

ID-Vit[®] Vitamin B₂ aus Serum

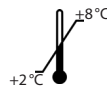
Mikrobiologisches Verfahren zur Bestimmung des Gesamtgehalts von Vitamin B₂ in Serum mittels einer Lactobacillus rhamnosus-beschichteten Mikrotiterplatte Zur Verwendung in Human- und Veterinärmedizin und zu Forschungszwecken

Microbiological test kit for the determination of vitamin B₂ in serum using a Lactobacillus rhamnosus coated microtiter plate For use in human and veterinary medicine and in research

Gültig ab / Valid from 2023-03-17

REF KIF002S

Σ 96



IVD



REF KIF002S.2

Σ 2x 96



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. TESTPRINZIP	2
4. INHALT DER TESTPACKUNG	3
5. ERFORDERLICHE LABORGERÄTE UND HILFSMITTEL	3
6. HINWEISE UND VORSICHTSMASSNAHMEN	4
7. LAGERUNG UND VORBEREITUNG DER REAGENZIEN	4
7.1 Wasser	5
7.2 Herstellung des sterilen Assay-Mediums	5
7.3 Herstellung der Kontrollen	5
7.4 Herstellung der Standardkurve	6
7.5 Mikrotiterplatte [PLATE]	6
8. PROBENLAGERUNG UND -VORBEREITUNG	7
8.1 Probenverdünnung	7
9. TESTDURCHFÜHRUNG	7
9.1 Testvorbereitungen	7
9.2 Testansatz	7
9.3 Messung	8
10. AUSWERTUNG DER ERGEBNISSE	8
10.1 Berechnung	8
10.2 Qualitätskontrolle	9
11. EINSCHRÄNKUNGEN	9
12. TESTCHARAKTERISTIKA	9
12.1 Präzision und Reproduzierbarkeit	9
13. ALLGEMEINE HINWEISE ZUM TEST	10
14. LITERATUR	10

1. VERWENDUNGSZWECK

Der ID-Vit® Vitamin B₂-Mikrotiterplattentest ist ein mikrobiologisches Verfahren zur Bestimmung des Gesamtgehaltes an Vitamin B₂ in Serum. Alle benötigten Reagenzien und der Standard sind im Testkit enthalten. Mit dem Test können 96 Bestimmungen inklusive der Standards durchgeführt werden. Für die Auswertung ist ein ELISA-Reader notwendig. Zur Verwendung in Human- und Veterinärmedizin und zu Forschungszwecken. Nur zur *in-vitro*-Diagnostik.

2. EINLEITUNG

Vitamin B₂ ist als Bestandteil von Flavinnukleotiden am Wasserstoff- und Elektronentransport beteiligt und gehört dabei zu den wichtigsten Coenzymen des Kohlenhydrat-, Fettsäure- und Proteinstoffwechsels.

Die biologische Form von Vitamin B₂ ist das Riboflavin-5-Phosphat. Die wichtigsten Derivate sind Flavinmononukleotid (FMN) und Flavinadenindinukleotid (FAD). FAD und FMN liegen im Blut zu ca. 60% proteingebunden vor, in freier Form sind nur etwa 0,5–2%. Riboflavin-5-Phosphat, FMN und FAD werden im Plasma von verschiedenen Proteinen transportiert, einschließlich Albumin, Fibrinogen, Riboflavin-Bindungsprotein und anderen Globulinen. Die Elimination von Vitamin B₂ erfolgt vorwiegend renal. Da sie jedoch starken Schwankungen unterliegt, ist die Bestimmung des Vitamin-B₂-Status im Urin nur bedingt sinnvoll.

Indikationen zur Bestimmung von Vitamin B₂

- Chronische Diarrhö
- Präeklampsie
- Schilddrüsendysfunktionen
- Diabetes mellitus
- Alkoholabusus
- Anorexie
- Laktoseintoleranz

3. TESTPRINZIP

Das Serum wird mit einem Puffergemisch vorbehandelt und verdünnt in die Kavitäten einer Mikrotiterplatte gegeben, die mit *Lactobacillus rhamnosus* beschichtet sind. Nach Zugabe von Vitamin B₂ als Standard oder als in einer Serumprobe enthaltenes Vitamin wächst der Keim so lange, bis das Vitamin aufgebraucht ist. Die Inkubation erfolgt bei **37°C** für **72–77h**.

Das Wachstum des *Lactobacillus rhamnosus* wird als Trübung bei 610–630 nm (alternativ bei 540–550 nm) im ELISA-Reader gemessen und mit einer Standard-Konzentrationsreihe verglichen. Die Menge an Vitamin B₂ ist dabei direkt proportional der Trübung.

4. INHALT DER TESTPACKUNG

Art.-Nr.	Bezeichnung	Kit-Komponenten	Menge	
			KIF002S	KIF002S.2
KIF002S/ KIF002S.2	PLATE	Mikrotiterplatte, beschichtet mit <i>Lactobacillus rhamnosus</i>	1 x	2 x
	DIL	Wasser	4 x 30 ml	4 x 30 ml
	ASYMED	Vitamin-B ₂ -Assay-Medium.	4 x	4 x
	STD	Vitamin-B ₂ -Standard, lyoph.	4 x	3 x
	FOL	Abklebefolie	1 x ganze 3 x halbe	3 x ganze
	FRA	Ersatzrahmen zum Umstecken der Mikrotiterstreifen	1 x	1 x
	CTRL1	Vitamin-B ₂ -Kontrolle 1, lyophilisiert	4 x	3 x
	CTRL2	Vitamin-B ₂ -Kontrolle 2, lyophilisiert	4 x	3 x

5. ERFORDERLICHE LABORGERÄTE UND HILFSMITTEL

- Inkubator mit dunkler Inkubationskammer, 37 °C
- Wasserbad (90–100 °C)
- Mikrotiterplattenphotometer 610–630 nm (540–550 nm)
- Kalibrierte Präzisionspipetten und sterile Pipettenspitzen für den Einmalgebrauch mit variablen Volumina von 20–1 000 µl
- 5-ml- bzw. 10-ml-Pipette
- 1,5–2 ml-Reaktionsgefäße, steril
- 0,2 µm-Polyethersulfon (PES)-Sterilfilter und Einwegspritze (10 ml)
- 15 ml-Zentrifugenröhrchen, steril (z. B. Falcons)
- Biozentrifuge (10 000 g)
- Vortex-Mixer

6. HINWEISE UND VORSICHTSMASSNAHMEN

- Es handelt sich um einen mikrobiologischen Test, daher sollten alle Maßnahmen, soweit möglich, für ein steriles Arbeiten getroffen werden (bevorzugt unter Sterilbank bzw. PCR-Hood arbeiten, sterile Arbeitsgeräte verwenden). Kontaminationen führen zu falschen Ergebnissen.
- Die Wasserqualität ist von großer Bedeutung für den Testablauf. Nur das im Testkit enthaltene Wasser [DIL] verwenden.
- Bei den Sterilfiltern muss es sich um Polyethersulfon-Sterilfilter handeln.
- Bei jeder Testdurchführung muss eine Standardkurve mitgeführt werden.
- Bei jedem Ansatz sind Kontrollen mitzumessen.
- Es wird die Messung in Doppelwerten empfohlen.
- Die Reagenzien dürfen nach Ablauf des Haltbarkeitsdatums nicht mehr verwendet werden.
- Während der Testdurchführung Handschuhe tragen.
- Gebrauchte Mikrotiterplattenstreifen sowie andere mit Patientenproben in Kontakt gekommene Materialien sind als potenziell infektiös zu behandeln und entsprechend zu entsorgen.
- Als Vorsichtsmaßnahme wird empfohlen, das verwendete Humanmaterial immer als potentiell infektiös zu betrachten.

7. LAGERUNG UND VORBEREITUNG DER REAGENZIEN

- Den Testkit und die Reagenzien bei 2–8 °C lagern.
- Angesetzte Reagenzien unmittelbar verwenden und nach Testansatz verwerfen.
- Bitte achten Sie bei mehrfachem Einsatz des Kits darauf, dass die Reagenzien wie in der Vorschrift beschrieben gelagert und nur die für den jeweiligen Ansatz benötigten Reagenzienmengen frisch angesetzt werden. Der Kit kann so bis zu 3 x (KIF002S.2) bzw. 4 x (KIF002S) je nach Probenaufkommen bis zum angegebenen Haltbarkeitsdatum verwendet werden.

7.1 Wasser

- Wasser [DIL] (für Medium [ASYMED], Standard [STD] und Kontrollen [CTRL1, CTRL2])
- Deckel nach oben drücken, nach hinten bis zum Glasrand abziehen und dann durch Drehen den gesamten Verschluss entfernen.

7.2 Herstellung des sterilen Assay-Mediums

- Das sterile Assay-Medium muss vor jedem Test frisch hergestellt werden.
- Trockenmittelbeutel aus dem Fläschchen mit einer Pinzette abschütteln, herausnehmen und verwerfen.
- Zum Assay-Medium [ASYMED] 10 ml Wasser [DIL] zugeben, das Fläschchen gut verschließen und schütteln. Die Menge ist ausreichend für 6 Mikrotiterstreifen.
- Mediumflasche im Wasserbad bei 90–100°C für 5 min erhitzen; während dessen mindestens 2 mal gut schütteln. Es ist darauf zu achten, dass dabei die Mediumflasche immer fest verschlossen ist.
- Mediumflasche schnell auf unter 30°C abkühlen (bei 2–8°C für 10 min).
- Medium mit Einwegspritze (10 ml) und dem 0,2-µm-PES-Filter in ein steriles Zentrifugenröhrchen (15 ml, z. B. Falcon) sterilfiltrieren.
- Das so hergestellte sterile Assay-Medium wird im Test verwendet.

7.3 Herstellung der Kontrollen

- Die lyophilisierten Kontrollen [CTRL1, CTRL2] sind mit je 5 ml Wasser [DIL] aus dem Testkit zu resuspendieren und mittels Vortex-Mixer zu homogenisieren.
- Die Kontrollen werden nach der Rekonstitution wie eine Probe behandelt.
- Die Konzentration der Kontrollen ändert sich von Charge zu Charge und ist der Produktspezifikation zu entnehmen.

7.4 Herstellung der Standardkurve

- Für die Herstellung des für die Standardkurve benötigten Standardkonzentrats ist der lyophilisierte Standard [STD] mit x ml (x = genaues Volumen bitte dem beiliegenden Quality Control Protocol entnehmen) Wasser [DIL] aus dem Testkit zu resuspendieren und mittels Vortex-Mixer zu homogenisieren.
- In 6 sterilen Reaktionsgefäßen (Fassungsvermögen 1,5–2 ml) wird mit dem Standardkonzentrat und Wasser [DIL] eine Standardkurve nach folgendem Schema hergestellt:

Vitamin B ₂ [µg/l]	Wasser [DIL] [µl]	+	Standard- konzentrat [µl]	=	Gesamtvolumen [µl]
Blank: 0	900	+	0	=	900
Standard 1: 25	975	+	25	=	1 000
Standard 2: 100	900	+	100	=	1 000
Standard 3: 200	400	+	100	=	500
Standard 4: 300	350	+	150	=	500
Standard 5: 600	200	+	300	=	500

7.5 Mikrotiterplatte [PLATE]

- Die Mikrotiterplatte [PLATE] ist in der Aluminiumverpackung mit dem Trockenmittelbeutel bei 2–8 °C zu lagern.
- Die Mikrotiterplatte [PLATE] muss vor Feuchtigkeit und Kontamination geschützt sein.
- Es ist darauf zu achten, dass die Aluminiumverpackung nicht beschädigt wird.
- Die Aluminiumverpackung nach dem Öffnen wieder sorgfältig verschließen.
- Nur die benötigten Mikrotiterstreifen unmittelbar vor Gebrauch entnehmen, um Kontaminationen zu vermeiden.

8. PROBENLAGERUNG UND -VORBEREITUNG

- Die Analyse ist mit Serum durchzuführen.
- Die Haltbarkeit der Probe beträgt bei 2–8 °C im Dunkeln 1 Tag. Zur längeren Lagerung kann die Probe bei -20 °C bis zu 5 Monate aufbewahrt werden.
- Proben vor dem Einsatz zentrifugieren (mind. 5 min bei 10 000 g). Den resultierenden Überstand im Test einsetzen.
- Hämolytische Proben beeinflussen das Testergebnis und sollten nicht verwendet werden. Lipämische Proben sollten vor dem Einsatz im Test bei 13 000 g für 10 min zentrifugiert werden, um ein möglichst fettfreies Serum zu erhalten.

8.1 Probenverdünnung

200 µl Serum/Kontrolle abnehmen, 200 µl Wasser [DIL] zugeben und mischen. Die Probenverdünnung entspricht insgesamt einer 1:2-Verdünnung (= Probenverdünnungsfaktor).

9. TESTDURCHFÜHRUNG

9.1 Testvorbereitungen

Entnehmen Sie die benötigten Reagenzien und Materialien für den durchzuführenden Test und legen Sie den restlichen Testkit zurück in den Kühlschrank. Bringen Sie die benötigten Reagenzien auf Raumtemperatur.

9.2 Testansatz

- Benötigte Mikrotiterstreifen entnehmen und in den Ersatzrahmen [FRA] stecken.
- 150 µl steriles Assay-Medium in die Kavitäten geben.
- Je 150 µl der hergestellten Standardkurve, vorbereiteten Proben und Kontrollen in die jeweiligen Kavitäten pipettieren. Pipettenspitzen jeweils mit der Standard-, Proben- bzw. Kontroll-Lösung vorspülen.
- Sorgfältig die befüllten Kavitäten mit der im Kit enthaltenen Klebefolie [FOL] abkleben. Wichtig: die Kavitäten müssen durch Andrücken mit der Hand luftdicht verschlossen werden!
- Bei 37 °C für 72–77 h im Brutschrank inkubieren.

9.3 Messung

- Klebefolie [FOL] nochmals mit der Hand fest andrücken
- Mikrotiterplatte [PLATE] über Kopf drehen, auf eine Tischoberfläche legen und Keime gut aufschütteln
- Mikrotiterplatte [PLATE] wieder zurückdrehen und die Abklebefolie [FOL] vorsichtig nach hinten abziehen. Mit einer Hand dabei die Streifen fest im Rahmen halten (Folie ist stark klebend!).
- Eventuell vorhandene Bläschen an der Oberfläche der Messlösung in den Kavitäten zerstören, z. B. mit Hilfe einer Pipettenspitze oder einer Nadel
- Trübung im ELISA-Reader bei E 610–630 nm messen (alternativ bei E 540–550 nm)

Hinweise

- Nach 72–77 h Inkubation kann die Mikrotiterplatte [PLATE] auch für max. 48 h im Kühlschrank aufbewahrt werden, um danach die Trübung zu messen.

10. AUSWERTUNG DER ERGEBNISSE

Wir empfehlen für die Auswertung die 4-Parameter-Funktion. Der Probenverdünnungsfaktor muss bei der Auswertung berücksichtigt werden.

Der Blank dient als optische Kontrolle zum Ausschluss von Kontaminationen und wird nicht in der Berechnung berücksichtigt. Die optische Dichte muss < Standard 1 haben. Ist dies nicht der Fall, muss die Analyse erneut durchgeführt werden.

10.1 Berechnung

Vitamin B₂ in µg/l = Wert aus Standardkurve × Probenverdünnungsfaktor (2)

Referenzbereich für Humanserum

Anhand einer laborinternen Studie mit Serumproben von augenscheinlich Gesunden (n = 40) wurden die folgenden Werte ermittelt.

Vitamin B₂: 50–206 µg/l

Anmerkung

Wir empfehlen jedem Labor, einen eigenen Referenzbereich zu etablieren, da Referenzbereiche stark von der Auswahl des Probandenkollektivs abhängig sind. Die Angabe des Referenzbereichs für Vitamin B₂ dient lediglich der Orientierung und kann von anderen publizierten Daten abweichen.

10.2 Qualitätskontrolle

Die Extinktion des höchsten Standards muss > 0,6 sein.

Die Ergebnisse der Kontrollen müssen auf Richtigkeit überprüft werden. Liegen eine oder mehrere Kontrollen oder der höchste Standard außerhalb des angegebenen Bereiches, kann Immundiagnostik die Richtigkeit der Messergebnisse nicht gewährleisten.

11. EINSCHRÄNKUNGEN

Nur Serum kann im Test eingesetzt werden.

12. TESTCHARAKTERISTIKA

Die nachfolgenden Testcharakteristika wurden mit Humanserum erhoben.

12.1 Präzision und Reproduzierbarkeit**Intra-Assay**

	Vitamin B ₂ [µg/l]	VK [%]
Probe 1 (n = 10)	12,21	4,47
Probe 2 (n = 6)	14,28	7,98

Inter-Assay

	Vitamin B ₂ [ng/l]	VK [%]
Probe 1 (n = 10)	13,87	11,57
Probe 2 (n = 6)	11,30	10,69

















13. ALLGEMEINE HINWEISE ZUM TEST

- Dieser Kit wurde nach der IVD Richtlinie 98/79/EG hergestellt und in den Verkehr gebracht.
- Sämtliche in der Testpackung enthaltene Reagenzien dürfen ausschließlich zur *in-vitro*-Diagnostik eingesetzt werden.
- ID-Vit® ist eine Marke der Immundiagnostik AG.
- Reagenzien nach Ablauf des Verfallsdatums nicht mehr verwenden (Verfallsdatum siehe Testpackung).
- Einzelkomponenten mit unterschiedlichen Lot-Nummern aus verschiedenen Testpackungen nicht mischen oder austauschen.
- Für die Qualitätskontrolle sind die dafür erstellten Richtlinien für medizinische Laboratorien 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.
- Qualitätskontrollen immer mitmessen.
- Die Bestimmung ist immer nach der dem Kit beigefügten Arbeitsanleitung durchzuführen.
- Schwerwiegende Vorfälle sind der Immundiagnostik AG und den nationalen Aufsichtsbehörden zu melden.

14. LITERATUR

Powers, H.J., 2003. Riboflavin (vitamin B-2) and health. *The American journal of clinical nutrition*, **77**(6), pp.1352–60.

Verwendete Symbole:

	Temperaturbegrenzung		Bestellnummer
	In-Vitro-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

ID-Vit[®] vitamin B₂ in serum

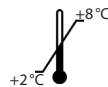
*Microbiological test kit for the determination of
vitamin B₂ in serum using a Lactobacillus rhamnosus
coated microtiter plate*

For use in human and veterinary medicine and in research

Valid from 2023-03-17

REF **KIF002S**

Σ 96



IVD



REF **KIF002S.2**

Σ 2 x 96



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	14
2. INTRODUCTION	14
3. PRINCIPLE OF THE TEST	14
4. MATERIAL SUPPLIED	15
5. MATERIAL REQUIRED BUT NOT SUPPLIED	15
6. PRECAUTIONS	16
7. STORAGE AND PREPARATION OF REAGENTS	16
7.1 Water	16
7.2 Preparation of the sterile assay medium	17
7.3 Preparation of the controls	17
7.4 Preparation of the standard curve	17
7.5 Microtiter plate [PLATE]	18
8. SAMPLE STORAGE AND PREPARATION	18
8.1 Sample dilution	18
9. ASSAY PROCEDURE	19
9.1 Test preparations	19
9.2 Test procedure	19
9.3 Measurement	19
10. EVALUATION OF RESULTS	20
10.1 Calculation	20
10.2 Quality control	20
11. LIMITATIONS	21
12. PERFORMANCE CHARACTERISTICS	21
12.1 Precision and reproducibility	21
13. GENERAL NOTES ON THE TEST AND TEST PROCEDURE	22
14. REFERENCES	22

1. INTENDED USE

ID-Vit® Vitamin B₂ is a microtiter plate test kit based on a microbiological method which measures the vitamin B₂ content in serum. The test kit contains the standard and all reagents required to perform the test. It is sufficient for 96 determinations including standard curves. An ELISA reader is required for the evaluation of the results. For use in human and veterinary medicine and in research. For *in vitro* diagnostic use only.

2. INTRODUCTION

Vitamin B₂ is a component of the flavin-nucleotides and as such is involved in the transport of hydrogen ions and electrons. It is an essential coenzyme for the meta-bolism of carbohydrates, fats and proteins.

The biological form of vitamin B₂ is riboflavin-5-phosphate. The most important vitamin B₂ derivatives are flavin mononucleotide (FMN) and flavin-adenine dinucleotide (FAD). In blood, about 60% of FAD and FMN are protein bound; only about 0.5–2% occur in free form. Riboflavin-5-phosphate, FMN, and FAD are transported in the plasma by a variety of proteins, including albumin, fibrinogen, riboflavin-binding protein and other globulins. Although vitamin B₂ is eliminated regularly in the urine, its determination in urine samples is not recommended because of fluctuations in the concentration.

Indications for vitamin B₂ determination:

- Chronic diarrhoe
- Preeclampsia
- Hypothyroidism
- Diabetes mellitus
- Alcohol abuse
- Anorexia
- Lactose intolerance

3. PRINCIPLE OF THE TEST

The serum samples are pre-treated and diluted with a buffer mixture, and then transferred into the wells of a microtiter plate coated with *Lactobacillus rhamnosus*. The addition of vitamin B₂ in either standards or samples gives a vitamin B₂-dependent growth response until vitamin B₂ is consumed.

After incubation at **37 °C** for **72–77 h**, the growth of *Lactobacillus rhamnosus* is measured turbidimetrically at 610–630 nm (alternatively at 540–550 nm) in a microtiter plate reader and compared to a standard curve generated from the dilution series. The amount of vitamin B₂ is directly proportional to the turbidity.

4. MATERIAL SUPPLIED

Cat. No.	Label	Kit components	Quantity	
			KIF002S	KIF002S.2
KIF002S/ KIF002S.2	PLATE	<i>Lactobacillus rhamnosus</i> -precoated microtiter plate	1 x	2 x
	DIL	Water	4 x 30 ml	4 x 30 ml
	ASYMED	Vitamin B ₂ assay medium	4 x	4 x
	STD	Vitamin B ₂ standard, lyoph.	4 x	3 x
	FOL	Adhesive cover foil	1 x whole 3 x whole	3 x whole
	FRA	Replacement holder for microtiter strips	1 x	1 x
	CTRL1	Vitamin B ₂ control 1, lyoph.	4 x	3 x
	CTRL2	Vitamin B ₂ control 2, lyoph.	4 x	3 x

5. MATERIAL REQUIRED BUT NOT SUPPLIED

- Incubator with a dark incubation chamber, 37 °C
- Water bath (90–100 °C)
- Microtiter plate reader 610–630 nm (540–550 nm)
- Calibrated precision pipettors and sterile 20–1 000 µl tips
- 5 ml and 10 ml pipets
- 1.5–2 ml reaction vials, sterile
- 0.2 µm sterile polyethersulfone (PES) filter with a disposable syringe
- 15 ml centrifuge tubes, sterile (e.g. Falcon tubes)
- Biocentrifuge (10 000 g)
- Vortex

6. PRECAUTIONS

- As the test is based on a microbiological method, the general guidelines for sterile work should be observed as far as possible (preferably work in a sterile bench / PCR hood, use of sterile instruments or equipment). Contaminations lead to erroneous results.
- Water quality is extremely important for the test. Only the water delivered with the test kit [DIL] should be used.
- For sterile filtration, only a sterile polyethersulfone filter must be used.
- It is essential to run a standard curve for each separate assay.
- Measure controls with each assay.
- We recommend measurements in duplicate.
- Do not use reagents beyond the expiration date shown on the label.
- Wear gloves during the test.
- As a precaution, it is recommended that the human material used is always considered potentially infectious.
- Used microtiter stripes [PLATE] and materials that have been in contact with patient samples must be handled and disposed of as potentially infectious.

7. STORAGE AND PREPARATION OF REAGENTS

- Store test kit and reagents at 2–8°C.
- Prepare reagents freshly and use them immediately after preparation.
- To run the assay more than once, ensure that reagents are stored at the conditions stated on the label. Prepare only the appropriate amount necessary for each run. The kit can be used up to 3 x (KIF002S.2) or 4 x (KIF002S) within the expiry date stated on the label.

7.1 Water

- Water [DIL] (for medium [ASYMED], standard [STD] and controls [CTRL1, CTRL2])
- Push the lid up and pull it back to the rim of the glass, then twist the whole cap off.

7.2 Preparation of the sterile assay medium

- Fresh sterile assay medium has to be prepared each time before performing a test.
- Remove the desiccant bag from the lyophilised assay medium bottle by taking the bag with a forceps and shaking it whilst still inside the bottle. Then remove the clean desiccant bag and discard it.
- Add 10 ml water [DIL] to the assay medium bottle [ASYMED], close the bottle firmly and shake it. This amount is sufficient for 6 microtiter stripes.
- Heat the medium bottle in a water bath at 90–100 °C for 5 min, shake well at least 2 times during this incubation time. Take care that the medium bottle is always firmly closed.
- Quickly cool the medium bottle to < 30 °C (at 2–8 °C for 10 min).
- Filter the medium using a disposable syringe (10 ml) and the 0.2 µm PES filter into a sterile centrifuge tube (15 ml, e.g. Falcon).
- After this preparation, the sterile assay medium can be used in the test.

7.3 Preparation of the controls

- The lyophilised controls [CTRL1, CTRL2] have to be resuspended each with 5 ml water [DIL] from the test kit, then homogenise using a vortex.
- After reconstitution, the controls are treated like samples.
- The concentration of the controls changes from lot to lot and is stated in the product specification.

7.4 Preparation of the standard curve

- For the preparation of the standard curve, standard concentrate is needed. To prepare standard concentrate, resuspend the lyophilised standard [STD] with x ml (x = please see the enclosed quality control protocol for the volume needed) water [DIL] supplied with the test kit, then homogenise using a vortex.
- Prepare a standard curve in 6 sterile reaction tubes (1.5–2 ml volume) from standard concentrate and water [DIL] following the scheme depicted in the table below:

Vitamin B ₂ [µg/l]	Water [DIL] [µl]	+	Standard concentrate [µl]	=	Total volume [µl]
Blank: 0	900	+	0	=	900
Standard 1: 25	975	+	25	=	1 000
Standard 2: 100	900	+	100	=	1 000
Standard 3: 200	400	+	100	=	500
Standard 4: 300	350	+	150	=	500
Standard 5: 600	200	+	300	=	500

7.5 Microtiter plate [PLATE]

- Store the microtiter plate [PLATE] in the aluminium packaging containing the desiccant bag at 2–8 °C.
- The microtiter plate [PLATE] has to be protected from humidity and contamination.
- Take care that the aluminium packaging is not damaged.
- Carefully close the aluminium packaging after opening.
- Take only the microtiter stripes needed directly before usage to avoid contamination

8. SAMPLE STORAGE AND PREPARATION

- Use serum for analysis.
- Samples are stable at 2–8 °C for one day in the dark. For longer storage, samples can be frozen and kept at -20 °C for 5 months.
- Centrifuge samples prior to measurement (at least 5 min at 10 000 g). Use the resulting supernatant in the test.
- Hemolytic samples may give erroneous results and should not be used for analysis. Lipemic samples should be centrifuged at 13 000 g for 10 min before assaying to obtain a serum that is as fat free as possible.

8.1 Sample dilution

Take 200 µl sample/control, add 200 µl water [DIL] and mix. The sample treatment and dilution result in a total dilution of 1:2 (= sample dilution factor).

9. ASSAY PROCEDURE

9.1 Test preparations

Take as many microtiter strips as needed from the kit. Return unused strips and any unused test kit component to the original packaging, and store in the refrigerator. Bring all necessary reagents to room temperature.

9.2 Test procedure

- Take as many microtiter strips as needed from the kit and put them in the second microtiter strip holder [FRA].
- Put 150 µl sterile assay medium into the cavities.
- Add 150 µl of the prepared standard curve, samples and controls into the respective cavities. Pre-rinse each pipet tip with standard, control or sample solution, respectively.
- Carefully seal the plate with adhesive cover foil [FOL]. Important: the cavities must be made airtight by pressing the foil down with the hand!
- Keep at 37 °C for 72–77 h in an incubator.

9.3 Measurement

- Press the adhesive cover foil [FOL] firmly down again with the hand.
- Turn the microtiter plate [PLATE], upside down, place it onto a tabletop and shake the microbes well.
- Turn the microtiter plate [PLATE] over again and carefully remove the adhesive cover foil [FOL]. During this, fix the strips in the frame with your hand because the foil is highly adhesive.
- Remove air bubbles in the cavities using a pipet tip or a needle.
- Read turbidity in a microtiter plate reader at E 610–630 nm (alternatively at E 540–550 nm).

Please note

- After 72–77 h incubation time, the microtiter plate [PLATE] may be stored for a maximum of 48 h in the refrigerator before measuring the turbidity.

10. EVALUATION OF RESULTS

We recommend to use the 4 parameter algorithm to calculate the results. The sample dilution factor has to be considered for data evaluation.

The blank serves as a visual control to exclude contamination and is not taken into account in the calculation. The optical density must be < standard 1. If this is not the case, the analysis must be carried out again.

10.1 Calculation

Vitamin B₂ in µg/l = value from the standard curve × sample dilution factor (2)

Reference value for human serum

Based on studies of serum samples of apparently healthy persons (n = 40), the following values were estimated.

Vitamin B₂: 50–206 µg/l

Please note

We recommend each laboratory to develop its own normal range as normal ranges strongly depend on the choice of the patient collective. The values mentioned above are only for orientation and can deviate from other published data.

10.2 Quality control

The extinction of the highest standard has to be > 0.6.

Results, generated from the analysis of control samples, should be evaluated for acceptability. The results for the samples may not be valid if within the same assay one or more values of the quality control sample or the highest standard are outside the acceptable limits.

11. LIMITATIONS

Only serum can be used for the test.

12. PERFORMANCE CHARACTERISTICS

The following performance characteristics have been collected using human serum samples.

12.1 Precision and reproducibility

Intraassay

	Vitamin B ₂ [µg/l]	CV [%]
Sample 1 (n=10)	12.21	4.47
Sample 2 (n=6)	14.28	7.98

Interassay

	Vitamin B ₂ [µg/l]	CV [%]
Sample 1 (n=10)	13.87	11.57
Sample 2 (n=6)	11.30	10.69

















13. 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.
- ID-Vit® is a trademark of Immundiagnostik AG.
- Do not use reagents beyond the expiration date stated on the kit label.
- Do not interchange different lot numbers of any kit component within the same assay.
- Follow the guidelines for medical laboratories.
- Incubation time, incubation temperature and pipetting volumes of the components are defined by the producer. Any variation of the test procedure, which has not been consulted 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 lodged within 14 days after receipt of the product. The product should be sent to Immundiagnostik AG along with a written complaint.
- Analyze controls with each run.
- Always perform the assay according to the enclosed manual.
- Serious incidents are to be reported to Immundiagnostik AG and the national regulatory authorities.

14. REFERENCES

Powers, H.J., 2003. Riboflavin (vitamin B-2) and health. *The American journal of clinical nutrition*, **77**(6), pp.1352–60.

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

