

Arbeitsanleitung / Manual

Nur für den Gebrauch durch Fachpersonal /  
For professional use only

# 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 microtiter plate For use in human and veterinary medicine and in research**

Gültig ab / Valid from 2024-05-07

REF KIF005

REF KIF005.2

$\Sigma$  96

$\Sigma$  2 x 96

$\pm 8^{\circ}\text{C}$   
 $+2^{\circ}\text{C}$

IVD

CE



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

Tel.: +49 6251 70190-0

Fax: + 49 6251 70190-363

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

## **Sicherheitshinweise**

Dieses Zubehör ist ausschließlich nach der beigefügten Arbeitsanleitung zu nutzen. Wichtige Sicherheitshinweise zu diesem Produkt sind dem Kapitel 6 zu entnehmen.

# Inhalt

<b>1. ZWECKBESTIMMUNG</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>5</b>
<b>7. LAGERUNG UND VORBEREITUNG DER REAGENZIEN</b>	<b>5</b>
7.1 Wasser	5
7.2 Herstellung des sterilen Assay-Mediums	6
7.3 Herstellung der Kontrollen	6
7.4 Herstellung der Standardkurve	6
7.5 Mikrotiterplatte (PLATE)	7
<b>8. PROBENLAGERUNG UND -VORBEREITUNG</b>	<b>7</b>
8.1 Probenverdünnung	8
<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>10</b>
<b>12. TESTCHARAKTERISTIKA</b>	<b>10</b>
12.1 Präzision und Reproduzierbarkeit	10
12.2 Wiederfindung	10
12.3 Linearität	12
<b>13. ALLGEMEINE HINWEISE ZUM TEST</b>	<b>12</b>
<b>14. LITERATUR</b>	<b>13</b>
<b>15. SYMBOLE</b>	<b>14</b>

## 1. ZWECKBESTIMMUNG

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. 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 **46-50 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 KIF005.2	DIL	Wasser	4 x 30 ml	7 x 30 ml
	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
- 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
- 0,2 µm-Polyethersulfon (PES)-Sterilfilter und Einwegspritze (10 ml)
- 15 ml-Zentrifugenröhrchen (z. B. Falcons)
- Biozentrifuge (10 000 g)
- Vortex-Mixer

## 6. HINWEISE UND VORSICHTSMASSNAHMEN

- Es handelt sich um einen mikrobiologischen Test. 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.
- 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 3x (KIF005.2) bzw. 4x (KIF005) je nach Probenaufkommen bis zum angegebenen Haltbarkeitsdatum verwendet werden.

### 7.1 Wasser

- Wasser (**DIL**) für Medium (**ASYMED**), Standard (**STD**), Kontrollen (**CTRL1**, **CTRL2**) und Verdünnungen.

## 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 werfen.
- Zum Assay-Medium (**ASYMED**) 10 ml Wasser (**DIL**) zugeben, das Fläschchen gut verschließen und gut vortexen. Die Menge ist ausreichend für 6 Mikrotiterstreifen.
- Medium mit Einwegspritze (10 ml) und dem 0,2-µm-PES-Filter in ein 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 **125 µl** 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 Wasser (**DIL**) (x = siehe Quality Control Protocol) 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:



Folsäure [µg/l]	Wasser (DIL) [µl]	+	Standard- konzentrat [µl]	=	Gesamt- volumen [µl]
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

### 7.5 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 8 Stunden. 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 nicht verwenden, da sie das Testergebnis beeinflussen. Lipämische Proben vor dem Einsatz im Test bei 13 000 g für 10 min zentrifugieren, um ein möglichst fettfreies Serum zu erhalten.

### 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 jede Kavität geben.
- Je 150 µl der hergestellten Standardverdünnungen (Blank, Standard 1–5), vorbereiteten Proben und Kontrollen in die jeweiligen Kavitäten pipettieren. Pipettenspitzen jeweils mit der Standard-, Proben- bzw. Kontroll-Lösung vor-spülen.
- 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 **46–50 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 **46–50 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*

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

Nur Serum kann 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 [ $\mu\text{g/l}$ ]	Spike [ $\mu\text{g/l}$ ]	Folsäure erwartet [ $\mu\text{g/l}$ ]	Folsäure gemessen [ $\mu\text{g/l}$ ]	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 [ $\mu\text{g/l}$ ]	Spike [ $\mu\text{g/l}$ ]	Folsäure erwartet [ $\mu\text{g/l}$ ]	Folsäure gemessen [ $\mu\text{g/l}$ ]	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 [ $\mu\text{g/l}$ ]	Spike [ $\mu\text{g/l}$ ]	Folsäure erwartet [ $\mu\text{g/l}$ ]	Folsäure gemessen [ $\mu\text{g/l}$ ]	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. 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.

## 14. LITERATUR

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.

## 15. SYMBOLE

	Temperaturbegrenzung		Bestellnummer
	<i>In-Vitro</i> -Diagnostikum		Zu verwenden mit
	Hersteller		Inhalt ausreichend für <n> Prüfungen
	Chargenbezeichnung		Verwendbar bis
	Enthält Plasmoderivate oder menschliches Blut		Gebrauchsanweisung beachten
	Spezifikationsdatenblatt beachten		Nicht wiederverwenden
	eindeutige Produktidentifizierung		Enthält Material tierischen Ursprungs
	medizinische Substanz		Enthält Material humanen Ursprungs



**Manual**  
**For professional use only**

# **ID-Vit<sup>®</sup> folic acid**

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

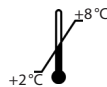
Valid from 2024-05-07

**REF** **KIF005**

**REF** **KIF005.2**

$\Sigma$  96

$\Sigma$  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](mailto:info@immundiagnostik.com) [www.immundiagnostik.com](http://www.immundiagnostik.com)

## **Safety information**

These accessories are to be used exclusively in accordance with the enclosed instructions for use. Important safety information for this product can be found in chapter 6.

# Table of Contents

<b>1. INTENDED PURPOSE</b>	<b>18</b>
<b>2. INTRODUCTION</b>	<b>18</b>
<b>3. PRINCIPLE OF THE TEST</b>	<b>19</b>
<b>4. MATERIAL SUPPLIED</b>	<b>20</b>
<b>5. MATERIAL REQUIRED BUT NOT SUPPLIED</b>	<b>20</b>
<b>6. PRECAUTIONS</b>	<b>21</b>
<b>7. STORAGE AND PREPARATION OF REAGENTS</b>	<b>21</b>
7.1 Water	21
7.2 Preparation of the sterile assay medium	21
7.3 Preparation of the controls	22
7.4 Preparation of the standard curve	22
7.5 Microtiter plate (PLATE)	23
<b>8. SAMPLE STORAGE AND PREPARATION</b>	<b>23</b>
8.1 Sample dilution	23
<b>9. ASSAY PROCEDURE</b>	<b>23</b>
9.1 Test preparations	23
9.2 Test procedure	24
9.3 Measurement	24
<b>10. EVALUATION OF RESULTS</b>	<b>24</b>
10.1 Calculation	25
10.2 Quality control	25
<b>11. LIMITATIONS</b>	<b>25</b>
<b>12. PERFORMANCE CHARACTERISTICS</b>	<b>25</b>
12.1 Precision and reproducibility	26
12.2 Recovery	26
12.3 Linearity	27
<b>13. GENERAL NOTES ON THE TEST AND TEST PROCEDURE</b>	<b>28</b>
<b>14. REFERENCES</b>	<b>28</b>
<b>15. SYMBOLS</b>	<b>29</b>

## 1. INTENDED PURPOSE

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. 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 abusos

## **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 **46-50 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 KIF005.2	DIL	Water	4 x 30 ml	7 x 30 ml
	PLATE	<i>Lactobacillus rhamnosus</i> -precoated microtiter plate	1 x	2 x
	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
- ELISA reader 610–630 nm (540–550 nm)
- Calibrated precision pipettors and sterile single use 20–1 000 µl tips
- 5 ml and 10 ml pipets
- 1.5–2 ml reaction vials
- 0.2 µm sterile polyethersulfone (PES) filter with a disposable syringe (10 ml)
- 15 ml centrifuge tubes (e.g. Falcon tubes)
- Biocentrifuge (10 000 g)
- Vortex

## 6. PRECAUTIONS

- The test is based on a microbiological method. Contaminations lead to erroneous results.
- Water quality is extremely important for the test. Use only the water delivered with the test kit (**DIL**).
- 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.
- As a precaution, it is recommended that the human material used is always considered potentially infectious.
- Used microtiter stripes 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 (KIF005.2) or 4 x (KIF005) within the expiry date stated on the label.

### 7.1 Water

- Water (**DIL**) for medium (**ASYMED**), standard (**STD**), controls (**CTRL1**, **CTRL2**) and dilutions.

### 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 vortex well. This amount is sufficient for 6 microtiter stripes.
- Filter the medium using a disposable syringe (10 ml) and the 0.2 µm PES filter into a 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 **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.

### 7.4 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 water (**DIL**) (x = see quality control protocol) 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:

Folic acid [µg/l]	Water (DIL) [µl]	+	Standard concentrate [µl]	=	Total volume [µl]
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



### 7.5 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 8 hours in the dark. For longer storage, samples can be frozen and kept at -20 °C for up to 5 months.
- Centrifuge samples prior to measurement (at least 5 min at 10 000 *g*). Use the resulting supernatant in the test.
- Do not use hemolytic samples for analysis as they may give erroneous results. Centrifuge lipemic samples 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 10 µl sample/control, add 740 µl 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 components 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 each cavity.
- Add 150 µl of the prepared standard dilutions (blank, standard 1–5), 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 **46-50 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 an ELISA reader at E 610–630 nm (alternatively at E 540–550 nm).

### Please note

- After 46-50 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

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

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 (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. 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 made within 14 days after reception of the product. The product should be sent to Immundiagnostik AG along with a written complaint.
- Analyse controls with each run.
- Always perform assay according to the enclosed manual.
- Serious incidents are to be reported to Immundiagnostik AG and the national regulatory authorities.

### 14. 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.

## 15. SYMBOLS

	Temperature limitation		Catalogue number
	<i>In Vitro</i> Diagnostic Medical Device		To be used with
	Manufacturer		Content 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](mailto:info@immundiagnostik.com)

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

