

IDK[®] Methylmalonsäure LC-MS/MS Kit

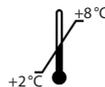
*Zur in-vitro-Bestimmung von Methylmalonsäure
in Plasma, Serum und Urin*

*For the in vitro determination of methylmalonic acid
in plasma, serum and urine*

Gültig ab / Valid from 2023-03-15

REF KM3110

Σ
300



IVD

CE



Immundiagnostik AG, Stubenwald-Allee 8a, 64625 Bensheim, Germany

Tel.: +49 6251 70190-0

Fax: + 49 6251 70190-363

e.mail: info@immundiagnostik.com

www.immundiagnostik.com

Inhalt

| | |
|--|-----------|
| 1. VERWENDUNGSZWECK | 2 |
| 2. EINLEITUNG | 2 |
| 3. MITGELIEFERTE MATERIALIEN | 3 |
| 4. ERFORDERLICHE LABORGERÄTE UND HILFSMITTEL | 4 |
| 5. VORBEREITUNG UND LAGERUNG DER REAGENZIEN | 4 |
| <i>Kalibratoren und Kontrollen</i> | 4 |
| <i>Interner Standard</i> | 5 |
| <i>Mobile Phase (A und B)</i> | 5 |
| <i>Autosampler Waschlösung</i> | 6 |
| <i>Fällungsreagenz</i> | 6 |
| <i>Lösemittel</i> | 6 |
| <i>Verdünnungslösung für Urin*</i> | 6 |
| 6. HALTBARKEIT, STABILITÄT UND VORBEREITUNG DER PROBE | 7 |
| <i>Serum und Plasma</i> | 7 |
| <i>Urin</i> | 7 |
| 7. LC-MS/MS METHODE | 8 |
| 8. MUSTERCHROMATOGRAMME | 9 |
| <i>Methylmalonsäure: INTSTD (oben) vs Probe (unten)</i> | 9 |
| 9. QUALITÄTSKONTROLLE | 10 |
| <i>Referenzbereich (Plasma, Serum und Urin)</i> | 10 |
| 10. TESTCHARAKTERISTIKA | 10 |
| <i>Messbereich mit Quantifizierungsgrenze (LLOQ)</i> | 10 |
| <i>Wiederholbarkeit</i> | 10 |
| 11. VORSICHTSMASSNAHMEN | 11 |
| 12. ENTSORGUNG | 11 |
| 13. TECHNISCHE MERKMALE | 11 |
| 14. ALLGEMEINE HINWEISE ZUM TEST | 12 |
| 15. LITERATUR | 12 |

1. VERWENDUNGSZWECK

Der Verwendungszweck dieses Kits ist die Unterstützung bei der Diagnose eines Vitamin B₁₂-Mangels durch Bestimmung des Methylmalonsäuregehalts in Serum/Plasma/Urin mittels automatisierter quantitativer LC-MS/MS-Assay-Technologie. Dieses Kit ist nur für den professionellen Gebrauch im Labor bestimmt.

2. EINLEITUNG

Methylmalonsäure ist eine organische Säure und ein wichtiges Zwischenprodukt des Aminosäureabbaus, welches bei der Umsetzung von Propionyl-Coenzym A zu Succinyl-Coenzym A entsteht. Bei dieser Reaktion wirkt Vitamin B₁₂ als Kofaktor. Bei einer Störung dieser Enzymreaktion staut sich Methylmalonyl-CoA an, das dann zu Methylmalonsäure (MMA) hydrolysiert wird. Entsprechend akkumuliert MMA bei Defekten des Vitamin-B₁₂-Stoffwechsels und zeigt in der Regel erhöhte Konzentrationen im Blut. Die Folge ist eine Hemmung des mitochondrialen Stoffwechsels mit Laktatazidose und Hyperammonämie. MMA gilt daher als ein früher und empfindlicher Biomarker für B₁₂-Mangel.

Hohe MMA-Serumwerte finden sich auch bei Menschen mit Niereninsuffizienz, Hypovolämie (vermindertes Volumen des zirkulierenden Blutes) und bakterieller Überwucherung des Darms. In diesen Fällen können die MMA-Werte nicht zur Diagnose eines B₁₂-Mangels herangezogen werden, obwohl gleichzeitig ein Vitamin-B₁₂-Mangel vorliegen könnte. Im Falle einer Nierenerkrankung (oder Hypovolämie) kann der MMA-Spiegel im Urin getestet werden.

Bei Patienten mit B₁₂-Mangel, die gleichzeitig Antibiotika einnehmen (oder kürzlich eingenommen haben), können die MMA-Werte fälschlicherweise normal sein.

Im Falle eines B₁₂-Mangels wird die Substitution von B₁₂ den erhöhten MMA-Spiegel relativ schnell senken. Ein Test einige Zeit nach Beginn der Behandlung, z. B. nach einem oder zwei Monaten, kann als Bestätigung der Diagnose eines B₁₂-Mangels dienen. Außerdem kann dieser Test auch bei Personen durchgeführt werden, die einen MMA-Wert aufweisen, der nicht deutlich über den Referenzwerten liegt.

Für die MMA-Bestimmung werden in der Regel Serumproben verwendet, da diese Matrix für parallele Cobalaminspiegel-Tests genutzt wird. Außerdem scheint die Ernährung einen geringeren Einfluss auf den MMA-Serumspiegel zu haben als bei der Bestimmung im Urin. Für die Bestimmung im Urin ist eine zusätzliche Messung des Kreatinins erforderlich.

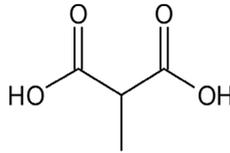


Abb 1: Methylmalonsäure

Indikationen

- Bewertung des Vitamin-B₁₂-Status
- Störung der Nierenfunktion
- Methylmalonsäureurie
- SIBO (bakterielle Überwucherung des Dünndarms)

3. MITGELIEFERTE MATERIALIEN

| Art.-Nr. | Bezeichnung | Kit-Komponenten | Menge |
|----------|-------------|--|---|
| KM3110 | AUTOWASH | Autosampler Waschlösung | 1 x 1 000 ml |
| | PREC | Fällungsreagenz; | 3 x 55 ml |
| | CAL1-6 | Kalibratoren 1-6, lyophilisiert (Konzentration siehe Produktspezifikation) | 2 Fläschchen (à 500 µl) pro Konzentration |
| | CTRL1-3 | Kontrollen 1-3, lyophilisiert (Konzentration siehe Produktspezifikation) | 3 Fläschchen (à 500 µl) pro Konzentration |
| | INTSTD | Interner Standard | 3 x 6 ml |
| | MOPHAA | Laufmittel A; | 1 x 500 ml |
| | MOPHAB | Laufmittel B; | 1 x 300 ml |
| | SOLVENT | Lösemittel | 3 x 30 ml |

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

4. ERFORDERLICHE LABORGERÄTE UND HILFSMITTEL

Folgendes Zubehör wird für die IDK® Methylmalonsäure LC-MS/MS Applikation benötigt (nicht im Kit enthalten):

- Präzisionspipetten und Einmalpipettenspitzen mit variablen Volumina von 10–1 000 µl
- Zentrifuge mit mindestens 10 000 g
- Vortex- oder Mikrotiterplatten-Mixer
- Vakuumzentrifuge oder Stickstoffverteiler
- Standard-Labor-Einmalreaktionsgefäße aus Kunststoff (z.B. 1,5 ml)
- LC-MS/MS-Anlage
- LC-MS Probenvials

Folgendes Zubehör kann separat für die IDK® Methylmalonsäure LC-MS/MS bei der Immundiagnostik AG bestellt werden:

- 500 ml Mobile Phase A mit erhöhter FA Konzentration (KM3110MOPHAA2)
- 100 ml Verdünnungslösung für Urin; gebrauchsfertig (KM3110DILSOL)
- UPLC Säule (KM3110SP)
- alle Einzelkomponenten

Bitte kontaktieren Sie uns für Ihre individuelle Lösung und fordern Sie unsere Einzelkomponenten-Preisliste an.

5. VORBEREITUNG UND LAGERUNG DER REAGENZIEN

Hinweis: Bitte nehmen Sie die Kit-Komponenten sofort nach Erhalt aus der Transportverpackung und beachten Sie die auf den Produktetiketten aufgedruckten Hinweise zu den Lagerbedingungen.

Alle Komponenten sollten lichtgeschützt, trocken und bei der angegebenen Lager-temperatur gelagert werden. Die so gelagerten Testreagenzien sind bis zum angegebenen Verfallsdatum verwendbar. Die angegebenen Stabilitäten gelten nur, wenn keine bakterielle Kontamination vorliegt.

Kalibratoren und Kontrollen

Handhabung:

Entfernen Sie die Kappe und den Gummistopfen stets vorsichtig (um Verluste des Inhalts zu vermeiden).

Rekonstituieren Sie die Kalibratoren und Kontrollen wie folgt:

- Rekonstituieren Sie jeden CAL und jede CTRL mit genau 500 µl destilliertem oder deionisiertem Wasser und inkubieren Sie diese 15 min bei Raumtemperatur.

- Die Komponente anschließend gründlich mischen, um sicherzustellen, dass sich das gesamte Trockenmaterial aufgelöst hat; dabei nicht zu stark schütteln, um Schaumbildung zu vermeiden.
- Die angesetzte Komponente während des Testverfahrens wie eine Patientenprobe handhaben.

Stabilität und Lagerung:

| | | |
|--------------------------|-------|---|
| Vor der Rekonstitution: | 2–8°C | Bis zu dem auf dem Produktetikett angegebenen Verfallsdatum |
| nach der Rekonstitution: | 2–8°C | 1 Woche |
| nach der Rekonstitution: | -20°C | 2 Wochen |

Interner Standard

Handhabung:

Entfernen Sie die Kappe und den Gummistopfen stets vorsichtig (um Verluste des Inhalts zu vermeiden).

Rekonstituieren Sie den internen Standard wie folgt:

- Rekonstituieren Sie den INTSTD mit genau 6 ml destilliertem oder deionisiertem Wasser und inkubieren Sie diese 15 min bei Raumtemperatur.
- Die Komponente anschließend gründlich mischen, um sicherzustellen, dass sich das gesamte Trockenmaterial aufgelöst hat; dabei nicht zu stark schütteln, um Schaumbildung zu vermeiden.

Stabilität und Lagerung:

| | | |
|--------------------------|-------|--|
| Vor der Rekonstitution: | 2–8°C | Bis zu dem auf dem Produktetikett angegebenen Verfallsdatum. |
| nach der Rekonstitution: | 2–8°C | 1 Woche |
| nach der Rekonstitution: | -20°C | 2 Wochen |

Mobile Phase (A und B)

Handhabung:

Die Komponente ist flüssig und gebrauchsfertig.

Stabilität und Lagerung:

| | |
|--------------------|---|
| Lagerung bei 2–8°C | Die Komponente kann verschlossen bis zu 6 Wochen nach dem ersten Öffnen oder bis zu 4 Wochen auf der UHPLC verwendet werden |
|--------------------|---|

Lagerung bei RT Vor dem ersten Öffnen kann die Komponente für 12 Wochen bei Raumtemperatur gelagert werden.

Autosampler Waschlösung

Handhabung:

Das Produkt ist flüssig und gebrauchsfertig.

Stabilität und Lagerung:

Lagerung bei 2–8 °C Die Komponente kann verschlossen bis zu 6 Wochen nach dem ersten Öffnen oder bis zu 4 Wochen auf der UHPLC verwendet werden

Fällungsreagenz

Handhabung:

Das Produkt ist flüssig und gebrauchsfertig.

Stabilität und Lagerung:

Lagerung bei 2–8 °C Die Komponente kann verschlossen bis zu 6 Wochen nach dem ersten Öffnen oder bis zu 3 Wochen verwendet werden

Lösemittel

Handhabung:

Das Produkt ist flüssig und gebrauchsfertig.

Stabilität und Lagerung:

Lagerung bei 2–8 °C Die Komponente kann verschlossen bis zu 4 Wochen nach dem ersten Öffnen verwendet werden.

*Verdünnungslösung für Urin**

Handhabung:

Das Produkt ist flüssig und gebrauchsfertig.

Stabilität und Lagerung:

Lagerung bei 2–8 °C Die Komponente kann verschlossen bis zu 6 Wochen nach dem ersten Öffnen verwendet werden.

*(Wenn die entsprechenden Verdünnungslösung für Urin bestellt wurden)

6. HALTBARKEIT, STABILITÄT UND VORBEREITUNG DER PROBE

Serum und Plasma

Stabilität und Lagerung:

Als Probe eignet sich Serum oder Plasma (EDTA- und Heparinplasma). Wiederholte Auftau- und Einfrierzyklen sind zu vermeiden.

Proben können gelagert werden: 3 Tage bei Raumtemperatur (15–25 °C)

7 Tage bei 2–8 °C

1 Monat bei -20 °C

Probenvorbereitung

| | |
|----|--|
| 1. | 100 µl Probe, CAL oder CTRL in ein 1,5 ml-Reaktionsgefäß geben. |
| 2. | Zugabe von 50 µl INTSTD und kurz vortexen. |
| 3. | Zugabe von 500 µl PREC. |
| 4. | Gefäß verschließen und für 30 s vortexen. |
| 5. | Zentrifugation für 5 min bei mindestens 10 000 g. |
| 6. | 400 µl des Probenüberstandes in ein neues 1,5 ml-Reaktionsgefäß überführen und unter Stickstoff-Zufuhr bei 50 °C oder in der Vakuumzentrifuge trocken evaporieren. |
| 7. | Rekonstitution in 200 µl SOLVENT. |
| 8. | Injektion in das LC-MS/MS System (siehe Application Note). |

Urin

Handhabung:

Das Produkt ist flüssig und gebrauchsfertig.

Stabilität und Lagerung:

Im Falle von Patienten mit einer beeinträchtigten Nierenfunktion wird die Analyse mit Urinproben durchgeführt. Die Stabilität von Urinproben ist identisch zu der Stabilität von Plasma und Serum Proben

Proben können gelagert werden: 3 Tage bei Raumtemperatur (15–25 °C)
7 Tage bei 2–8 °C
1 Monat bei -20 °C

Probenvorbereitung

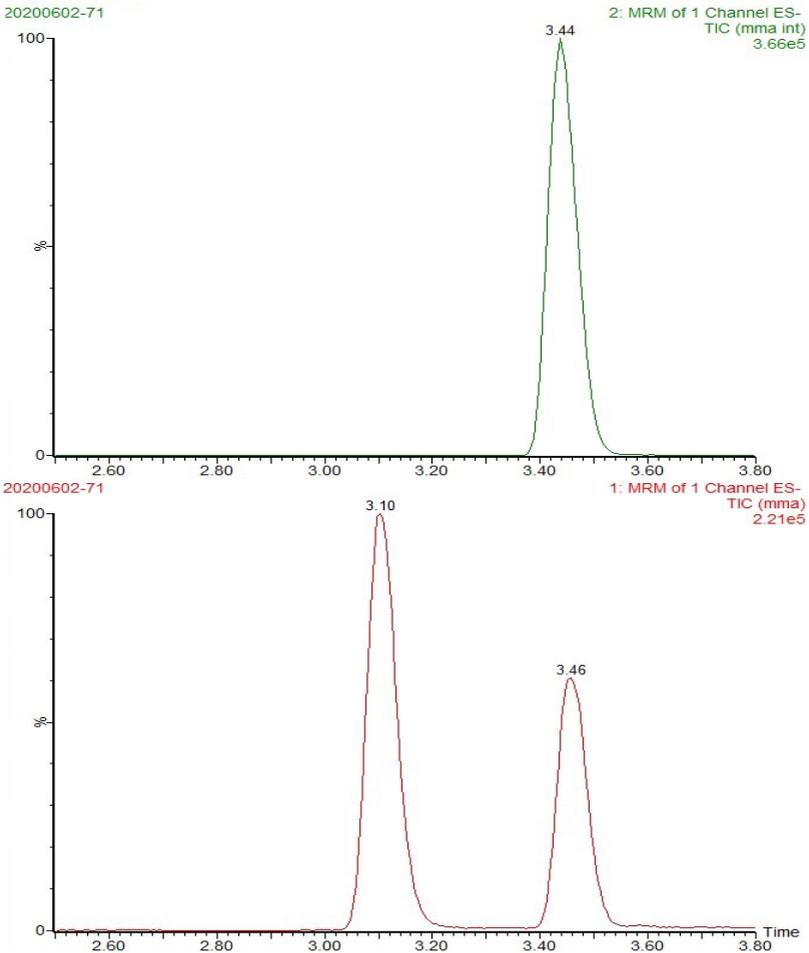
| | |
|----|--|
| 1. | 50 µl der Probe (Urin) mit 1 000 µl DILSOL in ein 1,5 ml-Reaktionsgefäß geben und gut mischen. |
| 2. | 100 µl verdünnte Probe (s. Schritt 1)/CAL/CTRL in ein neues 1,5 ml-Reaktionsgefäß geben. |
| 3. | Zugabe von 50 µl INTSTD und kurz vortexen. |
| 4. | Zugabe von 500 µl PREC. |
| 5. | Gefäß verschließen und für 30 s vortexen. |
| 6. | Zentrifugation für 5 min bei mindestens 10 000 g. |
| 7. | 400 µl des Probenüberstandes in ein neues 1,5 ml-Reaktionsgefäß überführen und unter Stickstoff-Zufuhr bei 50 °C oder in der Vakuumzentrifuge trocken evaporieren. |
| 8. | Rekonstitution in 200 µl SOLVENT. |
| 9. | Injektion in das LC-MS/MS System (siehe Application Note). |

7. LC-MS/MS METHODE

Die Parameter zur Einstellung der LC-MS/MS-Methode entnehmen Sie bitte der Application Note oder wenden Sie sich an lcms@immundiagnostik.com.

8. MUSTERCHROMATOGRAMME

Methylmalonsäure: INTSTD (oben) vs Probe (unten)



*aufgenommen mit einem Waters LC-MS/MS TQS System

9. QUALITÄTSKONTROLLE

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

Referenzbereich (Plasma, Serum und Urin)

Plasma, Serum: 0–350 nmol/l

Urin: < 3,6 mmol/mol Kreatinin

Wir empfehlen jedem Labor einen eigenen Referenzbereich zu etablieren.

10. TESTCHARAKTERISTIKA

Messbereich mit Quantifizierungsgrenze (LLOQ)

| Analyt | nmol/l |
|------------------|------------|
| Methylmalonsäure | 37,8–2 000 |

Wiederholbarkeit

| Level | Konzentration [nmol/l] | Standardabweichung [nmol/l] | Varianz [%] | N |
|-------|------------------------|-----------------------------|-------------|----|
| I | 211.3 | 14.1 | 6.7 | 25 |
| II | 350.0 | 12.5 | 3.6 | 25 |
| III | 1 114.7 | 27.1 | 2.4 | 25 |

11. VORSICHTSMASSNAHMEN

- 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 Immundiagnostik AG erhältlich) zu beachten. Beim Arbeiten mit diesen Reagenzien sind die gesetzlichen Schutzvorkehrungen einzuhalten.
- Als Vorsichtsmaßnahme wird empfohlen, das verwendete Humanmaterial immer als potentiell infektiös zu betrachten.
- Reagenzien dieser Testpackung enthalten organische Lösungsmittel. Berührungen mit der Haut oder den Schleimhäuten sind zu vermeiden.

12. ENTSORGUNG

Autosampler Waschlösung (AUTOWASH), Fällungsreagenz (PREC), Laufmittel A (MOPHAA), Laufmittel B (MOPHAB) und Lösemittel (SOLVENT) müssen als halogenfreier Lösungsmittelabfall entsorgt werden. Die Kalibratoren (CAL1–6) und Kontrollen (CTRL1–3) sollten als potentiell infektiöses Material gemäß der örtlichen Vorschriften entsorgt werden.

13. TECHNISCHE MERKMALE

- Reagenzien der Kitpackung dürfen nicht mit anderen Chargen gemischt werden.
- Die Reagenzien dürfen nach Ablauf des Haltbarkeitsdatums nicht mehr verwendet werden.
- Die Bestimmung ist immer nach der im Kit beigefügten Arbeitsanleitung durchzuführen.
- Stopfen und Verschlüsse verschiedener Reagenzien dürfen nicht vertauscht werden.
- Die Einzelkomponenten des Kits sind maximal für die angegebene Anzahl an Testdurchführungen ausgelegt. Ein bereits verwendeter Anteil der Komponenten darf nicht wiederverwendet werden.

14. ALLGEMEINE HINWEISE ZUM TEST

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

15. LITERATUR

1. L. Thomas, labor und diagnose: Indikation und Bewertung von laborbefunden für die medizinische Diagnostik, TH-Books Verlagsgesellschaft, Frankfurt/Main 2012, page 714 *
2. Norman, E.J. Urinary Methylmalonic Acid Test May have greater value than the total Homocysteine assay for screening elderly individuals for Cobalamin Deficiency, Clinical Chemistry 2004, 50 (8), 1482-1483.

Verwendete Symbole:

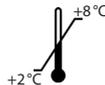
| | | | |
|---|---|---|---------------------------------------|
|  | Temperaturbegrenzung |  | Bestellnummer |
|  | <i>In-Vitro</i> -Diagnostikum |  | Zu verwenden mit |
|  | Hersteller |  | Inhalt ausreichend für <n> Prüfungen |
|  | Chargenbezeichnung |  | Verwendbar bis |
|  | Enthält Plasmaderivate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

IDK[®] Methylmalonic Acid LC-MS/MS Kit

*For the in vitro determination of methylmalonic acid
in plasma, serum and urine*

Valid from 2023-03-15

REF **KM3110**



IVD



Immundiagnostik AG, Stubenwald-Allee 8a, 64625 Bensheim, Germany

Tel.: +49 6251 70190-0

Fax: + 49 6251 70190-363

e.mail: info@immundiagnostik.com

www.immundiagnostik.com

Table of Contents

| | |
|--|-----------|
| 1. INTENDED USE | 17 |
| 2. INTRODUCTION | 17 |
| 3. MATERIAL SUPPLIED | 18 |
| 4. MATERIAL REQUIRED BUT NOT SUPPLIED | 18 |
| 5. PREPARATION, STORAGE AND STABILITY OF REAGENTS | 19 |
| <i>Calibrators and controls</i> | 19 |
| <i>Internal standard</i> | 19 |
| <i>Mobile phases A and B</i> | 20 |
| <i>Autosampler wash solution</i> | 20 |
| <i>Precipitation solution</i> | 20 |
| <i>Solvent</i> | 20 |
| <i>Dilution solution for urine*</i> | 21 |
| 6. STORAGE, STABILITY AND PREPARATION OF SAMPLE | 21 |
| <i>Serum and plasma</i> | 21 |
| <i>Urine</i> | 22 |
| 7. LC-MS/MS METHOD | 22 |
| 8. EXAMPLES OF CHROMATOGRAMS | 23 |
| <i>Methylmalonic Acid Internal Standard (top) vs Sample (bottom)</i> | 23 |
| 9. QUALITY CONTROL | 24 |
| <i>Reference range (Plasma, serum an urine)</i> | 24 |
| 10. TEST CHARACTERISTICS | 24 |
| <i>Measuring range with limit of quantification (LLOQ)</i> | 24 |
| <i>Repeatability</i> | 24 |
| 11. PRECAUTIONS | 25 |
| 12. DISPOSAL | 25 |
| 13. TECHNICAL HINTS | 25 |
| 14. GENERAL NOTES ON THE TEST | 26 |
| 15. REFERENCES | 26 |

1. INTENDED USE

The intended use of this device is assisting in diagnosis of vitamin B₁₂ deficiency by determination of the levels of Methylmalonic Acid in serum/plasma/urine, performed by automated quantitative LC-MS/MS assay technology. This kit is designed for laboratory professional use, only.

2. INTRODUCTION

Methylmalonic acid is an organic acid which blood level is usually elevated in cobalamin (vitamin B₁₂) deficiency. It is considered to be an early and sensitive biomarker for B₁₂ deficiency.

High MMA serum values are found in people with renal insufficiency, hypovolemia (decreased volume of circulating blood) and intestinal bacterial overgrowth. In these cases MMA levels cannot be used to diagnose B₁₂ deficiency, though a vitamin B₁₂ deficiency might simultaneously exist. In the case of kidney disease (or hypovolemia) MMA levels in urine can be tested.

In patients with B₁₂ deficiency who are taking (or have recently taken) antibiotics at the same time, MMA levels may be falsely normal.

In case of a B₁₂ deficiency, its substitution will lower the elevated MMA level relatively quickly. Testing some time after starting treatment, for instance after one or two months, may serve as a confirmation of the B₁₂ deficiency diagnosis. Furthermore, this testing can also be performed for people exhibiting a MMA value which is not distinctly above reference values.

Serum samples are generally used for MMA determination, as this matrix is used for parallel cobalamin level tests. Furthermore nutrition seems to have less influence on the MMA serum level than in case of urine. For determination in urine additional measurement of creatinine is necessary.

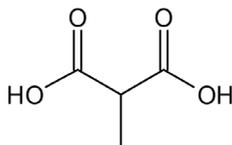


Fig 1: Methylmalonic Acid

Indications

- Vitamin B₁₂ status assessment
- Defect of kidney functions
- Methylmalonic aciduria
- SIBO (small intestinal bacterial overgrowth)

3. MATERIAL SUPPLIED

| Cat. No. | Identifier | Kit components | Quantity |
|----------|------------|--|------------------------------|
| KM3110 | AUTOWASH | Autosampler wash solution; | 1 x 1 000 ml |
| | PREC | Precipitation solution (contains internal standard) | 3 x 55 ml |
| | CAL1–6 | Calibrators 1–6; lyophilised (see product specification for concentration) | 2 vials (à 500 µl) per level |
| | CTRL1–3 | Controls 1–3; lyophilised (see product specification for concentration) | 3 vials (à 500 µl) per level |
| | INTSTD | Internal Standard | 3 x 6 ml |
| | MOPHAA | Mobile phase A | 1 x 500 ml |
| | MOPHAB | Mobile phase B | 1 x 300 ml |
| | SOLVENT | Solvent | 3 x 30 ml |

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

4. MATERIAL REQUIRED BUT NOT SUPPLIED

The following accessories are required for the *IDK*® Methylmalonic Acid LC-MS/MS application (not included in the kit):

- Precision pipettors and disposable tips to deliver 10–1 000 µl
- Centrifuge 10 000 *g* (at least)
- Vortex mixer
- Vacuum centrifuge or nitrogen distributor
- Standard laboratory disposable plastic reagent tubes (e.g. 1.5 ml)
- LC-MS/MS system and LC-MS vials

The following accessories for the *IDK*® Methylmalonic Acid LC-MS/MS application can be ordered separately at Immundiagnostik AG:

- 500 ml Mobile Phase A with increased FA concentration (KM3110MOPHAA2)
- 100 ml Dilution solution for urine; ready to use (KM3110DILSOL)
- UPLC column (KM3110SP)
- all single components

Please ask for our single component price list. Feel free to contact us for customized inquiries.

5. PREPARATION, STORAGE AND STABILITY OF REAGENTS

Note: Please unpack the kit components from the transport packaging immediately upon receipt and follow the instructions for storage conditions printed on the product labels.

All components should be stored protected from light, dry and at their given specified storage temperature. The test reagents stored in this way are usable until the indicated expiry date. The declared stated stabilities are only valid in case of no bacterial contamination.

Calibrators and controls

Handling:

Always remove the cap and rubber plug carefully (in order to avoid loss of content).

Reconstitute the calibrators and controls as follows:

- Reconstitute each calibrator and control with exactly 500 µl distilled or deionised water and incubate for 15 min at room temperature.
- Next, mix the component thoroughly to make sure that all dry material has dissolved; do not shake too vigorously to avoid foam formation.
- Handle the prepared component as a patient sample during the test procedure.

Stability and storage:

Before reconstitution: 2–8°C Until expiry date printed on the product label.

After reconstitution: 2–8°C 1 week

After reconstitution: -20°C 2 weeks

Internal standard

Handling:

Always remove the cap and rubber plug carefully (in order to avoid loss of content).

Reconstitute the internal standard as follows:

- Reconstitute each calibrator and control with exactly 6 ml distilled or deionised water and incubate for 15 min at room temperature.
- Next, mix the component thoroughly to make sure that all dry material has dissolved; do not shake too vigorously to avoid foam formation.

Stability and storage:

| | | |
|------------------------|-------|---|
| Before reconstitution: | 2–8°C | Until expiry date printed on the product label. |
| After reconstitution: | 2–8°C | 1 week |
| After reconstitution: | -20°C | 2 weeks |

*Mobile phases A and B***Handling:**

The component is liquid and ready for use.

Stability and storage:

| | |
|----------------|--|
| Store at 2–8°C | After first opening the component can be used for 6 weeks if closed and stored at 2–8°C or 4 weeks on the UHPLC. |
| Store at RT | Before first opening the component can be stored for 12 weeks at room temperature. |

*Autosampler wash solution***Handling:**

The component is liquid and ready for use.

Stability and storage:

| | |
|----------------|--|
| Store at 2–8°C | After first opening the component can be used for 6 weeks if closed and stored at 2–8°C or 4 weeks on the UHPLC. |
|----------------|--|

*Precipitation solution***Handling:**

The component is liquid and ready for use.

Stability and storage:

| | |
|----------------|--|
| Store at 2–8°C | After first opening the component can be used for 3 weeks if closed and stored at 2–8°C. |
|----------------|--|

*Solvent***Handling:**

The component is liquid and ready for use.

Stability and storage:

Store at 2–8 °C After first opening the component can be used for 4 weeks if closed and stored at 2–8 °C.

*Dilution solution for urine****Handling:**

The component is liquid and ready for use.

Stability and storage:

Store at 2–8 °C After first opening the component can be used for 6 weeks if closed and stored at 2–8 °C.

*(When the appropriate dilution solution for Urine have been ordered)

6. STORAGE, STABILITY AND PREPARATION OF SAMPLE*Serum and plasma***Storage and Stability**

Use serum or plasma (EDTA- and Heparin-plasma). Avoid freeze-thaw cycles.

Samples can be stored: 3 days at room temperature (15–25 °C)
 7 days at (2–8 °C)
 1 month (-20 °C)

Sample preparation

| | |
|----|---|
| 1. | Pipet 100 µl sample, CAL or CTRL into a 1.5 ml reaction tube. |
| 2. | Add 50 µl INTSTD and vortex shortly. |
| 3. | Add 500 µl PREC. |
| 4. | Mix for 30 s on a vortex mixer. |
| 5. | Centrifuge for 5 min at 10 000 g (or more) |
| 6. | Transfer 400 µl supernatant to a new 1.5 ml reaction tube and evaporate to dryness under nitrogen at 50 °C or in a vacuum centrifuge. |
| 7. | Reconstitute in 200 µl SOLVENT. |
| 8. | Inject 10 µl in the LC-MS/MS (see application note). |

Urine

Storage and Stability

In the cases of patients with impaired renal functions, the analysis is performed from an urine sample. The stability of urine samples is identical to those of serum and plasma.

Samples can be stored: 3 days at room temperature (15–25 °C)
 7 days at (2–8 °C)
 1 month (-20 °C)

Sample preparation

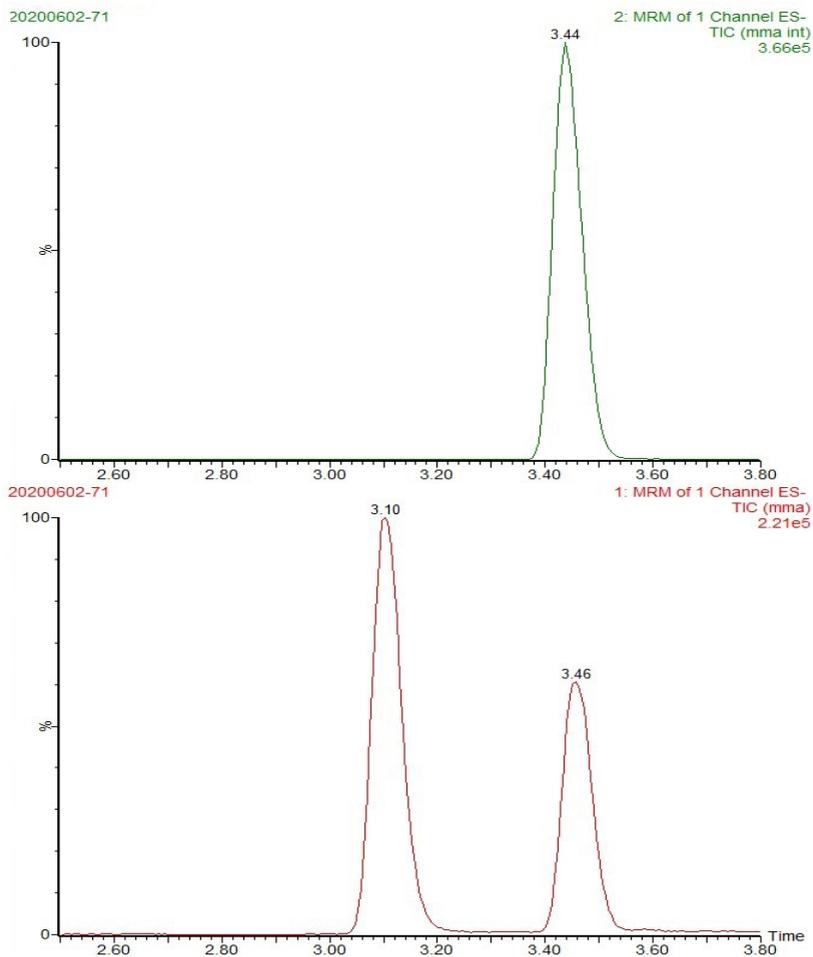
| | |
|----|---|
| 1. | Dilute 50 µl of the sample (urine) with 1 000 µl DILSOL in a 1.5 ml reaction tube and mix thoroughly. |
| 2. | Pipet 100 µl of the diluted sample (step 1), CAL or CTRL into a new 1.5 ml reaction tube. |
| 3. | Add 50 µl INTSTD and vortex shortly. |
| 4. | Add 500 µl PREC. |
| 5. | Mix for 30 s on a vortex mixer. |
| 6. | Centrifuge for 5 min at 10 000 g (or more) |
| 7. | Transfer 400 µl supernatant to a new 1.5 ml reaction tube and evaporate to dryness under nitrogen at 50 °C or in a vacuum centrifuge. |
| 8. | Reconstitute in 200 µl SOLVENT. |
| 9. | Inject 10 µl in the LC-MS/MS (see application note). |

7. LC-MS/MS METHOD

Please refer to the application note or contact lcms@immundiagnostik.com for the LC-MS/MS method parameters.

8. EXAMPLES OF CHROMATOGRAMS

Methylmalonic Acid Internal Standard (top) vs Sample (bottom)



*recorded with the Waters LC-MS/MS TQS system

9. QUALITY CONTROL

Control samples should be analysed with each run. The results of the control samples are used to confirm the accuracy of the method. The test results may not be valid, if one or more values of the quality control sample are outside the acceptable range (see product specification).

Reference range (Plasma, serum an urine)

Plasma, Serum: 0–350 nmol/l

Urine: < 3.6 mmol/mol Creatinine

We recommend each laboratory to establish its own reference range.

10. TESTCHARACTERISTICS

Measuring range with limit of quantification (LLOQ)

| Analyte | nmol/l |
|--------------------|------------|
| Methylmalonic acid | 37.8–2 000 |

Repeatability

| Level | Measured value (nmol/l) | Standard Deviation (nmol/l) | CV (%) | N |
|-----------|-------------------------|-----------------------------|--------|----|
| Level I | 211.3 | 14.1 | 6.7 | 25 |
| Level II | 350.0 | 12.5 | 3.6 | 25 |
| Level III | 1 114.7 | 27.1 | 2.4 | 25 |

11. PRECAUTIONS

- Human material used in the kit components was tested and found to be negative for HIV, Hepatitis B and Hepatitis C. Still, 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.
- As a precaution, it is recommended that the human material used is always considered potentially infectious.
- The test components contain organic solvents. Avoid contact with skin or mucous membranes.

12. DISPOSAL

Autosampler washing solution (AUTOWASH), precipitation solution (PREC), mobile phase A (MOPHAA), mobile phase B (MOPHAB) and solvent (SOLVENT) must be disposed as nonhalogenated solvents. The calibrators (CAL1–6) and controls (CTRL1–3) should be disposed as potentially infectious material in accordance with local regulations.

13. TECHNICAL HINTS

- Do not mix different lot numbers of any kit component.
- Reagents should not be used beyond the expiration date shown on the kit label.
- The assay should always be performed according the enclosed manual.
- Plugs and caps of different reagents should not be swapped.
- The individual components of the kit are designed for a maximum of the specified number of test runs. Any part of the components that has already been used must not be reused.

14. GENERAL NOTES ON THE TEST

- This assay was produced and distributed according to the IVD guidelines of 98/79/EC.
- IDK® is a trademark of Immundiagnostik AG.
- All reagents in the kit package are for *in vitro* diagnostic use only.
- The guidelines for medical laboratories should be followed.
- Incubation time, incubation temperature and pipetting volumes of the components are defined by the producer. Any variation of the test procedure, which is not coordinated with the producer, may influence the results of the test. Immundiagnostik AG can therefore not be held responsible for any damage resulting from wrong use.
- Serious incidents are to be reported to Immundiagnostik AG and the national regulatory authorities.
- Please contact Immundiagnostik AG if one or more components of the kit are damaged, missing (see material supplied) or precipitates are visible in the ready-to-use solutions.
- Warranty claims and complaints in respect of deficiencies must be lodged within 14 days after receipt of the product. The product shall be send to Immundiagnostik AG together with a written complaint.

15. REFERENCES

1. L.Thomas, labor und diagnose: Indikation und Bewertung von laborbefunden für die medizinische Diagnostik, TH-Books Verlagsgesellschaft, Frankfurt/Main 2012, page 714 *
2. Norman, E.J. Urinary Methylmalonic Acid Test May have greater value than the total Homocysteine assay for screening elderly individuals for Cobalamin Deficiency, Clinical Chemistry 2004, 50 (8), 1482-1483.

Used symbols:

| | | | |
|---|--|---|------------------------------------|
|  | Temperature limitation |  | Catalogue number |
|  | In Vitro Diagnostic Medical Device |  | To be used with |
|  | Manufacturer |  | Contains sufficient for <n> tests |
|  | Lot number |  | Use by |
|  | Contains plasma derivatives or human blood |  | Consult instructions for use |
|  | Consult specification data sheet |  | Do not re-use |
|  | Unique Device Identification |  | Contains material of animal origin |
|  | Medicinal substance |  | Contains material of human origin |

Immundiagnostik AG

Stubenwald-Allee 8a
64625 Bensheim, Germany

Tel.: +49 6251 70190-0

Fax: +49 6251 70190-363

info@immundiagnostik.com

www.immundiagnostik.com

