

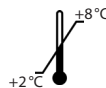
ImmuTube[®] Vitamin D duo LC-MS/MS Extraktionskit / extraction kit

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

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

Gültig ab / Valid from 2022-05-25

REF KM1311



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 / KLINISCHE RELEVANZ	2
3. INHALT DER TESTPACKUNG	3
4. ERFORDERLICHE LABORGERÄTE UND HILFSMITTEL	4
5. LAGERUNG UND VORBEREITUNG DER REAGENZIEN	4
<i>Lagerung</i>	4
<i>Vorbereitung der Reagenzien</i>	4
6. TESTDURCHFÜHRUNG	4
7. EINSCHRÄNKUNGEN	5
8. VORSICHTSMASSNAHMEN	5
9. ENTSORGUNG	6
10. TECHNISCHE MERKMALE	6
11. ALLGEMEINE HINWEISE ZUM TEST	6
12. LITERATUR	7

1. VERWENDUNGSZWECK

Bei ImmuTube® Vitamin D duo LC-MS/MS Extraktionskit handelt es sich um einen Kit zur Extraktion der Vitamin-D-Metaboliten 24,25-Dihydroxyvitamin D₃ und 25-Hydroxyvitamin D₃/D₂ aus menschlichem Serum und Plasma durch Immunaффinitätsanreicherung. Der Kit ist ein *In-vitro*-Diagnostikum für den manuellen Gebrauch durch professionelles Laborpersonal. Er dient zur Probenvorbereitung für die LC-MS/MS-basierte Ermittlung der Vitamin-D-Metaboliten-Zusammensetzung bei Patienten mit vermuteten Beeinträchtigungen des Vitamin-D-Metabolismus.

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
KM0003	WASHSOL	Waschlösung	80 ml
KM1300	ELUSOL	Elutionslösung	11 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:

- ImmuTube® Vitamin D duo LC-MS/MS Kit (KM1310)
- Tuninglösung für die Analyten (KM1300TU)
- Tuninglösung für den internen Standard (KM1300TS)
- 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
- Überkopfschüttler
- Ethanol, HPLC Gütegrad
- Zentrifuge

5. LAGERUNG UND VORBEREITUNG DER REAGENZIEN

Lagerung

Die Testreagenzien sollten lichtgeschützt, trocken und bei ihrer angegebenen Lager-temperatur (2–8 °C) gelagert werden. Die so gelagerten Testreagenzien sind bis zum angegebenen Verfallsdatum verwendbar.

Vorbereitung der Reagenzien

Die Aufreinigungslösung (PURSOL) wird unmittelbar vor Gebrauch mit 25 % Ethanol (v/v) versetzt (z. B. 2,0 ml PURSOL mit 0,5 ml Ethanol). Es wird empfohlen, nur soviel herzustellen wie für den Testansatz benötigt wird (50 µl pro Probe).

6. TESTDURCHFÜHRUNG

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.

Qualitätskontrollen sollten immer mitgeführt werden.

1.	ImmuTubes® vorsichtig vortexen und kurz zentrifugieren (30s bei 500–1000rpm), damit die enthaltene Suspension nicht im Deckel verbleibt.
2.	50µl Probe und zusätzlich 50µl verdünnte Aufreinigungslösung (PURSOL verdünnt mit Ethanol) zügig in die ImmuTubes® pipettieren, ImmuTubes® gut verschließen und vorsichtig mischen.
3.	Inkubation für 30min bei Raumtemperatur im Überkopfschüttler (15–20rpm).
4.	Verschlossene ImmuTubes® in 2ml Reaktionsgefäße setzen und 1min bei 550g zentrifugieren.
5.	ImmuTubes® am Auslass öffnen, dann den Deckel abschrauben und 2min bei 550g bis zum Eintrocknen zentrifugieren; den Durchlauf verwerfen.
6.	500µl Waschlösung (WASHSOL) hinzu pipettieren und 2min bei 550g bis zum Eintrocknen zentrifugieren; den Durchlauf verwerfen. Diesen Waschschrift insgesamt dreimal durchführen.
7.	ImmuTubes® in frische 1,5ml Reaktionsgefäße setzen.
8.	Elution mit 150µl Elutionslösung (ELUSOL) bei 2min und 550g; das Eluat in den Reaktionsgefäßen sammeln.
9.	ImmuTubes® verwerfen.

7. EINSCHRÄNKUNGEN

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

8. VORSICHTSMASSNAHMEN

- 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.

- Qualitätskontrollen sollten immer mitgeführt werden.

9. ENTSORGUNG

Waschlösung (WASHSOL), Aufreinigungslösung (PURSOL) und Elutionslösung (ELUSOL) müssen als halogenfreier Lösungsmittelabfall entsorgt werden.

10. 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.
- Die Einzelkomponenten des Kits sind maximal für die angegebene Anzahl an Testdurchführungen ausgelegt. Ein bereits verwendeter Anteil der Komponenten darf nicht wiederverwendet, sondern muss entsprechend den lokalen Richtlinien ordnungsgemäß entsorgt werden.

11. ALLGEMEINE HINWEISE ZUM TEST

- Dieser Kit wurde nach der Verordnung (EU) 2017/746 (IVDR) hergestellt und inverkehrgebracht.
- ImmuTube® ist eine Marke der Immundiagnostik AG.
- Alle im Kit enthaltenen Reagenzien dürfen ausschließlich zur *in-vitro*-Diagnostik verwendet werden.
- Diese Gebrauchsanweisung ersetzt die Version mit dem Stand 2021-11-18.
- 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 Immun-

diagnostik AG übernimmt für die hierdurch entstandenen Schäden und Folgeschäden keine Haftung.














- Schwerwiegende Vorkommnisse sind der Immundiagnostik AG und den nationalen Aufsichtsbehörden zu melden.
- Sollten eine oder mehrere Komponenten des Testkits beschädigt, unvollständig (siehe Liste der Testbestandteile) oder Präzipitate in den gebrauchsfertigen Lösungen sichtbar sein, kontaktieren Sie bitte Immundiagnostik AG.
- Bei Gewährleistungsansprüchen ist das beanstandete Material mit schriftlicher Erklärung innerhalb von 14 Tagen zum Hersteller, der Immundiagnostik AG, zurückzusenden.

12. 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
	In-Vitro-Diagnostikum		Zu verwenden mit
	Hersteller		Inhalt ausreichend für <n> Prüfungen
	Chargenbezeichnung		Verwendbar bis
	Achtung		Gebrauchsanweisung beachten
	Spezifikationsdatenblatt beachten		Nicht wieder-verwenden
	Eindeutige Produktkennung		

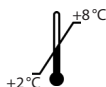
ImmuTube[®] Vitamin D duo LC-MS/MS extraction kit

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

Valid from 2022-05-25



KM1311



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	11
2. INTRODUCTION AND CLINICAL RELEVANCE	11
3. MATERIAL SUPPLIED	12
4. MATERIAL REQUIRED BUT NOT SUPPLIED	13
5. STORAGE AND PREPARATION OF REAGENTS	13
<i>Storage</i>	13
<i>Preparation of test reagents</i>	13
6. SAMPLE PREPARATION	13
7. LIMITATIONS	14
8. PRECAUTIONS	14
9. DISPOSAL	14
10. TECHNICAL HINTS	15
11. GENERAL NOTES ON THE TEST AND TEST PROCEDURE	15
12. REFERENCES	16

1. INTENDED USE

ImmuTube® Vitamin D duo LC-MS/MS extraction kit is a kit for the extraction of the vitamin D metabolites 24,25-dihydroxyvitamin D₃ and 25-hydroxyvitamin D₃/D₂ from human serum and plasma via immunoaffinity enrichment. The assay is an *in vitro* diagnostic tool for manual use by professional laboratory staff. It is used for the sample preparation for LC-MS based determination of the vitamin D metabolite composition in patients with suspected impaired vitamin D metabolism.

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
KM0003	WASHSOL	Washing solution	80 ml
KM1300	ELUSOL	Elution solution	11 ml
	PURSOL	Purification solution	4 ml
KM1310	COLUMNS	ImmuTube® columns for extraction of 25-OH-D ₃ /D ₂ and 24,25-(OH) ₂ -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:

- ImmuTube® Vitamin D duo LC-MS/MS kit (KM1310)
- tuning solution for the analytes (KM1300TU)
- tuning solution for the internal standard (KM1300TS)
- 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
- Overhead rotator
- Ethanol, HPLC grade
- Centrifuge

5. STORAGE AND PREPARATION OF REAGENTS

Storage

The test reagents should be stored protected from light, dry and their specified storage temperature (2–8°C). The test reagents stored in this way are usable until the indicated expiry date.

Preparation of test reagents

The purification solution (PURSOL) is mixed with with 25 % Ethanol (v/v) immediately before use (e.g. 2 ml PURSOL with 0.5 ml Ethanol). It is recommended to prepare only as much as is needed for the test approach (50 µl per sample).

6. SAMPLE PREPARATION

Serum and plasma can be used as 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 sample and additionally 50 µl diluted purification solution (PURSOL with Ethanol) 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 <i>g</i> .
5.	Open the outlet of the ImmuTubes®, then the lid and centrifuge for 2 min at 550 <i>g</i> to dryness; discard the flowthrough.
6.	Add 500 µl of wash solution (WASHSOL) and centrifuge for 2 min at 550 <i>g</i> 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 <i>g</i> ; collect the eluate.
9.	Discard ImmuTubes®.

7. LIMITATIONS

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

8. PRECAUTIONS

- Control samples should be carried along each run.
- The GHS symbols indicated on the individual components and specifications of the material safety data sheets (available on request from Immunodiagnostik AG) must be noted. When working with these reagents, the legal protective precautions must be adhered to.

9. DISPOSAL

Washing solution (WASHSOL) purification solution (PURSOL) and elution solution (ELUSOL) must be disposed as non-halogenated solvent.

10. 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.
- 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, but must be disposed of properly in accordance with local regulations.

11. GENERAL NOTES ON THE TEST AND TEST PROCEDURE














- This product has been produced and placed on the market in accordance with the regulation (EU) 2017/746 (IVDR).
- ImmuTube® is a brand of Immundiagnostik AG.
- All reagents in the kit package are for *in vitro* diagnostic use only.
- This instruction for use replaces the version dated 2021-11-18.
- 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.
- 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.

12. 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		Do not re-use
	Unique Device Identification		

Immundiagnostik AG

Stubenwald-Allee 8a
64625 Bensheim, Germany

Tel.: +49 6251 70190-0

Fax: +49 6251 70190-363

info@immundiagnostik.com

www.immundiagnostik.com

