

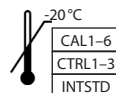
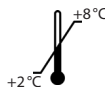
ImmuTube[®] Vitamin D duo LC-MS/MS Kit

*Zur Bestimmung von 24,25-(OH)₂-Vitamin D₃
und 25-OH-Vitamin D₃/D₂ in Plasma und Serum*

*For the determination of 24,25-(OH)₂-vitamin D₃
and 25-OH-vitamin D₃/D₂ in plasma and serum*

Gültig ab / Valid from 2021-11-18

REF KM1310



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 / KLINISCHE RELEVANZ	2
3. INHALT DER TESTPACKUNG	4
4. ERFORDERLICHE LABORGERÄTE UND HILFSMITTEL	5
5. LAGERUNG UND VORBEREITUNG DER REAGENZIEN	5
<i>Lagerung</i>	5
<i>Vorbereitung der Laufmittel und Testreagenzien</i>	5
<i>Vorbereitung der Kalibratoren, Kontrollen und des internen Standards</i>	6
6. PROBENVORBEREITUNG	6
7. LC-MS/MS-METHODE	7
8. AUSWERTUNG	7
9. MUSTERCHROMATOGRAMME	8
<i>25-OH-Vitamin D₃</i>	8
<i>24,25-(OH)₂-Vitamin D₃</i>	9
<i>25-OH-Vitamin D₂</i>	10
10. EINSCHRÄNKUNGEN	11
11. QUALITÄTSKONTROLLE	11
<i>Referenzwerte</i>	11
12. TESTCHARAKTERISTIKA	12
<i>Richtigkeit und Präzision</i>	12
<i>Sensitivität / Quantifizierungsgrenze (LLOQ)</i>	12
13. VORSICHTSMASSNAHMEN	13
14. ENTSORGUNG	13
15. TECHNISCHE MERKMALE	13
16. ALLGEMEINE HINWEISE ZUM TEST	14
17. LITERATUR	14

1. VERWENDUNGSZWECK

Bei ImmuTube® Vitamin D duo LC-MS/MS handelt es sich um einen Assay zur Quantifizierung der Vitamin-D-Metaboliten 24,25-Dihydroxyvitamin D₃ und 25-Hydroxyvitamin D₃/D₂ in menschlichem Serum und Plasma nach Immunitätsanreicherung mittels LC-MS/MS. Der Assay ist ein *In-vitro*-Diagnostikum für den manuellen Gebrauch durch professionelles Laborpersonal. Er dient der 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 / KLINISCHE RELEVANZ

Vitamin D wird entweder in der Haut (unter Einfluss von UV-Licht) aus Vorläufermolekülen gebildet oder aus der Nahrung aufgenommen. In der Leber entsteht daraus die Speicherform des Vitamin D, das 25-Hydroxyvitamin D, während in den Nieren durch einen zweiten Hydroxylierungsschritt anschließend entweder das aktive 1,25-Dihydroxyvitamin D oder das inaktive 24,25-Dihydroxyvitamin D gebildet werden kann.

Das für die Bildung des inaktiven 24,25-Dihydroxyvitamin D verantwortliche Enzym, die 24-Hydroxylase, gehört zu der Cytochrom-P450-Superfamilie und wird von dem Gen *CYP24A1* codiert. Die 24-Hydroxylase wird gegenläufig zur 1 α -Hydroxylase (*CYP27B1*) reguliert und hat so indirekt einen regulierenden Einfluss auf die Konzentration von 1,25-Dihydroxyvitamin D, der aktiven Form des Vitamin D.

Die 1 α -Hydroxylase reguliert die Serumkonzentration von 1,25-Dihydroxyvitamin D normalerweise sehr eng, angepasst an die Erfordernisse des Stoffwechsels. Erst bei einem ausgeprägten Vitamin-D-Mangel wird auch die Serumkonzentration von 1,25-Dihydroxyvitamin D absinken.

Ursachen für einen Mangel an 1,25-Dihydroxyvitamin D können Metabolisierungsstörungen entweder aufgrund genetischer Defekte der 1 α -Hydroxylase (selten) oder aufgrund von Nierenfunktionsstörungen (häufiger) sein. Bereits bei leicht eingeschränkter Nierenfunktion kommt es zu einem Abfall der Konzentrationen von 1,25-Dihydroxyvitamin D und 24,25-Dihydroxyvitamin D.

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

Eine unphysiologische Anhäufung von 25-Hydroxyvitamin D und 1,25-Dihydroxyvitamin D tritt unter anderem bei einer Mutation des *CYP24A1*-Gens auf, da ein Überangebot von 25-Hydroxyvitamin D nicht mehr in 24,25-Dihydroxyvitamin D umgewandelt wird.

Daher sollte zur Beurteilung des Vitamin-D-Status neben 25-Hydroxyvitamin D und 1,25-Dihydroxyvitamin D auch 24,25-Dihydroxyvitamin D quantifiziert werden.

Bei einer ausreichenden Versorgung mit Vitamin D korreliert die Serum-24,25-Dihydroxy-Vitamin-D-Konzentration eng mit der Serum-25-Hydroxyvitamin-D-Konzentration. Um das Ansprechen auf eine Vitamin-D-Supplementierung mit Ergocalciferol (Vitamin D₂) oder Cholecalciferol (Vitamin D₃) besser beurteilen zu können, ist es daher sinnvoll das Vitamin-D-Metabolit-Verhältnis (VMR) aus 24,25-Dihydroxyvitamin D / 25-Hydroxyvitamin D zu betrachten. Die VMR bleibt von individuellen Schwankungen wie z. B. der Ethnizität unbeeinflusst und erlaubt so eine sicherere Beurteilung der aktuellen 25-Hydroxyvitamin-D-Konzentration.

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
- Hypercalciämie

3. INHALT DER TESTPACKUNG

Art.-Nr.	Bezeichnung	Kit-Komponenten	Menge
KM0001	ACTSOL	Aktivierungslösung	1,5 ml
KM0002	RECSOL	Rekonstitutionslösung	15 ml
KM0003	WASHSOL	Waschlösung	80 ml
KM1300	CAL1–6	Kalibratoren 1–6, lyophilisiert (Konzentration siehe Produktspezifikation)	Je 1 Fläschchen (à 250 µl) pro Level
	CTRL1–3	Kontrollen 1–3, lyophilisiert (Konzentration siehe Produktspezifikation)	Je 1 Fläschchen (à 250 µl) pro Level
	ELUSOL	Elutionslösung	11 ml
	INTSTD	Interner Standard, konzentriert	1,1 ml
	MOPHAA	Laufmittel A	400 ml
	MOPHAB	Laufmittel B	400 ml
	PURSOL	Aufreinigungslösung	4 ml
KM1310	COLUMNS	ImmuTube®-Säulen zur Extraktion des 25-OH-Vitamin D ₃ /D ₂ und 24,25-(OH) ₂ - Vitamin D ₃	50 Stück

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

Folgendes Zubehör kann für die ImmuTube® Vitamin D duo-LC-MS/MS-Applikation bei Immundiagnostik AG separat bestellt werden:

- Tuninglösung für die Analyten (KM1300TU)
- Tuninglösung für den internen Standard (KM1300TS)
- ImmuTube® Vitamin D duo LC-MS/MS Extraktionskit (KM1311)
- UPLC-Säule (KM1300SP)
- Vorfilter (KM1300IF)
- Vorfilter-Halter (KM1300IH)

Bitte fordern Sie unsere Einzelkomponentenpreisliste an.

4. ERFORDERLICHE LABORGERÄTE UND HILFSMITTEL

- Vortex-Mixer
- 2 ml und 1,5 ml Reaktionsgefäße (z. B. Eppendorf)
- Präzisionspipetten und Einmalpipettenspitzen mit variablen Volumina von 10–1 000 µl
- LC-MS/MS-System
- Überkopfschüttler
- LC-MS Probenvials oder 96-Well Platte (z. B. 96-well sample collection plate von Waters)
- Zentrifuge

5. LAGERUNG UND VORBEREITUNG DER REAGENZIEN

Lagerung

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

Achtung: Die Kalibratoren (CAL1–6) und Kontrollen (CTRL1–3) sollten nicht wiederholt eingefroren werden.

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

Vorbereitung der Laufmittel und Testreagenzien

Die Laufmittel (MOPHAA und MOPHAB) müssen vor Gebrauch mit Aktivierungs-lösung (ACTSOL) anhand folgender Tabelle aktiviert werden:

Komponente		ACTSOL [µl]
Bezeichnung	[ml]	
Laufmittel A (MOPHAA)	400	+
Laufmittel B (MOPHAB)	400	

Die Laufmittel sollten vor Verwendung entgast werden.

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 sein.

Hinweis: Nach Aktivierung mit der Aktivierungslösung (ACTSOL) sind die Komponenten Laufmittel A (MOPHAA) und Laufmittel B (MOPHAB) für bis zu 2 Wochen haltbar. Es wird daher empfohlen, nur soviel herzustellen wie für den Testansatz benötigt wird.

Vorbereitung der Kalibratoren, Kontrollen und des internen Standards

Die Kalibratoren (CAL1–6) und die Kontrollen (CTRL1–3) werden in je 250 µl Rekonstitutionslösung (RECSOL) gelöst. Die Konzentration der Kalibratoren ändert sich geringfügig von Charge zu Charge; der genaue Gehalt ist auf der Produktspezifikation angegeben.

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

Hinweis: Nach Rekonstitution mit der Rekonstitutionslösung (RECSOL) können die Kalibratoren (CAL1–6) und die Kontrollen (CTRL1–3) nicht gelagert werden.

6. PROBENVORBEREITUNG

Als Probenmaterial kann Serum und Plasma verwendet werden. Die Proben sollten bis zu ihrer Messung bei -20 °C gelagert werden. Bei -20 °C gelagerte Proben sind mindestens vier Wochen stabil.

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

Vor Gebrauch Reagenzien und Proben gut mischen.

Die Qualitätskontrollen sollten immer mitgemessen werden.

1.	ImmuTubes® vorsichtig vortexen und kurz zentrifugieren (30 s bei 500–1 000 rpm), damit die enthaltene Suspension nicht im Deckel verbleibt.
3.	50 µl Kalibrator (CAL), Kontrolle (CTRL) oder Probe und zusätzlich 50 µl verdünnten internen Standard (INTSTD verdünnt mit PURSOL) zügig in die ImmuTubes® pipettieren, ImmuTubes® gut verschließen und vorsichtig mischen.
3.	Inkubation für 30 min bei Raumtemperatur im Überkopfschüttler (15–20 rpm).

4.	Verschlossene ImmuTubes® in 2 ml Reaktionsgefäße setzen und 1 min bei 550 g zentrifugieren.
5.	ImmuTubes® am Auslass öffnen, dann den Deckel abschrauben und 2 min bei 550 g bis zum Eintrocknen zentrifugieren; den Durchlauf verwerfen.
6.	500 µl Waschlösung (WASHSOL) hinzu pipettieren und 2 min bei 550 g bis zum Eintrocknen zentrifugieren; den Durchlauf verwerfen. Diesen Waschschrift insgesamt dreimal durchführen.
7.	ImmuTubes® in frische 1,5 ml Reaktionsgefäße setzen.
8.	Elution mit 150 µl Elutionslösung (ELUSOL) bei 2 min und 550 g; das Eluat in den Reaktionsgefäßen sammeln.
9.	ImmuTubes® verwerfen.
10.	Das Eluat mit 50 µl Waschlösung (WASHSOL) versetzen, Reaktionsgefäße verschließen und kurz durch Vortexen mischen.
11.	Überführen der Lösung in ein geeignetes Probenvial oder 96-Well Platte für das LC-MS/MS-System.
12.	Injektion in das LC-MS/MS-System (siehe <i>Application Note</i>).

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.

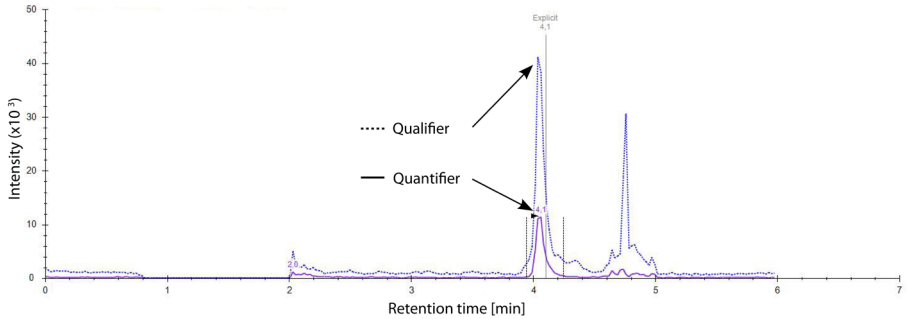
8. AUSWERTUNG

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

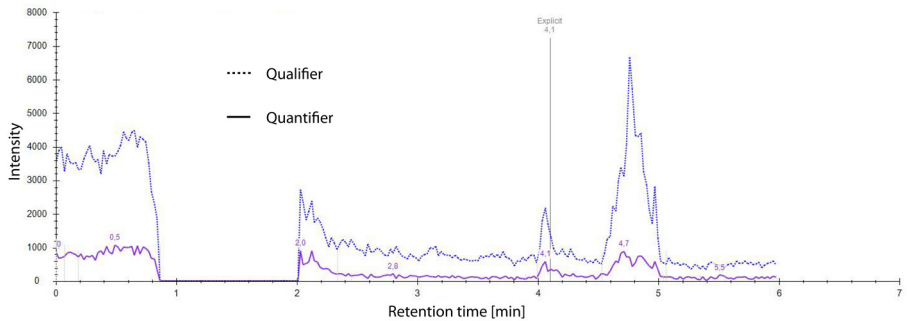
9. MUSTERCHROMATOGRAMME

25-OH-Vitamin D₃

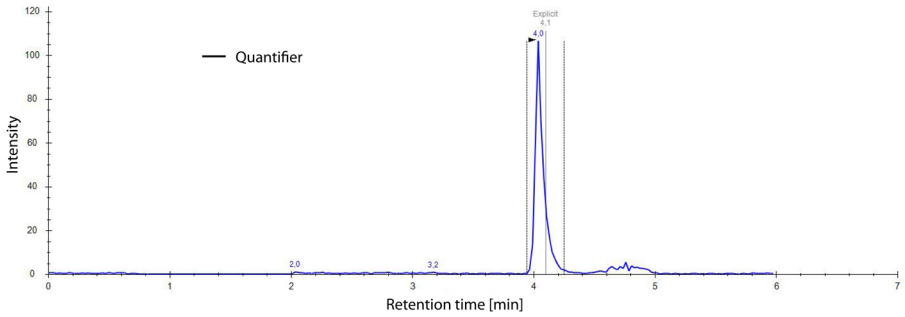
CAL1



Blank

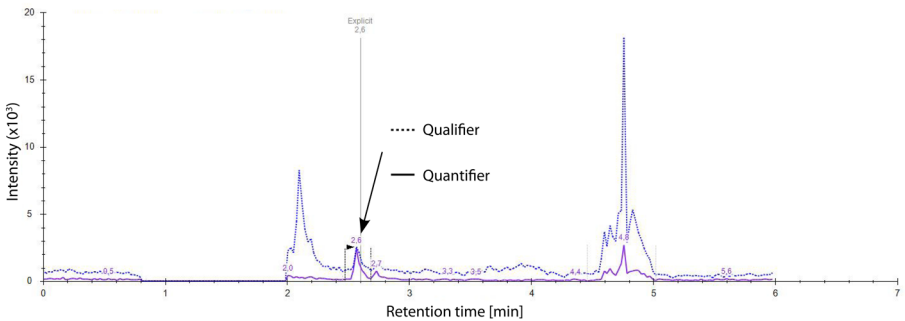


Interner Standard

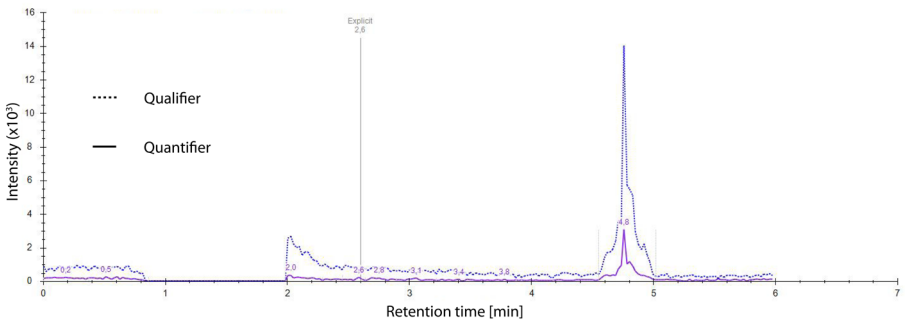


24,25-(OH)₂-Vitamin D₃

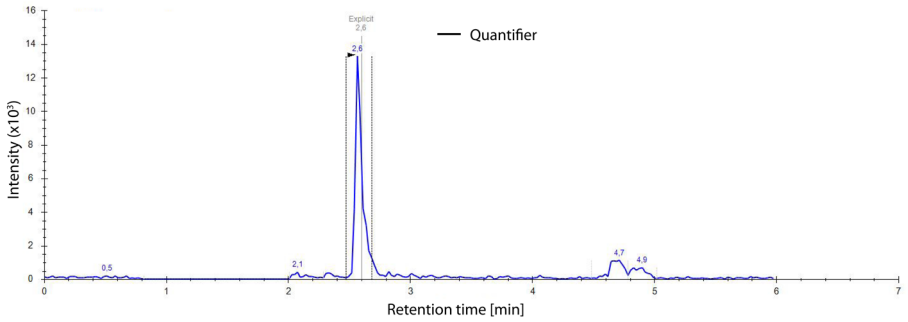
CAL1



Blank

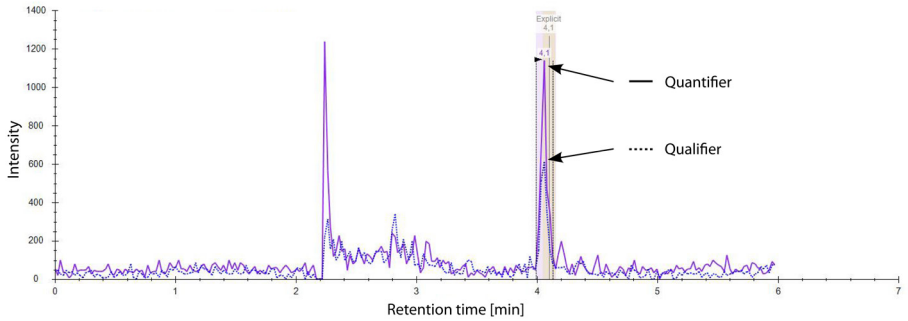


Interner Standard

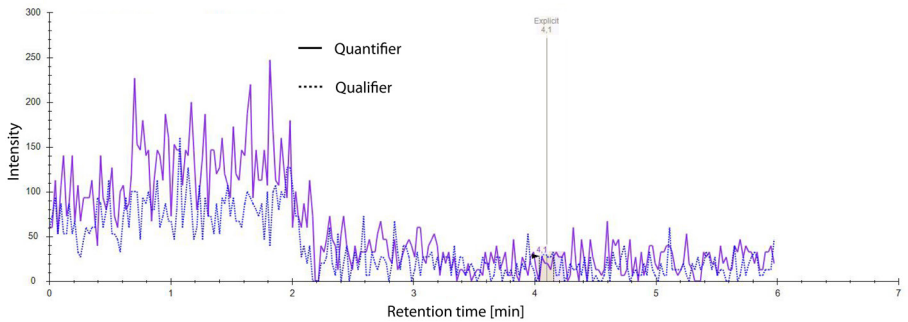


25-OH-Vitamin D₂

CAL1



Blank



10. EINSCHRÄNKUNGEN

Die Richtigkeit der Messung kann bei lipämischen oder hämolytischen Blutproben nicht gewährleistet werden.

11. QUALITÄTSKONTROLLE

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

Referenzwerte

Dirks *et al.* (2019) untersuchten 92 Personen (50% Frauen) im Alter von 20–71 Jahren und ermittelten folgende Referenzbereiche:

24,25-(OH) ₂ -Vitamin D ₃	0,16–3,56 ng/ml
25-OH-Vitamin D ₃	4,8–48,8 ng/ml
25-OH-Vitamin D ₃ /24,25-(OH) ₂ -Vitamin-D ₃ -Verhältnis	10–33

Wir empfehlen jedem Labor, einen eigenen Referenzbereich zu etablieren.

Hinweis: Die Produktion von Vitamin D in der Haut ist hoch variabel und abhängig von Jahres- und Tageszeit, Breitengrad, Alter, Sonnenschutz u. a.

Die Referenzbereiche sind von der verwendeten Untersuchungsmethode abhängig (z. B. Vitamin-D-Freisetzung vom Vitamin-D-Bindeprotein, VDBP) und können daher nur zur Orientierung dienen.

25-OH-Vitamin D₂ 1,54 ng/ml

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

13. VORSICHTSMASSNAHMEN

- Qualitätskontrollen sollten immer mitgemessen werden.
- Das für Kitkomponenten verwendete humane Material wurde auf HIV, Hepatitis B und Hepatitis C getestet und für negativ befunden. Dennoch wird empfohlen, die Kitkomponenten als Vorsichtsmaßnahme immer wie potentiell infektiöses Material zu behandeln.
- Es sind die auf den Einzelkomponenten angegebenen GHS-Symbole und Spezifikationen der Sicherheitsdatenblätter (auf Anfrage bei Immunodiagnostik AG erhältlich) zu beachten. Beim Arbeiten mit diesen Reagenzien sind die gesetzlichen Schutzvorkehrungen einzuhalten.

14. ENTSORGUNG

Laufmittel (MOPHAA, MOPHAB), Aktivierungslösung (ACTSOL), Waschlösung (WASHSOL), Aufreinigungslösung (PURSOL) 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.

15. TECHNISCHE MERKMALE

- Der Assay ist immer nach der dem Kit beigefügten Arbeitsanleitung durchzuführen.
- Reagenzien der Kitpackung dürfen nicht mit anderen Chargen gemischt werden.
- Die Reagenzien dürfen nach Ablauf des auf der Kitverpackung angegebenen Haltbarkeitsdatums nicht mehr verwendet werden.
- Stopfen und Verschlüsse verschiedener Reagenzien dürfen nicht vertauscht werden.

16. ALLGEMEINE HINWEISE ZUM TEST












- Dieser Kit wurde nach der IVD-Richtlinie 98/79/EG hergestellt und in den Verkehr gebracht.
- ImmuTube® 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.
- 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.
- 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.

17. LITERATUR

1. Chapuy MC, Schott AM, Garnero P, Hans D, Delmas PD, Meunier PJ. Healthy elderly French women living at home have secondary hyperparathyroidism and high bone turnover in winter. EPIDOS Study Group. *J Clin Endocrinol Metab.* 1996;**81**(3):1129-1133.
2. Scharla SH. Prevalence of subclinical vitamin D deficiency in different European countries. *Osteoporos Int.* 1998;**8** Suppl 2:S7-S12.
3. Grant WB, Holick MF. Benefits and requirements of vitamin D for optimal health: a review. *Altern Med Rev.* 2005;**10**(2):94-111.
4. Visser M, Deeg DJ, Puts MT, Seidell JC, Lips P. Low serum concentrations of 25-hydroxyvitamin D in older persons and the risk of nursing home admission. *Am J Clin Nutr.* 2006;**84**(3):616-672.

5. Wicherts IS, van Schoor NM, Boeke AJ, *et al.* Vitamin D status predicts physical performance and its decline in older persons. *J Clin Endocrinol Metab.* 2007;**92**(6):2058-2065.
6. Wielders JP, Wijnberg FA. Preanalytical stability of 25(OH)-vitamin D3 in human blood or serum at room temperature: solid as a rock. *Clin Chem.* 2009;**55**(8):1584-1585.
7. Soldin OP, Sharma H, Husted L, Soldin SJ. Pediatric reference intervals for aldosterone, 17alpha-hydroxyprogesterone, dehydroepiandrosterone, testosterone and 25-hydroxy vitamin D3 using tandem mass spectrometry. *Clin Biochem.* 2009;**42**(9):823-827.
8. Dirks NF, Ackermans MT, de Jonge R, Heijboer AC. Reference values for 24,25-dihydroxyvitamin D and the 25-hydroxyvitamin D/24,25-dihydroxyvitamin D ratio. *Clin Chem Lab Med.* 2019;**57**(10):e259-e261.
9. Berg AH, Powe CE, Evans MK, *et al.* 24,25-Dihydroxyvitamin d3 and vitamin D status of community-dwelling black and white Americans. *Clin Chem.* 2015;**61**(6):877-884.
10. Cavalier E, Huyghebaert L, Rousselle O, *et al.* Simultaneous measurement of 25(OH)-vitamin D and 24,25(OH)₂-vitamin D to define cut-offs for CYP24A1 mutation and vitamin D deficiency in a population of 1200 young subjects. *Clin Chem Lab Med.* 2020;**58**(2):197-201.
11. Shieh A, Ma C, Chun RF, *et al.* Associations Between Change in Total and Free 25-hydroxyvitamin D With 24,25-Dihydroxyvitamin D and Parathyroid Hormone. *J Clin Endocrinol Metab.* 2018;**103**(9):3368-3375.
12. Melamed ML, Chonchol M, Gutiérrez OM, *et al.* The Role of Vitamin D in CKD Stages 3 to 4: Report of a Scientific Workshop Sponsored by the National Kidney Foundation. *Am J Kidney Dis.* 2018;**72**(6):834-845.

Verwendete Symbole:

	Temperaturbegrenzung		Bestellnummer
	<i>In-Vitro</i> -Diagnostikum		Zu verwenden mit
	Hersteller		Inhalt ausreichend für <n> Prüfungen
	Chargenbezeichnung		Verwendbar bis
	Achtung		Gebrauchsanweisung beachten
	Spezifikationsdatenblatt beachten		

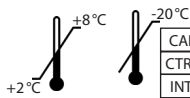
ImmuTube[®] Vitamin D duo LC-MS/MS kit

*For the determination of 24,25-(OH)₂-vitamin D₃
and 25-OH-vitamin D₃/D₂ in plasma and serum*

Valid from 2021-11-18



KM1310



CAL1-6
CTRL1-3
INTSTD



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 AND CLINICAL RELEVANCE	19
3. MATERIAL SUPPLIED	21
4. MATERIAL REQUIRED BUT NOT SUPPLIED	22
5. STORAGE AND PREPARATION OF REAGENTS	22
<i>Storage</i>	22
<i>Preparation of mobile phases and test reagents</i>	22
<i>Preparation of calibrators, controls and internal standard</i>	23
6. SAMPLE PREPARATION	23
7. LC-MS/MS METHOD	24
8. CALCULATION OF THE RESULTS	24
9. EXAMPLES OF CHROMATOGRAMS	25
<i>25-OH-vitamin D₃</i>	25
<i>24,25-(OH)₂-vitamin D₃</i>	26
<i>25-OH-vitamin D₂</i>	27
10. LIMITATIONS	28
11. QUALITY CONTROL	28
<i>Reference ranges</i>	28
12. PERFORMANCE CHARACTERISTICS	28
<i>Accuracy and precision</i>	28
<i>Sensitivity/limit of quantification (LLOQ)</i>	29
13. PRECAUTIONS	29
14. DISPOSAL	30
15. TECHNICAL HINTS	30
16. GENERAL NOTES ON THE TEST AND TEST PROCEDURE	30
17. REFERENCES	31

1. INTENDED USE

ImmuTube® vitamin D duo LC-MS/MS is an assay for the quantification of the vitamin D metabolites 24,25-dihydroxyvitamin D₃ and 25-hydroxyvitamin D₃/D₂ in human serum and plasma after immunoaffinity enrichment by LC-MS/MS. The assay is an *in vitro* diagnostic tool for manual use by professional laboratory staff. 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 AND CLINICAL RELEVANCE

Vitamin D is either formed in the skin (under the influence of UV light) from precursor molecules or ingested from food. The 25-hydroxylated storage form of vitamin D, is formed in the liver while a second hydroxylation in the kidney can subsequently form the active 1,25-dihydroxyvitamin D or the inactive 24,25-dihydroxyvitamin D.

The enzyme responsible for the formation of the inactive 24,25-dihydroxyvitamin D, 24-hydroxylase, belongs to the cytochrom-P450 superfamily and is encoded by the gene *CYP24A1*. The 24-hydroxylase is regulated in the opposite direction to the 1 α -hydroxylase (*CYP27B1*) and therefore has an indirect regulatory effect on the concentration of the active form 1,25-dihydroxyvitamin D.

The 1 α -hydroxylase normally regulates the concentration of 1,25-dihydroxyvitamin D in the serum very strictly adapted to the requirements of the metabolism. The concentration of 1,25-dihydroxyvitamin D in the serum will only decrease in the case of a pronounced vitamin D deficiency.

Reasons for an deficiency of 1,25-dihydroxyvitamin D can be metabolic disorders either due to genetic defects of the 1 α -hydroxylase (rare) or due to renal dysfunction (more frequent). Even a slightly impaired kidney function leads to a decrease of the 1,25-dihydroxyvitamin D and 24,25-dihydroxyvitamin D concentration.

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

An unphysiological accumulation of 25-hydroxyvitamin D and 1,25-dihydroxyvitamin D occurs, among other things, in case of a mutation of the *CYP24A1* gene since an excess of 25-hydroxyvitamin D is no longer converted to 24,25-dihydroxyvitamin D.

Therefore, 24,25-dihydroxyvitamin D should be quantified beside 25-hydroxyvitamin D and 1,25-dihydroxyvitamin D for an evaluation of the vitamin D status.

The concentration of 24,25-dihydroxyvitamin D in the serum correlates closely with the concentration of 25-hydroxyvitamin D in the serum in case of a sufficient supply with vitamin D. In order to evaluate the response of a vitamin D supplementation with ergocalciferol (vitamin D₂) or cholecalciferol (vitamin D₃) it is useful to study the vitamin D metabolite ratio (VMR) of 24,25-dihydroxyvitamin D and 25-hydroxyvitamin D. The VMR remains unaffected by individual variations such as e.g. ethnicity and thus allows a more reliable evaluation of the current 25-hydroxyvitamin D concentration.

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 SUPPLIED

Cat. no.	Label	Kit components	Amount
KM0001	ACTSOL	Activation-solution	1.5 ml
KM0002	RECSOL	Reconstitution solution	15 ml
KM0003	WASHSOL	Washing solution	80 ml
KM1300	CAL1–6	Calibrators 1–6, lyophilised (see product specification for concentrations)	1 vial (à 250 µl) per calibrator level each
	CTRL1–3	Controls 1–3, lyophilised (see product specification for concentrations)	1 vial (à 250 µl) per calibrator level each
	ELUSOL	Elution solution	11 ml
	INTSTD	Internal standard, concentrate	1.1 ml
	MOPHAA	Mobile phase A	400 ml
	MOPHAB	Mobile phase B	400 ml
	PURSOL	Purification solution	4 ml
KM1310	COLUMNS	ImmuTube® columns for extraction of 25-OH-vitamin D ₃ /D ₂ and 24,25-(OH) ₂ - vitamin D ₃	50 pieces

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

The following accessories for the ImmuTube® Vitamin D duo LC-MS/MS application can be ordered separately at Immundiagnostik AG:

- tuning solution for the analytes (KM1300TU)
- tuning solution for the internal standard (KM1300TS)
- ImmuTube® Vitamin D duo LC-MS/MS extraction kit (KM1311)
- UPLC column (KM300SP)
- in-line filter (KM1300IF)
- in-line filter holder (KM1300IH)

Please ask for our single component price list.

4. MATERIAL REQUIRED BUT NOT SUPPLIED

- Vortex mixer
- 2 ml and 1.5 ml reaction tubes (e.g. Eppendorf)
- Precision pipettes and disposable tips to deliver 10–1 000 µl
- LC-MS/MS system
- Overhead rotator
- LC-MS sample vials or 96-well plate (e.g. 96-well sample collection plate from Waters)
- Centrifuge

5. STORAGE AND PREPARATION 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 other components: 2–8°C). The test reagents stored in this way are usable until the indicated expiry date.

Attention: Do not repeatedly freeze and thaw the calibrators (CAL1–6) and controls (CTRL1–3).

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

Preparation of mobile phases and test reagents

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

Component			ACTSOL [µl]
Label	[ml]		
Mobile phase A (MOPHAA)	400	+	400
Mobile phase B (MOPHAB)	400		400

Prior use mobile phases should be degassed.

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.

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

Preparation of calibrators, controls and internal standard

Dissolve calibrators (CAL1–6) and controls (CTRL1–3) in each 250 µl of reconstitution solution (RECSOL). The concentration of the calibrators may slightly vary among different batches; the exact concentration is listed on the product specification.

The concentrate of the internal standard (INTSTD) is diluted with purification solution (PURSOL) in a ratio of 1:5 immediately before use (e.g. 0.5 ml INTSTD with 2.0 ml PURSOL). It is recommended to prepare only as much as is needed for the test approach (50 µl per sample).

Note: the calibrators (CAL1–6) and controls (CTRL1–3) are not stable after reconstitution with the reconstitution solution (RECSOL).

6. SAMPLE PREPARATION

Serum and plasma can be used as a sample. The samples should be stored at -20 °C until testing. Samples are stable for at least four weeks when stored at -20 °C.

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.

Control samples should be analysed with each run.

1.	Vortex ImmuTubes® carefully and centrifuge (30 s at 500–1 000 rpm) that no suspension remains in the lid.
2.	Put 50 µl calibrator (CAL), control (CTRL) or sample and additionally 50 µl diluted internal standard (INTSTD diluted with PURSOL) quickly into the ImmuTubes®, close thoroughly and mix carefully.
3.	Incubation for 30 min at room temperature in an overhead rotator (15–20 rpm).
4.	Place closed ImmuTubes® in 2 ml reaction tubes and centrifuge for 1 min at 550 g.
5.	Open the outlet of the ImmuTubes®, then the lid and centrifuge for 2 min at 550 g to dryness; discard the flowthrough.
6.	Add 500 µl of wash solution (WASHSOL) and centrifuge for 2 min at 550 g to dryness; discard the flowthrough. Carry out this wash step three times in total.
7.	Place ImmuTubes® in new 1.5 ml reaction tubes.

8.	Elution with 150 µl elution solution (ELUSOL) for 2 min at 550 g; collect the eluate.
9.	Discard ImmuTubes®.
10.	Add 50 µl wash solution (WASHSOL), close reaction tube and vortex for short.
11.	Transfer of the solution into a suitable sample vial or 96-well plate for the LC-MS/MS system.
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.

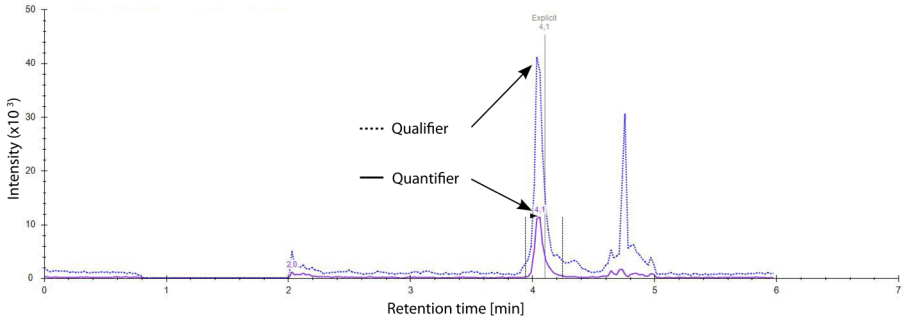
8. CALCULATION OF THE RESULTS

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). This can then be used to calculate the concentration of the samples and controls via the peak area.

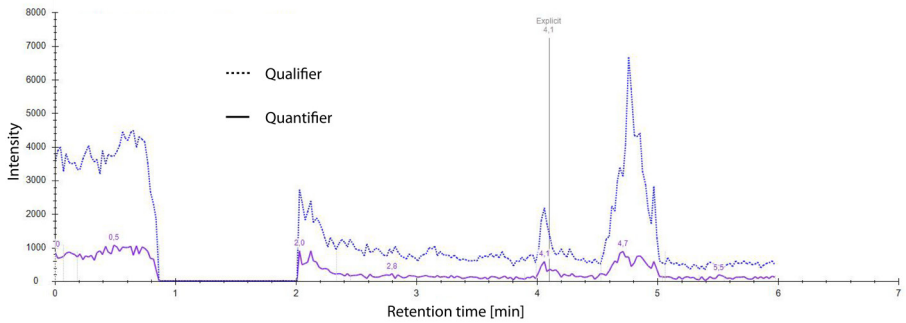
9. EXAMPLES OF CHROMATOGRAMS

25-OH-vitamin D₃

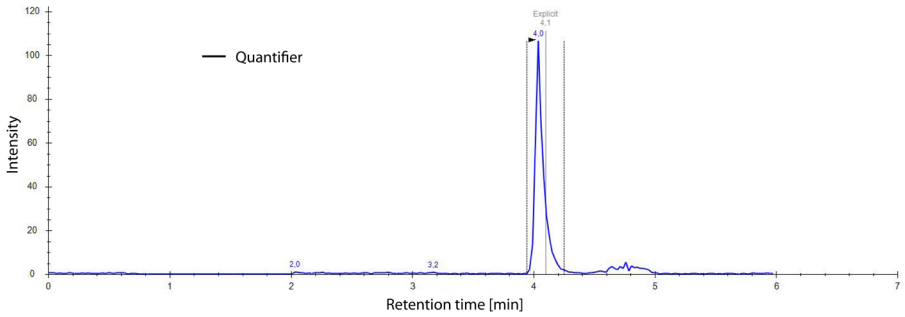
CAL1



Blank

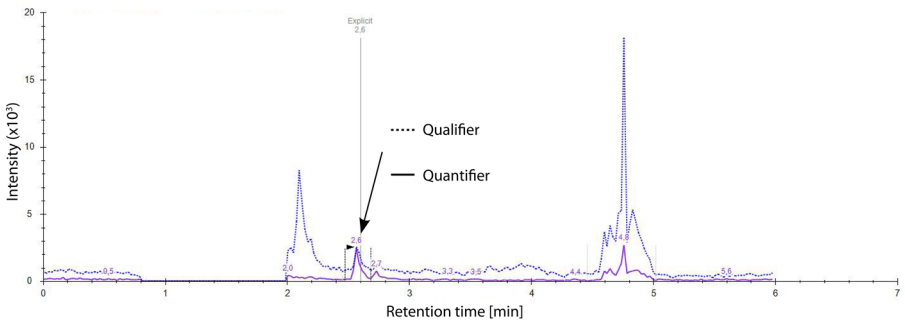


Internal standard

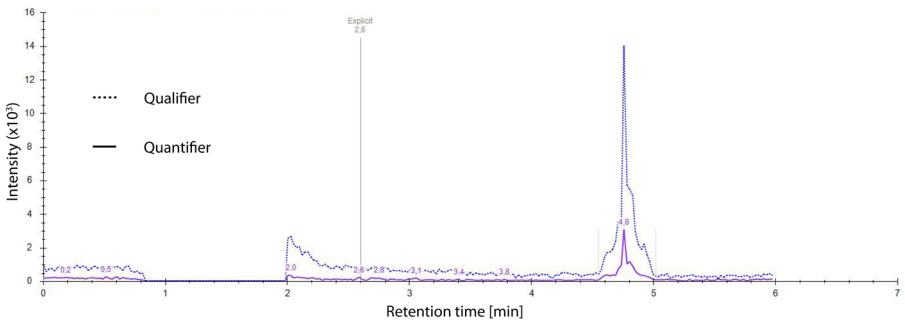


24,25-(OH)₂-vitamin D₃

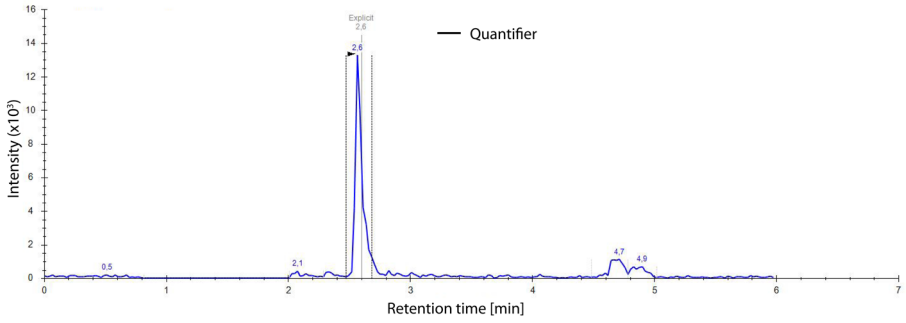
CAL1



Blank

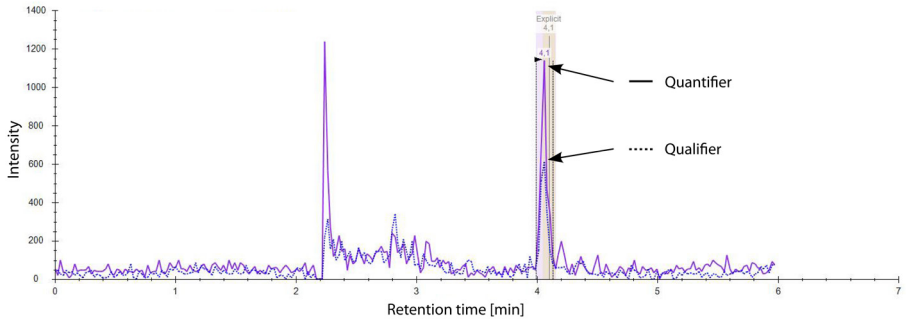


Internal standard

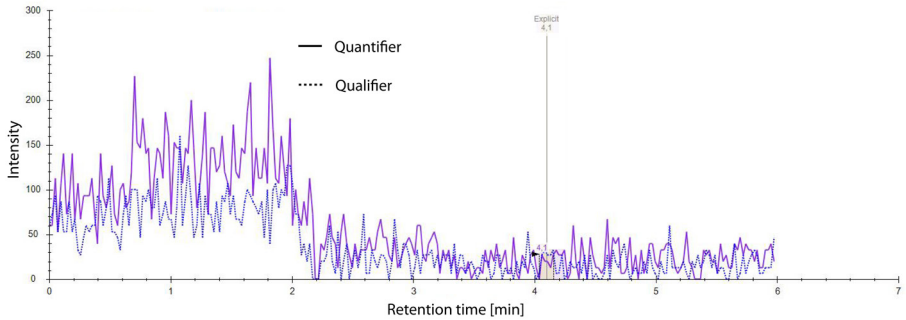


25-OH-vitamin D₂

CAL1



Blank



10. LIMITATIONS

The trueness of the measurement cannot be guaranteed with lipaemic or haemolytic blood samples.

11. QUALITY CONTROL

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

Reference ranges

Dirks *et al.* (2019) examined 92 individuals (50% women) aged 20–71 years and identified the following reference ranges

24,25-(OH) ₂ -vitamin D ₃	0.16–3.56 ng/ml
25-OH-vitamin D ₃	4.8–48.8 ng/ml
25-OH-vitamin D ₃ /24,25-(OH) ₂ -vitamin D ₃ ratio	10–33

We recommend each laboratory to establish its own reference range.

Note: The vitamin D production in the skin is high variable and depends on the season and daily time, degree of latitude, age, sun protection etc.

The reference ranges depend on the method used (e.g. vitamin D release from the vitamin D binding protein, VDBP) and therefore serve only as an orientation.

12. PERFORMANCE CHARACTERISTICS

Accuracy and precision

25-OH-vitamin D₃

Sample [ng/ml]	Accuracy		Precision	
	intra-day (n=5)	inter-day (n=18)	intra-day (n=5)	inter-day (n=18)
5.18	93.4%	92.0%	4.3%	4.3%
24.96	101.5%	100.9%	2.0%	3.0%
57.18	109.8%	108.3%	3.4%	3.3%

24,25-(OH)₂-vitamin D₃

Sample [ng/ml]	Accuracy		Precision	
	intra-day (n=5)	inter-day (n=18)	intra-day (n=5)	inter-day (n=18)
0.36	101.0%	102.7%	6.9%	6.3%
3.91	101.7%	101.3%	2.2%	2.6%
9.35	102.6%	102.8%	1.7%	1.8%

25-OH-vitamin D₂

Sample [ng/ml]	Accuracy		Precision	
	intra-day (n=5)	inter-day (n=18)	intra-day (n=5)	inter-day (n=18)
1.54	103.1%	101.3%	7.5%	8.3%
3.95	105.3%	101.7%	6.5%	6.5%
9.25	101.6%	99.3%	5.4%	4.9%

Sensitivity/limit of quantification (LLOQ)

The lower limit of quantification (LLOQ) refers to the lowest concentration of the analyte that can still be quantified.

25-OH-vitamin D₃ 5.18 ng/ml

24,25-(OH)₂-vitamin D₃ 0.36 ng/ml

25-OH-vitamin D₂ 1.54 ng/ml

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

13. PRECAUTIONS

- Control samples should be analysed with each run.
- Human material used in the kit components was tested and found to be negative for HIV, hepatitis B and hepatitis C. However, for safety reasons, all kit components should be treated as potentially infectious.
- The GHS symbols indicated on the individual components and specifications of the material safety data sheets (available on request from Immun-

diagnostik AG) must be noted. When working with these reagents, the legal protective precautions must be adhered to.

14. DISPOSAL

The mobile phases (MOPHAA, MOPHAB), activation solution (ACTSOL), washing solution (WASHSOL) purification solution (PURSOL) and elution solution (ELUSOL) must be disposed as non-halogenated solvent. The calibrators (CAL1–6) and controls (CTRL1–3) should be disposed due to their treatment as potentially infectious material in accordance with local regulations.

15. TECHNICAL HINTS

- The assay should always be performed according to the enclosed manual.
- Components of the kit package should not be mixed with other kit packages.
- Reagents should not be used beyond the expiration date stated on the kit label.
- Plugs and caps of different reagents should not be swapped.

16. GENERAL NOTES ON THE TEST AND TEST PROCEDURE

- This assay was produced and distributed according to the IVD guidelines of 98/79/EC.
- ImmuTube® is a brand 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 incorrect use.
- 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.

17. REFERENCES

1. Chapuy MC, Schott AM, Garnero P, Hans D, Delmas PD, Meunier PJ. Healthy elderly French women living at home have secondary hyperparathyroidism and high bone turnover in winter. EPIDOS Study Group. *J Clin Endocrinol Metab.* 1996;**81**(3):1129-1133.
2. Scharla SH. Prevalence of subclinical vitamin D deficiency in different European countries. *Osteoporos Int.* 1998;**8** Suppl 2:S7-S12.
3. Grant WB, Holick MF. Benefits and requirements of vitamin D for optimal health: a review. *Altern Med Rev.* 2005;**10**(2):94-111.
4. Visser M, Deeg DJ, Puts MT, Seidell JC, Lips P. Low serum concentrations of 25-hydroxyvitamin D in older persons and the risk of nursing home admission. *Am J Clin Nutr.* 2006;**84**(3):616-672.
5. Wicherts IS, van Schoor NM, Boeke AJ, et al. Vitamin D status predicts physical performance and its decline in older persons. *J Clin Endocrinol Metab.* 2007;**92**(6):2058-2065.
6. Wielders JP, Wijnberg FA. Preanalytical stability of 25(OH)-vitamin D3 in human blood or serum at room temperature: solid as a rock. *Clin Chem.* 2009;**55**(8):1584-1585.
7. Soldin OP, Sharma H, Husted L, Soldin SJ. Pediatric reference intervals for aldosterone, 17alpha-hydroxyprogesterone, dehydroepiandrosterone, testosterone and 25-hydroxy vitamin D3 using tandem mass spectrometry. *Clin Biochem.* 2009;**42**(9):823-827.
8. Dirks NF, Ackermans MT, de Jonge R, Heijboer AC. Reference values for 24,25-dihydroxyvitamin D and the 25-hydroxyvitamin D/24,25-dihydroxyvitamin D ratio. *Clin Chem Lab Med.* 2019;**57**(10):e259-e261.
9. Berg AH, Powe CE, Evans MK, et al. 24,25-Dihydroxyvitamin d3 and vitamin D status of community-dwelling black and white Americans. *Clin Chem.* 2015;**61**(6):877-884.
10. Cavalier E, Huyghebaert L, Rousselle O, et al. Simultaneous measurement of 25(OH)-vitamin D and 24,25(OH)2-vitamin D to define cut-offs for CYP24A1 mutation and vitamin D deficiency in a population of 1200 young subjects. *Clin Chem Lab Med.* 2020;**58**(2):197-201.

11. Shieh A, Ma C, Chun RF, et al. Associations Between Change in Total and Free 25-hydroxyvitamin D With 24,25-Dihydroxyvitamin D and Parathyroid Hormone. *J Clin Endocrinol Metab.* 2018;**103**(9):3368-3375.
12. Melamed ML, Chonchol M, Gutiérrez OM, et al. The Role of Vitamin D in CKD Stages 3 to 4: Report of a Scientific Workshop Sponsored by the National Kidney Foundation. *Am J Kidney Dis.* 2018;**72**(6):834-845.

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
	Attention		Consult instructions for use
	Consult specification data sheet		

Immundiagnostik AG

Stubenwald-Allee 8a
64625 Bensheim, Germany

Tel.: +49 6251 70190-0

Fax: +49 6251 70190-363

info@immundiagnostik.com

www.immundiagnostik.com

