

Arbeitsanleitung / Manual

**Nur für den Gebrauch durch Fachpersonal /
For professional use only**

Hepcidin-25 LC-MS/MS Kit

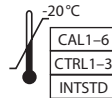
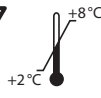
***Zur in-vitro-Bestimmung von Hepcidin-25
in Plasma und Serum***

***For the in vitro determination of hepcidin-25
in plasma and serum***

Gültig ab/Valid from 2024-01-11



KM4000



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

Sicherheitshinweise

Der Assay ist ausschließlich nach der dem Kit beigefügten Arbeitsanleitung durchzuführen. Wichtige Sicherheitshinweise zu diesem Produkt sind dem Kapitel 12 zu entnehmen.

Inhalt

1. ZWECKBESTIMMUNG	2
2. EINLEITUNG	2
3. TESTPRINZIP	2
4. MITGELIEFERTE MATERIALIEN	3
5. BENÖTIGTE MATERIALIEN (IM KIT NICHT ENTHALTEN)	3
6. VORBEREITUNG, LAGERUNG UND STABILITÄT DER REAGENZIEN	4
<i>Lagerung</i>	4
<i>Vorbereitung der Laufmittel und Testreagenzien</i>	4
7. PROBENVORBEREITUNG	5
8. LC-MS/MS-METHODE	7
9. MUSTERCHROMATOGRAMME	7
<i>Blank</i>	7
<i>Kontrolle 1 (CTRL1)</i>	8
<i>Probe</i>	9
10. QUALITÄTSKONTROLLE	10
<i>Referenzbereich</i>	10
11. TESTCHARAKTERISTIKA	10
<i>Richtigkeit und Präzision</i>	10
<i>Sensitivität / Quantifizierungsgrenze (LLOQ)</i>	10
12. VORSICHTSMASSNAHMEN	11
13. ENTSORGUNG	11
14. TECHNISCHE MERKMALE	11
15. ALLGEMEINE HINWEISE ZUM TEST	12
16. LITERATUR	12
17. SYMBOLE	13

1. ZWECKBESTIMMUNG

Der Hepcidin-25 LC-MS/MS Kit ist ein *In-vitro*-Diagnostikum zur Quantifizierung des Peptids Hepcidin-25 in Plasma und Serum mittels LC-MS/MS nach vorheriger Festphasenextraktion. Der Assay ist ein *In-vitro*-Diagnostikum für den manuellen und automatisierten Gebrauch durch professionelles Laborpersonal. Er dient der Beurteilung des Eisenstatus durch Vorhersage der durch Hepcidin gehemmten enteralen Eisenresorption.

2. EINLEITUNG

Hepcidin-25 ist ein cysteinreiches Peptid, welches in der Leber aus einem 84-Aminosäuren-Vorläufer, dem Pro-Hepcidin, produziert wird. Bislang konnten vier Isoformen charakterisiert werden, die sich durch aminoterninale Verkürzungen unterscheiden: Hepcidin-20, -22, -24 und -25. Hierbei handelt es sich bei Hepcidin-20 und Hepcidin-25 um die beiden Hauptformen, die aus 20 bzw. 25 Aminosäuren bestehen.

Die massenspektrometrische Analyse erlaubt die Unterscheidung dieser Isoformen und damit die selektive Bestimmung des Hepcidin-25. Das nativ gefaltete Hepcidin-25 enthält acht über intramolekulare Disulfidbrücken miteinander verbundene Cysteine und reguliert unter anderem im Dünndarmepithel die Eisenabsorption in den Körper.

Das Binden von Hepcidin-25 an Ferroportin, den Eisenexport-Kanal, führt schließlich zum lysosomalen Abbau des Ferroportins. Diese hemmende Bindung verhindert die Aufnahme von Eisen in den Blutkreislauf.

Hepcidin-25 kann als Prädiktor für die Eisenabsorption verwendet werden. Hepcidin-25 ermöglicht die Differenzierung der Eisenmangelanämie (IDA) von der Anämie bei chronischen Erkrankungen (ACD) und ACD/IDA. Darüber hinaus sagt es das Ansprechen auf eine orale Eisentherapie voraus und liefert damit wertvolle Informationen für die Behandlung von Patienten.

3. TESTPRINZIP

Zur Anreicherung von Hepcidin-25 wird eine simple Festphasenextraktion im 96-Well-Format durchgeführt. Nach der chromatographischen Auftrennung wird der Analyt via Tandem-Massenspektrometrie (LC-MS/MS) gemessen.

Als interner Standard wird eine mit schweren Isotopen markierte Hepcidin-Variante verwendet, um Varianz in der Probenvorbereitung und Matrixeffekte zu kompensieren.

4. MITGELIEFERTE MATERIALIEN

Art.-Nr.	Bezeichnung	Kit-Komponenten	Menge
KM0001	ACTSOL	Aktivierungslösung	1,5 ml
KM0002	RECSOL	Rekonstitutionslösung	15 ml
KM0003	WASHSOL	Waschlösung	80 ml
KM4000	CAL1–6	Kalibratoren 1–6; lyophilisiert (Konzentration siehe Produktspezifikation)	Je 2 Fläschchen (à 500 µl) pro Level
	CTRL1–3	Kontrolle 1–3; lyophilisiert (Konzentration siehe Produktspezifikation)	Je 2 Fläschchen (à 500 µl) pro Level
	DILSOL	Verdünnungslösung	10 ml
	ELUSOL	Elutionslösung	10 ml
	INTSTD	Interner Standard (Konzentrat)	3 x 10 µl
	MOPHAA	Laufmittel A	500 ml
	MOPHAB	Laufmittel B	500 ml
	SAMPLEBUF	Probenpuffer	30 ml
	WASHSOL2	Waschlösung 2	25 ml

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

Folgendes Zubehör kann für die Hepcidin-25-LC-MS/MS-Applikation bei Immunodiagnostik AG separat bestellt werden:

- Tuninglösung für Hepcidin (KM4000TU)
- Tuninglösung für den internen Standard (KM4000TS)
- HPLC-Säule (KM4000SP)
- Vorsäule (KM4000VS)
- 96-Well-Festphasenextraktionsplatte (KM400096SPE)
- Elutionsplatte (KM4000PLATE)

Bitte fordern Sie unsere Einzelkomponentenpreisliste an.

5. BENÖTIGTE MATERIALIEN (IM KIT NICHT ENTHALTEN)

- Reaktionsgefäße und Pipettenspitzen (*s. Application Note*)
- Präzisionspipetten und Einmalpipettenspitzen mit variablen Volumina von 10–1 000 µl

- Vakuumstation für 96-Well-Festphasenextraktionsplatten
- Vortex-Mixer
- LC-MS/MS-Anlage
- LC-MS-Vials
- Methanol p.a.
- 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).

6. VORBEREITUNG, LAGERUNG UND STABILITÄT DER REAGENZIEIN

Lagerung

Die Testreagenzien sollten lichtgeschützt, trocken und bei ihrer angegebenen Lager-temperatur (CAL1–6, CTRL1–3, INTSTD: -20 °C; alle anderen: 2–8 °C) gelagert werden. Die so gelagerten Testreagenzien sind bis zum angegebenen Haltbarkeitsdatum verwendbar.

Achtung: Die -20 °C-Komponenten sollten nach Rekonstitution / Verdünnung nicht erneut eingefroren werden.

Hinweis: Nach Vorbereitung der Reagenzien für die Testdurchführung können andere Stabilitäten gelten (siehe jeweiliger Vorbereitungsschritt).

Vorbereitung der Laufmittel und Testreagenzien

Die Laufmittel (MOPHAA und MOPHAB), der Probenpuffer (SAMPLEBUF), die Waschlösung 2 (KM4000WASHSOL2), die Verdünnungslösung (DILSOL) und die Elutionslösung (ELUSOL) müssen vor Gebrauch mit Aktivierungslösung (ACTSOL) aktiviert werden, siehe folgende Tabelle:

Komponente			ACTSOL [µl]
Bezeichnung	[ml]		
Laufmittel (MOPHAA und MOPHAB)	500	+	500
Probenpuffer (SAMPLEBUF)	30		60
Waschlösung 2 (KM4000WASHSOL2)	25		25
Verdünnungslösung (DILSOL)	10		10
Elutionslösung (ELUSOL)	10		10

Die Laufmittel sollten vor Verwendung entgast werden.

Hinweis: Nach Aktivierung mit der Aktivierungslösung (ACTSOL) sind die Komponenten Laufmittel A (MOPHAA), Laufmittel B (MOPHAB), Probenpuffer (SAMPLEBUF), Waschlösung 2 (KM4000WASHSOL2), Verdünnungslösung (DILSOL) und Elutionslösung (ELUSOL) bei 2–8 °C für bis zu 2 Wochen haltbar. Es wird daher empfohlen, nur soviel herzustellen wie für den Testansatz benötigt wird.

Achtung: Die Aktivierungslösung (ACTSOL) muss unter dem Abzug zugesetzt werden. Alle zu verwendenden Gefäße müssen absolut sauber, detergenzienfrei und vorzugsweise aus LC-MS/MS geeignetem Glas bestehen.

Vorbereitung Kalibratoren, Kontrollen und interner Standard

Die Kalibratoren (CAL1–6) und die Kontrollen (CTRL1–3) werden in je 500 µl Rekonstitutionslösung (RECSOL) bei 30 s vortexen gelöst.

Hinweis: Die rekonstituierten Kalibratoren (CAL1–6) und die Kontrollen (CTRL1–3) sind bei 2–8 °C für bis zu 1 Woche haltbar.

Der interne Standard (INTSTD) wird unmittelbar vor Gebrauch in zwei Verdünnungsschritten mit Probenpuffer (SAMPLEBUF) verdünnt. Hierbei unbedingt die im *Application Note* empfohlenen Pipettenspitzen und -reaktionsgefäße verwenden.

Verdünnung I

190 µl SAMPLEBUF zu 10 µl INTSTD geben (IS-Verdünnung I, 1:20). Diese Verdünnung muss in dem Fläschchen INTSTD angesetzt werden.

Hinweis: IS-Verdünnung I ist bei 2–8 °C für bis zu 1 Woche haltbar.

Werden für eine Aufarbeitung mehrerer Proben mehr als ein Fläschchen INTSTD benötigt und folglich mehr als eine IS-Verdünnung I hergestellt, sollte das benötigte Volumen vor Herstellung der IS-Verdünnung II zunächst in einem geeigneten Reaktionsgefäß zusammengeführt werden.

Verdünnung II

Je nach Anzahl aufzuarbeitender Proben ein entsprechendes Volumen der gebrauchsfertigen IS-Verdünnung II ansetzen, z.B. für 30 Proben:

150 µl IS-Verdünnung I + 5 850 µl SAMPLEBUF (IS-Verdünnung II, 1:40).

Hinweis: IS-Verdünnung II ist nicht stabil und muss unmittelbar nach dem Ansetzen verwendet werden.

7. PROBENVORBEREITUNG

Als Probe eignen sich Serum, Citrat- und Heparin-Plasma.

Achtung: bei hämolytischen Proben können Interferenzen auftreten.

Die Qualitätskontrollen sollten immer mitgemessen werden.

Im Test dürfen nur Reagenzien und Proben verwendet werden, die Raumtemperatur (18–26 °C) aufweisen.

Vor Gebrauch Reagenzien und Proben gut mischen.

Hinweis: Die Reagenzien zur Festphasenextraktion enthalten organische Löse-
mittel. Beim Arbeiten mit diesen Reagenzien sind die gesetzlichen Schutz-
vorkehrungen einzuhalten.

1.	Konditionierung der 96-Well-Festphasenextraktionsplatte (96SPE) mit 200 µl Methanol je Kavität, absaugen über die Vakuumstation.
2.	Äquilibrierung mit 200 µl Reinstwasser, absaugen.
3.	200 µl Probe, Kalibrator (CAL1–6) oder Kontrolle (CTRL1–3) in jede Kavität pipettieren.
4.	Zugabe von 200 µl interner Standard (IS-Verdünnung II), absaugen.
5.	Erster Waschschrift mit 200 µl Waschlösung (KM0003WASHSOL), absaugen.
6.	Zweiter Waschschrift mit 200 µl Waschlösung 2 (aktivierte KM4000WASH-SOL2), absaugen.
7.	Dritter Waschschrift mit 200 µl Waschlösung (KM0003WASHSOL), absaugen.
8.	Wechseln des Auffangbehälters zur Elutionsplatte vor den Elutions- schritten.
9.	Erster Elutionsschritt mit 25 µl Elutionslösung (aktivierte ELUSOL), absaugen.
10.	Zweiter Elutionsschritt mit 25 µl Elutionslösung (aktivierte ELUSOL), absaugen.
11.	Verdünnung (1:2) der kombinierten Elutionsfraktionen mit Verdün- nungslösung (aktivierte DILSOL): z.B. 50 µl Eluat + 50 µl Verdünnungslösung Dieser Schritt kann direkt in der Elutionsplatte oder auch nach dem Transfer in LC-MS-Vials durchgeführt werden.
12.	Injektion in das LC-MS/MS-System (s. <i>Application Note</i>).

8. LC-MS/MS-METHODE

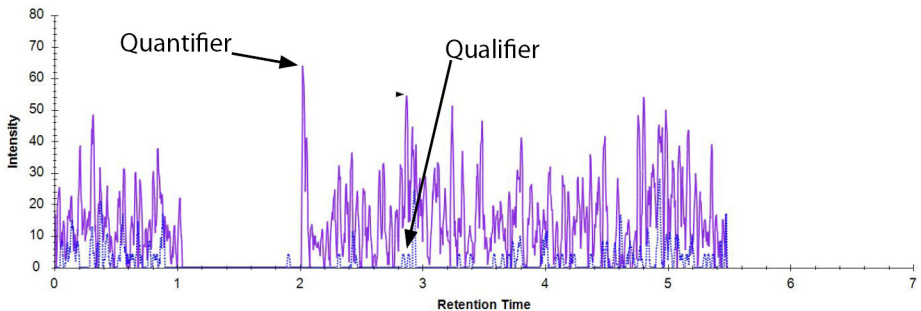
Bitte entnehmen Sie die Parameter zur Einstellung der LC-MS/MS-Methode dem *Application Note* oder wenden Sie sich an lcms@immundiagnostik.com.

9. MUSTERCHROMATOGRAMME

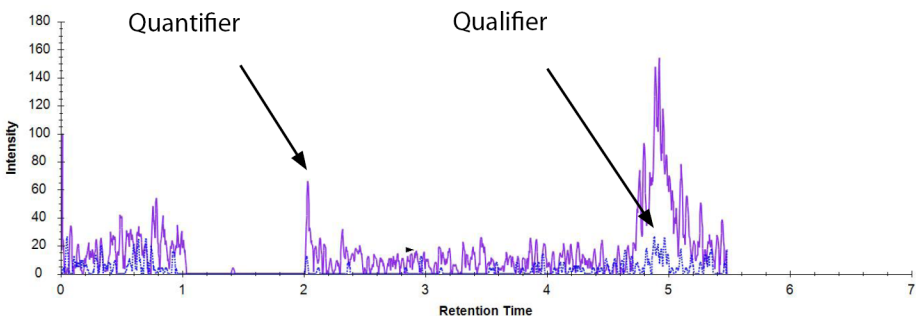
Es muss beachtet werden, dass die Retentionszeit und Signalintensität geräteabhängig variieren kann.

Blank

Analytübergänge

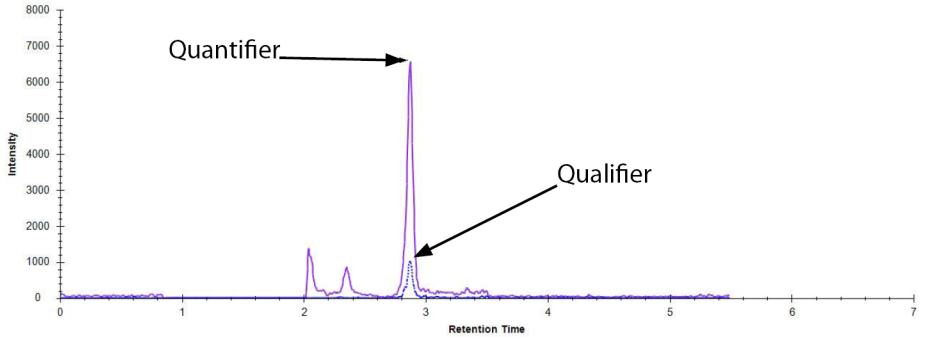


Übergänge interner Standard

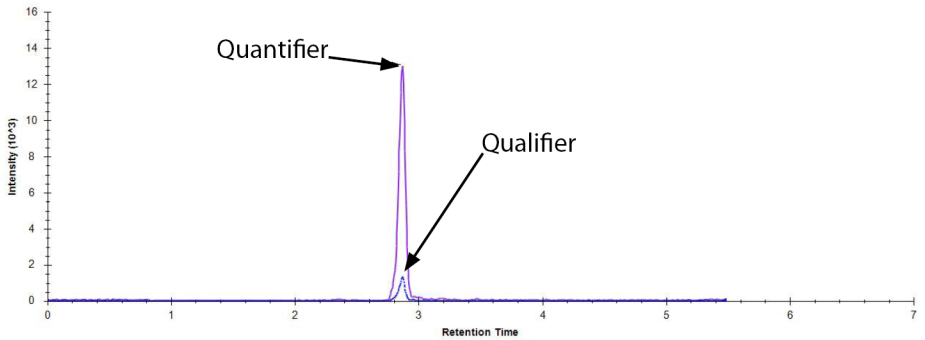


Kontrolle 1 (CTRL1)

Analytübergänge

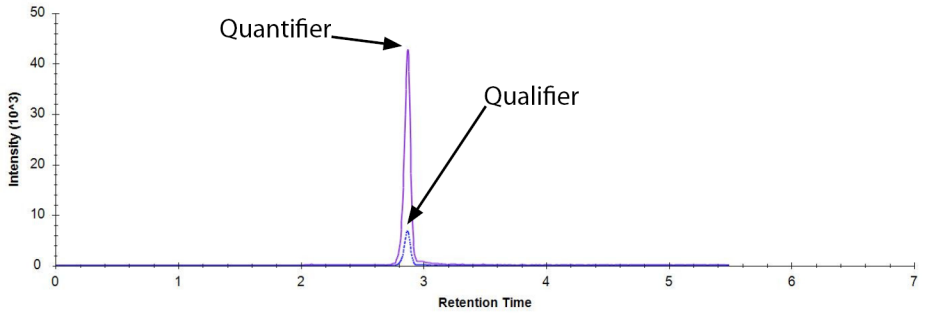


Übergänge interner Standard

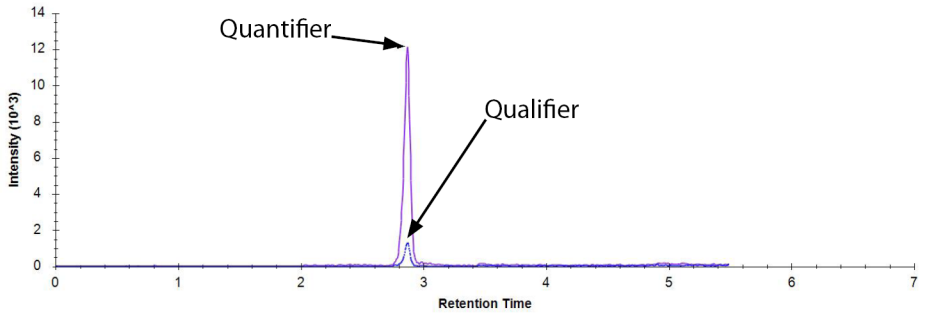


Probe

Analytübergänge



Übergänge interner Standard



10. QUALITÄTSKONTROLLE

Wir empfehlen, bei jedem Testansatz Kontrollen mitzumessen. Die Ergebnisse der Kontrollen müssen auf Richtigkeit überprüft werden. Liegen eine oder mehrere Kontrollen außerhalb des angegebenen Bereiches (s. Produktspezifikation), kann Immundiagnostik die Richtigkeit der Messergebnisse nicht gewährleisten.

Referenzbereich

Vorläufiger Referenzbereich (Serum und Plasma), Galesloot *et al.*, 2011:

Männer, n = 1 066: 1,39–43,24 ng/ml (P2,5–P97,5), Median: 13,11 ng/ml

Frauen, n = 882: 1,39–42,96 ng/ml (P2,5–P97,5), Median: 10,60 ng/ml

Wir empfehlen jedem Labor, einen eigenen Referenzbereich zu etablieren.

11. TESTCHARAKTERISTIKA

Richtigkeit und Präzision

Probe [ng/ml]	Richtigkeit		Präzision	
	<i>intra-day</i> (n=5)	<i>inter-day</i> (n=15)	<i>intra-day</i> (n=5)	<i>inter-day</i> (n=15)
1,9	93,5 %	98,0 %	6,8 %	6,8 %
5,3	106,5 %	103,3 %	6,2 %	5,4 %
19,9	104,0 %	100,2 %	3,8 %	3,8 %
92,5	107,4 %	102,5 %	5,3 %	5,2 %

Sensitivität / Quantifizierungsgrenze (LLOQ)

Der LLOQ bezeichnet die niedrigste Konzentration des Analyten, die sich noch quantifizieren lässt:

Hepcidin-25: 1,9 ng/ml

Es muss beachtet werden, dass die Quantifizierungsgrenze nicht ausschließlich applikations-, sondern auch geräteabhängig ist.

12. VORSICHTSMASSNAHMEN

- Qualitätskontrollen sollten immer mitgemessen werden.
- Das für Kitkomponenten verwendete humane Material wurde auf HIV, Hepatitis B und Hepatitis C 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 Immun diagnostik AG erhältlich) zu beachten. Beim Arbeiten mit diesen Reagenzien sind die gesetzlichen Schutzvorkehrungen einzuhalten.
- Als Vorsichtsmaßnahme wird empfohlen, das verwendete Humanmaterial stets als potenziell infektiös zu betrachten.

13. ENTSORGUNG

- Laufmittel (MOPHAA und MOPHAB), Probenpuffer (SAMPLEBUF), Waschlösung 2 (WASHSOL2), Elutionslösung (ELUSOL), Verdünnungslösung (DILSOL) und Aktivierungslösung (ACTSOL) müssen als halogenfreier Lösungsmittelabfall entsorgt werden. Die Kalibratoren (CAL1–6) und Kontrollen (CTRL1–3) sollten aufgrund ihrer Behandlung als potentiell infektiöses Material gemäß den örtlichen Vorschriften entsorgt werden.

14. TECHNISCHE MERKMALE

- Reagenzien der Kitpackung dürfen nicht mit anderen Chargen gemischt werden.
- Die Reagenzien dürfen nach Ablauf des auf der Kitverpackung angegebenen Haltbarkeitsdatums nicht mehr verwendet werden.
- Der Assay ist immer nach der dem Kit beigelegten Arbeitsanleitung durchzuführen.
- Die Einzelkomponenten des Kits sind maximal für die angegebene Anzahl an Testdurchführungen ausgelegt. Ein bereits verwendeter Anteil der Komponenten darf nicht wiederverwendet, sondern muss entsprechend den lokalen Richtlinien ordnungsgemäß entsorgt werden.
- Stopfen und Verschlüsse verschiedener Reagenzien dürfen nicht vertauscht werden.


15. ALLGEMEINE HINWEISE ZUM TEST

- Dieser Kit wurde nach der IVD Richtlinie 98/79/EG hergestellt und in den Verkehr gebracht.
- 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.
- Alle im Zusammenhang mit dem Produkt auftretende schwerwiegende Vorkommnisse sind der Immundiagnostik AG und (innerhalb des Unionsmarkt) der zuständigen Meldebehörde des jeweiligen Mitgliedsstaats 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.

16. LITERATUR

1. Bregman DB, Morris D, Koch TA, He A, Goodnough LT. Hepcidin levels predict non-responsiveness to oral iron therapy in patients with iron deficiency anemia. *Am J Hematol.* 2013;**88**(2):97-101.
2. Galesloot TE, Vermeulen SH, Geurts-Moespot AJ, et al. Serum hepcidin: reference ranges and biochemical correlates in the general population. *Blood.* 2011;**117**(25):e218-e225.
3. Hershko C, Camaschella C. How I treat unexplained refractory iron deficiency anemia. *Blood.* 2014;**123**(3):326-333.
4. Rochette L, Gudjoncik A, Guenancia C, Zeller M, Cottin Y, Vergely C. The iron-regulatory hormone hepcidin: a possible therapeutic target?. *Pharmacol Ther.* 2015;**146**:35-52.

17. 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

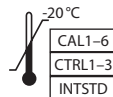
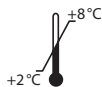
Manual
For professional use only

Hepcidin-25 LC-MS/MS kit

*For the in vitro determination of hepcidin-25
in plasma and serum*

Valid from 2024-01-11

REF **KM4000**



IVD



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

Safety information

The assay has to be performed exclusively according to the instructions for use enclosed with the kit. Important safety information for this product can be found in chapter 12.

Table of Contents

1. INTENDED USE	18
2. INTRODUCTION	18
3. PRINCIPLE OF THE TEST	18
4. MATERIALS PROVIDED	19
5. MATERIAL REQUIRED BUT NOT SUPPLIED	19
6. PREPARATION, STORAGE AND STABILITY OF REAGENTS	20
<i>Storage</i>	20
<i>Preparation of mobile phases and test reagents</i>	20
<i>Preparation of calibrators, controls and internal standard</i>	21
7. SAMPLE PREPARATION	21
8. LC-MS/MS METHOD	22
9. EXAMPLES OF CHROMATOGRAMS	23
<i>Blank</i>	23
<i>Control 1 (CTRL1)</i>	24
<i>Sample</i>	25
10. QUALITY CONTROL	26
<i>Reference range</i>	26
11. PERFORMANCE CHARACTERISTICS	26
<i>Accuracy and precision</i>	26
<i>Sensitivity / Limit of quantification (LLOQ)</i>	26
12. PRECAUTIONS	27
13. DISPOSAL	27
14. TECHNICAL HINTS	27
15. GENERAL NOTES ON THE TEST AND TEST PROCEDURE	28
16. REFERENCES	28
17. SYMBOL EXPLANATION	29

1. INTENDED USE

The Hepcidin-25 LC-MS/MS Kit is an *in vitro* diagnostic tool for the quantification of the peptide Hepcidin-25 in plasma and serum by LC-MS/MS after solid phase extraction. The assay is an *in vitro* diagnostic tool for manual and automated use by professional laboratory personnel. It is used to assess iron status by predicting hepcidin-inhibited enteral iron absorption.

2. INTRODUCTION

Hepcidin-25 is a cysteine-rich peptide that is produced in the liver from an 84-amino acid precursor, pre-hepcidin. So far, four isoforms have been characterised which are distinguished by amino-terminal truncations: hepcidin-20, -22, -24 and -25. Hepcidin-20 and -25 are the two main forms consisting of 20 and 25 amino acids, respectively.

Mass spectrometric analysis allows the differentiation of these two isoforms and thus the selective determination of hepcidin-25. The natively folded hepcidin-25 contains eight cysteines linked by intramolecular disulfide bridges and regulates, among other things, the absorption of iron into the body.

Binding of hepcidin-25 to ferroportin, the iron export channel, eventually leads to lysosomal degradation of ferroportin. This inhibitory binding prevents the absorption of iron into the bloodstream.

Hepcidin-25 can be used as a predictor of iron absorption. Hepcidin-25 enables the differentiation of iron deficiency anaemia (IDA) from anaemia in chronic diseases (ACD) and ACD/IDA. It also predicts the response to oral iron therapy and thus provides valuable information for the treatment of patients.

3. PRINCIPLE OF THE TEST

A simple solid phase extraction (SPE) in the 96-well format is used for hepcidin-25 enrichment. Following chromatographic separation at moderate pressures, the analyte is measured via tandem mass spectrometry (LC-MS/MS).

A stable isotope-labelled version of the analyte is used as internal standard to correct sample loss during the sample preparation and matrix effects during ionisation.

4. MATERIALS PROVIDED

Art. no.	Label	Kit components	Amount
KM0001	ACTSOL	Activation solution	1.5 ml
KM0002	RECSOL	Reconstitution solution	15 ml
KM0003	WASHSOL	Wash solution	80 ml
KM4000	CAL1–6	Calibrators 1–6; lyophilised (see product specification for concentration)	2 vials (á 500 µl) per level each
	CTRL1–3	Control 1–3; lyophilised (see product specification for concentration)	2 vials (á 500 µl) per level each
	DILSOL	Dilution solution	10 ml
	ELUSOL	Elution solution	10 ml
	INTSTD	Internal standard concentrate	3 x 10 µl
	MOPHAA	Mobile phase A	500 ml
	MOPHAB	Mobile phase B	500 ml
	SAMPLEBUF	Sample buffer	30 ml
	WASHSOL2	Wash solution 2	25 ml

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

The following accessories for the hepcidin-25 LC-MS/MS kit can be ordered separately at Immundiagnostik AG:

- tuning solution for hepcidin-25 (KM4000TU)
- tuning solution for the internal standard (KM4000TS)
- HPLC column (KM4000SP)
- precolumn (KM4000VS)
- 96-well solid phase extraction plate (KM400096SPE)
- elution plate (KM40000 PLATE)

Please ask for our single component price list.

5. MATERIAL REQUIRED BUT NOT SUPPLIED

- reaction tubes and pipette tips (see application note)
- Precision pipettors and disposable tips to deliver 10–1 000 µl
- Vacuum station for 96-well solid phase extraction plate
- Vortex-mixer

- LC-MS/MS equipment
- LC-MS vials
- Methanol p.a.
- Ultrapure water*

* Immundiagnostik AG recommends the use of ultrapure water (water type 1; ISO 3696), 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 MΩcm).

6. PREPARATION, STORAGE AND STABILITY OF REAGENTS

Storage

The test reagents should be stored protected from light, dry and their specified storage temperature (CAL1–6, CTRL1–3, INTSTD: -20°C; all others 2–8°C). The test reagents stored in this way are usable until the indicated expiry date.

Attention: The -20°C components should not be refrozen after reconstitution / dilution.

Note: After preparation of the reagents their stability may vary (see respective preparation step).

Preparation of mobile phases and test reagents

Before use, the mobile phases (MOPHAA and MOPHAB), sample buffer (SAMPLEBUF), wash solution 2 (KM4000WASHSOL2), dilution solution (DILSOL) and elution solution (ELUSOL) must be activated by adding activation solution (ACTSOL) according to the following chart:

Component			ACTSOL [µl]
Name	[ml]		
Mobile phase (MOPHAA and MOPHAB)	500	+	500
Sample buffer (SAMPLEBUF)	30		60
Washing solution 2 (WASHSOL2)	25		25
Dilution solution (DILSOL)	10		10
Elution solution (ELUSOL)	10		10

Prior use mobile phases should be degassed.

Note: After activation with activation solution (ACTSOL), the components mobile phase A (MOPHAA), mobile phase B (MOPHAB), sample buffer (SAMPLEBUF), wash solution 2 (WASHSOL2), dilution solution (DILSOL) and elution solution (ELUSOL)

can be stored at 2–8 °C up to 2 weeks. It is therefore recommended to prepare only as much as is needed for the test approach.

Attention: The activation solution (ACTSOL) must be added under the fume cupboard. All vessels to be used must be absolutely clean, free of detergents and preferably made of LC-MS/MS suitable glass.

Preparation of calibrators, controls and internal standard

Dissolve calibrators (CAL1–6) and controls (CTRL1–3) in 500 µl of reconstitution solution (RECSOL) each while 30 s vortexing.

Note: The reconstituted calibrators (CAL1–6) and controls (CTRL1–3) can be stored at 2–8 °C for up to 1 week.

The internal standard (INTSTD) is diluted in two steps with sample buffer (SAMPLE-BUF) immediately before use. Here, necessarily use the pipette tips and reaction vessels recommended in the application note.

Dilution I

Add 190 µl SAMPLEBUF to 10 µl INTSTD (IS dilution I, 1:20). This dilution must be prepared in the INTSTD vial.

Note: IS dilution I can be stored at 2–8 °C for up to 1 week.

If more than one vial of INTSTD is needed for a work-up of several samples and consequently more than one IS-dilution I is prepared, the required volume should first be combined in a suitable reaction tube before preparing IS-dilution II.

Dilution II

Depending on the number of samples to be processed, prepare an appropriate volume of the ready-to-use IS-dilution II, e.g. for 30 samples:

150 µl IS dilution I + 5 850 µl SAMPLEBUF (IS dilution II, 1:40).

Note: IS dilution II must be used immediately after preparation and is not stable.

7. SAMPLE PREPARATION

Serum, citrate-, and heparin plasma samples are suited for the assay.

Attention: Interferences may occur with hemolytic samples.

The quality controls should be analysed with each run.

Only reagents and samples that are at room temperature (18–26 °C) shall be used in the test.

Mix well samples and reagents before use.

Note: Reagents used in the SPE step contain organic solvents. When working with these reagents, the legal safety precautions must be observed.

1.	Conditioning of the 96-well solid phase extraction plate (96SPE) with 200 µl methanol per well, aspirate via the vacuum station.
2.	Equilibration with 200 µl ultrapure water, aspirate.
3.	Pipette 200 µl sample, calibrator (CAL1–6) or control (CTRL1–3) into each well.
4.	Add 200 µl internal standard (IS dilution II), aspirate.
5.	First wash step with 200 µl wash solution (KM0003 WASHSOL), aspirate
6.	Second wash step with 200 µl wash solution 2 (activated ASHSOL2), aspirate.
7.	Third wash step with 200 µl wash solution (KM0003 WASHSOL), aspirate.
8.	Change waste container to collection plate before the elution steps.
9.	First elution step with 25 µl elution solution (activated ELUSOL), aspirate.
10.	First elution step with 25 µl elution solution (activated ELUSOL), aspirate.
11.	Dilution (1:2) of the combined elution fractions with dilution solution (activated DILSOL): e.g. 50 µl eluate + 50 µl dilution solution This step can be performed direct in the elution plate or also after transfer of the eluate to LC-MS vials.
12.	Injection into the LC-MS/MS system (see application note).

8. LC-MS/MS METHOD

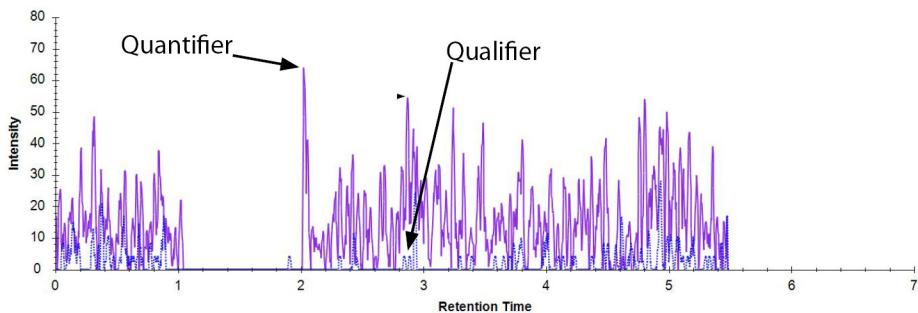
Please refer to the application note or contact lcms@immundiagnostik.com for the parameters for setting the LC-MS/MS method.

9. EXAMPLES OF CHROMATOGRAMS

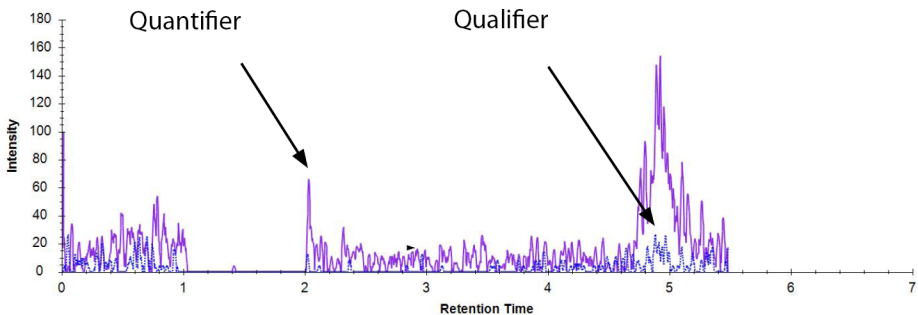
It must be noted that the retention time and signal intensity may vary depending on the device.

Blank

Analyte transitions

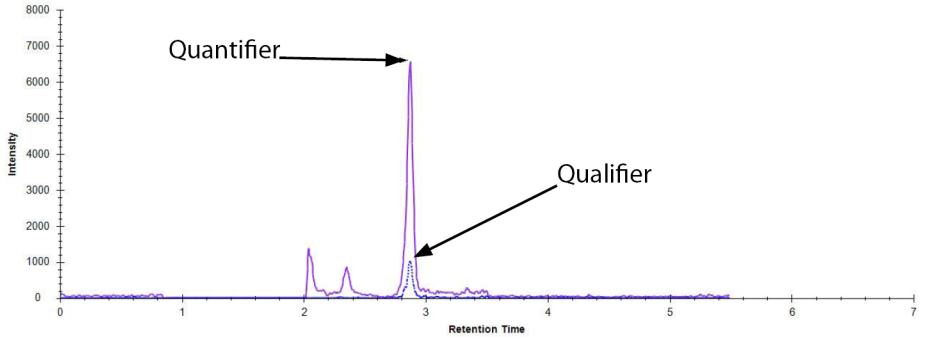


Internal standard transitions

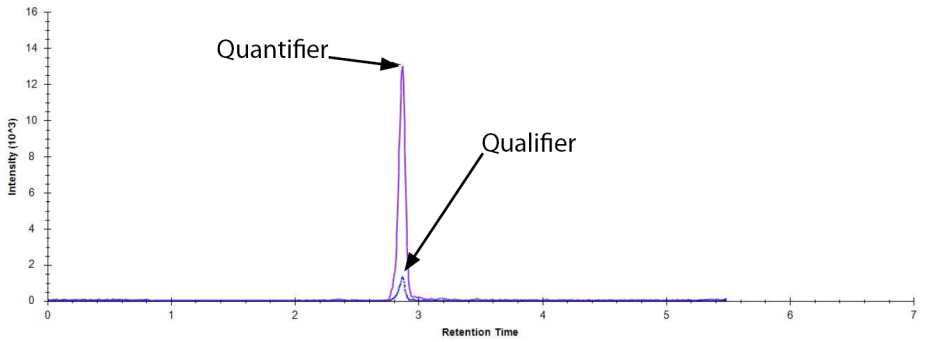


Control 1 (CTRL1)

Analyte transitions

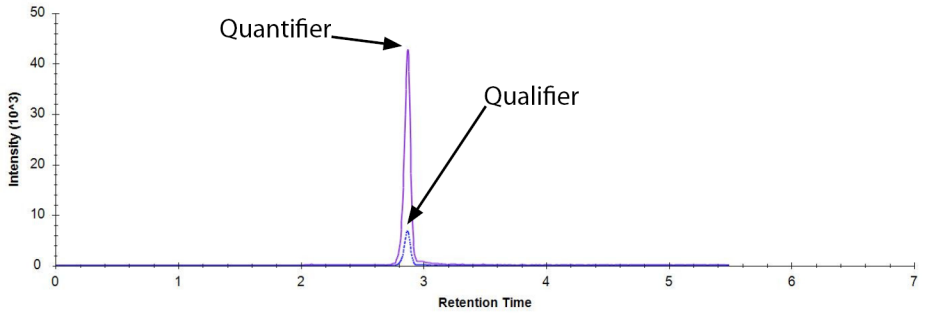


Internal standard transitions

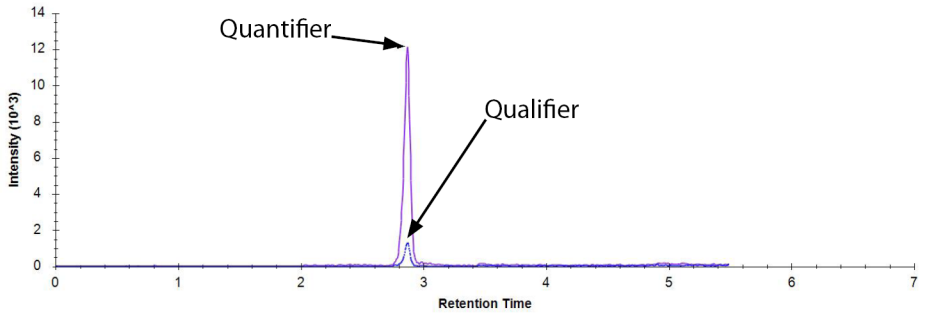


Sample

Analyte transitions



Internal standard transitions



10. QUALITY CONTROL

Control samples should be analyzed with each run. Results, generated from the analysis of control samples, should be evaluated for acceptability using appropriate statistical methods. The results for the patient samples may not be valid, if within the same assay one or more values of the quality control sample are outside the acceptable limits (see product specification).

Reference range

Preliminary reference range (serum and plasma), Galesloot *et al.*, 2011

Men, n = 1 066: 1.39–43.24 ng/ml (P2.5–P97.5), Median: 13.11 ng/ml

Women, n = 882: 1.39–42.96 ng/ml (P2.5–97.5), Median: 10.60 ng/ml

We recommend each laboratory to establish its own reference range.

11. PERFORMANCE CHARACTERISTICS

Accuracy and precision

sample [ng/ml]	Accuracy		Precision	
	<i>intra-day</i> (n=5)	<i>inter-day</i> (n=15)	<i>intra-day</i> (n=5)	<i>inter-day</i> (n=15)
1.9	93.5 %	98.0 %	6.8 %	6.8 %
5.3	106.5 %	103.3 %	6.2 %	5.4 %
19.9	104.0 %	100.2 %	3.8 %	3.8 %
92.5	107.4 %	102.5 %	5.3 %	5.2 %

Sensitivity / Limit of quantification (LLOQ)

The LLOQ designates the lowest concentration of the analyte that can still be quantified:

hepcidin-25: 1.9 ng/ml

It is important to note that the quantification limit is not exclusively application-dependent, but also device-dependent.

12. PRECAUTIONS

- Control samples should be analysed with each run.
- Human material used in the kit components was tested and found to be negative for HIV, hepatitis B and hepatitis C. 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 Immunodiagnostik AG) must be noted. When working with these reagents, the legal protective precautions must be adhered to.
- As a precaution, it is recommended that the human material used is always considered potentially infectious.

13. DISPOSAL

- Mobile phases (MOPHAA and MOPHAB), sample buffer (SAMPLEBUF), wash solution 2 (KM4000WASHSOL2), elution solution (ELUSOL), dilution solution (DILSOL) and activation solution (ACTSOL) must be deposited as non-halogenated solvents. The calibrators (CAL1–6) and controls (CTRL1–3) should be disposed due to their treatment as potentially infectious material in accordance with local regulations.

14. TECHNICAL HINTS

- Do not mix different lot numbers of any kit component.
- Reagents should not be used beyond the expiration date stated 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 of properly in accordance with local regulations.

















15. GENERAL NOTES ON THE TEST AND TEST PROCEDURE

- This assay was produced and distributed according to the IVD guidelines of 98/79/EC.
- 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 incorrect use.
- All serious incidents occurring in connection with the product must be reported to Immundiagnostik AG and (within the Union market) to the competent reporting authority of the respective member state.
- 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 regarding deficiencies must be logged within 14 days after receipt of the product. The product should be sent to Immundiagnostik AG along with a written complaint.

16. REFERENCES

1. Bregman DB, Morris D, Koch TA, He A, Goodnough LT. Hepcidin levels predict non-responsiveness to oral iron therapy in patients with iron deficiency anemia. *Am J Hematol.* 2013;**88**(2):97-101.
2. Galesloot TE, Vermeulen SH, Geurts-Moespot AJ, et al. Serum hepcidin: reference ranges and biochemical correlates in the general population. *Blood.* 2011;**117**(25):e218-e225.
3. Hershko C, Camaschella C. How I treat unexplained refractory iron deficiency anemia. *Blood.* 2014;**123**(3):326-333.
4. Rochette L, Gudjoncik A, Guenancia C, Zeller M, Cottin Y, Vergely C. The iron-regulatory hormone hepcidin: a possible therapeutic target?. *Pharmacol Ther.* 2015;**146**:35-52.

17. 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

