

1,25-(OH)₂-Vitamin D₃/D₂ IDKenhance[®] ImmuTube[®] LC-MS/MS Kit

*Zur Bestimmung von 1,25-(OH)₂-Vitamin D₃/D₂
in Plasma und Serum*

*For the determination of 1,25-(OH)₂-vitamin D₃/D₂
in plasma and serum*

Gültig ab / Valid from 2023-05-08

REF KM1002

Σ
50

+2°C
+8°C

-20°C
CAL1-6
CTRL1-3
INTSTD
DER

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	4
4. BENÖTIGTE MATERIALIEN (IM KIT NICHT ENTHALTEN)	4
5. VORBEREITUNG UND LAGERUNG DER REAGENZIEN	5
<i>Lagerung</i>	5
<i>Vorbereitung der Laufmittel und Testreagenzien</i>	5
<i>Vorbereitung des internen Standards</i>	6
<i>Vorbereitung Kalibratoren und Kontrollen</i>	6
6. PROBENVORBEREITUNG	6
7. LC-MS/MS-METHODE	8
8. AUSWERTUNG	8
9. MUSTERCHROMATOGRAMME	8
<i>Kalibrator</i>	8
<i>Realprobe</i>	9
<i>Blankprobe</i>	10
10. QUALITÄTSKONTROLLE	11
<i>Normbereich (Plasma oder Serum)</i>	11
11. TESTCHARAKTERISTIKA	12
<i>Richtigkeit</i>	12
<i>Präzision</i>	12
<i>Untere Bestimmungsgrenze (LLOQ)</i>	12
12. VORSICHTSMASSNAHMEN	13
13. ENTSORGUNG	13
14. TECHNISCHE MERKMALE	13
15. ALLGEMEINE HINWEISE ZUM TEST	14

1. VERWENDUNGSZWECK

Der 1,25-(OH)₂-Vitamin D₃/D₂ IDKenhance® ImmuTube® LC-MS/MS Kit ist ein *In-vitro*-Diagnostikum zur quantitativen Bestimmung von 1,25-(OH)₂-Vitamin D₃ und 1,25-(OH)₂-Vitamin D₂ in Serum und Plasma mittels LC-MS/MS nach vorheriger Immunaффinitätsanreicherung (ImmuTube®) und Derivatisierung (IDKenhance®). Der Kit ist für den manuellen Gebrauch durch professionelles Laborpersonal bestimmt. Er dient zur Ermittlung der Vitamin-D-Metaboliten-Zusammensetzung bei Patienten mit vermuteten Beeinträchtigungen des Vitamin-D Metabolismus. Dadurch kann er als Unterstützung bei der differenzierten Beurteilung des Vitamin-D-Status, auch im Rahmen einer Therapie von Vitamin-D-Mangel mittels Vitamin-D-Supplementierung, eingesetzt werden.

2. EINLEITUNG

Vitamin D wird entweder in der Haut (unter Einfluss von UV-Licht) gebildet oder aus der Nahrung aufgenommen. In der Leber entsteht die Speicherform des Vitamin D, das 25-OH-Vitamin D. In der Niere wird in einem zweiten Hydroxylierungsschritt die Hormonform des Vitamin D, das 1,25-(OH)₂-Vitamin D (D-Hormon) gebildet. Das dafür verantwortliche Enzym, die 1α-Hydroxylase der Niere, unterliegt einer strengen Kontrolle durch Hormone (insbesondere Parathormon) und wird in seiner Aktivität auch durch die Serumkonzentrationen von Calcium und Phosphat beeinflusst.

Die Serumkonzentration von 1,25-(OH)₂-Vitamin D richtet sich also normalerweise nach den Erfordernissen des Stoffwechsels. Abweichungen der 1,25-(OH)₂-Vitamin-D-Konzentration von der Norm müssen also immer im Kontext mit den übrigen Parametern des Calciumstoffwechsels interpretiert werden. Erst bei ausgeprägtem Vitamin-D-Mangel wird auch die Serumkonzentration von 1,25-(OH)₂-Vitamin D absinken. Zur Diagnostik des Vitamin-D-Mangels sollte man deshalb den Vorläufermetaboliten, das 25-(OH)-Vitamin D messen.

Ursachen für einen Mangel an 1,25-(OH)₂-Vitamin D können jedoch Metabolisierungsstörungen entweder aufgrund genetischer Defekte der 1α-Hydroxylase (selten) oder aufgrund von Nierenfunktionsstörungen (häufiger) auftreten. Bereits bei leicht eingeschränkter Nierenfunktion kommt es zu einem Abfall der 1,25-(OH)₂-Vitamin-D-Konzentration.

Da 1,25-(OH)₂-Vitamin D wichtige Funktionen im Calciumstoffwechsel innehat und insbesondere auch die Parathormonsekretion in den Nebenschilddrüsen supprimiert, kommt es mit zunehmender Niereninsuffizienz zur Ausbildung der renalen Osteopathie, die durch Mineralisierungsstörungen (Osteomalazie) und fibröse Veränderungen (Osteitis fibrosa) gekennzeichnet ist.

Die Behandlung der renalen Osteopathie besteht in der Gabe von 1,25-(OH)₂-Vitamin D (Calcitriol) oder des Prohormons 1α-Hydroxyvitamin D. Erniedrigte oder relativ niedrige 1,25-(OH)₂-Vitamin-D-Spiegel findet man bei renalen Tubulusfunktionsstörungen (z.B. Phosphatdiabetes, Fanconi-Syndrom). Eine unphysiologische Überproduktion von 1,25-(OH)₂-Vitamin D tritt bei granulomatösen Systemerkrankungen (z.B. Sarkoidose) auf, wo eine extrarenale 1,25-(OH)₂-Vitamin-D-Synthese stattfindet. Diese kann zur Hypercalciämie führen. Auch bei der idiopathischen Hypercalciurie findet man relativ hohe 1,25-Dihydroxyvitamin-D-Spiegel. Erhöhte 1,25-(OH)₂-Vitamin-D-Konzentrationen wurden des Weiteren in folgenden Fällen ermittelt: bei Störungen des Vitamin-D-Rezeptors (selten), bei calciumarmer Ernährung sowie bei Parathormonüberschuss (primärer Hyperparathyreoidismus) und bei manchen Tumorarten (infolge der Sekretion von parathormonähnlichem Peptid, PTHrP).

Zur Vitamin-D-Supplementierung werden zwei verschiedene Formen kommerziell angeboten: Ergocalciferol (Vitamin D₂) und Cholecalciferol (Vitamin D₃). Offiziell betrachten die Pharmakopöen diese zwei Formen als äquivalent und austauschbar, aufgrund von Studien zur Rachitisprävention bei Kindern. Die 1,25-(OH)₂-Vitamin-D₃/D₂-Bestimmung dient als Maßstab für den 1,25-(OH)₂-Vitamin-D-Status und liefert objektive, quantitative Information über die biologische Antwort auf die Einnahme von Vitamin-D-Präparaten.

Indikationen

- Nierenfunktionsstörungen
Chronische Niereninsuffizienz
Hämodialyse nach Nierentransplantation
- Renale Osteopathie
- Osteomalazie bei gestörtem Vitamin D-Metabolismus ausgelöst durch viele verschiedene Erkrankungen
- Nierentubulusfunktionsstörungen (Phosphatdiabetes, Fanconi-Syndrom)
- Überwachung einer Therapie mit aktiven Vitamin D-Metaboliten
- Ideopathische Hypercalciurie
- Hyperkalzämie

3. MITGELIEFERTE MATERIALIEN

Art.-Nr.	Bezeichnung	Kit-Komponenten	Menge
KM0002	RECSOL	Rekonstitutionslösung	2 x 15 ml
KM0003	WASHSOL	Waschlösung	1 x 80 ml
KM1000	INTSTD	Interner Standard	1 x 600 µl
	MOPHAB	Laufmittel B	1 x 500 ml
	SOLA	Lösung A	1 x 25 ml
KM1002	DER	Derivatisierungsreagenz	1 x 3 ml
	CAL	Kalibratoren 1–6; lyophilisiert (Konzentration siehe Produktspezifikation)	Je 2 Fläschchen (à 600 µl) pro Level
	CTRL	Kontrollen 1–3; lyophilisiert (Konzentration siehe Produktspezifikation)	Je 3 Fläschchen (à 600 µl) pro Level
	STOP	Stopplösung	1 x 1,5 ml
	ACTREAG	Aktivierungsreagenz	1 x 2,5 ml
	MOPHAA	Laufmittel A	1 x 500 ml
KM1100	COLUMNS	ImmuTube®-Säulen zur Extraktion des 1,25-(OH) ₂ -Vitamin D ₃ /D ₂	1 x 50 Stück
	ELUSOL	Elutionslösung	1 x 15 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 1,25-(OH)₂-Vitamin D₃/D₂ IDKenhance® ImmuTube® LC-MS/MS-Applikation benötigt (nicht im Kit enthalten):

- Glasröhrchen (Innendurchmesser 10 mm)
- Präzisionspipetten und Einmalpipettenspitzen mit variablen Volumina von 10–1 000 µl
- Zentrifuge, 10 000 g für 1,5-ml-Eppendorfreaktionsgefäße bzw. 550 g für Reagenzgefäße
- Vortex-Mixer

- Vakuumzentrifuge oder Stickstoffverteiler
- Laborübliche Plastikröhrchen (Innendurchmesser 10 mm, Einmalartikel)
- Überkopfschüttler
- LC-MS/MS-System
- LC-MS-Vials oder 96-Well-Platte für den Autosampler

Folgendes Zubehör kann unter anderem für die 1,25-(OH)₂-Vitamin D₃/D₂ IDKenhance® ImmuTube® LC-MS/MS-Applikation bei Immundiagnostik AG separat bestellt werden:

- Tuninglösung für 1,25-(OH)₂-Vitamin D₃/D₂ (KM1002TU)
- Tuninglösung für den internen Standard (KM1002TS)
- 1,25-(OH)₂-Vitamin D₃/D₂ IDKenhance® ImmuTube® LC-MS/MS Extraktionskit (KM1102)
- UPLC-Säule (KM1002SP)
- In-Line Filter (KM1000IF)
- In-Line Filterhalter (KM1000IH)

Bitte fordern Sie unsere Einzelkomponentenpreisliste an.

Immundiagnostik AG bietet für die 1,25-(OH)₂-Vitamin D₃/D₂ LC-MS/MS-Applikation weitere Optionen zur Derivatisierung und Probenvorbereitung an. Bitte sprechen Sie uns für Ihre individuelle Lösung an.

5. VORBEREITUNG UND LAGERUNG DER REAGENZIEN

Lagerung

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

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) und die Lösung A (SOLA) müssen vor Gebrauch mit Aktivierungsreagenz (ACTREAG) aktiviert werden, siehe folgende Tabelle:

Komponente			ACTREAG
Bezeichnung	[ml]		[µl]
Laufmittel (MOPHAA und MOPHAB)	500	+	500
Lösung A (SOLA)	25		25

Die aktivierten Laufmittel sollten vor Verwendung entgast werden.

Hinweis: Nach Aktivierung mit dem Aktivierungsreagenz (ACTREAG) sind die Laufmittel (MOPHAA und MOPHAB) und Lösung A (SOLA) noch 2 Wochen verwendbar. Es wird daher empfohlen, nur soviel herzustellen wie für den Testansatz benötigt wird.

Achtung: Das Aktivierungsreagenz (ACTREAG) muss unter dem Abzug zugesetzt werden. Alle zu verwendenden Gefäße müssen absolut sauber und detergentienfrei sein und vorzugsweise aus LC-MS/MS geeignetem Glas.

Vorbereitung des internen Standards

Das Konzentrat des internen Standards (INTSTD) wird unmittelbar vor Gebrauch mit Rekonstitutionslösung (RECSOL) im Verhältnis 1:5 verdünnt (z. B. 0,6 ml INTSTD mit 2,4 ml RECSOL). Es wird empfohlen, nur so viel herzustellen wie für den Testansatz benötigt wird (50 µl pro Probe).

Vorbereitung Kalibratoren und Kontrollen

Die Kalibratoren (CAL1–6) und die Kontrollen (CTRL1–3) werden in je 600 µl Rekonstitutionslösung (RECSOL) bei 30 s vortexen gelöst.

Die Konzentration der Kalibratoren (CAL1–6) und Kontrollen (1–3) ändert sich geringfügig von Charge zu Charge; der genaue Gehalt ist in der Produktspezifikation angegeben.

6. PROBENVORBEREITUNG

Als Probe eignet sich Serum und Plasma.

Proben müssen vor dem Einsatz zentrifugiert werden (mind. 5 min bei 10 000 g).

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.

1.	ImmuTubes® vorsichtig vortexen und kurz zentrifugieren (30s bei 500–1000rpm), damit die enthaltene Suspension nicht im Deckel verbleibt.
2.	ImmuTubes® beschriften, öffnen, 500 µl Kalibrator (CAL), Kontrolle (CTRL) oder Probe zügig hinzu pipettieren.
3.	Anschließend 50 µl verdünnten interner Standard (INTSTD verdünnt mit RECSOL) in jedes ImmuTube® pipettieren, ImmuTubes® verschließen und den Inhalt vorsichtig mischen.
4.	Inkubation für 1 h bei Raumtemperatur im Überkopfschüttler (15–30 rpm).
5.	Verschlossene ImmuTubes® in Plastikröhrchen setzen, 2 min bei 550g zentrifugieren, damit keine Suspension im Deckel verbleibt.
6.	ImmuTubes® am Auslass öffnen, dann den Deckel abschrauben und 2 min bei 550g bis zum Eintrocknen zentrifugieren; den Durchlauf verwerfen.
7.	500 µl Waschlösung (WASHSOL) hinzu pipettieren und 2 min bei 550g bis zum Eintrocknen zentrifugieren; den Durchlauf verwerfen. Diesen Waschschrift insgesamt dreimal durchführen.
8.	Unbenutzte Glasröhrchen beschriften, ImmuTubes® in die Glasröhrchen setzen.
9.	250 µl Elutionslösung (ELUSOL) hinzu pipettieren, 2 min bei 550g zentrifugieren und das Eluat mit den Analyten in den Glasröhrchen sammeln.
10.	Das Eluat unter Stickstoffstrom bei 37 °C oder in einer Vakuumzentrifuge eintrocknen.
11.	50 µl Derivatisierungslösung (DER) in jedes Glasröhrchen pipettieren und für 1 h bei 1200 rpm auf einem Schüttler im Dunkeln inkubieren (Achtung: Reaktion ist lichtsensitiv).
12.	25 µl Stopplösung (STOP) in jedes Glasröhrchen pipettieren und für 2 min bei 1200 rpm auf einem Schüttler inkubieren.
13.	Die Lösung unter Stickstoffstrom bei 37 °C oder in einer Vakuumzentrifuge eintrocknen.

14.	Den Rückstand in 175 µl aktivierter Lösung A (SOLA) durch 1 min Schütteln bei 1200 rpm lösen und anschließend in ein geeignetes LC-MS-Probenvial oder 96-Well-Platte für den LC-MS-Autosampler überführen.
15.	Injektion in das LC-MS/MS System (siehe Application Note).

7. 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.

8. AUSWERTUNG

Als Modell zur Auswertung wird die lineare Regression verwendet. Zwischen den Kalibratorkonzentrationen wird eine Gerade gelegt. Anhand dieser können dann die Proben berechnet werden.

9. MUSTERCHROMATOGRAMME

Kalibrator

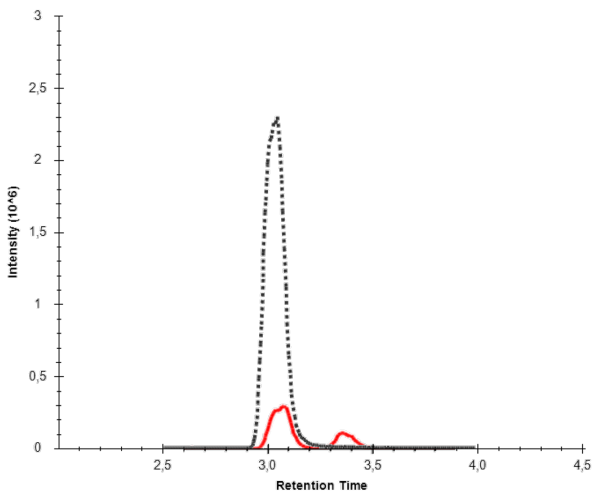


Abb. 1: Chromatogramm (mit einer Waters TQ-XS LC-MS/MS aufgenommen) für den internen Standard (gestrichelt) und den Analyten (durchgängig) von 1,25-(OH)₂-Vitamin D₃ für den Kalibrator 3.

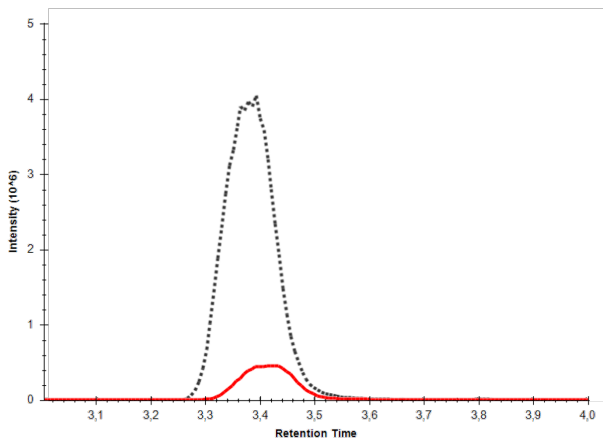


Abb. 2: Chromatogramm (mit einer Waters TQ-XS LC-MS/MS aufgenommen) für den internen Standard (gestrichelt) und den Analyten (durchgängig) von 1,25-(OH)₂-Vitamin D₂ für den Kalibrator 3.

Realprobe

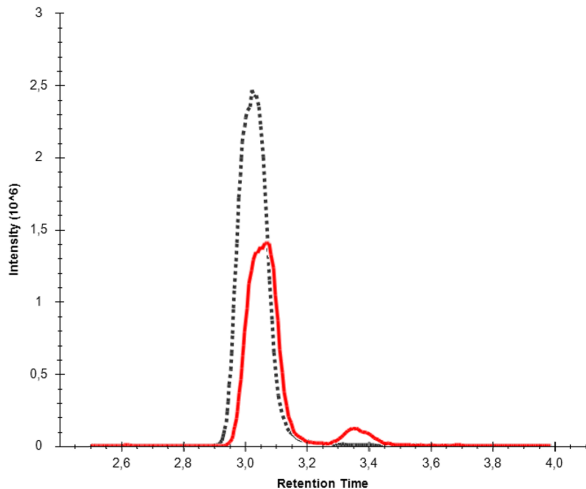


Abb. 3: Chromatogramm (mit einer Waters TQ-XS LC-MS/MS aufgenommen) für den internen Standard (gestrichelt) und den Analyten (durchgängig) von 1,25-(OH)₂-Vitamin D₃ für eine Realprobe (Citratplasma).

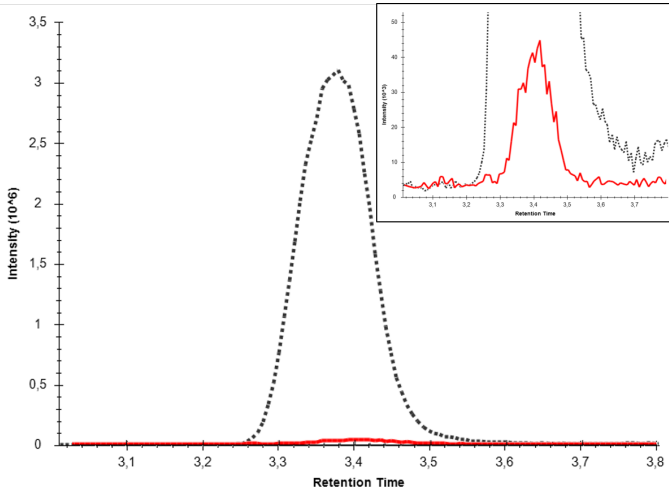


Abb. 4: Chromatogramm (mit einer Waters TQ-XS LC-MS/MS aufgenommen) für den internen Standard (gestrichelt) und den Analyten (durchgängig) von 1,25-(OH)₂-Vitamin D₂ für eine Realprobe (Citratplasma). Das Signal des Analyten ist aufgrund der geringen endogenen Konzentration in der Box vergrößert.

Blankprobe

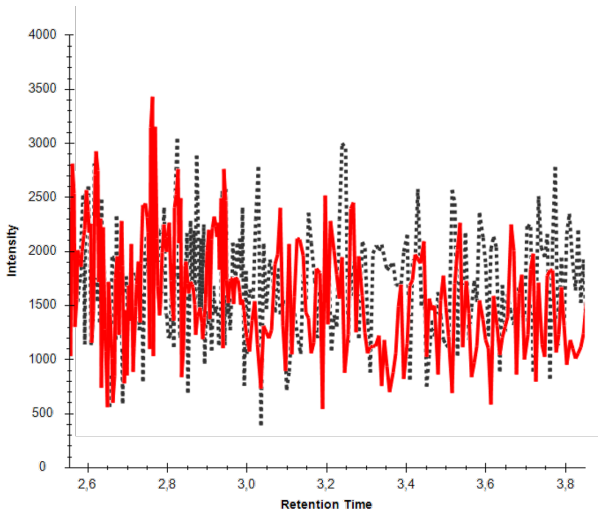


Abb. 5: Chromatogramm (mit einer Waters TQ-XS LC-MS/MS aufgenommen) für den internen Standard (gestrichelt) und den Analyten (durchgängig) von 1,25-(OH)₂-Vitamin D₃ für eine Blankprobe.

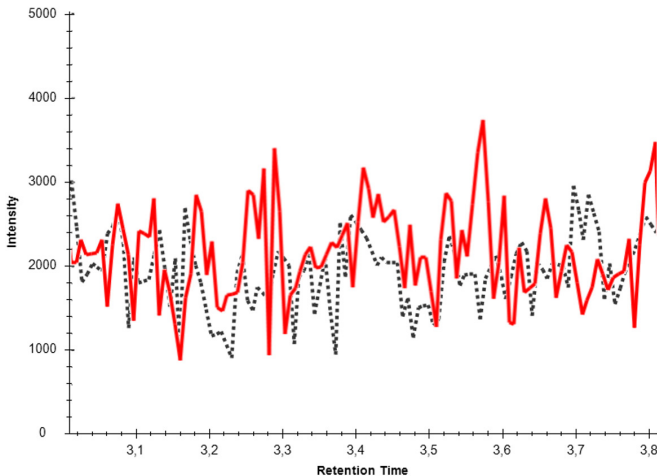


Abb. 6: Chromatogramm (mit einer Waters TQ-XS LC-MS/MS aufgenommen) für den internen Standard (gestrichelt) und den Analyten (durchgängig) von 1,25-(OH)₂-Vitamin D₂ für eine Blankprobe.

10. 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.

Normbereich (Plasma oder Serum)

Gesunde Erwachsene 20–50 Jahre:	17–53 pg/ml
Kinder bis 12 Jahre:	bis zu 40 % höhere Werte
Schwangere (8.–42. Gestationswoche):	bis zu 60 % höhere Werte
Personen über 70 Jahre:	bis zu 40 % niedrigere Werte

Die Produktion von Vitamin D in der Haut ist hoch variabel und abhängig von Jahres- und Tageszeit, Breitengrad, Alter, Sonnenschutz und anderen Faktoren.

Wir empfehlen jedem Labor, einen eigenen Normwertbereich zu etablieren.

11. TESTCHARAKTERISTIKA

Richtigkeit

Die Richtigkeit wurde unter Verwendung eines zertifizierten Referenzmaterials nach bestätigt.

1,25-(OH) ₂ -Vitamin D ₃		1,25-(OH) ₂ -Vitamin D ₂	
[pg/ml]	Abweichung [%]	[pg/ml]	Abweichung [%]
3,0	-6,0	2,0	-0,3
23,8	-1,8	22,8	0,3
40,5	-3,0	39,5	-1,2
57,2	-2,8	56,2	-2,1
78,0	-2,2	77,0	-1,2
103,0	-4,2	102,0	-2,1
128,0	-3,3	127,0	-2,0
253,0	-3,9	252,0	-3,2
503,0	-4,5	502,0	-3,5

Präzision

Die Präzision wurde über neun unabhängige Experimente hinweg bestimmt.

1,25-(OH) ₂ -Vitamin D ₃		1,25-(OH) ₂ -Vitamin D ₂	
[pg/ml]	Variationskoeffizient [%]	[pg/ml]	Variationskoeffizient [%]
15,6	1,6	16,7	1,9
36,7	2,6	36,6	2,5
89,5	2,7	87,8	2,2

Untere Bestimmungsgrenze (LLOQ)

Die untere Bestimmungsgrenze (LLOQ) wurde experimentiell bestätigt (ausreichende Richtigkeit und Präzision):

1,25-(OH)₂-Vitamin D₃: 5,33 pg/ml

1,25-(OH)₂-Vitamin D₂: 6,31 pg/ml

Es muss beachtet werden, dass die Bestimmungsgrenze geräteabhängig variieren kann.

12. VORSICHTSMASSNAHMEN

- Qualitätskontrollen sollten immer mit gemessen 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. Als Vorsichtsmaßnahme wird empfohlen, das verwendete Humanmaterial immer als potentiell infektiös zu betrachten.
- 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.

13. ENTSORGUNG

Laufmittel (MOPHAA, MOPHAB), Lösung A (SOLA), Aktivierungsreagenz (ACTREAG), Derivatisierungsreagenz (DER), Stopplösung (STOP) und Elutionslösung (ELUSOL) müssen als halogenfreier Lösungsmittelabfall entsorgt werden.

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

14. TECHNISCHE MERKMALE

- Reagenzien der Kitpackung dürfen nicht mit anderen Chargen gemischt werden.
- Die Reagenzien dürfen nach Ablauf des Mindesthaltbarkeitsdatums nicht mehr verwendet werden.
- Der Assay 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.

15. ALLGEMEINE HINWEISE ZUM TEST

- Dieser Kit wurde nach der IVD Richtlinie 98/79/EG hergestellt und in den Verkehr gebracht.
- IDKenhance® und ImmuTube® sind Marken der Immundiagnostik AG.
- Alle im Kit enthaltenen Reagenzien dürfen ausschließlich zur *In-vitro*-Diagnostik verwendet werden.
- Für die Qualitätskontrolle sind die für medizinische Laboratorien erstellten Richtlinien zu beachten.
- 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.
- 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, zurück zu senden.

Verwendete Symbole:

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

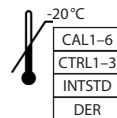
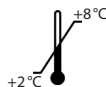
1,25-(OH)₂-Vitamin D₃/D₂ *IDK*enhance[®] ImmuTube[®] LC-MS/MS kit

*For the determination of 1,25-(OH)₂ vitamin D₃/D₂
in plasma and serum*

Valid from 2023-05-08



KM1002



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	19
2. INTRODUCTION	19
3. MATERIAL PROVIDED	20
4. MATERIAL REQUIRED BUT NOT SUPPLIED	21
5. PREPARATION AND STORAGE OF REAGENTS	22
<i>Storage</i>	22
<i>Preparation of the mobile phases and test reagents</i>	22
<i>Preparation of the internal standard</i>	23
<i>Preparation of the calibrators and controls</i>	23
6. SAMPLE PREPARATION	23
7. LC-MS/MS METHOD	24
8. CALCULATION	24
9. EXAMPLES OF CHROMATOGRAMS	25
<i>Calibrator</i>	25
<i>Patient sample</i>	26
<i>Blank sample</i>	27
10. QUALITY CONTROL	28
<i>Normal range (plasma or serum)</i>	28
11. PERFORMANCE CHARACTERISTICS	28
<i>Trueness</i>	28
<i>Precision</i>	29
<i>Lower limit of quantification (LLOQ)</i>	29
12. PRECAUTIONS	29
13. DISPOSAL	29
14. TECHNICAL HINTS	30
15. GENERAL NOTES ON THE TEST	30

1. INTENDED USE

1,25-(OH)₂-Vitamin D₃/D₂ IDKenhance® ImmuTube® LC-MS/MS kit is for the LC-MS/MS based quantification of 1,25-(OH)₂-vitamin D₃ and 1,25-(OH)₂-vitamin D₂ in serum and plasma after immunoaffinity enrichment (ImmuTube®) and derivatization (IDKenhance®). The assay is an *in vitro* diagnostic medical device for manual use by professional laboratory staff in a laboratory environment. It is used for the determination of the vitamin D metabolite composition in patients with suspected impaired vitamin D metabolism. It can thus be used as a support in the differentiated assessment of the vitamin D status, also in the context of a therapy of vitamin D deficiency by supplementation of vitamin D.

2. INTRODUCTION

Vitamin D is either produced in the skin (under the influence of UV light) or taken up from nourishment. The storage type of vitamin D, namely 25-OH-vitamin D, is formed in the liver. The hormone 1,25-(OH)₂-vitamin D (D hormone) is formed in a second hydroxylation step in the kidney. The responsible enzyme, the kidney 1 α -hydroxylase, is subjected to a rigid control through hormones (especially parathyroid hormone) and its activity is influenced by the serum concentrations of calcium and phosphate.

The serum concentration of 1,25-(OH)₂-vitamin D normally re-adjusts itself to the demands of metabolism. Deviations from the normal range of 1,25-(OH)₂-vitamin D must therefore always be interpreted in the context of the remaining parameters of the calcium metabolism. The serum concentration of 1,25-(OH)₂-vitamin D decreases only in seldom cases of vitamin D deficiency. For the diagnosis of vitamin D deficiency the precursor metabolite, 25-OH-vitamin D, should be measured.

The reason for a deficiency of 1,25-(OH)₂-vitamin D can be found in metabolic disturbances, caused either by genetic defects of the enzyme 1 α -hydroxylase (rare) or kidney malfunctions (more common). Even a slightly impaired kidney function can lead to a decrease of the 1,25-(OH)₂-vitamin D concentration.

Since 1,25-(OH)₂-vitamin D has important functions in calcium metabolism as well as supplementing secretion of parathyroid hormone from the parathyroid glands, increasing kidney malfunctioning leads to development of renal osteopathy, which is characterised by osteomalacia and osteitis fibrosa.

Treatment of renal osteopathy consists of the administration of 1,25-(OH)₂-vitamin D (calcitriol) or the prohormone 1 α -hydroxy vitamin D. In renal tubules malfunctions decreased or relatively low levels of 1,25-(OH)₂-vitamin D (e.g. diabetes insipidus, Fanconi syndrome) are found. A non-physiological over-production of 1,25-(OH)₂-

vitamin D arises in granulomatosis (e.g. sarcoidosis), where extra-renal synthesis of 1,25-(OH)₂-vitamin D occurs. This can lead to hypercalcaemia. Also in idiopathic hypercalciuria a relatively high level of 1,25-(OH)₂-vitamin D is found. Increased concentrations of 1,25-(OH)₂-vitamin D can be seen in case of non-functional vitamin D receptors (rare), during calcium deficient nutrition, as well as a result from overproduction of parathyroid hormone (primary hyperthyroidism).

Supplemental vitamin D is available in two distinct forms: ergocalciferol (vitamin D₂) and cholecalciferol (vitamin D₃). Pharmacopoeias have officially regarded these two forms as equivalent and interchangeable, based on studies of rickets prevention in infants. The determination of 1,25-(OH)₂-vitamin D₃/D₂ as a measure of 1,25-(OH)₂-vitamin D status provides an objective, quantitative measure of the biological response to vitamin D administration.

Indications

- Defect of kidney functions
 - Chronic kidney failure
 - Haemodialysis following kidney transplantation
- Renal osteopathy
- Osteomalacia from various types of vitamin D metabolism disturbances
- Kidney tubules function disturbances (diabetes insipidus, Fanconi-Syndrom)
- Monitoring of therapy with active vitamin D metabolites
- Ideopathic hypercalciuria
- Hypercalcaemia

3. MATERIAL PROVIDED

Cat. No.	Identifier	Kit components	Quantity
KM0002	RECSOL	Reconstitution solution	2 x 15 ml
KM0003	WASHSOL	Wash solution	1 x 80 ml
KM1000	INTSTD	Internal standard	1 x 600 µl
	MOPHAB	Mobile phase B	1 x 500 ml
	SOLA	Solution A	1 x 25 ml

Cat. No.	Identifier	Kit components	Quantity
KM1002	DER	Derivatization reagent	1 x 3 ml
	CAL	Calibrators 1–6; lyophilised (for concentration, see productspecification)	2 vials (à 600 µl) per level
	CTRL	Controls 1–3; lyophilised (for concentration, see product specification)	3 vials (à 600 µl) per level
	STOP	Stop solution	1 x 1.5 ml
	ACTREAG	Activation reagent	1 x 2.5 ml
	MOPHAA	Mobile phase A	1 x 500 ml
KM1100	COLUMNS	ImmuTube®-columns for extraction of 1,25-(OH) ₂ -Vitamin D ₃ /D ₂	1 x 50 Stück
	ELUSOL	Elution solution	1 x 15 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 material is required for the 1,25-(OH)₂-Vitamin D₃/D₂ IDKenhance® ImmuTube® LC-MS/MS application (not included in the kit):

- Glass tubes (inner diameter 10 mm)
- Precision pipettors and disposable tips to deliver 10–1 000 µl
- Centrifuge capable of 10 000 g for 1.5 ml Eppendorf reaction tubes and 550 g for glass tubes, respectively
- Vortex mixer
- Vacuum centrifuge or nitrogen distributor
- Standard laboratory disposable plastic reagent vials (inner diameter 10 mm)
- Overhead rotator
- LC-MS/MS system
- LC-MS vials or 96-well plate suitable for the autosampler

The following accessories, among others, can be ordered separately for the 1,25-(OH)₂-Vitamin D₃/D₂ IDKenhance® ImmuTube® LC-MS/MS application at Immundiagnostik AG:

- tuning solution for 1,25-(OH)₂-vitamin D₃/D₂ (KM1002TU)
- tuning solution for the internal standard (KM1002TS)
- 1,25-(OH)₂-Vitamin D₃/D₂ IDKenhance® ImmuTube® LC-MS/MS extraction kit (KM1102)
- UPLC column (KM1002SP)
- in-line filter (KM1000IF)
- in-line filter holder (KM1000IH)

Please ask for our single component price list.

Immundiagnostik AG offers further options for derivatization and sample preparation for the 1,25-(OH)₂-vitamin D₃/D₂ LC-MS/MS application. Please contact us for your individual solution.

5. PREPARATION AND STORAGE OF REAGENTS

Storage

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

Note: After preparation of the test reagents for the test procedure other stabilities might apply (see respective preparation step).

Preparation of the mobile phases and test reagents

Before use, the mobile phases (MOPHAA and MOPHAB) and solution A (SOLA) must be activated by adding activation reagent (ACTREAG) according to the following chart:

Components			ACTREAG
Name	[ml]		[µl]
Mobile phases (MOPHAA and MOPHAB)	500	+	500
Solution A (SOLA)	25		25

Prior use mobile phases should be degassed.

Note: After activation with activation reagent (ACTREAG), the components mobile phase A (MOPHAA), mobile phase B (MOPHAB) and solution A (SOLA) can be stored up to 2 weeks. It is therefore recommended to prepare only as much as is needed for the test approach.

Attention: The activation reagent (ACTREAG) 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 the internal standard

Immediately before use, the concentrate of the internal standard (INTSTD) must be diluted with the reconstitution solution (RECSOL) in a ratio of 1:5 (e.g., 0.6 ml INTSTD with 2.4 ml RECSOL). It is recommended to prepare only as much as needed for the test preparation (50 µl per sample).

Preparation of the calibrators and controls

Dissolve calibrators (CAL1–6) and controls (CTRL1–3) in 600 µl of reconstitution solution (RECSOL) each while 30 s vortexing.

The concentration of the calibrators (CAL1-6) and controls (CTRL1-3) changes slightly from batch to batch; the exact content is given in the product specification.

6. SAMPLE PREPARATION

Serum and plasma samples are suited for the assay.

The samples must be centrifuged before use (minimum 5 min at 10 000 g).

Control samples should be analysed with each run.

Prior to use in the assay, allow all samples and reagents to come to room temperature (18–26 °C).

Mix samples and reagents well before use.

1.	Carefully vortex ImmuTubes® and centrifuge (30 s at 500–1 000 rpm) to ensure that no suspension remains in the lid.
2.	Label the ImmuTubes®, open ImmuTubes® and quickly add 500 µl of calibrator (CAL), control (CTRL) or sample.
3.	Add 50 µl of diluted internal standard (INTSTD diluted with RECSOL) in each ImmuTube®, close ImmuTubes® and mix gently.
4.	Incubation for 1 h at room temperature in an overhead rotator (15–30 rpm).

5.	Insert closed ImmuTubes® in plastic reagent vials, centrifuge for 2 min at 550 g to ensure that no suspension remains in the lid.
6.	Open the outlet of the ImmuTubes®, then the lid and centrifuge for 2 min at 550 g to dryness. Discard flow-through.
7.	Add 500 µl of wash solution (WASHSOL) and centrifuge for 2 min at 550 g to dryness; discard the flow-through. Carry out this wash step three times in total.
8.	Label new glass tubes, place ImmuTubes® in the labelled glass tubes.
9.	Add 250 µl of elution solution (ELUSOL), centrifuge for 2 min at 550 g and collect the eluate with the analytes in the glass tubes.
10.	Evaporate the solvents under a nitrogen stream at 37 °C or in a vacuum centrifuge.
11.	Add 50 µl derivatization solution (DER) into each glass tube and incubate for 1 h at 1200 rpm on a shaker in the dark (attention: reaction is light sensitive).
12.	Add 25 µl of stop solution (STOP) into each glass tube and incubate for 2 min at 1200 rpm on a shaker.
13.	Evaporate the eluate under a nitrogen stream at 37 °C or in a vacuum centrifuge.
14.	Dissolve the residue in 175 µl of activated Solution A (SOLA) by shaking at 1200 rpm for 1 min and then transfer to a suitable LC-MS sample vial or 96-well plate for the LC-MS autosampler.
15.	Injection into the LC-MS/MS system (see application note).

7. 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.

8. CALCULATION

The linear regression is used as model for evaluation of the results. The calibrator concentration points are connected by a straight line. The samples can be calculated using the obtained line.

9. EXAMPLES OF CHROMATOGRAMS

Calibrator

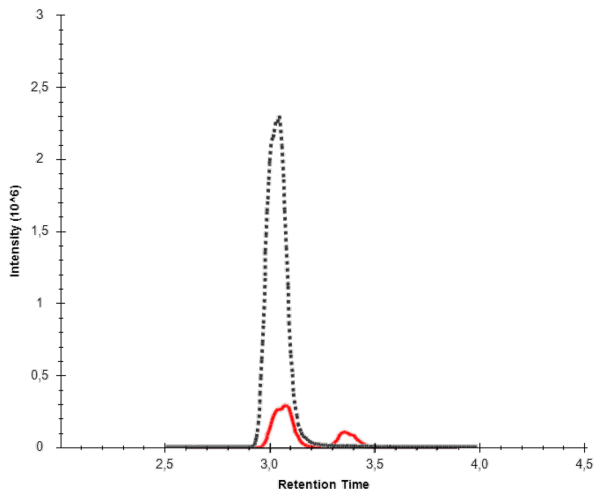


Fig. 1: Chromatogram (recorded with Waters TQ-XS LC-MS/MS) for the internal standard (dashed line) and the analyte (continuous line) of 1,25-(OH)₂-Vitamin D₃ for calibrator 3.

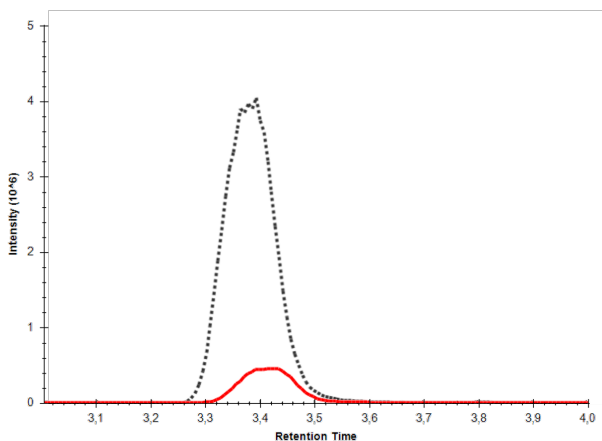


Fig. 2: Chromatogram (recorded with Waters TQ-XS LC-MS/MS) for the internal standard (dashed line) and the analyte (continuous line) of 1,25-(OH)₂-Vitamin D₂ for calibrator 3.

Patient sample

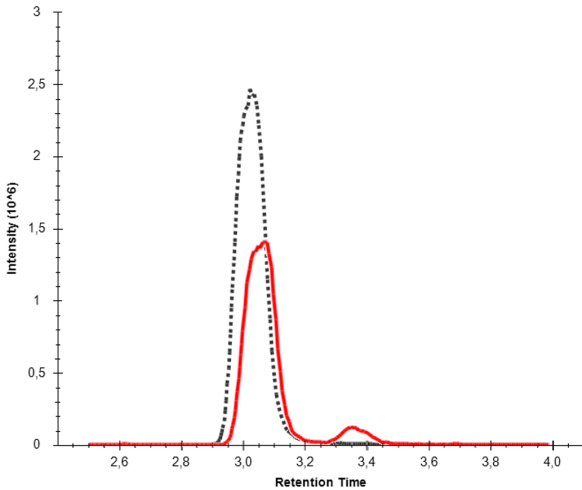


Fig. 3: Chromatogram (recorded with Waters TQ-XS LC-MS/MS) for the internal standard (dashed line) and the analyte (continuous line) of 1,25-(OH)₂-Vitamin D₃ for a patient sample (citrate plasma).

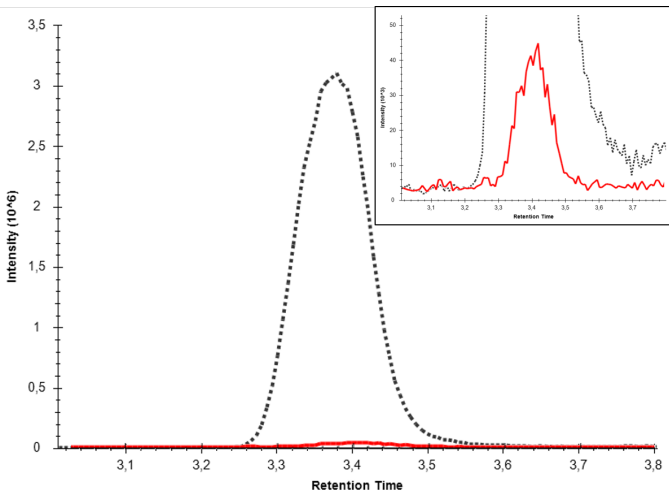


Fig. 4: Chromatogram (recorded with Waters TQ-XS LC-MS/MS) for the internal standard (dashed line) and the analyte (continuous line) of 1,25-(OH)₂-Vitamin D₂ for a patient sample (citrate plasma). The signal of the analyte is highlighted in the box due to low endogenous concentration.

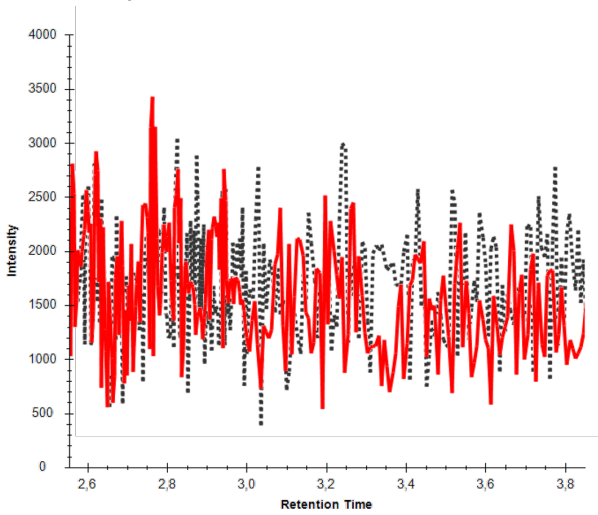
Blank sample

Fig. 5: Chromatogram (recorded with Waters TQ-XS LC-MS/MS) for the internal standard (dashed line) and the analyte (continuous line) of 1,25-(OH)₂-Vitamin D₃ for a blank sample.

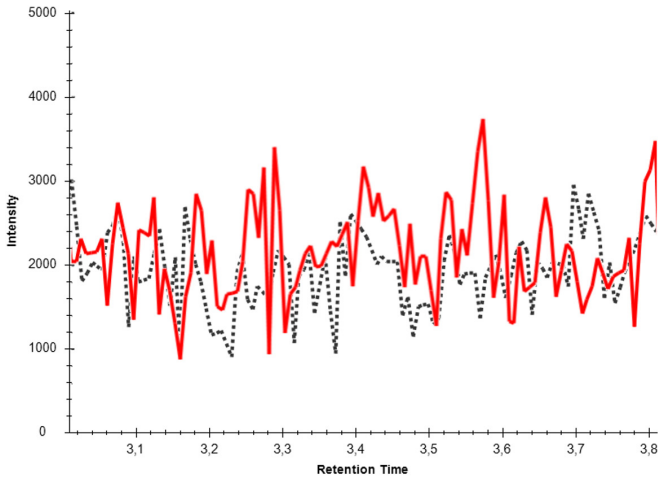


Abb. 6: Chromatogram (recorded with Waters TQ-XS LC-MS/MS) for the internal standard (dashed line) and the analyte (continuous line) of 1,25-(OH)₂-Vitamin D₂ for a blank sample.

10. 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 range (see product specification).

Normal range (plasma or serum)

Healthy adults (age 20–50) :	17–53 pg/ml
Children up to 12:	ca. 40% higher values
Pregnant women (week 8–42):	ca. 60% higher values
Persons older than 70:	ca. 40% lower values

Vitamin D production in the skin is highly variable and depends, among other things, on the season and time of day, latitude, age, sun protection, etc.

We recommend each laboratory to establish its own norm concentration range.

11. PERFORMANCE CHARACTERISTICS

Trueness

Trueness was assessed using a certified reference material.

1,25-(OH) ₂ -Vitamin D ₃		1,25-(OH) ₂ -Vitamin D ₂	
[pg/ml]	Bias [%]	[pg/ml]	Bias [%]
3.0	-6.0	2.0	-0.3
23.8	-1.8	22.8	0.3
40.5	-3.0	39.5	-1.2
57.2	-2.8	56.2	-2.1
78.0	-2.2	77.0	-1.2
103.0	-4.2	102.0	-2.1
128.0	-3.3	127.0	-2.0
253.0	-3.9	252.0	-3.2
503.0	-4.5	502.0	-3.5

Precision

Precision was determined across nine independent experiments.

1,25-(OH) ₂ -Vitamin D ₃		1,25-(OH) ₂ -Vitamin D ₂	
[pg/ml]	Coefficient of variation [%]	[pg/ml]	Coefficient of variation [%]
15.6	1.6	16.7	1.9
36.7	2.6	36.6	2.5
89.5	2.7	87.8	2.2

Lower limit of quantification (LLOQ)

The lower limit of quantification (LLOQ) was experimentally confirmed (sufficient trueness and precision):

1,25-(OH)₂-Vitamin D₃: 5.33 pg/ml

1,25-(OH)₂-Vitamin D₂: 6.31 pg/ml

It must be noted that the LLOQ may vary depending on the device.

12. PRECAUTIONS

- The quality control guidelines should be followed.
- 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. As a precaution, it is recommended that the human material used is always considered 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.

13. DISPOSAL

Mobile phases (MOPHAA, MOPHAB), solution A (SOLA), activation reagent (AC-TREAG), derivatization reagent (DER), stop solution (STOP) and elution solution (ELUSOL) must be disposed 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 expiry date shown on the kit label.
- The assay should always be performed according 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.

15. GENERAL NOTES ON THE TEST

- This assay was produced and distributed according to the IVD guidelines of 98/79/EC.
- *DKenhance*® and *ImmuTube*® are brands 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 send to Immundiagnostik AG together with a written complaint.

Used symbols:

	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

