

Methylmalonsäure LC-MS/MS Kit

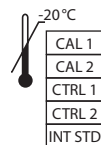
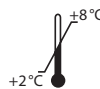
Zur Bestimmung von Methylmalonsäure in Urin

Methylmalonic acid LC-MS/MS kit

For the determination of methylmalonic acid in urine

Gültig ab / Valid from 2015-02-04

REF **KM3000**



IVD **CE**



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

Tel.: +49 6251 70190-0

Fax: + 49 6251 849430

e.mail: info@immundiagnostik.com

www.immundiagnostik.com

Inhalt

1. VERWENDUNGSZWECK	2
2. EINLEITUNG	2
3. INHALT DER TESTPACKUNG	3
4. ERFORDERLICHE LABORGERÄTE UND HILFSMITTEL	3
5. VORBEREITUNG UND LAGERUNG DER REAGENZIEN	3
6. PROBENVORBEREITUNG FÜR 100 PROBEN	4
7. CHROMATOGRAPHISCHE BEDINGUNGEN	5
8. MS/MS-METHODE (BEISPIELHAFT AUFGEFÜHRT FÜR EIN WATERS QUATTRO PREMIER XE TANDEM MASSENSPEKTROMETER)	5
MRM-Übergänge (m/z)	5
9. AUSWERTUNG	6
10. MUSTERCHROMATOGRAMME	6
11. QUALITÄTSKONTROLLE	7
Referenzwerte	7
12. TESTCHARAKTERISTIKA	8
Präzision und Reproduzierbarkeit	8
Nachweisgrenze	8
13. ENTSORGUNG	8
14. VORSICHTSMASSNAHMEN	8
15. TECHNISCHE MERKMALE	9
16. ALLGEMEINE HINWEISE ZUM TEST	9
17. LITERATUR	9

1. VERWENDUNGSZWECK

Die hier beschriebene LC-MS/MS-Applikation ist für die quantitative Bestimmung von Methylmalonsäure in Urin geeignet. Nur zur *in-vitro*-Diagnostik.

2. EINLEITUNG

Methylmalonsäure (MMA) entsteht beim Aminosäure-Stoffwechsel. Erhöhte MMA-Konzentrationen dienen als sensitiver früher Indikator eines Vitamin B₁₂-Mangels.

Vitamin B₁₂ wirkt als Coenzym und katalysiert die Umwandlung von Methylmalonyl-CoA zu Succinyl-CoA. Bei geringeren Mengen an Coenzym steigt die Methylmalonyl-CoA-Konzentration und aus Methylmalonyl-CoA wird MMA gebildet. Niedrige Verfügbarkeit an Vitamin B₁₂ führt zu erhöhten MMA-Spiegeln in Blut und Urin.

Da relativ große Vitamin-B₁₂-Mengen an Proteine gebunden und nicht frei für Analysen im Blut vorliegen, stellt die MMA-Bestimmung ein besseres Maß für die B₁₂-Bioverfügbarkeit als die herkömmlichen Vitamin-B₁₂-Tests dar.

Vitamin-B₁₂-Mangel kann hämatologische Veränderungen verursachen, wie Anämie und Bildung großer roter Blutzellen, oder Zeichen und Symptome einer Neuropathie (Konfusion, Irritation, Depression). Erhöhte MMA-Konzentrationen sind oft bereits vor der Manifestation der hämatologischen Veränderungen nachweisbar.

Indikationen

- Verminderte Bildung roter Blutkörperchen und **megaloblastäre Anämie**
- **Gastrointestinaltrakt** – vergrößerte Leber (Hepatomegalie), Übelkeit, Brechreiz, Sodbrennen, Bauchschmerzen mit Verdauungsstörungen wie Durchfall oder Verstopfung, Appetitmangel, Gewichtsverlust
- **Neurologische Symptome** – dauerhafte Nervenzerstörung, Taubheitsgefühl, Kribbeln in Armen und Beinen, Unruhe, Gangunsicherheit, Verwirrtheit, Depressionen, mangelnde Merkfähigkeit und Demenz

3. INHALT DER TESTPACKUNG

Art.-Nr.	Bezeichnung	Kit-Komponenten	Menge
KM3000LM	MOPHA	Laufmittel	1000 ml
KM3000KA	CAL 1 CAL 2	Kalibratoren 1 und 2 (lyoph., 250 µl)	je 5 Fläschchen
KM3000KO	CTRL 1 CTRL 2	Kontrollen 1 und 2 (lyoph., 250 µl)	Je 5 Fläschchen
KM3000IS	INT STD	Interner Standard (-20 °C)	2 x 50 ml
KM3000AC	ACTSOL	Aktivierungsreagenz	5 ml
KM3000RE	RECSOL	Rekonstitutionslösung	6 ml

Zur Vorbereitung der Methylmalonsäureapplikation ist das Tuning zur Findung der optimalen LC-MS/MS-Einstellungen notwendig. Die Tuninglösung (KM3000TU, MMA und INT STD als Reinstoffen), die Säule (KM3000RP) sowie alle anderen Einzelkomponenten können separat bei der Firma Immundiagnostik AG bestellt werden. Bitte fordern Sie unsere Einzelkomponentenpreisliste an.

4. ERFORDERLICHE LABORGERÄTE UND HILFSMITTEL

- 1,5-ml-Eppendorfreaktionsgefäße
- Reagenzgefäße aus Glas, LC-MS/MS-geeignet
- Präzisionspipetten und Einmalpipettenspitzen mit variablen Volumina von 10–1000 µl
- Zentrifuge, 10 000 g für 1,5-ml-Eppendorfreaktionsgefäße, auf 4 °C kühlbar
- Vortex-Mixer
- LC-MS/MS-Anlage
- RP-C₁₈-Säule, z. B. PerfectSil 120 ODS; 5 µm (125 x 4,0 mm)

5. VORBEREITUNG UND LAGERUNG DER REAGENZIEN

- Die **lyophilisierten Kalibratoren** (CAL 1 und CAL 2) **und Kontrollen** (CTRL 1 und CTRL 2) sind bei **-20 °C** bis zum angegebenen Haltbarkeitsdatum stabil. Sie müssen vor Gebrauch mit **250 µl Rekonstitutionslösung** (RECSOL) **rekonstituiert** werden. Rekonstituierte Kalibratoren und Kontrollen können nicht gelagert werden.
- Der **interne Standard** (INTSTD) ist bei **-20 °C** bis zum angegebenen Haltbarkeitsdatum stabil.

- Das **Laufmittel** (MOPHA) ist bei **2–8 °C** bis zum angegebenen Haltbarkeitsdatum stabil. **Vor Gebrauch muss es mit 0,4% Aktivierungsreagenz** (ACT-SOL) **versetzt werden** (z. B. 500 ml MOPHA + 2 ml ACTSOL). Die hergestellten Lösungen sind dann noch **2 Wochen** verwendbar, es wird deshalb empfohlen nur so viel anzusetzen, wie für den Testansatz benötigt wird.

Achtung: Das Aktivierungsreagenz muss unter dem Abzug zugesetzt werden. Alle zu verwendeten Gefäße müssen absolut sauber und detergentienfrei und vorzugsweise aus LC-MS/MS-geeignetem Glas sein.

- Alle anderen Testreagenzien sind gebrauchsfertig, bei **2–8 °C** zu lagern und bei entsprechender Lagerung bis zum angegebenen Verfallsdatum (siehe Etikett) verwendbar.

6. PROBENVORBEREITUNG FÜR 100 PROBEN

Als Probenmaterial eignet sich Urin.

Qualitätskontrollen sollten immer mitgemessen werden.

1.	Im Test dürfen nur Reagenzien und Proben verwendet werden, die Raumtemperatur (18–26 °C) aufweisen (außer interner Standard). Vor Gebrauch Reagenzien und Proben gut mischen
2.	50 µl Probe, Kalibrator (CAL 1 und CAL 2) oder Kontrolle (CTRL 1 und CTRL 2) in 1,5-ml-Eppendorfreaktionsgefäße pipettieren
3.	1000 µl internen Standard (INT STD), eiskalt , bei -20 °C gelagert, dazu geben und gut mischen
4.	10 Minuten bei -20 °C inkubieren
5.	10 Minuten bei 4 °C und 10000 g zentrifugieren
6.	10 µl vom Überstand in das LC-MS/MS-System injizieren

7. CHROMATOGRAPHISCHE BEDINGUNGEN

Säulenmaterial:	z. B. PerfectSil 120 ODS, 5 µm
Säulendimension:	125 x 4 mm
Fluss:	0,4 ml/min, isokratisch
Säulentemperatur:	45 °C
Auftragsvolumen:	10 µl
Laufzeit:	4 Minuten

Wir empfehlen die Verwendung einer Vorsäule/Vorfilter, um die Säulenhaltbarkeit zu verlängern.

Nach der Analyse sollte die Trennsäule mit ca. 20 ml 20 % Acetonitril gespült werden. Die Säule kann in 80 % Acetonitril gelagert werden.

8. MS/MS-METHODE (BEISPIELHAFT AUFGEFÜHRT FÜR EIN WATERS QUATTRO PREMIER XE TANDEM MASSENSPEKTROMETER)

Modus:	MRM
Polarität:	ESI ⁻
Kapillarspannung (kV):	4
Konusspannung (V):	15
Extraktor (V):	3
RF-Linse (V):	0
Quellentemperatur (°C):	130
Desolvation-Temperatur (°C):	500
Gasfluss am Konus (l/h):	50
Desolvation-Gasfluss (l/h):	950
Kollisionsgasfluss (ml/min):	0,25

MRM-Übergänge (m/z)

Methylmalonsäure

116,62 > 72,68	Konusspannung: 15	Kollisionsenergie: 10
116,62 > 54,85	Konusspannung: 15	Kollisionsenergie: 20

Interner Standard (isotopisch markiertes MMA-d₃)

119,62 > 75,81

Konusspannung: 15

Kollisionsenergie: 10

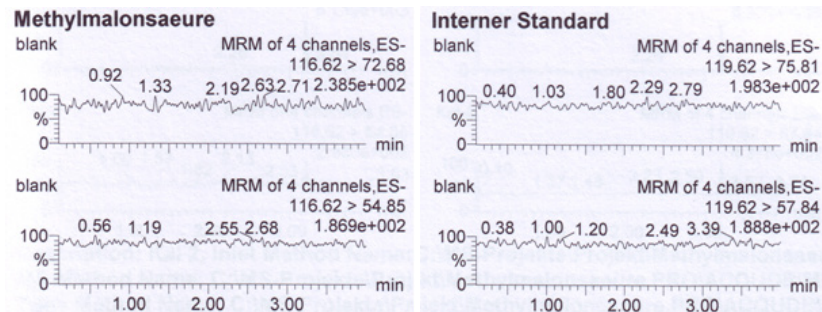
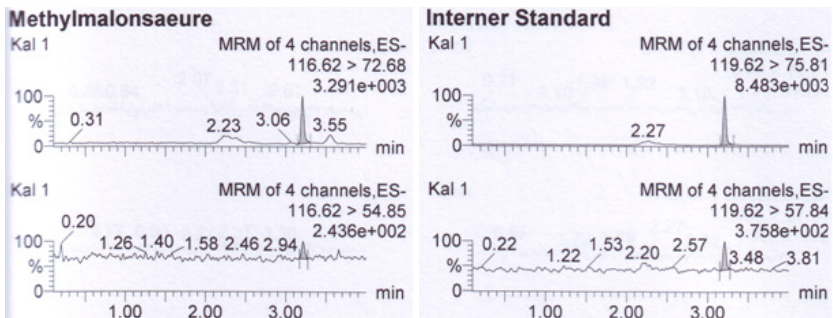
119,62 > 57,84

Konusspannung: 15

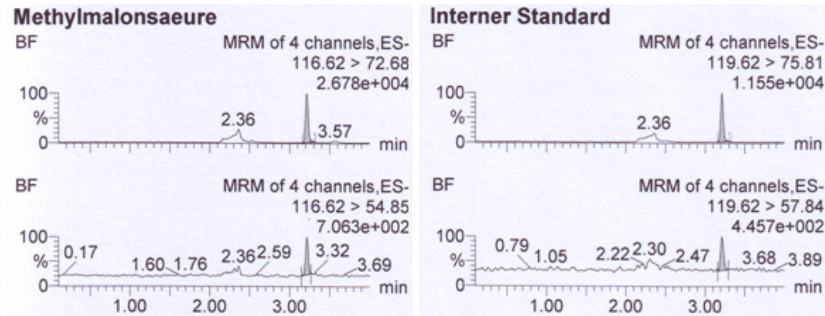
Kollisionsenergie: 23

9. AUSWERTUNG

Als Modell zur Auswertung kann die lineare Regression unter Berücksichtigung des internen Standards verwendet werden. Zwischen den beiden Kalibratorkonzentrationen wird eine Gerade gelegt. Anhand dieser können dann die Proben berechnet werden.

10. MUSTERCHROMATOGRAMME**Blank****Kalibrator**

Probe



11. QUALITÄTSKONTROLLE

Immundiagnostik empfiehlt den Einsatz von externen Kontrollen für die interne Qualitätskontrolle, wenn möglich.

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 die Richtigkeit der Messergebnisse nicht gewährleisten.

Referenzwerte

Vorläufiger Referenzbereich (Urin): 0,48–2,96 mmol MMA/mol Kreatinin

Wir empfehlen jedem Labor, einen eigenen Referenzbereich zu etablieren.

12. TESTCHARAKTERISTIKA

Präzision und Reproduzierbarkeit

Intra-Assay (n = 16)

Probe	Methylmalonsäure [ng/ml]	VK [%]
1	1438	4,1

Inter-Assay (n = 12)

Probe	Methylmalonsäure [ng/ml]	VK [%]
1	2805	9,0

Nachweisgrenze

Die Nachweisgrenze wurde mit der Kalibriergeradenmethode (DIN 32645) festgelegt. Gemessen wurden 10 Konzentrationen von 3-30 ng/ml in 2-fach Bestimmungen.

Nachweisgrenze Methylmalonsäure: 1,6 ng/ml

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

13. ENTSORGUNG

Laufmittel (MOPHA) und Aktivierungsreagenz (ACTSOL) müssen als halogenfreier Lösungsmittelabfall entsorgt werden.

14. VORSICHTSMASSNAHMEN

- Alle im Kit enthaltenen Reagenzien dürfen ausschließlich zur *in-vitro*-Diagnostik verwendet 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.

15. TECHNISCHE MERKMALE

- Reagenzien der Testpackung dürfen nicht mit anderen Chargen gemischt werden.
- Qualitätskontrollen sollten immer mitgemessen werden.
- Die Reagenzien dürfen nach Ablauf des Mindesthaltbarkeitsdatums nicht mehr verwendet werden.
- Die Bestimmung ist immer nach der im Kit beigefügten Arbeitsanleitung durchzuführen.

16. ALLGEMEINE HINWEISE ZUM TEST

- Dieser Kit wurde nach der IVD-Richtlinie 98/79/EG hergestellt und in den Verkehr gebracht.
- 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.
- Bei Gewährleistungsansprüchen ist das beanstandete Material mit schriftlicher Erklärung innerhalb von 14 Tagen zum Hersteller, der Immundiagnostik AG, zurückzusenden.

17. LITERATUR

1. Bjørke Monsen, Anne Lise, and Per Magne Ueland. 2003. "Homocysteine and Methylmalonic Acid in Diagnosis and Risk Assessment from Infancy to Adolescence." *American Journal of Clinical Nutrition* **78**: 7–21.
2. Hoey, Leane, J J Strain, and Helene McNulty. 2009. "Studies of Biomarker Responses to Intervention with Vitamin B-12 : A Systematic Review of Randomized Controlled Trials 1 – 5." *American Journal of Clinical Nutrition* **89**: 1981S–96S. doi:10.3945/ajcn.2009.27230C.1.
3. Kräutler, B. 2005. "Vitamin B12: Chemistry and Biochemistry." *Biochemical Society Transactions* **33**: 806–810. doi:10.1042/BST0330806.

4. Miller, Joshua W., Marjorie G. Garrod, Lindsay H. Allen, Mary N. Haan, and Ralph Green. 2009. "Metabolic Evidence of Vitamin B-12 Deficiency, Including High Homocysteine and Methylmalonic Acid and Low Holotranscobalamin, Is More Pronounced in Older Adults with Elevated Plasma Folate." *American Journal of Clinical Nutrition* **90**: 1586–1592. doi:10.3945/ajcn.2009.27514.
5. Nilsson, Lars B., and Göran Eklund. 2007. "Direct Quantification in Bioanalytical LC-MS/MS Using Internal Calibration via Analyte/stable Isotope Ratio." *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis* **43**: 1094–1099. doi:10.1016/j.jpba.2006.09.030.
6. Vogiatzoglou, Anna, Abderrahim Oulhaj, a. David Smith, Eha Nurk, Christian a. Drevon, Per M. Ueland, Stein E. Vollset, Grethe S. Tell, and Helga Refsum. 2009. "Determinants of Plasma Methylmalonic Acid in a Large Population: Implications for Assessment of Vitamin B12 Status." *Clinical Chemistry* **55**: 2198–2206. doi:10.1373/clinchem.2009.128678.
7. Werder, Steven F. 2010. "Cobalamin Deficiency, Hyperhomocysteinemia, and Dementia." *Neuropsychiatric Disease and Treatment* **6**: 159–195. doi:10.2147/NDT.S6564.

Verwendete Symbole:



Temperaturbegrenzung



Bestellnummer



In-Vitro-Diagnostikum



Zu verwenden mit



Hersteller



Inhalt ausreichend für <n> Prüfungen



Chargenbezeichnung



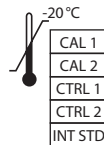
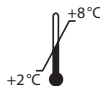
Verwendbar bis

Methylmalonic acid LC-MS/MS kit

For the determination of methylmalonic acid in urine

Valid from

REF **KM4000**



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

Tel.: +49 6251 70190-0

Fax: + 49 6251 849430

e.mail: info@immundiagnostik.com

www.immundiagnostik.com

Table of Contents

1. INTENDED USE	13
2. INTRODUCTION	13
3. MATERIAL SUPPLIED	14
4. MATERIAL REQUIRED BUT NOT SUPPLIED	14
5. PREPARATION AND STORAGE OF REAGENTS	14
6. SAMPLE PREPARATION FOR 100 SAMPLES	15
7. CHROMATOGRAPHIC CONDITIONS	15
8. MS/MS-METHOD (LISTED AS AN EXAMPLE FOR A WATERS QUATTRO PREMIER XE TANDEM MASS SPECTROMETER)	16
<i>MRM transitions (m/z)</i>	16
9. CALCULATION	16
10. EXAMPLES OF CHROMATOGRAMS	17
11. QUALITY CONTROL	18
12. PERFORMANCE CHARACTERISTICS	18
<i>Precision and reproducibility</i>	18
<i>Detection limit</i>	18
13. DISPOSAL	18
14. PRECAUTIONS	19
15. TECHNICAL HINTS	19
16. GENERAL NOTES ON THE TEST AND TEST PROCEDURE	19
17. REFERENCES	19

1. INTENDED USE

The described LC-MS/MS application is intended for the quantitative determination of methylmalonic acid in urine. For *in vitro* diagnostic use only.

2. INTRODUCTION

Methylmalonic acid (MMA) is a compound produced during amino acid metabolism. Increased production of MMA serves as a sensitive and early indicator of vitamin B₁₂ deficiency.

Normally, vitamin B₁₂ acts as a coenzyme, promoting the conversion of methylmalonyl CoA to succinyl CoA. If there is not enough B₁₂ available to act as a coenzyme, then methylmalonyl CoA concentrations begin to rise, and the body converts the methylmalonyl CoA to MMA instead. Decreased availability of B₁₂ leads to increases in blood and urine MMA levels.

Vitamin B₁₂ deficiency can cause hematologic changes, such as anemia and large red blood cells. It can also cause signs and symptoms of neuropathy, such as behavioral changes (confusion, irritability, depression). Increased concentrations of MMA are often detectable before the occurrence of hematologic changes.

Because a relatively large amount of the B₁₂ found in the blood is bound to proteins and is not freely available for analysis, MMA determination may be a better measure of bioavailable B₁₂ than the usual vitamin B₁₂ tests. MMA and homocysteine (which may be elevated when either B₁₂ or folate are deficient) are valuable in detecting early and mild cases of B₁₂ deficiency.

Indications

- Decreased red blood cell production and **pernicious anemia**
- **Gastrointestinal tract** – enlarged liver (hepatomegaly), nausea, vomiting, heartburn, abdominal bloating, gas, constipation or diarrhea, loss of appetite, and weight loss
- **Nervous system** – permanent nerve damage, numbness and tingling in the hands and feet, unsteadiness, difficulty walking, confusion, depression, memory loss, and dementia

3. MATERIAL SUPPLIED

Cat. No.	Label	Kit components	Quantity
KM3000LM	MOPHA	Mobile phase	1000 ml
KM3000KA	CAL1 CAL2	Calibrators 1 and 2 (lyoph., 250 µl)	5 vials each
KM3000KO	CTRL 1 CTRL 2	Controls 1 and 2 (lyoph., 250 µl)	5 vials each
KM3000IS	INT STD	Internal standard (-20°C)	2x 50 ml
KM3000AC	ACTSOL	Activation solution	5 ml
KM3000RE	RECSOL	Reconstitution solution	6 ml

For the preparation of the methylmalonic acid application, tuning is necessary to find the ideal LC-MS/MS settings. The tuning solution (KM3000TU, MMA and INT STD as pure substances), the column (KM3000RP) and all other individual components can be ordered separately. Please ask for our single component price list.

4. MATERIAL REQUIRED BUT NOT SUPPLIED

- 1.5 ml Eppendorf reaction tubes
- Glass vials; LC-MS/MS-suitable
- Calibrated precision pipettors and 10–1000 µl tips
- Cooled centrifuge (4°C), 10 000 g, for 1.5 ml Eppendorf reaction tubes
- Vortex
- LC-MS/MS equipment
- RP-C₁₈ column, e.g. PerfectSil 120 ODS; 5 µm (125 x 4.0 mm)

5. PREPARATION AND STORAGE OF REAGENTS

- The **lyophilised calibrators** (CAL 1 and CAL 2) **and controls** (CTRL 1 and CTRL 2) are stable at **-20°C** until the expiry date stated on the label. Before use, they must be reconstituted with **250 µl of reconstitution solution** (RECSOL). Reconstituted standards and controls are not stable and cannot be stored.
- The **internal standard** (INTSTD) is stable at **-20°C** until the expiry date stated on the label.
- The **mobile phase** (MOPHA) is stable at **2–8°C** until the expiry date stated on the label. **Before use, 0.4 % of activation reagent** (ACTSOL) **must be added** (e.g. 500 ml MOPHA + 2 ml ACTSOL). The prepared solutions have to be

used within **2 weeks**. For this reason, it is recommended to prepare only the desired amount necessary for each assay.

WARNING: The activation reagent (ACTSOL) must be added under the fume hood. All vials to be used must be absolutely clean, detergent-free and preferably made of a LC-MS/MS suitable glass.

- All other test reagents are ready to use. Test reagents are stable until the expiry date (see label of test package) when stored at **2–8 °C**.

6. SAMPLE PREPARATION FOR 100 SAMPLES

Urine is suited as sample for the assay.

Control samples should be analyzed with each run.

1.	Prior to use in the assay, allow all samples and reagents (except for the internal standard) to come to room temperature (18–26 °C). Mix well samples and reagents before use
2.	Pipet 50 µl of sample, calibrator (CAL 1 and CAL 2) or control (CTRL 1 and CTRL 2) in 1,5 ml Eppendorf reaction tubes
3.	Add 1000 µl of internal standard (INT STD), ice-cooled , stored at -20 °C, and mix well
4.	Incubate for 10 minutes at -20 °C
5.	Centrifuge for 10 minutes at -4 °C and 10 000 g
6.	Inject 10 µl of supernatant into the LC-MS/MS system

7. CHROMATOGRAPHIC CONDITIONS

Column material: e.g. PerfectSil 120 ODS, 5 µm

Column dimension: 125 x 4 mm

Flow: 0.4 ml/min, isocratic

Column temperature: 45 °C

Inject volume: 10 µl

Run time: 4 min

We recommend to use a guard column/filter to extend column's life.

After the analysis, the separation column should be washed with ~20 ml of 20 % ace-

tonitril. The column can be stored in 80 % acetonitril.

8. MS/MS-METHOD (LISTED AS AN EXAMPLE FOR A WATERS QUATTRO PREMIER XE TANDEM MASS SPECTROMETER)

Mode:	MRM
Polarity:	ESI ⁻
Capillary (kV):	4
Cone (V):	15
Extracor (V):	3
RF Lens (V):	0
Source temperature (°C):	130
Desolvation Temperatur (°C):	500
Cone Gas Flow (l/h):	50
Desolvation Gas Flow (l/h):	950
Collision Gas Flow (ml/min):	0.25

MRM transitions (m/z)

Methylmalonic acid

116.62 > 72.68	Cone Voltage: 15	Collisions Energy: 10
116.62 > 54.85	Cone Voltage: 15	Collisions Energy: 20

Internal Standard, isotopically labelled MMA-d₃

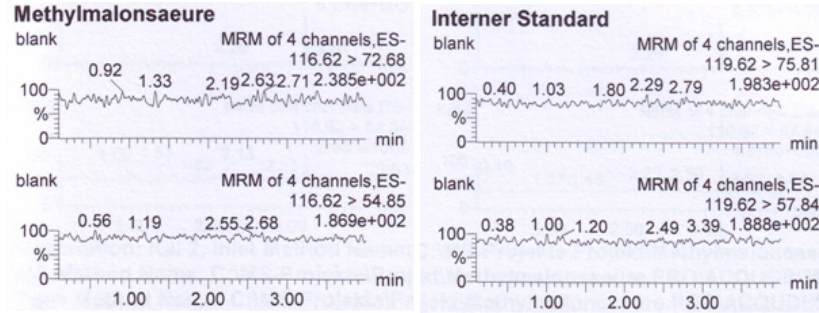
119.62 > 75.81	Cone Voltage: 15	Collisions Energy: 10
119.62 > 57.84	Cone Voltage: 15	Collisions Energy: 23

9. CALCULATION

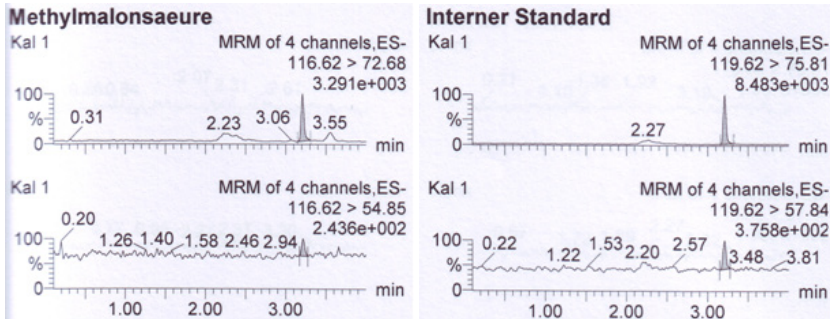
The linear regression can be used as model for evaluation of the results, whereby the internal standard should be considered. The two calibrator concentration points are connected by a straight line. The samples can be calculated using the obtained line.

10. EXAMPLES OF CHROMATOGRAMS

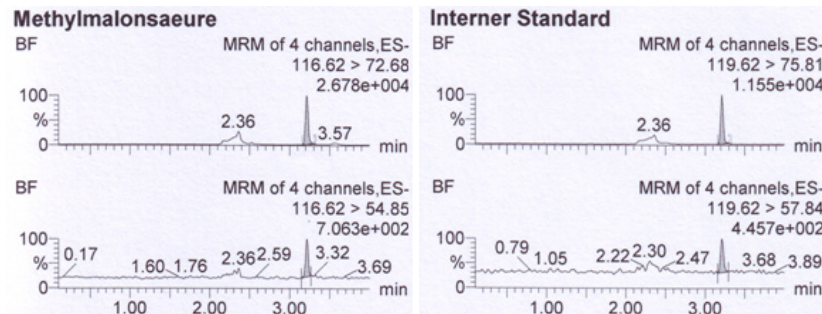
Blank



Calibrator



Sample



11. QUALITY CONTROL

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

Preliminary reference range (urine): 0.48–2.96 mmol MMA/mol creatinine

We recommend each laboratory to establish its own reference range.

12. PERFORMANCE CHARACTERISTICS

Precision and reproducibility

Intra-Assay (n = 16)

Sample	Methylmalonic acid [ng/ml]	CV [%]
1	1438	4.1

Inter-Assay (n = 12)

Sample	Methylmalonic acid [ng/ml]	CV [%]
1	2805	9.0

Detection limit

Detection limit of methylmalonic acid: 1.6 ng/ml

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

13. DISPOSAL

Mobile phase (MOPHA) and activation reagent (ACTSOL) must be disposed as non-halogenated solvents.

14. PRECAUTIONS

- All reagents in the kit package are for *in vitro* diagnostic use only.
- 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.

15. TECHNICAL HINTS

- Do not mix different lot numbers of any kit component.
- Control samples should be analyzed with each run.
- Reagents should not be used beyond the expiration date shown on the kit label.
- The assay should always be performed according to the enclosed manual.

16. GENERAL NOTES ON THE TEST AND TEST PROCEDURE

- This assay was produced and distributed according to the IVD guidelines of 98/79/EC.
- All reagents in the kit package are for *in vitro* diagnostic use only.
- 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.
- Warranty claims and complaints in respect of deficiencies must be lodged within 14 days after receipt of the product. The product shall be sent to Immundiagnostik AG together with a written complaint.

17. REFERENCES

1. Bjørke Monsen, Anne Lise, and Per Magne Ueland. 2003. "Homocysteine and Methylmalonic Acid in Diagnosis and Risk Assessment from Infancy to Adolescence." *American Journal of Clinical Nutrition* **78**: 7–21.
2. Hoey, Leane, J J Strain, and Helene McNulty. 2009. "Studies of Biomarker Re-

- sponses to Intervention with Vitamin B-12 : A Systematic Review of Randomized Controlled Trials 1 – 5." *American Journal of Clinical Nutrition* **89**: 1981S–96S. doi:10.3945/ajcn.2009.27230C.1.
3. Kräutler, B. 2005. "Vitamin B12: Chemistry and Biochemistry." *Biochemical Society Transactions* **33**: 806–810. doi:10.1042/BST0330806.
 4. Miller, Joshua W., Marjorie G. Garrod, Lindsay H. Allen, Mary N. Haan, and Ralph Green. 2009. "Metabolic Evidence of Vitamin B-12 Deficiency, Including High Homocysteine and Methylmalonic Acid and Low Holotranscobalamin, Is More Pronounced in Older Adults with Elevated Plasma Folate." *American Journal of Clinical Nutrition* **90**: 1586–1592. doi:10.3945/ajcn.2009.27514.
 5. Nilsson, Lars B., and Göran Eklund. 2007. "Direct Quantification in Bioanalytical LC-MS/MS Using Internal Calibration via Analyte/stable Isotope Ratio." *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis* **43**: 1094–1099. doi:10.1016/j.jpba.2006.09.030.
 6. Vogiatzoglou, Anna, Abderrahim Oulhaj, a. David Smith, Eha Nurk, Christian a. Drevon, Per M. Ueland, Stein E. Vollset, Grethe S. Tell, and Helga Refsum. 2009. "Determinants of Plasma Methylmalonic Acid in a Large Population: Implications for Assessment of Vitamin B12 Status." *Clinical Chemistry* **55**: 2198–2206. doi:10.1373/clinchem.2009.128678.
 7. Werder, Steven F. 2010. "Cobalamin Deficiency, Hyperhomocysteinemia, and Dementia." *Neuropsychiatric Disease and Treatment* **6**: 159–195. doi:10.2147/NDT.S6564.

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