

Instructions for use
Cortisol ELISA

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

REF**MS E-5000****IVD****CE**

INTRODUCTION

The **Cortisol Enzyme Immunoassay Kit** provides materials for the quantitative determination of Cortisol in serum and plasma.

This assay is intended for in vitro diagnostic use only.

Cortisol (hydrocortisone, compound F) is the main corticosteroid secreted in humans by the adrenal cortex. This steroid hormone has a molecular weight of 363.5.

In most physiological conditions, only about 10% of plasma cortisol circulates unbound from transcortin and albumin. Among the products of the human adrenal cortex, only cortisol is involved in the regulation of ACTH secretion.

As the level of free (non-protein bound) cortisol in blood rises, the release of ACTH is inhibited by the negative feedback effect. Conversely, if cortisol levels are subnormal, the negative feedback decreases, ACTH levels rise, and the adrenal cortex secretes cortisol until normal blood levels are restored.

The release of ACTH is under control of hypothalamic corticotrophin-releasing hormone (CRH); the negative feedback system involving cortisol has been identified at both hypothalamic and pituitary levels. (1).

Normally during the day there is a fluctuation of cortisol achieving the highest level in the morning and the lowest in the night. Useful information is given when cortisol measurement is done in samples withdrawn at a fixed hour (8.00 a.m.).

The main biological effects of cortisol are: promotion of gluconeogenesis, deposition of liver glycogen, increase in blood glucose concentration when the carbohydrate utilization is reduced, effect on fat metabolism and anti-inflammatory action.

Cortisol measurement is a powerful tool for the evaluation of suspected abnormalities in glucocorticoid production: Cushing's Syndrome (hypercortisolism), Addison's disease or secondary adrenal insufficiency (hypocortisolism). In many cases, it is necessary to perform dynamic tests (suppression or stimulation) in order to localize the defect at one of the three main levels (i.e. adrenal, pituitary, hypothalamus).

PRINCIPLE OF THE TEST

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

The microtiter wells are coated with a monoclonal antibody directed towards an antigenic site on the Cortisol molecule. Endogenous Cortisol of a patient sample competes with a Cortisol-horseradish peroxidase conjugate for binding to the coated antibody. After incubation the unbound conjugate is washed off.

The amount of bound peroxidase conjugate is inversely proportional to the concentration of Cortisol in the sample. After addition of the substrate solution, the intensity of colour developed is inversely proportional to the concentration of Cortisol in the patient sample.

PRECAUTIONS

- This kit is for in vitro diagnostic use only.
- For information on hazardous substances included in the kit please refer to Material Safety Data Sheets.
- All reagents of this test kit which contain human serum or plasma have been tested and confirmed negative for HIV I/II, HBsAg and HCV by FDA approved procedures. All reagents, however, should be treated as potential biohazards in use and for disposal.
- Avoid contact with *Stop Solution* containing 0.5 M H₂SO₄. It may cause skin irritation and burns.
- Never pipet by mouth and avoid contact of reagents and specimens with skin and mucous membranes.
- Do not smoke, eat, drink or apply cosmetics in areas where specimens or kit reagents are handled.
- Wear disposable latex gloves when handling specimens and reagents. Microbial contamination of reagents or specimens may give false results.
- Handling should be in accordance with the procedures defined by an appropriate national biohazard safety guideline or regulation.
- Do not use reagents beyond expiry date as shown on the kit labels.
- All indicated volumes have to be performed according to the protocol. Optimal test results are only obtained when using calibrated pipettes and microtiterplate readers.
- Do not mix or use components from kits with different lot numbers. It is advised not to exchange wells of different plates even of the same lot. The kits may have been shipped or stored under different conditions and the binding characteristics of the plates may result slightly different.
- Chemicals and prepared or used reagents have to be treated as hazardous waste according the national biohazard safety guideline or regulation.
- Safety Data Sheets for this product are available upon request directly from the manufacturer. The Safety Data Sheets fit the demands of: EU-Guideline 91/155 EC.

KIT COMPONENTS

Contents of the Kit

96 MS E-5031 Microtiterwells

12x8 (break apart) strips, 96 wells;
Wells coated with a anti-Cortisol antibody (monoclonal).

Standards

	Cat. no.	Standard	Concentration	Volume/Vial
STANDARD A	MS E-5001	Standard A (0)	0 ng/mL	1 ml
STANDARD B	MS E-5002	Standard B (1)	20 ng/mL	1 ml
STANDARD C	MS E-5003	Standard C (2)	50 ng/mL	1 ml
STANDARD D	MS E-5004	Standard D (3)	100 ng/mL	1 ml
STANDARD E	MS E-5005	Standard E (4)	200 ng/mL	1 ml
STANDARD F	MS E-5006	Standard F (5)	400 ng/mL	1 ml
STANDARD G	MS E-5007	Standard G (6)	800 ng/mL	1 ml

ready to use
corresponding to 0, 55.2, 138, 276, 552, 1104, 2208 nmol/L.
Conversion factor: 1 ng/mL = 2.76 nmol/l.
contain 0.3% Proclin as a preservative

CONJUGATE MS E-5040 Enzyme Conjugate

1 vial, 25 mL, ready to use;
Cortisol conjugated to horseradish Peroxidase;
contains 0.3% Proclin as a preservative.

SUBSTRATE FR E-0055 Substrate Solution

1 vial, 14 mL, ready to use;
Tetramethylbenzidine (TMB).

STOP-SOLN FR E-0080 Stop Solution

1 vial, 14 mL, ready to use;
contains 0.5M H₂SO₄.
Avoid contact with the stop solution. It may cause skin irritations and burns.

WASH-CONC 40x FR E-0030 Wash Solution

1 vial, 30 mL (40X concentrated);
see „Preparation of Reagents“.

Note: Additional Standard A for sample dilution is available upon request.

Equipment and material required but not provided

- A microtiter plate calibrated reader (450±10 nm)
- Calibrated variable precision micropipettes.
- Absorbent paper.
- Aqua dest.

Storage and stability of the Kit

When stored at 2-8°C unopened reagents will retain reactivity until expiration date. Do not use reagents beyond this date.

Opened reagents must be stored at 2-8°C. Microtiter wells must be stored at 2-8°C. Once the foil bag has been opened, care should be taken to close it tightly again.

Preparation of Reagents

Allow all reagents and required number of strips to reach room temperature prior to use.

Wash Solution

Dilute 30 mL of concentrated Wash Solution with 1170 mL deionized water to a final volume of 1200 mL.
The diluted Wash Solution is stable for 2 weeks at room temperature.

Disposal of the Kit

The disposal of the kit must be made according to the national regulations. Special information for this product is given in the Material Safety Data Sheets (see chapter 13).

Damaged Test Kits

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

SPECIMEN

Serum or plasma (EDTA-, Heparin- or citrate plasma) can be used in this assay.
Do not use haemolytic, icteric or lipaemic specimens.
Please note: Samples containing sodium azide should not be used in the assay.

Specimen Collection

Serum:

Collect blood by venipuncture (e.g. Sarstedt Monovette # 02.1388.001), allow to clot, and separate serum by centrifugation at room temperature. Do not centrifuge before complete clotting has occurred. Patients receiving anticoagulant therapy may require increased clotting time.

Plasma:

Whole blood should be collected into centrifuge tubes containing anti coagulant and centrifuged immediately after collection.

(E.g. for EDTA plasma Sarstedt Monovette – red cap - # 02.166.001; for Heparin plasma Sarstedt Monovette – orange cap - # 02.165.001; for Citrate plasma Sarstedt Monovette – green cap - # 02.167.001.)

Specimen Storage

Specimens should be capped and may be stored for up to 5 days at 2-8°C prior to assaying.
Specimens held for a longer time should be frozen only once at -20°C prior to assay. Thawed samples should be inverted several times prior to testing.

Specimen Dilution

If in an initial assay, a specimen is found to contain more than the highest standard, the specimens can be diluted with *Standard A* and reassayed as described in Assay Procedure.

For the calculation of the concentrations this dilution factor has to be taken into account.

Example:

- a) Dilution 1:10: 10 µL Serum + 90 µL *Standard A* (mix thoroughly)
- b) Dilution 1:100: 10 µL dilution a) 1:10 + 90 µL *Standard A* (mix thoroughly).

TEST PROCEDURE

General Remarks

- All reagents and specimens must be allowed to come to room temperature before use. All reagents must be mixed without foaming.
- Once the test has been started, all steps should be completed without interruption.
- Use new disposal plastic pipette tips for each standard, control or sample in order to avoid cross contamination.
- Absorbance is a function of the incubation time and temperature. Before starting the assay, it is recommended that all reagents are ready, caps removed, all needed wells secured in holder, etc. This will ensure equal elapsed time for each pipetting step without interruption.
- As a general rule the enzymatic reaction is linearly proportional to time and temperature.

Assay Procedure

Each run must include a standard curve.

1. Secure the desired number of Microtiter wells in the holder.
2. Dispense 20 µL of each <i>Standard</i> , <i>Control</i> and samples <u>with new disposable tips</u> into appropriate wells.
3. Dispense 200 µL <i>Enzyme Conjugate</i> into each well.
4. Thoroughly mix for 10 seconds. It is important to have a complete mixing in this step.
5. Incubate for 60 minutes at room temperature (without covering the plate).
6. Briskly shake out the contents of the wells. Rinse the wells 3 times with diluted <i>Wash Solution</i> (400 µL per well). Strike the wells sharply on absorbent paper to remove residual droplets. Important note: The sensitivity and precision of this assay is markedly influenced by the correct performance of the washing procedure!
7. Add 100 µL of <i>Substrate Solution</i> to each well.
8. Incubate for 15 minutes at room temperature.
9. Stop the enzymatic reaction by adding 100 µL of <i>Stop Solution</i> to each well.
10. Read the OD at 450±10 nm with a microtiter plate reader within 10 minutes after adding the <i>Stop Solution</i> .

Calculation of Results

1. Calculate the average absorbance values for each set of standards, controls and patient samples.
2. Construct a standard curve by plotting the mean absorbance obtained from each standard against its concentration with absorbance value on the vertical(Y) axis and concentration on the horizontal (X) axis.
3. Using the mean absorbance value for each sample determine the corresponding concentration from the standard curve.
4. Automated method: The results in the IFU have been calculated automatically using a 4 PL (4 Parameter Logistics) curve fit. Other data reduction functions may give slightly different results.
5. The concentration of the samples can be read directly from this standard curve. Samples with concentrations higher than that of the highest standard have to be further diluted. For the calculation of the concentrations this dilution factor has to be taken into account.

Below is listed a typical example of a standard curve with the Cortisol ELISA.

Standard	Optical Units (450 nm)
Standard A (0 ng/mL)	2.30
Standard B (20 ng/mL)	1.67
Standard C (50 ng/mL)	1.24
Standard D (100 ng/mL)	0.87
Standard E (200 ng/mL)	0.57
Standard F (400 ng/mL)	0.35
Standard G (800 ng/mL)	0.23

EXPECTED VALUES

It is strongly recommended that each laboratory should determine its own normal and abnormal values.

Cortisol values in serum or plasma ranges

from 50 ng/mL to 230 ng/mL (138-635 nmol/L) between 8:00 - 10:00 a.m., and

from 30 ng/mL to 150 ng/mL (82.8-414 nmol/L) at 4:00 p.m.

These values are from Tietz's Textbook (2) and may be used as main guideline.

ASSAY CHARACTERISTICS

Assay Dynamic Range

The range of the assay is between 0 – 800 ng/mL.

Specificity of Antibodies (Cross Reactivity)

The following substances were tested for cross reactivity of the assay:

Steroid	Cross reactivity
Cortisol	100 %
Corticosterone	45 %
Progesteron	9 %
Deoxycortisol	< 2 %
Dexamethasone	< 2 %
Estrone	< 0.01 %
Estriol	< 0.01 %
Testosterone	< 0.01 %

Analytical Sensitivity

The analytical sensitivity was calculated from the mean minus two standard deviations of twenty (20) replicate analyses of *Standard A* and was found to be 2.5 ng/mL (6.9 nmol/L).

Precision

Intra Assay Variation

The within assay variability is shown below:

Sample	n	Mean (ng/mL)	CV (%)
1	20	43.5	8.1
2	20	226.5	3.2
3	20	403.6	5.6

Inter Assay Variation

The between assay variability is shown below:

Sample	Mean (ng/mL)	CV (%)
1	55	6.6
2	209	7.7
3	361	6.5

Accuracy

Quality Control

It is recommended to use control samples according to state and federal regulations. The use of control samples is advised to assure the day to day validity of results. Use controls at both normal and pathological levels.

The controls and the corresponding results of the QC-Laboratory are stated in the QC certificate added to the kit. The values and ranges stated on the QC sheet always refer to the current kit lot and should be used for direct comparison of the results.

It is also recommended to make use of national or international Quality Assessment programs in order to ensure the accuracy of the results.

Employ appropriate statistical methods for analysing control values and trends. If the results of the assay do not fit to the established acceptable ranges of control materials patient results should be considered invalid.

In this case, please check the following technical areas: Pipetting and timing devices; photometer, expiration dates of reagents, storage and incubation conditions, aspiration and washing methods.

After checking the above mentioned items without finding any error contact your distributor or the manufacturer directly.

Recovery

Samples have been spiked by adding Cortisol solutions with known concentrations in a 1:1 ratio. The expected values were calculated by addition of half of the values determined for the undiluted samples and half of the values of the known solutions. The % Recovery has been calculated by multiplication of the ratio of the measurements and the expected values with 100.

Sample	Added Concentration 1:1 (v/v) (ng/mL)	Measured Conc. (ng/mL)	Expected Conc. (ng/mL)	Recovery (%)
1	--	57	57.0	100
	200	110	128.5	86
	400	216	228.5	95
	800	436	428.5	102
2	--	240	240	100
	200	210	220	95
	400	356	320	111
	800	514	520	99
3	--	378	378	100
	200	263	289	91
	400	355	389	91
	800	558	589	95

Linearity

Sample	Dilution	Mean Conc. (ng/mL)	Recovery (%)
1	None	48.0	--
	1:2	22.0	92
	1:4	12.9	108
	1:8	6.0	100
	1:16	3.3	110
2	None	255.0	--
	1:2	118.0	93
	1:4	63.1	99
	1:8	34.2	107
	1:16	15.9	100
3	None	427	--
	1:2	190	89
	1:4	97	91
	1:8	50	94
	1:16	25	94

LIMITATIONS OF USE

Interfering Substances

Any improper handling of samples or modification of this test might influence the results. Haemoglobin (up to 4 mg/mL), Bilirubin (up to 0.5 mg/mL) and Triglyceride (up to 7.5 mg/mL) have no influence on the assay results.

Drug Interferences

Until today no substances (drugs) are known to us, which have an influence to the measurement of Cortisol in a sample.

High-Dose-Hook Effect

No hook effect was observed in this test.

LEGAL ASPECTS

Reliability of Results

The test must be performed exactly as per the manufacturer's instructions for use. Moreover the user must strictly adhere to the rules of GLP (Good Laboratory Practice) or other applicable national standards and/or laws. This is especially relevant for the use of control reagents. It is important to always include, within the test procedure, a sufficient number of controls for validating the accuracy and precision of the test.

The test results are valid only if all controls are within the specified ranges and if all other test parameters are also within the given assay specifications. In case of any doubt or concern please contact the manufacturer.

Therapeutical Consequences

Therapeutical consequences should never be based on laboratory results alone even if all test results are in agreement with the items as stated under point "Reliability of Results". Any laboratory result is only a part of the total clinical picture of a patient.

Only in cases where the laboratory results are in acceptable agreement with the overall clinical picture of the patient should therapeutical consequences be derived.

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

Liability

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

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

REFERENCES

1. L. Thomas, Labor und Diagnose, 4. Auflage, 1992
2. Tietz, N.W., Textbook of Clinical Chemistry, Saunders, 1968

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

Symbols:

	Storage temperature		Manufacturer		Contains sufficient for <n> tests
	Expiry date		Batch code		For in-vitro diagnostic use only!
	Consult instructions for use		Content		CE labelled
	Caution		Catalogue number		For research use only!

EINLEITUNG

Der **Cortisol ELISA** wird zur quantitativen Bestimmung von Cortisol in Serum und Plasma eingesetzt.
Nur für In-vitro Diagnostik.

TESTPRINZIP

Der Cortisol ELISA ist ein Festphasen-Enzymimmunoassay, der auf dem Prinzip der kompetitiven Bindung basiert.

Die Wells der Mikrotiterplatten sind mit einem monoklonalen Antikörper beschichtet, der gegen eine Antikörper-Bindungsstelle des Cortisol-Moleküls gerichtet ist.

Die Proben werden in die beschichteten Wells gegeben und zusammen mit einem Cortisol-Enzymkonjugat inkubiert. Während der Inkubation konkurriert das Cortisol aus der Probe mit dem Cortisol-Enzymkonjugat um die freien Bindungsstellen auf den beschichteten Wells.

Das nicht gebundene Konjugat wird durch Waschen der Wells entfernt. Anschließend wird die Substratlösung zugegeben und die Farbentwicklung nach einer definierten Zeit gestoppt.

Die Intensität der gebildeten Farbe ist umgekehrt proportional der Cortisol -Konzentration in der Probe. Die Extinktion wird bei 450 nm mit einem Mikrotiterplattenleser gemessen.

VORSICHTSMAßNAHMEN

- Dieser Kit ist nur zum in vitro diagnostischen Gebrauch geeignet.
- Informationen zu im Kit enthaltenen gefährlichen Substanzen entnehmen Sie bitte dem Materialsicherheitsdatenblatt.
- Alle Bestandteile dieses Testkits, die humanes Serum oder Plasma enthalten, wurden mit FDA-geprüften Methoden auf HIV I/II, HbsAg und HCV getestet und als negativ bestätigt. Jedoch sollten alle Bestandteile im Umgang und bei der Entsorgung wie mögliche Gefahrenstoffe betrachtet werden.
- Der Kontakt mit der *Stop Solution* sollte vermieden werden, da sie 0.5 M H₂SO₄ enthält. Schwefelsäure kann Hautreizungen und Verbrennungen verursachen.
- Nicht mit dem Mund pipettieren und den Kontakt von Kitbestandteilen und Proben mit Haut und Schleimhäuten vermeiden.
- In den Bereichen, in denen Proben oder Kitbestandteile verwendet werden, nicht rauchen, essen oder Kosmetika verwenden.
- Beim Umgang mit Proben oder Reagenzien Einweg-Latexhandschuhe tragen. Die Verunreinigung von Reagenzien oder Proben mit Mikroben kann zu falschen Ergebnissen führen.
- Der Gebrauch sollte gemäß der Vorschriften einer entsprechenden nationalen Gefahrenstoff-Sicherheitsrichtlinie erfolgen.
- Reagenzien nicht nach dem auf dem Kit-Etikett angegebenen Verfallsdatum verwenden.
- Alle im Kit-Protokoll angegebenen Mengen müssen genau eingehalten werden. Optimale Ergebnisse können nur durch Verwendung kalibrierter Pipetten und Mikrotiterplatten-Lesegeräte erreicht werden.
- Komponenten von Kits mit unterschiedlichen Lotnummern nicht untereinander vertauschen. Es wird empfohlen, keine Wells von verschiedenen Platten zu verwenden, auch nicht, wenn es sich um das gleiche Lot handelt. Die Kits können unter anderen Bedingungen gelagert oder versendet worden sein, so dass die Bindungscharakteristik der Platten leicht unterschiedlich ausfällt.
- Chemikalien und zubereitete oder bereits benutzte Reagenzien müssen gemäß den nationalen Gefahrenstoffvorschriften wie gefährlicher Abfall behandelt werden.
- Materialsicherheitsdatenblätter für dieses Produkt sind auf Anfrage direkt von der Firma DRG Instruments GmbH erhältlich. Die Materialsicherheitsdatenblätter entsprechen den Verordnungen der EU-Richtlinie 91/155 EC.

BESTANDTEILE DES KITS**Kitinhalt**

 96 **MS E-5031 Microtiterwells**

96 Wells, 12x8 Wells (einzeln brechbar);
mit anti- Cortisol -Antikörper (monoklonal) beschichtet.

Standards

	Artikelnr.	Standard	Konzentration	Volumen/Flasche
STANDARD A	MS E-5001	Standard A (0)	0 ng/mL	1 ml
STANDARD B	MS E-5002	Standard B (1)	20 ng/mL	1 ml
STANDARD C	MS E-5003	Standard C (2)	50 ng/mL	1 ml
STANDARD D	MS E-5004	Standard D (3)	100 ng/mL	1 ml
STANDARD E	MS E-5005	Standard E (4)	200 ng/mL	1 ml
STANDARD F	MS E-5006	Standard F (5)	400 ng/mL	1 ml
STANDARD G	MS E-5007	Standard G (6)	800 ng/mL	1 ml

gebrauchsfertig;
entsprechend 0, 55,2, 138, 276, 552, 1104, 2208 nmol/L.
Umrechnungsfaktor: 1 ng/mL = 2.76 nmol/L.
Enthält 0,3% Proclin als Konservierungsstoff.

CONJUGATE **MS E-5040 Enzyme Conjugate** (Enzymkonjugat)

1 Fläschchen, 25 mL, gebrauchsfertig;
Cortisol mit Meerrettichperoxidase konjugiert.
Enthält 0,3% Proclin als Konservierungsstoff.

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

1 Fläschchen, 14 mL, gebrauchsfertig;
Substratlösung TMB.

STOP-SOLN **FR E-0080 Stop Solution** (Stopplösung)

1 Fläschchen, 14 mL, gebrauchsfertig;
Enthält 0,5M H₂SO₄.
Kontakt mit der Stopplösung vermeiden! Kann Hautreizungen und Verbrennungen verursachen.

WASH-CONC 40x **FR E-0030 Wash Solution** (Waschlösung)

40X konzentriert, 1 Fläschchen, 30 mL;
Siehe „Vorbereitung der Reagenzien“.

Anmerkung: Zusätzlicher *Standard A* zur Probenverdünnung ist auf Anfrage erhältlich.

Nicht im Kit enthaltene aber erforderliche Geräte und Materialien

- Kalibriertes Mikrotiterplattenlesegerät mit 450±10 nm Filter), (z.B. das DRG Instruments Mikrotiterplattenlesegerät)
- Kalibrierte variable Präzisions-Mikropipette
- Saugfähiges Papier
- Aqua dest.

Lagerung und Haltbarkeit des Kits

Die ungeöffneten Reagenzien behalten bei Lagerung um 2-8°C ihre Reaktivität bis zum Verfallsdatum. Nach dem Verfallsdatum die Reagenzien nicht mehr verwenden.
Nach dem Öffnen sollten alle Reagenzien bei 2-8°C gelagert werden.
Die Mikrotiterwells sollten bei 2-8°C gelagert werden. Der einmal geöffnete Folienbeutel sollte stets sehr sorgfältig wieder verschlossen werden.

Vorbereitung der Reagenzien

Alle Reagenzien sowie die benötigte Anzahl von Wells sollen vor dem Gebrauch auf Raumtemperatur gebracht werden.

Wash Solution

Die 40-fach konzentrierte Waschlösung (30 mL) mit 1170 mL destilliertem Wasser auf ein Gesamtvolumen von 1200 mL verdünnen.

Die verdünnte Waschlösung ist bei Raumtemperatur für 2 Wochen stabil.

Entsorgung des Kits

Die Entsorgung des Kits muss gemäß den nationalen gesetzlichen Vorschriften erfolgen. Spezielle Informationen für dieses Produkt finden Sie im Materialsicherheitsdatenblatt, Kapitel 13.

Beschädigte Testkits

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

PROBENVORBEREITUNG

Serum oder Plasma (EDTA-, Heparin- oder Zitratplasma) kann in diesem Test als Probenmaterial eingesetzt werden.

Lipämische, ikterische und/oder stark hämolysierte Proben sollten nicht verwendet werden.

Achtung: Proben, die Natriumazid enthalten, sollten nicht verwendet werden.

Probenentnahme

Serum:

Blut durch Venenpunktion entnehmen (z.B. mit Sarstedt Monovette # 02.1388.001), gerinnen lassen und das Serum durch Zentrifugation bei Raumtemperatur abtrennen. Vor der Zentrifugation muss die Gerinnung vollständig abgeschlossen sein. Bei Patienten, die Antikoagulantien erhalten, kann die Gerinnungszeit länger dauern.

Plasma:

Die Blutentnahme erfolgt mit Röhren, die ein Antikoagulans enthalten. Das Plasma wird als Überstand nach einer Zentrifugation gewonnen.

(z.B. für EDTA-Plasma Sarstedt Monovette – roter Deckel - # 02.166.001;

für Heparinplasma Sarstedt Monovette – oranger Deckel - # 02.165.001;

für Zitratplasma Sarstedt Monovette – grüner Deckel - # 02.167.001.)

Probenaufbewahrung

Proben sollten stets gut verschlossen sein und können vor Testbeginn bis zu 5 Tage bei 2-8°C gelagert werden. Für eine längere Aufbewahrung sollten die Proben eingefroren bei -20°C bis zum Testbeginn gelagert werden. Nur einmal einfrieren. Aufgetaute Proben sollten vor Testbeginn vorsichtig durchmischt werden, ohne Schaumbildung.

Probenverdünnung

Wenn in einem ersten Testdurchlauf bei einer Probe eine Konzentration höher als der höchste Standard gefunden wird, kann diese Probe mit *Standard A* weiter verdünnt und nochmals bestimmt werden. Die Verdünnung muss jedoch bei der Berechnung der Konzentration beachtet werden.

Beispiel:

a) Verdünnung 1:10: 10 µL Serum + 90 µL Standard A (gründlich mischen)

b) Verdünnung 1:100: 10 µL Verdünnung a) 1:10 + 90 µL Standard A (gründlich mischen).

TESTDURCHFÜHRUNG

Allgemeine Hinweise

Alle Reagenzien und Proben müssen vor Gebrauch auf Raumtemperatur gebracht und gut durchgemischt werden. Dabei sollte Schaumbildung vermieden werden.

Wenn die Testdurchführung einmal begonnen wurde, muss sie ohne Unterbrechung zu Ende geführt werden.

Für jeden Standard, jede Kontrolle oder Probe eine neue Plastikspitze verwenden, um Verschleppungen zu vermeiden.

Die Optische Dichte ist abhängig von Inkubationszeit und Temperatur. Deshalb ist es notwendig, vor Beginn der Testdurchführung alle Reagenzien in einen arbeitsbereiten Zustand zu bringen, die Deckel der Fläschchen zu öffnen, alle benötigten Wells in den Halter zu setzen. Nur eine solche Vorbereitung garantiert gleiche Zeiten für jeden Pipettiervorgang ohne Pausen.

Als generelle Regel gilt, dass die enzymatische Reaktion linear proportional zu Zeit und Temperatur ist.

Testdurchführung

Jeder Lauf muss eine Standardkurve beinhalten.

1. Die benötigte Anzahl Wells in der Halterung befestigen.
2. Je 20 µL Standards, Control und Proben <u>mit neuen Plastikspitzen</u> in die entsprechenden Wells geben.
3. 200 µL Enzyme Conjugate in jedes Well geben.
4. Für 10 Sekunden gut schütteln. Es ist sehr wichtig, in diesem Schritt eine komplette Durchmischung zu erreichen.
5. 60 Minuten bei Raumtemperatur inkubieren.
6. Den Inhalt der Wells kräftig ausschütteln. Wells 3mal mit verdünnter <i>Wash Solution</i> waschen. Verbleibende Flüssigkeit durch Ausklopfen der Wells auf saugfähigem Papier entfernen. Achtung: Die Sensitivität und Präzision dieses Assays wird erheblich beeinflusst von der korrekten Durchführung des Waschschruttes!
7. 100 µL Substrate Solution in jedes Well geben.
8. 15 Minuten bei Raumtemperatur inkubieren.
9. Die enzymatische Reaktion durch Zugabe von 100 µL Stop Solution in jedes Well abstoppen.
10. Die Optische Dichte bei 450±10 nm mit einem Mikrotiterplatten-Lesegerät innerhalb von 10 Minuten nach Zugabe der <i>Stop Solution</i> bestimmen.

Ergebnisermittlung

- Die durchschnittlichen Werte der Optischen Dichte (OD) für jedes Set von Standards, Controls und Patientenproben bestimmen.
- Eine Standardkurve ermitteln durch Auftragen der mittleren Optischen Dichte jedes Standards gegen die Konzentration, wobei der OD-Wert auf der vertikalen (Y) Achse und die Konzentration auf der horizontalen (X) Achse eingetragen wird.
- Unter Verwendung der mittleren OD wird für jede Probe die entsprechende Konzentration aus der Standardkurve ermittelt.
- Automatische Methode: Die in der Arbeitsanleitung ermittelten Werte wurden automatisch mit Hilfe der 4 Parameter Gleichung (4PL, 4 Parameter Logistics, 4 Parameter Rodbard) bestimmt. Andere Auswertungsfunktionen können leicht abweichende Werte ergeben.
- Die Konzentration der Proben kann direkt von der Standardkurve abgelesen werden. Proben, die eine höhere Konzentration als die des höchsten Standards enthalten, müssen verdünnt werden. Dieser Verdünnungsfaktor muss bei der Berechnung der Konzentration beachtet werden.

Nachfolgend wird ein typisches Beispiel für eine Standardkurve mit dem Cortisol ELISA gezeigt:

Standard	Optische Dichte (450nm)
Standard 0 (0 ng/mL)	2,30
Standard 1 (20 ng/mL)	1,67
Standard 2 (50 ng/mL)	1,24
Standard 3 (100 ng/mL)	0,87
Standard 4 (200 ng/mL)	0,57
Standard 5 (400 ng/mL)	0,35
Standard 6 (800 ng/mL)	0,23

ERWARTETE WERTE

Es wird empfohlen, dass jedes Labor seine eigenen normalen und abnormalen Werte ermittelt.

Die folgenden Normalwerte nach Tietzes "Textbook of Clinical Chemistry" (2) können als Richtwerte gelten. Wegen der zirkadianen Rhythmik des Plasma-Cortisols kann der Normalbereich nur für eine definierte Tageszeit angegeben werden.

Morgens (8.00 - 10.00 Uhr): 50 - 230 ng/mL (138 - 635 nmol/l)
Nachmittags (16.00 Uhr): 30 - 150 ng/mL (82,8 - 414 nmol/l)

ASSAY CHARACTERISTIKA

Messbereich

Der Messbereich des Testes liegt zwischen 0 – 800 ng/mL.

Spezifität der Antikörper (Kreuzreaktivität)

Die Daten entnehmen Sie bitte der ausführlichen englischen Arbeitsanleitung.

Analytische Sensitivität

Die analytische Sensitivität, definiert als Mittelwert minus der zweifachen Standardabweichung des Standards 0 (n = 20), beträgt 2,5 ng/mL (6,9 nmol/L).

Präzision

Die Daten entnehmen Sie bitte der ausführlichen englischen Arbeitsanleitung.

Testgenauigkeit

Qualitäts-Kontrolle

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

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

Es wird ebenfalls empfohlen, an nationalen oder internationalen Qualitätssicherungs-Programmen teilzunehmen, um die Genauigkeit der Ergebnisse zu sichern.

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

In diesem Fall überprüfen Sie bitte die folgenden Bereiche: Pipetten und Zeitnehmer, Photometer, Verfallsdatum der Reagenzien, Lagerungs- und Inkubationsbedingungen, Absaug- und Waschmethode.

Sollten Sie nach Überprüfung der vorgenannten Bereiche keinen Fehler erkannt haben, setzen Sie sich bitte mit Ihrem Lieferanten oder direkt mit dem Hersteller in Verbindung.

Die Daten zu:

Wiederfindung

Linearität

entnehmen Sie bitte der ausführlichen englischen Arbeitsanleitung.

GRENZEN DES TESTS

Interferenzen

Jede unsachgemäße Behandlung von Proben oder Modifikationen dieses Tests können die Ergebnisse beeinflussen.

Hämoglobin (bis zu 4 mg/mL), Bilirubin (bis zu 0,5 mg/mL) und Triglyceride (bis zu 7,5 mg/mL) haben keinen Einfluss auf das Testergebnis.

Beeinflussung durch Medikamente

Uns sind bislang keine Stoffe (Medikamente) bekannt geworden, deren Einnahme die Messung des Cortisol-Gehaltes der Probe beeinflussen würde.

High-Dose-Hook Effekt

Ein Hook Effekt tritt in diesem Test nicht auf.

RECHTLICHE GRUNDLAGEN

Zuverlässigkeit der Ergebnisse

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

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

Therapeutische Konsequenzen

Therapeutische Konsequenzen sollten keinesfalls nur aufgrund von Laborergebnissen erfolgen, selbst dann nicht, wenn alle Testergebnisse mit den in „Zuverlässigkeit der Ergebnisse“ genannten Voraussetzungen übereinstimmen. Jedes Laborergebnis ist nur ein Teil des klinischen Gesamtbildes eines Patienten.

Nur in Fällen, in denen die Laborergebnisse in akzeptabler Übereinstimmung mit dem allgemeinen klinischen Bild des Patienten stehen, sollten therapeutische Konsequenzen eingeleitet werden.

Das Testergebnis allein sollte niemals als alleinige Grundlage für die Einleitung therapeutischer Konsequenzen dienen.

Haftung

Jegliche Veränderungen des Testkits und/oder Austausch oder Vermischung von Komponenten unterschiedlicher Chargen von einem Testkit zu einem anderen, können die gewünschten Ergebnisse und die Gültigkeit des gesamten Tests negativ beeinflussen. Solche Veränderungen und/oder Austausch haben den Ausschluss jeglicher Ersatzansprüche zur Folge.

Reklamationen, die aufgrund von Falschinterpretation von Laborergebnissen durch den Kunden gemäß Punkt „Therapeutische Konsequenzen“ erfolgen, sind ebenfalls abzuweisen. Im Falle jeglicher Reklamation ist die Haftung des Herstellers maximal auf den Wert des Testkits beschränkt. Jegliche Schäden, die während des Transports am Kit entstanden sind, unterliegen nicht der Haftung des Herstellers.

REFERENZEN

Angaben zu den Referenzen entnehmen Sie bitte der ausführlichen englischen Arbeitsanleitung.

Symbole:

	Lagertemperatur		Hersteller		Enthält Testmaterial für <n> Teste
	Verwendbar bis	LOT	Chargennummer	IVD	In vitro Diagnostikum
	Vor Gebrauch Packungsbeilage lesen	CONT	Inhalt	CE	CE gekennzeichnet
	Achtung	REF	Katalog-Nummer	RUO	Nur für Forschungszwecke