

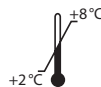
# **ID-Vit<sup>®</sup> Folsäure**

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

# **ID-Vit<sup>®</sup> Folic acid**

***Microbiological test kit for the determination of folic acid in serum using a Lactobacillus rhamnosus-coated microtitre plate  
For use in human and veterinary medicine and in research***

Gültig ab / Valid from 2022-07-05



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

## 1. VERWENDUNGSZWECK

Der ID-Vit® Folsäure-Mikrotiterplattentest ist ein mikrobiologisches Verfahren zur Bestimmung des Gesamtgehaltes an Folsäure 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

Folsäure, ein wasserlösliches, licht- und temperaturempfindliches Vitamin des B-Komplexes (Vitamin B<sub>9</sub>), ist an allen Wachstums- und Entwicklungsprozessen des Körpers beteiligt. Folsäure ist essentiell für die Bildung roter Blutkörperchen, für eine optimale Funktion des Knochenmarks und eine gesunde Nerventätigkeit. Folsäure ist außerdem essentiell für die Zellteilung (daher seine Bedeutung bei der Fötusentwicklung).

Obwohl Folsäure in den meisten pflanzlichen und tierischen Lebensmitteln enthalten ist, ist Folsäuremangel der am weitesten verbreitete Vitaminmangel in Europa und Nordamerika. Nach Angaben der Deutschen Gesellschaft für Ernährung nimmt nur jeder 4. Deutsche genügend Folsäure auf – die Folge einer einseitigen Ernährungsweise mit wenig frischem Obst und Gemüse. Aber auch Alter, Krankheiten und die Einnahme bestimmter Medikamente, wie z. B. Cotrimoxazol, können zu Resorptionsstörungen und einer damit verbundenen Unterversorgung führen.

Erniedrigte Folsäurespiegel kommen zustande durch:

- ein vermindertes Angebot (z. B. durch Alkoholismus oder Folsäure-Antagonisten),
- eine gestörte Resorption (z. B. bei Zöliakie, CED),
- einen vermehrten Bedarf (z. B. in der Schwangerschaft, bei Anämien oder Krebserkrankungen).

### Mangelsymptome

Erste Mangelsymptome sind Müdigkeit, Reizbarkeit, Konzentrationsschwäche und Appetitlosigkeit; weitere Folgen sind Entzündungen der Schleimhäute, Anämie und schwere neurologische Schädigungen. Während der Schwangerschaft, in der sich der Folsäurebedarf verdoppelt, kann ein Mangel zu Frühgeburt und schweren Missbildungen führen. Durch eine optimale Folsäureversorgung während der Schwangerschaft kann das Risiko eines Neuralrohrdefekts beim Fötus um 85 % vermindert werden. Da sowohl ein Folsäuremangel sowie ein Vitamin-B<sub>12</sub>-Mangel eine megaloblastäre Anämie bedingen können, ist die Bestimmung beider Vitamine bei diesem Krankheitsbild wichtig, um das richtige Vitamin zu supplementieren. Die Behandlung

der megaloblastären Anämie bei Vitamin-B<sub>12</sub>-Mangel mit Folsäure kann zu irreversiblen Schäden am zentralen Nervensystem führen.

### **Folsäure und Arteriosklerose**

Ein Folsäuremangel gilt als häufigste Ursache einer Hyperhomocysteinämie. Die Hyperhomocysteinämie wird inzwischen als unabhängiger Faktor für Arteriosklerose angesehen, daher kann die Folsäurebestimmung im Rahmen einer KHK-Risikoermittlung zum Einsatz kommen. Unabhängig vom Einfluss der Folsäure auf den Homocysteinspiegel wurde ein weiterer positiver Effekt auf die Endothelfunktion bei Herzpatienten festgestellt, bei denen sich aufgrund einer andauernden Therapie mit organischen Nitraten eine Nitrattoleranz entwickelt hatte. Ohne Folsäuresupplementierung kommt es bei solchen Patienten zur vermehrten Freisetzung von Sauerstoffradikalen.

### **Indikationen**

- Hyperchrome, makrozytäre Anämie (Leitsymptom)
- Langzeittherapie mit Antiepileptika bzw. Folsäure Antagonisten
- Langzeithämodialyse
- (Mehrlings-)Schwangerschaft / geplante Schwangerschaft
- gesteigerte Erythropoese
- Chronische Lebererkrankungen
- Hämoblastosen
- Psoriasis; Dermatitis
- Stomatitis; Glossitis
- Chronischer Alkoholabusus

## **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 Folsäure 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 **48 h**. 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 der Folsäure ist dabei direkt proportional der Trübung.

#### 4. INHALT DER TESTPACKUNG

Art.-Nr.	Bezeichnung	Kit-Komponenten	Menge	
			KIF005	KIF005.2
KIF005	PLATE	Mikrotiterplatte, beschichtet mit <i>Lactobacillus rhamnosus</i>	1 x	2 x
	DIL	Wasser	4 x 30 ml	7 x 30 ml
	ASYMED	Folsäure-Assay-Medium	4 x	4 x
	STD	Folsäure-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
	ASYBUF	Folsäure-Medium-Behandlungspuffer	4 x 1,5 ml	4 x 1,5 ml
	CTRL1	Folsäure-Kontrolle 1, lyoph.	4 x	3 x
	CTRL2	Folsäure-Kontrolle 2, lyoph.	4 x	3 x

#### 5. ERFORDERLICHE LABORGERÄTE UND HILFSMITTEL

- Inkubator mit dunkler Inkubationskammer, 37 °C
- Wasserbad (90–100 °C)
- optional für Probenvorbereitung: Thermoblock (95 °C)
- ELISA-Reader 610–630 nm (540–550 nm)
- Präzisionspipetten und sterile Pipettenspitzen für den Einmalgebrauch mit variablen Volumina von 2–1 000 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)

#### 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).

- 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.
- Es wird die Messung in Doppelwerten empfohlen.
- Ergibt die höhere Verdünnung einen höheren Messwert, können Hemmstoffe wie Antibiotika vorliegen.
- Während der Testdurchführung Handschuhe tragen.
- Gebrauchte Mikrotiterplattenstreifen sowie andere mit Patientenproben in Kontakt gekommene Materialien als potenziell infektiös behandeln und entsprechend 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 verworfen.
- 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.

### *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 der Kontrollen

- Die lyophilisierten Kontrollen [CTRL1, CTRL2] sind mit je 125 µl 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.

## 7.3 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:

<b>Folsäure [µg/l]</b>	<b>Wasser [DIL] [µl]</b>	<b>+</b>	<b>Standard- konzentrat [µl]</b>	<b>=</b>	<b>Gesamt- volumen [µl]</b>
Blank: 0	500	+	0	=	500
Standard 1: 0,04	450	+	50	=	500
Standard 2: 0,12	350	+	150	=	500
Standard 3: 0,20	250	+	250	=	500
Standard 4: 0,28	150	+	350	=	500
Standard 5: 0,36	50	+	450	=	500

## 7.4 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] und 1 ml Medium-Behandlungspuffer [ASYBUF] 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 Zentrifugenröhrchen (15 ml, z. B. Falcon) sterilfiltrieren.
- Das so hergestellte sterile Assay-Medium wird im Test verwendet.

### 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

- Als Probe eignet sich Serum.
- Die Haltbarkeit der Probe beträgt bei 2–8°C im Dunkeln 8 Stunden. 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.

### 8.1 Probenverdünnung

10 µl Serum/Kontrolle abnehmen, 740 µl Wasser [DIL] zugeben und mischen. Die Probenverdünnung entspricht insgesamt einer 1:75-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 48 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 48 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 60h Inkubation ausgewertet werden.

## 10. 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.

### 10.1 Berechnung

Folsäure in  $\mu\text{g/l}$  = Wert aus Standardkurve  $\times$  Probenverdünnungsfaktor (75)

#### Referenzbereich für Humanserum

Anhand einer laborinternen Studie mit Serumproben von augenscheinlich Gesunden ( $n = 74$ ) wurden die folgenden Werte ermittelt.

Folsäure: 3,8–23,2  $\mu\text{g/l}$

#### Anmerkung

Bei einem Probenverdünnungsfaktor von 75 ist ein Bereich von 3–27  $\mu\text{g/l}$  Folsäure 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 Folsäure 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

Vollblut kann nicht im Test eingesetzt werden.

## 12. TESTCHARAKTERISTIKA

Die nachfolgenden Testcharakteristika wurden mit Humanserum erhoben.

### 12.1 Präzision und Reproduzierbarkeit

#### Intra-Assay (n = 19)

	Folsäure [ $\mu\text{g/l}$ ]	VK [%]
Probe	12,69	4,7

#### Inter-Assay (n = 5)

	Folsäure [ $\mu\text{g/l}$ ]	VK [%]
Probe	12,24	5,68

### 12.2 Wiederfindung

Proben von 4 Patienten wurden unterschiedlich verdünnt (75, 150, 300), mit Folsäure gespiked und analysiert. Die Mittelwerte sind im Folgenden dargestellt.

Probe (n=9)	Mittelwert Originalprobe [ $\mu\text{g/l}$ ]	Spike [ $\mu\text{g/l}$ ]	Folsäure erwartet [ $\mu\text{g/l}$ ]	Folsäure gemessen [ $\mu\text{g/l}$ ]	Wiederfindungsrate [%]
A	8,2	5	13,2	13,8	112
		10	18,2	19,1	109
		15	23,2	24,8	111
<b>Wiederfindungsrate gesamt [%]</b>					<b>111</b>

Probe (n=8)	Mittelwert Originalprobe [µg/l]	Spike [µg/l]	Folsäure erwartet [µg/l]	Folsäure gemessen [µg/l]	Wiederfindungsrate [%]
B	3,9	5	8,9	9,3	108
		10	13,9	14,3	104
		15	18,9	19,5	104
<b>Wiederfindungsrate gesamt [%]</b>					<b>105</b>

Probe (n=8)	Mittelwert Originalprobe [µg/l]	Spike [µg/l]	Folsäure erwartet [µg/l]	Folsäure gemessen [µg/l]	Wiederfindungsrate [%]
C	4,4	5	9,4	9,6	104
		10	14,4	14,5	101
		15	19,4	20,0	104
<b>Wiederfindungsrate gesamt [%]</b>					<b>103</b>

Probe (n=8)	Mittelwert Originalprobe [µg/l]	Spike [µg/l]	Folsäure erwartet [µg/l]	Folsäure gemessen [µg/l]	Wiederfindungsrate [%]
D	5,1	5	10,1	10,6	110
		10	15,1	15,3	102
		15	20,1	20,6	103
<b>Wiederfindungsrate gesamt [%]</b>					<b>105</b>

### 12.3 Linearität

Proben von 2 Patienten wurden verdünnt und alaysiert. Die Ergebnisse sind im Folgenden dargestellt:

Probe	Verdünnung	Folsäure erwartet [µg/l]	Folsäure gemessen [µg/l]
A	75	13,2	13,7
	150		14,0
	300		13,9
C	150	19,4	20,1
	300		20,7
	450		19,4

## 13. LITERATUR












- Obeid, R. & Herrmann, W., 2006. Mechanisms of homocysteine neurotoxicity in neurodegenerative diseases with special reference to dementia. *FEBS letters*, **580**(13), pp.2994–3005.
- Strohecker, R. & Henning, H., 1963. Vitamin-Bestimmungen. Erprobte Methoden. E. Merck AG, ed., Weinheim/Bergstraße: Verlag Chemie GmbH.
- Verhaar, M.C., Stroes, E. & Rabelink, T.J., 2002. Folates and cardiovascular disease. *Arteriosclerosis, thrombosis, and vascular biology*, **22**(1), pp.6–13.

## 14. 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.

### Verwendete Symbole:

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



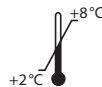


# **ID-Vit<sup>®</sup> folic acid**

***Microbiological test kit for the determination of folic acid in serum using a Lactobacillus rhamnosus coated microtitre plate***

***For use in human and veterinary medicine and in research***

Valid from 2022-07-05



**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. PRINCIPLE OF THE TEST</b>	<b>18</b>
<b>4. MATERIAL SUPPLIED</b>	<b>19</b>
<b>5. MATERIAL REQUIRED BUT NOT SUPPLIED</b>	<b>19</b>
<b>6. PRECAUTIONS</b>	<b>19</b>
<b>7. STORAGE AND PREPARATION OF REAGENTS</b>	<b>20</b>
7.1 Water	20
7.2 Preparation of the controls	20
7.3 Preparation of the standard curve	21
7.4 Preparation of the sterile assay medium	21
7.5 Microtiter plate [PLATE]	22
<b>8. SAMPLE STORAGE AND PREPARATION</b>	<b>22</b>
8.1 Sample dilution	22
<b>9. ASSAY PROCEDURE</b>	<b>23</b>
9.1 Test preparations	23
9.2 Test procedure	23
9.3 Measurement	23
<b>10. EVALUATION OF RESULTS</b>	<b>24</b>
10.1 Calculation	24
10.2 Quality control	24
<b>11. LIMITATIONS</b>	<b>24</b>
<b>12. PERFORMANCE CHARACTERISTICS</b>	<b>24</b>
12.1 Precision and reproducibility	25
12.2 Recovery	25
12.3 Linearity	26
<b>13. REFERENCES</b>	<b>27</b>
<b>14. GENERAL NOTES ON THE TEST</b>	<b>27</b>

## 1. INTENDED USE

ID-Vit® Folic acid is a microtiter plate test kit based on a microbiological method which measures the total folic 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

Folic acid, a water soluble, light and temperature sensitive vitamin of the B complex (vitamin B<sub>9</sub>), is involved in all growth and development processes of the body. Folic acid is essential for the formation of red blood cells, for optimal functioning of the bone marrow and for healthy nerve activity. Moreover, folic acid is essential for cell division, therefore it is important in foetus development.

Although most plant and animal based foods contain folic acid, a deficiency of folic acid is the most widespread vitamin deficiency in Europe and North America. According to information from the German Nutritional Society (Deutschen Gesellschaft für Ernährung) only one in four Germans absorb sufficient folic acid – the result of one-sided nutritional habits with little fresh fruit and vegetables. But also age, disease and the influence of specific medications, e. g. cotrimoxazol, may lead to resorption disturbances and to an associated deficiency.

Lowered folic acid levels occur because of:

- a decreased supply (e. g. through alcoholism or folic acid antagonists),
- a disrupted resorption (e. g. in celiac disease, CED),
- an increased requirement (e. g. during pregnancy, in anaemic or cancerous diseases).

### Symptoms of Deficiency

The first symptoms of deficiency are weariness, irritability, concentration problems and loss of appetite; further consequences are inflammation of the mucous membranes, anaemia and grievous neurological damage.

During pregnancy, when the folic acid requirements are doubled, a deficiency in folic acid may lead to premature birth and severe abnormalities. An optimal supplementation of folic acid during the pregnancy can reduce the risk of neural tube defects in the foetus by 85%.

Because a deficiency of either vitamin B<sub>12</sub> or folic acid may lead to megaloblastic anaemia, the determination of both vitamins is important for the clinical picture so that the correct vitamin may be supplemented. Otherwise, in the case of vitamin B<sub>12</sub>

deficiency, treatment of megaloblastic anaemia with folic acid may lead to irreversible damage of the central nervous system.

### **Folic acid and arteriosclerosis**

A folic acid deficiency is known to be the most common cause of hyperhomocysteinaemia. Meanwhile, the hyperhomocysteinaemia has been recognised as an independent factor in arteriosclerosis. Therefore, the determination of folic acid can be carried out within the framework of a coronary disease risk analysis. Beside of the influence of folic acid on the homocysteine levels, a further positive effect on the endothelial function in heart patients has been established – development of nitrate tolerance during continuous nitrate therapy, e.g. in such patients, an increased release of oxygen radicals occurs without folic acid supplementation (Verhaar et al. 2002).

### **Indications**

- Hyperchrome, macrocytic anemia
- Long-term therapy with antiepileptic drugs or folic acid antagonists
- Long-term haemodialysis
- Multiple birth pregnancy/planned pregnancy
- Enhanced erythropoiesis
- Chronic liver diseases
- Hemoblastosis
- Psoriasis, dermatitis
- Stomatitis, glossitis
- Chronic alcohol abus

## **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 folic acid in either standards or samples gives a folic acid-dependent growth response until folic acid is consumed. After incubation at **37 °C** for **48 h**, the growth of *Lactobacillus rhamnosus* 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 folic acid is directly proportional to the turbidity.

## 4. MATERIAL SUPPLIED

Cat. No.	Label	Kit components	Quantity	
			KIF005	KIF005.2
KIF005	PLATE	<i>Lactobacillus rhamnosus</i> -precoated microtiter plate	1 x	2 x
	DIL	Water	4 x 30 ml	7 x 30 ml
	ASYMED	Folic acid assay medium	4 x	4 x
	STD	Folic acid standard, lyoph.	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
	ASYBUF	Folic acid medium treatment buffer	4 x 1.5 ml	4 x 1.5 ml
	CTRL1	Folic acid control 1, lyoph.	4 x	3 x
	CTRL2	Folic acid control 2, lyoph.	4 x	3 x

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

## 5. MATERIAL REQUIRED BUT NOT SUPPLIED

- Incubator with a dark incubation chamber, 37 °C
- Water bath (90–100 °C)
- optional for sample preparation: themoblock (95 °C)
- ELISA reader 610–630 nm (540–550 nm)
- Calibrated precision pipettors and sterile 2–1 000 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)

## 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).

- 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.
- We recommend measurements in duplicate.
- If a higher dilution results in a higher value measured, inhibitors like antibiotics might be present.
- 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 should be handled and disposed 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. 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.

### 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 controls

- The lyophilised controls [CTRL1, CTRL2] have to be resuspended with each 125 µl 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.

### 7.3 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 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:

<b>Folic acid [µg/l]</b>	<b>Water [DIL] [µl]</b>	<b>+</b>	<b>Standard concentrate [µl]</b>	<b>=</b>	<b>Total volume [µl]</b>
Blank: 0	500	+	0	=	500
Standard 1: 0.04	450	+	50	=	500
Standard 2: 0.12	350	+	150	=	500
Standard 3: 0.20	250	+	250	=	500
Standard 4: 0.28	150	+	350	=	500
Standard 5: 0.36	50	+	450	=	500

### 7.4 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] and 1 ml medium treatment buffer [ASYMED] 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  $< 30^{\circ}\text{C}$  (at  $2-8^{\circ}\text{C}$  for 10 min).
- Filter the medium using a disposable syringe (10 ml) and the  $0.2\ \mu\text{m}$  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.

### 7.5 Microtiter plate [PLATE]

- Store the microtiter plate [PLATE] in the aluminium packaging containing the desiccant bag at  $2-8^{\circ}\text{C}$ .
- 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  $2-8^{\circ}\text{C}$  for 8 hours in the dark. For longer storage, samples should be frozen and kept at  $-20^{\circ}\text{C}$ .
- Hemolytic samples may give erroneous results and should not be used for analysis. Lipemic samples should be centrifuged at  $13\ 000g$  before assaying to obtain fat free serum as far as possible.
- Samples should be centrifuged (at least 5 min at  $10\ 000g$ ) prior to measurement. Use the resulting supernatant in the test.

### 8.1 Sample dilution

Take  $10\ \mu\text{l}$  sample/control, add  $740\ \mu\text{l}$  water [DIL] and mix. The sample dilution result in a total dilution of 1:75 (= sample dilution factor).



## 9. ASSAY PROCEDURE

### 9.1 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.

### 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 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 48 h in an incubator.

### 9.3 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 48 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 60 h incubation.

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

### 10.1 Calculation

Folic acid in  $\mu\text{g/l}$  = value from the standard curve  $\times$  sample dilution factor (75)

#### Reference value for human serum

Based on studies of serum samples of apparently healthy persons ( $n = 74$ ), the following values were estimated.

Folic acid: 3.8–23.2  $\mu\text{g/l}$

#### Please note

A concentration range of 3–27  $\mu\text{g/l}$  folic acid is covered at a sample dilution of 1:75.

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

Whole blood cannot be used in the assay.

## 12. PERFORMANCE CHARACTERISTICS

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

## 12.1 Precision and reproducibility

### Intraassay (n = 21)

	Folic acid [ $\mu\text{g/l}$ ]	CV [%]
Sample	12.69	4.7

### Interassay (n = 3)

	Folic acid [ $\mu\text{g/l}$ ]	CV [%]
Sample	12.24	5.68

## 12.2 Recovery

Samples from 4 patients were differently diluted (75, 150, 300), spiked with folic acid and analysed. The mean values are shown below.

Sample (n=9)	Mean value original sample [ $\mu\text{g/l}$ ]	Spike [ $\mu\text{g/l}$ ]	Folic acid expected [ $\mu\text{g/l}$ ]	Folic acid measured [ $\mu\text{g/l}$ ]	Recovery Rate [%]
A	8.2	5	13.2	13.8	112
		10	18.2	19.1	109
		15	23.2	24.8	111
<b>Recovery rate in total [%]</b>					<b>111</b>

Sample (n=8)	Mean value original sample [ $\mu\text{g/l}$ ]	Spike [ $\mu\text{g/l}$ ]	Folic acid expected [ $\mu\text{g/l}$ ]	Folic acid measured [ $\mu\text{g/l}$ ]	Recovery Rate [%]
B	3.9	5	8.9	9.3	108
		10	13.9	14.3	104
		15	18.9	19.5	104
<b>Recovery rate in total [%]</b>					<b>105</b>

Sample (n=8)	Mean value original sample [µg/l]	Spike [µg/l]	Folic acid expected [µg/l]	Folic acid measured [µg/l]	Recovery Rate [%]
C	4.4	5	9.4	9.6	104
		10	14.4	14.5	101
		15	19.4	20.0	104
<b>Recovery rate in total [%]</b>					<b>103</b>

Sample (n=8)	Mean value original sample [µg/l]	Spike [µg/l]	Folic acid expected [µg/l]	Folic acid measured [µg/l]	Recovery Rate [%]
D	5.1	5	10.1	10.6	110
		10	15.1	15.3	102
		15	20.1	20.6	103
<b>Recovery rate in total [%]</b>					<b>105</b>

### 12.3 Linearity

Samples from 2 patients were diluted and analysed. The results are shown below.

Sample	Dilution	Folic acid expected [µg/l]	Folic acid detected [µg/l]
A	75	13.2	13.7
	150		14.0
	300		13.9
C	150	19.4	20.1
	300		20.7
	150		19.4












### 13. REFERENCES

1. Obeid, R. & Herrmann, W., 2006. Mechanisms of homocysteine neurotoxicity in neurodegenerative diseases with special reference to dementia. *FEBS letters*, **580**(13), pp.2994–3005.
2. Strohecker, R. & Henning, H., 1963. Vitamin-Bestimmungen. Erprobte Methoden. E. Merck AG, ed., Weinheim/Bergstraße: Verlag Chemie GmbH.
3. Verhaar, M.C., Stroes, E. & Rabelink, T.J., 2002. Folates and cardiovascular disease. *Arteriosclerosis, thrombosis, and vascular biology*, **22**(1), pp.6–13.

### 14. GENERAL NOTES ON THE TEST

- 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.

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

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

