



Cortisol

DPC®

Coat-A-Count® Cortisol

English

Intended Use: Coat-A-Count Cortisol is a radioimmunoassay designed for the quantitative measurement of cortisol (hydrocortisone, Compound F) in serum, urine and heparinized plasma. It is intended strictly for *in vitro* diagnostic use as an aid in the clinical assessment of adrenal status.

Catalog numbers: **TKCO1** (100 tubes), **TKCO2** (200 tubes), **TKCO5** (500 tubes)



The 100-tube kit contains less than 5.5 microcuries (204 kilobecquerels) of radioactive ^{125}I cortisol; the 200-tube kit contains less than 11 microcuries (407 kilobecquerels); and the 500-tube kit contains less than 27.5 microcuries (1018 kilobecquerels).

Summary and Explanation

Cortisol (hydrocortisone, Compound F) is the most abundant circulating steroid and the major glucocorticoid secreted by the adrenal cortex. Physiologically effective in anti-inflammatory activity and blood pressure maintenance, cortisol is also involved in gluconeogenesis, calcium absorption and the secretion of gastric acid and pepsin.

As an indicator of adrenocortical function, measurement of blood cortisol levels is useful in the differential diagnosis of Addison's and Cushing's disease, hypopituitarism, and adrenal hyperplasia and carcinoma.⁴

A variety of stimulation and suppression tests — ACTH Stimulation, ACTH Reserve, Dexamethasone Suppression — can supply supportive information on adrenocortical function.^{4,5,6} Anomalous cortisol concentrations have been shown to exist in patients with acute infections, severe pain, diabetes mellitus or heart failure, and in women either pregnant or on estrogen therapy. In addition, certain virilizing syndromes and iatrogenic conditions raise other naturally occurring steroid levels to high (nonphysiologic) concentrations that may interfere with

assaying cortisol directly, unless a highly specific antiserum is used.

Principle of the Procedure

The Coat-A-Count Cortisol procedure is a solid-phase radioimmunoassay, wherein ^{125}I -labeled cortisol competes for a fixed time with cortisol in the patient sample for antibody sites. Because the antibody is immobilized to the wall of a polypropylene tube, simply decanting the supernatant suffices to terminate the competition and to isolate the antibody-bound fraction of the radiolabeled cortisol. Counting the tube in a gamma counter then yields a number, which converts by way of a calibration curve to a measure of the cortisol present in the patient sample.

Reagents to Pipet: 1

Total Incubation Time: 45 minutes.

Total Counts at Iodination: approximately 90,000 cpm.

Warnings and Precautions

For *in vitro* diagnostic use.

Reagents: Store at 2–8°C in a refrigerator designated for incoming radioactive materials. Dispose of in accordance with applicable laws.

Do not use reagents beyond their expiration dates.

Some components supplied in this kit may contain human source material and/or other potentially hazardous ingredients which necessitate certain precautions:

Follow universal precautions, and handle all components as if capable of transmitting infectious agents. Source materials derived from human blood were tested and found nonreactive for syphilis; for antibodies to HIV 1 and 2; for hepatitis B surface antigen; and for antibodies to hepatitis C.

Sodium azide, at concentrations less than 0.1 g/dL, has been added as a preservative. On disposal, flush with large volumes of water to prevent the buildup of potentially explosive metal azides in lead and copper plumbing.

Water: Use distilled or deionized water.

Radioactivity

A copy of any radioisotope license certificate (Specific or General) issued to a US customer must be on file with Diagnostic Products Corporation before kits or components containing radioactive material can be shipped. These radioactive materials may be acquired by any customer with the appropriate Specific license. Under a General license these radioactive materials may be acquired only by physicians, veterinarians in the practice of veterinary medicine, clinical laboratories and hospitals — and strictly for *in vitro* clinical or laboratory tests not involving external or internal administration of the radioactive material or its radiation to human beings or other animals. Its acquisition, receipt, storage, use, transfer and disposal are all subject to the regulations and a (General or Specific) license of the U.S. Nuclear Regulatory Commission or a State with which the NRC has entered into an agreement for the exercise of regulatory control.

Handle radioactive materials according to the requirements of your General or Specific license. To minimize exposure to radiation, the user should adhere to guidelines set forth in the National Bureau of Standards publication on the *Safe Handling of Radioactive Materials* (Handbook No. 92, issued March 9, 1964) and in subsequent publications issued by State and Federal authorities.

Wipe up spills promptly and decontaminate affected surfaces. Avoid generation of aerosols. Dispose of solid radioactive waste according to license requirements. General licensees (holders of NRC Form 483) may dispose of solid radioactive waste as nonradioactive waste, after removing labeling. Specific licensees (NRC Form 313) should refer to Title 10, Code of Federal Regulations, Part 20. Licensees in Agreement States should refer to the appropriate regulations of their own state. General licensees may dispose of liquid radioactive waste of the type contained in this product through a laboratory sink drain. Licensees must remove or deface labels from empty containers of radioactive materials before disposal of solid waste. Specific licensees may dispose of small quantities of liquid radioactive waste of the type used in this

product through a laboratory sink drain. Refer to the appropriate regulations applicable to your laboratory.

Materials Supplied: Initial Preparation

Cortisol Ab-Coated Tubes (TKCO1)

Polypropylene tubes coated with antibodies to cortisol and packaged in zip-lock bags. Protect from moisture, carefully resealing the bags after opening: stable at 2–8°C until the expiration date marked on the bag. Color: light blue.

TKCO1: 100 tubes. **TKCO2:** 200 tubes.

TKCO5: 500 tubes.

¹²⁵I Cortisol (TKCO2)

Iodinated cortisol with blocking agents for steroid-binding proteins, supplied in liquid form, ready to use. Each vial contains 105 mL. Stable at 2–8°C for at least 30 days after opening, or until the expiration date marked on the vial.

TKCO1: 1 vial. **TKCO2:** 2 vials.

TKCO5: 5 vials.

Cortisol Calibrators (TKCO3–8)

Cortisol calibrators, ready to use, in processed human serum. The zero calibrator vial A contains 2.0 mL, while the remaining calibrator vials B through F contain 1.0 mL each. Stable at 2–8°C for at least 30 days after opening, or until the expiration date marked on the vial. The life of the calibrators may be extended by freezing. Aliquot, if necessary, to avoid repeated freezing and thawing.

TKCO1: 1 set. **TKCO2:** 1 set.

TKCO5: 2 sets.

The calibrators contain, respectively, 0, 1, 5, 10, 20 and 50 micrograms of cortisol per deciliter (µg/dL) in processed human serum; equivalently, 0, 27.6, 138, 276, 552 and 1,380 nanomoles per liter (nmol/L). Intermediate calibration points can be obtained by mixing the calibrators in suitable proportions.

Materials Required But Not Provided

Gamma counter – compatible with standard 12×75 mm tubes

Vortex mixer

Urine Extraction

Tubes with caps – suitable for extraction with dichloromethane

Dichloromethane – spectrophotometric grade (also called methylene chloride)

Micropipets: 50 μ L and 500 μ L. The 50 μ L pipet should be of the positive-displacement type.

Evaporator with compressed nitrogen

Radioimmunoassay

Plain 12 $\times$ 75 mm polypropylene tubes — for use as NSB tubes, available from DPC

Micropipets: 25 μ L and 1.0 mL.

Waterbath — capable of maintaining 37°C. Neither an oven nor a heat block is suitable.

Foam decanting rack – available from DPC

Logit-log graph paper – available from DPC (catalog number: ZP797)

A tri-level, human serum-based immunoassay control, containing cortisol as one of over 25 assayed constituents, is available from DPC (catalog number: CON6).

Specimen Collection

Serum and Plasma

The patient need not be fasting, and no special preparations are necessary. Collect blood by venipuncture¹⁰ into plain (without anticoagulant) or heparinized tubes, and separate the serum or plasma from the cells. EDTA plasma is *not* acceptable. (See Alternate Sample Type section). Since cortisol exhibits a circadian rhythm, the time of collection should be noted.

The use of an ultracentrifuge is recommended to clear lipemic samples.

Hemolyzed samples may indicate mistreatment of a specimen before receipt by the laboratory; hence the results should be interpreted with caution.

Blood collection tubes from different manufacturers may yield differing values, depending on materials and additives, including gel or physical barriers, clot activators and/or anticoagulants. Coat-A-Count Cortisol has not been tested with all possible variations of tube types. Consult the section on Alternate Sample Types for details on tubes that have been tested.

Volume Required: 25 μ L of serum or plasma per tube.

Storage: 7 days at 2–8°C or 2 months at –20°C.⁸ Before assay, allow samples to come to room temperature (15–28°C) and mix by *gentle* swirling or inversion. Aliquot, if necessary, to avoid repeated thawing and freezing. Do *not* attempt to thaw specimens by heating them in a waterbath. Patient samples expected to contain cortisol concentrations greater than the highest calibrator (50 μ g/dL) should be diluted in the zero calibrator before assay.

Urine

Collect a 24-hour urinary sample without preservative, keeping the specimen refrigerated during collection. Record the total volume in milliliters.

Volume Required (extraction procedure): 0.5 mL of urine.

Storage: 7 days at 2–8°C or one month at –20°C.⁸

Preparation of Urine Samples

Warning – Dichloromethane: Do not pipet by mouth. Conduct the evaporation step under a fume hood. Avoid open flames.

- 1 Label one 12 $\times$ 75 mm polypropylene tube for each urine sample.

Suitable tubes with tightly fitting caps are available from DPC. Do not use antibody-coated tubes at this stage.

- 2 Pipet 500 μ L of each urine sample into the tube prepared.

If the sample is cloudy, or if a precipitate has formed, first centrifuge the urine and work with the supernatant.

- 3 **Extraction:** Add 1.0 mL dichloromethane to every tube. Cap securely.

Do not pipet dichloromethane by mouth.

- 4 Mix by *gentle* inversion for 5 to 10 minutes.

Use a mechanical rotator set at 15 to 20 revolutions per minute.

- 5 Centrifuge for 5 minutes at about 1500 $\times$ g to separate the two phases.

Any sample partially emulsified should be shaken vigorously and centrifuged again.

- 6 Remove most of the top layer, being careful not to disturb the interface.

Use a water-tap aspirator. (Aspirating all the way to the interface may cause the dichloromethane layer to become contaminated with material from the aqueous phase on contact.)

- 7 **Evaporation:** Transfer **50 µL** of the lower (dichloromethane) phase into each of two Cortisol Ab-Coated Tubes.

Pipet all extracts directly to the bottom using a positive-displacement micropipet. Be careful that none of the upper phase enters the assay tube.

- 8 Evaporate to complete dryness under a gentle stream of nitrogen at room temperature (15–28°C).

Conduct the evaporation step under a fume hood. Avoid open flames.

Once dry, let the tubes (suitably labeled) take their place in an assay that includes a set of (serum) calibrator tubes. Continue – step 2 of the radioimmunoassay procedure – by adding 25 µL of the zero calibrator A, and so on. Results in micrograms of (free) cortisol per 100 mL urine (µg/dL) can be read off directly from the calibration curve. No correction factor is necessary.

No more than 30 minutes should elapse between transfer of the extract into the coated tube (step 7 of the extraction procedure) and the addition of tracer (step 3 of the radioimmunoassay procedure). The extraction procedure may be interrupted after step 6 by storing the infranatant layer tightly capped in a –20°C freezer.

Radioimmunoassay Procedure

All components must be at room temperature (15–28°C) before use.

- 1 **Plain Tubes:** Label four plain (uncoated) 12×75 mm polypropylene tubes T (total counts) and NSB (nonspecific binding) in duplicate.

Because nonspecific binding in the Coat-A-Count procedure is characteristically low, the NSB tubes may be safely omitted without

compromising accuracy or quality control.

Coated Tubes: Label twelve Cortisol Ab-Coated Tubes A (maximum binding) and B through F in duplicate. Label additional Cortisol Ab-Coated Tubes, also in duplicate, for controls and patient samples.

Calibrators	µg/dL	nmol/L
A (MB)	0	0
B	1	27.6
C	5	138
D	10	276
E	20	552
F	50	1,380

Urine samples: Once dry, the coated tubes used for evaporating the extracts should be suitably labeled and incorporated into the sequence of patient sample tubes.

- 2 Pipet **25 µL** of the zero calibrator A into the NSB and A tubes, *and also into each of the urine sample evaporation tubes*. Pipet **25 µL** of each remaining calibrator, control and patient sample into the tubes prepared. **Pipet directly to the bottom.**

It is good practice to use a disposable-tip micropipet, changing the tip between samples, in order to avoid carryover contamination.

- 3 Add **1.0 mL** of ¹²⁵I Cortisol to every tube. Vortex.

Laboratories equipped with a reliable pipettor-diluter may handle steps 2 and 3 simultaneously. No more than 10 minutes should elapse during the dispensing of the tracer. Set the T tubes aside for counting at step 6; they require no further processing.

- 4 Incubate for 45 minutes at 37°C.

Use a waterbath; neither an oven nor a heat block is suitable. Longer incubation periods will not significantly affect the assay.

- 5 Decant thoroughly.

Removing all visible moisture will greatly enhance precision. Decant the contents of all tubes (except the T

tubes) using a foam decanting rack, and allow them to drain for 2 or 3 minutes. Then strike the tubes sharply on absorbant paper to shake off all residual droplets.

- 6 Count for **1 minute** in a gamma counter.

Calculation of Results

To obtain results in terms of concentration from a logit-log representation of the calibration curve, first calculate for each pair of tubes the average NSB-corrected counts per minute:

Net Counts = (Average CPM) minus (Average NSB CPM)

Then determine the binding of each pair of tubes as a percent of maximum binding (MB), with the NSB-corrected counts of the A tubes taken as 100%:

Percent Bound = (Net Counts / Net MB Counts) × 100

The calculation can be simplified by omitting the correction for nonspecific binding; samples within range of the calibrators yield virtually the same results when Percent Bound is calculated directly from Average CPM.)

Using logit-log graph paper, plot Percent Bound on the vertical (probability) axis against Concentration on the horizontal (logarithmic) axis for each of the nonzero calibrators, and draw a straight line approximating the path of these points. Results for the unknowns may then be read from the line by interpolation.

It is good practice to inspect results for agreement within replicates, and to construct a graph of the calibration curve (even if the calculations are handled by computer) as a visual check on the appropriateness of the transformation used and as a way to detect deviant calibration points. We also recommend keeping track of these data reduction parameters:

T = Total Counts (as counts per minute)

%NSB = $100 \times (\text{Average NSB Counts} / \text{Total Counts})$

%MB = $100 \times (\text{Net Counts} / \text{Total Counts})$

And the 20, 50 and 80 percent "intercepts," where

20% = Concentration at 20 Percent Bound, etc.

Note that other approaches, e.g. a sound implementation of the 4-parameter logistic, are also acceptable. See Dudley RA, et al. Guidelines for immunoassay data reduction. Clin Chem 1985;31:1264-71.

Urine Samples:

Urinary free cortisol concentrations may be read off directly from the calibration curve. No correction factor is necessary. (Introducing *twice* the usual 25 µL sample into the assay tube at step 7 of the extraction procedure exactly compensates for the 1-in-2 dilution occasioned by extracting 0.5 mL urine into 1.0 mL dichloromethane.)

To determine the urinary free cortisol output in micrograms per day, simply multiply the result in µg/dL by the 24-hour urine volume in deciliters:

$\mu\text{g}/24 \text{ hours} = \mu\text{g}/\text{dL} \times (\text{Total Volume in milliliters}) / 100$

Example Run: For illustration only, not for calculating results from another run. (See "Example Run" table.)

Quality Control

Controls (or serum pools) with at least two cortisol concentration levels — low and high — should routinely be assayed as unknowns.

Report patient results only if the control results for that assay meet your laboratory's established criteria for acceptability.

It is good laboratory practice to record for each assay the lot numbers of the components used, as well as the dates when they were first reconstituted or opened. We also recommend charting control results from day to day — as described, for example, in Westgard JO, et al. A multi-rule chart for quality control. Clin Chem 1981;27:493-501. Note that repeat samples can serve as a valuable additional tool for monitoring interassay precision, and that pairs of control tubes can be spaced throughout the assay to help verify the absence of significant drift.

Solvent Blanks:

For reliable results, the dichloromethane must be of at least spectrophotometric grade and the nitrogen source, if used, must not contaminate the evaporation tubes with oil or moisture. (The use of a trap containing calcium sulfate will help prevent such contamination.) As a check on the purity of these reagents, which are not supplied with the kit, we recommend periodically running a "solvent blank." This involves extracting and assaying distilled or sterile water, in the manner prescribed for urine samples, to verify that it yields an apparent cortisol concentration of essentially zero, that is, below the detection limit of the assay.

Expected Values

Serum

The following expected values for circulating cortisol have been reported.

Diurnal Rhythm Variation	<i>a.m.</i> : 5 – 25 µg/dL (138 – 690 nmol/L) ^{1,8,9} <i>p.m.</i> : Approximately half of <i>a.m.</i> values
ACTH Stimulation	Over twice (usually 3 to 5 times) basal values ^{4,5}
ACTH Reserve (Metyrapone Suppression)	Below basal (control) values ^{5,6}
Dexamethasone Suppression	Below basal (control) values for the screening, low-dose and high-dose tests ^{4,5}

Urine

A study of 24-hour urine samples from 33 healthy laboratory volunteers yielded an absolute range of 21 to 85 µg/24 hours, with a median of 48 µg/24 hours. This is consistent with a reference range of 20 to 90 µg/24 hours for urinary free cortisol, as reported in the literature.⁷

Consider these limits as *guidelines* only. Each laboratory should establish its own reference ranges.

Limitation

Serum and urinary cortisol results may be falsely elevated in samples obtained from patients being treated with prednisolone or prednisone (converted to prednisolone *in*

vivo). Caution must therefore be exercised with cortisol determinations for patients undergoing therapy with these and structurally related synthetic corticosteroids.

Performance Data

See Tables and Graphs for data *representative* of the assay's performance. Results are expressed as micrograms of cortisol per deciliter (µg/dL). All results were obtained on serum samples.

Conversion Factor:

µg/dL × 27.59 → nmol/L

Calibration Range: 1 – 50 µg/dL
(27.6 – 1,380 nmol/L)

Analytical Sensitivity: 0.2 µg/dL
(5.5 nmol/L)

Intraassay Precision (Within-Run):

Statistics were calculated for each of seven samples from the results of 20 pairs of tubes in a single assay. (See "Intraassay Precision" table.)

Interassay Precision (Run-to-Run):

Statistics were calculated for each of three samples from the results of 20 pairs of tubes. (See "Interassay Precision" table.)

End-of-Run Effect: none up to approximately 700 tubes. (See "End-of-Run Effect" table.)

Linearity: Samples were assayed under various dilutions. (See "Linearity" table.)

Recovery: Samples spiked 1 to 19 with three cortisol solutions (130, 250 and 475 µg/dL) were assayed. (See "Recovery" table.)

Bilirubin: Presence of bilirubin in concentrations up to 200 mg/L has no effect on results, within the precision of the assay.

Hemolysis: Presence of packed red blood cells in concentrations up to 30 µL/mL has no effect on results, within the precision of the assay.

Lipemia: The 50 µg/dL calibrator was serially diluted with a lipemic serum pool. This causes the degree of lipemia to increase as the cortisol concentration (due primarily to the calibrator) decreases. All dilutions were assayed along with the unspiked lipemic pool. The results show good recoveries, even in the presence of severe lipemia.

Alternate Sample Type: To assess the effect of alternate sample types, blood was collected from 40 volunteers into plain, heparinized, EDTA and Becton Dickinson SST[®] vacutainer tubes. All samples were assayed by the Coat-A-Count Cortisol procedure. By linear regression:

(Heparin) = 0.93 (Serum) + 0.59 µg/dL
r = 0.988

(EDTA) = 1.17 (Serum) – 0.03 µg/dL
r = 0.998

(SST) = 0.94 (Plain Tubes) + 0.70 µg/dL
r = 0.995

Means:

13.8 µg/dL (Serum)
13.5 µg/dL (Heparin)
16.2 µg/dL (EDTA)
13.7 µg/dL (SST)

The results show that EDTA plasma is *not* acceptable.

Specificity: The Coat-A-Count Cortisol antiserum is highly specific for cortisol, with an extremely low crossreactivity to other naturally occurring steroids or therapeutic drugs that may be present in patient samples. (See "Specificity" table.)

Although some steroids exhibit slight crossreactivity, their normal physiological concentrations are low compared to cortisol, hence they will not significantly interfere in the Coat-A-Count Cortisol procedure. There is, however, an observed crossreactivity of approximately 76% with prednisolone, which must be considered for patients undergoing this therapy. Since prednisone is converted to prednisolone *in vivo*, caution must be exercised with cortisol determinations for patients undergoing either therapy.

Method Comparison: The assay was compared to DPC's Double Antibody Cortisol on 89 patient samples. By linear regression:

(CAC) = 1.02 (DA) – 0.25 µg/dL
r = 0.970

Means:

18.8 µg/dL (Coat-A-Count)
18.7 µg/dL (Double Antibody)

Protein Effect: To simulate various protein concentrations, experiments were performed in which 2.0 mL aliquots of a human serum pool were freeze-dried and then reconstituted with various volumes of water (1, 2, 3 and 4 mL). Each

reconstituted aliquot was then assayed by the Coat-A-Count Cortisol procedure. Note that aliquots reconstituted with half the original volume represent an extremely high protein concentration, on the order of 14 g/dL. These results indicate that even wide variations in total protein have no clinically significant effect on the Coat-A-Count Cortisol assay. (See "Protein Effect" table for representative data.)

References

Foster L, Dunn R. Single-antibody technique for radioimmunoassay of cortisol in unextracted serum or plasma. Clin Chem 1974;20:365. 2) Farmer R, Pierce C. Plasma cortisol determination: radioimmunoassay and competitive protein binding compared. Clin Chem 1974;20:411. 3) Ruder H, et al. A radioimmunoassay for cortisol in plasma and urine. J Clin Endo Metab 1972;35:219. 4) Rothfeld B, ed. Plasma cortisol. In: Nuclear medicine *in vitro*. 1974: 120. 5) Murphy B, et al. Clinical studies utilizing a new method for the serial determination of plasma corticoids. Can Med Assoc J 1964;90:775. 6) Spark R. Measurement of serum 11-deoxycortisol and cortisol after metyrapone. Ann Intern Med 1971;75:717. 7) Kowalski A, Paul W. A simple extraction procedure for the determination of free (unconjugated) cortisol in urine by radioimmunoassay. Clin Chem 1979;25:1152. 8) Burtis CA, Ashwood ER, editors. Tietz textbook of clinical chemistry. 2nd ed. Philadelphia: W.B. Saunders, 1994. 9) Wilson JD, Foster DW, editors. Williams textbook of endocrinology. 7th ed. Philadelphia: W.B. Saunders, 1985. 10) National Committee for Clinical Laboratory Standards. Procedures for the collection of diagnostic blood specimens by venipuncture; approved standard. 4th ed. NCCLS Document H3-A4, Wayne, PA: NCCLS, 1998.

Technical Assistance

In the United States, contact DPC's Technical Services department.
Tel: 800.372.1782, 310.645.8200
Fax: 310.645.9999. To place an order:
Tel: 800.372.1782. Fax: 800.234.4372.
Outside the United States, contact your National Distributor.

The Quality System of Diagnostic Products Corporation is registered to ISO 13485:2003.

Tables and Graphs

Example Run

Tube ¹	Duplicate CPM ²	Average CPM ³	Net CPM ⁴	Percent Bound ⁵	Cortisol µg/dL ⁶
T ⁸	84,250 83,899	84,075			
(NSB) ⁹	519 415	467	0		
A	46,585				
(MB) ¹⁰	46,351	46,468	46,001	100%	0
B	38,113 38,034	38,074	37,607	82%	1
C	26,346 26,661	26,504	26,037	57%	5
D	19,778 20,113	19,946	19,479	42%	10
E	14,049 13,851	13,950	13,483	29%	20
F	7,548 7,739	7,644	7,177	16%	50
Unknowns ¹¹					
X1	26,021 26,699	26,360	25,893	56%	4.9
X2	18,879 18,896	18,888	18,421	40%	11
X3	13,402 14,483	13,943	13,476	29%	20

Quality Control Parameters:⁷

T⁸ = 84,075 cpm

%NSB⁹ = 0.56%

%MB¹⁰ = 55%

20% Intercept¹¹ = 37 µg/dL

50% Intercept = 6.7 µg/dL

80% Intercept = 1.2 µg/dL

Intraassay Precision (µg/dL)

	Mean	SD	CV
1	3.1	0.15	4.8%
2	4.5	0.19	4.2%
3	9.9	0.47	4.7%
4	12	0.61	5.1%
5	20	0.60	3.0%
6	25	1.0	4.0%
7	34	1.5	4.4%

Interassay Precision (µg/dL)

	Mean ¹	SD ²	CV ³
1	3.3	0.17	5.2%
2	21	0.83	4.0%
3	36	2.3	6.4%

End-of-run Effect (µg/dL)

	Tubes ¹ 84–89	Tubes 420–425	Tubes 700–705
1	3.1	3.0	3.0
2	12.1	11.9	12.0
3	26.2	25.3	25.5

Linearity (µg/dL)

	Dilution ¹	Observed ²	Expected ³	%O/E ⁴
1	8 in 8 ⁵	16	—	—
	4 in 8	8.0	8.0	100%
	2 in 8	4.0	4.0	100%
	1 in 8	1.9	2.0	95%
2	8 in 8	19	—	—
	4 in 8	9.4	9.5	99%
	2 in 8	4.7	4.8	98%
	1 in 8	2.3	2.4	96%
3	8 in 8	20	—	—
	4 in 8	9.3	10	93%
	2 in 8	4.8	5.0	96%
	1 in 8	2.5	2.5	100%
4	8 in 8	27	—	—
	4 in 8	14	14	100%
	2 in 8	6.7	6.8	99%
	1 in 8	3.3	3.4	97%
5	8 in 8	31	—	—
	4 in 8	16	16	100%
	2 in 8	7.9	7.8	101%
	1 in 8	3.8	3.9	97%
6	8 in 8	38	—	—
	4 in 8	19	19	100%
	2 in 8	8.8	9.5	93%
	1 in 8	4.4	4.8	92%

Recovery (µg/dL)

	Spiking Solution ¹	Observed ²	Expected ³	% O/E ⁴
1	—	11	—	—
	A	17	17	100%
	B	23	23	100%
	C	33	34	97%
2	—	18	—	—
	A	22	24	92%
	B	29	30	97%
	C	39	41	95%
3	—	13	—	—
	A	19	19	100%
	B	25	25	100%
	C	36	36	100%
4	—	9.1	—	—
	A	15	15	100%
	B	20	22	91%
	C	30	33	91%

Specificity

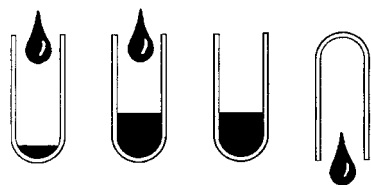
Compound ¹	µg/dL Added ²	Apparent Conc. ³ µg/dL	Percent Cross- reactivity ⁴
Aldosterone	2,000	0.6	0.03%
Betamethasone	1,000	1.6	1.6%
Corticosterone	500	4.7	0.94%
Cortisone	500	4.9	0.98%
Danazol	2,000	0.2	0.01%
11-Deoxycorticosterone	2,000	5.1	0.26%
11-Deoxycortisol	50	5.7	11.4%
Dexamethasone	10,000	4.2	0.04%
Estradiol	2,000	0.2	0.01%
Estrone	4,000	0.3	0.007%
Fluticasone	22	ND	ND
Flumethasone	10,000	1.7	0.017%
Methotrexate	10,000	0.4	0.004%
Methylprednisolone	100	12	12%
	200	21	11%
Prednisolone	8	6.1	76%
Prednisone	250	5.8	2.3%
Pregnenolone	2,000	0.4	0.02%
Pregnanediol	2,000	ND	—
Progesterone	10,000	1.8	0.02%
Tetrahydrocortisol	1,000	3.4	0.34%
Triamcinolone	500	0.65	0.13%
	5,000	2.26	0.045%

ND: not detectable.⁵

Protein Effect (µg/dL)

	Recon- stitution ¹	Approx. Conc. ² g/dL	Observed ³	Expected ⁴	% O/E ⁵
1	2.00×	14.0	27.3	29.2	93%
	1.00×	7.0	14.6	—	(100%)
	0.67×	4.7	10.4	9.7	107%
	0.50×	3.5	8.1	7.3	111%
2	2.00×	14.0	32.9	34.8	95%
	1.00×	7.0	17.4	—	(100%)
	0.67×	4.7	10.8	11.6	93%
	0.50×	3.5	8.2	8.7	94%

Procedure for Serum Samples
Refer to Radioimmunoassay Procedure for details.



Add 25 µL Calibrator, Control or Sample. Add 1.0 mL ¹²⁵I Cortisol. Vortex. Incubate 45 minutes at 37°C. Decant and count.

Deutsch. Example Run: ¹Röhrchen, ²Duplikat CPM, ³Mittelwert CPM, ⁴Netto CPM, ⁵Prozent Bindung, ⁶Ca. Cortisol, µg/dL, ⁷Qualitätskontrollparameter, ⁸Total, ⁹%NSB, ¹⁰%MB, ¹¹20% Intercept. **End-of-Run Effect:** ¹Röhrchen. **Intraassay Precision:** ¹Mittelwert, ²SD (Standardbereich), ³CV (Variationskoeffizient). **Interassay Precision:** ¹Mittelwert, ²SD (Standardbereich), ³CV (Variationskoeffizient). **Linearity:** ¹Verdünnung, ²Beobachten (B), ³Erwarten (E), ⁴% B/E, ⁵8 in 8. **Recovery:** ¹Lösung, ²Beobachten (B), ³Erwarten (E), ⁴% B/E. **Specificity:** ¹Verbindung, ²zugesezte Menge, ³Ausgewiesene Konzentration, ⁴% Kreuzreaktivität, ⁵NN: Nicht nachweisbar. **Protein Effect:** ¹Rekonstituieren, ²Ca. Konzentration, ³Beobachten (B), ⁴Erwarten (E), ⁵% B/E. **Procedure for Serum Samples.** Refer to Radioimmunoassay Procedure for details: Für Details verweisen wir auf das Radioimmunoassay Verfahren. Add 25 µl Calibrator, Control or Sample: Add 25 µl Calibrator, Control or Sample: 25 µl Standard, Kontrolle oder Probe hinzufügen. Add 1,0 ml ¹²⁵I Cortisol. Vortex: 1,0 ml ¹²⁵I Cortisol hinzufügen. Mischen. Incubate 45 minutes at 37°C: Für 45 Minuten bei 37°C inkubieren. Decant and Count: Dekantieren und zählen.

Español. Example Run: ¹Tubo, ²Duplicado CPM, ³Media CPM, ⁴CPM Netas, ⁵Porcentaje de unión, ⁶Cortisol aprox., µg/dL, ⁷Parámetros del control de calidad, ⁸Total, ⁹%NSB, ¹⁰%MB, ¹¹Corte al 20%. **End-of-Run Effect:** Tubos. **Intraassay Precision:** ¹Media, ²DS, ³CV. **Interassay Precision:** ¹Media, ²DS, ³CV. **Linearity:** ¹Dilución, ²Observado (O), ³Esperado (E), ⁴%O/E, ⁵8 en 8. **Recovery:** ¹Solución, ²Observado (O), ³Esperado (E), ⁴%O/E. **Specificity:** ¹Compuesto, ²Cantidad añadida, ³Concentración aparente, ⁴% Reacción cruzada, ⁵ND: no detectable. **Protein Effect:** ¹Reconstitución, ²Concentración aprox, ³Observado (O), ⁴Esperado (E), ⁵%O/E.

Procedure for Serum Samples. Refer to Radioimmunoassay Procedure for details: Para detalles, consulte el procedimiento del radioinmunoanálisis. Add 25 µl Calibrator,

Control or Sample: Add 25 µl Calibrator, Control or Sample: Añadir 25 µl del calibrador, del control o de la muestra. Add 1,0 ml ¹²⁵I Cortisol. Vortex: Añadir 1,0 ml de ¹²⁵I Cortisol. Mezclar en Vortex. Incubate 45 minutes at 37°C: Incubar 45 minutos a 37°C. Decant and Count: Decantar y contar.

Français. Exemple Série: ¹Tube, ²Duplicate CPM, ³CPM moyen, CPM corrigé, ⁵Pourcentage lié, ⁶Approx. Cortisol, µg/dL, ⁷Paramètres Contrôle de Qualité, ⁸Total, ⁹%NSB, ¹⁰%MB, ¹¹20% Intercept. **Effet de la position des tubes** ¹Tubes. **Intraassay Precision:** ¹Moyenne, ²SD, ³CV. **Interassay Precision:** ¹Moyenne, ²SD, ³CV. **Linearity:** ¹Dilution, ²Observé (O), ³Attendu (A), ⁴%O/A, ⁵8 dans 8. **Recovery:** ¹Solution, ²Observé (O), ³Attendu (A), ⁴%O/A. **Specificity:** ¹Composé, ²ajouté, ³Concentration apparente, ⁴Réaction croisée%. ⁵ND: non détectable. **Protein Effect:** ¹Reconstitution, ²Approx. Concentration, ³Observé (O), ⁴Attendu (A), ⁵%O/A. **Procedure for Serum Samples.** Refer to Radioimmunoassay Procedure for details: Se reporter à la procédure de radioimmunodosage pour les détails. Add 25 µl Calibrator, Control or Sample: Ajouter 25 µl de standard, de Contrôle ou d'Echantillon. Add 1,0 ml ¹²⁵I Cortisol. Vortex: Ajouter 1.0 ml de Cortisol marqué à l'iode 125. Vortexer. Incubate 45 minutes at 37°C: Incuber pendant 45 minutes à 37°C. Decant and Count: Décanter et compter.

Italiano. Seduta Esemplificativa: ¹Provetta, ²CPM in duplicato, ³CPM Medio, ⁴CPM Netti, ⁵Percentuale di Legato, ⁶Appross. Cortisol, µg/dL, ⁷Parametri per il Controllo di Qualità, ⁸Totale, ⁹%NSB, ¹⁰%MB, ¹¹Intercepta al 20%. **Effetto fine Seduta:** ¹Provette. **Intraassay Precision:** ¹Media, ²SD (Deviazione Standard), ³CV (Coefficiente di Variazione). **Interassay Precision:** ¹Media, ²SD (Deviazione Standard), ³CV (Coefficiente di Variazione). **Linearity:** ¹Diluizione, ²Osservato (O), ³Atteso (A), ⁴%O/A, ⁵8 in 8. **Recovery:** ¹Soluzione, ²Osservato (O), ³Atteso (A), ⁴%O/A. **Specificity:** ¹Composto, ²quantità aggiunta, ³Concentrazione apparente, ⁴Percentuale di Crossreattività, ⁵ND: non determinabile. **Protein Effect:** ¹Ricostituzione, ²Appross Concentrazione, ³Osservato (O), ⁴Atteso (A), ⁵%O/E. **Procedure for Serum Samples.** Refer to Radioimmunoassay Procedure for details: Fare riferimento alla Metodica del Dosaggio per dettagli. Add 25 µl Calibrator, Control or Sample: Add 25 µl Calibrator, Control or Sample: Aggiungere 25 µl del Calibratore, Controllo o Campione. Add 1,0 ml ¹²⁵I Cortisol. Vortex: Aggiungere 1,0 ml di Cortisolo marcato don ¹²⁵I. Vortexare. Incubate 45 minutes at 37°C: Incubare 45 minuti a 37°C. Decant and Count: Decantare e Contare.

Português. Example Run: ¹Tubo, ²Duplicado CPM, ³Média de CPM, ⁴Net CPM, ⁵Percentagem de Ligação, ⁶Aprox. Cortisol, µg/dL, ⁷Parâmetros do controlo de qualidade, ⁸Total, ⁹%NSB,

¹⁰MB, ¹¹20% Intercepção. **Efeito fim-de-série:** ¹Tubos. **Intraassay Precision:** ¹Média, ²Desvio padrão, ³Coeficiente de variação. **Interassay Precision:** ¹Média, ²Desvio padrão, ³Coeficiente de variação. **Linearity:** ¹Diluição, ²Observado (O), ³Esperado (E), ⁴%O/E, ⁵8 em 8. **Recovery:** ¹Solução, ²Observado (O), ³Esperado (E), ⁴%O/E. **Specificity:** ¹Composto, ²Quantidade adicionada, ³Apparent Concentration, ⁴Percentagem de reacção cruzada. ⁵ND: não detectável. **Protein Effect:** ¹Reconstituição, ²Aprox. Concentration, ³Observado (O), ⁴Esperado (E), ⁵% O/E. **Procedure for Serum Samples.** Refer to Radioimmunoassay Procedure for details: Radioimunoensaio para detalhes. Add 25 µl Calibrator, Control or Sample: Add 25 µl Calibrator, Control or Sample: Adicionar 25 µl de Calibrador, Controlo ou amostra. Add 1,0 ml ¹²⁵I Cortisol. Vortex: Adicionar 1,0 ml ¹²⁵I de Cortisol. Vortex. Incubate 45 minutes at 37°C: Incubar durante 45 minutos a 37°C. Decant and Count: Decantar e contar.

Deutsch

Coat-A-Count Cortisol

Anwendung: Festphasen Radioimmunoassay (coated tubes) zur direkten quantitativen Bestimmung des Cortisol (Hydrocortison, Compound F) im Serum, Heparin-Plasma und Urin. Der Assay ist ausschließlich in der In-Vitro-Diagnostik zur klinischen Abschätzung des adrenalen Status einzusetzen.

Artikelnummern: **TKCO1** (100 Tests), **TKCO2** (200 Tests), **TKCO5** (500 Tests)



Die Packung mit 100 Röhrchen enthält weniger als 5,5 Microcurie (296 Kilobecquerel) an radioaktivem ¹²⁵I-markiertem Cortisol; die Packung mit 200 Röhrchen enthält weniger als 11 Microcurie (407 Kilobecquerel); und die Packung mit 500 Röhrchen enthält weniger als 27,5 Microcurie (1018 Kilobecquerel).

Klinische Relevanz

Cortisol (Hydrocortison, Compound F) ist das in der höchsten Konzentration vorkommende Steroid und das in der größten Menge im adrenalen Cortex gebildete Glukocorticoid. Physiologisch hat es eine anti-inflammatorische Wirkung und ist an der Kontrolle des Blutdrucks beteiligt. Zusätzlich spielt Cortisol bei der

Glukoneogenese, der Calciumresorption, der Sekretion von Gallensäure und Pepsin eine Rolle.

Als ein Indikator der Nebennierenfunktion ist die Messung des Cortisolspiegels im Blut für die Differenzialdiagnose des Morbus Addison und des Cushing Syndroms, der Hypophysenunterfunktion, der adrenergen Hyperplasie und bei Karzinomen von Bedeutung.⁴

Verschiedene Funktionsteste - z. B. ACTH-Stimulationstest, Dexamethason-Hemmtest - können eine zusätzliche Information bei der Untersuchung der Nebennierenfunktion liefern.^{4,5,6} Pathologische Cortisol-Konzentrationen wurden bei Patienten mit akuten Infektionen, starken Schmerzen, Diabetes mellitus, Funktionsstörungen des Herzens, bei Schwangeren und unter Östrogen-Therapie beobachtet. Zusätzlich können Virilisierung und verschiedene Therapien die Konzentration anderer Steroide unphysiologisch erhöhen, was zu Interferenzen in einem direkten Cortisol Assay führen kann, obwohl ein sehr spezifisches Antiserum verwendet wurde.

Methodik

Der Cortisol Coat-A-Count RIA ist ein Festphasen Radioimmunoassay, bei dem ¹²⁵I-markiertes Cortisol eine vorgegebene Zeit mit dem Cortisol im Patientenserum um die Bindung an spezifische Antikörper, die auf die Innenwand von Polypropylen-Röhrchen fest aufgebracht sind, konkurriert. Nach Ablauf der Inkubationszeit wird der Überstand abgegossen oder abgesaugt und die an die Antikörper gebundene Fraktion in einem Gamma-Counter gemessen. Die Counts sind zu der Konzentration umgekehrt proportional. Durch Vergleich mit unter gleichen Bedingungen behandelten Standards lässt sich die Konzentration des Cortisol im Serum aus der Standardkurve ablesen.

Zu pipettierende Reagenzien: 1

Testdauer: 45 Minuten.

Totalaktivität zum Zeitpunkt der

Markierung: ca. 90 000 cpm.

Hinweise und Vorsichtsmaßnahmen

Zur *In-vitro*-Diagnostik.

Reagenzien: Die Packung mit den Reagenzien sollte bei 2–8°C in einem Kühlschrank gelagert werden, der für radioaktives Material ausgewiesen ist. Die Entsorgung muss nach den jeweils gültigen Gesetzen erfolgen.

Die Reagenzien dürfen nur bis zum Verfallsdatum verwendet werden.

Einige Komponenten der Packung können Material humanen Ursprungs und/oder in anderer Weise gefährliche Inhaltsstoffe enthalten, die es unbedingt notwendig machen die folgenden

Vorsichtsmaßnahmen einzuhalten:

Die generell geltenden

Vorsichtsmaßnahmen sind einzuhalten und alle Komponenten als potenziell infektiös zu behandeln. Alle aus menschlichem Blut gewonnenen Materialien wurden auf Syphilis, Antikörper gegen HIV-1 und HIV-2, Hepatitis-B-Oberflächenantigen und Hepatitis-C-Antikörper untersucht und negativ befundet.

Bestimmten Komponenten wurde Natriumazid (<0,1 g/dl) hinzugefügt. Um die Bildung von explosiven Metallaziden in Blei- und Kupferrohren zu vermeiden, sollten die Reagenzien nur zusammen mit großen Wassermengen in die Kanalisation gespült werden.

Wasser: Destilliertes bzw. deionisiertes Wasser benutzen.

Radioaktivität

Der Umgang mit radioaktivem Material ist in Deutschland genehmigungspflichtig. Deshalb muss der DPC eine Kopie der aktuellen gültigen Umgangsgenehmigung des Kunden vorliegen, bevor radioaktive Reagenzien versendet werden dürfen. Die Strahlenschutzverordnung ist zu beachten.

Das radioaktive Material ist gemäß der jeweiligen Umgangsgenehmigung zu handhaben.

Die Strahlenexposition ist zu minimieren. Spritzer sind sofort aufzuwischen und die betroffene Oberfläche zu dekontaminieren. Aerosolbildung ist zu vermeiden. Flüssiger und fester radioaktiver Abfall sind unter Beachtung der gültigen Richtlinien zu entsorgen.

Bestandteile der Testpackung: Vorbereitung

Cortisol Ak-beschichtete Röhrchen (TCO1)

Polypropylen-Röhrchen* beschichtet mit Antikörpern gegen Cortisol, verpackt in wiederverschließbaren Plastikbeuteln. Vor Feuchtigkeit schützen und nach dem Öffnen wieder sorgfältig verschließen. Lagerung bei 2–8°C bis zum Verfallsdatum. Farbe: Hellblau.

TKCO1: 100 Röhrchen.

TKCO2: 200 Röhrchen.

TKCO5: 500 Röhrchen.

¹²⁵I Cortisol (TCO2)

105 ml jodiertes Cortisol mit Blockierungsreagenz für Steroidhormonbindende Proteine, wird gebrauchsfertig, in flüssiger Form geliefert. Lagerung bei 2–8°C. Haltbar bis 30 Tage nach dem Öffnen oder bis zum Verfallsdatum auf der Flasche.

TKCO1: 1 Flasche.

TKCO2: 2 Flaschen.

TKCO5: 5 Flaschen.

Cortisol Standards (TCO3–8)

Cortisol Standards, gebrauchsfertig, in behandeltem Humanserum. Der Nullstandard (A) enthält 2,0 ml während die Standards B – F je 1,0 ml enthalten. Bei 2–8°C bis 30 Tage nach dem Öffnen oder bis zum Verfallsdatum auf der Flasche haltbar. Die Haltbarkeit der Standards kann durch tiefgefrieren verlängert werden. Um wiederholtes Einfrieren und Auftauen zu vermeiden bei Bedarf portionieren.

TKCO1: 1 Set.

TKCO2: 1 Set.

TKCO5: 2 Sets.

Die Standards enthalten 0; 1; 5; 10; 20 und 50 µg/dl; bzw. 0; 27,6; 138; 276; 552; und 1 380 nmol/l. Weitere Standardkurvenpunkte können durch Mischen der Standards hergestellt werden.

Erforderliche Laborgeräte und Hilfsmittel

Gamma counter – kompatibel mit 12x75 mm Röhrchen

Wirbelmischer

Urin Extraktion

Röhrchen mit Stopfen – geeignet für die Extraktion mit Dichlormethan

Dichlormethan (Methylenchlorid) – Reinheitsgrad: „Für Spektroskopie“.

Mikropipetten: für 50 µl und 500 µl. Die 50 µl Pipette sollte eine Verdrängungspipette sein.

Vorrichtung zum Eintrocknen unter Stickstoff-Begasung.

Radioimmunoassay

Unbeschichtete 12x75 mm Polypropylen-Röhrchen - für NSB Röhrchen, erhältlich bei DPC

Mikropipette: für 25 µl und 1,0 ml.

Wasserbad — für Inkubation bei 37°C. Heizblock oder Ofen dürfen nicht verwendet werden.

Dekantierständer – erhältlich bei DPC

Logit-Log-Papier – erhältlich bei DPC (Artikelnummer: ZP797)

DPC Immunoassay-Kontrolle (> 25 Parameter, 3 Konzentrationen) (Artikelnummer: CON6).

Probengewinnung

Serum und Plasma

Es ist keine besondere Vorbereitung der Patienten nötig. Blutentnahme durch Venenpunktion¹⁰ in Röhrchen ohne Zusätze (ohne Antikoagulantien) oder Heparin-Röhrchen. Trennung des Serums oder Plasma von den Blutzellen. EDTA Plasma kann nicht verwendet werden. (Siehe Abschnitt "Alternative Probenarten"). Da Cortisol einer zirkadianen Rhythmik unterliegt ist der Zeitpunkt der Blutentnahme zu notieren.

Der Einsatz einer Ultrazentrifuge wird zur Klärung von lipämischen Proben empfohlen.

Bei hämolysierten Proben besteht die Möglichkeit einer unsachgemäßen Handhabung vor Eintreffen im Labor, daher sind die Ergebnisse mit Vorsicht zu interpretieren.

Blutentnahmeröhrchen von verschiedenen Herstellern können differierende Werte verursachen. Dies hängt von den verwendeten Materialien und Additiven (Gel oder physische Trennbarrieren, Gerinnungsaktivatoren und /oder Antikoagulantien) ab. Coat-A-Count

Cortisol sind nicht mit allen möglichen Röhrchenvariationen ausgetestet worden. Details der getesteten Röhrchenarten sind dem Kapitel "Alternative Probenarten" zu entnehmen.

Erforderliche Menge: 25 µl Serum oder Plasma pro Röhrchen.

Lagerung: 7 Tage bei 2–8°C oder 2 Monate bei –20°C.⁸ Die Proben vor Testbeginn auf Raumtemperatur (15–28°C) bringen und vorsichtig durchmischen. Um wiederholtes Einfrieren und Auftauen zu vermeiden bei Bedarf portionieren. Gefrorene Proben dürfen nicht durch Erhitzen im Wasserbad aufgetaut werden. Patientenproben, in denen Cortisol Konzentrationen erwartet werden, die über dem höchsten Standard (50 µg/dl) liegen, sind vor dem Einsatz in den Assay mit 0-Standard zu verdünnen.

Urin

Urin über 24 Stunden ohne Konservierungsstoffe sammeln, während der Sammelperiode bei 2–8°C lagern. Das Gesamtvolumen protokollieren.

Erforderliche Menge

(Extraktionsverfahren): 0,5 ml Urin.

Lagerung: 7 Tage bei 2–8°C oder 1 Monat bei –20°C.⁸

Vorbereitung der Urinproben

Warnung – Dichlormethan: Nicht mit dem Mund pipettieren. Der Trockenschritt sollte unter dem Abzug durchgeführt werden. Offene Flammen vermeiden.

- 1 Für jede Urinprobe je 1 unbeschichtetes 12x75 mm Polypropylen-Röhrchen beschriften.
Geeignete Röhrchen mit dicht schließenden Stopfen sind bei DPC erhältlich. Für diesen Schritt keine beschichteten Röhrchen verwenden.
- 2 Jeweils **500 µl** der Urinproben in die vorbereiteten Röhrchen pipettieren.
Urinproben, die flockig oder präzipitiert sind, vorher zentrifugieren und nur den Überstand verwenden.
- 3 **Extraktion:** Jedem Röhrchen **1,0 ml** Dichlormethan zugeben. Stopfen dicht verschließen.
Dichlormethan *nicht* mit dem Mund pipettieren.

- 4 Die Röhrchen auf einen Rotator spannen und bei 15–20 Umdrehungen pro Minute **5–10 Minuten mischen**.
- 5 Die Röhrchen **5 Minuten** bei 1500 xg zentrifugieren, um die Phasen voneinander zu trennen.
Proben, die danach eine Emulsion zeigen, sollten gut geschüttelt (Wirbelmischer) und erneut zentrifugiert werden.
- 6 Die obere Phase entfernen ohne die Trennschicht aufzuwirbeln.
Die **obere** wässrige Schicht vorsichtig mit einer Pasteurpipette an einer Wasserstrahlpumpe **absaugen**. Die Pasteurpipette **nicht** in die untere Schicht durchstoßen, um Kontaminationen zu vermeiden.
- 7 **Verdampfung:** Jeweils **50 µl** der unteren (Dichlormethan) Phase der extrahierten Urine auf den Boden der entsprechend beschrifteten, mit Cortisol Antikörper beschichtete Röhrchen pipettieren.
Hierzu sollte eine Kolbenpipette (z. B. SMI) verwendet werden, um Pipettierfehler durch entstehenden Dampfdruck zu vermeiden.
- 8 Unter leichter Begasung mit Stickstoff bei Raumtemperatur (15–28°C) vollständig eintrocknen.
Der Trockenschritt sollte unter dem Abzug durchgeführt werden. Offene Flammen vermeiden.

Nach dem Eintrocknen werden die (entsprechend beschrifteten) Röhrchen in einen Testansatz mit Serum-Standards eingefügt. Fortfahren mit Schritt 2 des Verfahrens – 25 µl des Nullstandards in jedes Röhrchen pipettieren usw. Die Ergebnisse für (freies) Cortisol im Urin in µg/dl können direkt an der Standardkurve abgelesen werden. Es ist kein Korrekturfaktor notwendig.

Von der Überführung des Überstandes in die beschichteten Röhrchen (Schritt 7 der Extraktionsvorschrift) bis zur Zugabe des ¹²⁵I-Cortisol (Schritt 3 der Anleitung) sollen nicht mehr als 30 Minuten vergehen. Ist die sofortige Weiterführung der Bestimmung nicht möglich, kann die Extraktion nach Schritt 6 (Trennung der Phasen) unterbrochen werden. Die Röhrchen werden dann bis zum Ansatz

des RIA's dicht verschlossen bei –20°C aufbewahrt.

Durchführung Radioimmunoassay

Alle Testkomponenten vor Testbeginn auf Raumtemperatur (15–28°C) bringen.

- 1 **Unbeschichtete Röhrchen:** Jeweils 2 unbeschichtete 12x75 mm Polypropylen-Röhrchen mit T (Totalaktivität) und NSB (unspezifische Bindung) beschriften.

Da die unspezifische Bindung im Coat-A-Count RIA normalerweise niedrig ist, hat sie keinen signifikanten Einfluss auf die Messwerte. Es kann deshalb auch auf das Mitführen der NSB-Röhrchen verzichtet werden.

Beschichtete Röhrchen: Jeweils 2 Antikörper-beschichtete Cortisol Röhrchen mit A (maximale Bindung, 0-Standard) und von B bis F beschriften. Jeweils 2 weitere Antikörper-beschichtete Röhrchen für Kontrollen und Patientenproben beschriften.

Standards	µg/dl	nmol/l
A (MB)	0	0
B	1	27,6
C	5	138
D	10	276
E	20	552
F	50	1 380

Urin Proben: Nach dem Eintrocknen werden die (entsprechend beschrifteten) Röhrchen in einen Testansatz mit Serum-Proben eingefügt.

- 2 Jeweils **25 µl** des 0-Standards A in die NSB und A Röhrchen, in jedes Röhrchen mit eingetrockneten Urinproben und jeweils **25 µl** der restlichen Standards, Kontrollen und Patientenproben in die vorbereiteten Röhrchen pipettieren. **Direkt auf den Boden des Röhrchens pipettieren.**

Es ist gute Laborpraxis Pipetten mit Einmalspitzen zu verwenden und die Spitze von Probe zu Probe zu wechseln um Verschleppung zu vermeiden.

- 3 Jeweils **1,0 ml** ¹²⁵I-Cortisol hinzufügen. Mischen.

Mit Hilfe eines Pippetor-Dilutors können die Schritte 2 und 3 auch simultan durchgeführt werden. Das Verteilen des ^{125}I -Cortisol darf nicht länger als 10 Minuten dauern. Die T-Röhrchen bis zur Messung (siehe Schritt 6) beiseite stellen; sie bedürfen keiner weiteren Behandlung.

- 4 Für **45 Minuten bei 37°C** im Wasserbad inkubieren.
Weder ein Heizblock oder Ofen dürfen verwendet werden. Längere Inkubationszeiten beeinflussen den Assay nicht signifikant.
- 5 Vollständig dekantieren.
Vollständiges Entfernen der Flüssigkeit verbessert die Präzision deutlich. Mit Hilfe eines Dekantierständers alle Röhrchen (außer die T-Röhrchen) dekantieren oder absaugen und 2-3 Minuten umgedreht stehen lassen. Anschließend werden die Röhrchen kräftig auf Fließpapier ausgeklopft, um alle restlichen Tröpfchen zu entfernen.
- 6 Alle Röhrchen **1 Minute** im Gamma-Counter messen.

Berechnung der Ergebnisse

Um die Konzentrationen aus der Logit-Log Darstellung der Standardkurve abzulesen werden zunächst der Mittelwert der zwei Röhrchen bereinigt um den Mittelwert der NSB Counts pro Minute (cpm) berechnet:

Netto Counts = (Mittelwert CPM) minus (Mittelwert **NSB** CPM)

Anschließend wird die Bindung jedes Röhrchenpaars als Prozent der Maximalbindung (MB, B0) bestimmt. Hierzu werden die mittleren CPM des A-Standards korrigiert um die mittlere NSB als 100% gesetzt:

Prozentbindung = (Netto Counts / Netto **MB** Counts) $\times$ 100

(Die Berechnung kann durch weglassen der Korrektur um die NSB vereinfacht werden. Für Proben innerhalb des Standardbereichs werden nahezu identische Konzentrationen berechnet, wenn B/B0 direkt aus den CPM ermittelt wird.)

Die so ermittelten B/B0 aller Standards außer des 0-Standards werden auf der y-Achse auf Logit-Log Papier gegen die

Konzentration auf der x-Achse (logarithmisch) aufgetragen. Die Punkte werden mit bestmöglicher Annäherung durch eine gerade Linie verbunden. Die Ergebnisse der unbekannten Proben können dann durch Interpolation an der Kurve abgelesen werden.

Es ist gute Laborpraxis die Ergebnisse der Doppelbestimmung auf Übereinstimmung zu prüfen und eine Grafik der Standardkurve darzustellen (auch wenn die eigentliche Berechnung durch ein Computerprogramm erfolgt) um visuell zu überprüfen, ob für die Standardkurve die geeignete Transformation verwendet wurde und um eventuell abweichende Standardkurvenpunkte zu entdecken. Es wird weiterhin empfohlen, folgende Parameter der Berechnung zu protokollieren:

T = Totalaktivität (als Counts pro Minute)

%NSB = $100 \times (\text{Mittelwert NSB Counts} / \text{Total Counts})$

%MB = $100 \times (\text{Netto Counts} / \text{Total Counts})$

und die 20, 50 und 80 Prozent "intercepts," wobei

20% = Konzentration bei 20 Prozent Bindung, etc.

Bitte beachten Sie, dass auch andere Auswertungen z. B. nach der 4-Parameter-Logistik akzeptabel sind. Siehe: Dudley RA, et al. Guidelines for immunoassay data reduction. Clin Chem 1985;31:1264-71.

Urinproben:

Entsprechend der für Serumproben beschriebenen Auswertung wird für jede Urinprobe die Konzentration des Cortisol in $\mu\text{g}/100\text{ ml}$ ($\mu\text{g}/\text{dl}$) Urin direkt von der Eichkurve abgelesen. Es ist keine Umrechnung erforderlich. In der Standardprozedur korrigiert der Einsatz von 50 μl Extrakt in das Probenröhrchen statt der üblichen 25 μl im Schritt 7, die 1:2 Verdünnung durch die Extraktion von 0,5 ml Urin in 1 ml Dichlormethan.

Für die Berechnung des gesamten freien Cortisols im Urin für einen 24-Stunden-Zeitraum wird das Ergebnis in $\mu\text{g}/\text{dl}$ mit der gesamten Urinmenge in ml multipliziert und durch 100 dividiert:

Cortisol $\mu\text{g}/24\text{ Stunden} = \mu\text{g}/\text{dl} \times (\text{Gesamtvolumen in ml}) / 100$

Auswertebeispiel: Dieses Beispiel dient nur zur Veranschaulichung und ist nicht dazu geeignet, Werte aus einem anderen Testansatz damit zu ermitteln. (Siehe Tabelle "Example Run".)

Qualitätskontrolle

Es wird empfohlen Kontrollen mit mindestens 2 Konzentrationen (niedrig und hoch) an Cortisol routinemäßig als unbekannte Proben einzusetzen.

Patientenergebnisse dürfen nur dann freigegeben werden, wenn die laborspezifischen Akzeptanzkriterien erfüllt sind. Hierzu sind die jeweils gültigen Richtlinien zu berücksichtigen.

Es ist gute Laborpraxis die Chargennummern, sowie das Datum der ersten Öffnung bzw. Rekonstitution der verwendeten Komponenten zu protokollieren. Die wiederholte Messung von Proben kann bei der Beurteilung der Interassay Präzision hilfreich sein. Der Einsatz von Kontrollprobenpaaren an unterschiedlichen Positionen des Testansatzes ist hilfreich, um einen eventuellen Drift zu erkennen.

Lösungsmittel Blank:

Um exakte Resultate zu erzielen, sollte das Dichlormethan mindestens den Reinheitsgrad "Für die Spektroskopie" haben. Der zum Begasen verwendete Stickstoff darf die Proben nicht mit Öl oder Feuchtigkeit kontaminieren. (Die Verwendung einer Calciumsulfat-Falle hilft, solche Kontaminationen zu vermeiden.) Es wird empfohlen mit einem „Lösungsmittel-Blank“ die Reinheit der verwendeten Reagenzien, die nicht mit dem Kit geliefert werden, routinemäßig zu überprüfen. Hierzu wird destilliertes oder steriles Wasser in der für Urinproben beschriebenen Extraktionsprozedur eingesetzt. Die in den so behandelten Proben gemessene Cortisol Konzentration muss faktisch 0 sein und damit unterhalb der unteren Nachweisgrenze des Assays gemessen werden.

Referenzwerte

Serum

Für das Cortisol wurden folgende Werte angegeben:

tageszeitliche Schwankung	<i>vormittags:</i> 5 – 25 µg/dl (138 – 690 nmol/l) ^{1,8,9} <i>nachmittags:</i> Ungefähr die Hälfte der Morgenwerte
ACTH-Stimulation	Mehr als zweifache Erhöhung (meistens 3 bis 5 fach), ausgehend von den Basalwerten ^{4,5}
Metyrapon-Suppression	Unter den Basal- (Kontroll) Werten ^{5,6}
Dexamethason-Suppression	Unter den Basal- (Kontroll) Werten für das Screening, Niederdosis- und Hochdosistests ^{4,5}

Urin

Eine Referenzwertstudie des Herstellers an 33 gesunden Probanden ergab einen Absolutbereich von 21–85 µg/24 h mit einem Median von 48 µg/24 h. Diese Ergebnisse stimmen mit Literaturangaben von 20–90 µg/24 h für freies Cortisol im Urin sehr gut überein.⁷

Die genannten Bereiche sind als Richtlinie zu interpretieren. Jedes Labor sollte seine eigenen Referenzbereiche etablieren.

Grenzen der Methode

Falsch erhöhte Cortisol-Werte können im Serum und Urin von Patienten unter Therapie mit Prednisolon oder Prednison (welches in vivo in Prednisolon umgewandelt wird) auftreten. Außerdem müssen die Meßergebnisse von Patienten, die mit verschiedenen synthetischen Corticosteroiden therapiert werden, mit Vorsicht betrachtet werden.

Leistungsdaten

Im folgenden Abschnitt sind Daten gezeigt, die für die Leistung des Cortisol Coat-A-Count RIA repräsentativ sind. Die Ergebnisse wurden im Serum ermittelt und sind in µg/dl angegeben.

Umrechnungsfaktor:

µg/dl × 27,59 → nmol/l

Messbereich: 1 – 50 µg/dl

(27,6 – 1 380 nmol/l)

Analytische Sensitivität: 0,2 µg/dl

(5,5 nmol/l)

Intraassay-Präzision: Statistische

Berechnung der Ergebnisse von 7 Proben, die in 20 Röhrchenpaaren in

einem Ansatz gemessen wurden. (Siehe Tabelle "Intraassay Precision".)

Interassay-Präzision: Statistische Berechnung der Ergebnisse von 3 Proben, die in 20 Röhrchenpaaren in mehreren Ansätzen gemessen wurden. (Siehe Tabelle "Interassay Precision".)

"End of Run"-Effekt: Tritt bis ca. 700 Röhrchen nicht auf. (Siehe Tabelle "End-of-Run Effect".)

Linearität: Proben wurden in verschiedenen Verdünnungen getestet. (Siehe Tabelle "Linearity".)

Wiederfindung: Proben wurden 1:20 mit 3 Cortisol Lösungen (130; 250 und 475 µg/dl) versetzt und gemessen. (Siehe Tabelle "Recovery".)

Bilirubin: Bilirubin hat in Konzentration von bis zu 200 mg/l keinen Einfluss auf die Ergebnisse, der größer als die Unpräzision des Assays selbst ist.

Hämolyse: Erythrozytenkonzentrate haben in Konzentrationen bis zu 30 µl/ml keinen Einfluss auf die Messung, der größer als die Unpräzision des Assays selbst ist.

Lipämie: Der 50 µg/dl Standard wurde mit einem lipämischen Serumpool seriell verdünnt. Dies führt dazu, dass der Grad der Lipämie ansteigt, während die Cortisol Konzentration (hauptsächlich durch den Standard verursacht) abfällt. Alle Verdünnungen wurden zusammen mit dem unverdünnten Serumpool gemessen. Die Ergebnisse zeigen akzeptable Wiederfindung auch bei deutlicher Lipämie.

Alternativer Probentyp: Um die Auswirkungen von verschiedenen Probenarten zu untersuchen, wurde Blut von 40 Freiwilligen in Röhrchen ohne Additiva, in Heparin-, EDTA- und Becton Dickinson SST® Vacutainer-Röhrchen gesammelt. Alle Proben wurden im Cortisol Coat-A-Count RIA gemessen. Durch lineare Regression:

(Heparin) = $0,93 (\text{Serum}) + 0,59 \mu\text{g/dl}$
 $r = 0,988$

(EDTA) = $1,17 (\text{Serum}) - 0,03 \mu\text{g/dl}$
 $r = 0,998$

(SST) = $0,94 (\text{einfachen Röhrchen}) + 0,70 \mu\text{g/dl}$
 $r = 0,995$

Mittelwerte:
13,8 µg/dl (Serum)

13,5 µg/dl (Heparin)
16,2 µg/dl (EDTA)
13,7 µg/dl (SST)

Die Ergebnisse zeigen, dass EDTA-Plasma nicht eingesetzt werden kann.

Spezifität: Das in diesem Testbesteck verwendete Antiserum ist hochspezifisch mit sehr niedrigen Kreuzreaktivitäten zu anderen natürlich vorkommenden Steroiden oder Medikamenten. Bei Untersuchungen im Labor des Herstellers wurden folgende Kreuzreaktivitäten gemessen: (Siehe Tabelle „Specificity“.)

Obwohl einige Steroide eine leichte Kreuzreaktivität zeigen, ist deren physiologische Konzentration im Vergleich zum Cortisol so niedrig, dass keine signifikante Kreuzreaktivität im Assay zu erwarten ist. Für das Prednisolon wurde eine Kreuzreaktivität von 76% gefunden, die bei Patienten mit entsprechender Therapie betrachtet werden muss. Da Prednison *in vivo* zu Prednisolon umgewandelt wird, muss bei entsprechender Therapie der Cortisolwert mit entsprechender Vorsicht interpretiert werden.

Methodenvergleich: 89 Patientenproben wurden im Cortisol Coat-A-Count RIA und im Cortisol Doppelantikörper RIA der DPC gemessen. Durch lineare Regression:

(CAC) = $1,02 (\text{DA}) - 0,25 \mu\text{g/dl}$
 $r = 0,970$

Mittelwerte:
18,8 µg/dl (Coat-A-Count)
18,7 µg/dl (Doppel-Antikörper)

Protein-Einfluss: Um unterschiedliche Proteinkonzentrationen zu simulieren, wurden 2,0 ml Portionen eines Humanserum-Pools gefriergetrocknet und anschließend in unterschiedlichen Volumina (1, 2, 3 und 4 ml) an Wasser aufgelöst. Jede aufgelöste Portion wurde im Cortisol Coat-A-Count RIA gemessen. In den mit der Hälfte des Originalvolumens aufgelösten Proben liegt eine extrem hohe Proteinkonzentration von 14 g/dl vor. Die Ergebnisse zeigen, dass selbst große Unterschiede in der Gesamtproteinkonzentration keinen klinisch signifikanten Einfluss auf den Cortisol Coat-A-Count RIA haben. (Siehe Tabelle "Protein Effect".)

Anwendungsberatung

Bei Rückfragen wenden Sie sich bitte an Ihre DPC Niederlassung.

Das Qualitätssystem der Diagnostic Products Corporation ist nach ISO 13485:2003 registriert.

Español

Coat-A-Count Cortisol

Utilidad del análisis: El kit Coat-A-Count Cortisol es un radioinmunoanálisis diseñado para la medición cuantitativa de cortisol (hidrocortisona, Compuesto F) en suero, orina y plasma heparinizado. Su uso es estrictamente para el diagnóstico *in vitro*, como ayuda en la evaluación clínica del estado adrenal.

Referencia: **TKCO1** (100 tubos), **TKCO2** (200 tubos), **TKCO5** (500 tubos)



El kit de 100 tubos contiene menos de 5,5 microcurios (204 kilobequerelios) de cortisol marcado con ^{125}I radioactivo. El kit de 200 tubos contiene menos de 11 microcurios (1018 kilobequerelios).

Resumen y Explicación del Test

Cortisol (hidrocortisona, Compuesto F) es el esteroide circulante más abundante y el glucocorticoide más importante secretado por la corteza adrenal. Fisiológicamente efectivo en la respuesta anti-inflamatoria y en la regulación de la presión sanguínea, el cortisol también está involucrado en la gluconeogénesis, en la absorción de calcio y en la secreción de los ácidos gástricos y de la pepsina.

Como indicador de la función adrenocortical, la determinación de los niveles de cortisol sanguíneos es útil en el diagnóstico diferencial de los síndromes de Addison y Cushing, hipopituitarismo, e hiperplasia adrenal y carcinoma.⁴

Una amplia variedad de tests de supresión y estimulación — Estimulación con ACTH, Reserva de ACTH, Supresión con Dexametasona — pueden generar información complementaria de la función adrenocortical.^{4,5,6} Se ha demostrado la existencia de concentraciones anómalas de cortisol en pacientes con infecciones

agudas, dolor, diabetes mellitus o falla cardíaca, y en mujeres embarazadas o con terapia de estrógenos. Además, ciertos síndromes virilizantes y condiciones iatrogénicas sobreelevan los niveles de esteroides hasta concentraciones no-fisiológicas que pueden interferir con el ensayo directo de cortisol, a menos que sea usado un antisuero altamente específico.

Principio del análisis

El procedimiento Coat-A-Count es un radioinmunoanálisis en fase sólida, en el cual el cortisol marcado radiactivamente con ^{125}I compete, durante un periodo de tiempo determinado, con el cortisol en la muestra del paciente, por los sitios de unión de los anticuerpos. Debido a que el anticuerpo está inmovilizado en la pared de un tubo de polipropileno, la decantación del sobrenadante es suficiente para terminar la competencia y aislar la fracción unida al anticuerpo del cortisol marcado. El tubo se cuenta en un contador gama y da un número, que, mediante una curva de calibración, se convierte en una medida del cortisol presente en la muestra del paciente.

Reactivos a pipetear: 1

Tiempo total de incubación: 45 minutos.

Cuentas totales en la iodización: aproximadamente 90 000 cpm.

Advertencias y precauciones

Para uso diagnóstico *in vitro*.

Reactivos: Almacenar a 2–8°C en una cámara preparada para almacenar material radioactivo. Desechar de acuerdo a la legislación en vigor.

No usar los reactivos después de su fecha de caducidad.

Algunos componentes suministrados en el kit pueden contener material de origen humano y/o otros componentes potencialmente peligrosos que necesiten ciertas precauciones.

Siga las precauciones universales y manipule todos los componentes como si fueran capaces de transmitir agentes infecciosos. Los materiales derivados de sangre humana han sido analizados y son negativos para sífilis; para anticuerpos frente al HIV 1 y 2; para el antígeno de

superficie de hepatitis B y para los anticuerpos de hepatitis C.

Se ha usado Azida sódica, en concentraciones menores de 0,1 g/dl, como conservante. Para su eliminación, lavar con grandes cantidades de agua para evitar la constitución de residuos de azidas metálicas, potencialmente explosivas, en las cañerías de cobre y plomo.

Agua: Usar agua destilada o desionizada.

Radioactividad

Una copia de cualquier certificado de licencia de radioisótopos (específico o general) emitido a la aduana de los EE.UU. se registrará en los ficheros de Diagnostic Products Corporation antes de que se puedan enviar kits o componentes conteniendo material radioactivo. Estos materiales radioactivos pueden adquirirse por cualquier cliente con la licencia específica apropiada. Con una licencia general, estos materiales radioactivos pueden adquirirse solo por médicos, veterinarios en la práctica de la medicina veterinaria, laboratorios clínicos y hospitales — y estrictamente para la clínica in vitro o test de laboratorio que no conlleven la administración interna o externa de material radioactivo o su radiación a humanos u otros animales. Su adquisición, recepción, almacenaje, uso, transferencia y desecho están regulados y se expenderá una licencia (general o específica) de la Comisión Nuclear de EE.UU. o de un Estado con el NRC para su consiguiente control.

Manejar los materiales radioactivos de acuerdo a los requerimientos de su licencia general o específica. Para minimizar la exposición a la radiación, el usuario debe adherirse al cuarto conjunto de guías publicadas por el National Bureau of Standards con el nombre Safe Handling of Radioactive Materials (Handbook No. 92, issued March 9, 1964) y en las consiguientes publicaciones de las autoridades Federales o Estatales.

Limpiar y descontaminar rápidamente las superficies afectadas. Evitar la generación de aerosoles. Eliminar los residuos sólidos radioactivos de acuerdo con los requerimientos de su licencia. Licencias generales (NRC Form 483) pueden eliminar sus residuos sólidos radioactivos

como residuos no radioactivos, después de retirar las etiquetas. Licencias específicas (NRC Form 313) se deben referir al Título 10, Código de Regulaciones Federales, Parte 20. Las licencias en Estados Asociados deben referirse a las normativas de su correspondiente Estado. Licencias generales pueden eliminar sus residuos líquidos radioactivos contenidos en este tipo de productos como cualquier otro material líquido, quitando las etiquetas de los contenedores y procesándolos como residuos sólidos. Licencias específicas pueden eliminar pequeñas cantidades de residuos líquidos radioactivos contenidos en este tipo de productos como cualquier otro material líquido. Refiérase a la normativa aplicable a su laboratorio.

Materiales Suministrados: Preparación Inicial

Tubos recubiertos de anticuerpo frente al Cortisol (TCO1)

Tubos de polipropileno recubiertos con anticuerpos anticortisol, embalados en bolsas de cierre hermético. Almacenar refrigerados y protegidos de la condensación, cerrando cuidadosamente las bolsas después de su uso. Estable a 2–8°C hasta la fecha de caducidad impresa en la bolsa. Color: Azul claro.

TKCO1: 100 tubos. **TKCO2:** 200 tubos.

TKCO5: 500 tubos.

¹²⁵**I Cortisol (TCO2)**

Cortisol iodizado con agentes bloqueantes de proteínas que se unen a esteroides, suministrado en forma líquida y listo para usar. Cada vial contiene 105 ml. Estable a 2–8°C durante 30 días después de su apertura, o hasta la fecha de caducidad impresa en el vial.

TKCO1: 1 vial. **TKCO2:** 2 viales.

TKCO5: 5 viales.

Calibradores de Cortisol (TCO3–8)

Calibradores de cortisol, listos para usar, en suero humano procesado. El vial A o calibrador cero contiene 2,0 ml, mientras que el resto de los calibradores, viales B – F, contienen cada uno 1,0 ml. Estable a 2–8°C hasta la fecha de caducidad impresa en la bolsa. La vida de los calibradores se puede extender por congelación. Alicuotar si es necesario, para evitar el congelamiento y

descongelamiento repetidos.

TKCO1: 1 juego. **TKCO2:** 1 juego.

TKCO5: 2 juegos.

Los calibradores contienen respectivamente 0, 1, 5, 10, 20 y 50 microgramos de cortisol por decilitro ($\mu\text{g/dl}$) en suero humano procesado; equivalentemente: 0; 27,6; 138; 276; 552 y 1 380 nanomoles por litro (nmol/l). Los puntos de calibración intermedios se pueden obtener mezclando los calibradores en las proporciones adecuadas.

Materiales Requeridos pero no suministrados

Contador Gamma compatible con los tubos de 12 x 75 mm.

Vortex

Extracción de orina

Tubos con tapas – adecuados para la extracción con diclorometano.

Diclorometano – para espectrofotometría (también llamado cloruro de metileno).

Micropipetas: 50 μl y 500 μl . Se deberá usar una pipeta de 50 μl de desplazamiento positivo.

Evaporador con nitrógeno comprimido.

Radioinmunoanálisis

Tubos de ensayo de polipropileno de 12 x 75 mm para su uso como tubos NSB, disponibles en DPC

Micropipetas: 25 μl y 1,0 ml.

Baño de incubación capaz de mantener 37°C. No es adecuado el uso de una estufa ni de un bloque calefactor.

Rack de decantación – disponible en DPC

Papel gráfico Logit-log – disponible en DPC (Referencia: ZP797)

Un control de inmunoanálisis, a tres niveles, basado en suero humano, que contiene cortisol como uno de sus 25 constituyentes, disponible en DPC (Referencia: CON6).

Recogida de la muestra

Suero y Plasma

El paciente no necesita estar en ayunas así como tampoco cualquier otro tipo de preparación. Recoger la sangre por venipunción¹⁰ en tubos sin anticoagulante o en tubos heparinizados, y separar el

suero o plasma de las células. No es aceptable el uso de plasma con EDTA. (Ver la sección Tipos de Muestras Alternativas). Debido a que el cortisol exhibe un ritmo circadiano, se deberá anotar la hora en que se toma la muestra.

Se recomienda el uso de una ultracentrífuga para aclarar las muestras lipémicas.

Las muestras hemolizadas podrían indicar una mala manipulación de la muestra antes de ser recibida por el laboratorio; en este caso, los resultados deben interpretarse con precaución.

Los tubos para recoger sangre de distintos fabricantes pueden producir valores diferentes, dependiendo del material del tubo y de los aditivos, incluyendo barreras de gel o barreras físicas, activadores de la coagulación y/o anticoagulantes. El Cortisol Coat-A-Count no ha sido analizado con todos los distintos tipos de tubos. Para obtener detalles sobre los tipos tubos que se han analizado, consulte la sección de Tipos de Muestras Alternativas.

Volumen requerido: 25 μl suero o plasma por tubo.

Conservación: 7 días a 2–8°C o 2 meses a –20°C.⁸ Antes del ensayo, llevar todas las muestras a temperatura ambiente (15–28°C) y mezclar por inversión. Alicuotar, si es necesario, para evitar la repetición de congelación y descongelación. No intentar la descongelación de muestras congeladas calentándolas en un baño de agua. Las muestras de los pacientes que se espera que contengan concentraciones de cortisol más altas que la del calibrador más alto (50 $\mu\text{g/dl}$) deberán diluirse con el calibrador cero antes del análisis.

Orina

Recoger una muestra urinaria de 24 horas sin conservante, manteniendo la muestra refrigerada durante la recolección. Registrar el volumen total en mililitros.

Volumen requerido (procedimiento de extracción): 0,5 ml de orina.

Conservación: 7 días a 2–8°C o 1 mes a –20°C.⁸

Preparación de las muestras de orina

Advertencia – Diclorometano: No pipetear con la boca. Realizar el paso de evaporación bajo una campana para gases. Evitar la exposición a flama abierta.

- 1** Marcar un tubo de polipropileno de 12 x 75 mm para cada muestra de orina.
Tubos adecuados con tapas ajustadas, disponibles en DPC. No usar tubos recubiertos con anticuerpo en esta etapa.
- 2** Pipetear **500 µl** de cada muestra de orina en el tubo preparado.
Si la muestra está turbia o si se ha formado un precipitado, centrifugar primero la orina y trabajar con el sobrenadante.
- 3 Extracción:** Añadir **1,0 ml** de diclorometano a cada tubo. Tapar bien.
No pipetear el diclorometano con la boca.
- 4** Mezclar por inversión *suave*, durante **5 a 10 minutos**.
Usar un equipo de rotación mecánica de 15 a 20 revoluciones por minuto.
- 5** Centrifugar durante **5 minutos** a 1500 xg aproximadamente para separar las dos fases.
Cualquier muestra que esté parcialmente emulsificada se deberá agitar vigorosamente y centrifugar nuevamente.
- 6** Quitar la mayor parte de la capa superior, teniendo cuidado de no interferir con la interfase.
Utilizar un aspirador de agua corriente. (Si se aspira toda la capa superior hasta la interfase, la capa de diclorometano puede contaminarse con material de la fase acuosa con la que está en contacto).
- 7 Evaporación:** Transferir **50 µl** de la fase inferior (diclorometano) a cada uno de los dos tubos de cortisol recubiertos con anticuerpos.
Pipetear todos los extractos directamente del fondo con una micropipeta de desplazamiento

positivo. Tener cuidado de que nada de la fase superior entre en el tubo de análisis.

- 8** Evaporar para completar el secado bajo un chorro suave de nitrógeno a temperatura ambiente (15–28°C).
Realizar el paso de evaporación bajo una campana para gases. Evitar la exposición a flama abierta.

Una vez secos, permitir que los tubos (adecuadamente marcados) tomen su lugar en un análisis que incluye un conjunto de tubos calibradores (Suero). Continuar con el paso 2 del procedimiento de radioinmunoanálisis, añadiendo 25 µl del calibrador cero A, y los calibradores sucesivos. Los resultados en microgramos de cortisol (libre) por 100 ml de orina (µg/dl) pueden leerse directamente de la curva de calibración. No es necesario usar un factor de corrección.

No se debe tardar más de 30 minutos entre la transferencia del extracto al tubo recubierto (paso 7 del procedimiento de extracción) y la adición del trazador (paso 3 del procedimiento de radioinmunoanálisis). El procedimiento de extracción puede interrumpirse después del paso 6, guardando la capa de infranadante herméticamente en un congelador a –20°C.

Procedimiento del Radioinmunoanálisis

Todos los componentes deben llevarse a temperatura ambiente (15–28°C) antes de su uso.

- 1 Tubos de ensayo:** Marcar cuatro tubos de ensayo de polipropileno (sin recubrir) 12 x 75 mm. Tubos T (cuentas totales) y NSB (unión no específica) en duplicado.

Al ser característicamente baja la unión no específica en el ensayo Coat-A-Count, los tubos NSB pueden ser omitidos sin comprometer la precisión y control de calidad del ensayo.

Tubos recubiertos: Marcar doce tubos recubiertos de anticuerpo frente a la cortisol: A (máxima unión) y B hasta F por duplicado. Marcar tubos recubiertos de anticuerpo adicionales, también en duplicado, para controles y muestras de pacientes.

Calibrador	µg/dl	nmol/l
A (MB)	0	0
B	1	27,6
C	5	138
D	10	276
E	20	552
F	50	1 380

Muestras de orina: Una vez secos, se deberá marcar correctamente los tubos recubiertos utilizados para evaporar los extractos, e incorporarlos en la secuencia de los tubos con las muestras de los pacientes.

- Pipetear **25 µl** del calibrador cero A en los tubos NSB y A, y *también en cada uno de los tubos de evaporación de las muestras de orina*. Pipetear **25 µl** del resto de los calibradores, controles y muestras de los pacientes en sus correspondientes tubos.

Pipetear directamente en el fondo del tubo.

Es una buena práctica el uso de micropipetas con punta desechables, cambiando las puntas entre las muestras, para evitar la contaminación por arrastre.

- Añadir **1,0 ml** de ^{125}I Cortisol a todos los tubos. Mezclar en el Vortex.
Los laboratorios que tengan un equipo confiable para efectuar diluciones automáticas pueden hacer los pasos 2 y 3 simultáneamente. No se debe tardar más de 10 minutos durante la dispensación del trazador. Dejar los tubos T a un lado para su conteo (paso 6); no requieren más procesamiento posterior.
- Incubar durante **45 minutos a 37°C**.
Usar un baño de agua; no es apropiado el uso de una estufa ni de un bloque calefactor. El análisis no se verá significativamente afectado por periodos de incubación mayores.

- Decantar.

Eliminar toda la humedad visible para mejorar la precisión. Decantar o aspirar el contenido de todos los tubos (excepto los tubos T) y dejar escurrir durante 2 o 3 minutos. Golpear los tubos contra papel absorbente para eliminar las gotas residuales.

- Contar durante **1 minuto** en un contador gamma.

Cálculo de resultados

Para obtener resultados en términos de concentración a partir de una representación logit-log de la curva de calibración, primero hay que calcular para cada pareja de tubos las cuentas medias por minuto corregidas con el NSB:

Cuentas netas = (Media CPM) menos (Media **NSB** CPM)

Entonces, determinar la unión de cada pareja de tubos como un porcentaje de la unión máxima (MB), tomando las cuentas corregidas con el NSB de los tubos A como 100%:

Porcentaje de Unión = (Cuentas netas / Cuentas **MB** netas) × 100

El cálculo puede simplificarse omitiendo la corrección de las uniones no específicas; las muestras dentro del rango de calibración van a dar virtualmente el mismo resultado cuando el porcentaje de unión es calculado directamente a partir de la media de las CPM).

Usando papel gráfico logit-log, representar el porcentaje de unión en el eje vertical frente a la concentración en el eje horizontal (logarítmico) para cada calibrador no cero, y dibujar la línea que pase por esos puntos aproximadamente. Los resultados de las muestras pueden ser leídos en la curva por interpolación.

Es una buena práctica inspeccionar los resultados para comprobar la concordancia entre los replicados, y realizar una gráfica de la curva de calibración (aunque los cálculos se realicen por ordenador) para ver la transformación más apropiada a usar y las posibles desviaciones en los puntos de calibración. También, recomendamos mantener un registro de los siguientes parámetros de la reducción de datos:

T = Cuentas totales (como cuentas por minuto)

$\%NSB = 100 \times (\text{Media cuentas NSB} / \text{cuentas totales})$

$\%MB = 100 \times (\text{Cuentas netas} / \text{Cuentas totales})$

Y los cortes 20, 50 y 80 por ciento, donde

20% = Concentración al 20 por ciento de unión, etc.

Otras aproximaciones, por ejemplo, logística 4-parámetros, también son aceptables. Ver Dudley RA, et al. "Guidelines for immunoassay data reduction". Clin Chem 1985;31:1264-71.

Muestras de orina:

Las concentraciones de cortisol libre en orina se pueden leer directamente de la curva de calibración. No es necesario usar un factor de corrección. (La colocación de *dos veces* la cantidad normal de 25 µl de muestra en el tubo de análisis en el paso 7 del procedimiento de extracción, compensa exactamente la dilución 1 en 2 ocasionada por la extracción de 0,5 ml de orina en 1,0 ml de diclorometano).

Para determinar la producción de cortisol libre urinario en microgramos por día, simplemente multiplique el resultado en µg/dl por el volumen de orina de 24 horas en decilitros.

$\mu\text{g}/24 \text{ horas} =$

$\mu\text{g}/\text{dl} \times (\text{Volumen total en mililitros}) / 100$

Ejemplo: Sólo como ilustración, no se puede utilizar para calcular resultados. (Ver tabla "Example Run").

Control de Calidad

Se deben procesar de manera rutinaria al menos dos niveles de controles (o pool de sueros) con diferente concentración de cortisol — baja y alta —.

Informar los resultados de los pacientes sólo si los resultados de los controles para este ensayo están dentro de los criterios de aceptabilidad establecidos por su laboratorio.

Es una buena práctica de laboratorio registrar para cada ensayo los números de lote de los componentes usados, así como las fechas en las que fueron abiertos por primera vez y reconstituidos. También recomendamos el uso de gráficos diarios de los controles — como se describe, por ejemplo, en Westgard JO, et al. A multi-rule chart for quality

control. Clin Chem 1981;27:493-501. Las muestras repetidas pueden servir como una herramienta de valor adicional para monitorizar la precisión interensayo, y que las parejas de los tubos del control pueden espaciarse a lo largo de la tanda de ensayo para verificar la ausencia de deriva significativa.

Blancos de solvente:

Para que los resultados sean confiables, el diclorometano debe ser para uso espectrofotométrico y la fuente de nitrógeno, de usarse, no debe contaminar los tubos de evaporación con aceite o humedad. (El uso de una trampa con sulfato de calcio ayudará a evitar dicha contaminación). Como un control de la pureza de estos reactivos, los cuales no se suministran con el kit, recomendamos correr periódicamente un "blanco de solvente". Esto implica extraer y analizar agua destilada o estéril, de la manera indicada para las muestras de orina, para verificar que dé una concentración aparente de cortisol esencialmente cero, es decir, por debajo del límite de detección del análisis.

Valores esperados

Suero

Se han informado los siguientes valores esperados para el cortisol circulante.

Variación del ritmo diurno	a.m.: 5 – 25 µg/dl (138 – 690 nmol/l) ^{1,8,9} p.m.: Aproximadamente la mitad de los valores a.m.
Estimulación con ACTH	Más del doble de los valores basales ^{4,5} (generalmente de 3 a 5 veces)
Reserva de ACTH (Supresión con metirapona)	Por debajo de los valores basales (control) ^{5,6}
Supresión con dexametasona	Por debajo de los valores basales (control) para las pruebas de detección de dosis bajas y altas ^{4,5}

Orina

Un estudio de muestras de orina, recogidas en un periodo de 24 horas de 33 voluntarios sanos del laboratorio, dio un intervalo absoluto de 21 a 85 µg/24 horas, con una mediana de 48 µg/24 horas. Esto es coherente con un intervalo de referencia de 20 a 90 µg/24 horas para el cortisol libre urinario, como se informó en la literatura.⁷

Estos límites han de considerarse *sólo como una guía*. Cada laboratorio deberá establecer sus propios intervalos de referencia.

Limitación

Los resultados de cortisol del suero y urinarios pueden ser falsamente elevados en las muestras obtenidas de pacientes que están siendo tratados con prednisolona o prednisona (convertida a prednisolona *in vivo*). Por ello, se deberá tener cuidado al realizar determinaciones de cortisol en pacientes que se encuentren bajo tratamiento con estos corticosteroides sintéticos estructuralmente relacionados.

Características analíticas

Para ver resultados *representativos* de las cualidades del ensayo, consulte las tablas y los gráficos. Los resultados se expresan en microgramos de cortisol por decilitro

(µg/dl). Todos los resultados se obtuvieron en muestras de suero.

Factor de Conversión:

µg/dl × 27,59 → nmol/l

Intervalo de calibración: 1 – 50 µg/dl (27,6 – 1 380 nmol/l)

Sensibilidad analítica: 0,2 µg/dl (5,5 nmol/l)

Precisión intraensayo (dentro de una tanda): Las estadísticas se calcularon para las muestras a partir de los resultados de 20 pares de tubos en una tanda. (Ver la tabla "Intraassay Precision".)

Precisión entre ensayos (de una tanda a otra): Los análisis estadísticos se calcularon para las muestras a partir de los resultados de 20 pares de tubos. (Ver la tabla "Interassay Precision".)

Efecto deriva: Ninguno, hasta aproximadamente 700 tubos. (Ver la tabla "End-of-Run Effect").

Linealidad: Las muestras fueron analizadas con varias diluciones. (Ver la tabla "Linearity")

Recuperación: Se han analizado las muestras cargadas 1 a 19 con tres soluciones (130, 250 y 475 µg/dl) de cortisol. (Ver la tabla "Recovery")

Bilirrubina: La presencia de bilirrubina, en concentraciones hasta 200 mg/l, no tienen ningún efecto sobre los resultados en términos de precisión.

Hemólisis: La presencia de eritrocitos hasta concentraciones de 30 µl/ml no tiene efecto en los resultados, en lo concerniente a la precisión del ensayo.

Lipemia: El calibrador de 50 µg/dl se diluyó sucesivamente con un pool de suero lipémico. Esto hace que el grado de lipemia aumente a medida que la concentración del cortisol disminuye (principalmente debido al calibrador). Todas las diluciones se analizaron junto con el pool lipémico sin calibrador. Los resultados muestran una recuperación buena, aun en presencia de una lipemia grave.

Tipo de Muestra Alternativa: para evaluar el efecto de los diferentes tipos de muestras alternativos, se recogió sangre de 40 voluntarios en tubos normales, tubos con Heparina, tubos con EDTA y

tubos vacutainer SST[®] de Becton Dickinson. Todas las muestras se analizaron mediante el procedimiento Coat-A-Count. Por regresión lineal:

(Heparina) = 0,93 (Suero) + 0,59 µg/dl
r = 0,988

(EDTA) = 1,17 (Suero) – 0,03 µg/dl
r = 0,998

(SST) = 0,94 (tubos simples) + 0,70 µg/dl
r = 0,995

Medias:

13,8 µg/dl (Suero)
13,5 µg/dl (Heparina)
16,2 µg/dl (EDTA)
13,7 µg/dl (SST)

Los resultados muestran que *no* es aceptable el uso de plasma con EDTA.

Especificidad: El antisuero Coat-A-Count Cortisol es altamente específico para el cortisol, y tiene una reactividad cruzada extremadamente baja para otros esteroides naturales o fármacos terapéuticos que pueden estar presentes en las muestras de los pacientes. (Ver la tabla "Specificity".)

Si bien algunos esteroides exhiben una reactividad cruzada leve, sus concentraciones fisiológicas normales son bajas en comparación con el cortisol, por lo tanto no interferirán significativamente en el procedimiento Coat-A-Count Cortisol. No obstante, se ha observado una reactividad cruzada de aproximadamente 76% con prednisolona, la cual deberá considerarse para los pacientes que estén bajo este tratamiento. Debido a que la prednisolona se convierte *in vivo* en prednisolona, se deberá tener precaución con las determinaciones de cortisol para los pacientes que se encuentren bajo cualquiera de estos dos tratamientos.

Comparación de los métodos: El análisis se comparó con el análisis de Cortisol de Doble Anticuerpo de DPC en 89 muestras de pacientes. Por regresión lineal:

(CAC) = 1,02 (DA) – 0,25 µg/dl
r = 0,970

Medias:

18,8 µg/dl (Coat-A-Count)
18,7 µg/dl (Doble Anticuerpo)

Efecto de las proteínas: Para simular distintas concentraciones de proteínas, se realizaron experimentos en los cuales

alícuotas de 2,0 ml de un pool de suero humano se liofilizaron y luego se reconstituyeron con varios volúmenes de agua (1, 2, 3 y 4 ml). Luego, se analizó cada alícuota reconstituida mediante el procedimiento Coat-A-Count Cortisol. Observe que las alícuotas reconstituidas con la mitad del volumen original representan una concentración de proteínas extremadamente alta, del orden de 14 g/dl. Estos resultados indican que incluso grandes variaciones en la concentración de proteína total no tiene un efecto clínicamente significativo sobre el análisis Coat-A-Count Cortisol. (Ver la tabla "Protein Effect" para resultados representativos.)

Asistencia técnica

Póngase en contacto con el distribuidor nacional.

El Sistema de Calidad de Diagnostic Products Corporation está registrado para la ISO 13485:2003.

Français

Coat-A-Count Cortisol

Domaine d'utilisation: Coat-A-Count Cortisol est un dosage radioimmunologique permettant de doser quantitativement le Cortisol (hydrocortisone, composé F) dans le sérum, l'urine et le plasma hépariné. Cette trousse est strictement destinée à l'usage diagnostic *in vitro*, et constitue une aide dans l'appréciation de l'état clinique de la fonction adrénaliennne.

Référence catalogue : **TKCO1** (100 tubes), **TKCO2** (200 tubes), **TKCO5** (500 tubes)



Le coffret de 100 tubes contient moins de 5,5 microcuries (204 kilobecquerels) de Cortisol réactif marqué à l'iode 125 ; le coffret de 200 tubes contient moins de 11 microcuries (407 kilobecquerels) ; et le coffret de 500 tubes contient moins de 27,5 microcuries (1018 kilobecquerels)

Introduction

Le cortisol (hydrocortisone, composé F) est le stéroïde circulant le plus abondant

et le glucocorticoïde majeur sécrété par le cortex surrénalien. Le cortisol possède une activité anti-inflammatoire physiologique et agit sur le maintien de la pression sanguine. Il est également impliqué dans la néoglucogénèse, l'absorption du calcium et la sécrétion d'acide gastrique et de pepsine.

C'est un indicateur du fonctionnement des corticosurrénales. Le dosage du cortisol est indiqué pour le diagnostic différentiel de la maladie d'Addison et du syndrome de Cushing, dans l'insuffisance antéhypophysaire, l'hyperplasie des glandes surrénales et les cancers.⁴

Une variété de tests de stimulation ou suppression — Stimulation ACTH, Réserve ACTH, Dexaméthasone Suppression — peuvent fournir des informations complémentaires sur la fonction adrénocorticosurrénalienne.^{4,5,6} Il a été démontré que des concentrations anormales de cortisol peuvent exister chez des patients atteints d'infections aiguës, de douleurs sévères, de diabète sucré ou d'insuffisance cardiaque, et chez des femmes soit enceintes soit sous thérapie oestrogénique. Par ailleurs, certains syndromes de virilisation et certaines maladies iatrogènes entraînent une augmentation (non physiologique) de la concentration d'autres stéroïdes naturels, pouvant interférer directement sur le dosage du cortisol. Il est donc important d'utiliser un anticorps hautement spécifique du cortisol dans le dosage.

Principe du test

Le dosage Coat-A-Count Cortisol est un dosage radioimmunologique en phase solide. Au cours de l'incubation, il y a compétition entre le cortisol marqué à l'iode 125 et le cortisol contenu dans l'échantillon plasmatique, vis-à-vis des sites de l'anticorps. L'anticorps étant fixé sur la paroi des tubes en polypropylène, il suffit d'éliminer le surnageant par décantation pour isoler facilement la fraction radioactive liée à l'anticorps. Le tube est ensuite compté sur un compteur gamma. La concentration de cortisol présente dans l'échantillon est déterminée à l'aide d'une courbe standard.

Réactifs à distribuer: 1

Temps total d'incubation: 45 minutes.

Activité totale en début de marquage:
environ 90 000 cpm.

Précautions d'emploi

Réservé à un usage diagnostique *in vitro*.

Réactifs : Conserver à +2–8°C dans un réfrigérateur autorisé à recevoir du matériel radioactif. Éliminer les déchets conformément aux lois en vigueur.

Ne pas utiliser les réactifs au delà de leur date d'expiration.

Certains composants fournis avec ce coffret peuvent contenir des agents humains et/ou d'autres éléments potentiellement infectieux qui nécessitent certaines précautions:

Respecter les précautions d'emploi et manipuler tous les composants du coffret comme des produits potentiellement infectieux. Les réactifs dérivés de produits humains et utilisés dans ce coffret ont subi un test sérologique pour la Syphilis et des tests de dépistage pour les anticorps anti-VIH1 et 2, anti-VHC et pour l'antigène de surface de l'hépatite B, qui se sont tous avérés négatifs.

De l'azide de sodium à des concentrations inférieures à 0,1 g/dl a été ajouté comme conservateur ; lors de l'élimination, l'évacuer avec de grandes quantités d'eau pour éviter une accumulation d'azides métalliques explosifs dans les canalisations

Eau : utiliser de l'eau distillée ou désionisée.

Radioactivité

Ce coffret de réactif est réservé à l'usage *in vitro**

Règles de base de protection contre les rayonnements ionisants et précautions d'emploi.

Ce produit radioactif ne peut être reçu, acheté, détenu ou utilisé que par des personnes autorisées à cette fin et dans des laboratoires dotés de cette autorisation. Cette solution ne peut en aucun cas être administrée à l'homme ou aux animaux. Respecter impérativement les dates de péremption indiquées sur l'emballage extérieur et sur les étiquettes des différents réactifs du coffret. Tous les réactifs, dont les tubes revêtus d'anticorps, doivent être conservés à + 4/+

8° C dans leur conditionnement d'origine avant d'être utilisés. L'achat, la possession, l'utilisation et l'échange de matières radioactives sont soumis aux réglementations en vigueur dans le pays de l'utilisateur. Les règles de base de protection contre les rayonnements ionisants doivent être respectées selon des procédures en vigueur. Ne pas pipeter des solutions radioactives avec la bouche. Eviter le contact direct avec la peau ou les muqueuses de tout produit radioactif en utilisant des blouses et gants de protection. Toute manipulation de matières radioactives se fera dans un local ad hoc éloigné de tout passage. Les produits radioactifs seront stockés dans leur conditionnement d'origine dans un local approprié. Un cahier de réception et de stockage de produits radioactifs sera tenu à jour. Le matériel de laboratoire et la verrerie qui ont été contaminés doivent être éliminés au fur et à mesure afin d'éviter une contamination croisée de plusieurs isotopes. Chaque contamination ou perte de substance radioactive devra être réglée selon les procédures établies. Toute mise aux déchets de matière radioactive se fera en accord avec les réglementations en vigueur. Ne pas manger, ni boire, ni fumer, ni appliquer des cosmétiques dans les laboratoires où des produits radioactifs sont utilisés.

Les réactifs radioactifs ne peuvent être vendus qu'à des personnes habilitées à manipuler des substances radioactives.

Autorisation DGSNR.

Matériel fourni: préparation initiale

Tubes revêtus d'anticorps anti-cortisol (TKO1)

Tubes en polypropylène revêtus d'anticorps anti-cortisol dans des sachets à glissière. Conserver à l'abri de l'humidité, refermer soigneusement les sachets après ouverture. Stables à +2- 8° C jusqu'à la date de péremption indiquée sur le sachet. Couleur : bleu clair.

TKO1: 100 tubes. **TKO2:** 200 tubes.
TKO5: 500 tubes.

Cortisol marqué à l'iode 125 (TKO2)

Cortisol marqué à l'iode 125 avec des agents bloquant la liaison des stéroïdes aux protéines, fourni sous forme liquide,

prête à l'emploi. Chaque flacon contient 105 ml. Conservés à + 2/+ 8° C, les flacons sont stables au moins 30 jours après ouverture ou jusqu'à la date de péremption indiquée sur le flacon.

TKO1: 1 flacon. **TKO2:** 2 flacons.

TKO5: 5 flacons.

Standards Cortisol (TKO3-8)

Les standards Cortisol, prêts à l'emploi, dans du sérum humain prétraité. Le standard zéro, flacon A, contient 2,0 ml, les autres standards, flacons de B à F contiennent chacun 1,0 ml. Stable à +2- 8° C pendant au moins 30 jours après ouverture, ou jusqu'à la date d'expiration inscrite sur le flacon. Il est possible d'augmenter la durée de vie des standards en les congelant. Aliquoter, si nécessaire, afin d'éviter de répéter les cycles congélation / décongélation.

TKO1: 1 jeu. **TKO2:** 1 jeu.

TKO5: 2 jeux.

Les standards contiennent, respectivement, 0, 1, 5, 10, 20 et 50 microgrammes de cortisol par décilitre (µg/dl) dans du sérum humain prétraité; ce qui équivaut à, 0, 27,6, 138, 276, 552 et 1 380 nanomoles par litre (nmol/l). Des points intermédiaires peuvent être obtenus en mélangeant des standards dans des proportions compatibles.

Matériel requis mais non fourni

Compteur Gamma – permettant l'utilisation de tubes standards 12x75 mm
Agitateur de type Vortex

Extraction du cortisol des échantillons urinaires

Tubes avec bouchon, compatibles pour une extraction avec du dichlorométhane.

Dichlorométhane (ou chlorure de méthylène) de qualité pour spectrophotomètre.

Micropipettes: 50 µl et 500 µl. La pipette pour les 50 µl doit être une micropipette.

Evaporateur avec azote comprimé

Dosage radioimmunologique

Tubes secs en polypropylène 12x75 mm – à utiliser comme les tubes LNS, disponibles chez DPC

Micropipettes: 25 µl et 1,0 ml.

Bain-marie pouvant maintenir une température d'incubation de 37°C. Ni étuve ni bloc chauffant ne sont adaptés à ce dosage.

Un portoir de décantation – disponible chez DPC

Papier graphe Logit-log– disponibles chez DPC (Référence catalogue : ZP797)

Un contrôle immunodosage, à base de sérum humain, à trois niveaux de concentration, contenant du cortisol (parmi plus de 25 constituants dosables), est disponible chez DPC (Référence catalogue : CON6).

Recueil des échantillons

Sérum et Plasma

Le patient n'a pas besoin d'être à jeun et aucune préparation spéciale n'est requise. Prélever le sang par ponction veineuse¹⁰ sur tubes secs (sans anticoagulant) ou héparinés, et séparer le sérum des cellules. Le plasma EDTA n'est pas acceptable. (Voir le chapitre Autres Types d'Échantillons). Puisque le cortisol présente un rythme circadien, il faut noter l'heure du prélèvement.

Il est recommandé de clarifier les échantillons hyperlipémiques par ultracentrifugation.

Des échantillons hémolysés peuvent être révélateurs d'une préparation inadéquate du prélèvement avant son envoi au laboratoire ; il faudra donc interpréter les résultats avec prudence.

Des tubes pour prélèvements sanguins provenant de fabricants différents peuvent donner des résultats différents, selon les matériaux et additifs utilisés, y compris gels ou barrières physiques, activateurs de la coagulation et/ou anticoagulants. Le coffret Cortisol Coat-A-Count n'a pas été testé sur tous les types de tubes possibles. Veuillez consulter le chapitre intitulé Autres Types d'Échantillons pour plus de renseignements sur les tubes qui ont été évalués.

Volume nécessaire : 25 µl de sérum ou de plasma par tube

Conservation: 7 jours à + 2–8°C ou 2 mois à –20°C.⁸ Avant le dosage, laisser les échantillons revenir à température ambiante (15–28°C), mélanger doucement par rotations ou retournement. Aliquoter, si nécessaire, afin d'éviter de

répéter les cycles congélation / décongélation. Ne pas tenter de décongeler les spécimens congelés à l'aide d'un bain marie. Les échantillons de patients suspectés de contenir des concentrations de cortisol supérieures au standard le plus élevé (50 µg/dl) doivent être dilués avec le standard zéro avant le dosage.

Urine

Recueillir les urines de 24 heures sans conservateur, en gardant les échantillons au réfrigérateur après chaque recueil. Noter le volume total en ml.

Volume Requis (protocole d'extraction): 0,5 ml d'urine.

Conservation: 7 jours à +2–8°C ou 1 mois à –20°C.⁸

Préparation des échantillons urinaires

ATTENTION – Dichlorométhane: ne pas pipeter avec la bouche. Effectuer l'évaporation sous une hotte et éviter tout contact avec les flammes.

1. Etiqueter un tube en polypropylène de 12x75 mm pour chaque échantillon urinaire.
Des tubes adaptés avec des bouchons parfaitement hermétiques sont disponibles chez DPC. Ne pas utiliser des tubes coâtés d'anticorps à ce stade.
2. Pipeter **500 µl** de chaque échantillon urinaire dans les tubes préparés.
Si l'échantillon est trouble, ou si un précipité s'est formé, centrifuger au préalable et utiliser le surnageant.
3. **Extraction**: ajouter **1,0 ml** de dichlorométhane dans chaque tube. Boucher soigneusement.
Ne pas pipeter le dichlorométhane avec la bouche.
4. Mélanger par légère inversion pendant **5 à 10 minutes**.
Utiliser un agitateur rotatif: 15 à 20 tours par minute.
5. Centrifuger pendant **5 minutes** à environ 1500xg pour séparer les deux phases.
Tout échantillon partiellement émulsionné doit être agité

vigoureusement et centrifugé à nouveau.

- 6 Prélever le maximum de la phase supérieure avec précaution, sans perturber l'interface.

Utiliser une pompe à vide. (Aspirer jusqu'à l'interface peut entraîner une contamination du dichlorométhane par la phase aqueuse en contact).

- 7 **Evaporation:** Transférer **50 µl** de la phase inférieure (dichlorométhane) dans chacun des deux tubes revêtus d'anticorps anti-cortisol.

Pipeter tous les extraits directement au fond du tube en utilisant une pipette « à capillaire ». Faire attention à ce qu'aucun élément de la phase supérieure ne contamine le tube.

- 8 Evaporer jusqu'à sec, sous un courant d'azote modéré, à température ambiante (15–28°C).

Effectuer l'évaporation sous une hotte et éviter le contact avec les flammes.

Une fois sec, replacer les tubes (étiquetés en conséquence) dans la série à doser incluant les tubes de la gamme standard (sérum). Continuer – étape 2 de la procédure de radioimmunos dosage – en ajoutant 25 µl du standard zéro A, et ainsi de suite. Les résultats en microgrammes de cortisol (libre) par 100 ml d'urine (µg/dl) peuvent être lus directement à partir de la courbe standard, sans facteur de conversion.

Pas plus de 30 minutes ne doivent se passer entre le transfert de l'extrait dans le tube coâté d'anticorps (étape 7 de la procédure d'extraction) et l'ajout du traceur (étape 3 de la procédure de radioimmunos dosage). La procédure d'extraction peut être interrompu après l'étape 6 en conservant le tube contenant la phase inférieure soigneusement bouché, à –20°C dans le congélateur.

Protocole de dosage radioimmunologique

Tous les composants doivent être à température ambiante (15–28°C) avant utilisation.

- 1 **Tubes secs:** Etiqueter en duplicate 4 tubes T (activité totale) et LNS secs (non coâtés) en polypropylène 12x75 mm.

La valeur du LNS dans la technique Coat-A-Count étant très faible, elle peut être négligée sans modifier la précision ou le contrôle de qualité.

Tubes revêtus d'anticorps: Etiqueter 12 tubes revêtus d'anticorps anti-cortisol, A (liaison maximale) et de B à F, en duplicate. Etiqueter les tubes revêtus d'anticorps anti-cortisol supplémentaires, également en duplicate, pour les contrôles et les échantillons patients.

Standards	µg/dl	nmol/l
A (LM)	0	0
B	1	27,6
C	5	138
D	10	276
E	20	552
F	50	1 380

Echantillons urinaires: Une fois secs, les tubes revêtus d'anticorps utilisés pour l'évaporation des extraits doivent être convenablement identifiés et incorporés dans la série des échantillons à doser.

- 2 Pipeter **25 µl** du standard zéro A dans les tubes de LNS et les tubes A, et également dans chacun des tubes correspondants aux échantillons urinaires. Pipeter **25 µl** de chacun des autres standards, contrôles et échantillons de patients dans les tubes correspondants préparés.
Pipeter directement au fond du tube.

Il est bon d'utiliser des embouts de micropipettes jetables, de changer d'embout entre les échantillons de manière à éviter toute contamination.

- 3 Ajouter **1,0 ml** de cortisol marqué à l'iode 125 dans chaque tube. Vortexer. Les laboratoires équipés d'un pipeteur-diluteur fiable peuvent procéder aux étapes 2 et 3 simultanément. Pas plus de 10 minutes ne doivent s'écouler pendant la distribution du traceur. Les tubes T peuvent être mis de côté jusqu'au comptage (étape 6); ils n'ont besoin d'aucun autre traitement.

- 4 Incuber pendant **45 minutes à 37°C**. Utiliser un bain-marie. Une étuve ou un bloc chauffant ne sont pas adaptés

à cet usage. Des temps d'incubation plus longs ne modifient pas de façon significative le dosage.

5 Décanter parfaitement.

Éliminer toute trace d'humidité pour améliorer la précision du dosage. À l'aide d'un portoir de décantation, décanter ou aspirer le contenu de tous les tubes (excepté les tubes T) et laisser les tubes retournés pendant 2 ou 3 minutes. Puis appliquer les fortement sur du papier absorbant afin d'éliminer les gouttelettes résiduelles.

6 Compter **1 minute** dans un compteur gamma.

Calcul des résultats

Afin d'obtenir des résultats en concentrations à partir d'une représentation logit-log de la courbe de calibration, calculer pour chaque doublet de tubes les coups corrigés: moyenne cpm-moyenne des cpm du LNS:

CPM corrigés = (Moyenne cpm) moins (Moyenne cpm **LNS**)

Puis déterminer pour chaque doublet la capacité de liaison en pourcentage de liaison maximale (B0), corrigée des cpm dus au LNS des tubes A tubes considérés à 100%:

$\% \text{ liaison} = (\text{cpm corrigés} / \text{cpm corrigés } \mathbf{LM}) \times 100$

(Le calcul peut être simplifié en négligeant la correction due au LNS. Les échantillons dans la gamme d'étalonnage donnent des résultats pratiquement identiques quand la capacité de liaison est calculée directement à partir de la moyenne des CPM.)

En utilisant un papier logit-log, on porte en ordonnée les pourcentages de liaison en fonction des concentrations des calibrateurs qui ne sont pas à zéro, en abscisse. On trace une ligne droite passant approximativement par ces points. Les concentrations en cortisol des échantillons inconnus sont déterminées par interpolation sur la courbe standard.

Il est bon de vérifier les doublets et de construire une représentation graphique de la courbe de calibration (même si celle-ci est faite par ordinateur) avec les différentes valeurs de façon à visualiser le

meilleur tracé et c'est une façon de détecter les points deviants. Nous recommandons aussi de suivre les paramètres suivants :

T = Activité totale (cpm)

$\% \text{LNS} = 100 \times (\text{Moyenne des cpm du LNS} / \text{cpm Totaux})$

$\% \text{LM} = 100 \times (\text{cpm corrigés} / \text{cpm totaux})$

Et les intercepts à 20, 50 et 80 % avec

20% = Concentration à 20% de liaison, etc.

Note: d'autres approches sont possibles comme l'utilisation de polynôme du 4^{ème} degré. Se rapporter à Dudley RA, et al. Guidelines for immunoassay data reduction. Clin Chem 1985;31:1264-71.

Echantillons urinaires:

Les concentrations en cortisol libre urinaire peuvent être lues directement à partir de la courbe standard. Aucun facteur de correction n'est nécessaire. (L'introduction en double des habituels 25 µl d'échantillon dans le tube lors de l'étape 7 du protocole d'extraction compense exactement la dilution au demi causée par l'extraction de 0,5 ml d'urine dans 1,0 ml de dichlorométhane.)

Pour déterminer la production de cortisol libre urinaire en microgrammes par jour, multiplier simplement le résultat en µg/dl par le volume urinaire en décilitre recueilli en 24 heures:

$\mu\text{g}/24 \text{ heures} = \mu\text{g}/\text{dl} \times (\text{Volume Total en millilitres}) / 100$

Exemple de série: A titre d'exemple uniquement, et non pour calculer des résultats provenant d'une autre série. (Voir le tableau "Example Run".)

Contrôle de Qualité

Les contrôles (ou pools de sérums) avec au moins deux taux de concentration de cortisol – haut et bas - doivent être dosés en routine comme des échantillons inconnus.

Les résultats de patient ne doivent être validés que si les résultats des contrôles correspondent aux critères d'acceptation établis par votre laboratoire.

Il est bon d'enregistrer pour chaque dosage les numéros de lots des composants utilisés ainsi que la date à laquelle ils ont été reconstitués ou ouverts.

Nous recommandons également de noter jour après jour les résultats des contrôles – comme décrit par exemple dans Westgard JO, et al. A multi-rule chart for quality control. Clin Chem 1981;27:493-501. Noter qu'un redosage d'échantillon peut être précieux pour suivre la précision inter essai, et que les doublets de tubes contrôle peuvent être espacés de façon à vérifier l'absence de dérive significative.

“Blancs de solvants”:

Pour que les résultats soient fiables, le dichlorométhane doit être d'une pureté suffisante et la source d'azote utilisée pour l'évaporation ne doit pas être contaminée par de la graisse ou de l'humidité. (A cet effet, un piège contenant du sulfate de calcium est utile). Pour vérifier la pureté de ces réactifs, nous recommandons d'effectuer périodiquement un "blanc solvant". Ceci implique une extraction et un dosage en utilisant de l'eau distillée ou stérile de la même manière que celle décrite pour l'échantillon urinaire. Ceci afin de vérifier que la concentration apparente en cortisol est bien nulle ou inférieure à la limite de détection du dosage.

Valeurs de référence

Sérum

Les valeurs attendues suivantes en cortisol circulant ont été reportées.

Variation nycthémerale	matin. : 5 – 25 µg/dl (138 – 690 nmol/l) ^{1,8,9} Après midi: Environ la moitié des valeurs du matin
Stimulation ACTH	Deux fois supérieures à la valeur de base (généralement 3 à 5 fois) ⁵
ACTH Réserve (Freination à la métyrapone)	Inférieures aux valeurs de base (contrôle) ^{5,6}
Freination à la Dexaméthasone	Inférieures aux valeurs de base (contrôle) pour le suivi, tests à faible dose et haute dose ^{4,5}

Urine

Une étude d'échantillons urinaires de 24 heures provenant de 33 volontaires sains a donné un domaine absolu de 21 à 85 µg/24 heures, avec une médiane de

48 µg/24 heures. Ce qui est concordant avec un domaine de mesure de 20 à 90 µg/24 heures pour le cortisol urinaire libre, comme décrit dans la littérature.⁷

Utiliser ces valeurs à *titre indicatif* uniquement. Chaque laboratoire devra établir ses propres valeurs de référence.

Limites

Les valeurs de cortisol sérique ou urinaire peuvent être trouvées faussement élevées chez des patients traités avec la prédnisolone ou la prédnisone (transformée en prédnisolone in vivo). Une attention particulière doit être apportée pour le dosage du cortisol chez des patients suivant ce type de traitement ou des traitements à base de corticostéroïdes de structure voisine.

Performances du test

Consulter les tableaux et graphiques pour obtenir les données *représentatives* des performances de ce test. Les résultats sont exprimés en microgrammes de cortisol par décilitre (µg/dl). Tous les résultats ont été obtenus à partir d'échantillons sériques.

Facteur de conversion :

µg/dl × 27,59 → nmol/l

Intervalle de linéarité : 1 – 50 µg/dl

(27,6 – 1 380 nmol/l)

Sensibilité analytique : 0,2 µg/dl

(5,5 nmol/l)

Précision intra-dosage (au sein d'une même série)

Les résultats ont été calculés pour chacun des 7 échantillons à partir des résultats de 20 tubes en duplicate dans une même série. (Voir le tableau "Intraassay Precision")

Précision inter-dosage (entre plusieurs séries)

Les résultats ont été calculés pour chacun des 3 échantillons à partir des résultats de 20 tubes en duplicate. (Voir le tableau "Interassay Precision".)

Effet de la position des tubes: aucun jusqu'à environ 700 tubes. (Voir le tableau "End-of-Run Effect".)

Test de dilution : Des échantillons ont été dosés à différentes concentrations. (Voir le tableau "Linearity".)

Test de récupération : Des échantillons chargés dans un rapport de 1 à 19 avec 3

solutions de cortisol (130, 250 et 475 µg/dl) ont été dosés. (Voir le tableau "Recovery".)

Bilirubine : La présence de bilirubine à des concentrations allant jusqu'à 200 mg/l n'a aucun effet sur les résultats ni sur la précision du dosage.

Hémolyse : La présence d'agrégat d'hématies jusqu'à une concentration de 30 µl/ml, n'a aucun effet sur les résultats ni sur la précision du dosage.

Lipémie : Le standard 50 µg/dl a été dilué en série avec un pool de sérums lipémiques. Ce qui engendre un degré de lipémie augmentant alors que la concentration de cortisol (due préliminairement au standard) diminue. Toutes les dilutions ont toujours été testées avec le pool lipémique non surchargé. Les résultats montrent une bonne récupération même en présence de lipémie sévère.

Autres types d'échantillons: pour estimer l'effet de l'utilisation de différents types d'échantillons, 40 volontaires ont été prélevés sur tubes secs, héparinés, EDTA et sur tubes vacutainer SST® Becton Dickinson. Tous les échantillons ont été dosés avec le protocole Coat-A-Count Cortisol. Par régression linéaire :

(Héparine) = 0,93 (Sérum) + 0,59 µg/dl
r = 0,988

(EDTA) = 1,17 (Sérum) – 0,03 µg/dl
r = 0,998

(SST) = 0,94 (tubes ordinaires) + 0,70 µg/dl
r = 0,995

Moyennes :
13,8 µg/dl (Sérum)
13,5 µg/dl (Héparine)
16,2 µg/dl (EDTA)
13,7 µg/dl (SST)

Ces résultats montrent que le plasma EDTA ne peut être utilisé.

Spécificité : L'antisérum utilisé dans la technique Coat-A-Count Cortisol est très spécifique du cortisol. Il présente de très faibles réactions croisées avec les composés pouvant se trouver dans les échantillons des patients, stéroïdes ou médicaments. (Voir le tableau « Specificity ».)

Bien que quelques stéroïdes montrent une légère réaction croisée, leur concentration physiologique normale est faible par rapport à celle du cortisol. Ils n'ont, en

conséquence, pas d'effet significatif sur le dosage. Cependant, on peut observer une réaction croisée d'environ 76 % avec la prédnisolone. Il est nécessaire d'en tenir compte pour des patients traités par ce médicament. Etant donné que la prédnisolone est métabolisée en prédnisolone in vitro, il faut être prudent sur les résultats de cortisol pour des patients sous traitement à base de prédnisolone.

Comparaison de méthodes: Le dosage a été comparé au test Double Anticorps Cortisol de DPC sur 89 échantillons de patients. Par régression linéaire :

(CAC) = 1,02 (DA) – 0,25 µg/dl
r = 0,970

Moyennes :
18,8 µg/dl (Coat-A-Count)
18,7 µg/dl (Double Anticorps)

Effet des protéines: Pour simuler différentes concentrations en protéines, des expériences ont été effectuées en reconstituant des aliquots de 2 ml de sérums humains lyophilisés avec différents volumes d'eau (1, 2, 3 et 4 ml). Chaque aliquot reconstitué a été dosé à l'aide de la méthode Coat-A-Count Cortisol. La reconstitution des aliquots, avec seulement la moitié du volume original, a conduit à une concentration protéique extrêmement haute, de l'ordre de 14 g/dl. Les résultats montrent, que même de grandes variations de la concentration en protéines n'ont pas d'effet sur le dosage. (Voir le tableau "Protein Effect" pour les données représentatives.)

Assistance technique

Contactez votre distributeur national.

En France distribué par DPC France 90 bd National 92257 La Garenne-Colombes.

Le système d'assurance qualité de DPC est certifié ISO 13485 (2003).

Italiano

Coat-A-Count Cortisolo

Uso: Il dosaggio radioimmunologico Coat-A-Count Cortisolo dosa in maniera quantitativa il cortisolo (idrocortisone, Composto F) nel siero, nelle urine e nel

plasma eparinizzato. E' a solo uso diagnostico *in vitro* quale ausilio nella determinazione clinica dello stato del surrene.

Codice: **TKCO1** (100 provette), **TKCO2** (200 provette), **TKCO5** (500 provette)



Il kit da 100 provette contiene meno di 5,5 microcurie (204 kilobecquerel) di cortisolo marcato con I^{125} ; il kit da 200 determinazioni contiene meno di 11 microcurie (407 kilobecquerel); ed il kit da 500 determinazioni contiene meno di 27,5 microcurie (1018 kilobecquerel).

Riassunto e Spiegazione del Test

Il Cortisolo (idrocortisone, Composto F) è lo steroide che circola in maggiori quantità ed il glucocorticoide principale secreto dalla corteccia surrenalica. Efficace fisiologicamente nell'attività anti-infiammatoria e nel mantenimento della pressione sanguigna, il cortisolo è anche coinvolto nella gluconeogenesi, nell'assorbimento del calcio e nella secrezione dell'acido gastrico e della pepsina.

Quale indicatore della funzione surrenalica corticale, la misurazione dei livelli di cortisolo nel sangue è utile nella diagnosi differenziale della sindrome di Addison e di Cushing, nell'ipopituitarismo, nell'iperplasia surrenalica e nel carcinoma.⁴

Una serie di test di stimolazione e soppressione – la Stimolazione con ACTH, la Riserva dell'ACTH, la Soppressione del Desametasone – possono fornire informazioni di supporto sulla funzione surrenalico-corticale.^{4,5,6} E' stata dimostrata l'esistenza di concentrazioni anomale di cortisolo in pazienti con infezioni acute, dolore persistente, diabete mellito, o problemi cardiaci, ed in donne in gravidanza o sottoposte a terapia estrogenica. Inoltre, alcune sindromi virilizzanti e disturbi iatrogeni provocano un innalzamento di altri steroidi esistenti in natura a concentrazioni elevate (non fisiologiche) che possono interferire con il dosaggio del cortisolo diretto a meno che non venga utilizzato un antisiero altamente specifico

Procedura del Dosaggio

Il dosaggio radioimmunologico Coat-A-Count Cortisolo è un dosaggio in fase solida, dove il cortisolo marcato con I^{125} compete per un tempo fisso con il cortisolo contenuto nel campione per i siti anticorpali. Poiché l'anticorpo è adeso alle pareti della provetta di polipropilene, la semplice decantazione del supernatante è sufficiente per porre fine alla competizione e per isolare la frazione legata all'anticorpo del cortisolo marcato. La conta delle provette in un gamma counter produce un numero che viene convertito attraverso una curva di calibrazione nella misura del cortisolo presente nel campione del paziente.

Reagenti da Dispensare: 1

Tempo di Incubazione Totale: 45 minuti.

Conte Totali alla Iodinazione:
circa 90 000 cpm.

Avvertenze e Precauzioni

Ad uso diagnostico *in vitro*.

Reagenti: Conservare a 2–8°C in un frigorifero per il materiale radioattivo. Eliminare secondo le Norme di legge vigenti.

Non utilizzare reagenti oltre la data di scadenza.

Alcuni componenti forniti in questo kit possono contenere materiale di origine umana e/o altri ingredienti potenzialmente pericolosi che necessitano di alcune precauzioni.

Seguire le precauzioni universali, e manipolare tutti i componenti come se potessero trasmettere agenti infettivi. Sono stati analizzati i materiali di origine umana e sono stati trovati non reattivi per la Sifilide; per gli Anticorpi Anti-HIV 1 e 2; per l'Antigene di Superficiale dell'Epatite B; e per gli Anticorpi Anti-Epatite C.

E' stata aggiunta Sodio Azide a concentrazioni inferiori a 0,1 g/dL come conservante. Al momento dell'eliminazione, irrorare con molta acqua per evitare la formazione di azidi metalliche potenzialmente esplosive nelle tubature di piombo e di rame.

Acqua: Utilizzare solo acqua distillata o deionizzata.

Radioattività

Una copia di tutti i certificati di Autorizzazione per radioisotopi (Specifica o Generica) rilasciata ad un cliente americano deve essere conservata in file presso la Diagnostic Products Corporation prima che i kit o i componenti contenenti materiale radioattivo possano essere spediti. Questi materiali radioattivi possono essere acquisiti da qualsivoglia cliente in possesso dell'Autorizzazione Specifica. Con l'Autorizzazione Generica questi materiali radioattivi possono essere acquistati solo da medici, veterinari che esercitano la professione, laboratori clinici ed ospedalieri – e solo per l'esecuzione di test clinici o di laboratorio in vitro che non implicino somministrazione interna o esterna del materiale radioattivo o delle sue radiazioni a persone o animali. La sua acquisizione, ricevimento, conservazione, utilizzo, trasferimento ed eliminazione sono soggette a regolamentazioni e ad Autorizzazione (Generica o Specifica) della Commissione Statunitense per il Nucleare o dello Stato con il quale l'NRC abbia stipulato un accordo per l'esercizio del controllo regolatorio.

Manipolare i materiali radioattivi secondo quanto previsto dall'Autorizzazione Generica o Specifica. Per minimizzare l'esposizione alle radiazioni, l'utilizzatore deve attenersi alle linee guida stabilite dal National Bureau of Standards publication su *"Safe Handling of Radioactive Materials"* *"Norme per una corretta manipolazione dei Materiali Radioattivi"*. (Guida N° 92, pubblicata il 9 Marzo 1964) e successive edizioni pubblicate dallo Stato e dalle Autorità Federali.

Assorbire immediatamente le fuoriuscite e decontaminare le superfici contaminate. Evitare la formazione di aerosol. Eliminare i rifiuti solidi radioattivi secondo quanto previsto dall'Autorizzazione. Le licenze generiche (possessori di NRC Form 483) possono eliminare i rifiuti radioattivi solidi come non radioattivi, dopo aver rimosso l'etichetta.

I detentori di autorizzazioni specifiche (NRC Form 313) devono fare riferimento al Titolo 10, Codice delle Regolamentazioni Federali Parte 20. I detentori di Autorizzazioni negli Stati che hanno stipulato un accordo con l'NRC dovrebbero far riferimento alle

regolamentazioni idonee dei loro stati. I detentori di Autorizzazioni Generali possono eliminare i rifiuti radioattivi liquidi del tipo contenuto in questo prodotto attraverso il lavello del laboratorio. I detentori di autorizzazione devono eliminare o rendere illeggibili le etichette dei contenitori vuoti di materiali radioattivi prima di eliminare i rifiuti solidi. I detentori di autorizzazioni specifiche possono eliminare piccoli quantitativi di rifiuti radioattivi liquidi del tipo utilizzato in questo prodotto attraverso il lavello del laboratorio. Fare riferimento alle regolamentazioni appropriate applicabili al Vostro laboratorio.

Materiali Forniti: Preparazione Iniziale

Provette coattate con Anticorpo Anti-Cortisolo (TCO1)

Provette di polipropilene coattate con anticorpi anti-cortisolo e confezionate in buste sigillate. Proteggerle dall'umidità, risigillando le buste dopo l'apertura: stabili a 2–8°C fino alla data di scadenza indicata sulla confezione.

Colore: blu chiaro.

TKCO1: 100 provette.

TKCO2: 200 provette

TKCO5: 500 provette

Cortisolo marcato con I¹²⁵ (TCO2)

Cortisolo iodinato con agenti bloccanti per le proteine leganti gli steroidi, fornito in forma liquida, pronto all'uso. Ogni flacone contiene 105 mL. Stabile a 2–8°C per almeno 30 giorni dopo l'apertura, o fino alla data di scadenza indicata sul flacone.

TKCO1: 1 flacone. **TKCO2:** 2 flaconi.

TKCO5: 5 flaconi.

Calibratori Cortisolo (TCO3–8)

Calibratori cortisolo, pronti all'uso, in siero umano processato. Il calibratore zero, flacone A, contiene 2,0 mL, mentre i rimanenti calibratori flacone dalla B alla F contengono 1,0 mL ciascuno. Stabile a 2–8°C per almeno 30 giorni dopo l'apertura, o fino alla data di scadenza indicata sull'etichetta. La vita dei calibratori può essere estesa attraverso congelamento. Aliquotare, se necessario, per evitare cicli ripetuti di congelamento e scongelamento.

TKCO1: 1 set. **TKCO2:** 1 set.

TKCO5: 2 set.

I calibratori contengono, rispettivamente, 0, 1, 5, 10, 20 e 50 microgrammi di cortisolo per decilitro ($\mu\text{g/dL}$) in siero umano processato; equivalenti a, 0, 27,6, 138, 276, 552 e 1 380 nanomoli per litro (nmol/L). I punti intermedi della calibrazione possono essere ottenuti mescolando i calibratori in proporzioni idonee.

Materiali Richiesti Ma Non Forniti

Gamma counter – compatibile con le provette standard 12x75 mm

Vortex mixer

Estrazione delle Urine

Provette con tappino – idonee per effettuare l'estrazione con diclorometano.

Diclorometano – gradiente spettrofotometrico (anche chiamato cloruro di metilene)

Micropipette: da 50 μL e 500 μL . La pipetta da 50 μL dovrebbe essere del tipo a ripetizione.

Evaporatore con nitrogeno compresso.

Dosaggio Radioimmunologico

Provette semplici di polipropilene 12x75 mm — da utilizzarsi come provette NSB, disponibili presso DPC

Micropipette: da 25 μL e 1,0 mL.

Bagnetto termostato — capace di mantenere la temperatura a 37°C. Non possono essere utilizzati né un forno né un dispositivo riscaldato.

Foam per la decantazione – disponibile presso DPC

Carta Logit-log – disponibile presso la DPC (Codice: ZP797)

Un controllo a tre livelli, basato su siero umano, contenente cortisolo tra gli altri oltre 25 costituenti dosati. Disponibile presso DPC (Codice: CON6).

Prelievo dei Campioni

Siero e Plasma

Non è necessario che il paziente sia a digiuno, e non sono necessarie preparazioni particolari. Prelevare il sangue¹⁰ in provette semplici (senza anticoagulanti) o eparinizzate e separare il siero o il plasma dalle cellule. Il plasma EDTA *non* può essere utilizzato. (Vedi

sezione "Campioni Alternativi") Poiché il cortisolo presenta un ritmo circadiano, occorre annotare il momento del prelievo.

Si consiglia l'utilizzo di un'ultracentrifuga per schiarire i campioni lipemici.

I campioni emolizzati possono indicare il trattamento non idoneo del campione prima dell'arrivo al laboratorio; per questo motivo, i risultati devono essere interpretati con prudenza.

Provette per il prelievo di sangue di produttori diversi possono dare valori differenti, a seconda dei materiali e degli additivi usati, incluso gel o barriere fisiche, attivatori di coaguli e/o anticoagulanti. L'Coat-A-Count Cortisolo non è stato verificato con tutte le possibili variazioni di tipi di provette. Consultare la sezione riguardante Campioni Alternativi per dettagli sulle provette testate.

Volume Richiesto: 25 μL di siero o di plasma per provetta.

Conservazione: 7 giorni a 2–8°C o 2 mesi a –20°C.⁸ Prima del dosaggio, consentire ai campioni di raggiungere temperatura ambiente (15–28°C) e mescolare capovolgendo o scuotendo. Aliquotare, se necessario, per evitare ripetuti cicli di congelamento e scongelamento. Non tentare di scongelare i campioni riscaldandoli in un bagnetto termostato. Campioni di pazienti con concentrazioni di cortisolo superiori al calibratore più alto (50 $\mu\text{g/dL}$) devono essere diluiti nel calibratore zero prima del dosaggio.

Urina

Prelevare un campione di urina durante le 24-ore senza conservanti, tenendo il campione refrigerato durante il prelievo. Annotare il volume totale in millilitri.

Volume Richiesto (Procedura di Estrazione): 0,5 mL di urina.

Conservazione: 7 giorni a 2–8°C o un mese a –20°C.⁸

Preparazione dei Campioni di Urina

Attenzione – Diclorometano: Non pipettare con la bocca. Effettuare l'evaporazione sotto cappa. Evitare le fiamme.

- 1 Etichettare una provetta di polipropilene da 12x75 mm per ciascun campione di urina.
Le provette idonee allo scopo con tappini sigillanti sono disponibili presso DPC. Non utilizzare provette coattate con anticorpo.
- 2 Dispensare **500 µL** di ciascun campione di urina nella provetta preparata.
Se il campione risulta torbido, o se si è formato un precipitato, prima centrifugare l'urina e quindi lavorare con il sovrantante.
- 3 **Estrazione:** Aggiungere **1,0 mL** di diclorometano ad ogni provetta. Sigillare.
Non pipettare il diclorometano con la bocca.
- 4 Mescolare capovolgendo la provetta da **5 a 10 minuti**.
Utilizzare un rotatore meccanico settato da 15 a 20 rivoluzioni al minuto.
- 5 Centrifugare per **5 minuti** a circa 1500xg per separare le due fasi.
Qualsiasi campione parzialmente emulsionato dovrebbe essere sbattuto energicamente e quindi nuovamente centrifugato.
- 6 Rimuovere la maggior parte dello strato superficiale, facendo attenzione a non disturbare l'interfaccia.
Utilizzare un aspiratore per acqua del rubinetto (aspirare fino all'interfaccia può provocare una contaminazione dello strato di diclorometano con materiale della fase acquosa che è in contatto).
- 7 **Evaporazione:** Trasferire **50 µL** della fase più bassa di diclorometano in entrambe le provette coattate con un anticorpo anti-Cortisolo.
Pipettare tutti gli estratti direttamente al fondo utilizzando una micropipetta a ripetizione. Fare attenzione che la fase superiore non entri nella provetta.
- 8 Lasciar evaporare fino ad asciugatura completa sotto un flusso leggero di nitrogeno a temperatura ambiente (15–28°C).
Effettuare l'evaporazione sotto cappa, Evitare le fiamme.

Una volta asciutte, allocare le provette (etichettate) nel dosaggio che comprende un set di calibratori (siero). Continuare – punto 2 del dosaggio – aggiungendo 25 µL del calibratore zero A e così via. I risultati in microgrammi di cortisolo (libero) per 100 mL di urina (µg/dL) possono essere letti direttamente dalla curva di calibrazione. No è necessario nessun fattore di correzione.

Non devono trascorrere più di 30 minuti tra il trasferimento dell'estratto nella provetta coattata (punto 7 della procedura di estrazione) e l'aggiunta del tracciante (punto 3 del dosaggio radioimmunologico). La procedura di estrazione può essere interrotta dopo il punto 6 conservando lo strato infranante ben sigillato a –20°C.

Dosaggio Radioimmunologico

Tutti i componenti devono essere a temperatura ambiente (15–28°C) prima dell'utilizzo.

- 1 **Provette Semplici:** Etichettare 4 provette semplici di polipropilene T (conte totali) (non coattate) 12x75 mm ed NSB (legame non specifico) in duplicato.

Poiché il legame non specifico nel dosaggio Coat-A-Count è caratteristicamente basso, le provette NSB possono essere tranquillamente omesse senza omettere l'accuratezza o il controllo di qualità.

Provette Coattate: Etichettare dodici Provette Coattate A con un anticorpo anti-Cortisolo e dalla B alla F in duplicato. Etichettare altre provette coattate con un anticorpo anti-Cortisolo, anch'esse in duplicato, per i controlli ed i campioni.

Calibratori	µg/dL	nmol/L
A (MB)	0	0
B	1	27.6
C	5	138
D	10	276
E	20	552
F	50	1 380

Campioni di Urina: Una volta asciutte, le provette coattate utilizzate per far evaporare gli estratti dovrebbero essere

etichettate ed inserite nella sequenza dei campioni del paziente.

- 2** Dispensare **25 µL** del calibratore zero A nelle provette NSB ed A, *ed anche in ciascuna delle provette di urina per l'evaporazione*. Pipettare **25 µL** di ciascuno dei calibratori rimanenti, controllo e campioni nelle provette preparate. **Dispensare direttamente al fondo.**

E' buona norma utilizzare una micropipetta con puntali monouso, cambiando il puntale tra un campione e l'altro, per evitare la contaminazione da carryover.

- 3** Aggiungere **1,0 mL** di Cortisolo marcato con I^{125} ad ogni provetta. Vortexare.

I laboratori provvisti di un diluitore-pipettatore affidabile possono eseguire il punto 2 e 3 simultaneamente. Non devono passare più di 10 minuti durante la dispensazione del tracciante. Mettere da parte le provette T per le conte al punto 6; non sono necessari ulteriori passaggi.

- 4** Incubare per 45 minuti a 37°C.

Utilizzare un bagnetto termostato; non utilizzare forni o piastre riscaldate. Periodi di incubazione superiori non intaccheranno in maniera significativa il dosaggio.

- 5** Decantare completamente.

La rimozione di tutta l'umidità residua aumenterà molto la precisione. Decantare il contenuto di tutte le provette (ad eccezione delle provette T) utilizzando un foam e lasciare che si asciughino per 2 o 3 minuti. Quindi blottare le provette su carta assorbente per rimuovere le goccioline residue.

- 6** Contare per **1 minuto** in un gamma counter.

Calcolo dei Risultati

Per ottenere risultati in termini di concentrazione da una rappresentazione logit-log della curva di calibrazione, calcolare per ciascuna coppia di provette le conte medie al minuto corrette con NSB:

Conte Nette = (Media dei CPM) Meno (Media CPM **NSB**)

Quindi determinare il legame di ciascuna coppia di provette quale percentuale del legame massimo (MB), con le conte corrette con NSB delle provette A prese al 100%:

Percentuale di Legato = (Conte Nette / Conte Nette **MB**) × 100

(Il calcolo può essere semplificato omettendo la correzione per il legame non specifico; i campioni entro il range dei calibratori hanno prodotto virtualmente gli stessi risultati quando la Percentuale di Legato viene calcolata direttamente dai CPM Medi).

Utilizzando della carta per grafici logit-log, tracciare la Percentuale di Legato sull'asse verticale (probabilità) verso la concentrazione sull'asse orizzontale (logaritmico) per ciascuno dei calibratori non zero, e disegnare una linea retta approssimativamente che incontri tutti i punti. I risultati per i campioni non noti possono essere letti dalla retta per interpolazione.

Si consiglia di visionare i risultati per verificare la loro correlazione con i campioni in replicato per costruire un grafico della curva di calibrazione (anche se i calcoli vengono gestiti dal computer) che visualizzi l'appropriatezza della trasformazione utilizzata e quale modalità di visualizzazione dei punti devianti della calibrazione. Consigliamo anche di conservare i parametri utilizzati per il calcolo dei dati:

$T = \text{Conte Totali (conte al minuto)}$

$\%NSB = 100 \times (\text{Conte NSB Medie} / \text{Conte Totali})$

$\%MB = 100 \times (\text{Conte Nette} / \text{Conte Totali})$

Le intercette al 20, 50 ed 80 percento dove:

20% = Concentrazione al 20% di Legato ecc.

Notare che sono anche accettabili altri approcci, i.e. l'implementazione della logistica a 4 parametri. Vedi Dudley RA, et al. Guidelines for immunoassay data reduction. Clin Chem 1985;31:1264-71.

Campioni di urina:

Le concentrazioni nell'urina del cortisolo libero possono essere lette direttamente dalla curva di calibrazione. Non è necessario nessun fattore di correzione. (Aggiungendo *due volte* 25 µL di campione nella provetta al punto 7 della procedura di estrazione si compensa esattamente la diluizione 1:2 dovuta all'estrazione di 0,5 mL di urina in 1,0 mL di diclorometano).

Per determinare l'output del cortisolo urinario libero in microgrammi/giorno, moltiplicare semplicemente il risultato in µg/dL per il volume in decilitri delle urine nelle 24 ore:

$$\mu\text{g}/24 \text{ ore} = \mu\text{g}/\text{dL} \times (\text{Volume totale in millilitri}) / 100$$

Seduta Esemplificativa: A solo scopo esemplificativo, non per il calcolo dei risultati di un'altra seduta. (Vedi tabella "Example Run".)

Controllo di Qualità

Controlli (o pool di sieri) con almeno due livelli di concentrazione di cortisolo – bassa ed alta – devono essere dosati ogni giorno come campioni sconosciuti.

Riportare i risultati dei pazienti solo se i risultati dei controlli per quel dosaggio incontrano i criteri di accettabilità stabiliti dal Vostro laboratorio.

Si consiglia per ogni dosaggio di annotare i numeri di lotto dei componenti utilizzati, ed anche le date di ricostituzione o di apertura. Si consiglia anche di tracciare i grafici dei risultati dei controlli giorno dopo giorno – come descritto, ad esempio, in Westgard JO, et al. A multi-rule chart for quality control. Clin Chem 1981;27:493-501. Campioni ripetuti possono servire come ulteriore strumento per monitorare la precisione inter-dosaggio; coppie di campioni intervallate lungo tutto il dosaggio possono essere d'aiuto nel verificare l'assenza di deviazioni significative.

Bianchi Solventi:

Per ottenere risultati affidabili, il diclorometano deve essere almeno ad un gradiente spettrofotometrico e la sorgente di nitrogeno, se utilizzata, non deve contaminare le provette in evaporazione con olio o umidità. (l'utilizzo di una

trappola che contiene solfato di calcio potrà evitare la contaminazione). Come verifica della purezza di questi reagenti, che non vengono forniti nel kit, consigliamo di eseguire periodicamente un "solvente bianco". Ciò comporta l'estrazione ed il dosaggio di acqua distillata o sterile con le stesse modalità utilizzate per i campioni di urina, per verificare che produca una concentrazione apparente di cortisolo uguale a zero, cioè, al di sotto del limite di rilevazione del dosaggio.

Valori Attesi

Siero

Sono stati riportati i seguenti valori attesi per il cortisolo in circolo.

Variazione del Ritmo Diurno	mattino: 5 – 25 µg/dL (138 – 690 nmol/L) ^{1,8,9} pomeriggio - sera circa metà dei valori del mattino
Stimolazione con ACTH	Più che doppio (normalmente da 3 a 5 volte) i valori basali ^{4,5}
ACTH Reserve (Soppressione con Metirapone)	Al di sotto dei valori basali (controllo) ^{5,6}
Soppressione con Desametasone	Al di sotto dei valori basali (controllo) per lo screening, test dose bassa ed elevata ^{4,5}

Urina

Uno studio effettuato su campioni di urina delle 24 ore provenienti da 33 volontari sani ha prodotto un range assoluto da 21 a 85 µg/24 ore, con una mediana di 48 µg/24 ore. Ciò è in linea con il range di riferimento da 20 a 90 µg/24 ore per il cortisolo libero urinario, cosiccome riportato in letteratura.⁷

Consider questi limiti solo come linee guida. Ogni laboratorio dovrebbe stabilire i propri range di riferimento.

Limiti

I risultati del cortisolo sierico ed urinario possono essere falsamente elevati in campioni ottenuti da pazienti che sono stati trattati con prednisolone o prednisone (convertiti in prednisolone *in vivo*). Occorre fare attenzione con le

determinazioni del cortisolo per i pazienti sottoposti a terapia con questi ultimi e strutturalmente relazionati ai corticosteroidi sintetici.

Prestazioni del Dosaggio

Vedi tabelle e grafici per dati *rappresentativi* delle prestazioni del dosaggio. I Risultati sono espressi in microgrammi di cortisolo per decilitro ($\mu\text{g/dL}$). Tutti i risultati sono stati ottenuti su campioni di siero.

Fattore di Conversione:

$\mu\text{g/dL} \times 27,59 \rightarrow \text{nmol/L}$

Range di Calibrazione: 1 – 50 $\mu\text{g/dL}$
(27,6 – 1 380 nmol/L)

Sensibilità Analitica: 0,2 $\mu\text{g/dL}$
(5,5 nmol/L)

Precisione Intra-Dosaggio (All'interno della stessa seduta) Sono state calcolate statistiche per sette campioni dai risultati di 20 coppie di provette in un unico dosaggio. (Vedi tabella "Intraassay Precision")

Precisione Inter-Dosaggio (Da una seduta all'altra) Sono state calcolate statistiche per ciascuno dei tre campioni dai risultati di 20 coppie di provette. (Vedi tabella "Interassay Precision")

Effetto Fine Seduta: nessuno fino a circa 700 provette. (Vedi tabella "End-of-Run Effect".)

Linearità: I campioni sono stati dosati a varie diluizioni. (Vedi tabella "Linearity".)

Recupero: Ai campioni sono state aggiunte tre soluzioni 1:19 di cortisolo (130, 250 e 475 $\mu\text{g/dL}$) e quindi sono stati dosati (Vedi tabella "Recovery").

Bilirubina: La presenza di bilirubina in concentrazioni fino a 200 mg/L non ha nessun effetto sui risultati, entro il range di precisione del dosaggio.

Emolisi: La presenza di globuli rossi impaccati in concentrazioni fino a 30 $\mu\text{L/mL}$ non ha effetto sui risultati entro il range di precisione del dosaggio.

Lipemia: Il calibratore di 50 $\mu\text{g/dL}$ è stato diluito serialmente con un pool di sieri lipemici. Ciò provoca un aumento nei livelli di lipemia poiché la concentrazione di cortisolo decresce (dovuta principalmente al calibratore). Sono state dosate tutte le diluizioni insieme ai pool di sieri lipemici

"unspiked". Il risultati mostrano un buon recupero anche in presenza di un'accentuata lipemia.

Tipo di Campione Alternativo: Per determinare l'effetto di campioni alternativi, è stato prelevato del sangue da 40 volontari in provette semplici, eparinizzate, EDTA e Becton Dickinson vacutainer SST[®]. Tutti i campioni sono stati dosati con il dosaggio Coat-A-Count Cortisolo. Mediante regressione lineare:

(Eparina) = 0,93 (Siero) + 0,59 $\mu\text{g/dL}$
 $r = 0,988$

(EDTA) = 1,17 (Siero) – 0,03 $\mu\text{g/dL}$
 $r = 0,998$

(SST) = 0,94 (tubi semplici) + 0,70 $\mu\text{g/dL}$
 $r = 0,995$

Valore Medio:

13,8 $\mu\text{g/dL}$ (Siero)
13,5 $\mu\text{g/dL}$ (Eparina)
16,2 $\mu\text{g/dL}$ (EDTA)
13,7 $\mu\text{g/dL}$ (SST)

I risultati indicano che il plasma EDTA *non* è accettabile.

Specificità: L'antisiero Coat-A-Count Cortisolo è altamente specifico per il cortisolo, con una crossreattività verso altri steroidi presenti in natura o medicinali somministrati come terapia e presenti nei campioni estremamente bassa. (Vedi tabella "Specificity".)

Benché alcuni steroidi presentino una limitata crossreattività, le loro concentrazioni fisiologiche normali sono basse se comparate al cortisolo, quindi non interferiranno in maniera significativa con il dosaggio Coat-A-Count Cortisolo. Esiste, tuttavia, una crossreattività osservata di circa 76% con il prednisolone, che deve essere considerato in quei pazienti sottoposti a questa terapia. Poiché il prednisone viene convertito in prednisolone *in vivo*, occorre fare attenzione con le determinazioni di cortisolo per i pazienti sottoposti ad entrambe le terapie.

Comparazione di Metodi: Il dosaggio è stato comparato al DPC Cortisolo Doppio Anticorpo su 89 campioni. Mediante regressione lineare:

(CAC) = 1,02 (DA) – 0,25 $\mu\text{g/dL}$
 $r = 0,970$

Valore Medio:

18,8 $\mu\text{g/dL}$ (Coat-A-Count)
18,7 $\mu\text{g/dL}$ (Doppio Anticorpo)

Effetto delle Proteine: Per simulare le concentrazioni delle varie proteine, sono stati effettuati esperimenti nei quali aliquote da 2,0 mL di un pool di sieri umani è stato liofilizzato e quindi ricostituito con vari volumi d'acqua (1, 2, 3 e 4 mL). Ciascuna aliquota ricostituita è stata quindi dosata con il dosaggio Coat-A-Count Cortisol. Notare che le aliquote ricostituite con metà del volume originario rappresentano una concentrazione di proteine estremamente elevata, nell'ordine di 14 g/dL. Questi risultati indicano che anche variazioni notevoli nelle proteine totali non hanno nessun effetto clinico significativo sul dosaggio Coat-A-Count Cortisol. (Vedi tabella "Protein Effect" per dati rappresentativi).

Assistenza Tecnica

All'Estero: contattare il proprio Distributore Nazionale.

Il Sistema Qualità della Diagnostic Products Corporation è certificato secondo le norme ISO 13485:2003.

Português

Coat-A-Count Cortisol

Utilização: O Coat-A-Count Cortisol é um radioimunoensaio concebido para a medição quantitativa de cortisol (hidrocortisona, Composto F) no soro, na urina e no plasma heparinizado. Destina-se estritamente ao uso de diagnóstico *in vitro* como auxiliar na avaliação clínica do estado supra-renal.

Números de catálogo: **TKCO1** (100 tubos), **TKCO2** (200 tubos), **TKCO5** (500 tubos)



O kit de 100 tubos contém menos de 5,5 microcuries (204 quilibecquerels) de cortisol ^{125}I radioactivo; o kit de 200 tubos contém menos de 11 microcuries (407 quilibecquerels); e o kit de 500 tubos contém menos de 27,5 microcuries (1018 quilibecquerels).

Sumário e explicação do teste

O cortisol (hidrocortisona, Composto F) é o esteroide em circulação mais abundante

e o principal glucocorticoide segregado pelo córtex supra-renal. Fisiologicamente eficaz na actividade anti-inflamatória e na manutenção da pressão sanguínea, o cortisol está igualmente envolvido na gluconeogénese, na absorção do cálcio e na secreção de ácido gástrico e pepsina.

Como indicador da função cortico-supra-renal, a medição dos níveis de cortisol no sangue é útil no diagnóstico diferencial das doenças de Addison e de Cushing, do hipopituitarismo, e da hiperplasia e do carcinoma supra-renais.⁴

Uma grande variedade de testes de estimulação e supressão — estimulação de ACTH, Reserva de ACTH, Supressão de Dexametasona — pode fornecer informações de apoio sobre a função cortico-supra-renal.^{4,5,6} Foi detectada a existência de concentrações anómalas de cortisol em pacientes com infecções agudas, dores fortes, diabetes mellitus ou insuficiência cardíaca, e em mulheres grávidas ou submetidas a terapêutica com estrogénios. Além disso, alguns síndromas de virilização e condições iatrogénicas provocam o aumento dos níveis de esteróides naturais para concentrações elevadas (não fisiológicas) que podem interferir directamente nos ensaios de cortisol, a menos que seja utilizado um anti-soro altamente específico.

Princípio do Procedimento

O procedimento Coat-A-Count Cortisol é um radioimunoensaio de fase sólida em que cortisol marcado com ^{125}I compete durante um período de tempo fixo com o cortisol na amostra do paciente por locais de fixação de anticorpos. Como o anticorpo é imobilizado contra a parede de um tubo de polipropileno basta decantar o sobrenadante para concluir a competição e isolar a fracção ligada ao anticorpo do cortisol marcado radioactivamente. Após a contagem do tubo num contador gama, obtém-se um número que, através de uma curva de calibração, é convertido numa medição do nível de cortisol presente na amostra do paciente.

Reagentes a pipetar: 1

Tempo Total de Incubação: 45 minutos.

Contagens Totais na Iodação:
aproximadamente 90.000 cpm.

Precauções

Para uso de diagnóstico *in vitro*.

Reagentes: Armazenar a uma temperatura de 2–8°C num frigorífico destinado à recepção de materiais radioactivos. Eliminar de acordo com as leis em vigor.

Não utilizar os reagentes após o prazo de validade.

Alguns componentes fornecidos com este kit podem conter material de origem humana e/ou outros ingredientes potencialmente perigosos que requerem determinadas precauções.

Manipule com as devidas precauções todos os materiais capazes de transmitir doenças infecciosas. As matérias primas, obtidas de soro humano, foram testadas, revelando resultados negativos para a sífilis, para os anticorpos do vírus da imunodeficiência humana (HIV) 1 e 2; para o antígeno de superfície da hepatite B (HBsAg) e para os anticorpos do vírus da hepatite C.

Azida de sódio foi adicionada como conservante; para evitar acumulações de azidas metálicas explosivas em canalizações de cobre e alumínio, os reagentes devem ser rejeitados no esgoto apenas se estiverem diluídos e forem lavados com grandes volumes de água.

Água: Utilize água destilada ou desionizada.

Radioactividade

A Diagnostic Products Corporation tem de receber uma cópia de qualquer certificado de licença relativo a radioisótopos (Específica ou Geral) emitida em nome de um cliente dos EUA antes de poder enviar kits ou componentes com material radioactivo. Estes materiais radioactivos podem ser adquiridos por qualquer cliente com a licença Específica adequada. Com uma licença Geral, estes materiais radioactivos só podem ser adquiridos por médicos, veterinários que pratiquem medicina veterinária, laboratórios clínicos e hospitais — e unicamente para testes clínicos ou laboratoriais *in vitro* que não envolvam a administração externa ou interna do material radioactivo ou da sua

radiação em seres humanos ou outros animais. A sua aquisição, recepção, armazenagem, utilização, transferência e eliminação estão sujeitas aos regulamentos e a uma licença (Geral ou Específica) da Comissão de Regulamentação Nuclear dos EUA ou de um Estado com o qual a NRC tenha estabelecido um acordo de aplicação de controlo legal.

Manusear materiais radioactivos em conformidade com os requisitos da licença Geral ou Específica. Para minimizar a exposição à radiação, o utilizador deverá cumprir as directivas definidas na publicação do National Bureau of Standards sobre o manuseamento seguro de materiais radioactivos (*Safe Handling of Radioactive Materials* – Manual N.º 92, editado a 9 de Março de 1964) e em publicações posteriores editadas pelas autoridades estatais e federais norte-americanas.

Limpar imediatamente qualquer derrame e descontaminar as superfícies afectadas. Evitar a geração de aerossóis. Eliminar os resíduos radioactivos sólidos de acordo com os requisitos da licença. Os detentores de licenças Gerais (detentores do formulário 483 da NRC) podem eliminar os resíduos radioactivos sólidos como resíduos não radioactivos, após a remoção dos rótulos. Os detentores de licenças Específicas (Formulário 313 da NRC) devem consultar o Título 10 do Código de Regulamentos Federais (*Code of Federal Regulations*), Parte 20. Os detentores de licenças em Estados com os quais tenham sido estabelecidos acordos deverão consultar os regulamentos adequados do respectivo Estado. Os detentores de licenças Gerais podem eliminar os resíduos radioactivos líquidos do tipo contido neste produto através de um cano de esgoto de laboratório. Os detentores de licenças têm de remover ou tornar ilegíveis os rótulos dos recipientes vazios de materiais radioactivos antes de os eliminar como resíduos sólidos. Os detentores de licenças Específicas podem eliminar pequenas quantidades de resíduos radioactivos líquidos do tipo utilizado neste produto através de um cano de esgoto de laboratório. Consultar os regulamentos adequados e aplicáveis ao respectivo laboratório.

Materiais Fornecidos: Preparação Inicial

Tubos Revestidos com Anticorpos de Cortisol (TCO1)

Tubos de polipropileno revestidos com anticorpos para cortisol e embalados em saquetas de fecho hermético. Proteger da humidade, fechando de novo cuidadosamente as saquetas após a abertura: estável a uma temperatura de 2–8°C até ao prazo de validade indicado na saqueta. Cor: Azul claro.

TKCO1: 100 tubos. **TKCO2:** 200 tubos.
TKCO5: 500 tubos.

Cortisol ¹²⁵I (TCO2)

Cortisol iodado com agentes bloqueadores para proteínas de ligação de esteróides, fornecido na forma líquida, pronto a usar. Cada frasco contém 105 mL. Estável a uma temperatura de 2–8°C durante pelo menos 30 dias depois de aberto, ou até ao prazo de validade indicado no frasco.

TKCO1: 1 frasco. **TKCO2:** 2 frascos.
TKCO5: 5 frascos.

Calibradores de Cortisol (TCO3–8)

Calibradores de cortisol, prontos a usar, em soro humano processado. O frasco A do calibrador zero contém 2,0 mL, enquanto os restantes frascos dos calibradores B a F contêm 1,0 mL cada. Estável a uma temperatura de 2–8°C durante pelo menos 30 dias depois de aberto, ou até ao prazo de validade indicado no frasco. A duração dos calibradores pode ser prolongada por congelamento. Se necessário, alíquotar para evitar o descongelamento e congelamento repetidos.

TKCO1: 1 conjunto. **TKCO2:** 1 conjunto.
TKCO5: 2 conjuntos.

Os calibradores contêm, respectivamente, 0, 1, 5, 10, 20 e 50 microgramas de cortisol por decilitro (µg/dL) em soro humano processado; equivalente a 0, 27,6, 138, 276, 552 e 1 380 nanomoles por litro (nmol/L). Os pontos de calibração intermédios podem ser obtidos misturando os calibradores nas proporções adequadas.

Materiais Necessários Mas Não Fornecidos

Contador gama — compatível com tubos standard 12x75 mm

Misturador giratório

Preparação de Urina

Tubos com tampas — adequados à preparação com diclorometano.

Diclorometano — qualidade espectrofotométrica (também designado por cloreto de metileno)

Micropipetas: 50 µL e 500 µL. A pipeta de 50 µL deve ser do tipo de transporte positivo.

Evaporador com azoto comprimido.

Radioimunoensaio

Tubos lisos de polipropileno de 12x75 mm — para utilização como tubos NSB, disponíveis na DPC

Micropipetas: 25 µL e 1,0 mL

Banho-maria — capaz de manter a temperatura de 37°C. Nunca é adequada a utilização de um forno ou de uma placa de aquecimento.

Dispositivo de decantação de espuma — disponível na DPC

Papel milimétrico logit-log — disponível na DPC (Números de catálogo: ZP797)

A tri-level, human serum-based immunoassay control, containing cortisol as one of over 25 assayed constituents, is available from DPC (Números de catálogo: CON6).

Colheita

Soro e Plasma

O paciente não necessita de estar em jejum e não são necessárias preparações especiais. Colher sangue por punção venosa¹⁰ para tubos lisos (sem anticoagulante) ou heparinizados, e separar o soro ou plasma das células. Não é aceitável a utilização de plasma de EDTA. (Ver secção Tipos de Amostras Alternativas). Como o cortisol apresenta um ritmo circadiano, a data e a hora da colheita devem ser registadas.

Recomenda-se a utilização de uma ultracentrífuga para clarificar as amostras lipémicas.

Amostras hemolisadas podem indicar tratamento incorrecto de uma amostra antes do envio para o laboratório; portanto os resultados devem ser interpretados com cuidado.

Os tubos para colheita sanguínea de diferentes fabricantes, podem originar diferentes valores, dependendo dos materiais e aditivos, incluindo gel ou barreiras físicas, activadores do coágulo e/ou anti coagulantes. Coat-A-Count Cortisol não foram ainda testados com todas as possíveis variações originadas pelos tipos de tubos. Consultar a secção Tipos de Amostras Alternativas para obter detalhes sobre os tubos que foram testados.

Volume de Amostra: 25 µL de soro ou plasma por tubo.

Armazenamento: 7 dias a 2–8°C ou 2 meses a –20°C.⁸ Antes de proceder ao ensaio, deixar que as amostras atinjam a temperatura ambiente (15–28°C) e misturar por agitação ou inversão *suaves*. Aliquotar, se necessário, a fim de evitar o descongelamento e congelamento repetidos. *Não* tentar descongelar espécimens congelados aquecendo-os em banho-maria. As amostras de paciente que se preveja que contenham concentrações de cortisol superiores à do calibrador mais elevado (50 µg/dL) deverão ser diluídas com o calibrador zero antes do ensaio.

Urina Colher uma amostra de urina de 24 horas sem conservante, mantendo o espécimen refrigerado durante a colheita. Registar o volume total em mililitros.

Volume Necessário (procedimento de extracção): 0,5 mL de urina.

Armazenamento: 7 dias a 2–8°C ou um mês a –20°C.⁸

Preparação de Amostras de Urina:

Aviso –Diclorometano: Não pipetar com a boca. Efectuar a fase de evaporação sob um exaustor. Evitar chamas expostas.

- 1 Rotular um tubo de polipropileno 12x75 mm para cada amostra de urina.
Tubos adequados e com tampas de fecho hermético estão disponíveis na

DPC. Não utilizar nesta fase tubos revestidos com anticorpos.

- 2 Pipetar **500 µL** de cada amostra de urina para o tubo preparado.
Se a amostra estiver turva ou se se tiver formado um precipitado, começar por centrifugar a urina e trabalhar com o sobrenadante.
- 3 **Preparação:** Adicionar **1,0 mL** de diclorometano a cada tubo. Tapar bem.
Não pipetar diclorometano com a boca.
- 4 Misturar por inversão *suave* durante **5 a 10 minutos**.
Utilizar um rotador mecânico configurado para 15 a 20 rotações por minuto.
- 5 Centrifugar durante **5 minutos** a cerca de 1500×g, para separar as duas camadas.
Qualquer amostra parcialmente emulsionada deve ser vigorosamente agitada e novamente centrifugada.
- 6 Remover a maior parte da camada superior, tendo o cuidado de não agitar a camada intermédia.
Utilizar um aspirador de torneira de água. (Aspirar até à camada intermédia pode conduzir à contaminação da camada de diclorometano por contacto com material da fase aquosa.)
- 7 **Evaporação:** Transferir **50 µL** da fase inferior (diclorometano) para cada um dos dois tubos revestidos com anticorpos de cortisol.
Pipetar todas as preparações directamente para o fundo do tubo, utilizando uma micropipeta de transporte positivo. Ter cuidado para que nenhuma parte da camada superior entre no tubo de ensaio.
- 8 Evaporar até secar completamente, sob um fluxo suave de azoto à temperatura ambiente (15–28°C).
Efectuar a fase de evaporação sob um exaustor. Evitar chamas expostas.

Uma vez secos, submeter os tubos (devidamente rotulados) a um ensaio que inclua um conjunto de tubos de calibrador (Soro). Continuar (etapa 2 do

procedimento do radioimunoensaio) adicionando 25 µL do calibrador zero A, e assim por diante. Os resultados em microgramas de cortisol (livre) por 100 mL de urina (µg/dL) podem ser lidos directamente a partir da curva de calibração. Não é necessário um factor de correcção.

Não deverão passar mais de 30 minutos entre a transferência da preparação para o tubo revestido (etapa 7 do procedimento de preparação) e a adição do marcador (etapa 3 do procedimento do radioimunoensaio). O procedimento de preparação pode ser interrompido após a etapa 6, armazenando a camada de infranadante em recipiente hermeticamente fechado num congelador a -20°C.

Procedimento de Radioimunoensaio

Todos os componentes devem estar à temperatura ambiente (15 -28°C) antes da sua utilização.

- 1 Tubos lisos:** Rotular quatro tubos de polipropileno lisos (não revestidos) de 12x75 mm com T (contagens totais) e NSB (ligação não específica), em duplicado.

Dado que a ligação não específica no procedimento Coat-A-Count é caracteristicamente baixa, os tubos NSB podem ser omitidos com segurança sem comprometer a precisão ou o controlo de qualidade.

Tubos revestidos: Rotular doze tubos revestidos com anticorpos de cortisol com A (ligação máxima) e com B a F, em duplicado. Rotular tubos revestidos com anticorpos de cortisol adicionais, também em duplicado, para controlos e amostras de paciente

Calibradores	µg/dL	nmol/L
A (MB)	0	0
B	1	27,6
C	5	138
D	10	276
E	20	552
F	50	1 380

Amostras de Urina: Uma vez secos, os tubos revestidos utilizados para evaporar

as preparações deverão ser devidamente rotulados e incorporados na sequência de tubos de amostra de paciente.

- 2** Pipetar **25 µL** do calibrador zero A para os tubos NSB e A, *e também para cada um dos tubos de evaporação de amostras de urina*. Pipetar **25 µL** de cada calibrador restante, controlo e amostra de paciente para os tubos preparados. **Pipetar directamente para a base do tubo.**

É boa prática usar uma micropipeta de ponta descartável, substituindo a ponta entre cada amostragem, a fim de evitar contaminação entre amostras.

- 3** Adicionar **1,0 mL** de cortisol ¹²⁵I a cada tubo. Agitar no misturador.

Os laboratórios equipados com um pipetador-diluidor fiável podem efectuar as etapas 2 e 3 em simultâneo. Não deverão passar mais de 10 minutos durante a dispensação do marcador. Reservar os tubos T para a contagem na etapa 6; não necessitam de mais processamento.

- 4** Incubar durante **45 minutos a 37°C**.

Utilizar o procedimento de banho-maria; não é adequada a utilização de um forno nem de uma placa de aquecimento. Períodos de incubação mais prolongados não afectam significativamente o ensaio.

- 5** Decantar completamente.

Remover toda a humidade visível melhorará significativamente a precisão. Decantar o conteúdo de todos os tubos (à excepção dos tubos T) usando um dispositivo de decantação de espuma, e deixá-los drenar durante 2 ou 3 minutos. De seguida, sacudir os tubos vigorosamente contra papel absorvente para eliminar todas as gotas residuais.

- 6** Contar durante **1 minuto** num contador gama.

Cálculo dos Resultados

Para obter resultados em termos de concentração a partir de uma representação logit-log da curva de calibração, começar por calcular a média

das contagens por minuto corrigidas com NSB de cada par de tubos:

Contagens Líquidas CPM Média *menos* CPM Média **NSB**

De seguida, determinar a ligação de cada par de tubos como uma percentagem da ligação máxima (MB), considerando as contagens corrigidas com NSB dos tubos A como 100%:

Percentagem de Ligação = (Contagens Líquidas / Contagens Líquidas **MB**) × 100

O cálculo pode ser simplificado, omitindo a correcção para a ligação não específica; as amostras dentro da gama dos calibradores produzem virtualmente os mesmos resultados quando a Percentagem de Ligação é calculada directamente a partir da CPM Média.

Usando papel milimétrico logit-log, representar a Percentagem de Ligação no eixo vertical (probabilidade) relativa à Concentração no eixo horizontal (logarítmico) para cada um dos calibradores diferentes de zero, e desenhar uma linha recta aproximando a trajectória destes pontos. Os resultados das amostras desconhecidas podem ser então lidos a partir da linha, por interpolação.

É boa prática analisar os resultados para verificar a concordância entre as réplicas, e para construir um gráfico da curva de calibração (mesmo que os cálculos sejam processados por computador) como verificação visual da adequação da transformação usada e como forma de detectar pontos de calibração desviantes. Recomendamos também o acompanhamento destes parâmetros de redução de dados.

T = Contagens Totais (como contagens por minuto)

%NSB = $100 \times (\text{Média Contagens NSB} / \text{Contagens Totais})$

%MB = $100 \times (\text{Contagens reais} / \text{Contagens Totais})$

E as linhas interceptadas percentuais de 20, 50 e 80, onde

20% = Concentração a 20 por cento de Ligação, etc.

De notar que outras abordagens, por ex., uma implementação correcta da logística de 4 parâmetros, são também aceitáveis.

Ver Dudley RA, et al. Guidelines for immunoassay data reduction. Clin Chem 1985; 31:1264-71:

Amostras de Urina:

As concentrações de cortisol livre na urina podem ser lidas directamente a partir da curva de calibração. Não é necessário um factor de correcção. (A introdução do dobro da amostra habitual de 25 µL no tubo de ensaio na etapa 7 do procedimento de preparação compensa exactamente a diluição de 1:2 verificada ao preparar 0,5 mL de urina em 1,0 mL de diclorometano.)

Para determinar o nível de cortisol livre na urina por dia em microgramas, basta multiplicar o resultado em µg/dL pelo volume de urina de 24 horas em decilitros:

µg/24 horas =
µg/dL × (Volume Total em mililitros) / 100

Exemplo de ensaio: Para ilustração apenas, não serve para calcular os resultados de outro ensaio. (Ver tabela "Exemplo de Ensaio".)

Controlo de Qualidade

Controlos (ou pools de soro) com pelo menos dois níveis de concentração de cortisol — baixo e alto — devem ser submetidos por rotina a ensaio como amostras desconhecidas.

Transmitir os resultados de paciente apenas se os resultados do controlo para o referido ensaio satisfizerem os critérios definidos pelo laboratório como critérios de admissibilidade.

É boa prática laboratorial registar para cada ensaio os números de lote dos componentes usados, bem como as datas em que foram reconstituídos ou abertos pela primeira vez. Recomendamos igualmente que sejam representados em gráfico os resultados de dia para dia — conforme descrito, por exemplo, em Westgard JO, et al. A multi-rule chart for quality control. Clin Chem 1981;27:493-501. De notar que as amostras de repetição podem funcionar como uma ferramenta adicional útil para a monitorizar a precisão inter-ensaio, e que os pares de tubos de controlo podem ser espaçados ao longo do ensaio a fim de ajudar a verificar a ausência de desvio significativo.

Ensaio sem Solventes:

Para obter resultados fiáveis, o diclorometano tem de apresentar pelo menos uma qualidade espectrofotométrica e a fonte de azoto, se utilizada, não pode contaminar os tubos de evaporação com óleo ou humidade. (A utilização de um ardil contendo sulfato de cálcio ajuda a prevenir essa contaminação.) Para verificar a pureza destes reagentes, que não são fornecidos com o kit, recomendamos o processamento periódico de um "ensaio sem solventes". Este procedimento implica a preparação e o ensaio com água destilada ou esterilizada da forma prescrita para as amostras de urina, de modo a confirmar que produz uma concentração aparente de cortisol essencialmente de zero, ou seja, inferior ao limite de detecção do ensaio.

Valores de Referência

Soro

Foram obtidos os seguintes valores previstos para o cortisol em circulação.

Variação de Ritmo Diurno	<i>manhã</i> : 5 – 25 µg/dL (138 – 690 nmol/L) ^{1,8,9} <i>tarde</i> : Aprox. metade dos valores da manhã.
Estimulação ACTH	Mais do dobro (normalmente 3 a 5 vezes) dos valores basais ^{4,5}
Reserva de ACTH (supressão de metirapona)	Inferior aos valores basais (controlo) ^{5,6}
Supressão de dexametasona	Inferior aos valores basais (controlo) para os testes de despiste, dose reduzida e dose elevada ^{4,5}

Urina

Um estudo com amostras de urina de 24 horas de 33 voluntários de laboratório saudáveis produziu uma gama absoluta de 21 a 85 µg/24 horas, com uma média de 48 µg/24 horas. Estes resultados são coerentes com uma gama de referência de 20 a 90 µg/24 horas para o nível de cortisol livre na urina, de acordo com o indicado na literatura de referência.⁷

Estes limites devem ser considerados apenas como *directrizes*. Cada laboratório deve estabelecer os seus próprios valores de referência.

Limitação

Os resultados de cortisol no soro e na urina podem apresentar valores falsamente elevados em amostras obtidas de pacientes submetidos a tratamento com prednisolona ou prednisona (convertida para prednisolona *in vivo*). É portanto necessário ter cuidado nas determinações dos níveis de cortisol em pacientes sob terapêutica com estes e outros corticosteróides sintéticos estruturalmente relacionados.

Características do Ensaio

Consulte Tabelas e Gráficos para dados *representativos* do desempenho do doseamento. Os resultados são expressos como microgramas de cortisol por decilitro (µg/dL). Todos os resultados foram obtidos com base em amostras de soro.

Factor de conversão:

µg/dL × 27,59 → nmol/L

Calibração: 1 – 50 µg/dL

(27,6 – 1 380 nmol/L)

Sensibilidade Analítica: 0,2 µg/dL

(5,5 nmol/L)

Precisão Intra-ensaio (entre ensaios)

Foram calculadas estatísticas para cada uma de sete amostras a partir dos resultados de 20 pares de tubos num único ensaio. (Ver tabela "Precisão Intra-ensaio".)

Precisão Inter-ensaio (ensaio a ensaio)

Foram calculadas estatísticas para cada uma de três amostras a partir dos resultados de 20 pares de tubos. (Ver tabela "Precisão Inter-ensaio".)

Efeito Fim-de-Série: nenhum até

aproximadamente 700 tubos.

(Ver tabela "Efeito Fim-de-Série".)

Linearidade: As amostras foram

doseadas sob várias diluições. (Ver tabela "Linearidade".)

Recuperação: Foram submetidas a

ensaio amostras a que foram adicionadas três soluções de cortisol de 1 para 19 (130, 250 e 475 µg/mL). (Ver a tabela "Recuperação".)

Bilirrubina: A presença de bilirrubina em concentrações até 200 mg/L não tem qualquer efeito nos resultados, dentro da precisão do ensaio.

Hemólise: A Presença de eritrócitos em concentrações até 30 µL/mL não tem efeito no resultado, dentro da precisão do ensaio.

Lipémia: O calibrador de 50 µg/dL foi diluído em série com um pool de soro lipêmico. Este procedimento provoca o aumento do grau de lipémia à medida que a concentração de cortisol vai diminuindo (devido principalmente ao calibrador). Todas as diluições foram testadas juntamente com o pool lipêmico sem qualquer adição. Os resultados demonstram boas recuperações, mesmo na presença de lipémia grave.

Tipo de amostra alternativa: Para determinar o efeito de amostras alternativas, foi colhido sangue de 40 voluntários em tubos secos, com EDTA, heparinizados e tubos de vacum SST® da Becton Dickinson. Todas as amostras foram testadas através do procedimento Coat-A-Count Cortisol. Regressão linear:

(Heparina) = 0,93 (Soro) + 0,59 µg/dL
r = 0,988

(EDTA) = 1,17 (Soro) – 0,03 µg/dL
r = 0,998

(SST) = 0,94 (tubos simples) + 0,70 µg/dL
r = 0,995

Médias:
13,8 µg/dL (Soro)
13,5 µg/dL (Heparina)
16,2 µg/dL (EDTA)
13,7 µg/dL (SST)

Os resultados demonstram que a utilização de plasma de EDTA *não é aceitável*.

Especificidade: O anti-soro Coat-A-Count Cortisol é altamente específico para o cortisol, com uma reactividade cruzada extremamente baixa a outros esteróides naturais ou fármacos terapêuticos que possam estar presentes nas amostras de paciente. (Ver tabela de "Specificity".)

Embora alguns esteróides demonstrem uma ligeira reactividade cruzada, as suas concentrações fisiológicas normais são baixas quando comparadas com o cortisol, pelo que não causam uma interferência significativa no procedimento Coat-A-Count Cortisol. Observou-se

contudo uma reactividade cruzada de aproximadamente 76% com a prednisolona, o que terá de ser tomado em consideração no caso de pacientes submetidos a esta terapêutica. Uma vez que a prednisona é convertida em prednisolona *in vivo*, é necessário ter cuidado nas determinações dos níveis de cortisol em pacientes sob qualquer uma destas terapêuticas.

Comparação de Métodos: O ensaio foi comparado com o ensaio Double Antibody Cortisol da DPC em 89 amostras de paciente. Regressão linear:

(CAC) = 1,02 (DA) – 0,25 µg/dL
r = 0,970

Médias:
18,8 µg/dL (Coat-A-Count)
18,7 µg/dL (Double Antibody)

Efeito das Proteínas: Para simular diversas concentrações de proteínas, foram efectuadas experiências em que alíquotas de 2,0 mL de pool de soro humano foram submetidas ao processo de congelamento-secagem e, em seguida, reconstituídas com diversos volumes de água (1, 2, 3 e 4 mL). Cada alíquota reconstituída foi então testada através do procedimento Coat-A-Count Cortisol. Note-se que as alíquotas reconstituídas com metade do volume original representam uma concentração proteica extremamente elevada, na ordem dos 14 g/dL. Estes resultados indicam que mesmo grandes variações no teor de proteínas totais não têm um efeito clinicamente significativo sobre o ensaio Coat-A-Count Cortisol. (Consultar a tabela "Efeito das Proteínas" para ver dados representativos.)

Assistência Técnica

Por favor contacte o seu Distribuidor Nacional.

O Sistema de Qualidade da Diagnostic Products Corporation está registado sob ISO 13485:2003.



Diagnostic Products Corporation
Corporate Offices
5210 Pacific Concourse Drive
Los Angeles, CA 90045-6900
USA

2005-03-18

PITKCO – 4



EC	REP
----	-----

 DPC Biemann GmbH
61231 Bad Nauheim
Germany
+49 -6032-994-00