

IDK[®] Cortisol & Cortisone LC-MS/MS Kit

*Zur in-vitro-Bestimmung von
Cortisol & Cortison in Urin*

*For the in vitro determination of
cortisol & cortisone in urine*

Gültig ab / Valid from 2023-10-27

REF KM2110

Σ
300

+2°C +8°C -20°C
CAL1-6
CTRL1-3

IVD **CE**



Immundiagnostik AG, Stubenwald-Allee 8a, 64625 Bensheim, Germany

Tel.: +49 6251 70190-0

Fax: + 49 6251 70190-363

e.mail: info@immundiagnostik.com

www.immundiagnostik.com

Inhalt

1. VERWENDUNGSZWECK	2
2. EINLEITUNG	2
3. MITGELIEFERTE MATERIALIEN	3
4. BENÖTIGTE MATERIALIEN (IM KIT NICHT ENTHALTEN)	4
5. VORBEREITUNG UND LAGERUNG DER REAGENZIEN	4
<i>Kalibratoren und Kontrollen</i>	4
<i>Verdünnungslösung</i>	5
<i>Interner Standard</i>	5
<i>Mobile Phase A und B</i>	6
<i>Autosampler Waschlösung</i>	6
6. VORBEREITUNG DER PROBE	6
7. LC-MS/MS METHODE	7
8. MUSTERCHROMATOGRAMME	7
9. QUALITÄTSKONTROLLE	8
<i>Referenzbereich</i>	8
10. TESTCHARAKTERISTIKA	9
<i>Wiederholbarkeit - intra-day Präzision</i>	9
<i>Reproduzierbarkeit - inter-day Präzision</i>	9
<i>Messbereich mit Limit des Blanks (LOB)</i>	9
11. VORSICHTSMASSNAHMEN	9
12. ENTSORGUNG	10
13. TECHNISCHE MERKMALE	10
14. ALLGEMEINE HINWEISE ZUM TEST	10
15. LITERATUR	11
16. SYMBOLE	12

1. VERWENDUNGSZWECK

Der IDK® Cortisol & Cortison LC-MS/MS Assay dient dem quantitativen Nachweis des Cortison- und Cortisolspiegels in menschlichem 24-Stunden-Urin. Der Assay ist ein medizinisches *In-vitro*-Diagnostikum für den automatisierten Einsatz durch professionelles Laborpersonal in einer Laborumgebung. Der Assay dient zur Hilfe bei der Diagnose und Überwachung von Funktionsstörungen der Hypophyse und der Nebennieren (z. B. Cushing-Syndrom, Addison-Krankheit, angeborene Nebennierenhyperplasie oder Nebenniereninsuffizienz). Es kann auch als Hilfsmittel bei der Bewertung und Überwachung von chronischem Stress und für ein umfassendes Verständnis des komplexen Zusammenhangs von Fettleibigkeit und einem metabolischem Syndrom dienen.

2. EINLEITUNG

Die Analyse des freien Cortisols im Urin (UFC) stellt den ersten biochemischen Laboransatz für das Screening des endogenen Cushing-Syndroms (CS) dar. Das endogene CS wird durch einen anhaltend hohen Spiegel von endogenem Cortisol verursacht, welchem eine übermäßige Produktion von Cortisol in einer oder beiden Nebennieren oder eine Überproduktion des adrenocorticotropen Hormons (ACTH), welches die Cortisolproduktion reguliert, zugrundeliegt. Da die Symptome immer unspezifisch sind, einschließlich Bluthochdruck, Fettleibigkeit und Stimmungsstörungen, ist für eine eindeutige Diagnose von CS eine Laborspezifische Bestimmung des freien Cortisols im Urin erforderlich.

Die Bestimmung des freien Cortisols im 24-Stunden-Urin kann ebenfalls bei anderen klinischen Pathologien nützlich sein, welche durch einen Cortisolspiegel im Urin gekennzeichnet sind wie z.B. bei nicht-autonomen Hyperkortisolismus (Pseudo-CS), psychiatrischen Störungen, morbidem Adipositas, schlecht eingestelltem Diabetes mellitus und Alkoholismus. Ein veränderter Cortisol-Stoffwechsel ist auch für einen Zustand verantwortlich, der als scheinbarer Mineralokortikoidüberschuss (AME)-Syndrom bekannt ist.

Während Cortisol im Wesentlichen von der Nebenniere ausgeschieden wird, wird Cortison hauptsächlich durch die Oxidierung von Cortisol durch die 11 β -Hydroxysteroid-Dehydrogenase (11 β -HSD) vom Typ 2 in verschiedenen menschlichen Geweben produziert. Somit wird Cortisol durch die 11 β -HSD inaktiviert und steht nicht mehr zur Rezeptorbindung zur Verfügung. Daher kann die gleichzeitige Bestimmung von Cortisol und Cortison bei der Diagnose des AME-Syndroms, aber auch bei kongenitaler Nebennierenhyperplasie und Nebenniereninsuffizienz helfen.¹

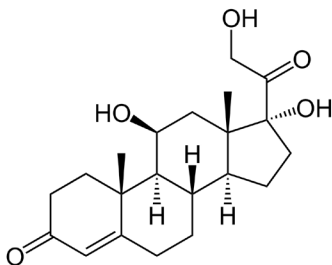


Abb. 1: Cortisol

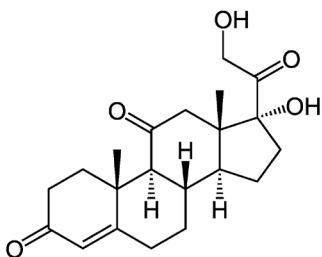


Abb. 2: Cortison

3. MITGELIEFERTE MATERIALIEN

Art.-Nr.	Bezeichnung	Kit-Komponenten	Menge
KM2110	AUTOWASH	Autosampler Waschlösung	1 x 1 000 ml
	CAL1-6	Kalibratoren 1-6, lyophilisiert (Konzentration siehe Produktspezifikation)	2 Fläschchen (à 1 ml) pro Konzentration
	CTRL1-3	Kontrollen 1-3, lyophilisiert (Konzentration siehe Produktspezifikation)	3 Fläschchen (à 1 ml) pro Konzentration
	DILSOL	Verdünnungslösung	3 x 100 ml
	INTSTD	Interner Standard; lyophilisiert	3 x 6 ml
	MOPHAA	Laufmittel A	1 x 500 ml
	MOPHAB	Laufmittel B	1 x 500 ml

Bitte verwenden Sie für Nachbestellungen von Einzelkomponenten als Bestellnummer die Artikelnummer gefolgt von der Bezeichnung ohne Leerzeichen.

4. BENÖTIGTE MATERIALIEN (IM KIT NICHT ENTHALTEN)

Folgendes Zubehör wird für die IDK®Cortisol&Cortison LC-MS/MS Applikation benötigt (nicht im Kit enthalten):

- Präzisionspipetten und Einmalpipettenspitzen mit variablen Volumina von 10–1 000 µl
- Zentrifuge, 10 000 g
- Vortex-Mixer
- Standard-Labor-Einmalreaktionsgefäße aus Kunststoff (z. B. 1,5 ml)
- LC-MS/MS-Anlage und passende LC-MS Probenvials
- Reinstwasser*

* Immundiagnostik AG empfiehlt die Verwendung von Reinstwasser nach ISO 3696. Es handelt sich dabei um Wasser des Typs 1, welches frei von ungelösten und kolloidalen Ionen und organischen Molekülen ist (frei von Partikeln > 0,2 µm) mit einer elektrischen Leitfähigkeit von 0,055 µS/cm bei 25 °C (≥ 18,2 MΩ cm).

Folgendes Zubehör kann separat für die IDK®Cortisol&Cortison LC-MS/MS Applikation bei der Immundiagnostik AG bestellt werden:

- UPLC Säule (KM2110SP)
- alle Einzelkomponenten

Bitte kontaktieren Sie uns für Ihre individuelle Lösung und fordern Sie unsere Einzelkomponenten-Preisliste an.

5. VORBEREITUNG UND LAGERUNG DER REAGENZIEN

Hinweis: Bitte nehmen Sie die Kit-Komponenten sofort nach Erhalt aus der Transportverpackung und beachten Sie die auf den Produktetiketten aufgedruckten Hinweise zu den Lagerbedingungen.

Alle Komponenten sollten lichtgeschützt, trocken und bei der angegebenen Lagertemperatur gelagert werden. Die so gelagerten Testreagenzien sind bis zum angegebenen Verfallsdatum verwendbar. Die angegebenen Stabilitäten gelten nur, wenn keine bakterielle Kontamination vorliegt.

Kalibratoren und Kontrollen

Handhabung:

Entfernen Sie die Kappe und den Gummistopfen stets vorsichtig (um Verluste des Inhalts zu vermeiden).

Rekonstituieren Sie die Kalibratoren und Kontrollen wie folgt:

- Rekonstituieren Sie jeden CAL und jede CTRL mit genau 1 ml destilliertem oder deionisiertem Wasser und inkubieren Sie diese 15 min bei Raumtemperatur.

- Die Komponente anschließend gründlich mischen, um sicherzustellen, dass sich das gesamte Trockenmaterial aufgelöst hat; dabei nicht zu stark schütteln, um Schaumbildung zu vermeiden.
- Die angesetzte Komponente während des Testverfahrens wie eine Patientenprobe handhaben.

Stabilität und Lagerung:

Vor der Rekonstitution:	-20°C	Bis zu dem auf dem Produktetikett angegebenen Verfallsdatum.
Nach der Rekonstitution:	-20°C	2 Wochen
	2–8°C	1 Woche

*Verdünnungslösung***Handhabung:**

Das Produkt ist flüssig und gebrauchsfertig.

Stabilität und Lagerung:

Lagerung bei 2–8°C Die Komponente kann nach dem ersten Öffnen bis zu 6 Wochen verschlossen oder bis zu 2 Wochen an der LC verwendet werden.

*Interner Standard***Handhabung:**

Entfernen Sie die Kappe und den Gummistopfen stets vorsichtig (um Verluste des Inhalts zu vermeiden).

Rekonstituieren Sie den internen Standard wie folgt:

- Rekonstituieren Sie den Inhalt eines Fläschchen INSTD mit genau 6 ml DILSOL und inkubieren Sie die gelöste Komponente für 15 min bei Raumtemperatur. Die verwendete Flasche BUF mit den verbleibenden 94 ml beiseite stellen.
- Die Komponente anschließend gründlich mischen, um sicherzustellen, dass sich das gesamte Trockenmaterial aufgelöst hat; dabei nicht zu stark schütteln, um Schaumbildung zu vermeiden.
- Abschließend die 6 ml rekonstituierter INTSTD in die DILSOL-Flasche (mit den verbleibenden 94 ml) zurückgeben und gründlich mischen.

Stabilität und Lagerung:

Vor der Rekonstitution:	2–8 °C	Bis zu dem auf dem Produktetikett angegebenen Verfallsdatum.
Nach der Rekonstitution:	-20 °C	2 Wochen
	2–8 °C	1 Woche

*Mobile Phase A und B***Handhabung:**

Die Komponente ist flüssig und gebrauchsfertig.

Stabilität und Lagerung:

Lagerung bei 2–8 °C Die Komponente kann nach dem ersten Öffnen bis zu 6 Wochen verschlossen oder bis zu 2 Wochen an der LC verwendet werden.

*Autosampler Waschlösung***Handhabung:**

Das Produkt ist flüssig und gebrauchsfertig.

Stabilität und Lagerung:

Lagerung bei 2–8 °C Die Komponente kann nach dem ersten Öffnen bis zu 6 Wochen verschlossen oder bis zu 2 Wochen an der LC verwendet werden.

6. VORBEREITUNG DER PROBE

Als Probe eignet sich humaner 24-Stunden-Urin.

Stabilität und Lagerung:

Lagerung bei 2–8 °C	14 Tage
Lagerung bei -20 °C	2 Monate

Probenvorbereitung

1.	Die Probe, CAL oder CTRL für 5 min bei 10 000 g zentrifugieren.
2.	100 µl des Überstandes (siehe Schritt 1.) in ein Reaktionsgefäß oder Kavität einer 96-well-Platte überführen.
3.	900 µl DILSOL (mit dazugegebenem INTSTD, siehe "Vorbereitung und Lagerung der Reagenzien") hinzugeben. Gut mischen (dabei Schaumbildung vermeiden).
4.	Lösung in ein passendes Probenvial oder eine Mikrotiterplatte für den LC-MS-Autosampler überführen.
5.	Injektion in das LC-MS/MS System (siehe Application Note).

7. LC-MS/MS METHODE

Die Parameter zur Einstellung der LC-MS/MS-Methode entnehmen Sie bitte der Application Note oder wenden Sie sich an lcms@immundiagnostik.com.

8. MUSTERCHROMATOGRAMME

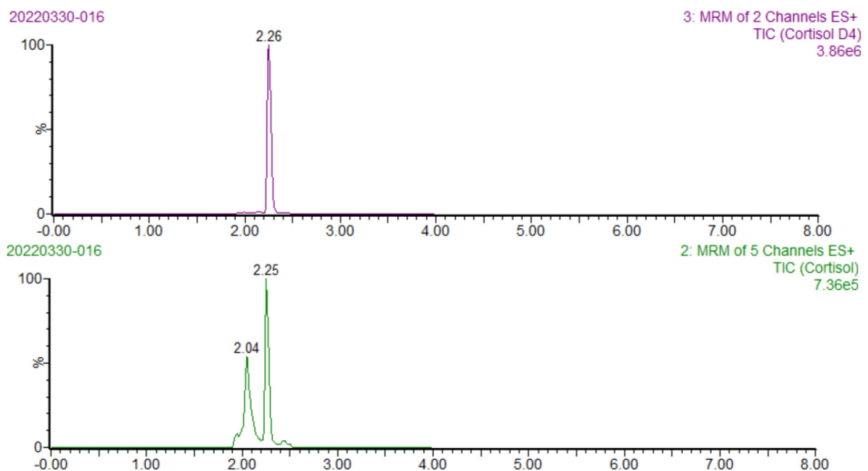


Abb. 3: Chromatogramm (mit einer Waters TQS-micro LC-MS/MS aufgenommen) für den internen Standard (oben) und den Analyten (unten) von Cortisol.

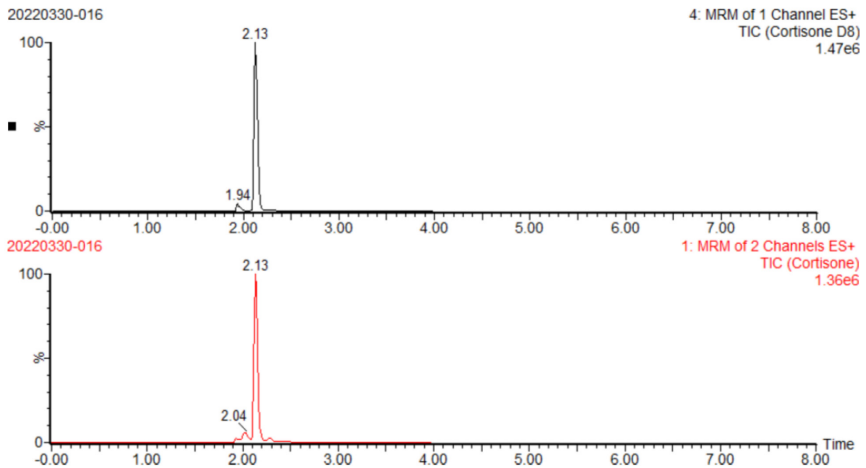


Abb. 4: Chromatogramm (mit einer Waters TQS-micro LC-MS/MS aufgenommen) für den internen Standard (oben) und den Analyten (unten) von Cortison.

9. QUALITÄTSKONTROLLE

Wir empfehlen Kontrollen bei jedem Testansatz mitzumessen. Die Ergebnisse der Kontrollen werden verwendet, um die Genauigkeit der Methode zu bestätigen. Liegt einer oder mehrere Werte der Qualitätskontrolle außerhalb des angegebenen Bereiches (siehe Produktspezifikation), kann Immundiagnostik AG die Richtigkeit der Testergebnisse nicht gewährleisten.

Referenzbereich

Cortisol: 5–133 nmol/l (1,8–48,2 ng/ml)

Cortison: 74–328 nmol/l (26,7–118,2 ng/ml)

Wir empfehlen jedem Labor einen eigenen Referenzbereich zu etablieren.

10. TESTCHARAKTERISTIKA

Wiederholbarkeit - intra-day Präzision

Analyt	CV		
	Kontrolle 1 [%]	Kontrolle 3 [%]	Patientenprobe [%]
Cortisol	2,0	1,0	1,4
Cortison	1,7	1,2	0,9

Reproduzierbarkeit - inter-day Präzision

Analyt	CV		
	Kontrolle 1 [%]	Kontrolle 3 [%]	Patientenprobe [%]
Cortisol	3,0	2,5	3,2
Cortison	2,9	2,6	3,4

Messbereich mit Limit des Blanks (LOB)

Analyt	[nmol/l (ng/ml)]
Cortisol	0–1 200 (0–435)
Cortison	0,218–3 100 (0,1–1 117)

11. VORSICHTSMASSNAHMEN

- Das für Kitkomponenten verwendete humane Material wurde auf HBsAg, HIV-1, HIV-2 und HIV p24 Ag Antikörper, Anti-HTLV 1 & 2, HCV und HIV Genom getestet und für negativ befunden. Dennoch wird empfohlen, die Kitkomponenten als Vorsichtsmaßnahme immer wie potentiell infektiöses Material zu behandeln.
- Es sind die auf den Einzelkomponenten angegebenen GHS-Symbole und Spezifikationen der Sicherheitsdatenblätter (auf Anfrage bei Immundiagnostik AG erhältlich) zu beachten. Beim Arbeiten mit diesen Reagenzien sind die gesetzlichen Schutzvorkehrungen einzuhalten.
- Reagenzien dieser Testpackung enthalten organische Lösungsmittel. Berührungen mit der Haut oder den Schleimhäuten sind zu vermeiden.

12. ENTSORGUNG

Autosampler Waschlösung (AUTOWASH), Laufmittel A (MOPHAA), Laufmittel B (MOPHAB) und Verdünnungslösung (DILSOL) müssen als halogenfreier Lösungsmittelabfall entsorgt werden.

Die Kalibratoren (CAL1–6) und Kontrollen (CTRL1–3) sollten als potentiell infektiöses Material gemäß der örtlichen Vorschriften entsorgt werden.

13. TECHNISCHE MERKMALE

- Reagenzien der Kitpackung dürfen nicht mit anderen Chargen gemischt werden.
- Die Reagenzien dürfen nach Ablauf des Haltbarkeitsdatums nicht mehr verwendet werden.
- Die Bestimmung ist immer nach der im Kit beigefügten Arbeitsanleitung durchzuführen.
- Stopfen und Verschlüsse verschiedener Reagenzien dürfen nicht vertauscht werden.
- Die Einzelkomponenten des Kits sind maximal für die angegebene Anzahl an Testdurchführungen ausgelegt. Ein bereits verwendeter Anteil der Komponenten darf nicht wiederverwendet werden.

14. ALLGEMEINE HINWEISE ZUM TEST

- Dieser Kit wurde nach der IVD Richtlinie 98/79/EG hergestellt und in den Verkehr gebracht.
- IDK® ist eine Marke der Immundiagnostik AG.
- Alle im Kit enthaltenen Reagenzien dürfen ausschließlich zur *in-vitro*-Diagnostik verwendet werden.
- Für die Qualitätskontrolle sind die für Laboratorien erstellten Richtlinien zu beachten.

- Die Testcharakteristika wie Inkubationszeiten, Inkubationstemperaturen und Pipettiervolumina der verschiedenen Komponenten wurden vom Hersteller festgelegt. Nicht mit dem Hersteller abgesprochene Veränderungen in der Testdurchführung können die Resultate beeinflussen. Die Firma Immundiagnostik AG übernimmt für die hierdurch entstandenen Schäden und Folgeschäden keine Haftung.
- Schwerwiegende Vorkommnisse sind der Immundiagnostik AG und den nationalen Aufsichtsbehörden zu melden.
- Sollten eine oder mehrere Komponenten des Testkits beschädigt, unvollständig (siehe Liste der Testbestandteile) oder Präzipitate in den gebrauchsfertigen Lösungen sichtbar sein, kontaktieren Sie bitte Immundiagnostik AG.
- Bei Gewährleistungsansprüchen ist das beanstandete Material mit schriftlicher Erklärung innerhalb von 14 Tagen zum Hersteller, der Immundiagnostik AG, zurückzusenden.

15. LITERATUR

1. Antonelli, G. et al. (2014) Cortisol and cortisone ratio in urine: LC-MS/MS method validation and preliminary clinical application. *Clinical Chemistry and Laboratory Medicine*, 52(2), 213-220.

16. SYMBOLE

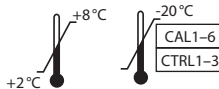
	Temperaturbegrenzung		Bestellnummer
	<i>In-Vitro</i> -Diagnostikum		Zu verwenden mit
	Hersteller		Inhalt ausreichend für <n> Prüfungen
	Chargenbezeichnung		Verwendbar bis
	Enthält Plasmaderivate oder menschliches Blut		Gebrauchsanweisung beachten
	Spezifikationsdatenblatt beachten		Nicht wiederverwenden
	Herstellungskennung		Enthält Material tierischen Ursprungs
	medizinische Substanz		Enthält Material humanen Ursprungs

IDK[®] Cortisol & Cortisone LC-MS/MS Kit

*For the in vitro determination of
cortisol & cortisone in urine*

Valid from 2023-10-27

REF KM2110



IVD **CE**



Immundiagnostik AG, Stubenwald-Allee 8a, 64625 Bensheim, Germany

Tel.: +49 6251 70190-0

Fax: + 49 6251 70190-363

e.mail: info@immundiagnostik.com

www.immundiagnostik.com

Table of Contents

1. INTENDED USE	16
2. INTRODUCTION	16
3. MATERIAL SUPPLIED	18
4. MATERIAL REQUIRED BUT NOT SUPPLIED	18
5. PREPARATION, STORAGE AND STABILITY OF REAGENTS	19
<i>Calibrators and controls</i>	19
<i>Dilution solution</i>	19
<i>Internal standard</i>	20
<i>Mobile phases A and B</i>	20
<i>Autosampler wash solution</i>	20
6. PREPARATION OF SAMPLE	21
7. LC-MS/MS METHOD	21
8. EXAMPLES OF CHROMATOGRAMS	22
9. QUALITY CONTROL	23
<i>Reference range</i>	23
10. TEST CHARACTERISTICS	23
<i>Repeatability - intra-day precision</i>	23
<i>Reproducibility - inter-day precision</i>	23
<i>Measuring range with limit of blank (LOB)</i>	23
11. PRECAUTIONS	24
12. DISPOSAL	24
13. TECHNICAL HINTS	24
14. GENERAL NOTES ON THE TEST	25
15. REFERENCES	25
16. SYMBOL EXPLANATION	26

1. INTENDED USE

IDK® Cortisol & Cortisone LC-MS/MS assay is for the quantitative detection of cortisone and cortisol levels in 24-hour human urine samples. The assay is an *in vitro* diagnostic medical device for automated use by professional laboratory staff in a laboratory environment. The assay serves as an aid in the diagnosis and monitoring of functional disorders of the pituitary and adrenal glands (e.g. Cushing's syndrome, Addison disease, congenital adrenal hyperplasia or adrenal insufficiency). It may also serve as an aid in the assessment and monitoring of chronic stress and in the comprehensive understanding of the complex context of obesity and metabolic syndrome.

2. INTRODUCTION

Urinary free cortisol (UFC) analysis represents the first biochemical laboratory approach for the screening of endogenous Cushing's syndrome (CS). Endogenous CS is caused by prolonged exposure to elevated levels of endogenous cortisol that may occur from excess production by one or both adrenal glands, or from overproduction of the adrenocorticotropic hormone (ACTH), which normally regulates cortisol production. As symptoms are always non-specific, including hypertension, truncal obesity and mood disorders, specific biochemical tests are required for diagnosing CS.

One of the first-line tests for this diagnosis, the measurement of 24-h UFC, can also be useful in other clinical conditions characterized by a high urine cortisol level, such as in non-autonomous hypercortisolism (pseudo-CS), psychiatric disorders, morbid obesity, poorly controlled diabetes mellitus and alcoholism. Altered cortisol metabolism is also responsible for a condition called apparent mineralocorticoid excess (AME) syndrome.

While cortisol is mainly essentially secreted by the adrenal gland, cortisone is mainly produced by type 2 11 β -hydroxysteroid dehydrogenase (11 β -HSD) in multiple human tissues, which interconverts bioactive cortisol to hormonally inactive cortisone to prevent activation of the mineralocorticoid receptor by cortisol. Hence the simultaneous determination of cortisol and cortisone can help in the diagnosis of AME syndrome, but also in congenital adrenal hyperplasia and adrenal insufficiency.¹

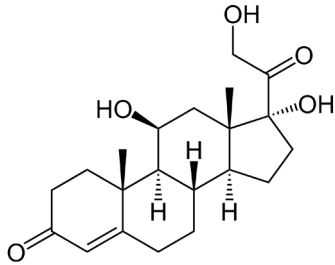


Fig. 1: Cortisol.

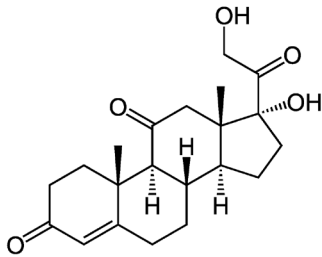


Fig. 2: Cortisone.

3. MATERIAL SUPPLIED

Cat. No.	Identifier	Kit components	Quantity
KM2110	AUTOWASH	Autosampler wash solution	1 x 1 000 ml
	CAL1–6	Calibrators 1–6; lyophilised (see product specification for concentration)	2 vials (à 1 ml) per level
	CTRL1–3	Controls 1–3; lyophilised (see product specification for concentration)	3 vials (à 1 ml) per level
	DILSOL	Dilution solution	3 x 100 ml
	INTSTD	Internal standard; lyophilised	3 x 6 ml
	MOPHAA	Mobile phase A	1 x 500 ml
	MOPHAB	Mobile phase B	1 x 500 ml

For reorders of single components, please use the catalogue number followed by the identifier without space as product number.

4. MATERIAL REQUIRED BUT NOT SUPPLIED

The following accessories are required for the IDK® Cortisol & Cortisone LC-MS/MS application (not included in the kit):

- Ultrapure water*
- Precision pipettors and disposable tips to deliver 10–1 000 µl
- Centrifuge 10 000 *g* (at least)
- Vortex mixer or microtiter plate shaker
- Standard laboratory disposable plastic reagent tubes (e.g. 1.5 ml)
- LC-MS/MS system and LC-MS vials

*Immundiagnostik AG recommends the use of ultrapure water (water type 1; ISO 3696/LC-MS grade), which is free of undissolved and colloidal ions and organic molecules (free of particles > 0.2 µm) with an electrical conductivity of 0.055 µS/cm at 25 °C (≥ 18.2 MΩ cm).

The following accessories for the IDK® Cortisol & Cortisone LC-MS/MS application can be ordered separately at Immundiagnostik AG:

- UPLC column (KM2110SP)
- all single components

Please ask for our single component price list. Please contact us for customized inquiries.

5. PREPARATION, STORAGE AND STABILITY OF REAGENTS

Note: Please unpack the kit components from the transport packaging immediately upon receipt and follow the instructions for storage conditions printed on the product labels. In general, all components should be stored protected from light, dry and at the specified storage temperature.

All components are for LC-MS/MS use only, components may also contain other ingredients than those listed as active ingredients below which might influence the measurement. All declared stabilities are only valid in case of no bacterial contamination.

Calibrators and controls

Handling:

Always remove the cap and rubber plug carefully (in order to avoid loss of content).

Reconstitute the calibrators and controls as follows:

- Reconstitute each calibrator and control with exactly 1 ml distilled or deionised water and incubate for 15 min at room temperature.
- Next, mix the component thoroughly to make sure that all dry material has dissolved; do not shake too vigorously to avoid foam formation.
- Handle the prepared component as a patient sample during the test procedure.

Stability and storage:

Before reconstitution: -20°C Until expiry date printed on the product label.

After reconstitution: -20°C 2 weeks

 2–8°C 1 week

Dilution solution

Handling:

The component is liquid and ready for use.

Stability and storage:

Store at 2–8°C

After first opening the component can be used for up to 6 weeks if closed and stored at 2–8°C or 2 weeks on the LC.

Internal standard

Handling:

Always remove the cap and rubber plug carefully (in order to avoid loss of content).

Reconstitute the internal standard as follows:

- Reconstitute the content of one vial INTSTD with exactly 6 ml DILSOL and incubate for 15 min at room temperature. Put aside the used vial of DILSOL with the remaining 94 ml.
- Next, mix the component thoroughly to make sure that all dry material has dissolved; do not shake too vigorously to avoid foam formation.
- Finally, return the 6 ml reconstituted INTSTD into the DILSOL vial (with the remaining 94 ml) and mix thoroughly.

Stability and storage:

Before reconstitution: 2–8 °C Until expiry date printed on the product label.

After reconstitution: -20 °C 2 weeks

2–8 °C 1 week

Mobile phases A and B

Handling:

The component is liquid and ready for use.

Stability and storage:

Store at 2–8 °C

After first opening the component can be used for up to 6 weeks if closed and stored at 2–8 °C or 2 weeks on the LC.

Autosampler wash solution

Handling:

The components are liquid and ready for use.

Stability and storage:

Store at 2–8 °C

After first opening the component can be used for up to 6 weeks if closed and stored at 2–8 °C or 2 weeks on the LC.

6. PREPARATION OF SAMPLE

Use human 24-hour urine.

Stability and storage:

Store at 2–8 °C 14 days

Store at -20 °C 2 months

Sample preparation

1.	Centrifuge sample, CAL or CTRL for 5 min at 10 000 <i>g</i> .
2.	Transfer 100 µl of the supernatant (see step 1.) into one reaction tube or well of a 96-well plate..
3.	Add 900 µl DILSOL (with added INTSTD, see "Preparation, storage and stability of reagents"). Mix well (avoid foam formation).
4.	Transfer the solution into a suitable LC-MS vial or 96-well plate for the LC-MS autosampler.
5.	Injection in the LC-MS/MS (see application note).

7. LC-MS/MS METHOD

Please refer to the application note or contact lcms@immundiagnostik.com for the LC-MS/MS method parameters.

8. EXAMPLES OF CHROMATOGRAMS

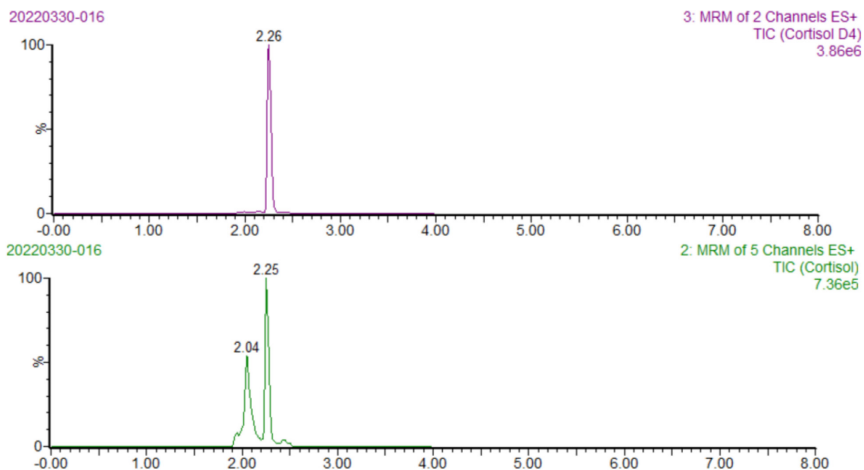


Fig. 3: Chromatogram (recorded with Waters TQS-micro LC-MS/MS) for the internal standard (top) and analyte (bottom) of cortisol.

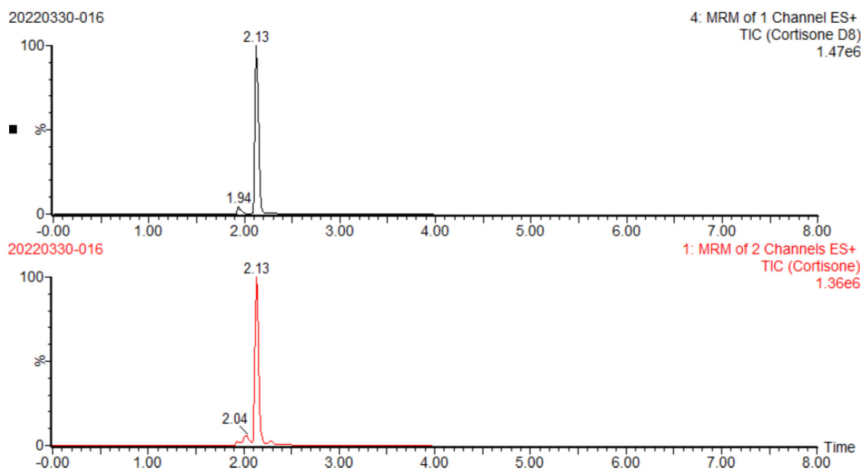


Fig. 4: Chromatogram (recorded with Waters TQS-micro LC-MS/MS) for the internal standard (top) and analyte (bottom) of cortisone.

9. QUALITY CONTROL

Control samples should be analysed with each run. Results, generated from the analysis of control samples, should be evaluated for acceptability using appropriate statistical methods. Immundiagnostik AG cannot guarantee the trueness of the method if one or more values of the quality control samples are outside the acceptable range (see product specification).

Reference range

Cortisol: 5–133 nmol/l (1.8–48.2 ng/ml)

Cortisone: 74–328 nmol/l (26.7–118.2 ng/ml)

We recommend each laboratory to establish its own reference range.

10. TESTCHARACTERISTICS

Repeatability - intra-day precision

Analyte	CV		
	Control 1 [%]	Control 3 [%]	Sample [%]
Cortisol	2.0	1.0	1.4
Cortisone	1.7	1.2	0.9

Reproducibility - inter-day precision

Analyte	CV		
	Control 1 [%]	Control 3 [%]	Sample [%]
Cortisol	3.0	2.5	3.2
Cortisone	2.9	2.6	3.4

Measuring range with limit of blank (LOB)

Analyte	nmol/l (ng/ml)
Cortisol	0–1 200 (0–435)
Cortisone	0.218–3 100 (0.1–1 117)

11. PRECAUTIONS

- Human material used in the kit components was tested and found to be negative for HBsAg, HIV-1, HIV-2 and HIV p24 Ag antibodies, Anti-HTLV 1 and 2, HCV and HIV genome. However, for safety reasons, all kit components should be treated as potentially infectious.
- The GHS symbols indicated on the individual components and specifications of the material safety data sheets (available on request from Immundiagnostik AG) must be noted. When working with these reagents, the legal protective precautions must be adhered to.
- The test components contain organic solvents. Contact with skin or mucous membranes has to be avoided.

12. DISPOSAL

Autosampler wash solution (AUTOWASH), mobile phase A (MOPHAA), mobile phase B (MOPHAB) and dilution solution (DILSOL) must be disposed as non-halogenated solvents.

Calibrators (CAL1–6) and controls (CTRL1–3) should be disposed as potentially infectious material in accordance with local regulations.

13. TECHNICAL HINTS

- Do not mix different lot numbers of any kit component.
- Reagents should not be used beyond the expiration date shown on the kit label.
- The assay should always be performed according to the enclosed manual.
- Plugs and caps of different reagents should not be swapped.
- The individual components of the kit are designed for a maximum of the specified number of test runs. Any part of the components that has already been used must not be reused, but must be disposed properly in accordance with local regulations.

















14. GENERAL NOTES ON THE TEST

- This assay was produced and distributed according to the IVD guidelines of 98/79/EC.
- IDK® is a trademark of Immundiagnostik AG.
- All reagents in the kit package are for *in vitro* diagnostic use only.
- The guidelines for medical laboratories should be followed.
- Incubation time, incubation temperature and pipetting volumes of the components are defined by the producer. Any variation of the test procedure, which is not coordinated with the producer, may influence the results of the test. Immundiagnostik AG can therefore not be held responsible for any damage resulting from wrong use.
- Serious incidents are to be reported to Immundiagnostik AG and the national regulatory authorities.
- Please contact Immundiagnostik AG if one or more components of the kit are damaged, missing (see material supplied) or precipitates are visible in the ready-to-use solutions.
- Warranty claims and complaints in respect of deficiencies must be lodged within 14 days after receipt of the product. The product shall be sent to Immundiagnostik AG together with a written complaint.

15. REFERENCES

1. Antonelli, G. et al. (2014) Cortisol and cortisone ratio in urine: LC-MS/MS method validation and preliminary clinical application. *Clinical Chemistry and Laboratory Medicine*, 52(2), 213-220.

16. SYMBOL EXPLANATION

	Temperature limitation		Catalogue number
	In Vitro Diagnostic Medical Device		To be used with
	Manufacturer		Contains sufficient for <n> tests
	Lot number		Use by
	Contains plasma derivatives or human blood		Consult instructions for use
	Consult specification data sheet		Do not re-use
	Unique Device Identification		Contains material of animal origin
	Medicinal substance		Contains material of human origin

Immundiagnostik AG

Stubenwald-Allee 8a
64625 Bensheim, Germany

Tel.: +49 6251 70190-0

Fax: +49 6251 70190-363

info@immundiagnostik.com

www.immundiagnostik.com

