

**Arbeitsanleitung / Manual**

*Nur für den Gebrauch durch Fachpersonal /*

*For professional use only*

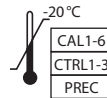
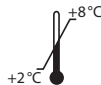
# 3-OH-Isovaleryl Carnitin LC-MS/MS Kit

*Zur Bestimmung von 3-OH-Isovaleryl Carnitin  
in Citratplasma*

*For the determination of 3-OH-isovalerylcarnitine  
in citrate plasma*

Gültig ab/Valid from 2023-05-15

**REF** KM3200



**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](mailto:info@immundiagnostik.com)

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



# Inhalt

<b>1. ZWECKBESTIMMUNG</b>	<b>3</b>
<b>2. MITGELIEFERTE MATERIALIEN</b>	<b>3</b>
<b>3. BENÖTIGTE MATERIALIEN (IM KIT NICHT ENTHALTEN)</b>	<b>4</b>
<b>4. REAGENZIE: LAGERUNG UND VORBEREITUNG</b>	<b>4</b>
<i>Lagerung</i>	4
<i>Vorbereitung der Laufmittel</i>	4
<i>Vorbereitung der Kalibratoren und Kontrollen</i>	5
<b>5. PROBEN: LAGERUNG UND VORBEREITUNG</b>	<b>5</b>
<i>Probentypen</i>	5
<i>Probenlagerung</i>	5
<i>Probenvorbereitung</i>	5
<b>6. TESTDURCHFÜHRUNG</b>	<b>6</b>
<i>Testprinzip</i>	6
<i>Abarbeitung</i>	6
<i>Ergänzende Informationen</i>	7
<b>7. AUSWERTUNG</b>	<b>7</b>
<i>Qualitätskontrolle</i>	7
<i>Berechnung</i>	7
<i>Metrologische Rückverfolgbarkeit der Kalibratoren und Kontrollen</i>	7
<i>Musterchromatogramme</i>	8
<b>8. ANALYTISCHE UND KLINISCHE LEISTUNG</b>	<b>9</b>
<i>Richtigkeit und Präzision</i>	9
<i>Messbereich mit Quantifizierungsgrenzen (LLOQ &amp; ULOQ)</i>	9
<i>Matrixeffekt &amp; Interferenzen</i>	10
<i>Verschleppung</i>	10
<i>Ausbeute</i>	10
<i>Testwertgrenze (cut-off)</i>	10
<b>9. SICHERHEITSHINWEISE</b>	<b>10</b>
<b>10. ENTSORGUNG</b>	<b>11</b>
<b>11. SYMBOLE</b>	<b>12</b>

**SICHERHEITSHINWEISE**

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

## 1. ZWECKBESTIMMUNG

Der 3-OH-Isovaleryl Carnitin LC-MS/MS Kit ist ein LC-MS/MS Assay zur Quantifizierung von 3-OH-Isovaleryl Carnitin in Citratplasma mittels LC-MS/MS nach Fällungsreaktion. Dies kann für die Diagnose eines funktionellen Biotinmangel verwendet werden. Der Assay ist ein *In-vitro*-Diagnostikum für den manuellen und automatisierten Gebrauch durch professionelles Laborpersonal im Labor bestimmt.

## 2. MITGELIEFERTE MATERIALIEN

Art.-Nr.	Bezeichnung	Kit-Komponente	Menge
KM0001	ACTSOL	Aktivierungslösung	1 x 1,5 ml
KM0002	RECSOL	Rekonstitutionslösung	1 x 15 ml
KM3200	96DWP	96-Deep-Well-Platte	2 x 1 Stück
	CAL1–6	Kalibratoren 1–6, lyophilisiert (Konzentration siehe Produktspezifikation)	2 Fläschchen (à 250 µl) pro Level
	CTRL1–3	Kontrollen 1–3, lyophilisiert (Konzentration siehe Produktspezifikation)	2 Fläschchen (à 250 µl) pro Level
	DILSOL	Verdünnungslösung	1 x 11 ml
	MOPHAA	Laufmittel A	1 x 500 ml
	MOPHAB	Laufmittel B	1 x 500 ml
	PREC	Fällungsreagenz (enthält den internen Standard)	2 x 17 ml

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

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

Folgendes Zubehör wird für die 3-OH-Isovaleryl Carnitin-LC-MS/MS-Applikation benötigt (nicht im Kit enthalten):

- Präzisionspipetten und Einmalpipettenspitzen mit variablen Volumina von 10–1 000 µl
- Zentrifuge, 150 g für Mikrotiterplatten
- Vortexer
- Mikrotiterplatten-Mixer
- LC-MS/MS System
- LC-MS-Vials oder 96-Well-Platte für den Autosampler
- für die Durchführung in Reaktionsgefäßen: 1,5 ml Reaktionsgefäße

Folgendes Zubehör kann für die 3-OH-Isovaleryl Carnitin-LC-MS/MS-Applikation bei Immundiagnostik AG separat bestellt werden:

- Tuninglösung für den Analyten (KM3200TU)
- Tuninglösung für den internen Standard (KM3200TS)
- UPLC-Säule (KM3200SP)
- In-Line Filter (KM3200IF)
- In-Line Filterhalter (KM3200IH)

Bitte kontaktieren Sie uns für Ihre individuelle Lösung und fordern Sie unsere Einzelkomponentenpreisliste an.

### 4. REAGENZIEN: LAGERUNG UND VORBEREITUNG

#### *Lagerung*

Die Testreagenzien sollten lichtgeschützt, trocken, verschlossen und bei ihrer angegebenen Lagertemperatur (CAL1–6, CTRL1–3, PREC: -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*

Die Laufmittel (MOPHAA und MOPHAB) müssen vor Gebrauch mit Aktivierungslösung (ACTSOL) aktiviert werden, siehe folgende Tabelle:

Komponente			ACTSOL
Bezeichnung	[ml]		[ $\mu$ l]
Laufmittel A (MOPHAA)	500	+	500
Laufmittel B (MOPHAB)	500		500

Die aktivierten Laufmittel sollten vor Verwendung entgast werden.

**Hinweis:** Nach Aktivierung mit der Aktivierungslösung (ACTSOL) sind die Laufmittel (MOPHAA und MOPHAB) noch für bis zu 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, detergenzienfrei und vorzugsweise aus LC-MS/MS geeignetem Glas oder Plastik bestehen.

### *Vorbereitung der Kalibratoren und Kontrollen*

Die Kalibratoren (CAL1–6) und die Kontrollen (CTRL1–3) werden in je 250  $\mu$ l Rekonstitutionslösung (RECSOL) bei 30 s vortexen gelöst.

**Hinweis:** Nach Rekonstitution mit der Rekonstitutionslösung (RECSOL) sind die Kalibratoren (CAL1–6) und die Kontrollen (CTRL1–3) bei 2–8 °C für 20 Tage stabil.

## 5. PROBEN: LAGERUNG UND VORBEREITUNG

### *Probentypen*

Als Probe eignet sich Citratplasma.

Die Entnahme hat mit entsprechenden Blutentnahmeröhrchen gemäß den Anweisungen des Herstellers und durch medizinisches Fachpersonal zu erfolgen.

### *Probenlagerung*

Die Proben können für 4 Monate bei -20 °C gelagert werden.

Wiederholte Auftau- und Einfrierzyklen sind zu vermeiden.

### *Probenvorbereitung*

Die Proben müssen vor Testdurchführung auf Raumtemperatur (18–26 °C) gebracht werden.

## 6. TESTDURCHFÜHRUNG

### Testprinzip

Zur Extraktion von 3-OH-Isovaleryl Carnitin wird eine Fällungsreaktion durchgeführt. Nach der chromatographischen Auftrennung wird der Analyt via Tandem-Massenspektrometrie (MS/MS) im *multiple reaction monitoring* (MRM) Modus gemessen.

Als interner Standard wird eine mit schweren Isotopen markierte 3-OH-Isovaleryl Carnitin-Variante verwendet, um Varianzen in der Probenvorbereitung und Matrixeffekte zu kompensieren.

### Abarbeitung

Vor Gebrauch alle Reagenzien und Proben bis auf das Fällungsreagenz (PREC) auf Raumtemperatur (18–26 °C) bringen und gut mischen.

	96-Deep-Well-Platte	1,5 ml Reaktionsgefäß
1.	50 µl Probe, CAL oder CTRL in eine Kavität der 96DWP bzw. ein Reaktionsgefäß vorlegen.	
2.	150 µl eiskaltes (-20 °C) PREC hinzugeben.	
3.	96DWP verschließen und 5 min bei 1 000 rpm schütteln lassen.	Gefäß verschließen und 1 min vortexen.
4.	Zentrifugation bei 150 g für 15 min.	Zentrifugation bei 8 900 g für 15 min.
5.	50 µl DILSOL in eine Kavität einer neuen 96-Deep-Well-Platte* oder LC-MS Probenvial vorlegen (analog zur Anzahl verwendeter Proben, CAL und CTRL).	
6.	50 µl des Probenüberstandes (siehe Schritt 4.) in vorgelegte DILSOL überführen.	
7.	Mischen der Probe durch auf- und abpipettieren.	-
8.	Platte verschließen und weitere 5 min bei 1 000 rpm schütteln lassen.	LC-MS Probenvials verschließen und 5 s vortexen.
9.	Injektion in das LC-MS System (siehe <i>Application Note</i> ).	

\*passend für den LC-MS/MS Autosampler.



### *Ergänzende Informationen*

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).

Die genauen Konzentrationen der Kontrollen (CTRL1–3) und Kalibratoren (CAL1–6) können chargenabhängig variieren und sind der mitgelieferten Produktspezifikation zu entnehmen.

## **7. AUSWERTUNG**

### *Qualitätskontrolle*

Wir empfehlen, bei jedem Testansatz Kontrollen (CTRL1–3) mitzumessen. Die Ergebnisse der Kontrollen werden verwendet, um die Genauigkeit der Methode zu bestätigen. Liegen eine oder mehrere Werte der Qualitätskontrolle außerhalb des angegebenen Bereichs (siehe Produktspezifikation), kann Immundiagnostik AG die Richtigkeit der Testergebnisse nicht gewährleisten.

Wir empfehlen zudem, die Intensität des internen Standards innerhalb einer Messreihe und langfristig auch das Verhältnis der Ionenübergänge zu beobachten, um Abweichungen in der Leistung zu identifizieren.

### *Berechnung*

Als Modell zur Auswertung wird die lineare Regression verwendet. Zwischen den sechs Kalibratorkonzentrationen wird eine Gerade gelegt (Gewichtungsfaktor:  $1/x^2$ ). Anhand der Peakfläche wird dann die Konzentration der Proben und Kontrollen bestimmt.

Bei der Verwendung von Citratplasma muss für die Auswertung der Verdünnungsfaktor in dem Blutentnahmeröhrchen mit der Citratlösung (i. d. R. Faktor 1:10) beachtet werden.

Die Ergebnisse des Assays müssen durch medizinisches Fachpersonal mit Erfahrung im vorgesehenem Anwendungsbereich und unter Berücksichtigung von Referenzwerten, sowie patientenspezifischen Faktoren interpretiert werden.

### *Metrologische Rückverfolgbarkeit der Kalibratoren und Kontrollen*

Die Kalibratoren (CAL1–6) und Kontrollen (CTRL1–3) basieren auf synthetischer Reinsubstanz und jede Charge wird zu seiner Vorgängercharge, sowie einer externen Kalibrierung in mehreren Experimenten verglichen.

## Musterchromatogramme

Es muss beachtet werden, dass die Retentionszeit und Signalintensität geräteabhängig variieren kann. Die hier dargestellten Chromatogramme wurden mit einer Waters TQ-XS LC-MS/MS aufgenommen.

### Blank

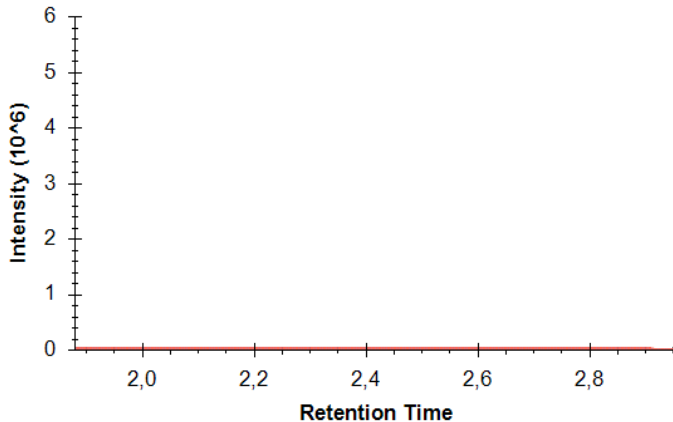


Abb. 1: Chromatogramm für den internen Standard (gestrichelt) und den Analyten (durchgängig) von 3-OH-Isovaleryl Carnitin für eine Blankprobe.

### Kontrolle (CTRL1)

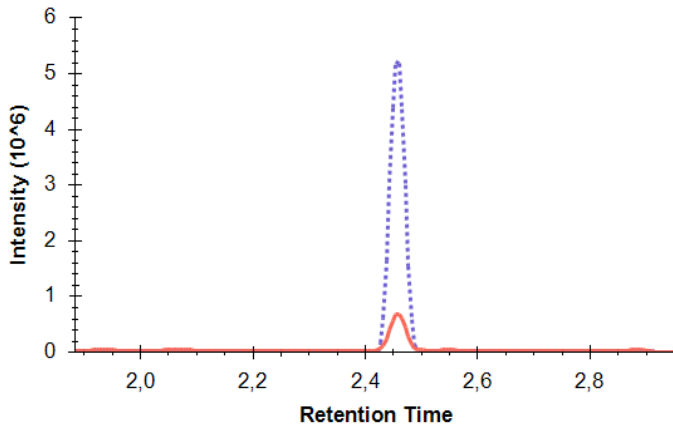


Abb. 2: Chromatogramm für den internen Standard (gestrichelt) und den Analyten (durchgängig) von 3-OH-Isovaleryl Carnitin für eine Kontrolle (CTRL1).

## Realprobe (Citratplasma)

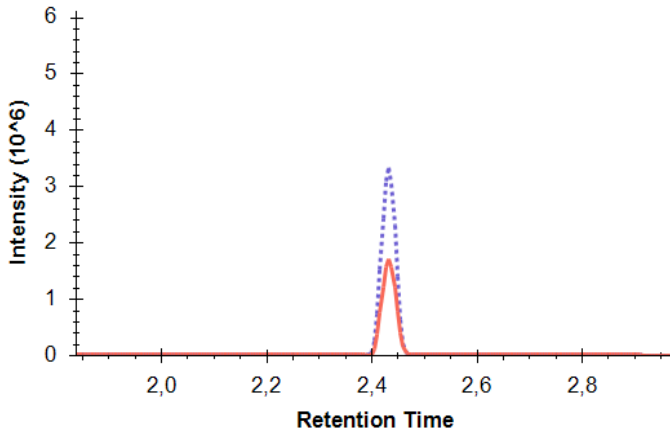


Abb. 3: Chromatogramm für den internen Standard (gestrichelt) und den Analyten (durchgängig) von 3-OH-Isovaleryl Carnitin für eine Realprobe (Citratplasma).

## 8. ANALYTISCHE UND KLINISCHE LEISTUNG

### Richtigkeit und Präzision

Probe [ng/ml]	Richtigkeit		Präzision	
	<i>intra-day</i> (n=5)	<i>inter-day</i> (n=40)	<i>intra-day</i> (n=5)	<i>inter-day</i> (n=40)
0,47	96,1 – 114,7 %	101,9 %	≤ 11,4 %	9,3 %
3,43	100,3 – 109,8 %	104,2 %	≤ 9,4 %	5,2 %
10,72	99,6 – 104,5 %	101,2 %	≤ 9,6 %	5,4 %
59,49	102,6 – 109,2 %	105,1 %	≤ 8,3 %	4,8 %

### Messbereich mit Quantifizierungsgrenzen (LLOQ & ULOQ)

Der Assay wurde in einem Bereich von 0,47–88,82 ng/ml als linear verifiziert ( $R^2 \geq 0,99$ ; 95 % Konfidenzintervall der Steigung liegt zwischen 0,9 und 1,1; 95 % Konfidenzintervall des y-Achsenabschnitts beinhaltet den Nullpunkt).

### *Matrixeffekt & Interferenzen*

Citratplasma weist einen ionensupprimierenden Effekt auf, welcher durch den internen Standard ausgeglichen werden kann. In Citratplasma wurde keine Interferenz mit dem internen Standard festgestellt.

### *Verschleppung*

Aufgrund der analytischen Methode sind Verschleppungen nie komplett auszuschließen. Diese wurden für den Analyten bzw. internen Standard allerdings als nicht signifikant (< 15% Abweichung am LLOQ nach vorheriger Injektion einer ULOQ-Probe) bewertet.

### *Ausbeute*

Die Ausbeute wurde über verschiedene Konzentrationsbereiche (4,0 ng/ml; 10,0 ng/ml; 60,0 ng/ml) hinweg für den Analyten bzw. internen Standard als konstant ( $96,1 \pm 2,8\%$  bzw.  $89,8 \pm 2,7\%$ ) verifiziert.

### *Testwertgrenze (cut-off)*

Testwertgrenze (*cut-off*)\* in Citratplasma: 12,5 ng/ml

Höhere Werte für 3-OH-Isovaleryl Carnitin können als Anzeichen für einen funktionellen Biotin-Mangel herangezogen werden.

\*97,5 Perzentile von gesunden Blutspender\*innen: N = 100, 40 % weiblich, 20–60 Jahre alt.

## **9. SICHERHEITSHINWEISE**

- Dieser Kit wurde nach der IVD Richtlinie 98/79/EG hergestellt und in den Verkehr gebracht.
- Alle im Kit enthaltenen Reagenzien dürfen ausschließlich zur *In-vitro*-Diagnostik und im Sinne der Zweckbestimmung verwendet werden.
- Der Assay ist immer nach der dem Kit beigefügten Arbeitsanleitung durchzuführen. Die Testcharakteristika wie Inkubationszeiten, Inkubationstemperaturen und Pipettiervolumina der verschiedenen Komponenten wurden vom Hersteller festgelegt. Nicht mit dem Hersteller abgesprochene Veränderungen in der Testdurchführung können die Resultate beeinflussen. Die Firma Immundiagnostik AG übernimmt für die hierdurch entstandenen Schäden und Folgeschäden keine Haftung.
- Reagenzien dieser Testpackung enthalten organische Lösungsmittel. Berührungen mit der Haut oder den Schleimhäuten sind zu vermeiden.

- Reagenzien der Kitpackung dürfen nicht mit anderen Chargen gemischt werden. Stopfen und Verschlüsse verschiedener Reagenzien dürfen nicht vertauscht werden.
- Das für Kitkomponenten verwendete humane Material wurde auf die Parameter Anti-HIV, Anti-HCV, HBsAg, Anti-HBc, Anti-*Treponema pall.*, HIV-1-RNA und HCV-RNA getestet und für negativ befunden. Dennoch wird empfohlen, die Kitkomponenten als Vorsichtsmaßnahme immer wie potentiell infektiöses Material zu behandeln.
- Es sind die auf den Einzelkomponenten angegebenen GHS-Symbole und Spezifikationen der Sicherheitsdatenblätter (bei Immundiagnostik AG erhältlich) zu beachten. Beim Arbeiten mit diesen Reagenzien sind die gesetzlichen Schutzvorkehrungen einzuhalten.
- Ein bereits verwendeter Anteil der Komponenten darf nicht wiederverwendet, sondern muss entsorgt werden.
- Die Reagenzien dürfen nach Ablauf des Haltbarkeitsdatums nicht mehr verwendet werden.
- Alle im Zusammenhang mit dem Produkt auftretende schwerwiegende Vorkommnisse sind der Immundiagnostik AG und (innerhalb des Unionsmarkt) der zuständigen Meldebehörde des jeweiligen Mitgliedsstaats zu melden.
- Sollten eine oder mehrere Komponenten des Testkits beschädigt, unvollständig (siehe Liste der Testbestandteile) oder Präzipitate in den gebrauchsfertigen Lösungen sichtbar sein, kontaktieren Sie bitte Immundiagnostik AG.
- Bei Gewährleistungsansprüchen ist das beanstandete Material mit schriftlicher Erklärung innerhalb von 14 Tagen zum Hersteller, der Immundiagnostik AG, zurückzusenden.




## 10. ENTSORGUNG

Die Laufmittel (MOPHAA, MOPHAB) und Fällungsreagenz (PREC) müssen als halogenfreier Lösungsmittelabfall entsorgt werden.

Verdünnungslösung (DILSOL) muss als halogenhaltiger Lösungsmittelabfall entsorgt werden.

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

## 11. 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
	eindeutige Produktidentifizierung		Enthält Material tierischen Ursprungs
	medizinische Substanz		Enthält Material humanen Ursprungs

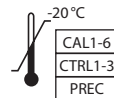
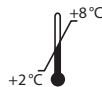
**Manual**  
*For professional use only*

# 3-OH-Isovalerylcarnitine LC-MS/MS kit

*For the determination of 3-OH-isovalerylcarnitine  
in citrate plasma*

Gültig ab/Valid from 2023-05-15

**REF** KM3200



**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](mailto:info@immundiagnostik.com) [www.immundiagnostik.com](http://www.immundiagnostik.com)

# Table of Contents

<b>1. INTENDED PURPOSE</b>	<b>16</b>
<b>2. MATERIAL PROVIDED</b>	<b>16</b>
<b>3. MATERIAL REQUIRED BUT NOT SUPPLIED</b>	<b>16</b>
<b>4. REAGENTS: STORAGE AND PREPARATION</b>	<b>17</b>
<i>Storage</i>	17
<i>Preparation of mobile phases</i>	17
<i>Preparation of calibrators and controls</i>	18
<b>5. SAMPLES: STORAGE AND PREPARATION</b>	<b>18</b>
<i>Sampling</i>	18
<i>Sample storage</i>	18
<i>Sample preparation</i>	18
<b>6. TEST PROCEDURE</b>	<b>18</b>
<i>Test principle</i>	18
<i>Processing</i>	19
<i>Supporting information</i>	19
<b>7. RESULT EVALUATION</b>	<b>20</b>
<i>Quality control</i>	20
<i>Calculation</i>	20
<i>Metrological traceability of the calibrators and controls</i>	20
<i>Example of chromatograms</i>	20
<b>8. ANALYTICAL AND CLINICAL PERFORMANCE</b>	<b>22</b>
<i>Accuracy and precision</i>	22
<i>Measuring range with quantification limits (LLOQ &amp; ULOQ)</i>	22
<i>Matrix effect and interferences</i>	23
<i>Carry over</i>	23
<i>Recovery</i>	23
<i>Cut off value</i>	23
<b>9. WARNINGS AND PRECAUTIONS</b>	<b>23</b>
<b>10. DISPOSAL</b>	<b>24</b>
<b>11. SYMBOLS</b>	<b>25</b>



**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.

## 1. INTENDED PURPOSE

The 3-OH-Isovalerylcarnitine LC-MS/MS kit is an LC-MS/MS assay for the quantification of 3-OH-isovalerylcarnitine by LC-MS/MS in citrate plasma after precipitation reaction. This can be used for the diagnosis of functional biotin deficiency. The assay is an in vitro diagnostic medical device for manual or automatic use by professional laboratory staff in a laboratory environment.

## 2. MATERIAL PROVIDED

Cat. no.	Identifier	Kit components	Amount
KM0001	ACTSOL	Activation solution	1 x 1,5 ml
KM0002	RECSOL	Reconstitution solution	1 x 15 ml
KM3200	96DWP	96-deep well plate	2 x 1 piece
	CAL1–6	Calibrators 1–6; lyophilised (see product specification for concentration)	2 vials (à 250 µl) per level each
	CTRL1–3	Control 1–3; lyophilised (see product specification for concentration)	2 vials (à 250 µl) per level each
	DILSOL	Dilution solution	1 x 11 ml
	MOPHAA	Mobile phase A	1 x 500 ml
	MOPHAB	Mobile phase B	1 x 500 ml
	PREC	Precipitation reagent (contains the internal standard)	2 x 17 ml

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

## 3. MATERIAL REQUIRED BUT NOT SUPPLIED

The following material is required for the 3-OH-Isovalerylcarnitine LC-MS/MS application (not included in the kit):

- Precision pipettors and disposable tips to deliver 10–1 000 µl
- Centrifuge, 150 g for microtiter plates
- Vortexer
- microtiter plate mixer
- LC-MS/MS system

- LC-MS vials or 96-well plate suitable for the autosampler
- for the procedure in reaction tubes: 1.5 ml reaction tubes

The following accessories for the 3-OH-Isovalerylcarnitine LC-MS/MS kit can be ordered separately at Immundiagnostik AG:

- Tuning solution for the analyte (KM3200TU)
- Tuning solution for the internal standard (KM3200TS)
- UPLC-column (KM3200SP)
- In-line filter (KM3200IF)
- In-line filter holder (KM3200IH)

Please ask for our single component price list and contact us for your individual solution.

## 4. REAGENTS: STORAGE AND PREPARATION

### *Storage*

The test reagents should be stored protected from light, dry and at their specified storage temperature (CAL1–6, CTRL1–3, PREC: -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 reagents their stability may vary (see respective preparation step).

### *Preparation of mobile phases*

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

Component			ACTSOL [µl]
Name	[ml]		
Mobile phase A (MOPHAA)	500	+	500
Mobile phase B (MOPHAB)	500		500

Mobile phases should be degassed prior to use.

**Note:** After activation with activation solution (ACTSOL), the components mobile phase A (MOPHAA) and mobile phase B (MOPHAB) can be stored at 2–8°C up to 2 weeks. It is therefore recommended to prepare only as much as is needed for the test approach.

**Attention:** The activation solution (ACTSOL) must be added under the fume hood. All used vials must be absolutely clean, detergent-free and preferably made of glass or plastic suitable for LC-MS/MS.

### *Preparation of calibrators and controls*

Calibrators (CAL1–6) and controls (CTRL1–3) have to be reconstituted with 250 µl reconstitution solution (RECSOL) each. Mix the vial content thoroughly for 30 s by using a vortex mixer.

**Note:** The reconstituted CAL1–6 and CTRL1–3 are stable for 20 days at 2–8 °C.

## **5. SAMPLES: STORAGE AND PREPARATION**

### *Sampling*

Citrate plasma samples are to be used with this assay.

The blood sampling must be performed with appropriate blood collection tubes according to the manufacturer's instructions and by qualified medical personnel.

### *Sample storage*

The samples can be stored for 4 months at -20 °C.

Repeated freeze and thaw cycles should be avoided.

### *Sample preparation*

The samples must be brought to room temperature (18–26 °C) prior the test procedure.

## **6. TEST PROCEDURE**

### *Test principle*

For the extraction of 3-OH-isovalerylcarnitine, a precipitation reaction is performed. After chromatographic separation, the analyte is measured via tandem mass spectrometry (MS/MS) in multiple reaction monitoring (MRM) mode.

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

## Processing

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

Vortex samples and reagents before use.

	96-deep well plate	1.5 ml reaction tube
1.	Add 50 µl sample, calibrator (CAL) or control (CTRL) into a well of the 96DWP respectively a reaction tube.	
2.	Add 150 µl ice-cold (-20°C) PREC.	
3.	Seal 96DWP and shake for 5 min at 1 000 rpm.	Seal tubes and vortex for 1 min.
4.	Centrifuge for 15 min at 150 g.	Centrifuge for 15 min at 8 900 g.
5.	Add 50 µl DILSOL into one well of a new 96 well plate* or LC-MS vial (analogous to the number of samples, CAL and CTRL used).	
6.	Transfer 50 µl of the supernatant (see step 4.) to the DILSOL presented.	
7.	Mix the sample by pipetting up and down.	-
8.	Seal plate and shake for 5 min at 1 000 rpm.	Seal LC-MS vials and vortex for 5 s.
9.	Injection into the LC-MS system (see application note).	

\*suitable for the autosampler of the LC-MS system.

## Supporting information

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

The exact concentrations of the controls (CTRL1–3) and calibratos (CAL1–6) may vary from lot to lot and can be found in the enclosed product specification.

## 7. RESULT EVALUATION

### *Quality control*

Control samples should be analysed with each run. Results, generated from the analysis of control samples, should be evaluated for acceptability using appropriate statistical methods. The 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.

We furthermore recommend to monitor the intensity of the internal standard within one batch and, in the long term, the ion transition ratio in order to identify deviations in performance.

### *Calculation*

Linear regression is used as model for evaluation of the results. The six calibrator concentration points are connected by a straight line (weighting factor:  $1/x^2$ ). This is used to calculate the concentration of the samples and controls via the peak area.

When using citrate plasma, the dilution factor in the blood collection tube with the citrate solution (normally factor 1:10) has to be noted for the evaluation.

The results of the assay must be interpreted by medical professionals with experience in the intended field of application and taking into account reference values as well as patient-specific factors.

### *Metrological traceability of the calibrators and controls*

The calibrators (CAL1–6) and controls (1–3) are based on synthetic pure substance and every lot is compared to its previous lot as well as external calibration in multiple experiments.

### *Example of chromatograms*

It must be noted that the retention time and signal intensity may vary depending on the device. The chromatograms shown here were recorded by using a Waters TQ-XS LC-MS/MS.

## Blank

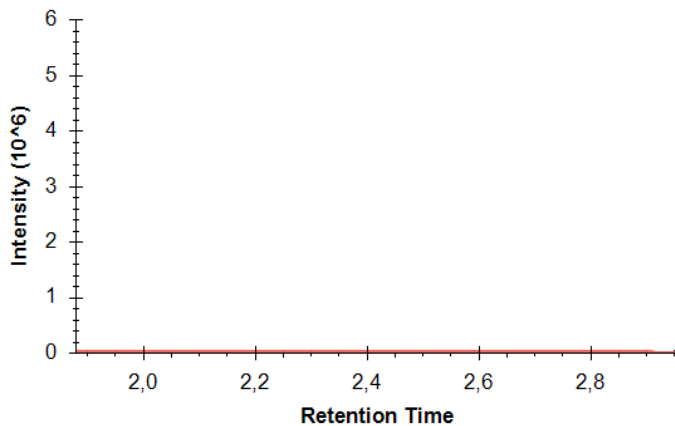


Fig. 1: Chromatogram for the internal standard (dashed line) and the analyte (continuous line) of 3-OH-isovalerylcarnitine for a blank sample.

## Control

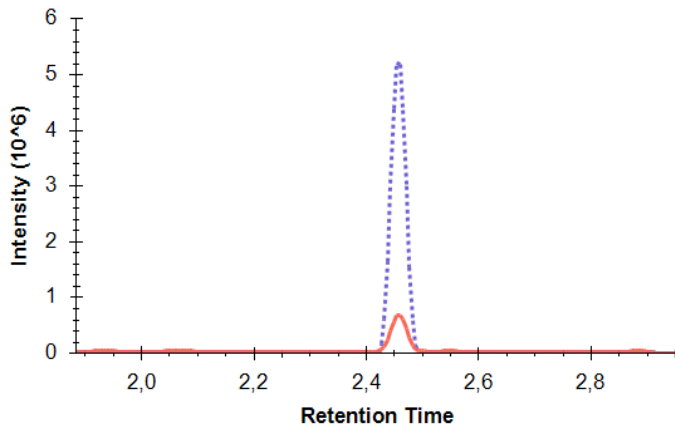


Fig. 2: Chromatogram for the internal standard (dashed line) and the analyte (continuous line) of 3-OH-isovalerylcarnitine for a control (CTRL1).

## Sample

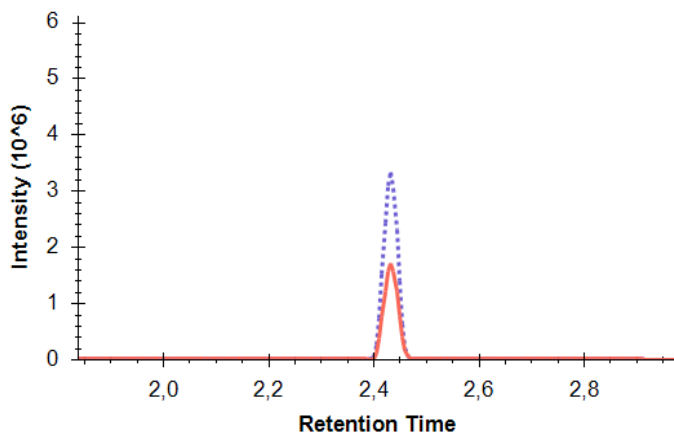


Fig. 3: Chromatogram for the internal standard (dashed line) and the analyte (continuous line) of 3-OH-isovalerylcarnitine for a patient sample (citrate plasma).

## 8. ANALYTICAL AND CLINICAL PERFORMANCE

### Accuracy and precision

Sample [ng/ml]	Accuracy		Precision	
	<i>intra-day</i> (n=5)	<i>inter-day</i> (n=40)	<i>intra-day</i> (n=5)	<i>inter-day</i> (n=40)
0.47	96.1 – 114.7 %	101.9 %	≤ 11.4 %	9.3 %
3.43	100.3 – 109.8 %	104.2 %	≤ 9.4 %	5.2 %
10.72	99.6 – 104.5 %	101.2 %	≤ 9.6 %	5.4 %
59.49	102.6 – 109.2 %	105.1 %	≤ 8.3 %	4.8 %

### Measuring range with quantification limits (LLOQ & ULOQ)

The assay has been verified as linear in a range from 0.47–88.82 ng/ml ( $R^2 \geq 0.99$ ; 95 % CI of the slope is between 0.9 and 1.1; 95 % CI of the y-intercept brackets the origin).



### *Matrix effect and interferences*

Citrate plasma exhibits an ion suppressing effect which can be compensated by the internal standard. No interference was detected for the internal standard in citrate plasma.

### *Carry over*

Carry over can never be completely excluded due to the analytical method. However, this was verified as not significant for the analyte and the internal standard (< 15% deviation at the LLOQ after preceding injection of an ULOQ sample).

### *Recovery*

The recovery was verified to be stable ( $96.1 \pm 2.8\%$  and  $89.8 \pm 2.7\%$ ) across different concentration ranges (4.0 ng/ml; 10.0 ng/ml; 60.0 ng/ml) for the analyte and internal standard, respectively.

### *Cut off value*

Cut off value\* in citrate plasma: 12.5 ng/ml

Higher values of 3-OH-isovalerylcarnitine can be taken to represent a functional biotin deficiency.

\*97.5th percentile of healthy blood donors: N = 100, 40% female, aged 20–60.

## **9. WARNINGS AND PRECAUTIONS**

- This assay was produced and distributed according to the IVD guidelines of 98/79/EC.
- All reagents in the kit package are for *in vitro* diagnostic use only and in accordance with the intended use.
- The assay should always be performed according to the enclosed manual. 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.
- Human material used in the kit components was tested and found to be negative for Anti-HIV, Anti-HCV, HBsAg, Anti-HBc, Anti-*Treponema pall.*, HIV-1-RNA and HCV-RNA. However, for safety reasons, all kit components should be treated as potentially infectious.

- The GHS symbols indicated on the individual components and specifications of the material safety data sheets (available on request from Immundiagnostik AG) must be noted. When working with these reagents, the legal protective precautions must be adhered to.
- The test components contain organic solvents. Contact with skin or mucous membranes has to be avoided.
- Any part of the components that has already been used must not be reused, but must be disposed in accordance with local regulations.
- Do not interchange different lot numbers of any kit component within the same assay. Do not mix plugs and caps from different reagents.
- Reagents should not be used beyond the expiry date stated on the kit label.
- 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 logged within 14 days after receipt of the product. The product should be sent to Immundiagnostik AG along with a written complaint.

















## 10. DISPOSAL

Mobiles phases (MOPHAA, MOPHAB) and precipitation reagent (PREC) have to be disposed as non-halogenated solvents.

Dilution solution (DILSOL) has to be disposed as halogenated solvent.

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

## 11. SYMBOLS

	Temperature limitation		Catalogue number
	<i>In Vitro</i> Diagnostic Medical Device		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)

