

Arbeitsanleitung / Manual

Nur für den Gebrauch durch Fachpersonal /
For professional use only

ID-Vit[®] Folsäure aus Vollblut

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

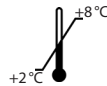
ID-Vit[®] Folic acid in whole blood

*Microbiological test kit for the determination of folic acid
in whole blood 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 KIF005VB

Σ 96



IVD

CE

REF KIF005VB.2

Σ 2 x 96



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

Tel.: +49 6251 70190-0

Fax: + 49 6251 70190-363

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

Sicherheitshinweise

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

Inhalt

1. ZWECKBESTIMMUNG	2
2. EINLEITUNG	2
3. TESTPRINZIP	3
4. INHALT DER TESTPACKUNG	4
5. ERFORDERLICHE LABORGERÄTE UND HILFSMITTEL	5
6. HINWEISE UND VORSICHTSMASSNAHMEN	5
7. LAGERUNG UND VORBEREITUNG DER REAGENZIEN	6
7.1 Wasser	6
7.2 Herstellung des sterilen Assay-Mediums	6
7.3 Herstellung des Lyse-Reagenz	6
7.4 Herstellung der Kontrollen	7
7.5 Herstellung der Standardkurve	7
7.6 Mikrotiterplatte (PLATE)	8
8. PROBENLAGERUNG UND -VORBEREITUNG	8
8.1 Probenvorbehandlung	8
8.2 Probenverdünnung	8
9. TESTDURCHFÜHRUNG	9
9.1 Testvorbereitungen	9
9.2 Testansatz	9
9.3 Messung	9
10. AUSWERTUNG DER ERGEBNISSE	10
10.1 Berechnung	10
10.2 Qualitätskontrolle	10
11. EINSCHRÄNKUNGEN	10
12. TESTCHARAKTERISTIKA	11
12.1 Präzision und Reproduzierbarkeit	11
12.2 Wiederfindung	11
12.3 Linearität	13
13. ALLGEMEINE HINWEISE ZUM TEST	14
14. LITERATUR	15
15. SYMBOLE	15

1. ZWECKBESTIMMUNG

Der ID-Vit® Folsäure-Mikrotiterplattentest ist ein mikrobiologisches Verfahren zur Bestimmung des Gesamtgehaltes an Folsäure aus Vollblut. Alle benötigten Reagenzien, wie auch 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 (Vitamin B₉) gehört in die Gruppe des Vitamin B-Komplexes; sie ist wasserlöslich, empfindlich gegenüber Licht, Sauerstoff, erhöhten Temperaturen und ist wesentlich an allen Wachstums- und Entwicklungsprozessen des Körpers beteiligt. Folsäure ist notwendig 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 Entwicklung des Fötus). Obwohl die Folsäure in den meisten pflanzlichen und tierischen Lebensmitteln enthalten ist, stellt eine Unterversorgung von Folsäure den häufigsten Vitaminmangel in Europa und Nordamerika dar. Nach Angaben der Deutschen Gesellschaft für Ernährung nimmt nur jeder 4. Deutsche genügend Folsäure auf – oft die Folge einer einseitigen Ernährungsweise, mit wenig frischem Obst und Gemüse. Aber auch das Alter, verschiedene Krankheiten und die Einnahme bestimmter Medikamente, wie z.B. Cotrimoxazol, können zu Resorptionsstörungen und einer damit verbundenen Mangelversorgung führen.

Erniedrigte Folsäurespiegel kommen zustande durch:

- ein vermindertes Angebot (z.B. durch Folsäure-Antagonisten),
- eine gestörte Resorption (z.B. bei Zöliakie, CED, höheres Alter),
- einen vermehrten Bedarf (z.B. erhöhtem Alkoholkonsum, bei Einnahme von empfängnisverhütenden Mitteln, in der Schwangerschaft, bei Anämien oder Krebserkrankungen).

Mangelsymptome

Erste Mangelsymptome sind Müdigkeit, Reizbarkeit, Depression, Konzentrationschwäche 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-B₁₂-Mangel eine megaloblastäre Anämie bedingen können, ist die Bestimmung beider Vitamine bei diesem Krankheitsbild besonders wichtig, um das richtige Vitamin zu supplementieren. Die Behandlung einer durch Vitamin-B₁₂-Mangel verursachten megaloblastären Anämie alleinig 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 Supplementierung der Folsäure 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 EDTA-Vollblut wird mit einem Puffergemisch vorbehandelt und verdünnt in die Kavitäten einer Mikrotiterplatte gegeben, die mit *Lactobacillus rhamnosus* vorbeschichtet sind. Nach Zugabe von Folsäure als Standard oder als in einer Probe 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 an Folsäure ist dabei direkt proportional zur Trübung.

4. INHALT DER TESTPACKUNG

Art.-Nr.	Bezeichnung	Kit-Komponenten	Menge	
			KIF005VB	KIF005VB.2
KIF005VB/ KIF005VB.2	DIL	Wasser	4 x 30 ml	7 x 30 ml
	PLATE	Mikrotiterplatte, beschichtet mit <i>Lactobacillus rhamnosus</i>	1 x	2 x
	SOL	Probenbehandlungs- puffer, gebrauchsfertig	5 x 4,6 ml	10 x 4,6 ml
	PAF	Folsäure-Puffer, lyophilisiert	5 x	10 x
	ASYMED	Folsäure-Assay-Medium, gebrauchsfertig	4 x	4 x
	ASYBUF	Folsäure-Medium- Behandlungspuffer, gebrauchsfertig	4 x 1,5 ml	4 x 1,5 ml
	STD	Folsäure-Standard, lyophilisiert	4 x	3 x
	FOL	Ablebefolie	1 x ganze 3 x halbe	3 x ganze
	CTRL1	Folsäure-Kontrolle 1, lyophilisiert	4 x	3 x
	CTRL2	Folsäure-Kontrolle 2, lyophilisiert	4 x	3 x
	FRA	Ersatzrahmen zum Umstecken der Mikrotiterstreifen	1 x	1 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 (KIF005VB.2) bzw. 4x (KIF005VB) je nach Probenaufkommen bis zum angegebenen Haltbarkeitsdatum verwendet werden.

7.1 Wasser

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

7.2 Herstellung des sterilen Assay-Mediums

- Das sterile Assay-Medium muss vor jedem Test frisch hergestellt werden.
- Trockenmittelbeutel aus dem Fläschchen mit einer Pinzette abschütteln, herausnehmen und verwerfen.
- Zum Assay-Medium (**ASYMED**) 10 ml Wasser (**DIL**) zugeben, das Fläschchen gut verschließen und 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 des Lyse-Reagenz

- 4,5 ml Probenvorbereitungspuffer (**SOL**) in Fläschchen mit lyophilisiertem Puffer (**PAF**) überführen und mittels Vortex-Mixer homogenisieren.
- Das Lyse-Reagenz kann nicht aufbewahrt werden

7.4 Herstellung der Kontrollen

- Die lyophilisierten Kontrollen (**CTRL1**, **CTRL2**) sind mit je 125 µl Lyse-Reagenz zu resuspendieren (entspricht einer 1:10 Verdünnung der Kontrollen) 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.

7.5 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

7.6 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 Vollblut 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.

8.1 Probenvorbehandlung

25 µl EDTA-Vollblut mit 225 µl von dem vorbereiteten Lyse-Reagenz versetzen (Verhältnis 1:10), mischen. Die Kontrollen in ein 1,5 ml Reaktionsgefäß überführen. Anschließend Proben und Kontrollen bei 37 °C für 30 Minuten inkubieren, bei 2–8 °C für 10 min kühlstellen und anschließend 10 min zentrifugieren (10 000 g).

8.2 Probenverdünnung

Vom Überstand des vorbehandelten EDTA-Vollbluts 10 µl entnehmen und 740 µl Wasser [DIL] zugeben und mischen. Die Probenvorbehandlung und – verdünnung entsprechen insgesamt einer **1:750 Verdünnung** (= Probenverdünnungsfaktor).

Vom Überstand der vorbehandelten Kontrollen 10 µl entnehmen und 740 µl Wasser [DIL] zugeben und mischen. Die Probenvorbehandlung und – verdünnung entsprechen insgesamt einer **1:750 Verdünnung** (= Probenverdünnungsfaktor).

9. TESTDURCHFÜHRUNG

9.1 Testvorbereitungen

Nehmen Sie nur die Reagenzien und Materialien heraus, die Sie für die Durchführung des Tests benötigen, und stellen Sie den Rest des Testkits 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 Standardverdünnungen (Blank, Standard 1–5), 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 **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 (750)

Referenzbereich für Humanvollblut

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

Folsäure: 79,5–231,4 $\mu\text{g/l}$

Anmerkung

Bei einem Probenverdünnungsfaktor von 750 ist ein Bereich von 30–270 $\mu\text{g/l}$ 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.

Immundiagnostik AG empfiehlt den Einsatz von externen Kontrollen für die interne Qualitätskontrolle, wenn möglich.

Wir empfehlen, bei jedem Testansatz Kontrollen mitzumessen. Die Ergebnisse der Kontrollen müssen auf Richtigkeit überprüft werden. Liegen eine oder mehrere Kontrollen oder der höchste Standard außerhalb des angegebenen Bereiches, kann Immundiagnostik AG die Richtigkeit der Messergebnisse nicht gewährleisten.

11. EINSCHRÄNKUNGEN

Nur EDTA-Vollblut kann im Test eingesetzt werden.

12. TESTCHARAKTERISTIKA

Die nachfolgenden Testcharakteristika wurden mit EDTA-Vollblut erhoben.

12.1 Präzision und Reproduzierbarkeit

Intra-Assay (n = 22)

Probe	Folsäure [$\mu\text{g/l}$]	VK [%]
1	70,24	7,2
2	146,03	8,5
3	239,31	5,6

Inter-Assay (n = 33)

Probe	Folsäure [$\mu\text{g/l}$]	VK [%]
1	84,53	7,6
2	149,08	7,7
3	227,9	8,2

12.2 Wiederfindung

Für die Bestimmung der Wiederfindung wurden Proben von 4 EDTA-Vollblut Proben in unterschiedlicher Konzentration mit Folsäure-Konzentrationen dotiert und gemessen. Das Ergebnis ergibt sich durch das Verhältnis zwischen dem Messergebnis und der wahren Konzentration einer Probe.

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	92,2	40,8	132,98	129,86	98
		76,8	168,98	186,44	110
		100,3	192,48	216,34	112
Wiederfindungsrate gesamt [%]					107

Probe (n=8)	Mittelwert Originalprobe [µg/l]	Spike [µg/l]	Folsäure erwartet [µg/l]	Folsäure gemessen [µg/l]	Wiederfindungsrate [%]
B	107,1	40,8	147,89	167,37	113
		76,8	183,89	195,19	106
		100,3	207,39	243,72	118
Wiederfindungsrate gesamt [%]					112

Probe (n=8)	Mittelwert Originalprobe [µg/l]	Spike [µg/l]	Folsäure erwartet [µg/l]	Folsäure gemessen [µg/l]	Wiederfindungsrate [%]
C	108,4	40,8	149,21	135,01	90
		76,8	185,21	168,53	91
		100,3	208,71	215,19	103
Wiederfindungsrate gesamt [%]					95

Probe (n=8)	Mittelwert Originalprobe [µg/l]	Spike [µg/l]	Folsäure erwartet [µg/l]	Folsäure gemessen [µg/l]	Wiederfindungsrate [%]
D	115,6	40,8	156,38	170,08	109
		76,8	192,38	211,48	110
		100,3	215,88	215,58	100
Wiederfindungsrate gesamt [%]					106

12.3 Linearität

Die EDTA-Vollblutproben von vier Patienten wurden von zwei Anwendern seriell verdünnt und analysiert. Die Ergebnisse sind nachfolgend dargestellt.

Probe	Verdünnung		Folsäure erwartet [µg/l]	Folsäure gemessen [µg/l]	Wiederfin- dungsrate [%]
A	1:425	1	316,7	303,2	96
	1:500		271,7	259,5	95
	1:750		194,1	194,1	100
	1:1 000		145,6	153,8	106
	1:1 250		116,5	113,2	97
B	1:425	2	257,1	266,6	104
	1:500		218,6	226,5	104
	1:750		145,7	145,7	100
	1:1 000		109,3	117,8	108
	1:1 250		87,4	94,1	108
C	1:425	1	279,9	275,4	98
	1:500		237,9	219,4	92
	1:750		158,6	158,6	100
	1:1 000		119,0	120,3	101
	1:1 250		95,2	96,9	102
D	1:425	2	265,8	267,6	101
	1:500		225,9	227,9	101
	1:750		150,6	150,6	100
	1:1 000		113,0	118,1	105
	1:1 250		90,4	95,5	106

















13. ALLGEMEINE HINWEISE ZUM TEST

- Dieser Kit wurde nach der IVD Richtlinie 98/79/EG hergestellt und in den Verkehr gebracht.
- Alle im Kit enthaltene Reagenzien dürfen ausschließlich zur *in-vitro*-Diagnostik eingesetzt werden.
- *ID-Vit®* ist eine Marke der Immundiagnostik AG.
- Reagenzien nach Ablauf des Verfallsdatums nicht mehr verwenden (Verfallsdatum siehe Testpackung).
- Einzelkomponenten mit unterschiedlichen Lot-Nummern aus verschiedenen Testpackungen nicht mischen oder austauschen.
- Für die Qualitätskontrolle sind die dafür erstellten Richtlinien für medizinische Laboratorien zu beachten.
- Die Testcharakteristika wie Inkubationszeiten, Inkubationstemperaturen und Pipettierolumina der verschiedenen Komponenten wurden vom Hersteller festgelegt. Nicht mit dem Hersteller abgesprochene Veränderungen in der Testdurchführung können die Resultate beeinflussen. Die Firma Immundiagnostik AG übernimmt für die hierdurch entstandenen Schäden und Folgeschäden keine Haftung.
- Bei Gewährleistungsansprüchen ist das beanstandete Material mit schriftlicher Erklärung innerhalb von 14 Tagen zum Hersteller, der Immundiagnostik AG, zurückzusenden.
- Qualitätskontrollen immer mitmessen.
- Die Bestimmung ist immer nach der dem Kit beigefügten Arbeitsanleitung durchzuführen.
- Schwerwiegende Vorfälle sind der Immundiagnostik AG und den nationalen Aufsichtsbehörden zu melden.

14. LITERATUR

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
	In-Vitro-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[®] Folic acid in whole blood

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

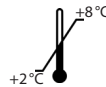
Valid from 2024-05-07

REF KIF005VB

REF KIF005VB.2

Σ 96

Σ 2 x 96



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

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

1. INTENDED PURPOSE	19
2. INTRODUCTION	19
3. PRINCIPLE OF THE TEST	20
4. MATERIAL SUPPLIED	21
5. MATERIAL REQUIRED BUT NOT SUPPLIED	22
6. PRECAUTIONS	22
7. STORAGE AND PREPARATION OF REAGENTS	22
7.1 Water	23
7.2 Preparation of the sterile assay medium	23
7.3 Preparation of the lysis-reagent	23
7.4 Preparation of the controls	23
7.5 Preparation of the standard curve	24
7.6 Microtiter plate (PLATE)	24
8. SAMPLE STORAGE AND PREPARATION	24
8.1 Sample pretreatment	25
9. ASSAY PROCEDURE	25
9.1 Test preparations	25
9.2 Test procedure	25
9.3 Measurement	26
10. EVALUATION OF RESULTS	26
10.1 Calculation	26
10.2 Quality control	27
11. LIMITATIONS	27
12. PERFORMANCE CHARACTERISTICS	27
12.1 Precision and reproducibility	27
12.2 Recovery	27
12.3 Linearity	29
13. GENERAL NOTES ON THE TEST	30
14. REFERENCES	31
15. SYMBOLS	31

1. INTENDED PURPOSE

ID-Vit® Folic acid is a microtiter plate test kit based on a microbiological method for determining the total content of folic acid from whole blood. All required reagents, as well as the standard are included in the test. An ELISA reader is required for the evaluation. For use in human and veterinary medicine and in research. For *in vitro* diagnostic use only.

2. INTRODUCTION

Folic acid (vitamin B₉) belongs to the group of the vitamin B complex; it is water-soluble, sensitive to light, oxygen, increased temperatures and is essentially involved in all growth and development processes of the body. Folic acid is necessary for the formation of red blood cells, for optimal bone marrow function and healthy nerve activity. Folic acid is also essential for all cell divisions (hence its importance in foetal development).

Although folic acid is found in most plant and animal foods an undersupply of folic acid is the most common vitamin deficiency in Europe and North America. According to the German Nutrition Society only one in four Germans consumes enough folic acid - often the result of an unbalanced diet with little fresh fruit and vegetables. But age, various diseases and the intake of certain medicines such as cotrimoxazole can also lead to absorption disorders and an associated deficiency. Lowered folic acid levels occur because of:

- a decreased supply (e.g. folic acid antagonists).
- a disrupted resorption (e.g. in celiac disease. CED).
- an increased requirement (e.g. increased alcohol consumption. when taking contraceptives. during pregnancy. anaemia or cancer).

Symptoms of Deficiency

The early symptoms of deficiency are fatigue, irritability, depression, poor concentration and loss of appetite; other consequences are inflammation of the mucous membranes, anaemia and severe neurological damage. During pregnancy, when the need for folic acid doubles, a deficiency can lead to premature birth and severe malformations. Optimal folic acid supply during pregnancy can reduce the risk of neural tube defects in the foetus by 85%. Since both a folic acid deficiency and a vitamin B₁₂ deficiency can cause megaloblastic anaemia, the determination of both vitamins is particularly important in this clinical picture in order to supplement the right vitamin. Treatment of megaloblastic anaemia caused by vitamin B₁₂ deficiency with folic acid alone can lead to irreversible damage to the central nervous system.

Folic acid and arteriosclerosis

A folic acid deficiency is known to be the most common cause of hyperhomocysteinaemia. 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. Apart from 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) pregnancy / planned pregnancy
- Enhanced erythropoiesis
- Chronic liver diseases
- Hemoblastosis
- Psoriasis, dermatitis
- Stomatitis, glossitis
- Chronic alcohol abus

3. PRINCIPLE OF THE TEST

The EDTA whole blood samples are pre-treated and diluted with a buffer mixture and then transferred into the wells of a microtiter plate precoated 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	
			KIF005VB	KIF005VB.2
KIF005VB/ KIF005VB.2	DIL	Water	4 x 30 ml	7 x 30 ml
	PLATE	microtiter plate, precoated with <i>Lactobacillus rhamnosus</i>	1 x	2 x
	SOL	Sample treatment solution, ready-to-use	5 x 4.6 ml	10 x 4.6 ml
	PAF	Folic acid buffer, lyophilized	5 x	10 x
	ASYMED	Folic acid assay medium, ready-to-use	4 x	4 x
	ASYBUF	Folic acid medium treat- ment buffer, ready-to-use	4 x 1.5 ml	4 x 1.5 ml
	STD	Folic acid standard, lyophilized	4 x	3 x
	FOL	Adhesive cover foil	1 x whole 3 x half	3 x whole
	CTRL1	Folic acid control 1, lyophilized	4 x	3 x
	CTRL2	Folic acid control 2, lyophilized	4 x	3 x
	FRA	Replacement holder for microtiter strips	1 x	1 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 3x (KIF005VB.2) or 4x (KIF005VB) within the expiry date stated on the label.

7.1 Water

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

7.2 Preparation of the sterile assay medium

- Fresh sterile assay medium has to be prepared each time before performing a test.
- Remove the desiccant bag from the lyophilised assay medium bottle by taking the bag with a forceps and shaking it whilst still inside the bottle. Then remove the clean desiccant bag and discard it.
- Add 10 ml water (**DIL**) to the assay medium bottle (**ASYMED**), close the bottle firmly and 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 lysis-reagent

- Transfer 4.5 ml sample preparation buffer (**SOL**) into vials containing lyophilised buffer (**PAF**), then homogenise using a vortex.
- The lysis-reagent cannot be stored.

7.4 Preparation of the controls

- The lyophilised controls (**CTRL1**, **CTRL2**) have to be resuspended each with **125 µl** lysis-reagent (corresponds to a 1:10 dilution), then homogenise using a vortex.
- After reconstitution, the controls are treated like samples.
- The concentration of the controls changes from batch to batch and can be found in the product specification.

7.5 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

7.6 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 EDTA whole blood 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.

8.1 Sample pretreatment

Add 25 µl of EDTA whole blood sample to 225 µl of the prepared lysis-reagent (ratio 1:10). Transfer the controls into a 1.5 ml reaction tube. Incubate samples and controls at 37°C for 30 min. Cool at 2–8°C for 10 min and then centrifuge (10 000 g) for 10 min.

8.2 Sample dilution

Take 10 µl from the supernatant of the pre-treated EDTA whole blood and add 740 µl water [DIL] and mix. The sample pretreatment and dilution corresponds in total to a **1:750 dilution** (= sample dilution factor).

Take 10 µl of the supernatant of the pre-treated **controls** and add 740 µl water [DIL] and mix. The sample pre-treatment and dilution corresponds in total to a **1:750 dilution** (= sample dilution factor).

9. ASSAY PROCEDURE

9.1 Test preparations

Take as many microtiter strips as needed from the kit. Return unused strips and any unused test kit 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 (750).

Reference value for EDTA whole blood sample

Based on internal studies of EDTA whole blood samples of apparently healthy persons (n = 74) the following values were estimated.

Folic acid: 79.5–231.4 $\mu\text{g/l}$

Please note

With a sample dilution factor of 750 a range from 30–270 $\mu\text{g/l}$ folic acid is covered.

We recommend each laboratory to establish its own reference range as reference ranges are strongly dependent on the selection of the patient collective. The reference range for folic acid is given for guidance only and may differ 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 EDTA whole blood can be used for the test.

12. PERFORMANCE CHARACTERISTICS

The following performance characteristics have been collected using human EDTA whole blood samples.

12.1 Precision and reproducibility

Intraassay (n = 22)

Sample	Folic acid [$\mu\text{g/l}$]	CV [%]
1	70.24	7.2
2	146.03	8.5
3	239.31	5.6

Interassay (n = 33)

Sample	Folic acid [$\mu\text{g/l}$]	CV [%]
1	84.53	7.6
2	149.08	7.7
3	227.9	8.2

12.2 Recovery

For the determination of recovery 4 EDTA whole blood samples were spiked with folic acid in different concentrations and measured. The result is obtained by the ratio between the measurement result and the true concentration of a sample.

Sample (n=9)	Mean value original sample [µg/l]	Spike [µg/l]	Folic acid expected [µg/l]	Folic acid measured [µg/l]	Recovery Rate [%]
A	99.2	40.8	132.98	129.86	98
		76.8	168.98	186.44	110
		100.3	192.48	216.34	112
Recovery rate in total [%]					107

Sample (n=8)	Mean value original sample [µg/l]	Spike [µg/l]	Folic acid expected [µg/l]	Folic acid measured [µg/l]	Recovery Rate [%]
B	107.1	40.8	147.89	167.37	113
		76.8	183.89	195.19	106
		100.3	207.39	243.72	118
Recovery rate in total [%]					112

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	108.4	40.8	149.21	135.01	90
		76.8	185.21	168.53	91
		100.3	208.71	215.19	103
Recovery rate in total [%]					95

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	115.6	40.8	156.38	170.08	109
		76.8	192.38	211.48	110
		100.3	215.88	215.58	100
Recovery rate in total [%]					106

12.3 Linearity

EDTA whole blood samples from four patients were serially diluted and analysed by two operators. The results are shown below.

Sample	Dilution		Folic acid expected [µg/l]	Folic acid measured [µg/l]	Recovery Rate [%]
A	1:425	1	316.7	303.2	96
	1:500		271.7	259.5	95
	1:750		194.1	194.1	100
	1:1 000		145.6	153.8	106
	1:1 250		116.5	113.2	97
B	1:425	2	257.1	266.6	104
	1:500		218.6	226.5	104
	1:750		145.7	145.7	100
	1:1 000		109.3	117.8	108
	1:1 250		87.4	94.1	108
C	1:425	1	279.9	275.4	98
	1:500		237.9	219.4	92
	1:750		158.6	158.6	100
	1:1 000		119.0	120.3	101
	1:1 250		95.2	96.9	102

Sample	Dilution		Folic acid expected [µg/l]	Folic acid measured [µg/l]	Recovery Rate [%]
D	1:425	2	265.8	267.6	101
	1:500		225.9	227.9	101
	1:750		150.6	150.6	100
	1:1 000		113.0	118.1	105
	1:1 250		90.4	95.5	106

















13. 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.
- 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

www.immundiagnostik.com

