

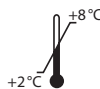
# IDK<sup>®</sup> Biotin ELISA

***Zur in-vitro-Bestimmung von Biotin (Vitamin H)  
in Serum, Plasma, Urin und Milch***

***For the in vitro determination of biotin (vitamin H)  
in serum, plasma, urine and milk***

Gültig ab / Valid from 2022-01-11

**REF** **K 8141**



**IVD** **CE**



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

Tel.: +49 6251 70190-0

Fax: + 49 6251 70190-363

e.mail: [info@immundiagnostik.com](mailto:info@immundiagnostik.com)

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



# Inhalt

<b>1. VERWENDUNGSZWECK</b>	<b>2</b>
<b>2. EINLEITUNG</b>	<b>2</b>
<b>3. INHALT DER TESTPACKUNG</b>	<b>2</b>
<b>4. ERFORDERLICHE LABORGERÄTE UND HILFSMITTEL</b>	<b>3</b>
<b>5. LAGERUNG UND VORBEREITUNG DER REAGENZIEN</b>	<b>3</b>
<b>6. PROBENLAGERUNG UND -VORBEREITUNG</b>	<b>4</b>
<i>Probenlagerung</i>	4
<i>Probenvorbereitung</i>	4
<b>7. TESTDURCHFÜHRUNG</b>	<b>5</b>
<i>Testprinzip</i>	5
<i>Pipettierschema</i>	5
<b>8. ERGEBNISSE</b>	<b>6</b>
<b>9. EINSCHRÄNKUNGEN</b>	<b>7</b>
<b>10. QUALITÄTSKONTROLLE</b>	<b>7</b>
<i>Referenzwerte</i>	8
<b>11. TESTCHARAKTERISTIKA</b>	<b>8</b>
<i>Analytische Spezifität - Kreuzreaktivität</i>	8
<i>Analytische Spezifität – Interferenzen</i>	9
<i>Analytische Sensitivität</i>	9
<i>Genauigkeit – Richtigkeit</i>	9
<i>Linearität</i>	10
<i>Genauigkeit – Präzision</i>	11
<b>12. VORSICHTSMASSNAHMEN</b>	<b>11</b>
<b>13. TECHNISCHE MERKMALE</b>	<b>12</b>
<b>14. ALLGEMEINE HINWEISE ZUM TEST</b>	<b>12</b>
<b>15. LITERATUR</b>	<b>13</b>

## 1. VERWENDUNGSZWECK

Der hier beschriebene Assay ist für die Bestimmung von Biotin in Serum, Plasma, Urin und Milch geeignet. Nur zur *in-vitro*-Diagnostik.

## 2. EINLEITUNG

Biotin (Vitamin H) findet sich weit verbreitet in Bakterien, Pilzen, höheren Pflanzen und tierischen Geweben. In Nahrungsmitteln tritt der Großteil des Biotins kovalent an Protein gebunden auf, während nur ein geringer Teil in freier Form zur Verfügung steht. Während des Verdauungsvorgangs wird das Biozytin (Biotinyl-Lysin) aus den Proteinen freigesetzt, das ähnlich dem Biotin leicht aus dem Intestinaltrakt resorbiert werden kann. Biotin wird anschließend im Plasma und in den Erythrozyten durch das Einwirken des Enzyms Biozytinase aus dem Biozytin freigesetzt und steht danach als prosthetische Gruppe für eine Reihe von biotinabhängigen Enzymen zur Verfügung.

Der tägliche Bedarf an Biotin ist schwer abzuschätzen, da eine gesunde Darmflora durch endogene Synthese wesentlich zur Deckung des Vitamin-H-Bedarfs beiträgt. Nach neuesten Kenntnissen wird für Erwachsene eine tägliche Zufuhr von 100–200 µg empfohlen. Bei chronischen Hämodialysepatienten zeigt eine Supplementierung im Milligrammbereich eine deutliche Verbesserung der neuropathologischen Lage und des Glukosestoffwechsels.

Biotin-Mangelerscheinungen werden z.B. verursacht durch eine Zerstörung der Darmflora oder durch extreme Ernährungsgewohnheiten (z. B. häufiger Verzehr von rohen Eiern). Folgen des Biotinmangels können sein: Dermatitis, Haarausfall, Anorexie, muskuläre Hypotonie, Depressionen und Störungen der Fortpflanzung.

## 3. INHALT DER TESTPACKUNG

Art.-Nr.	Bezeichnung	Kit-Komponenten	Menge
K 8141	PLATE	Mikrotitermodul, vorbeschichtet	12 x 8 Vertiefungen
K 0001.C.100	WASHBUF	Waschpufferkonzentrat, 10x	2 x 100 ml
K 8141	CONJ	Konjugat, gebrauchsfertig	1 x 13 ml
K 8141	STD	Standards, gebrauchsfertig (Konzentrationen der Spezifikation entnehmen)	1 x 6 vials

Art.-Nr.	Bezeichnung	Kit-Komponenten	Menge
K 8141	CTRL A	Kontrolle, gebrauchsfertig (Bereich der Spezifikation entnehmen)	1 x 1 vial
K 8141	CTRL B	Kontrolle, gebrauchsfertig (Bereich der Spezifikation entnehmen)	1 x 1 vial
K 8141	SAMPLEBUF	Probenverdünnungspuffer, gebrauchsfertig	1 x 30 ml
K 0002.15	SUB	Substrat (Tetramethylbenzidin), gebrauchsfertig	1 x 15 ml
K 0003.15	STOP	Stopplösung, gebrauchsfertig	1 x 15 ml
K 8141	FOL	Lichtundurchlässige Folie zum Abkleben der Mikrotiterplatte	3 x 1 Stück

Für Nachbestellungen von Einzelkomponenten verwenden Sie als Bestellnummer die Artikelnummer gefolgt von der Bezeichnung.

#### 4. ERFORDERLICHE LABORGERÄTE UND HILFSMITTEL

- Reinstwasser\*
- Präzisionspipetten und Pipettenspitzen für den Einmalgebrauch mit variablen Volumina von 10–1 000 µl
- Vortex-Mixer
- Mikrotiterplattenphotometer (benötigte Filter siehe Kapitel 7)

\* Immundiagnostik AG empfiehlt die Verwendung von Reinstwasser nach ISO 3696. Es handelt sich dabei um Wasser des Typs 1, welches frei von ungelösten und kolloidalen Ionen und organischen Molekülen ist (frei von Partikeln > 0,2 µm) mit einer elektrischen Leitfähigkeit von 0,055 µS/cm bei 25 °C (≥ 18,2 MΩ cm).

#### 5. LAGERUNG UND VORBEREITUNG DER REAGENZIEN

- Reagenzien mit einem **Volumen kleiner 100 µl** sollten vor Gebrauch kurz an zentrifugiert werden, um Volumenverluste zu vermeiden.
- **Vorbereitung des Waschpuffers:** Das **Waschpufferkonzentrat (WASHBUF)** muss vor Gebrauch **1:10** in Reinstwasser verdünnt werden (100 ml WASHBUF + 900 ml Reinstwasser), gut mischen. Aufgrund des hohen Salzgehalts im Konzentrat kann es zu Kristallbildungen kommen. Die Kristalle lösen sich bei Raumtemperatur bzw. im Wasserbad bei 37 °C auf. Das **WASHBUF** kann bei **2–8 °C** bis zum angegebenen Haltbarkeitsdatum aufbewahrt werden. Der

**Waschpuffer** (1:10 verdünntes WASHBUF) ist **1 Monat bei 2–8 °C** in einem geschlossenen Gefäß haltbar.

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

## 6. PROBENLAGERUNG UND -VORBEREITUNG

### *Probenlagerung*

#### **Serum und Plasma**

Plasma bzw. Serum kann 5 Tage bei Raumtemperatur (15–30 °C), 4 Wochen bei 2–8 °C oder 21 Monate bei -20 °C gelagert werden. Plasma- und Serumproben können bis zu 6 Mal eingefroren und aufgetaut werden.

### *Probenvorbereitung*

#### **Serum und Plasma**

Humanes Serum bzw. Plasma kann im Assay direkt eingesetzt werden, sollte aber frei von unlöslichen Partikeln sein. Trübe Serum- und Plasmaproben sollten vor Verwendung anzentrifugiert werden (3 000 g).

Serum- und Plasmaproben mit erwarteter hoher Biotinkonzentration (über 1 100 ng/l) müssen mit Probenverdünnungspuffer entsprechend vorverdünnt werden.

#### **Z. B. Verdünnungsfaktor 2:**

1+1 = 1:2 = 75 µl Probe + 75 µl Probenverdünnungspuffer

#### **Urin**

Urinproben müssen vor dem Einsatz im Test 1:40–1:80 mit Probenverdünnungspuffer verdünnt werden.

#### **Milch**

Milchproben müssen vor dem Einsatz im Test 1:200–1:400 mit Probenverdünnungspuffer verdünnt werden.

## 7. TESTDURCHFÜHRUNG

### *Testprinzip*

Dieser ELISA dient zur Bestimmung von Biotin in biologischen Proben. Er beruht auf dem Prinzip eines kompetitiven Enzymbindungstests, der auf der hohen Affinität von Biotin und Streptavidin basiert.

Für den Test werden Proben, Standards und Kontrollen in die mit Streptavidin beschichteten Vertiefungen der Mikrotiterplatte pipettiert und inkubiert. Nach einem Waschschrift wird Konjugat (enzymmarkiertes Biotin) zugegeben und konkurriert mit dem Biotin aus den Proben, Standards und Kontrollen um die Streptavidin-Bindestellen auf der Mikrotiterplatte. Nicht gebundenes enzymmarkiertes Biotin wird in einem Waschschrift wieder entfernt und Substrat zugegeben, welches vom konjugatgebundenen Enzym in einer Farbreaktion umgesetzt wird. Nach dem Abstoppen der Reaktion wird die Absorption bestimmt, die sich umgekehrt proportional zur Biotinkonzentration in Proben, Standards und Kontrollen verhält. Anhand einer mitgeführten Standardkurve – optische Dichte (Absorption bei 450 nm) versus Standardkonzentration – lässt sich die Konzentration der Probe ermitteln.

### *Pipettierschema*

Vor Gebrauch **alle Reagenzien und Proben** auf **Raumtemperatur** (20–30 °C) bringen, gut mischen.

Markieren Sie die Positionen für Standards/Proben/Kontrollen im Protokollblatt.

Die benötigten Mikrotiterstreifen aus dem Kit nehmen. Nicht verwendete Mikrotiterstreifen müssen mit der beiliegenden Klebefolie (FOL) abgeklebt und zusammen mit dem Trockenmittelbeutel in der verschlossenen Aluminiumverpackung bis zum angegebenen Haltbarkeitsdatum bei 2–8 °C gelagert werden.

Im Fall einer automatisierten Abarbeitung des Tests müssen automaten-spezifische Anpassungen der Prozedur durchgeführt werden, um den jeweiligen technischen Gegebenheiten gerecht zu werden. Für Unterstützung und Rückfragen wenden Sie sich bitte an Ihren Anbieter oder Immundiagnostik AG.

**Achtung:** Beim Arbeiten mit Standards und Kontrollen **immer** Handschuhe tragen, insbesondere beim Überführen für einen Automatenansatz in DSX Vials, um Kontamination der Standards und Kontrollen durch ungeschützte Haut zu vermeiden.

Wir empfehlen, die Bestimmungen in Doppelwerten durchzuführen.

1.	<b>50 µl Standards/Kontrollen/Proben</b> in die jeweiligen Vertiefungen pipettieren.
2.	<b>50 µl Probenverdünnungspuffer</b> (SAMPLEBUF) in die jeweiligen Vertiefungen (für Standards/Kontrollen/Proben) dazu pipettieren.
3.	Streifen mit der mitgelieferten Folie (FOL) abdecken und <b>30 min bei Raumtemperatur</b> (20–30 °C) inkubieren.
4.	Inhalt der Vertiefungen verwerfen und <b>5 x mit je 250 µl Waschpuffer</b> waschen. Nach dem letzten Waschschrift Reste von Waschpuffer durch Ausklopfen auf saugfähigem Papier entfernen.
5.	<b>100 µl Konjugat</b> (CONJ) in jede Vertiefung pipettieren.
6.	Streifen mit der mitgelieferten Folie (FOL) abdecken und <b>30 min bei Raumtemperatur</b> (20–30 °C) inkubieren.
7.	Inhalt der Vertiefungen verwerfen und <b>5 x mit je 250 µl Waschpuffer</b> waschen. Nach dem letzten Waschschrift Reste von Waschpuffer durch Ausklopfen auf saugfähigem Papier entfernen.
8.	<b>100 µl Substrat</b> (SUB) in jede Vertiefung pipettieren.
9.	<b>8–12 min* bei Raumtemperatur</b> (20–30 °C) <b>im Dunkeln</b> inkubieren.
10.	<b>100 µl Stopplösung</b> (STOP) in jede Vertiefung pipettieren, gut mischen
11.	<b>Extinktion sofort</b> im Mikrotiterplattenphotometer bei <b>450 nm</b> gegen die Referenzwellenlänge 620 nm (oder 690 nm) messen. Ist keine Referenzwellenlänge vorhanden, wird nur bei 450 nm gemessen. Falls die Extinktion des höchsten Standards den Messbereich des Photometers übersteigt, sollte sofort bei <b>405 nm</b> gegen 620 nm (690 nm) gemessen werden.

\* Die Intensität der Farbentwicklung ist temperaturabhängig. Es wird empfohlen, den Farbumschlag während der Inkubationszeit zu beobachten und entsprechend der Farbentwicklung die Reaktion zu stoppen.

## 8. ERGEBNISSE

Die unten beschriebenen mathematischen Modelle können alternativ zur Auswertung benutzt werden. Wir empfehlen die Punkt-zu-Punkt-Auswertung.



## 1. Punkt-zu-Punkt-Auswertung

Für die optische Dichte und für die Konzentration empfehlen wir eine lineare Ordinate bzw. Abszisse.

## 2. 4-Parameter-Funktion

Für die optische Dichte empfehlen wir eine lineare Ordinate und für die Konzentration eine logarithmische Abszisse (bei einer logarithmischen Abszisse muss für den Standard mit der Konzentration 0 ein Wert kleiner 1 eingegeben werden z. B. 0,001).

Vor jeder automatischen Auswertung sollte stets eine Kontrolle der Doppelwerte auf Plausibilität („Ausreißerkontrolle“) durchgeführt werden; falls dies nicht durch das verwendete Programm erfolgt, sollte die Kontrolle manuell durchgeführt werden.

### Serum/Plasma

Der ermittelte Biotin-Spiegel der Proben kann direkt abgelesen werden.

### Urin

Die ermittelten Ergebnisse werden mit dem verwendeten **Verdünnungsfaktor** (1:40–1:80) multipliziert, um die tatsächlichen Konzentrationen zu erhalten.

### Milch

Die ermittelten Ergebnisse werden mit dem verwendeten **Verdünnungsfaktor** (1:200–1:400) multipliziert, um die tatsächlichen Konzentrationen zu erhalten.

Sollte ein **anderer Verdünnungsfaktor** verwendet worden sein, so ist die ermittelte Konzentration mit dem verwendeten Verdünnungsfaktor zu multiplizieren.

## 9. EINSCHRÄNKUNGEN

Proben mit Konzentrationen oberhalb des Messbereichs ( $> 1\,100\text{ ng/l}$ ) können mit Probenverdünnungspuffer stärker verdünnt und erneut gemessen werden. Bitte beachten Sie diese stärkere Verdünnung bei der Ergebnisberechnung.

Proben mit Konzentrationen unterhalb des Messbereichs (= LoQ,  $48,1\text{ ng/l}$ ) können nicht klar quantifiziert werden.

## 10. QUALITÄTSKONTROLLE

Immundiagnostik AG 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 AG die Richtigkeit der Messergebnisse nicht gewährleisten.

### *Referenzwerte*

Anhand einer laborinternen Studie mit Proben von augenscheinlich Gesunden (n = 40) wurden folgende Werte ermittelt:

#### **Serum/Plasma**

Gesunde:	> 250 ng/l
Suboptimaler Status:	100–250 ng/l
Avitaminose:	< 100 ng/l

Wir empfehlen jedem Labor, einen eigenen Referenzbereich zu etablieren.

Zur sicheren Diagnose eines Biotinmangels wird empfohlen, den Biotingehalt aus Serumabnahmen verschiedener Tage eines Patienten zu bestimmen, da der Biotinspiegel Tagesschwankungen von bis zu 100 % unterliegen kann. Insbesondere nach Supplementation steigt der Spiegel schnell um ein Vielfaches an.

#### **Urin**

Ab 70 nmol/l (entspricht 17 101,7 ng/l) geht man von einer adäquaten Versorgung mit Biotin aus<sup>[14]</sup>.

## **11. TESTCHARAKTERISTIKA**

Die Werte aller folgenden Testcharakteristika wurden mit der Punkt-zu-Punkt-Auswertung ermittelt.

### *Analytische Spezifität - Kreuzreaktivität*

Die Spezifität wurde nachgewiesen durch Bestimmung der Kreuzreaktivität von Biocytin. Die Kreuzreaktivität wird angegeben in Prozent, bezogen auf die Biotin-Reaktivität:

- Biotin 100,0%
- Biocytin 67,0%

### Analytische Spezifität – Interferenzen

Es wurden verschiedene Substanzen, welche möglicherweise mit dem IDK® Biotin ELISA interferieren könnten, getestet. Es wurden hierzu positive sowie negative Proben mit Serumbestandteilen (empfohlene Dosen gemäß CLSI-Richtlinie EP7-A2) versetzt und gemessen.

Es wurde keine Interferenz durch folgende Serumbestandteile gefunden: Hämoglobin, Bilirubin oder Triglyceride.

### Analytische Sensitivität

Die im Folgenden aufgeführten Werte wurden in Bezug auf die Standardkurve ohne Berücksichtigung eventuell verwendeter Probenverdünnungsfaktoren ermittelt.

Leerwert ( <i>limit of blank</i> , LoB):	25 ng/l
Nachweisgrenze ( <i>limit of detection</i> , LoD):	32,4 ng/l
Bestimmungsgrenze ( <i>limit of quantitation</i> , LoQ):	48,1 ng/l
Messbereich:	48,1–1 100 ng/l

Die Auswertung wurde gemäß der CLSI-Richtlinie EP-17-A2 durchgeführt.

### Genauigkeit – Richtigkeit

Die Richtigkeit gibt das Verhältnis zwischen dem Messergebnis und der wahren Konzentration einer Probe an. 3 Plasmaproben wurden dafür mit bekannten Biotin-Konzentrationen versetzt und gemessen. Folgende Werte wurden ohne Berücksichtigung der verwendeten Probenverdünnung ermittelt:

Probe [ng/l]	Spike [ng/l]	Erwartet [ng/l]	Gemessen [ng/l]	Wiederfindung R [%]
51,3	100	151,3	164,8	109,0
	200	251,3	289,4	115,2
	400	451,3	492,8	109,2
	600	651,3	644,4	98,9
	800	851,3	900,0	105,7
	900	951,3	964,6	101,4
	1 000	1 051,3	1 007,7	95,9
	1 100	1 151,3	1 032,3	89,7
	1 200	1 251,3	1 121,5	89,6

Probe [ng/l]	Spike [ng/l]	Erwartet [ng/l]	Gemessen [ng/l]	Wiederfindung R [%]
118,8	100	218,8	214,7	98,1
	200	318,8	324,1	101,7
	400	518,8	578,7	111,5
205,7	100	305,7	317,9	104,0
	200	405,7	464,5	114,5
	400	605,7	609,0	100,5

### Linearität

Die Linearität zeigt die Fähigkeit einer Methode, ein Ergebnis proportional zur Analytkonzentration in einer Probe zu liefern. Sie wurde mittels einer seriellen Verdünnung von 3 Plasmaproben nachgewiesen.

Für Biotin in Serum und Plasma wurde in Bezug auf die Standardkurve ein lineares Verhalten im Bereich von 63,3 bis 1 134,8 ng/l nachgewiesen. Die Nicht-Linearität lag bei weniger als  $\pm 20\%$ .

Probe	Verdünnung	Erwartet [ng/l]	Gemessen [ng/l]	Wiederfindung R [%]
1	unverdünnt	1 134,8	1 134,8	100,0
	1:2	567,4	652,2	114,9
	1:4	283,7	288,8	101,8
	1:8	141,85	141,5	99,8
2	unverdünnt	798,9	798,9	100,0
	1:2	399	390,4	97,8
	1:4	199,7	191,4	95,8
	1:8	99,86	98,9	99,0
3	unverdünnt	506,2	506,2	100,0
	1:2	253,1	236,7	93,5
	1:4	126,6	115,2	91,0
	1:8	63,3	55,5	87,7

## Genauigkeit – Präzision

### Wiederholbarkeit (Intra-Assay); n = 40

Die Wiederholbarkeit wurde mit 2 Plasmaproben unter **gleichbleibenden** Bedingungen (Bediener, System, Tag, Kitcharge) bestimmt.

Probe	Mittelwert [ng/l]	VK [%]
1	140,63	6,0
2	454,46	6,7

### Reproduzierbarkeit (Inter-Assay); n=15

Die Reproduzierbarkeit wurde mit 2 Plasmaproben unter **variablen** Bedingungen (Bediener, System, Tag, Kitcharge) bestimmt.

Probe	Mittelwert [ng/l]	VK [%]
1	148,70	10,9
2	492,33	4,8

## 12. 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.
- Die Kitkomponenten enthalten zum Schutz vor bakteriellen Kontaminationen Natriumazid oder ProClin. Natriumazid bzw. ProClin sind giftig. Auch Substrate für enzymatische Farbreaktionen sind als giftig und karzinogen beschrieben. Jeder Kontakt mit Haut oder Schleimhaut ist zu vermeiden.
- Das 10xWaschpufferkonzentrat (WASHBUF) enthält Tenside, welche bei Augenkontakt zu schweren Augenreizungen führen können.

**Achtung:** Verursacht schwere Augenreizung.

**BEI KONTAKT MIT DEN AUGEN:** Einige Minuten lang behutsam mit Wasser spülen. Eventuell vorhandene Kontaktlinsen nach Möglichkeit entfernen. Weiter spülen. Bei anhaltender Augenreizung: Ärztlichen Rat einholen/ärztliche Hilfe hinzuziehen.

- Die Stopplösung besteht aus verdünnter Schwefelsäure ( $H_2SO_4$ ).  $H_2SO_4$  ist eine starke Säure und muss auch in verdünnter Form mit Vorsicht benutzt werden.  $H_2SO_4$  verursacht bei Kontakt mit der Haut Verätzungen. Es sollte daher mit Schutzhandschuhen, Schutzkleidung und Schutzbrille gearbeitet werden. Bei Kontakt mit der Säure muss die verätzte Stelle sofort mit viel Wasser gespült werden. Dämpfe nicht einatmen und Inhalation vermeiden.

### 13. TECHNISCHE MERKMALE

- Reagenzien der Testpackung dürfen nicht mit anderen Chargen gemischt werden. Ferner dürfen Kavitäten unterschiedlicher Mikrotiterplatten, selbst der gleichen Charge, nicht zusammengefügt und zur Analyse verwendet werden.
- Qualitätskontrollen sollten immer mitgemessen werden.
- Die Reagenzien dürfen nach Ablauf des auf der Kitverpackung angegebenen Haltbarkeitsdatums nicht mehr verwendet werden.
- Substratlösung muss vor Gebrauch farblos sein.
- Mikrotiterstreifen müssen während der Inkubationen mit Folie abgedeckt sein.
- Vermeiden Sie Schaumbildung beim Mischen der Reagenzien.
- Stopfen und Verschlüsse verschiedener Reagenzien dürfen nicht vertauscht werden.
- Der Assay ist immer nach der dem Kit beigefügten Arbeitsanleitung durchzuführen.

### 14. 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.
- *IDK®* ist eine Marke der Immundiagnostik AG.

- 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.

## 15. LITERATUR

1. Lynen, F., Knappe, J., Lorch, E., Jutting, G. and Ringelmann, E. (1959) *Angew. Chem.* **71**, 481.
2. Wakil, S. J. and Gibson, D.M. (1960) *Biochim. Biophys. Acta* **41**, 122.
3. Bonjour, J.P. (1977) *Int. J. Vit. Nutr. Res.* **47**, 107.
4. Dakshinamurti, K. and Bhagavan, H.N. eds. (1985) *Biotin*, **Vol. 447**, pp. 1-441, Ann. N.Y. Acad. Sci., New York
5. Watanabe, T. (1983) *J. Nutr.* **113**, 574.
6. Green, N.M. (1970) in *Methods in Enzymology* (McCormick, D.B. and Wright, L.D., eds), **Vol. 18**, pp. 383-385, Academic press, New York.
7. Hood, R.L. (1979) in *Methods in Enzymology* (McCormick, D.B. and Wright, L.D., eds), **Vol. 62**, pp. 279-283, Academic Press, New York.
8. Dakshinamurtik. and Allan, L. in *Methods in Enzymology* (McCormick, D.B. and Wright, L.D., eds), **Vol. 62**, pp. 284-287, Academic press, New York. 11 January 2006.
9. Green, N.M. (1970) in *Methods in Enzymology* (McCormick, D.B. and Wright, L.D., eds), **Vol. 18**, pp. 418-424, Academic press, New York.
10. Lin. H.J. and Kirsch, J.F. (1979) in *Methods in Enzymology* (McCormick, D.B. and Wright, L.D., eds), **Vol. 62**, pp. 287-289, Academic press, New York.
11. Al-Hakiem, M.H.H., Landon, J., Smith, D.S. and Nargessi, R.D. (1981) *Anal. Biochem.* **116**, 264.
12. Büttner, J., Borth, R., Boutwell, J.H., Broughton, P.M.G. and Bowyer, R.C. (1979) Quality control in clinical chemistry. *Clin. Chim. Acta* **98**, 145F-162F.

13. Livaniou, E., Evangelatos, G.P. and Ithakissios, D.S. (1987) *Clin. Chem.* **33**, 1983-1988.
14. Biesalski, H.K., Bischoff, S.C. & Puchstein, C., 2010. Ernährungsmedizin: Nach dem Curriculum Ernährungsmedizin der Bundesärztekammer und der DGE **4th ed.**, Thieme.

### Verwendete Symbole:



Temperaturbegrenzung



Bestellnummer



In-Vitro-Diagnostikum



Zu verwenden mit



Hersteller



Inhalt ausreichend für <n> Prüfungen



Chargenbezeichnung



Verwendbar bis



Achtung



Gebrauchsanweisung beachten



Spezifikationsdatenblatt beachten



Reizend

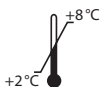


# IDK<sup>®</sup> Biotin ELISA

*For the in vitro determination of biotin (vitamin H)  
in serum, plasma, urine and milk*

Valid from 2022-01-11

**REF** K 8141



**IVD** **CE**



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

Tel.: +49 6251 70190-0

Fax: + 49 6251 70190-363

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

# Table of Contents

<b>1. INTENDED USE</b>	<b>17</b>
<b>2. INTRODUCTION</b>	<b>17</b>
<b>3. MATERIAL SUPPLIED</b>	<b>17</b>
<b>4. MATERIAL REQUIRED BUT NOT SUPPLIED</b>	<b>18</b>
<b>5. STORAGE AND PREPARATION OF REAGENTS</b>	<b>18</b>
<b>6. STORAGE AND PREPARATION OF SAMPLES</b>	<b>19</b>
<i>Sample storage</i>	19
<i>Sample preparation</i>	19
<b>7. ASSAY PROCEDURE</b>	<b>19</b>
<i>Principle of the test</i>	19
<i>Test procedure</i>	20
<b>8. RESULTS</b>	<b>21</b>
<b>9. LIMITATIONS</b>	<b>22</b>
<b>10. QUALITY CONTROL</b>	<b>22</b>
<i>Reference range</i>	22
<b>11. PERFORMANCE CHARACTERISTICS</b>	<b>23</b>
<i>Accuracy - Precision</i>	23
<i>Analytical sensitivity</i>	23
<i>Analytical specificity</i>	23
<i>Accuracy - Trueness</i>	24
<i>Analytical specificity – Interferences</i>	24
<i>Linearity</i>	25
<b>12. PRECAUTIONS</b>	<b>25</b>
<b>13. TECHNICAL HINTS</b>	<b>26</b>
<b>14. GENERAL NOTES ON THE TEST AND TEST PROCEDURE</b>	<b>26</b>
<b>15. REFERENCES</b>	<b>27</b>

## 1. INTENDED USE

This Immundiagnostik AG assay is intended for the quantitative determination of biotin in serum, plasma, urine and milk. For *in vitro* diagnostic use only.

## 2. INTRODUCTION

Biotin (vitamin H) is present in bacteria, fungi, plants and animals. In food, the major part of biotin is covalently bound to protein, leaving only a minor fraction freely available. During digestion, biocytin (biotinyl-lysine) is released from the proteins and can be resorbed as easily as biotin from the intestinal tract. Afterwards, biotin is released from biocytin by the enzyme biocytinase in erythrocytes and plasma. It is then available as prosthetic group for a series of biotin-dependent enzymes.

The daily requirements of biotin are difficult to estimate because a healthy intestinal flora supplies a major part of biotin by endogenous synthesis. The generally recommended daily dose for adults is 100–200 µg. Chronic hemodialysis patients show clear improvements of neuropathological status and glucose metabolism when supplemented with biotin in a milligram range.

Biotin deficiency can be caused by e.g. destruction of the intestinal flora or extreme diets (e.g. frequent consumption of raw eggs). It can lead to dermatitis, hair loss, anorexia, muscular hypotonia, depression and reproduction problems.

## 3. MATERIAL SUPPLIED

Cat. No.	Label	Kit components	Quantity
K 8141	PLATE	Microtiter plate, pre-coated	12 x 8 wells
K 0001.C.100	WASHBUF	Wash buffer concentrate, 10x	2 x 100 ml
K 8141	CONJ	Conjugate, ready-to-use	1 x 13 ml
K 8141	STD	Standards, ready-to-use (see specification for concentration)	1 x 6 vials
K 8141	CTRL A	Control, ready-to-use (see specification for concentration)	1 x 1 vial
K 8141	CTRL B	Control, ready-to-use (see specification for concentration)	1 x 1 vial
K 8141	SAMPLEBUF	Sample dilution buffer, ready-to-use	1 x 30 ml
K 0002.15	SUB	Substrate, ready-to-use	1 x 15 ml

Cat. No.	Label	Kit components	Quantity
K 0003.15	STOP	Stop solution, ready-to-use	1 x 15 ml
K 8141	FOL	Lightproof foil to cover the microtiter plate	3 x 1 piece

For reorders of single components, use the catalogue number followed by the label as product number.

#### 4. MATERIAL REQUIRED BUT NOT SUPPLIED

- Ultrapure water\*
- Calibrated precision pipettors and 10–1 000 µl single-use tips
- Vortex
- Microtiter plate reader (required filters see chapter 7)

\* Immundiagnostik AG recommends the use of ultrapure water (water type 1; ISO 3696), which is free of undissolved and colloidal ions and organic molecules (free of particles >0.2 µm) with an electrical conductivity of 0.055 µS/cm at 25 °C (≥ 18.2 MΩ cm).

#### 5. STORAGE AND PREPARATION OF REAGENTS

- Reagents with a volume less than **100 µl** should be centrifuged before use to avoid loss of volume.
- **Preparation of the wash buffer:** The **wash buffer concentrate (WASHBUF)** has to be diluted with ultrapure water **1:10** before use (100 ml WASHBUF + 900 ml ultrapure water), mix well. Crystals could occur due to high salt concentration in the concentrate. Before dilution, the crystals have to be redissolved at room temperature or in a water bath at 37 °C. The **WASHBUF** is stable at **2–8 °C** until the expiry date stated on the label. **Wash buffer** (1:10 diluted WASHBUF) can be stored in a closed flask at **2–8 °C for 1 month**.
- All other test reagents are ready-to-use. Test reagents are stable until the expiry date (see label) when stored at **2–8 °C**.

## 6. STORAGE AND PREPARATION OF SAMPLES

### *Sample storage*

#### **Serum and plasma**

Plasma or serum can be stored for 5 days at room temperature (15–30°C), 4 weeks at 2–8°C or 21 months at -20°C. The samples can be frozen and thawed again for up to 6 times.

### *Sample preparation*

#### **Serum and plasma**

Human serum/plasma can directly be processed, but it should be free from insoluble particles. Remove insoluble particles by short centrifugation (3 000 g).

Samples with an expected high biotin concentration (more than 1 100 ng/l) have to be diluted appropriately with sample dilution buffer.

E.g. **dilution factor 2:** 1+1 = 1:2 = 75 µl sample + 75 µl sample dilution buffer

#### **Urine**

Urine samples have to be diluted 1:40–1:80 with sample dilution buffer before being assayed.

#### **Milk**

Milk samples have to be diluted 1:200–1:400 with sample dilution buffer before being assayed.

## 7. ASSAY PROCEDURE

### *Principle of the test*

This test is a competitive ELISA for the determination of biotin in human serum.

Samples, standards and controls are pipetted into the wells (pre-coated with streptavidine) and incubated. After a washing step, conjugate (enzyme-labelled biotin) is added and competes against the biotin in the samples, standards and controls for streptavidin on the microtiter plate. Unbound enzyme-labelled biotin is washed away and the enzyme substrate TMB is added, resulting in a colour reaction. Finally, the reaction is terminated by an acidic stop solution causing a colour change from blue to yellow. The color intensity is inversely proportional to the biotin concentration. A dose response curve of the absorbance unit (optical density, OD at 450 nm)

vs. concentration is generated using the values obtained from the standards. Biotin present in the samples is determined from this curve.

### *Test procedure*

Bring all **reagents and samples to room temperature** (20–30 °C) and mix well.

Mark the positions of standards/samples/controls on a protocol sheet.

Take as many microtiter strips as needed from the kit. Store unused strips covered with foil (FOL) and together with the desiccant bag in the closed aluminium packaging at 2–8 °C. Strips are stable until expiry date stated on the label.

For automated ELISA processors, the given protocol has to be adjusted according to the specific features of the respective automated platform. For further details please contact your supplier or Immundiagnostik AG.

**Attention:** Always wear gloves when working with standards and controls to avoid contamination of standards and controls by unprotected skin, especially when transferring to DSX vials.

We recommend to carry out the tests in duplicate.

1.	Add each <b>50 µl standards/controls/samples</b> into the respective wells.
2.	<b>Add 50 µl sample dilution buffer</b> (SAMPLEBUF) into the respective wells (for standards/controls/samples).
3.	Cover the strips with the provided foil (FOL) and incubate for <b>30 min</b> at room temperature (20–30 °C).
4.	Discard the content of each well and wash <b>5 times</b> with <b>250 µl wash buffer</b> . After the final washing step, remove residual wash buffer by firmly tapping the plate on absorbent paper.
5.	Add <b>100 µl conjugate</b> (CONJ) into each well.
6.	Cover the strips with the provided foil (FOL) and incubate for <b>30 min</b> at room temperature (20–30 °C).
7.	Discard the content of each well and wash <b>5 times</b> with <b>250 µl wash buffer</b> . After the final washing step, remove residual wash buffer by firmly tapping the plate on absorbent paper.
8.	Add <b>100 µl substrate</b> (SUB) into each well.
9.	Incubate for <b>8–12 minutes*</b> at room temperature (20–30 °C) in the <b>dark</b> .

10.	Add <b>100 µl stop solution</b> (STOP) into each well and mix well.
11.	Determine <b>absorption immediately</b> with an ELISA reader at <b>450 nm</b> against 620 nm (or 690 nm) as a reference. If no reference wavelength is available, read only at 450 nm. If the extinction of the highest standard exceeds the range of the photometer, absorption must be measured immediately at <b>405 nm</b> against 620 nm as a reference.

\* The intensity of the colour change is temperature sensitive. We recommend observing the colour change and stopping the reaction upon good differentiation.

## 8. RESULTS

The following algorithms can be used alternatively to calculate the results. We recommend using the point-to-point calculation.

### 1. Point-to-point calculation

We recommend a linear ordinate for the optical density and a linear abscissa for the concentration.

### 2. 4 parameter algorithm

It is recommended to use a linear ordinate for the optical density and a logarithmic abscissa for the concentration. When using a logarithmic abscissa, the zero standard must be specified with a value less than 1 (e.g. 0.001).

The plausibility of the duplicate values should be examined before the automatic evaluation of the results. If this option is not available with the programme used, the duplicate values should be evaluated manually.

### Serum/plasma

The obtained results do not have to be further calculated.

### Urine

The obtained results have to be multiplied by the **dilution factor** used (1:40–1:80).

### Milk

The obtained results have to be multiplied by the **dilution factor** used (1:200–1:400).

In case **another dilution factor** has been used, multiply the obtained result by the dilution factor used.

## 9. LIMITATIONS

Samples with concentrations above the measurement range ( $> 1\,100\text{ ng/l}$ ) can be further diluted with sample dilution buffer and re-assayed. Please consider this greater dilution when calculating the results.

Samples with concentrations lower than the measurement range (= LoQ,  $48,1\text{ ng/l}$ ) cannot be clearly quantified.

## 10. QUALITY CONTROL

Immundiagnostik AG recommends the use of external controls for internal quality control, if possible.

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

Based on Immundiagnostik AG studies of samples of apparently healthy persons ( $n = 40$ ), the following ranges were estimated:

#### **Serum/plasma**

Healthy:	$> 250\text{ ng/l}$
Suboptimal status:	$100\text{--}250\text{ ng/l}$
Vitamin deficiency:	$< 100\text{ ng/l}$

We recommend each laboratory to establish its own reference range.

To assure a correct diagnosis of biotin deficiency, we recommend to analyse the biotin level on several consecutive days of a patient, as biotin level undergoes daily fluctuations of up to 100%. Especially supplementation can cause the biotin level to increase tremendously in a very short time.

#### **Urine**

Adequate biotin supply is considered to start at levels of  $70\text{ nmol/l}$  (equals  $17\,101,7\text{ ng/l}$ ) and higher<sup>[14]</sup>.



## 11. PERFORMANCE CHARACTERISTICS

All values of the following performance characteristics have been calculated using the point-to-point calculation.

### *Accuracy - Precision*

#### **Repeatability (Intra-Assay); n = 40**

The repeatability was assessed with 2 serum samples under **constant** parameters (same operator, measurement system, day and kit lot).

Sample	Mean value [ng/l]	CV [%]
1	140.63	6.0
2	454.46	6.7

#### **Reproducibility (Inter-Assay); n = 15**

The reproducibility was assessed with 2 serum samples under **varying** parameters (different operators, measurement systems, days and kit lots).

Sample	Mean value [ng/l]	CV [%]
1	148.70	10.9
2	492.33	4.8

### *Analytical sensitivity*

The following values have been estimated based on the concentrations of the standard without considering possibly used sample dilution factors.

Limit of blank, LoB	25 ng/l
Limit of detection, LoD	32.4 ng/l
Limit of quantitation, LoQ	48.1 ng/l
Measuring range:	48,1–1 100 ng/l

The evaluation was performed according to the CLSI guideline EP-17-A2.

### *Analytical specificity*

The specificity of the antibody was tested by measuring the cross-reactivity against a biocytin. The specificity is calculated in percent, based on the cross-reactivity of biocytin compared to biotin.

- Biotin 100.0%
- Biocytin 67.0%

### Accuracy - Trueness

The trueness states the closeness of the agreement between the result of a measurement and the true value of the measurand. Therefore, biotin spikes with known concentrations were added to 3 different plasma samples. The results below were obtained without consideration of the sample dilution factor.

Sample [ng/l]	Spike [ng/l]	Expected [ng/l]	Obtained [ng/l]	Recovery R [%]
51.3	100	151.3	164.8	109.0
	200	251.3	289.4	115.2
	400	451.3	492.8	109.2
	600	651.3	644.4	98.9
	800	851.3	900.0	105.7
	900	951.3	964.6	101.4
	1 000	1 051.3	1 007.7	95.9
	1 100	1 151.3	1 032.3	89.7
	1 200	1 251.3	1 121.5	89.6
118.8	100	218.8	214.7	98.1
	200	318.8	324.1	101.7
	400	518.8	578.7	111.5
205.7	100	305.7	317.9	104.0
	200	405.7	464.5	114.5
	400	605.7	609.0	100.5

### Analytical specificity – Interferences

Different substances that might interfere when using the IDK® Biotin ELISA were tested. Therefore, positive as well as negative serum samples were supplemented with either drugs (maximum daily dose) or serum components (doses according to CLSI guideline EP7-A2) and then measured.

No interferences with the following serum components were found: Hemoglobin, bilirubin or triglycerides.

### Linearity

The linearity states the ability of a method to provide results proportional to the concentration of analyte in the test sample within a given range. This was assessed according to CLSI guideline

EP06-A with a serial dilution of 3 different plasma samples.

For biotin in serum and plasma, the method has been demonstrated to be linear from 63.3 to 1 134.8 ng/l based on the standard curve without considering possibly used sample dilution factors, showing a non-linear behaviour of less than  $\pm 20\%$  in this interval.

Sample	Dilution	Expected [ng/l]	Obtained [ng/l]	Recovery R [%]
1	undiluted	1 134.8	1 134.8	100.0
	1:2	567.4	652.2	114.9
	1:4	283.7	288.8	101.8
	1:8	141.85	141.5	99.8
2	undiluted	798.9	798.9	100.0
	1:2	399	390.4	97.8
	1:4	199.7	191.4	95.8
	1:8	99.86	98.9	99.0
3	undiluted	506.2	506.2	100.0
	1:2	253.1	236.7	93.5
	1:4	126.6	115.2	91.0
	1:8	63.3	55.5	87.7

## 12. PRECAUTIONS

- All reagents in the kit package are for *in vitro* diagnostic use only.
- Human materials used in kit components were 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.
- Kit reagents contain sodium azide or ProClin as bactericides. Sodium azide and ProClin are toxic. Substrates for the enzymatic color reactions are toxic and carcinogenic. Avoid contact with skin or mucous membranes.

- The 10x Wash buffer concentrate (WASHBUF) contains surfactants which may cause severe eye irritation in case of eye contact.

**Warning:** Causes serious eye irritation.

**IF IN EYES:** Rinse cautiously with water for several minutes. Remove contact lenses, if present and easy to do. Continue rinsing. If eye irritation persists: get medical Advice/attention.

- The stop solution consists of diluted sulphuric acid, a strong acid. Although diluted, it still must be handled with care. It can cause burns and should be handled with gloves, eye protection, and appropriate protective clothing. Any spill should be wiped up immediately with copious quantities of water. Do not breath vapour and avoid inhalation.

### 13. TECHNICAL HINTS

- Do not interchange different lot numbers of any kit component within the same assay. Furthermore we recommend not assembling wells of different microtiter plates for analysis, even if they are of the same batch.
- Control samples should be analysed with each run.
- Reagents should not be used beyond the expiration date stated on kit label.
- Substrate solution should remain colourless until use.
- To ensure accurate results, proper adhesion of plate sealers during incubation steps is necessary.
- Avoid foaming when mixing reagents.
- Do not mix plugs and caps from different reagents.
- The assay should always be performed according to the enclosed manual.

### 14. GENERAL NOTES ON THE TEST AND TEST PROCEDURE

- This assay was produced and distributed according to the IVD guidelines of 98/79/EC.
- The guidelines for medical laboratories should be followed.
- IDK® is a trademark of Immundiagnostik AG.













- 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.
- 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.

## 15. REFERENCES

1. Lynen, F., Knappe, J., Lorch, E., Jutting, G. and Ringelmann, E. (1959) *Angew. Chem.* **71**, 481.
2. Wakil, S. J. and Gibson, D.M. (1960) *Biochim. Biophys. Acta* **41**, 122.
3. Bonjour, J.P. (1977) *Int. J. Vit. Nutr. Res.* **47**, 107.
4. Dakshinamurti, K. and Bhagavan, H.N. eds. (1985) *Biotin*, **Vol. 447**, pp. 1-441, Ann. N.Y. Acad. Sci., New York
5. Watanabe, T. (1983) *J. Nutr.* **113**, 574.
6. Green, N.M. (1970) in *Methods in Enzymology* (McCormick, D.B. and Wright, L.D., eds), **Vol. 18**, pp. 383-385, Academic press, New York.
7. Hood, R.L. (1979) in *Methods in Enzymology* (McCormick, D.B. and Wright, L.D., eds), **Vol. 62**, pp. 279-283, Academic Press, New York.
8. Dakshinamurtik. and Allan, L. in *Methods in Enzymology* (McCormick, D.B. and Wright, L.D., eds), **Vol. 62**, pp. 284-287, Academic press, New York. 11 January 20069.
9. Green, N.M. (1970) in *Methods in Enzymology* (McCormick, D.B. and Wright, L.D., eds), **Vol. 18**, pp. 418-424, Academic press, New York.
10. Lin. H.J. and Kirsch, J.F. (1979) in *Methods in Enzymology* (McCormick, D.B. and Wright, L.D., eds), **Vol. 62**, pp. 287-289, Academic press, New York.
11. Al-Hakiem, M.H.H., Landon, J., Smith, D.S. and Nargessi, R.D. (1981) *Anal. Biochem.* **116**, 264.
12. Büttner, J., Borth, R., Boutwell, J.H., Broughton, P.M.G. and Bowyer, R.C. (1979) Quality control in clinical chemistry. *Clin. Chim. Acta* **98**, 145F-162F.

13. Livaniou, E., Evangelatos, G.P. and Ithakissios, D.S. (1987) *Clin. Chem.* **33**, 1983-1988.
14. Biesalski, H.K., Bischoff, S.C. & Puchstein, C., 2010. Ernährungsmethodik: Nach dem Curriculum Ernährungsmethodik der Bundesärztekammer und der DGE **4th ed.**, Thieme.

**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		Irritant



## **Immundiagnostik AG**

Stubenwald-Allee 8a  
64625 Bensheim, Germany

Tel.: +49 6251 70190-0

Fax: +49 6251 70190-363

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

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

