

Arbeitsanleitung / Manual

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

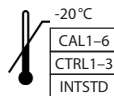
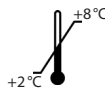
1,25-(OH)₂-Vitamin D₃/D₂ ImmuPlate[®] DIY LC-MS/MS Kit

*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 2023-08-31

REF KM1020



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

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
1,25-(OH) ₂ -Vitamin D ₃	8
1,25-(OH) ₂ -Vitamin D ₂	9
10. QUALITÄTSKONTROLLE	9
<i>Normbereich (Plasma oder Serum)</i>	9
11. TESTCHARAKTERISTIKA	10
<i>Präzision</i>	10
<i>Linearität</i>	10
<i>Analytische Sensitivität</i>	11
12. VORSICHTSMASSNAHMEN	11
13. ENTSORGUNG	11
14. TECHNISCHE MERKMALE	12
15. ALLGEMEINE HINWEISE ZUM TEST	12

1. VERWENDUNGSZWECK

Der 1,25-(OH)₂-Vitamin D₃/D₂ ImmuPlate® DIY LC-MS/MS Kit ist für die LC-MS/MS-basierte Quantifizierung 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 (ImmuPlate®). Der Assay ist ein In-vitro-Diagnostikum zur manuellen Anwendung durch professionelles Laborpersonal in einer Laborumgebung. 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 1 α -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 1 α -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-(OH)₂-Vitamin-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
KM0001	ACTSOL	Aktivierungslösung	1 x 1,5 ml
KM0002	RECSOL	Rekonstitutionslösung	2 x 15 ml
KM0003	WASHSOL	Waschlösung	2 x 80 ml
KM0005	RMMAT	Verschlussmatte für ELUPLATE	1 Stück
KM0006	IPMAT	Verschlussmatte für PLATE	1 Stück
KM1000	INTSTD	Interner Standard	1 x 600 µl
	MOPHAA	Laufmittel A	1 x 500 ml
	MOPHAB	Laufmittel B	1 x 500 ml
	SOLA	Lösung A	1 x 25 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
KM1100	ELUSOL	Elutionslösung	2 x 15 ml
KM1110	ELUPLATE	Elutionsplatte mit Glasröhrchen	1 Stück
KM1120	PLATE	96-Well-Platte	1 Stück
	SLU	Antikörper Slurry zur Extraktion des 1,25-(OH) ₂ -Vitamin D ₃ /D ₂	1 x 10,5 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 ImmuPlate® DIY LC-MS/MS-Applikation benötigt (nicht im Kit enthalten):

- Präzisionspipetten und Einmalpipettenspitzen mit variablen Volumina von 10–1 000 µl
- Zentrifuge, 550 g für 96-Well Platte
- 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 ImmuPlate® DIY LC-MS/MS-Applikation bei Immundiagnostik AG separat bestellt werden:

- Tuninglösung für 1,25-(OH)₂-Vitamin D₃/D₂ (KM1000TU)
- Tuninglösung für den internen Standard (KM1000TS)
- 1,25-(OH)₂-Vitamin D₃/D₂ ImmuPlate® LC-MS/MS Extraktionskit (KM1120)
- UPLC-Säule (KM1000SP)
- In-Line Filter (KM1000IF)
- In-Line Filterhalter (KM1000IH)
- Waschplatte (KM1120WASHPLATE)

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: -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 gültig sein (siehe jeweiliger Vorbereitungsschritt).

Vorbereitung der Laufmittel und Testreagenzien

Die Laufmittel (MOPHAA und MOPHAB) und die Lösung A (SOLA) müssen vor Gebrauch mit Aktivierungslösung (ACTSOL) aktiviert werden, siehe nachfolgende Tabelle.

Komponente			ACTSOL
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 (ACTSOL) 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: Die Aktivierungslösung (ACTSOL) muss unter dem Abzug zugesetzt werden. Alle zu verwendenden Gefäße müssen absolut sauber und detergentienfrei sein und sollte vorzugsweise aus LC-MS/MS geeignetem Glas sein.

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) durch 30 sekündiges vortexen gelöst.

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

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.	Von einer 200 µl Pipettenspitze ca. 5 mm der Auslassseite abschneiden und in jedes zu benutzende Well der PLATE 100 µl SLU pipettieren. Dabei die Flasche SLU regelmäßig schwenken, um ein Absetzen des Slurrys zu verhindern.
2.	500 µl CAL, CTRL oder Probe in die entsprechenden Kavitäten der gefüllten PLATE pipettieren.
3.	Anschließend 50 µl verdünnten INTSTD (INTSTD verdünnt mit RECSOL) in jedes Well pipettieren.
4.	Die 96-Well-Filter-Platte mit IPMAT sicher verschließen (Roller verwenden), einige Male invertieren und bei Raumtemperatur für 1 h in einem Orbital-schüttler (mindestens 1 200 rpm; dabei darauf achten, dass alle Wells gut durchmischt sind) oder einem Überkopfschüttler (15–20 rpm) inkubieren.
5.	PLATE auf eine 96-Well-Platte setzen (Waschplatte) und 2 min bei 550 g zentrifugieren damit kein SLU an der IPMAT verbleibt.
6.	IPMAT abziehen und verwerfen. PLATE auf der Waschplatte belassen, 2 min bei 550 g trocken zentrifugieren; den Durchlauf verwerfen.
7.	500 µl WASHSOL in jedes benutzte Well der PLATE pipettieren und 2 min bei 550 g bis zum Eintrocknen zentrifugieren; den Durchlauf verwerfen. Diesen Waschschrift insgesamt dreimal durchführen.
8.	Setzen Sie die 96-Well-Filter-Platte auf die ELUPLATE.
9.	250 µl ELUSOL hinzu pipettieren, 2 min bei 550 g zentrifugieren und das Eluat mit den Analyten in den Glasröhrchen der ELUPLATE sammeln.
10.	Das Eluat unter Stickstoffstrom bei 37 °C oder in einer Vakuumzentrifuge eintrocknen.
11.	175 µl aktivierte SOLA (SOLA aktiviert mit ACTSOL) in jedes verwendete Well pipettieren, dann die ELUPLATE mit der RMMAT verschließen (oder alternativ die Lösung in geeignete LC-MS-Vails für den Autosampler überführen) und 1 min bei 1 200 rpm schütteln.
12.	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

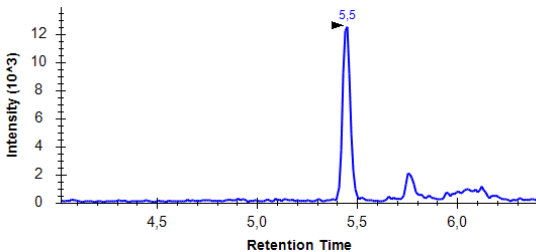
Als Modell zur Auswertung wird die lineare Regression verwendet. Zwischen den Kalibratorkonzentrationen wird eine Gerade gelegt. Anhand dieser können dann die Proben berechnet werden.

9. MUSTERCHROMATOGRAMME

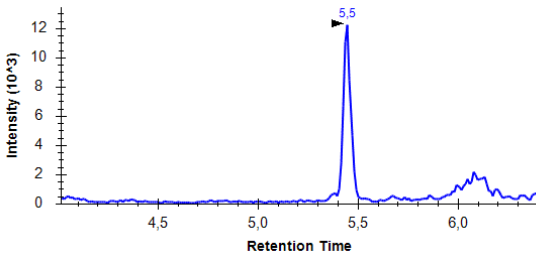
Es muss beachtet werden, dass die Retentionszeit und Signalintensität geräteabhängig variieren kann.

1,25-(OH)₂-Vitamin D₃

Quantifier ($m/z = 399,3 > 151$):

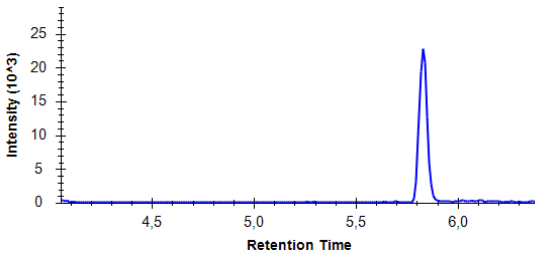


Qualifier ($m/z = 399,3 > 135,1$):

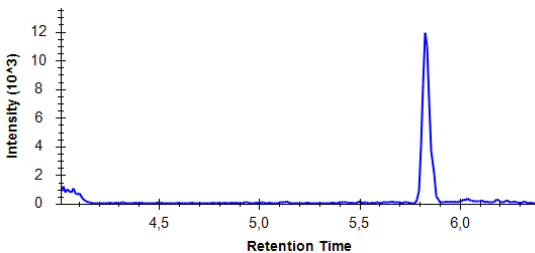


1,25-(OH)₂-Vitamin D₂

Quantifier ($m/z=411,1 > 151$):



Qualifier ($m/z=411,1 > 135,1$):



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

Präzision

Wiederholbarkeit (intra-day); n=22

1,25-(OH) ₂ -Vitamin D ₃		1,25-(OH) ₂ -Vitamin D ₂	
[pg/ml]	VK [%]	[pg/ml]	VK [%]
113,0	7,2	115,0	5,3
338,9	4,0	367,1	2,7

Reproduzierbarkeit (inter-day); n=14

1,25-(OH) ₂ -Vitamin D ₃		1,25-(OH) ₂ -Vitamin D ₂	
[pg/ml]	VK [%]	[pg/ml]	VK [%]
118,8	12,2	119,1	6,7
345,0	9,7	340,4	8,4

Linearität

Probe [pg/ml]	1,25-(OH) ₂ -Vitamin D ₃	1,25-(OH) ₂ -Vitamin D ₂
	Linearität [%]	
25	100,6	100,0
125	102,6	99,0
250	97,3	103,1
500	98,1	96,9
1000	101,3	100,9

Analytische Sensitivität

Die Nachweisgrenze (LLOD) bezeichnet die niedrigste Konzentration des Analyten, die sich noch nachweisen lässt.

Nachweisgrenze 1,25-(OH)₂-Vitamin D₃: 5,68 pg/ml

Nachweisgrenze 1,25-(OH)₂-Vitamin D₂: 12,01 pg/ml

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

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 Immundiagnostik AG erhältlich) zu beachten. Beim Arbeiten mit diesen Reagenzien sind die gesetzlichen Schutzvorkehrungen einzuhalten.

13. ENTSORGUNG

Laufmittel (MOPHAA, MOPHAB), Lösung A (SOLA), Aktivierungslösung (ACTSOL) 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.
- ImmuPlate® ist eine Marke der Immundiagnostik AG.
- Alle im Kit enthaltenen Reagenzien dürfen ausschließlich zur *In-vitro*-Diagnostik verwendet werden.
- Für die Qualitätskontrolle sind die für medizinische Laboratorien erstellten Richtlinien zu beachten.
- 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.
- 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.
- Bei Gewährleistungsansprüchen ist das beanstandete Material mit schriftlicher Erklärung innerhalb von 14 Tagen zum Hersteller, der Immundiagnostik AG, zurück zu senden.

Verwendete Symbole:

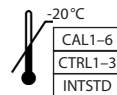
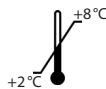
	Temperaturbegrenzung		Bestellnummer
	In-Vitro-Diagnostikum		Zu verwenden mit
	Hersteller		Inhalt ausreichend für <n> Prüfungen
	Chargenbezeichnung		Verwendbar bis
	Enthält Plasmoderivate oder menschliches Blut		Gebrauchsanweisung beachten
	Spezifikationsdatenblatt beachten		Nicht wiederverwenden
	eindeutige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

1,25-(OH)₂-Vitamin D₃/D₂ ImmuPlate[®] DIY LC-MS/MS kit

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

Valid from 2023-08-31

REF KM1020



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

Table of Contents

1. INTENDED USE	16
2. INTRODUCTION	16
3. MATERIAL PROVIDED	18
4. MATERIAL REQUIRED BUT NOT SUPPLIED	18
5. PREPARATION AND STORAGE OF REAGENTS	19
<i>Storage</i>	19
<i>Preparation of the mobile phases and test reagents</i>	19
<i>Preparation of the internal standard</i>	20
<i>Preparation of the calibrators and controls</i>	20
6. SAMPLE PREPARATION	20
7. LC-MS/MS METHOD	21
8. CALCULATION	21
9. EXAMPLES OF CHROMATOGRAMS	22
1,25-(OH) ₂ -vitamin D ₃	22
1,25-(OH) ₂ -vitamin D ₂	22
10. QUALITY CONTROL	23
<i>Normal range (plasma or serum)</i>	23
11. PERFORMANCE CHARACTERISTICS	23
<i>Precision</i>	23
<i>Linearity</i>	24
<i>Analytical sensitivity</i>	24
12. PRECAUTIONS	24
13. DISPOSAL	25
14. TECHNICAL HINTS	25
15. GENERAL NOTES ON THE TEST	25

1. INTENDED USE

1,25-(OH)₂-Vitamin D₃/D₂ ImmuPlate® DIY 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 (ImmuPlate®). 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
KM0001	ACTSOL	Activation solution	1 x 1.5 ml
KM0002	RECSOL	Reconstitution solution	2 x 15 ml
KM0003	WASHSOL	Wash solution	2 x 80 ml
KM0005	RMMAT	Sealing mat for ELUPLATE	1 piece
KM0006	IPMAT	Sealing mat for PLATE	1 piece
KM1000	INTSTD	Internal standard	1 x 600 µl
	MOPHAA	Mobile phase A	1 x 500 ml
	MOPHAB	Mobile phase B	1 x 500 ml
	SOLA	Solution A	1 x 25 ml
	CAL	Calibrators 1–6; lyophilised (for concentration, see product specification)	2 vials (à 600 µl) per level
	CTRL	Controls 1–3; lyophilised (for concentration, see product specification)	3 vials (à 600 µl) per level
KM1100	ELUSOL	Elution solution	2 x 15 ml
KM1110	ELUPLATE	Elution plate with glass tubes	1 piece
KM1120	PLATE	96-well filter plate	1 piece
	SLU	Antibody slurry for extraction of 1,25-(OH) ₂ -Vitamin D ₃ /D ₂	1 x 10.5 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 ImmuPlate® DIY LC-MS/MS application (not included in the kit):

- Precision pipettors and disposable tips to deliver 10–1 000 µl
- Centrifuge capable of 550 g for 96-well plate
- Vortex mixer
- Vacuum centrifuge or nitrogen distributor
- Orbital shaker

- 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 ImmuPlate® DIY LC-MS/MS application at Immundiagnostik AG:

- tuning solution for 1,25-(OH)₂-vitamin D₃/D₂ (KM1000TU)
- tuning solution for the internal standard (KM1000TS)
- 1,25-(OH)₂-Vitamin D₃/D₂ ImmuPlate® LC-MS/MS extraction kit (KM1120)
- UPLC column (KM1000SP)
- in-line filter (KM1000IF)
- in-line filter holder (KM1000IH)
- Wash plate (KM1120WASHPLATE)

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: -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 solution (ACTSOL) according to the following chart:

Components			ACTSOL
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 solution (ACTSOL), 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 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 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.	Cut off approximately 5 mm of the outlet side of a 200 µl pipette tip and pipette 100 µl SLU into each PLATE well to be used. Swirl the bottle SLU regularly to prevent the slurry from settling.
2.	Add 500 µl CAL, CTRL or sample into the corresponding wells of the filled PLATE.
3.	Add 50 µl diluted INTSTD (INTSTD diluted with RECSOL) into each filled well of the PLATE.

4.	Seal the PLATE securely with the IPMAT (use roller), invert a few times and incubate for 1 h at room temperature in an orbital shaker (at least 1 200 rpm; make sure that all wells are effectively mixed) or an overhead shaker (15–20 rpm).
5.	Put the PLATE on a 96-well plate (wash plate) and centrifuge at 550 g for 2 min for removal of any SLU from the IPMAT.
6.	Remove and discard the IPMAT. Leave the PLATE on wash plate, centrifuge 2 min at 550 g until dryness; discard the flow-through.
7.	Pipette 500 µl WASHSOL into each used well of the PLATE and centrifuge at 550 g for 2 min until dryness; discard the flow-through. Perform this washing step a total of three times.
8.	Place the PLATE on the ELUPLATE.
9.	Add 250 µl ELUSOL into each well used, centrifuge at 550 g for 2 min, and collect the eluate containing the analytes in the glass tubes of the ELUPLATE.
10.	Evaporate the eluate under a nitrogen stream at 37 °C or in a vacuum centrifuge.
11.	Add 175 µl activated SOLA (SOLA activated with ACTSOL) in every used well, seal the ELUPLATE with the RMMAT (or alternatively transfer the solution into suitable LC-MS vials for the autosampler) and shake at 1 200 rpm for 1 min.
12.	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

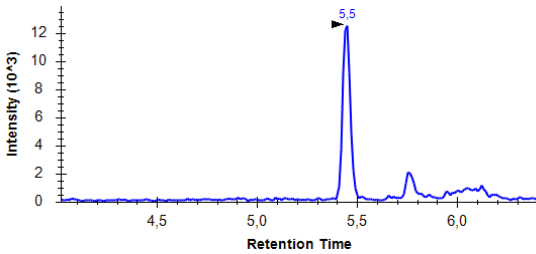
The linear regression is used as model for evaluation of the results. The calibrator concentration points are connected by a straight line. The samples can be calculated using the obtained line.

9. EXAMPLES OF CHROMATOGRAMS

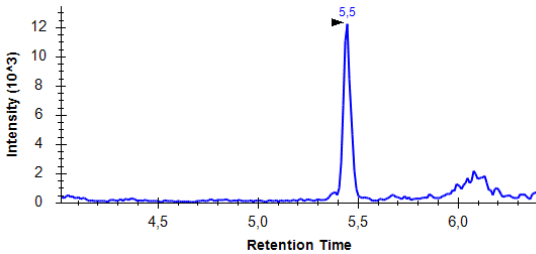
It must be noted that the retention time and signal intensity may vary depending on the device.

1,25-(OH)₂-vitamin D₃

Quantifier ($m/z = 399.3 > 151$):

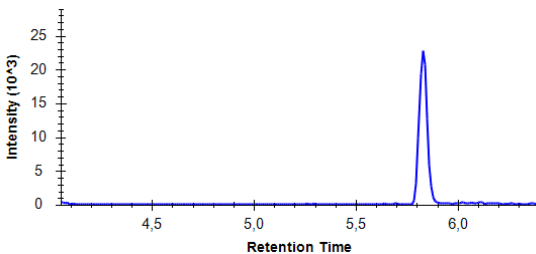


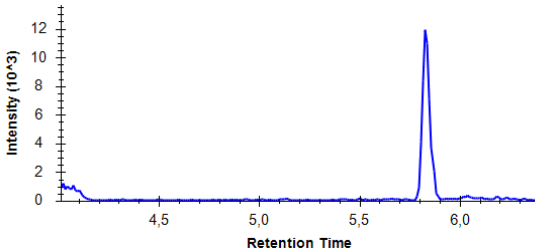
Qualifier ($m/z = 399.3 > 135.1$):



1,25-(OH)₂-vitamin D₂

Quantifier ($m/z = 411.1 > 151$):



Qualifier ($m/z = 411.1 > 135.1$):**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*Precision***Repeatability (intra-day); n=22**

1,25-(OH) ₂ -vitamin D ₃		1,25-(OH) ₂ -vitamin D ₂	
[pg/ml]	CV [%]	[pg/ml]	CV [%]
113.0	7.2	115.0	5.3
338.9	4.0	367.1	2.7

Reproducibility (Inter-day); n=14

1,25-(OH) ₂ -vitamin D ₃		1,25-(OH) ₂ -vitamin D ₂	
[pg/ml]	CV [%]	[pg/ml]	CV [%]
118.8	12.2	119.1	6.7
345.0	9.7	340.4	8.4

Linearity

Sample [pg/ml]	1,25-(OH) ₂ -vitamin D ₃	1,25-(OH) ₂ -vitamin D ₂
	Linearity [%]	
25	100.6	100.0
125	102.6	99.0
250	97.3	103.1
500	98.1	96.9
1 000	101.3	100.9

Analytical sensitivity

The detection limit (LLOD) designates the lowest concentration of the analyte that can still be detected.

Detection limit of 1,25-(OH)₂-vitamin D₃: 5.68 pg/ml

Detection limit of 1,25-(OH)₂-vitamin D₂: 12.01 pg/ml

It should be noted that the detection limit depends not only on the application method but also on the instrument.

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 Immundiagnostik 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 solution (ACTSOL) 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.
- *IDKenhance*® and *ImmuPlate*® 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

