

**Arbeitsanleitung / Manual**

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

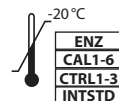
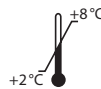
# **IDKmonitor<sup>®</sup> Vedolizumab drug level LC-MS/MS Kit**

*Zur Bestimmung der Konzentration von  
Vedolizumab (z. B. Entyvio<sup>®</sup>) in Serum*

*For the determination of vedolizumab  
concentration (e. g. Entyvio<sup>®</sup>) in serum*

Gültig ab / Valid from 2023-12-12

**REF** **KMR9600**



**RUO**



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

Tel.: +49 6251 70190-0

Fax: + 49 6251 70190-363

e.mail: [info@immundiagnostik.com](mailto:info@immundiagnostik.com)

[www.immundiagnostik.com](http://www.immundiagnostik.com)

## **Sicherheitshinweise**

Der Assay ist ausschließlich nach der dem Kit beigefügten Arbeitsanleitung durchzuführen. Wichtige Sicherheitshinweise zu diesem Produkt sind dem Kapitel 9 zu entnehmen.

# Inhalt

<b>1. ZWECKBESTIMMUNG</b>	<b>2</b>
<b>2. MITGELIEFERTE MATERIALIEN</b>	<b>2</b>
<b>3. BENÖTIGTE MATERIALIEN (IM KIT NICHT ENTHALTEN)</b>	<b>3</b>
<b>4. VORBEREITUNG, LAGERUNG UND STABILITÄT DER REAGENZIEN</b>	<b>3</b>
<i>Lagerung</i>	3
<i>Vorbereitung der Laufmittel</i>	4
<i>Vorbereitung von Kalibratoren und Kontrollen</i>	4
<i>Vorbereitung des Enzyms</i>	4
<i>Vorbereitung des internen Standards</i>	4
<b>5. PROBENVORBEREITUNG</b>	<b>4</b>
<b>6. LC-MS/MS-METHODE</b>	<b>6</b>
<b>7. AUSWERTUNG</b>	<b>6</b>
<b>8. QUALITÄTSKONTROLLE</b>	<b>6</b>
<b>9. VORSICHTSMASSNAHMEN</b>	<b>6</b>
<b>10. ENTSORGUNG</b>	<b>7</b>
<b>11. TECHNISCHE MERKMALE</b>	<b>7</b>
<b>12. ALLGEMEINE HINWEISE ZUM TEST</b>	<b>7</b>
<b>13. SYMBOLE</b>	<b>8</b>

## 1. ZWECKBESTIMMUNG

Die hier beschriebene LC-MS/MS-Applikation ist für die quantitative Bestimmung des humanen  $\alpha_4\beta_7$ -Integrin-Therapieantikörpers Vedolizumab (z.B. Entyvio®) aus Serum geeignet. Dieses Kit ist für den professionellen Einsatz im Labor und nur für Forschungszwecke. Nicht für den Gebrauch in diagnostischen Verfahren.

## 2. MITGELIEFERTE MATERIALIEN

Art.-Nr.	Bezeichnung	Kit-Komponenten	Menge
KMR0001	ACTSOL	Aktivierungslösung	1 x 1,5 ml
KMR0002	RECSOL	Rekonstitutionslösung	1 x 15 ml
KMR9000	COLUMNS	ImmuTube®-Säulen zur Aufreinigung von Vedolizumab	50 Stück
	ELUREAG	Elutionsreagenz	1 x 3 ml
	ENZ	Enzym	5 x 21 µl
	REABUF	Reaktionspuffer	1 x 2 ml
	STOP	Stopplösung	1 x 1 ml
	WASHBUF	Waschpuffer	1 x 55 ml
	WASHSOL	Waschlösung	1 x 30 ml
KMR9600	CAL1–6	Kalibrator 1–6, lyophilisiert (Konzentration siehe Produktspezifikation)	1 Fläschchen (à 200 µl) pro Level
	CTRL1–3	Kontrollen 1–3, lyophilisiert (Konzentration siehe Produktspezifikation)	1 Fläschchen (à 200 µl) pro Level
	INTSTD	Interner Standard	1 x 11 µl
	MOPHAA	Laufmittel A	1 x 250 ml
	MOPHAB	Laufmittel B	1 x 250 ml

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

Folgendes Zubehör kann für die IDKmonitor® Vedolizumab drug level LC-MS/MS-Applikation bei Immundiagnostik AG separat bestellt werden:

- Tuninglösung für den Analyten (KMR9600TU)
- Tuninglösung für den internen Standard (KMR9600TS)
- UPLC-Säule (KMR9600SP)

- In-Line Filter (KMR9600IF)
- In-Line Filterhalter (KMR9600IH)

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

### 3. BENÖTIGTE MATERIALIEN (IM KIT NICHT ENTHALTEN)

- Präzisionspipetten und Einmalpipettenspitzen mit variablen Volumina von 10–1 000 µl
- 1,5 ml und 2 ml Reaktionsgefäße (Immundiagnostik AG empfiehlt Protein LoBind Tubes von Eppendorf)
- Multistepper
- Zentrifuge, 1 000 g
- Vortex-Mixer
- Laborübliche Plastikröhrchen (Einmalartikel)
- Thermoblock, aufheizbar bis mindestens 70 °C
- Überkopfschüttler für Reaktionsgefäße
- LC-MS/MS-Anlage

### 4. VORBEREITUNG, LAGERUNG UND STABILITÄT DER REAGENZIEN

Bitte achten Sie bei mehrfachem Einsatz des Kits darauf, dass die Reagenzien wie in der Vorschrift beschrieben gelagert und nur die für den jeweiligen Ansatz benötigten Reagenzienmengen frisch angesetzt werden.

Reagenzien mit einem Volumen kleiner 100 µl sollten vor Gebrauch kurz anzentrifugiert werden, um Volumenverluste zu vermeiden.

#### *Lagerung*

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

**Achtung:** Die Matrix der COLUMNS darf nicht trocken laufen.

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

### *Vorbereitung der Laufmittel*

MOPHAA und MOPHAB müssen vor Gebrauch mit 0,5 ml ACTSOL versetzt und im Ultraschall-Bad für 15 min beschallt werden.

**Achtung:** ACTSOL wenn möglich mit einer Glaspipette pipettieren. Die ACTSOL muss unter dem Abzug zugesetzt werden. Alle zu verwendenden Gefäße müssen absolut sauber, frei von Detergenzien und vorzugsweise aus LC-MS/MS geeignetem Glas oder Plastik sein.

**Hinweis:** Mit ACTSOL versetzte Laufmittel können nach der Aktivierung bei 2–8 °C für 2 Wochen aufbewahrt werden.

### *Vorbereitung von Kalibratoren und Kontrollen*

CAL1–6 und CTRL1–3 werden mit je 200 µl RECSOL rekonstituiert, vorsichtig gemischt und zum Lösen 10 min stehen gelassen.

Vor Gebrauch müssen die rekonstituierten CAL1–6 und die CTRL1–3 1:10 mit WASHSOL verdünnt werden (z.B. 10 µl CAL und 90 µl WASHSOL). Für die Testdurchführung wird 50 µl je Level benötigt.

**Hinweis:** Die rekonstituierten CAL1–6 und CTRL1–3 sind 10 Tage lang bei 4 °C stabil.

### *Vorbereitung des Enzyms*

Das ENZ darf erst zur Testdurchführung (s. Schritt 8.) aufgetaut und mit 84 µl WASHSOL verdünnt werden. Ein Aliquot (à 21 µl) reicht für 10 Aufarbeitungen.

**Hinweis:** Das fertig verdünnte ENZ ist nicht stabil und kann nicht gelagert werden.

### *Vorbereitung des internen Standards*

Der INTSTD wird kurz anzentrifugiert und in dem Reaktionsgefäß des INTSTD mit 1 089 µl WASHBUF verdünnt.

**Hinweis:** Der verdünnte INTSTD ist 7 Tage lang bei 4 °C stabil.

## **5. PROBENVORBEREITUNG**

Als Probe eignet sich Serum.

Die Proben müssen vor Benutzung 1:10 mit WASHSOL verdünnt werden (z.B. 10 µl Probe und 90 µl WASHSOL). Für die Testdurchführung werden 50 µl je verdünnter Probe benötigt.

Qualitätskontrollen sollten immer mitgemessen werden.

Im Test dürfen nur Reagenzien und Proben verwendet werden, die Raumtemperatur (18–26 °C) aufweisen - Ausnahme: das Enzym ENZ. Vor Gebrauch Reagenzien, Lösungen und Proben kurz vortexen.

1.	COLUMNS in einen geeigneten Ständer stellen und sicherstellen, dass die enthaltene Suspension nicht im Deckel verbleibt. COLUMNS beschriften.
2.	Den Deckel der COLUMNS abdrehen und den Auslass durch das Abbrechen des Endstücks an der Sollbruchstelle öffnen. Das Endstück <u>nicht</u> verwerfen. COLUMNS in 2 ml Reaktionsgefäße setzen. 100 µl WASHBUF zugeben und ca. 30 s bei 1 000 g zentrifugieren; den Durchlauf verwerfen. Diesen Waschschrift (2.) insgesamt zweimal durchführen.
3.	150 µl WASHBUF in die COLUMNS vorlegen. Den Auslass der COLUMNS durch umgekehrtes Anbringen des Endstücks wieder verschließen. 20 µl verdünnten INTSTD zugeben. 50 µl verdünnter CAL, verdünnte CTRL oder verdünnte Probe dazu pipettieren und die COLUMNS verschließen (Deckel zudrehen).
4.	Langsame "Mixing-Rotation" (end-over-end Rotation) für 1 h bei Raumtemperatur. Nach Ende der Inkubation die Säulen kurz anzentrifugieren, um Matrixreste aus dem Deckel zu sammeln.
5.	Den Deckel der COLUMNS abschrauben und den Auslass wieder öffnen. COLUMNS in Reaktionsgefäße setzen, 30 s bei 1 000 g zentrifugieren. 150 µl WASHBUF zugeben und 30 s bei 1 000 g zentrifugieren; den Durchlauf verwerfen. Diesen Waschschrift mit WASHBUF insgesamt zweimal durchführen.
6.	150 µl WASHSOL zugeben und 30 s bei 1 000 g zentrifugieren; den Durchlauf verwerfen. Die COLUMNS dürfen nicht zu lange trocken stehen. Diesen Waschschrift mit WASHSOL insgesamt zweimal durchführen.
7.	COLUMNS in neue, bereits beschriftete 1,5 ml-Reaktionsgefäße einsetzen. 40 µl ELUREAG auf die Matrix pipettieren und 30–60 s bei 1 000 g zentrifugieren bis die Matrix komplett getrocknet ist. Die COLUMNS verwerfen.
8.	Zugabe von 20 µl REABUF zu dem Eluat.

9.	Die benötigte Menge an ENZ-Aliquots auf Raumtemperatur bringen und mit 84 µl WASHSOL verdünnen. Zugabe von 10 µl verdünnter ENZ in die Reaktionsgefäße.
10.	Inkubation für 90 min bei 70°C und 1000 rpm agitierend in einem Thermoblock.
11.	Reaktionsgefäße auf Raumtemperatur abkühlen lassen und vor dem nächsten Schritt kurz anzentrifugieren.
12.	Zugabe von 10 µl STOP.
13.	Überführung in ein für den Autosampler geeignetes LC-MS-Vial/96-Well-Platte und Injektion in das LC-MS/MS-System (s. <i>Application Note</i> ).

## 6. LC-MS/MS-METHODE

Bitte entnehmen Sie die Parameter zur Einstellung der LC-MS/MS-Methode der *Application Note* oder wenden Sie sich an [lcms@immundiagnostik.com](mailto:lcms@immundiagnostik.com).

## 7. AUSWERTUNG

Als Modell zur Auswertung wird die lineare Regression verwendet. Zwischen den sechs Kalibratorkonzentrationen wird eine Gerade gelegt (Gewichtungsfaktor: 1/x). Anhand der Peakfläche wird dann die Konzentration der Proben und Kontrollen bestimmt.

## 8. QUALITÄTSKONTROLLE

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

## 9. VORSICHTSMASSNAHMEN

- 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.



- Reagenzien dieser Testpackung enthalten organische Lösungsmittel. Berührungen mit der Haut oder den Schleimhäuten sind zu vermeiden.
- 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.

## 10. ENTSORGUNG

MOPHAA, MOPHAB und ACTSOL müssen als halogenfreier Lösungsmittelabfall; ELUREAG und STOP als halogenhaltiger Lösungsmittelabfall entsorgt werden.

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

## 11. 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 für die angegebene Anzahl an Testdurchführungen ausgelegt. Ein bereits verwendeter Anteil der Komponenten darf nicht wiederverwendet werden.

## 12. ALLGEMEINE HINWEISE ZUM TEST

- Alle im Kit enthaltenen Reagenzien dürfen ausschließlich zu Forschungszwecken verwendet werden. Nicht für den Gebrauch in der *in-vitro*-Diagnostik.
- Für die Qualitätskontrolle sind die für Laboratorien erstellten Richtlinien zu beachten.
- IDKmonitor® und ImmuTube® sind Marken der Immundiagnostik AG.

- Schwerwiegende Vorkommnisse sind der Immundiagnostik AG und den nationalen Aufsichtsbehörden zu melden.
- Die Testcharakteristika wie Inkubationszeiten, Inkubationstemperaturen und Pipettierolumina 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.
- 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.

### 13. SYMBOLE

	Temperaturbegrenzung		Bestellnummer
	Nur für Forschungszwecke		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**

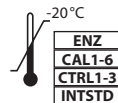
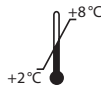
# **IDKmonitor<sup>®</sup> Vedolizumab drug level LC-MS/MS Kit**

*For the determination of  
vedolizumab concentration (e. g. Entyvio<sup>®</sup>) in serum*

Valid from 2023-12-12

**REF**

**KMR9600**



**RUO**



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

Tel.: +49 6251 70190-0

Fax: + 49 6251 70190-363

e.mail: [info@immundiagnostik.com](mailto:info@immundiagnostik.com)

[www.immundiagnostik.com](http://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 9.

## Table of Contents

<b>1. INTENDED PURPOSE</b>	<b>12</b>
<b>2. MATERIALS PROVIDED</b>	<b>12</b>
<b>3. MATERIAL REQUIRED BUT NOT SUPPLIED</b>	<b>13</b>
<b>4. PREPARATION, STORAGE AND STABILITY OF REAGENTS</b>	<b>13</b>
<i>Preparation of mobile phases</i>	13
<i>Preparation of calibrators and controls</i>	14
<i>Preparation of enzyme</i>	14
<i>Preparation of internal standard</i>	14
<b>5. SAMPLE PREPARATION</b>	<b>14</b>
<b>6. LC-MS/MS METHOD</b>	<b>16</b>
<b>7. EVALUATION</b>	<b>16</b>
<b>8. QUALITY CONTROL</b>	<b>16</b>
<b>9. PRECAUTIONS</b>	<b>16</b>
<b>10. DISPOSAL</b>	<b>16</b>
<b>11. TECHNICAL HINTS</b>	<b>17</b>
<b>12. GENERAL NOTES ON THE TEST AND TEST PROCEDURE</b>	<b>17</b>
<b>13. SYMBOL EXPLANATION</b>	<b>18</b>

## 1. INTENDED PURPOSE

This LC-MS/MS application is intended for the quantitative determination of human  $\alpha_4\beta_7$  integrin therapeutic antibody vedolizumab (e.g. Entyvio®) in serum. This kit is designed for laboratory professional and research use only. Not for use in diagnostic procedures.

## 2. MATERIALS PROVIDED

Cat. No.	Label	Kit components	Quantity
KMR0001	ACTSOL	Activation solution	1 x 1.5 ml
KMR0002	RECSOL	Reconstitution solution	1 x 15 ml
KMR9000	COLUMNS	ImmuTube®-columns for extraction of vedolizumab	50 pieces
	ELUREAG	Elution reagent	1 x 3 ml
	ENZ	Enzyme	5 x 21 µl
	REABUF	Reaction buffer	1 x 2 ml
	STOP	Stop solution	1 x 1 ml
	WASHBUF	Wash buffer	1 x 55 ml
	WASHSOL	Wash solution	1 x 30 ml
KMR9600	CAL1–6	Calibrators 1–6; lyophilised (see product specification for concentration)	1 vial (à 200 µl) per level
	CTRL1–3	Controls 1–3; lyophilised (see product specification for concentration)	1 vial (à 200 µl) per level
	INTSTD	Internal standard	1 x 11 µl
	MOPHAA	Mobile phase A	1 x 250 ml
	MOPHAB	Mobile phase B	1 x 250 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 IDKmonitor® Vedolizumab drug level LC-MS/MS extraction kit can be ordered separately at Immundiagnostik AG:

- tuning solution for the analyte (KMR9600TU)
- tuning solution for the internal standard (KMR9600TS)

- UPLC column (KMR9600SP)
- in-line filter (KMR9600IF)
- in-line filter holder (KMR9600IH)

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

### 3. MATERIAL REQUIRED BUT NOT SUPPLIED

- Calibrated precision pipettes and 10–1 000 µl tips
- 1.5 ml and 2 ml reaction tubes (Immundiagnostik AG recommends Protein LoBind Tubes from Eppendorf)
- Multistepper
- Centrifuge, 1 000 g
- Vortex
- Standard single-use laboratory plastic vials, cups, etc.
- Thermal block, heatable to at least 70 °C
- Overhead rotator for reaction tubes
- LC-MS/MS equipment

### 4. PREPARATION, STORAGE AND STABILITY OF REAGENTS

To run the assay multiple times, ensure that the reagents are stored at the conditions stated on the label. Prepare only the amount required for each run.

Reagents with a volume less than 100 µl should be centrifuged before use to avoid loss of volume.

#### *Storage*

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

**Attention:** The matrix of the COLUMNS must not run dry.

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

#### *Preparation of mobile phases*

MOPHAA and MOPHAB have to be activated with 0.5 ml ACTSOL before use and sonicated in the ultrasonic bath for 15 min.

**Attention:** If possible, use glass pipettes to pipet ACTSOL. The ACTSOL must be added under the fume hood. All used vials must be absolutely clean, detergent-free and preferably made of glass or plastic suitable for LC-MS/MS.

**Note:** Mobile phases spiked with activation reagent can be stored up to 2 weeks in a closed flask at 2–8°C.

### *Preparation of calibrators and controls*

CAL1–6 and CTRL1–3 have to be reconstituted with 200 µl RECSOL each. Mix the vial content thoroughly and allow it to dissolve for 10 minutes to ensure complete reconstitution.

Reconstituted CAL1–6 and CTRL1–3 have to be diluted 1:10 with WASHSOL prior to use (e.g. 10 µl CAL and 90 µl WASHSOL). 50 µl diluted sample will be needed per sample preparation.

**Note:** The reconstituted CAL1–6 and CTRL1–3 are stable up to 10 days at 4°C.

### *Preparation of enzyme*

ENZ should be thawed and diluted with 84 µl WASHSOL just before the assay is performed (see step 8.). One aliquot (à 21 µl) is sufficient for 10 samples.

**Note:** The diluted ENZ is not stable and cannot be stored.

### *Preparation of internal standard*

The INTSTD is briefly centrifuged and diluted with 1 089 µl WASHBUF in the reaction tube of the INTSTD.

**Note:** The diluted INTSTD is stable for 7 days at 4°C.

## 5. SAMPLE PREPARATION

This assay is intended for serum samples only.

The samples must be diluted 1:10 with WASHSOL before use (e.g. 10 µl sample and 90 µl WASHSOL). For the test procedure 50 µl per diluted sample are required.

Quality control samples should be analysed with each run.

Reagents and samples should be used at room temperature (18–26 °C) - Exception: the enzyme (ENZ). Vortex samples, solutions and reagents before use.

- |    |   |
|----|---|
| 1. | Place the COLUMNS into an appropriate rack. Assure that the included suspension does not stick to the lid. Label the COLUMNS. |
|----|---|



2.	<p>Unscrew the lids of the COLUMNS and open the outlet by breaking the endpiece at the predetermined breaking point. Do <u>not</u> discard the endpiece. Put the COLUMNS into 2 ml reaction tubes.</p> <p>Add 150 µl WASHBUF and centrifuge for 30s at 1000g; discard the flowthrough. Carry out this wash step (2.) two times in total.</p>
3.	<p>Add 100 µl WASHSOL into the COLUMNS. Close the COLUMNS firmly by recapping the outlet with the endpiece in reversed orientation.</p> <p>Add 20 µl diluted INTSTD.</p> <p>Add 50 µl diluted CAL, diluted CTRL or diluted sample. Close the COLUMNS by screwing the lid.</p>
4.	<p>Mix for 1 h by slow end-over-end rotation at room temperature. After the incubation, shortly centrifuge the columns to collect matrix remains in the lid.</p>
5.	<p>Unscrew the lid of the COLUMNS and open the outlet. Put the COLUMNS into plastic reaction tubes and centrifuge for 30s at 1000g.</p> <p>Add 150 µl WASHBUF and centrifuge for 30s at 1000g; discard the flowthrough. Carry out this wash step with WASHBUF (5.) two times in total.</p>
6.	<p>Add 150 µl WASHSOL and centrifuge for 30s at 1000g; discard the flowthrough. The COLUMNS should not stand dry for too long.</p> <p>Carry out this wash step with WASHSOL (6.) two times in total.</p>
7.	<p>Place COLUMNS in already labelled new 1.5 ml reaction tubes.</p> <p>Add 40 µl ELUREAG to the matrix, centrifuge for 30–60s at 1000g until the matrix is completely dry. Discard the COLUMNS.</p>
8.	<p>Add 20 µl REABUF to the eluate.</p>
9.	<p>Thaw the required amount of ENZ aliquots and dilute with 84 µl WASHSOL. Add 10 µl diluted ENZ to the reaction tubes.</p>
10.	<p>Incubation for 90 min at 70 °C and 1 000 rpm agitating in a thermoblock.</p>
11.	<p>Allow reaction tubes to cool down to room temperature and centrifuge briefly before the next step.</p>
12.	<p>Add 10 µl STOP.</p>
13.	<p>Transfer to an LC-MS vial/96-well plate suitable for the autosampler and inject into the LC-MS/MS system (see application note).</p>

## 6. LC-MS/MS METHOD

Please refer to the application note or contact [lcms@immundiagnostik.com](mailto:lcms@immundiagnostik.com) for the LC-MS/MS method parameters.

## 7. EVALUATION

Linear regression is used as model for the evaluation of the results. The six calibrator concentration points are connected by a straight line (weighting factor:  $1/x$ ). The peak area is used to determine the concentration of the samples and controls.

## 8. QUALITY CONTROL

Control samples should be analysed with each run. The results of the control samples are used to confirm the accuracy of the method. The test results may not be valid if one or more values of the quality control sample are outside the acceptable limits (see product specification) within the same assay.

## 9. PRECAUTIONS

- Human materials used in kit components were tested and found to be negative for HIV, Hepatitis B and Hepatitis C. Still, 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. Avoid contact with skin or mucous membranes.

## 10. DISPOSAL

- MOPHAA, MOPHAB and ACTSOL have to be disposed as non-halogenated solvents, ELUREAG and STOP as halogenated solvents. CAL1–6 and CTRL1–3 should be disposed as potentially infectious material in accordance with local regulations.

















## 11. TECHNICAL HINTS

- Do not interchange different lot numbers of any kit component within the same assay.
- 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.
- Do not mix plugs and caps from different reagents.
- The individual components of the kit are designed for the specified number of test runs. Any part of the components that has already been used must not be reused.

## 12. GENERAL NOTES ON THE TEST AND TEST PROCEDURE

- All reagents in the kit package are for research use only. Not for use in diagnostic procedures.
- The guidelines for laboratories should be followed.
- *IDKmonitor*® and *ImmuTube*® are trademarks of Immundiagnostik AG.
- 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.
- 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 regarding deficiencies must be lodged within 14 days after receipt of the product. The product should be send to Immundiagnostik AG along with a written complaint.

### 13. SYMBOL EXPLANATION

	Temperature limitation		Catalogue number
	For research use only		To be used with
	Manufacturer		Content 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](mailto:info@immundiagnostik.com)

[www.immundiagnostik.com](http://www.immundiagnostik.com)

