%]	Coefficiente di correlazione (r)
SST	0,96 [0,91 – 1,04]	2,72 [-2,38 – 9,67]	1,0
Litio eparina	1,03 [0,91 – 1,18]	-2,87 [-13,10 – 5,81]	0,99
Sodio eparina	0,99 [0,90 – 1,20]	0,14 [-13,69 – 10,67]	0,99
EDTA	1,00 [0,90 – 1,06]	-1,08 [-5,44 – 6,58]	0,99

### 15.8. Recupero della diluizione

Per i campioni che superano l'intervallo di misurazione analitica (500 ng/mL), è stato eseguito uno studio di recupero della diluizione. Un totale di 5 campioni è stato preparato aggiungendo una soluzione madre ad alta concentrazione. I campioni sono stati poi diluiti ed eseguiti in duplicato con il test Cortisol ELISA.

I campioni con concentrazioni di analita superiori a 500 ng/mL possono essere diluiti 1:4 con il calibratore 0. Il risultato del test deve quindi essere corretto applicando il fattore di diluizione appropriato.

### 16. LIMITAZIONI D'USO

- Come nel caso di qualsiasi procedura diagnostica, i risultati devono essere interpretati unitamente ai dati clinici del paziente e alle altre informazioni a disposizione del medico.
- Non sono state stabilite le caratteristiche di azione di questo dosaggio nella popolazione pediatrica.
- Gli anticorpi eterofili nel siero umano possono reagire con le immunoglobuline dei reagenti, interferendo con gli immunodosaggi *in vitro*<sup>14</sup>. I pazienti regolarmente esposti agli animali o a prodotti derivati da siero animale possono essere soggetti a questa interferenza, quindi si potrebbero osservare valori anomali.

### 17. GESTIONE DEI RIFIUTI

I reagenti devono essere smaltiti in conformità alle normative locali.

### 18. BIBLIOGRAFIA

1. Ramamoorthy, S. & Cidlowski, J. A. Corticosteroids: Mechanisms of Action in Health and Disease. *Rheumatic diseases clinics of North America* 42, 15-31, doi:10.1016/j.rdc.2015.08.002 (2016).
2. Wild, D. *The immunoassay handbook*. (Elsevier, 2005).
3. Cain, D.W. & Cidlowski, J. A. Specificity and sensitivity of glucocorticoid signaling in health and disease. *Best practice & research. Clinical endocrinology & metabolism* 29, 545-556, 2015.04.007 (2015).
4. Schacke, H., Docke, W. D. & Asadullah, K. Mechanisms involved in the side effects of glucocorticoids. *Pharmacology & therapeutics* 96, 23-43 (2002).
5. Charmandari, E., Nicolaides, N. C. & Chrousos, G. P. Adrenal insufficiency *Lancet* 383, 2152-2167, (13)61684-0 (2014).
6. Bancos, I., Hahner, S., Tomlinson, J. & Arlt, W. Diagnosis and management of adrenal insufficiency. *The lancet. Diabetes & endocrinology* 3, 216-226, (14)70142-1 (2015).
7. Arlt, W. & Allolio, B. Adrenal insufficiency. *Lancet* 361, 1881-1893, (03)13492-7 (2003).
8. Lacroix, A., Feelders, R. A., Stratakis, C. A. & Nieman, L. K. Cushing's syndrome. *Lancet* 386, 913-927, (14)61375-1 (2015).
9. Arnaldi, G. et al. Diagnosis and complications of Cushing's syndrome: a consensus statement. *The Journal of clinical endocrinology and metabolism* 88, 5593-5602 (2003).
10. Yaneva, M. et al. Midnight salivary cortisol for the initial diagnosis of Cushing's syndrome of various causes. *The Journal of clinical endocrinology and metabolism* 89, 3345-3351, (2004).
11. Krieger, D. T., Allen, W., Rizzo, F. & Krieger, H. P. Characterization of the normal temporal pattern of plasma corticosteroid levels. *The Journal of clinical endocrinology and metabolism* 32, 266-284, (1971).
12. Ceccato, F. et al. Performance of salivary cortisol in the diagnosis of Cushing's syndrome, adrenal incidentaloma, and adrenal insufficiency. *European journal of endocrinology / European Federation of Endocrine Societies* 169, 31-36, (2013).
13. Basic QC Practices On-line Course; <http://www.Westgard.com>.
14. Boscato, LM. and Stuart, MC., 'Heterophilic antibodies: a problem for all immunoassays'. *Clin Chem*, 34, 1988, pp 27-33

### 19. IDENTIFICATORE DELLE REVISIONI

Le aggiunte o le modifiche alle istruzioni per l'uso sono indicate dall'evidenziazione in grigio.

## 20. RECLAMI SUI PRODOTTI E SUPPORTO TECNICO

Per un paziente/utente/terza parte nell'Unione Europea e nei Paesi con un regime normativo simile (Regolamento 2017/746/UE relativo ai dispositivi medico-diagnostici *in vitro*); se, durante l'uso di questo dispositivo o come risultato del suo utilizzo, si è verificato un incidente grave, segnalarlo al produttore e/o al suo rappresentante autorizzato e all'autorità normativa nazionale.

Il produttore può essere contattato tramite il relativo servizio clienti o il team di supporto tecnico. I dettagli di contatto sono disponibili di seguito e sul sito Web dell'azienda: [www.diametra.com](http://www.diametra.com).

Ed. 09/2022

DCM001-13

### Produttore legale

Dia.Metra Srl  
Via Pozzuolo 14  
06038 SPELLO (PG) Italy  
Tel. +39-0742-24851  
Fax +39-0742-316197

Example Version



DCM001-13  
Ed. 09/2022

# CORTISOL ELISA

for routine analysis

Direct immunoenzymatic determination of Cortisol in human serum or plasma

IVD



LOT

See external label

2°C 8°C



Σ = 96 tests

REF DKO001

## 1. INTENDED PURPOSE

For *In Vitro* Diagnostic Use

For Laboratory Professional Use

Cortisol ELISA is a manual in vitro diagnostic device intended for the quantitative determination of cortisol in human serum or plasma.

## 2. CLINICAL SIGNIFICANCE

Cortisol is a glucocorticoid steroid hormone synthesised from cholesterol in the zona fasciculata of the adrenal cortex. Glucocorticoids are predominantly stress hormones that regulate a variety of physiological processes by binding to glucocorticoid receptors expressed throughout the body<sup>1</sup>. Endogenous glucocorticoids like cortisol play a crucial role in establishing the body's homeostasis after physical or psychological stress. Additionally, cortisol plays a role in the metabolism of carbohydrates, fat and protein, the maintenance of myocardial function<sup>2</sup> and is involved in the development and function of the central nervous system, the immune system and the gastrointestinal system<sup>3</sup>.

Approximately 80-90% of cortisol in plasma is protein-bound to an  $\alpha$ 2-globulin, cortisol-binding-globulin (CBG), also known as transcortin. The remaining 5 to 15% is bound to albumin, with only 5% in a free form. The non-protein bound free cortisol is the biologically active hormone, with higher levels of CBG protecting against high cortisol concentrations<sup>2,3</sup>. Increased levels of cortisol in the circulation feedback to the hypothalamus and pituitary gland, decreasing the levels of ACTH and corticotropin-releasing hormone in a classic negative feedback loop<sup>4</sup>. The hypothalamic-pituitary-adrenal axis (HPA) and consequently cortisol, is under the control of three major factors including stress levels, the negative feedback loop and a circadian rhythm<sup>2</sup>. Cortisol determinations are frequently used in the assessment of adrenocortical function and other disturbances of the hypothalamic-pituitary-adrenal axis. These disturbances can result in under- or over- production of glucocorticoids, most commonly referred to as Addison's disease and Cushing's syndrome respectively<sup>3</sup>. Addison's disease is a failure of the adrenal gland to produce cortisol due to a primary adrenal insufficiency, most frequently caused by autoimmune adrenalitis. Secondary adrenal insufficiency is due to an impaired regulation of the adrenal gland by the HPA axis. Whereas patients with primary

adrenal insufficiency can be diagnosed based on a combined measurement of early morning serum cortisol and plasma ACTH levels, secondary adrenal insufficiency most commonly requires dynamic testing such as the insulin tolerance test or the overnight metyrapone test<sup>5-7</sup>. Cushing's syndrome (CS) is defined as a large group of signs and symptoms to prolonged and inappropriately high exposure to glucocorticoids<sup>8</sup>. The most common cause is iatrogenic due to use of prescribed corticosteroids. Endogenous CS may be caused by excess ACTH production (80-85% of cases) or ACTH-independent due to excess secretion of cortisol by the adrenal gland<sup>9</sup>.

Under normal physiological conditions, the HPA axis has a characteristic circadian rhythm with highest cortisol levels found in the morning, reaching a nadir in the late evening<sup>10,11</sup>. As cortisol secretion is pulsatile, assessment of levels in a single sample may not provide adequate diagnostic accuracy. Absence of the normal diurnal rhythm is a good indication of the presence of CS<sup>12</sup>. Whereas in healthy individuals late night levels are undetectable, patients with increased function of the adrenal lose the normal circadian rhythm and have detectable levels of cortisol at midnight<sup>9</sup>. The time of collection is therefore an important consideration in the assessment of cortisol levels. Additionally, concentrations should be referred to assay-specific normal reference range profiles and clinical cut-off levels.

## 3. PRINCIPLE OF THE METHOD

The Cortisol ELISA is a competitive enzyme immunometric 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 calibration curve.



## 4. REAGENTS, MATERIALS AND INSTRUMENTATION

### 4.1. Reagents and materials supplied in the kit

#### 1. Calibrators (5 vials, 1 mL each)

CAL0	<b>REF</b> DCE002/0106-0
CAL1	<b>REF</b> DCE002/0107-0
CAL2	<b>REF</b> DCE002/0108-0
CAL3	<b>REF</b> DCE002/0109-0
CAL4	<b>REF</b> DCE002/0110-0

#### 2. Control (1 vial, 1 mL)

See Control concentration on the Certificate of Analysis  
**REF** DCE045/0103-0

#### 3. Conjugate (1 vial, 21 mL)

Cortisol conjugated with Horseradish peroxidase (HRP)  
**REF** DCE002/0102-0

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

Microplate coated with anti-Cortisol antibodies  
**REF** DCE002/0103-0

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

H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>-TMB 0.26 g/L (*avoid any skin contact*)  
**REF** DCE004-0

#### 6. Stop Solution (1 vial, 15 mL)

Sulphuric acid 0.15 mol/L (*avoid any skin contact*)  
**REF** DCE005-0

#### 7. 10X Conc. Wash Solution (1 vial, 50 mL)

Phosphate buffer 0.2M pH 7.4 **REF** DCE054-0

### 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.
- Follow Good Laboratory Practice (GLP) for handling blood products.
- Material of animal origin used in the preparation of the kit has been obtained from animals certified as healthy and the bovine protein has been obtained from countries not infected by BSE, but these materials should be handled as potentially infectious.
- Some reagents contain small amounts of ProClin™ 300 as preservative. Avoid contact with skin or mucosa.  
Classification under CLP  
Skin Sens. 1

#### Hazard statements

H317: May cause an allergic skin reaction

#### Precautionary statements

P261: Avoid breathing dust / fumes / gas / mist / vapours / spray.

P272: Contaminated work clothing should not be allowed out of the workplace.

P280: Wear protective gloves / protective clothing / eye protection / face protection.

P302/352 IF ON SKIN: Wash with plenty of water / soap and water.

P321: Specific treatment (see instructions on the label)  
P333/313: If skin irritation or rash occurs: get medical attention.

- The TMB Substrate contains an irritant, which 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, corrosive and can be toxic if ingested. To prevent chemical burns, avoid contact with skin and eyes.
- Avoid the exposure of reagent TMB/H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> to direct sunlight, metals or oxidants. Do not freeze the solution.

## 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 2-8°C in their original container. Any exceptions are clearly indicated.
- Allow all kit components and specimens to reach room temperature (22-28°C) and mix well prior to use.
- Do not interchange kit components from different lots. The expiry date printed on box and vials labels must be observed. Do not use any kit component beyond their expiry date.
- If you use automated equipment, the user has the responsibility to make sure that the kit has been appropriately tested.
- The incomplete or inaccurate liquid removal from the wells could influence the assay precision and/or increase the background. To improve the performance of the kit on automatic systems is recommended to increase the number of washes.
- It is important that the time of reaction in each well is held constant for reproducible results. Pipetting of samples should not extend beyond ten minutes to avoid assay drift. If more than 10 minutes are needed, follow the same order of dispensation. If more than one plate is used, it is recommended to repeat the dose response curve in each plate
- Addition of the TMB Substrate solution initiates a kinetic reaction, which is terminated by the addition of the Stop Solution. Therefore, the TMB Substrate and the Stop Solution should be added in the same sequence to eliminate any time deviation during the reaction.
- Observe the guidelines for performing quality control in medical laboratories by assaying controls and/or pooled sera.
- Maximum precision is required for reconstitution and dispensation of the reagents.
- Samples microbiologically contaminated, highly lipemic or haemolysed should not be used in the assay.
- Plate readers measure vertically. Do not touch the bottom of the wells.

## 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 kit is stable at 2 – 8°C for 5 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 serum (standard sampling tubes or tubes containing serum separating gel) or plasma (lithium heparin, sodium heparin, potassium EDTA) samples.

Sample Storage	Duration
2 – 8 °C	96 hours
Freeze/thaw cycles	3 cycles

## 9. PROCEDURE

### 9.1. Preparation of Calibrators and Controls

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

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

The calibrator is ready to use; the concentration of the Calibrator is printed on the label.

The Control is ready for use.

### 9.2. Preparation of the Conjugate

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

### 9.3. Preparation of the Wash Solution

Dilute the content of the vial "10X Conc. Wash Solution" with distilled water to a final volume of 500 mL prior to use. For smaller volumes respect the 1:10 dilution ratio.

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 Samples

Store the sample at -20°C if the determination is not performed on the same day of the sample collection. Avoid repetitive freezing and thawing of samples.

### 9.5. Procedure

- **Allow all reagents to reach room temperature (22-28°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 2-8°C.
- To avoid potential microbial and/or chemical contamination, unused reagents should never be transferred into the original vials.
- As it is necessary to perform the determination in duplicate in order to improve accuracy of the test results, prepare two wells for each point of the calibration curve (C<sub>0</sub>-C<sub>5</sub>), two for each Control, two for each sample, one for Blank.

Reagent	Calibrator	Sample/Control	Blank
Calibrator C <sub>0</sub> -C <sub>4</sub>	20 µL		
Sample/Control		20 µL	
Conjugate	200 µL	200 µL	

Incubate 1 hour at 37°C.

Remove the contents from each well. Wash the wells 3 times with 300 µL of diluted wash solution.

**Important note:** during each washing step, gently shake the plate for 5 seconds and remove excess solution by tapping the inverted plate on an absorbent paper towel.

**Automatic washer:** in case you use an automatic washer, it is advised to do 6 washing steps.

TMB Substrate	100 µL	100 µL	100 µL
Stop Solution	100 µL	100 µL	100 µL

Incubate 15 minutes in the dark at room temperature (22±28°C).

Shake the microplate gently.

Read the absorbance (E) at 450 nm against a reference wavelength of 620-630 nm or against Blank within 5 minutes.

## 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 control provided in the kit should be tested as unknown 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.

DiaMetra 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>13</sup>.

### 11. CALCULATION OF RESULTS

A variety of data reduction software packages are available, which may be employed to generate the mean calibration curve and to calculate the mean concentrations of unknown samples and controls. A 4-parameter logistic (4PL) curve fit, including Calibrator 0 is required.

Alternatively, a calibration 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. Calibrator 0 should be included in the calibration curve. Read the mean absorbance value of each unknown sample off the curve.

#### Conversion of units

To convert results to SI units:  
 $\text{nmol/L} = \text{ng/mL} \times 2.7586$

To convert results to mass units:  
 $\text{ng/mL} = \text{nmol/L} \times 0.3625$

### 12. MEASURING RANGE

The assay measuring range (AMR) is 7.16 – 500 ng/mL (19.75 – 1379.3 nmol/L).

Any value that reads below 7.16 ng/mL (19.75 nmol/L) should be reported as “< 7.16 ng/mL (19.75 nmol/L)”. Any value that reads above 500 ng/mL (1379.3 nmol/L) should be reported as “> 500 ng/mL (1379.3 nmol/L)”.

### 13. METROLOGY AND TRACEABILITY

The calibrators of this kit are traceable to a commercial cortisol assay which in turn is traceable to the Cortisol reference serum panel [ERM DA541\_IFCC].

### 14. EXPECTED VALUES

The following ranges were determined using the Cortisol ELISA and are provided for information only. The 95 % reference interval for apparently healthy adults were calculated by a non-parametric method following guidance from CLSI C28-A3 “Defining, Establishing and Verifying Reference Intervals in the Clinical Laboratory”.

	Morning 6 – 10 am	Evening 4 – 8 pm
No. of subjects	41	51
Mean (ng/mL)	108.41	66.81
SD (ng/mL)	42.16	25.06
Median (ng/mL)	112.64	61.95
Reference Interval (ng/mL)	47.1 - 187	31.4 – 114.2

The above ranges should be considered as guidelines only; it is recommended that each laboratory establish its own expected range based upon its own patient population.

### 15. PERFORMANCE CHARACTERISTICS

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

#### 15.1. Detection Capability

The limit of blank (LoB), limit of detection (LoD) and limit of quantitation (LoQ) were determined with guidance from CLSI EP17-A, “Protocols for Determination of Limits of Detection and Limits of Quantitation” using 6 blanks and 6 low level samples.

Sensitivity	Concentration
Limit of Blank (LoB)	3.47 ng/mL
Limit of Detection (LoD)	5.79 ng/mL
Limit of Quantitation (LoQ)	7.16 ng/mL

#### 15.2. Trueness

Trueness has been demonstrated through comparison of the Cortisol ELISA to a commercially available cortisol assay, which in turn is traceable to ID GC-MS, with a total of 34 individual donor native serum samples.

n	Slope [95% CI]	Intercept (ng/mL) [95% CI]	Correlation coefficient (r)
34	1.03 [0.98 – 1.10]	-0.13 [-0.62 – 0.36]	0.99

#### 15.3. Precision

Precision of the Cortisol ELISA was determined by performing a complex precision study.

**Repeatability:** A total of 5 serum samples were assayed in 5 replicates, once a day for 5 days by 3 operators. Data from one representative lot is shown below:

Sample	n	Mean Conc. (ng/mL)	Within run (Repeatability)	
			SD	CV%
1	75	38.38	3.43	8.9%
2	75	88.34	3.92	4.4%
3	75	156.08	13.08	8.4%
4	75	257.48	21.89	8.5%
5	75	379.41	31.18	8.4%
6	75	393.23	37.78	9.5%

**Reproducibility:** A total of 5 serum samples were assayed in 5 replicates, once a day for 5 days by 3 operators. Results for the combined data from two lots is shown below:

Sample	n	Mean Conc. (ng/mL)	Within Laboratory (Reproducibility)	
			SD	CV%
1	150	37.93	4.63	12.2%
2	150	88.06	7.06	8.0%
3	150	156.98	18.26	11.6%
4	150	261.15	33.44	12.8%
5	150	385.80	52.37	13.6%
6	150	400.14	56.95	14.2%

#### 15.4. Linearity

Linearity was evaluated based on CLSI EP-06, "Evaluation of the Linearity of Quantitative Measurement Procedures". For cortisol concentration by Cortisol ELISA, the measurement procedure shows linearity for the interval from 7.16 to 500 ng/mL (19.75 to 1379.3 nmol/L) within the allowable deviation of linearity (ADL) of  $\pm 15\%$ .

#### 15.5. Method comparison

The Cortisol ELISA was compared against a commercially available quantitative automated assay, following CLSI EP-9A, "Method Comparison and Bias Estimation Using Patient Samples". A total of 100 samples, selected to represent a wide range of cortisol concentrations, was assayed by each method. Passing-Bablok regression analysis was performed on the comparative data:

n	Slope [95% CI]	Intercept (ng/mL) [95% CI]	Correlation coefficient (r)
100	1.06 [1.01 – 1.10]	-4.33 [-8.33 – 0.44]	0.98

#### 15.6. Analytical Specificity

The specificity was assessed with the following cross-reactants.

Cross-reactant	Concentration tested (unit)	Mean %Cross reactivity
Prednisolone	200 ng/ml	79%
11-Deoxycortisol	100 ng/ml	67%
21-Deoxycortisol	1 000 ng/ml	14%
Cortisone	1 000 ng/ml	14%
Cortiscosterone	1 000 ng/ml	11%
6-b-Hydroxycortisol	1 000 ng/ml	3%
17 $\alpha$ – OH Progesterone	10 000 ng/ml	2%
11 - Deoxycorticosterone	10 000 ng/ml	1%
Aldosterone	10 000 ng/ml	1%
Dexamethasone	10 000 ng/ml	1%
Prednisone	10 000 ng/ml	3%
Progesterone	10 000 ng/ml	1%

The following substances do not interfere with a bias of  $\geq \pm 15\%$  in the Cortisol ELISA assay when the concentrations are below the stated threshold presented in the following table.

Potentially Interfering Reagent	Threshold Concentration
Bilirubin, conjugated	40 mg/dL
Bilirubin, unconjugated	40 mg/dL
Haemoglobin	200 mg/dL
Total Protein	15 g/dL
Triglyceride	1500 mg/dL

#### 15.7. Serum-plasma study

The Cortisol ELISA matrix comparison study was performed to evaluate the difference across tube types (serum separator tubes (SST), lithium heparin plasma, sodium heparin plasma and K2 EDTA plasma) versus the control samples (red top serum, without additive) following CLSI EP9-A3 guidelines. A total of 20 samples (16 native, 4 spiked) to cover the assay range were evaluated. Passing-Bablok regression analysis was performed on the comparative data:

Sample type	Slope [95% CI]	Intercept (ng/mL) [95% CI]	Correlation coefficient (r)
SST	0.96 [0.91 – 1.04]	2.72 [-2.38 – 9.67]	1.0
Lithium Heparin	1.03 [0.91 – 1.18]	-2.87 [-13.10 – 5.81]	0.99
Sodium Heparin	0.99 [0.90 – 1.20]	0.14 [-13.69 – 10.67]	0.99
EDTA	1.00 [0.90 – 1.06]	-1.08 [-5.44 – 6.58]	0.99

### 15.8. Dilution recovery

For samples exceeding the analytical measurement interval (500 ng/mL), a dilution recovery study was performed. A total of 5 samples were prepared by spiking with a high concentration stock solution. The samples were then diluted and run in duplicate with the Cortisol ELISA.

Samples with analyte concentrations greater than 500 ng/mL can be diluted 1:4 with Calibrator 0. The assay result must then be corrected by applying the appropriate dilution factor.

### 16. 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.
- Heterophilic antibodies in human serum can react with reagent immunoglobulins, interfering with *in vitro* immunoassays<sup>14</sup>. Patients routinely exposed to animals or to animal serum products can be prone to this interference and anomalous values may be observed.

### 17. WASTE MANAGEMENT

Reagents must be disposed of in accordance with local regulations.

### 18. BIBLIOGRAPHY

1. Ramamoorthy, S. & Cidlowski, J. A. Corticosteroids: Mechanisms of Action in Health and Disease. *Rheumatic diseases clinics of North America* 42, 15-31, doi:10.1016/j.rdc.2015.08.002 (2016).
2. Wild, D. *The immunoassay handbook*. (Elsevier, 2005).
3. Cain, D.W. & Cidlowski, J. A. Specificity and sensitivity of glucocorticoid signaling in health and disease. *Best practice & research. Clinical endocrinology & metabolism* 29, 545-556, 2015.04.007 (2015).
4. Schacke, H., Docke, W. D. & Asadullah, K. Mechanisms involved in the side effects of glucocorticoids. *Pharmacology & therapeutics* 96, 23-43 (2002).

5. Charmandari, E., Nicolaidis, N. C. & Chrousos, G. P. Adrenal insufficiency *Lancet* 383, 2152-2167, (13)61684-0 (2014).
6. Bancos, I., Hahner, S., Tomlinson, J. & Arlt, W. Diagnosis and management of adrenal insufficiency. *The lancet. Diabetes & endocrinology* 3, 216-226, (14)70142-1 (2015).
7. Arlt, W. & Allolio, B. Adrenal insufficiency. *Lancet* 361, 1881-1893, (03)13492-7 (2003).
8. Lacroix, A., Feelders, R. A., Stratakis, C. A. & Nieman, L. K. Cushing's syndrome. *Lancet* 386, 913-927, (14)61375-1 (2015).
9. Arnaldi, G. et al. Diagnosis and complications of Cushing's syndrome: a consensus statement. *The Journal of clinical endocrinology and metabolism* 88, 5593-5602 (2003).
10. Yaneva, M. et al. Midnight salivary cortisol for the initial diagnosis of Cushing's syndrome of various causes. *The Journal of clinical endocrinology and metabolism* 89, 3345-3351, (2004).
11. Krieger, D. T., Allen, W., Rizzo, F. & Krieger, H. P. Characterization of the normal temporal pattern of plasma corticosteroid levels. *The Journal of clinical endocrinology and metabolism* 32, 266-284, (1971).
12. Ceccato, F. et al. Performance of salivary cortisol in the diagnosis of Cushing's syndrome, adrenal incidentaloma, and adrenal insufficiency. *European journal of endocrinology / European Federation of Endocrine Societies* 169, 31-36, (2013).
13. Basic QC Practices On-line Course; <http://www.Westgard.com>.
14. Boscato, LM. and Stuart, MC., 'Heterophilic antibodies: a problem for all immunoassays'. *Clin Chem*, 34, 1988, pp 27-33

### 19. REVISION IDENTIFIER

Additions or changes to the IFU are indicated by grey highlighting.

### 20. 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 below and on the company website: [www.diametra.com](http://www.diametra.com).

Ed. 09/2022

DCM001-13

#### Legal Manufacturer

Dia.Metra Srl  
Via Pozzuolo 14  
06038 SPELLO (PG) Italy  
Tel. +39-0742-24851  
Fax +39-0742-316197



DCM001-13  
Ed. 09/2022

# CORTISOL ELISA

para el análisis de rutina

Determinación inmunoenzimática directa del cortisol en suero o plasma humano

IVD



LOT

Ver etiqueta  
externa

2°C - 8°C



$\Sigma = 96$  pruebas

REF DKO001

## 1. FINALIDAD PREVISTA

Para uso en diagnóstico *in vitro*

Para uso profesional de laboratorio

Cortisol ELISA es un dispositivo manual de diagnóstico *in vitro* destinado a la determinación cuantitativa del cortisol en suero o plasma humano.

## 2. IMPORTANCIA CLÍNICA

El cortisol es una hormona esteroidea glucocorticoidea que se sintetiza a partir del colesterol en la zona fascicular de la corteza suprarrenal. Los glucocorticoides son principalmente hormonas de estrés que regulan una variedad de procesos fisiológicos uniéndose a receptores glucocorticoides que se expresan por todo el cuerpo<sup>1</sup>. Los glucocorticoides endógenos como el cortisol poseen una función crucial para establecer la homeostasis del cuerpo tras situaciones de estrés físico o psicológico. Asimismo, el cortisol posee una función en el metabolismo de carbohidratos, lípidos y proteínas, y en el mantenimiento de la función miocárdica<sup>2</sup>; además, participa en el desarrollo y el funcionamiento del sistema nervioso central, el sistema inmunitario y el sistema digestivo<sup>3</sup>.

Aproximadamente entre el 80 y el 90 % del cortisol en plasma está ligado mediante proteínas a una  $\alpha$ 2-globulina, la globulina fijadora de corticoesteroides (CBG), también denominada transcortina. La cantidad restante, entre el 5 % y el 15 %, está ligada a albúmina, y solo el 5 % está en forma libre. El cortisol libre no ligado a proteínas es la hormona activa desde el punto de vista biológico, con niveles más altos de la CBG que protegen frente a concentraciones con altos niveles de cortisol<sup>2,3</sup>. Los niveles elevados de cortisol en la circulación autorregulan el hipotálamo y la hipófisis, lo que reduce los niveles de la ACTH y la hormona liberadora de corticotropina en un patrón convencional de autorregulación negativa<sup>4</sup>. El eje hipotálamo-hipófiso-suprarrenal (HHS) y, en consecuencia, el cortisol, se encuentra bajo el control de tres factores principales que incluyen niveles de estrés, el patrón de autorregulación negativa y el ritmo circadiano<sup>2</sup>. Con frecuencia se utilizan las determinaciones de cortisol para valorar la función corticosuprarrenal y otras alteraciones del eje hipotálamo-hipófiso-suprarrenal. Estas alteraciones pueden dar lugar a una producción insuficiente o a una producción excesiva de glucocorticoides, con mayor

frecuencia denominadas enfermedad de Addison y síndrome de Cushing, respectivamente<sup>3</sup>. La enfermedad de Addison consiste en una incapacidad de la glándula suprarrenal de producir cortisol como consecuencia de una insuficiencia suprarrenal primaria, con mayor frecuencia causada por adrenalitis autoinmunitaria. La insuficiencia suprarrenal secundaria se produce como consecuencia de una alteración de la regulación de la glándula suprarrenal procedente del eje HHS. Si bien es posible diagnosticar a los pacientes con insuficiencia suprarrenal primaria mediante una medición combinada del cortisol en suero y los niveles de ACTH en plasma a primera hora del día, lo más frecuente es que en los casos de insuficiencia suprarrenal secundaria deban realizarse pruebas dinámicas como la prueba de tolerancia a la insulina o la prueba nocturna con metirapona<sup>5-7</sup>. El síndrome de Cushing (CS) se define como un amplio grupo de signos y síntomas que se producen como consecuencia de una gran exposición prolongada e inapropiada a glucocorticoides<sup>8</sup>. La causa más frecuente es iatrogénica, ya que se debe al uso de corticosteroides recetados. El CS endógeno puede estar causado por una producción excesiva de la ACTH (entre el 80 % y el 85 % de los casos) o, con independencia de la ACTH, como consecuencia de una secreción excesiva de cortisol procedente de la glándula suprarrenal<sup>9</sup>.

En condiciones fisiológicas normales, el eje HHS posee un ritmo circadiano característico en el que los niveles más elevados de cortisol se detectan por la mañana y alcanzan el punto más bajo a última hora de la tarde<sup>10,11</sup>. Dado que la secreción de cortisol es pulsátil, es posible que la valoración de los niveles en una sola muestra no proporcione una precisión diagnóstica suficiente. La ausencia del ritmo diurno normal es un buen indicador de la presencia del CS<sup>12</sup>. Mientras que en personas sanas los niveles no son detectables a altas horas de la noche, los pacientes con un aumento de la función de la glándula suprarrenal pierden el ritmo circadiano normal y sus niveles de cortisol son detectables durante la medianoche<sup>9</sup>. Por lo tanto, la hora de obtención de la muestra es un factor importante para la valoración de los niveles de cortisol. Asimismo, deben compararse las concentraciones con los perfiles de los intervalos de referencia normales y los niveles de los valores de corte clínicos que son específicos del ensayo.

### 3. PRINCIPIO DEL MÉTODO

El Cortisol ELISA es un ensayo enzimático inmunométrico competitivo (ELISA) en el que el cortisol (antígeno) de la muestra compete con el cortisol antigénico conjugado con peroxidasa de rábano picante (HRP) para unirse al número limitado de anticuerpos anticortisol recubiertos en la microplaca (fase sólida).

Tras la incubación, la separación ligada/libre se realiza mediante un simple lavado en fase sólida. A continuación, la enzima HRP de la fracción ligada reacciona con el sustrato ( $H_2O_2$ ) y el sustrato de TMB, y desarrolla un color azul que cambia a amarillo cuando se añade la solución de detención ( $H_2SO_4$ ). La intensidad del color es inversamente proporcional a la concentración de cortisol de la muestra.

La concentración de cortisol de la muestra se calcula mediante una curva de calibración.

### 4. REACTIVOS, MATERIALES E INSTRUMENTACIÓN

#### 4.1. Reactivos y materiales incluidos en el kit

##### 1. Calibradores (5 viales de 1 mL cada uno)

CAL0	REF DCE002/0106-0
CAL1	REF DCE002/0107-0
CAL2	REF DCE002/0108-0
CAL3	REF DCE002/0109-0
CAL4	REF DCE002/0110-0

##### 2. Control (1 vial, 1 mL)

Consulte la concentración de control en el certificado de análisis

REF DCE045/0103-0

##### 3. Conjugado (1 vial, 21 mL)

Cortisol conjugado con peroxidasa de rábano (HRP)

REF DCE002/0102-0

##### 4. Microplaca recubierta

(1 microplaca que se puede romper)

Microplaca recubierta con anticuerpos anticortisol

REF DCE002/0103-0

##### 5. Sustrato de TMB (1 vial, 15 mL)

$H_2O_2$ -TMB 0,26 g/L (evitar el contacto con la piel)

REF DCE004-0

##### 6. Solución de detención (1 vial, 15 mL)

Ácido sulfúrico 0,15 mol/L (evitar el contacto con la piel)

REF DCE005-0

##### 7. Conc. 10X Solución de lavado (1 vial, 50 mL)

Tampón fosfato 0,2 M pH 7,4

REF DCE054-0

#### 4.2. Materiales necesarios pero no suministrados

Agua destilada

#### 4.3. Materiales auxiliares e instrumentación

Dispensador automático

Dispositivos de pipetas de precisión

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

### 5. ADVERTENCIAS

- Este kit está destinado al uso *in vitro* realizado exclusivamente por profesionales. No es para uso interno o externo en personas ni animales.
- Utilice el equipo de protección personal adecuado cuando trabaje con los reactivos suministrados.

- Siga las prácticas de laboratorio recomendadas (BPL) para manipular productos sanguíneos.
- El material de origen animal utilizado en la preparación del kit se ha obtenido de animales certificados como sanos y la proteína bovina se ha obtenido de países donde no hay infección de EEB, pero estos materiales deben manejarse como potencialmente infecciosos.
- Algunos reactivos contienen pequeñas cantidades de ProClin™ 300 como conservante. Evite el contacto con la piel o las mucosas.

#### Clasificación según el Reglamento CLP

Sensibilidad cutánea 1

#### Declaraciones de riesgo

H317: puede provocar una reacción alérgica en la piel

#### Declaraciones preventivas

P261: evitar inhalar polvos/humos/gases/nebulizaciones/vapores/aerosoles.

P272: se debe prohibir el uso de ropa de trabajo contaminada fuera del lugar de trabajo.

P280: usar guantes de protección, ropa de protección y protección para los ojos y la cara.

P302/352 EN CASO DE CONTACTO CON LA PIEL: lavar con agua y jabón abundantes.

P321: tratamiento específico (consulte las instrucciones en esta etiqueta).

P333/313: en caso de irritación o erupción cutánea: consultar a un médico.

- El sustrato de TMB contiene un irritante que es perjudicial si se inhala, se ingiere o se absorbe a través de la piel. Para evitar lesiones, evite la inhalación, la ingestión o el contacto con la piel y los ojos.
- La solución de detención consiste en una solución diluida de ácido sulfúrico. El ácido sulfúrico es venenoso, corrosivo y puede ser tóxico si se ingiere. Para evitar quemaduras químicas, evite el contacto con la piel y los ojos.
- Evite la exposición del reactivo TMB/ $H_2O_2$  a la luz solar directa, a metales o a oxidantes. No congele la solución.

### 6. PRECAUCIONES

- Siga estrictamente la secuencia de pasos de pipeteado que se indica en este protocolo. Los datos de rendimiento representados en este documento se obtuvieron utilizando los reactivos específicos indicados en estas instrucciones de uso.
- Todos los reactivos deben conservarse refrigerados entre 2 y 8 °C en su envase original. Las excepciones se indican claramente.
- Deje que todos los componentes del kit y las muestras alcancen la temperatura ambiente (22-28 °C) y mezcle bien antes de usarlos.
- No intercambie componentes del kit procedentes de diferentes lotes. Debe respetarse la fecha de caducidad impresa en las etiquetas de la caja y de los viales. No utilice ningún componente del kit después de su fecha de caducidad.
- Si el usuario utiliza un equipo automatizado, tiene la responsabilidad de asegurarse de que el kit ha sido debidamente probado.
- La eliminación incompleta o imprecisa del líquido de los pocillos podría alterar la precisión del ensayo o aumentar el fondo. Para mejorar el rendimiento del kit en sistemas automáticos se recomienda aumentar el número de lavados.

- Es importante que el tiempo de reacción en cada pocillo se mantenga constante para obtener resultados reproducibles. El pipeteo de las muestras no debe prolongarse más de diez minutos para evitar errores en el ensayo. Si se necesitan más de 10 minutos, siga el mismo orden de dispensación. Si se utiliza más de una placa, se recomienda repetir la curva dosis-respuesta en cada placa.
- La adición de la solución de sustrato de TMB inicia una reacción cinética, que finaliza al añadir la solución de detención. Por lo tanto, el sustrato de TMB y la solución de detención deben añadirse en la misma secuencia para eliminar las posibles desviaciones temporales durante la reacción.
- Respete las directrices para realizar el control de calidad en los laboratorios médicos mediante el ensayo de controles o sueros combinados.
- Se requiere la máxima precisión en la reconstitución y dispensación de los reactivos.
- No se deben usar en el ensayo muestras contaminadas microbiológicamente, muy lipémicas o hemolizadas.
- Los lectores de placas miden en vertical. No toque el fondo de los pocillos.

## 7. ALMACENAMIENTO Y ESTABILIDAD DE LOS REACTIVOS

Almacene el kit a 2-8 °C en un lugar oscuro.

- El kit es estable a 2-8 °C hasta la fecha de caducidad indicada en su etiqueta externa.
- Una vez abierto, el kit es estable a 2-8 °C durante 5 meses.
- La solución de lavado diluida es estable durante 30 días a 2-8 °C.

Nota importante: abra la bolsa que contiene la microplaca recubierta solo cuando esté a temperatura ambiente y ciérrela inmediatamente después de su uso.

## 8. RECOGIDA Y ALMACENAMIENTO DE LAS MUESTRAS

El ensayo debe realizarse usando muestras de suero (tubos de muestras estándar o tubos que contienen gel de separación de suero) o muestras de plasma (heparina de litio, heparina de sodio, EDTA de potasio).

Almacenamiento de muestras	Duración
2-8 °C	96 horas
Ciclos de congelación/descongelación	3 ciclos

## 9. PROCEDIMIENTO

### 9.1. Preparación de calibradores y controles

Los calibradores están listos para utilizarse y tienen la siguiente concentración de cortisol:

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

El calibrador está listo para su uso; la concentración del calibrador está impresa en la etiqueta.

El control está listo para su uso.

### 9.2. Preparación del conjugado

El conjugado está listo para su uso. Mezclar suavemente durante 5 minutos con un mezclador de rodillos.

### 9.3. Preparación de la solución de lavado

Diluir el contenido del vial «10X Conc. Wash Solution» con agua destilada hasta un volumen final de 500 mL antes de usarlo. Para volúmenes más pequeños, respete la relación de dilución de 1:10.

Es posible que observe la presencia de cristales dentro de la solución de lavado concentrada; en este caso, mezcle a temperatura ambiente hasta la completa disolución de los cristales. Para una mayor precisión, diluya todo el frasco de solución de lavado concentrada a 500 mL, teniendo cuidado también de transferir los cristales enjuagando completamente el frasco y luego mezclando hasta que los cristales se disuelvan completamente.

### 9.4. Preparación de las muestras

Almacene la muestra a -20 °C si la determinación no se realiza el mismo día de la recogida de la muestra. Evite la congelación y descongelación repetida de las muestras.

### 9.5. Procedimiento

- **Deje que todos los reactivos alcancen la temperatura ambiente (22-28 °C) durante al menos 30 minutos.** Al finalizar el ensayo, almacene inmediatamente los reactivos a 2-8 °C: evite la exposición prolongada a la temperatura ambiente.
- Las tiras de micropocillos recubiertas no utilizadas deben dejarse de forma segura en el envoltorio de papel de aluminio que contiene desecante y almacenarse a 2-8 °C.
- Para evitar que se produzca una posible contaminación microbiana o química, los reactivos no utilizados nunca se deberán transferir a los viales originales.
- Como es necesario realizar la determinación por duplicado para mejorar la precisión de los resultados de la prueba, prepare dos pocillos para cada punto de la curva de calibración (C<sub>0</sub>-C<sub>5</sub>), dos por cada control, dos para cada muestra y uno para el blanco.



Reactivo	Calibrador	Muestra/ Control	Blanco
Calibrador C <sub>0</sub> -C <sub>4</sub>	20 µL		
Muestra/ Control		20 µL	
Conjugado	200 µL	200 µL	

Incube durante 1 hora a 37 °C.

Retire el contenido de cada pocillo. Lave los pocillos 3 veces con 300 µL de solución de lavado diluida.

**Nota importante:** en cada paso de lavado, agite ligeramente la placa durante 5 segundos y elimine el exceso de solución golpeando la placa invertida sobre un paño de papel absorbente.

**Lavadora automática:** en caso de utilizar una lavadora automática, se aconseja realizar 6 pasos de lavado.

Sustrato de TMB	100 µL	100 µL	100 µL
--------------------	--------	--------	--------

Incube durante 15 minutos en un lugar oscuro a temperatura ambiente (22-28 °C).

Solución de detención	100 µL	100 µL	100 µL
--------------------------	--------	--------	--------

Agite suavemente la microplaca.

Compare la absorbancia (E) a 450 nm con la obtenida con una longitud de onda de referencia de 620-630 nm o con el blanco en un plazo de 5 minutos.

## 10. CONTROL DE CALIDAD

Las prácticas de laboratorio recomendadas (BPL) requieren el uso de muestras de control de calidad en cada serie de ensayos para comprobar el rendimiento del ensayo. Los controles deberán tratarse como muestras desconocidas y los resultados deberán analizarse con métodos estadísticos adecuados.

Los controles incluidos en el kit deberán ser probados como desconocidos y están destinados a ayudar a evaluar la validez de los resultados obtenidos con cada placa de ensayo.

La concentración media de cada nivel de control se documenta en el informe de control de calidad que se incluye en cada kit. Los niveles de concentración media se determinan respecto de varios análisis, los cuales se realizan por duplicado en varios puntos diferentes de cada placa.

DiaMetra recomienda que los usuarios mantengan registros gráficos de los valores de control que se generan con cada ensayo, incluida la media de ejecución, la DE (desviación estándar) y el % CV. Esta información facilitará los ensayos de tendencia de los controles relacionados con el rendimiento de lotes de control actuales e históricos relativos a los datos de control de calidad proporcionados. La tendencia facilitará la identificación de los análisis que generan valores de control significativamente distintos de su intervalo medio.

Al interpretar los datos de control, los usuarios deberán tener en cuenta que este producto fue diseñado y desarrollado como un producto manual. El rango establecido en el certificado de control de calidad deberá ser adecuado para los ensayos que se realizan manualmente y en estricto cumplimiento del procedimiento de ensayo anteriormente descrito. Los profesionales del control de la calidad reconocen que, como resultado de las diferencias en las condiciones y en las prácticas, siempre habrá variaciones entre laboratorios en los valores medios y en la precisión de las mediciones de control<sup>13</sup>.

## 11. CÁLCULO DE LOS RESULTADOS

Hay disponibles diversos paquetes de software de reducción de datos que se pueden utilizar para generar el promedio de la curva de calibración y para calcular el promedio de las concentraciones de muestras y controles desconocidos. Es necesario un ajuste de curva logístico de 4 parámetros (4PL), **incluido el calibrador 0**.

También se puede preparar una curva de calibración en papel semilogarítmico mediante el trazado de la absorbancia media en el eje Y frente a la concentración de analitos en el eje X. El calibrador 0 debe incluirse en la curva de calibración. Lea el valor de absorbancia medio de cada muestra desconocida que se encuentra fuera de la curva.

### Conversión de unidades

Para convertir los resultados a unidades del SI:  
 $\text{nmol/L} = \text{ng/mL} \times 2,7586$

Para convertir los resultados en unidades de masa:  
 $\text{ng/mL} = \text{nmol/L} \times 0,3625$

## 12. RANGO DE MEDICIÓN

El rango de medición del ensayo (AMR) es de 7,16-500 ng/mL (19,75-1379,3 nmol/L).

Cualquier valor inferior a 7,16 ng/mL (19,75 nmol/L) deberá comunicarse como "<7,16 ng/mL (19,75 nmol/L)". Cualquier valor inferior a 500 ng/mL (1379,3 nmol/L) deberá comunicarse como ">500 ng/mL (1379,3 nmol/L)".

## 13. METROLOGÍA Y TRAZABILIDAD

Los calibradores de este kit son trazables según un ensayo comercial de cortisol que, a su vez, se puede trazar hasta el panel de suero de referencia de cortisol [ERM DA541\_IFCC].

## 14. VALORES ESPERADOS

Los rangos siguientes se determinaron usando el Cortisol ELISA y se facilitan solo con fines informativos. El intervalo de referencia del 95 % para adultos aparentemente sanos se calculó mediante un método no paramétrico siguiendo la orientación de CLSI C28-A3 "Defining, Establishing and Verifying Reference Intervals in the Clinical Laboratory".

	Mañana 6-10 a.m.	Tarde 4-8 p.m.
N.º de sujetos	41	51
Media (ng/mL)	108,41	66,81
DE (ng/mL)	42,16	25,06
Mediana (ng/mL)	112,64	61,95
Intervalo de referencia (ng/mL)	47,1 - 187	31,4 - 114,2

Los rangos anteriores deberán ser considerados como directrices solamente; se recomienda que cada laboratorio establezca su propio rango previsto en función de su propia población de pacientes.

## 15. CARACTERÍSTICAS DE RENDIMIENTO

Se muestran los datos de rendimiento representativos. Los resultados obtenidos en diferentes laboratorios pueden diferir.

### 15.1. Capacidad de detección

El límite de blanco (LoB), el límite de detección (LoD) y el límite de cuantificación (LoQ) se determinaron con orientación del documento CLSI EP17-A, "Protocols for Determination of Limits of Detection and Limits of Quantitation", usando 6 blancos y 6 muestras de bajo nivel.

Sensibilidad	Concentración
Límite de blanco (LoB)	3,47 ng/mL
Límite de detección (LoD)	5,79 ng/mL
Límite de cuantificación (LoQ)	7,16 ng/mL

### 15.2. Veracidad

Se ha demostrado la veracidad mediante la comparación de Cortisol ELISA con un ensayo de cortisol disponible en el mercado que, a su vez, se puede trazar hasta el ID GC-MS, con un total de 34 muestras de suero nativo de donantes individuales.

n	Pendiente [IC del 95 %]	Intersección (ng/mL) [IC del 95 %]	Coefficiente de correlación (r)
34	1,03 [0,98-1,10]	-0,13 [-0,62-0,36]	0,99

### 15.3. Precisión

La precisión de Cortisol ELISA se determinó mediante la realización de un estudio de precisión complejo.

**Repetibilidad:** se analizó un total de 5 muestras de suero en 5 réplicas, una vez al día durante 5 días por 3 operadores.

A continuación, se muestran los datos de un lote representativo:

Muestra	n	Concentración media (ng/mL)	Intraprueba (repetibilidad)	
			DE	CV %
1	75	38,38	3,43	8,9 %
2	75	88,34	3,92	4,4 %
3	75	156,08	13,08	8,4 %
4	75	257,48	21,89	8,5 %
5	75	379,41	31,18	8,4 %
6	75	393,23	37,78	9,5 %

**Reproducibilidad:** se analizó un total de 5 muestras de suero en 5 réplicas, una vez al día durante 5 días por 3 operadores. A continuación, se muestran los resultados de los datos combinados de dos lotes:

Muestra	n	Concentración media (ng/mL)	Dentro del laboratorio (reproducibilidad)	
			DE	CV %
1	150	37,93	4,63	12,2 %
2	150	88,06	7,06	8,0 %
3	150	156,98	18,26	11,6 %
4	150	261,15	33,44	12,8 %
5	150	385,80	52,37	13,6 %
6	150	400,14	56,95	14,2 %

### 15.4. Linealidad

La linealidad se evaluó en base a CLSI EP-06, "Evaluation of the Linearity of Quantitative Measurement Procedures". Para la concentración de cortisol mediante Cortisol ELISA, la medición muestra linealidad para el intervalo de 7,16 a 500 ng/mL (19,75 hasta 1379,3 nmol/L) dentro de la desviación de linealidad permitida (ADL) de  $\pm 15$  %.

### 15.5. Comparación de métodos

El Cortisol ELISA se comparó con un ensayo cuantitativo automático disponible en el mercado, siguiendo CLSI EP-9A, "Method Comparison and Bias Estimation Using Patient Samples". Con cada método se realizó el ensayo de un total de 100 muestras seleccionadas para representar un amplio intervalo de concentraciones de cortisol. Se realizó el análisis de regresión de Passing y Bablok en los datos comparativos:

n	Pendiente [IC del 95 %]	Intersección (ng/mL) [IC del 95 %]	Coefficiente de correlación (r)
100	1,06 [1,01-1,10]	-4,33 [-8,33-0,44]	0,98

### 15.6. Especificidad analítica

La especificidad se evaluó con los siguientes reaccionantes cruzados. La especificidad se evaluó con los siguientes reaccionantes cruzados.

Reaccionante cruzado	Concentración probada (unidad)	Promedio en % de reactividad cruzada
Prednisolona	200 ng/mL	79 %
11-deoxicortisol	100 ng/mL	67 %
21-deoxicortisol	1000 ng/mL	14 %
Cortisona	1000 ng/mL	14 %
Corticosterona	1000 ng/mL	11 %
6-b-hidroxicortisol	1000 ng/mL	3 %
17 $\alpha$ – OH progesterona	10 000 ng/mL	2 %
11-deoxicorticosterona	10 000 ng/mL	1 %
Aldosterona	10 000 ng/mL	1 %
Dexametasona	10 000 ng/mL	1 %
Prednisona	10 000 ng/mL	3 %
Progesterona	10 000 ng/mL	1 %

Las siguientes sustancias no interfieren con un sesgo de  $> \pm 15\%$  en el ensayo Cortisol ELISA cuando las concentraciones están por debajo del umbral indicado presentado en la siguiente tabla.

Reactivos que pueden interferir	Límite máximo de concentración
Bilirrubina, conjugada	40 mg/dL
Bilirrubina, no conjugada	40 mg/dL
Hemoglobina	200 mg/dL
Proteína total	15 g/dL
Triglicéridos	1500 mg/dL

### 15.7. Estudio en suero-plasma

El estudio de comparación de la matriz de Cortisol ELISA se realizó para evaluar la diferencia entre los tipos de tubos (tubos separadores de suero [SST], plasma de heparina de litio, plasma de heparina sódica y plasma K2 EDTA) frente a las muestras de control (tapón rojo para suero, sin aditivos) siguiendo las directrices CLSI EP9-A3. Se evaluó un total de 20 muestras (16 nativas, 4 con aditivos) para cubrir el intervalo. Se realizó el análisis de regresión de Passing y Bablok en los datos comparativos:

Tipo de muestra	Pendiente [IC del 95 %]	Intersección (ng/mL) [IC del 95 %]	Coefficiente de correlación (r)
SST	0,96 [0,91-1,04]	2,72 [-2,38-9,67]	1,0
Heparina de litio	1,03 [0,91-1,18]	-2,87 [-13,10-5,81]	0,99
Heparina sódica	0,99 [0,90-1,20]	0,14 [-13,69-10,67]	0,99
EDTA	1,00 [0,90-1,06]	-1,08 [-5,44-6,58]	0,99

### 15.8. Recuperación por dilución

Para las muestras que superan el intervalo de medición analítica (500 ng/mL), se realizó un estudio de recuperación por dilución. Se preparó un total de 5 muestras añadiendo una solución madre de alta concentración. A continuación, las muestras se diluyeron y se evaluaron por duplicado con Cortisol ELISA.

Las muestras con concentraciones de analitos superiores a 500 ng/mL pueden diluirse a una proporción de 1:4 con el Calibrador 0. El resultado del ensayo ha de corregirse aplicando el factor de dilución adecuado.

### 16. LÍMITES DE USO

- Como en cualquier procedimiento diagnóstico, los resultados se deberán interpretar junto con los hallazgos clínicos del paciente y otra información de la que el médico disponga.
- Las características de rendimiento de este análisis no se han establecido para una población pediátrica.
- Los anticuerpos heterofílicos en el suero humano pueden presentar reacciones con las inmunoglobulinas reactivas, que interfieren con los inmunoensayos *in vitro*<sup>14</sup>. Los pacientes que se exponen habitualmente a animales o a productos de suero animal pueden ser propensos a esta interferencia y puede que se observen valores anómalos.

### 17. GESTIÓN DE RESIDUOS

Los reactivos deben eliminarse de acuerdo con la normativa local.

### 18. BIBLIOGRAFÍA

1. Ramamoorthy, S. & Cidlowski, J. A. Corticosteroids: Mechanisms of Action in Health and Disease. Rheumatic diseases clinics of North America 42, 15-31, doi:10.1016/j.rdc.2015.08.002 (2016).
2. Wild, D. The immunoassay handbook. (Elsevier, 2005).
3. Cain, D.W. & Cidlowski, J. A. Specificity and sensitivity of glucocorticoid signaling in health and disease. Best practice & research. Clinical

- endocrinology & metabolism 29, 545-556, 2015.04.007 (2015).
4. Schacke, H., Docke, W. D. & Asadullah, K. Mechanisms involved in the side effects of glucocorticoids. *Pharmacology & therapeutics* 96, 23-43 (2002).
  5. Charmandari, E., Nicolaidis, N. C. & Chrousos, G. P. Adrenal insufficiency *Lancet* 383, 2152-2167, (13)61684-0 (2014).
  6. Bancos, I., Hahner, S., Tomlinson, J. & Arlt, W. Diagnosis and management of adrenal insufficiency. *The lancet. Diabetes & endocrinology* 3, 216-226, (14)70142-1 (2015).
  7. Arlt, W. & Allolio, B. Adrenal insufficiency. *Lancet* 361, 1881-1893, (03)13492-7 (2003).
  8. Lacroix, A., Feelders, R. A., Stratakis, C. A. & Nieman, L. K. Cushing's syndrome. *Lancet* 386, 913-927, (14)61375-1 (2015).
  9. Arnaldi, G. et al. Diagnosis and complications of Cushing's syndrome: a consensus statement. *The Journal of clinical endocrinology and metabolism* 88, 5593-5602 (2003).
  10. Yaneva, M. et al. Midnight salivary cortisol for the initial diagnosis of Cushing's syndrome of various causes. *The Journal of clinical endocrinology and metabolism* 89, 3345-3351, (2004).
  11. Krieger, D. T., Allen, W., Rizzo, F. & Krieger, H. P. Characterization of the normal temporal pattern of plasma corticosteroid levels. *The Journal of clinical endocrinology and metabolism* 32, 266-284, (1971).
  12. Ceccato, F. et al. Performance of salivary cortisol in the diagnosis of Cushing's syndrome, adrenal incidentaloma, and adrenal insufficiency. *European journal of endocrinology / European Federation of Endocrine Societies* 169, 31-36, (2013).
  13. Basic QC Practices On-line Course; <http://www.Westgard.com>.

14. Boscato, LM. and Stuart, MC., 'Heterophilic antibodies: a problem for all immunoassays'. *Clin Chem*, 34, 1988, pp 27-33

#### 19. IDENTIFICADOR DE REVISIÓN

Las adiciones o cambios en las instrucciones de uso se han resaltado en gris.

#### 20. RECLAMACIONES SOBRE PRODUCTOS Y ASISTENCIA TÉCNICA

Para un paciente/usuario/tercero en la Unión Europea y en países con un régimen regulatorio similar: Reglamento (UE) 2017/746 sobre los productos sanitarios para diagnóstico in vitro; si, durante el uso de este dispositivo o como resultado de su uso, se ha producido un incidente grave, informe del mismo al fabricante o a su representante autorizado y al organismo regulador nacional. Puede contactar con el fabricante a través del servicio de atención al cliente o del equipo de asistencia técnica. Los datos de contacto se encuentran a continuación y en el sitio web de la empresa: [www.diametra.com](http://www.diametra.com).

Ed. 09/2022

DCM001-13

#### Fabricante legal

Dia.Metra Srl  
Via Pozzuolo 14  
06038 SPELLO (PG) Italy  
Tel. +39-0742-24851  
Fax +39-0742-316197

<b>DiaMetra</b>	<b>Packaging Information Sheet</b>	<b>Mod. PIS000-1</b>
-----------------	------------------------------------	----------------------

	DE In vitro Diagnostikum ES Producto sanitario para diagnóstico In vitro FR Dispositif medical de diagnostic in vitro GB In vitro Diagnostic Medical Device IT Dispositivo medico-diagnostico in vitro PT Dispositivos medicos de diagnostico in vitro		DE Hergestellt von ES Elaborado por FR Fabriqué par GB Manufacturer IT Produttore PT Produzido por
	DE Achtung, Begleitdokumente ES Precaución, consulte los documentos adjuntos FR Attention, veuillez consulter les documents d'accompagnement GB Caution, consult accompanying documents IT Attenzione, consultare la documentazione allegata PT Atenção, consultar os documentos de acompanhamento	 yyyy-mm	DE Herstellungs datum ES Fecha de fabricacion FR Date de fabrication GB Date of manufacture IT Data di produzione PT Data de produção
 yyyy-mm-dd	DE Verwendbar bis ES Estable hasta (usar antes de último día del mes) FR Utiliser avant (dernier jour du mois indiqué) GB Use by (last day of the month) IT Utilizzare prima del (ultimo giorno del mese) PT Utilizar (antes ultimo dia do mês)		DE Biogefährdung ES Riesco biológico FR Risque biologique GB Biological risk IT Rischio biologico PT Risco biológico
	DE Gebrauchsanweisung beachten ES Consultar las instrucciones FR Consulter le mode d'emploi GB Consult instructions for use IT Consultare le istruzioni per l'uso PT Consultar instruções para uso	<b>LOT</b>	DE Chargenbezeichnung ES Código de lote FR Numero de lot GB Batch code IT Codice del lotto PT Código do lote
 $\Sigma = xx$	DE Ausreichend für "n" Tests ES Contenido suficiente para "n" tests FR Contenu suffisant pour "n" tests GB Contains sufficient for "n" tests IT Contenuto sufficiente per "n" saggi PT Contém o suficiente para "n" testes	<b>CONT</b>	DE Inhalt ES Contenido del estuche FR Contenu du coffret GB Contents of kit IT Contenuto del kit PT Conteúdo do kit
 Max Min	DE Temperaturbereich ES Limitación de temperatura FR Limites de température de conservation GB Temperature limitation IT Limiti di temperatura PT Temperaturas limites de conservação	<b>REF</b>	DE Bestellnummer ES Número de catálogo FR Références du catalogue GB Catalogue number IT Numero di Catalogo PT Número do catálogo
	DE Vor direkter Sonneneinstrahlung schützen ES Mantener alejado de la luz solar FR Tenir à l'écart de la lumière du soleil GB Keep away from sunlight IT Tenere lontano dalla luce solare PT Mantenha longe da luz solar		

**SUGGERIMENTI PER LA RISOLUZIONE DEI PROBLEMI/TROUBLESHOOTING****ERRORE CAUSE POSSIBILI/ SUGGERIMENTI****Nessuna reazione colorimetrica del saggio**

- mancata dispensazione del coniugato
- contaminazione del coniugato e/o del Substrato
- errori nell'esecuzione del saggio (es. Dispensazione accidentale dei reagenti in sequenza errata o provenienti da flaconi sbagliati, etc.)

**Reazione troppo blanda (OD troppo basse)**

- coniugato non idoneo (es. non proveniente dal kit originale)
- tempo di incubazione troppo breve, temperatura di incubazione troppa bassa

**Reazione troppo intensa (OD troppo alte)**

- coniugato non idoneo (es. non proveniente dal kit originale)
- tempo di incubazione troppo lungo, temperatura di incubazione troppa alta
- qualità scadente dell'acqua usata per la soluzione di lavaggio (basso grado di deionizzazione,)
- lavaggi insufficienti (coniugato non completamente rimosso)

**Valori inspiegabilmente fuori scala**

- contaminazione di pipette, puntali o contenitori- lavaggi insufficienti (coniugato non completamente rimosso)

**CV% intrasaggio elevato**

- reagenti e/o strip non portate a temperatura ambiente prima dell'uso
- il lavatore per micropiastre non lava correttamente (suggerimento: pulire la testa del lavatore)

**CV% intersaggio elevato**

- condizioni di incubazione non costanti (tempo o temperatura)
- controlli e campioni non dispensati allo stesso tempo (con gli stessi intervalli) (controllare la sequenza di dispensazione)
- variabilità intrinseca degli operatori

**ERROR POSSIBLE CAUSES / SUGGESTIONS****No colorimetric reaction**

- no conjugate pipetted reaction after addition
- contamination of conjugates and/or of substrate
- errors in performing the assay procedure (e.g. accidental pipetting of reagents in a wrong sequence or from the wrong vial, etc.)

**Too low reaction (too low ODs)**

- incorrect conjugate (e.g. not from original kit)
- incubation time too short, incubation temperature too low

**Too high reaction (too high ODs)**

- incorrect conjugate (e.g. not from original kit)
- incubation time too long, incubation temperature too high
- water quality for wash buffer insufficient (low grade of deionization)
- insufficient washing (conjugates not properly removed)

**Unexplainable outliers**

- contamination of pipettes, tips or containers
- insufficient washing (conjugates not properly removed) too high within-run
- reagents and/or strips not pre-warmed to CV% Room Temperature prior to use
- plate washer is not washing correctly (suggestion: clean washer head)
- too high between-run - incubation conditions not constant (time, CV % temperature)
- controls and samples not dispensed at the same time (with the same intervals) (check pipetting order)
- person-related variation

**ERROR / POSIBLES CAUSAS / SUGERENCIAS****No se produce ninguna reacción colorimétrica del ensayo**

- no se ha dispensado el conjugado
- contaminación del conjugado y/o del sustrato
- errores en la ejecución del ensayo (p. ej., dispensación accidental de los reactivos en orden incorrecto o procedentes de frascos equivocados, etc.)

**Reacción escasa (DO demasiado bajas)**

- conjugado no idóneo (p. ej., no procedente del kit original)
- tiempo de incubación demasiado corto, temperatura de incubación demasiado baja

**Reacción demasiado intensa (DO demasiado altas)**

- conjugado no idóneo (p. ej., no procedente del kit original)
- tiempo de incubación demasiado largo, temperatura de incubación demasiado alta
- calidad escasa del agua usada para la solución de lavado (bajo grado de desionización)
- lavados insuficientes (el conjugado no se ha retirado completamente)

**Valores inexplicablemente fuera de escala**

- contaminación de pipetas, puntas o contenedores- lavados insuficientes (el conjugado no se ha retirado completamente)

**CV% intraensayo elevado**

- los reactivos y/o tiras no se encontraban a temperatura ambiente antes del uso
- el lavador de microplacas no funciona correctamente (sugerencia: limpiar el cabezal del lavador)

**CV% interensayo elevado**

- condiciones de incubación no constantes (tiempo o temperatura)
- controles y muestras no dispensados al mismo tiempo (con los mismos intervalos) (controlar la secuencia de dispensación)
- variación en función de los operadores

**ERREUR CAUSES POSSIBLES / SUGGESTIONS****Aucune réaction colorimétrique de l'essai**

- non distribution du conjugué
- contamination du conjugué et/ou du substrat
- erreurs dans l'exécution du dosage (par ex., distribution accidentelle des réactifs dans le mauvais ordre ou en provenance des mauvais flacons, etc.)

**Réaction trop faible (DO trop basse)**

- conjugué non approprié (par ex., ne provenant pas du coffret original)
- temps d'incubation trop court, température d'incubation trop basse

**Réaction trop intense (DO trop élevée)**

- conjugué non approprié (par ex., ne provenant pas du coffret original)
- temps d'incubation trop long, température d'incubation trop élevée
- mauvaise qualité de l'eau utilisée pour la solution de lavage (bas degré de déionisation)
- lavages insuffisants (conjugué non entièrement éliminé)

**Valeurs inexplicablement hors plage**

- contamination des pipettes, embouts ou récipients - lavages insuffisants (conjugué non entièrement éliminé)

**CV% intra-essai élevé**

- les réactifs et/ou les bandes n'ont pas atteint la température ambiante avant usage
- le laveur de microplaques ne lave pas correctement (suggestion : nettoyer la tête du laveur)

**CV% inter-essai élevé**

- conditions d'incubation non constantes (temps ou température)
- contrôles et échantillons non distribués en même temps (avec les mêmes intervalles) (contrôler l'ordre de distribution)
- variabilité intrinsèque des opérateurs