

ID-Vit[®] Pantothersäure

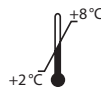
Mikrobiologisches Verfahren zur Bestimmung des Gesamtgehalts von freier Pantothersäure (Vitamin B₅) in Serum mittels einer Lactobacillus plantarum-beschichteten Mikrotiterplatte
Zur Verwendung in Human- und Veterinärmedizin und zu Forschungszwecken

ID-Vit[®] Pantothenic acid

Microbiological test kit for the determination of total free pantothenic acid (vitamin B₅) in serum using a Lactobacillus plantarum coated microtitre plate
For use in human and veterinary medicine and in research

Gültig ab / Valid from 2022-06-20

REF KIF004



IVD



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

Tel.: +49 6251 70190-0

Fax: + 49 6251 70190-363

e.mail: info@immundiagnostik.com www.immundiagnostik.com

Inhalt

1. VERWENDUNGSZWECK	2
2. EINLEITUNG	2
3. INHALT DER TESTPACKUNG	3
4. ERFORDERLICHE LABORGERÄTE UND HILFSMITTEL	3
5. LAGERUNG UND VORBEREITUNG DER REAGENZIEN	4
5.1 Wasser	4
5.2 Herstellung der Kontrollen	4
5.3 Herstellung der Standardkurve	4
5.4 Herstellung des sterilen Assay-Mediums	5
5.5 Mikrotiterplatte [PLATE]	5
6. PROBENLAGERUNG UND -VORBEREITUNG	6
6.1 Probenverdünnung	6
7. TESTDURCHFÜHRUNG	6
7.1 Testprinzip	6
7.2 Testvorbereitungen	7
7.3 Testansatz	7
7.4 Messung	7
8. AUSWERTUNG DER ERGEBNISSE	8
8.1 Berechnung	8
8.2 Erwartungswerte	8
8.3 Qualitätskontrolle	9
9. TESTCHARAKTERISTIKA	9
9.1 Präzision und Reproduzierbarkeit	9
9.2 Wiederfindung	9
10. EINSCHRÄNKUNGEN	10
11. HINWEISE UND VORSICHTSMASSNAHMEN	10
12. ALLGEMEINE HINWEISE ZUM TEST	11
12. LITERATUR	12

1. VERWENDUNGSZWECK

Der ID-Vit® Pantothensäure-Mikrotiterplattentest ist ein mikrobiologisches Verfahren zur Bestimmung des Gesamtgehaltes an freier Pantothensäure in Serum. Alle benötigten Reagenzien und der Standard sind im Test 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

Pantothensäure übernimmt die reaktive Thiofunktion von Coenzym A und ACP

Der Begriff „Pantothensäure“ umfasst die freie Säure, ihr Kalziumsalz (Kalziumpantothenat) sowie ihren Alkohol (D-Panthenol). Pantothensäure (Vitamin B₅) wird von den meisten Mikroorganismen und Pflanzen synthetisiert. Vorstufe ist die Pantoinsäure. Aus ihr und der Aminosäure β -Alanin entsteht die Pantothensäure. Diese wiederum bildet zusammen mit Cysteamin das Pantethin, das eine Komponente des Coenzym A darstellt. Das Coenzym A spielt eine Schlüsselrolle im Stoffwechsel verschiedenster Verbindungen (Fettsäuresynthese, Citrat-Zyklus, Cholesterinbiosynthese, Steroidbiosynthese). Eine weitere bedeutende Funktion kommt der Pantothensäure als Bestandteil des ACP (*acyl carrier protein*) bei der Fettsäure-Biosynthese zu.

Die Aufnahme der Pantothensäure erfolgt v.a. als Coenzym A, von dem dann im Magen-Darm-Trakt die Pantothensäure abgespalten wird. Im Blut liegt die Pantothensäure an Plasmaproteine gebunden vor. Im Serum überwiegt die freie Pantothensäure, in Erythrozyten liegt sie überwiegend als CoA-Verbindung vor (Böhm *et al.* 2003).

Das Pantothensäurederivat Pantethin zeigte in einer Studie eine cholesterinsenkende Wirkung (Coronel *et al.* 1991). Der Pantothensäure-Antagonist Pantoyl-GABA wird in Japan therapeutisch zur Behandlung von Demenzerkrankungen genutzt (Nutzen möglicherweise durch Erhöhung der cholinergen Aktivität).

Pantothensäure-Mangel

Ein Pantothensäure-Mangel kommt unter normalen Bedingungen selten vor. Zur Erforschung von Mangelerscheinungen wurde daher ein Mangel experimentell durch Gabe eines Antagonisten bzw. durch Einhalten einer entsprechenden Diät induziert. Die Probanden zeigten neben gastrointestinalen Störungen mit Anorexie bzw. Konstipation auch Jähzorn und Persönlichkeitsstörungen. Es entwickelten sich nervöse Störungen, bis hin zum Burning-Feet-Syndrom.

Indikationen

Verdacht auf unzureichende Pantothensäureaufnahme, z. B. bei

- Dialysepatienten
- Alkoholabusus
- Morbus Crohn, Colitis ulcerosa

3. INHALT DER TESTPACKUNG

Art.-Nr.	Bezeichnung	Kit-Komponenten	Menge	
			KIF004	KIF004.2
KIF004	PLATE	Mikrotiterplatte, beschichtet mit <i>Lactobacillus plantarum</i>	1 x	2 x
	DIL	Wasser	6 x 30 ml	7 x 30 ml
	ASYMED	Pantothensäure-Assay-Medium	4 x	4 x
	STD	Pantothensäure-Standard, lyophilisiert	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	Pantothensäure-Kontrolle 1, lyophilisiert	4 x	3 x
	CTRL2	Pantothensäure-Kontrolle 2, lyophilisiert	4 x	3 x

4. ERFORDERLICHE LABORGERÄTE UND HILFSMITTEL

- Inkubator mit dunkler Inkubationskammer, 37 °C
- Wasserbad (90 °C–100 °C)
- ELISA-Reader 610–630 nm (540–550 nm)
- 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)

5. 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 4x je nach Probenaufkommen bis zum angegebenen Haltbarkeitsdatum verwendet werden.

5.1 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.

5.2 Herstellung der Kontrollen

- Die lyophilisierten Kontrollen [CTRL1, CTRL2] sind mit je 1,25 ml Wasser [DIL] aus dem Testkit zu resuspendieren und mittels Vortex-Wirbelmischer 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.

5.3 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-Wirbelmischer zu homogenisieren.

- In 6 sterilen Reaktionsgefäßen (Fassungsvermögen 1,5–2 ml) wird mit dem Standardkonzentrat und Wasser [DIL] eine Standardkurve nach folgendem Schema hergestellt:

Pantothensäure [µg/l]	Wasser [DIL] [µl]	+	Standard- konzentrat [µl]	=	Gesamt- volumen [µl]
Blank: 0	975	+	0	=	975
Standard 1: 2,3	975	+	25	=	1 000
Standard 2: 4,6	950	+	50	=	1 000
Standard 3: 18,4	400	+	100	=	500
Standard 4: 27,6	350	+	150	=	500
Standard 5: 36,8	300	+	200	=	500

5.4 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 werfen.
- 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; währenddessen 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 Zentrifugentröhrchen (15 ml, z. B. Falcon) sterilfiltrieren.
- Das so hergestellte sterile Assay-Medium wird im Test verwendet.

5.5 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.

6. PROBENLAGERUNG UND -VORBEREITUNG

- Als Probe eignet sich Serum.
- Die Haltbarkeit der Probe beträgt bei 2–8°C im Dunkeln 3 Tage. Zur längeren Lagerung sollte die Probe bei -20°C aufbewahrt werden.
- Hämolytische Proben beeinflussen das Testergebnis und sollten nicht verwendet werden. Lipämische Proben sollten vor dem Einsatz im Test bei 13 000 g zentrifugiert werden, um ein möglichst fettfreies Serum zu erhalten.
- Proben sollten vor dem Einsatz zentrifugiert werden (mind. 5 min bei 10 000 g). Den resultierenden Überstand im Test einsetzen.

6.1 Probenverdünnung

Von den Serumproben/den Kontrollen je 50 µl abnehmen, 350 µl Wasser [DIL] zugeben und mischen. Dies entspricht einer 1:8-Verdünnung (= Probenverdünnungsfaktor).

7. TESTDURCHFÜHRUNG

7.1 Testprinzip

Das Serum wird verdünnt in die Kavitäten einer Mikrotiterplatte gegeben, die mit *Lactobacillus plantarum* beschichtet sind. Nach Zugabe von Pantothensäure 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 **24 h**. Das Wachstum des *Lactobacillus plantarum* wird als Trübung bei 610–630 nm (alternativ bei 540–550 nm) im ELISA-Reader gemessen und mit einer Standard-Konzentrationsreihe verglichen. Die Menge der Pantothensäure ist dabei direkt proportional der Trübung.

7.2 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.

7.3 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 24 h im Brutschrank inkubieren.

7.4 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 24 h Inkubation kann die Mikrotiterplatte [PLATE] auch für max. 48 h im Kühlschrank aufbewahrt werden, um danach die Trübung zu messen.
- Um Zeitverluste durch Feiertage oder Wochenende zu vermeiden, kann die Mikrotiterplatte [PLATE] auch noch nach bis zu 65 h Inkubation ausgewertet werden.

8. AUSWERTUNG DER ERGEBNISSE

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

Der Blank sollte eine optische Dichte < Standard 1 haben. Er dient als optische Kontrolle zum Ausschluss von Kontaminationen und wird nicht in der Berechnung berücksichtigt.

8.1 Berechnung

Pantothensäure in $\mu\text{g/l}$ = Wert aus Standardkurve \times Probenverdünnungsfaktor (8)

8.2 Erwartungswerte

Der Pantothensäuregehalt wurde in 74 verschiedenen Blutspenderproben ermittelt. Als Mittelwert (Median) wurde 91,4 (81,4) $\mu\text{g/l}$ gefunden. Der 2-SD-Bereich erstreckte sich von 36–147 $\mu\text{g/l}$. Aus Abb. 1 geht die Verteilung der Blutspenderwerte hervor.

Wertebereich

Anzahl Proben	74
Mittelwert	91.4
Median	81.4
SD	27.7
MW-2*SD	36.0
MW+2*SD	146.8

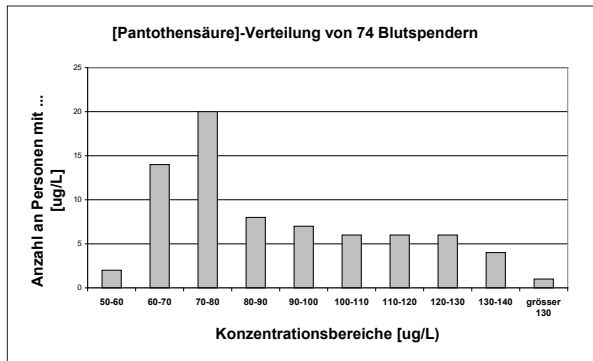


Abb. 1: Verteilung der Pantothensäurewerte in Blutspenderwerte

Anmerkung

Bei einem Probenverdünnungsfaktor von 8 ist ein Bereich von 18,4–294,4 $\mu\text{g/l}$ Pantothensäure abgedeckt.

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

8.3 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.

9. TESTCHARAKTERISTIKA

Die nachfolgenden Testcharakteristika wurden mit Humanserum erhoben.

9.1 Präzision und Reproduzierbarkeit

Intra-Assay (n = 28)

	Pantothensäure [$\mu\text{g/l}$]	VK [%]
Probe	81,0	3,0

Inter-Assay (n = 5)

	Pantothensäure [$\mu\text{g/l}$]	VK [%]
Probe	92,4	4,9

9.2 Wiederfindung

Proben von 3 Patienten wurden mit Pantothensäure gespiked und analysiert. Die Mittelwerte sind im Folgenden dargestellt.

Probe (n=5)	Mittelwert Originalprobe [$\mu\text{g/l}$]	Spike [$\mu\text{g/l}$]	Pantothen-säure erwartet [$\mu\text{g/l}$]	Pantothen-säure gemessen [$\mu\text{g/l}$]	Wiederfindungsrate [%]
A	112,5	18,4	130,9	131,9	105
		36,8	149,3	141,5	79
		55,2	167,7	158,1	83
Wiederfindungsrate gesamt [%]					89

Probe (n=5)	Mittelwert der Originalprobe [µg/l]	Spike [µg/l]	Pantothen-säure erwartet [µg/l]	Pantothen-säure gemessen [µg/l]	Wiederfindungsrate [%]
B	96,61	18,4	115,0	113,8	93
		36,8	133,4	133,8	101
		55,2	151,8	165,3	128
Wiederfindungsrate gesamt [%]					106

Probe (n=5)	Mittelwert der Originalprobe [µg/l]	Spike [µg/l]	Pantothen-säure erwartet [µg/l]	Pantothen-säure gemessen [µg/l]	Wiederfindungsrate [%]
C	106,21	18,4	124,6	122,5	88
		36,8	143,0	138,6	88
		55,2	161,4	176,1	127
Wiederfindungsrate gesamt [%]					101

10. EINSCHRÄNKUNGEN

Vollblut kann nicht im Test eingesetzt werden.

11. 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).
- Die GLP (Good Laboratory Practice)-Regeln sind bei der Testdurchführung einzuhalten.
- 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.

- Die Kontrollen sollten bei jedem Ansatz mitgemessen werden.
- Es wird die Messung in Doppelwerten empfohlen.
- Ergibt die höhere Verdünnung einen höheren Messwert, können Hemmstoffe wie Antibiotika vorliegen.
- 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 als potenziell infektiös behandeln und entsprechend entsorgen.

12. 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.
- Die Reagenzien sollten nach Ablauf des Verfallsdatums nicht mehr verwendet werden (Verfallsdatum siehe Testpackung).
- Einzelkomponenten mit unterschiedlichen Lot-Nummern aus verschiedenen Testpackungen sollten nicht gemischt oder ausgetauscht werden.
- 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 sollten immer mitgemessen werden.
- Die Bestimmung ist immer nach der dem Kit beigefügten Arbeitsanleitung durchzuführen.
- Schwerwiegende Vorkommnisse sind der Immundiagnostik AG und den nationalen Aufsichtsbehörden zu melden.

12. LITERATUR

1. Burtis, C.A. & Ashwood, E.R., 1999. Tietz textbook of clinical chemistry 3rd ed., W.B. Saunders.
2. Coronel, F. et al., 1991. Treatment of hyperlipemia in diabetic patients on dialysis with a physiological substance. *American journal of nephrology*, **11**(1), pp.32–6.

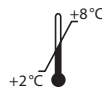
Verwendete Symbole:

	Temperaturbegrenzung		Bestellnummer
	In-Vitro-Diagnostikum		Zu verwenden mit
	Hersteller		Inhalt ausreichend für <n> Prüfungen
	Chargenbezeichnung		Verwendbar bis
	Achtung		Gebrauchsanweisung beachten
	Spezifikationsdatenblatt beachten		

ID-Vit[®] Pantothenic acid

Microbiological test kit for the determination of total free pantothenic acid (vitamin B₅) in serum using a Lactobacillus plantarum coated microtitre plate
For use in human and veterinary medicine and in research

Valid from 2022-06-20



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	15
2. INTRODUCTION	15
3. MATERIAL SUPPLIED	16
4. MATERIAL REQUIRED BUT NOT SUPPLIED	16
5. STORAGE AND PREPARATION OF REAGENTS	17
5.1 <i>Water</i>	17
5.2 <i>Preparation of the controls</i>	17
5.3 <i>Preparation of the standard curve</i>	17
5.4 <i>Preparation of the sterile assay medium</i>	18
5.5 <i>Microtiter plate [PLATE]</i>	18
6. SAMPLE STORAGE AND PREPARATION	19
6.1 <i>Sample dilution</i>	19
7. ASSAY PROCEDURE	19
7.1 <i>Principle of the test</i>	19
7.2 <i>Test preparations</i>	19
7.3 <i>Test procedure</i>	20
7.4 <i>Measurement</i>	20
8. EVALUATION OF RESULTS	20
8.1 <i>Calculation</i>	21
8.2 <i>Expected values</i>	21
8.3 <i>Quality control</i>	21
9. PERFORMANCE CHARACTERISTICS	21
9.1 <i>Precision and reproducibility</i>	22
9.2 <i>Recovery</i>	22
10. LIMITATIONS	23
11. PRECAUTIONS	23
12. GENERAL NOTES ON THE TEST AND TEST PROCEDURE	24
13. REFERENCES	24

1. INTENDED USE

ID-Vit® Pantothenic acid is a microtiter plate test kit based on a microbiological method which measures the total free pantothenic acid 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

Pantothenic acid is the reactive thiol function of CoA and ACP

Pantothenic acid (vitamin B₅) is synthesised by most microorganisms and plants from pantoic acid. The vitamin is an integral part of 4'-phosphopantetheine, which is a component of coenzyme A (CoA). CoA plays a key role in the metabolism of numerous compounds, especially lipids and the ultimate catabolic disposition of carbohydrates and ketogenic amino acids. About 80% of the vitamin in animal tissues is in CoA form, and the rest exists mainly as phosphopantetheine and phosphopantethenate.

Another essential role of pantothenic acid is its participation in the 4'-phosphopantetheine moiety of acyl carrier protein (ACP), where the phosphodiester-linked prosthetic group uses the sulfhydryl terminus to exchange with malonyl-CoA to form an ACP-S malonyl thioester, which can chain elongate during fatty acid biosynthesis.

Pantothenic acid deficiency

Pantothenic acid deficiency is exceedingly rare. Because of its rarity, most information about pantothenic acid deficiency has been obtained from experiments: Pantothenic acid deficiency has been induced in humans by use of a metabolic antagonist, w-methyl pantothenic acid along with a pantothenic acid-deficient diet. Subjects became irascible and developed postural hypotension and rapid heart rate on exertion, epigastric distress with anorexia and constipation, numbness and tingling of the hands and feet. Because pantothenic acid is involved with so many vital processes in the body, it is not surprising that a broad number of complications might result from deficiency.

From recent research it is known that the pantothenic acid derivative, pantetheine (two molecules of pantetheine joined by a disulfide bond), has a hypocholesterolemic effect. A metabolic antagonist of pantothenic acid, pantoyl g-amino butyric acid (called pantoyl-GABA), is widely used in Japan as an antidementia drug for treating cognitive impairments in pathological states such as Alzheimer's disease, presumably through increasing cholinergic activity *in vivo*.

Indications

Suspicion of inadequate intake of pantothenic acid, e.g.

- dialysis patients
- alcohol abusius
- Crohn's disease, Colitis ulcerosa

3. MATERIAL SUPPLIED

Cat. No.	Label	Kit components	Quantity	
			KIF004	KIF004.2
KIF004	PLATE	<i>Lactobacillus plantarum</i> -precoated microtiter plate	1 x	2 x
	DIL	Water	6 x 30 ml	7 x 30 ml
	ASYMED	Pantothenic acid assay medium	4 x	4 x
	STD	Pantothenic acid standard, lyophilized.	4 x	3 x
	FOL	Adhesive cover foil	1 x whole 3 x half	3 x whole
	FRA	Replacement holder for microtiter strips	1 x	1 x
	CTRL1	Pantothenic acid control 1, lyophilized.	4 x	3 x
	CTRL2	Pantothenic acid control 2, lyophilized.	4 x	3 x

4. MATERIAL REQUIRED BUT NOT SUPPLIED

- Incubator with a dark incubation chamber, 37 °C
- Water bath (90 °C–100 °C)
- ELISA 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 sterile disposable syringe
- 15 ml centrifuge tubes, sterile (e.g. Falcon tubes)
- Biocentrifuge (10 000 g)

5. STORAGE AND PREPARATION OF REAGENTS

- Store test kit and reagents at 2–8 °C.
- Prepare reagents freshly and use them immediately after preparation. Discard remaining unused reagents and waste in accordance with country, federal, state, and local regulations.
- 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 4 times within the expiry date stated on the label.

5.1 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.

5.2 Preparation of the controls

- The lyophilised controls [CTRL1, CTRL2] have to be resuspended with each 1.25 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.

5.3 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 needed volume) 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:

Pantothenic acid [µg/l]	Water [DIL] [µl]	+	Standard concentrate [µl]	=	Total volume [µl]
Blank: 0	975	+	0	=	975
Standard 1: 2.3	975	+	25	=	1 000
Standard 2: 4.6	950	+	50	=	1 000
Standard 3: 18.4	400	+	100	=	500
Standard 4: 27.6	350	+	150	=	500
Standard 5: 36.8	300	+	200	=	500

5.4 Preparation of the sterile assay medium

- Fresh sterile assay medium has to be prepared each time before performing a test.
- Remove lyophilised assay medium from the desiccant bag in the 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.

5.5 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

6. SAMPLE STORAGE AND PREPARATION

- Use serum for analysis.
- Samples are stable at 2–8 °C for 3 days in the dark. For longer storage, samples should be frozen and kept at -20 °C.
- Hemolytic samples may give erroneous results and should not be used for analysis. Lipemic samples should be centrifuged at 13 000 *g* before assaying to obtain fat free serum as far as possible.
- Samples should be centrifuged (at least 5 min at 10 000 *g*) prior to measurement. Use the resulting supernatant in the test.

6.1 Sample dilution

Take 50 µl from the sample/control, add 350 µl water [DIL] and mix. The sample treatment and dilution result in a total dilution of 1:8 (= sample dilution factor).

7. ASSAY PROCEDURE

7.1 Principle of the test

The serum samples are diluted and then transferred into the wells of a microtiter plate coated with *Lactobacillus plantarum*. The addition of pantothenic acid in either standards or samples gives a pantothenic acid-dependent growth response until pantothenic acid is consumed. After incubation at **37 °C** for **24 h**, the growth of *Lactobacillus plantarum* is measured turbidimetrically at 610–630 nm (alternatively at 540–550 nm) in an ELISA reader and compared to a standard curve generated from the dilution series. The amount of pantothenic acid is directly proportional to the turbidity.

7.2 Test preparations

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

7.3 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 each 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 24 h in an incubator.

7.4 Measurement

- Press the adhesive cover foil [FOL] firmly down again with the hand.
- Upturn the microtiter plate [PLATE], put 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 an ELISA reader at E 610–630 nm (alternatively at E 540–550 nm).

Please note

- After 24 h incubation time, the microtiter plate [PLATE] may be stored for a maximum of 48 h in the refrigerator before measuring the turbidity.
- To prevent time-loss through public holidays or weekends, the microtiter plate [PLATE] may also be evaluated after 65 h incubation.

8. 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 should have an optical density < standard 1. It serves as optical control to exclude contaminations and is not included in the calculation of results.

8.1 Calculation

Pantothenic acid in $\mu\text{g/l}$ = value from the standard curve \times sample dilution factor (8)

8.2 Expected values

The concentration of pantothenic acid was determined in 74 samples of different blood donors. The median value was 91.4 (81.4) $\mu\text{g/l}$. The 2-SD area was 36–147 $\mu\text{g/l}$. Figure 1 shows the distribution of the values.

Number of samples	74
Mean	91.4
Median	81.4
SD	27.7
MW-2*SD	36.0
MW+2*SD	146.8

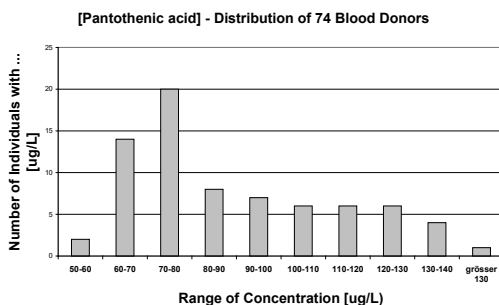


Fig. 1: Distribution of pantothenic acid values in blood donor samples

Please note

A concentration range of 18.4–294.4 $\mu\text{g/l}$ pantothenic acid is covered at a sample dilution of 1:8.

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.

8.3 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.

9. PERFORMANCE CHARACTERISTICS

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

9.1 Precision and reproducibility

Intraassay (n = 28)

	Pantothenic acid [$\mu\text{g/l}$]	CV [%]
Sample	81.0	3.0

Interassay (n = 5)

	Pantothenic acid [$\mu\text{g/l}$]	CV [%]
Sample	92.4	4.9

9.2 Recovery

Samples from 3 patients were spiked with pantothenic acid and analysed. The mean values are shown below.

Sample (n=5)	Mean value original sample [$\mu\text{g/l}$]	Spike [$\mu\text{g/l}$]	Pantothenic acid expected [$\mu\text{g/l}$]	Pantothenic acid measured [$\mu\text{g/l}$]	Recovery Rate [%]
A	112.5	18.4	130.9	131.9	105
		36.8	149.3	141.5	79
		55.2	167.7	158.1	83
Recovery rate in total [%]					89

Sample (n=5)	Mean value measured in original sample [$\mu\text{g/l}$]	Spike [$\mu\text{g/l}$]	Pantothenic acid expected [$\mu\text{g/l}$]	Pantothenic acid measured [$\mu\text{g/l}$]	Recovery Rate [%]
B	96.61	18.4	115.0	113.8	93
		36.8	133.4	133.8	101
		55.2	151.8	165.3	125
Recovery rate in total [%]					106

Sample (n=5)	Mean value measured in original sample [µg/l]	Spike [µg/l]	Pantothenic acid expected [µg/l]	Pantothenic acid measured [µg/l]	Recovery Rate [%]
C	106.21	18.4	124.6	122.5	88
		36.8	143.0	138.6	88
		55.2	161.4	176.1	127
Recovery rate in total [%]					101

10. LIMITATIONS

Whole blood cannot be used in the assay.

11. 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).
- GLP (Good Laboratory Practice) guidelines have to be observed.
- 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.
- Controls should be measured with each assay.
- We recommend measurements in duplicate.
- If a higher dilution results in a higher value measured, inhibitors like antibiotics might be present.
- Reagents should not be used beyond the expiration date shown on the label.
- Wear gloves during the test.
- Used microtiter stripes [PLATE] and materials that have been in contact with patient samples should be handled and disposed as potentially infectious.












12. 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.
- Reagents should not be used beyond the expiration date stated on the kit label.
- Do not interchange different lot numbers of any kit component within the same assay.
- The guidelines for medical laboratories should be followed.
- Incubation time, incubation temperature and pipetting volumes of the components are defined by the producer. Any variation of the test procedure, which is not coordinated with the producer, may influence the results of the test. Immundiagnostik AG can therefore not be held responsible for any damage resulting from incorrect use.
- 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.
- Control samples should be analysed with each run.
- The assay should always be performed according to the enclosed manual.
- Serious incidents are to be reported to Immundiagnostik AG and the national regulatory authorities.

13. REFERENCES

1. Burtis, C.A. & Ashwood, E.R., 1999. Tietz textbook of clinical chemistry 3rd ed., W.B. Saunders.
2. Coronel, F. et al., 1991. Treatment of hyperlipemia in diabetic patients on dialysis with a physiological substance. *American journal of nephrology*, **11**(1), pp.32–6.

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		

Immundiagnostik AG

Stubenwald-Allee 8a
64625 Bensheim, Germany

Tel.: +49 6251 70190-0

Fax: +49 6251 70190-363

info@immundiagnostik.com

www.immundiagnostik.com

