

Arbeitsanleitung / Manual

**Nur für den Gebrauch durch Fachpersonal /
For professional use only**

ID-Vit[®] Biotin

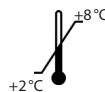
***Mikrobiologisches Verfahren zur Bestimmung des Gesamtgehalts von freiem Biotin in Serum mittels einer Lactobacillus plantarum-beschichteten Mikrotiterplatte
Zur Verwendung in Human- und Veterinärmedizin und
zu Forschungszwecken***

***Microbiological test kit for the determination of total free biotin in serum using a Lactobacillus plantarum coated microtiter plate
For use in human and veterinary medicine and in research***

Gültig ab / Valid from 2024-05-07

REF KIF007

Σ 96



IVD



REF KIF007.2

Σ 2x 96



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

Tel.: +49 6251 70190-0

Fax: + 49 6251 70190-363

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

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

1. ZWECKBESTIMMUNG

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

Biotin (Vitamin H) findet sich weit verbreitet in Bakterien, Pilzen, höheren Pflanzen und tierischen Geweben. In Nahrungsmitteln tritt der Großteil des Biotins kovalent an Protein gebunden auf, während nur ein geringer Teil in freier Form zur Verfügung steht. Während des Verdauungsvorgangs wird das Biocytin (Biotinyl-Lysin) aus den Proteinen freigesetzt, das ähnlich dem Biotin leicht aus dem Intestinaltrakt resorbiert werden kann. Biotin wird anschließend im Plasma und in den Erythrozyten durch das Einwirken des Enzyms Biozytinase aus dem Biozytin freigesetzt und steht danach als prosthetische Gruppe für eine Reihe von biotinabhängigen Enzymen zur Verfügung. Der tägliche Bedarf an Biotin ist schwer abzuschätzen, da eine gesunde Darmflora durch endogene Synthese wesentlich zur Deckung des Biotinbedarfs beiträgt. Nach neuesten Erkenntnissen wird für Erwachsene eine tägliche Zufuhr von 100–200 µg empfohlen. Bei chronischen Hämodialysepatienten zeigt eine Supplementierung im Milligrammbereich eine deutliche Verbesserung der neuropathologischen Lage und des Glukosestoffwechsels.

Biotin-Mangel

Biotin-Mangelercheinungen werden z. B. durch eine Zerstörung der Darmflora oder durch extreme Ernährungsgewohnheiten (z.B. häufiger Verzehr von rohen Eiern) verursacht. Folgen des Biotinmangels können sein: Dermatitis, Haarausfall, Anorexie, muskuläre Hypotonie, Depressionen und Störungen der Fortpflanzung.

Indikationen zum Nachweis eines Biotinmangels

- Enzymstörungen (z. B. genetisch defekte Biotinidase)
- Kurzdarmsyndrom
- Veränderte Darmflora
- Fehlernährung

3. TESTPRINZIP

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

4. INHALT DER TESTPACKUNG

Art.-Nr.	Bezeichnung	Kit-Komponenten	Menge	
			KIF007	KIF007.2
KIF007/ KIF007.2	DIL	Wasser	4 x 30 ml	8 x 30 ml
	PLATE	Mikrotiterplatte, beschichtet mit <i>Lactobacillus plantarum</i>	1 x	2 x
	ASYMED	Biotin-Assay-Medium	4 x	4 x
	STD	Biotin-Standard, lyoph.	4 x	3 x
	FOL	Abklebefolie	1 x ganze 3 x halbe	3 x ganze
	FRA	Ersatzrahmen zum Umstecken der Mikrotiterstreifen	1 x	1 x
	CTRL1	Biotin-Kontrolle 1, lyoph.	4 x	3 x
	CTRL2	Biotin-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 3 x (KIF007.2) bzw. 4 x (KIF007) 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 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 der Kontrollen

- Die lyophilisierten Kontrollen (**CTRL1**, **CTRL2**) sind mit je **200 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:

Biotin [µg/l]	Wasser (DIL) [µl]	+	Standard- konzentrat [µl]	=	Gesamt- volumen [µl]
Blank: 0	500	+	0	=	500
Standard 1: 0,02	450	+	50	=	500
Standard 2: 0,06	350	+	150	=	500
Standard 3: 0,10	250	+	250	=	500
Standard 4: 0,14	150	+	350	=	500
Standard 5: 0,18	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 3 Tage. 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

Von den Serumproben/den Kontrollen 50 µl abnehmen, 950 µl Wasser (**DIL**) zugeben und mischen. Die Probenverdünnung entspricht einer 1:20-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

Biotin in µg/l = Wert aus Standardkurve × Probenverdünnungsfaktor (20)

Referenzbereich für Humanserum

Anhand einer laborinternen Studie mit Serumproben von augenscheinlich Gesunden (n = 84) wurden die folgenden Biotinwerte ermittelt.

< 750 ng/l	behandlungsbedürftiger Biotinmangel
750–1 250 ng/l	suboptimale Biotinversorgung
> 1 250 ng/l	ausreichende Biotinversorgung

Anmerkung

Bei einem Probenverdünnungsfaktor von 20 ist ein Bereich von 0,4–3,6 µg/l Biotin 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 Biotin 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 AG 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 = 5)

	Biotin [$\mu\text{g/l}$]	VK [%]
Probe	63,5	3,4

Inter-Assay (n = 5)

	Biotin [$\mu\text{g/l}$]	VK [%]
Probe	64,3	2,9

12.2 Wiederfindung

Proben von 4 Patienten wurde unterschiedlich verdünnt (20, 40, 80, 120, 160), mit Biotin gespiked und analysiert. Die Mittelwerte sind im Folgenden dargestellt.

Probe (n=5)	Mittelwert Originalprobe [$\mu\text{g/l}$]	Spike [$\mu\text{g/l}$]	Biotin erwartet [$\mu\text{g/l}$]	Biotin gemessen [$\mu\text{g/l}$]	Wiederfindungsrate [%]
A	1,1	2	3,1	3,3	110
		4	5,1	5,2	103
		6	7,1	7,3	103
Wiederfindungsrate gesamt [%]					105

Probe (n=5)	Mittelwert der Originalprobe [$\mu\text{g/l}$]	Spike [$\mu\text{g/l}$]	Biotin erwartet [$\mu\text{g/l}$]	Biotin gemessen [$\mu\text{g/l}$]	Wiederfindungsrate [%]
B	1,5	2	3,5	3,2	85
		4	5,5	4,7	80
		6	7,5	7,4	98
Wiederfindungsrate gesamt [%]					88

Probe (n=5)	Mittelwert der Originalprobe [$\mu\text{g/l}$]	Spike [$\mu\text{g/l}$]	Biotin erwartet [$\mu\text{g/l}$]	Biotin gemessen [$\mu\text{g/l}$]	Wiederfindungsrate [%]
C	1,4	2	3,4	3,3	95
		4	5,4	5,6	105
		6	7,4	7,0	93
Wiederfindungsrate gesamt [%]					98

Probe (n=5)	Mittelwert der Originalprobe [$\mu\text{g/l}$]	Spike [$\mu\text{g/l}$]	Biotin erwartet [$\mu\text{g/l}$]	Biotin gemessen [$\mu\text{g/l}$]	Wiederfindungsrate [%]
D	1,3	2	3,3	3,6	115
		4	5,3	5,7	110
		6	7,3	6,9	93
Wiederfindungsrate gesamt [%]					106

12.3 Linearität

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

Probe	Verdünnung	Biotin erwartet [$\mu\text{g/l}$]	Biotin gemessen [$\mu\text{g/l}$]
A	20	3,0	3,1
	40		3,5
	80		3,3
	120		2,9
	160		3,4
B	20	1,3	1,3
	40		1,3
	80		1,6

















13. ALLGEMEINE HINWEISE ZUM TEST

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

14. LITERATUR

Burtis, C.A. & Ashwood, E.R. eds., Tietz Textbook of Clinical Chemistry 3rd ed., Saunders.

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[®] Biotin

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

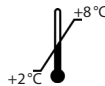
Valid from 2024-05-07

REF KIF007

Σ 96

REF KIF007.2

Σ 2 x 96



IVD



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

Tel.: +49 6251 70190-0

Fax: + 49 6251 70190-363

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

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	17
2. INTRODUCTION	17
3. PRINCIPLE OF THE TEST	18
4. MATERIAL SUPPLIED	18
5. MATERIAL REQUIRED BUT NOT SUPPLIED	18
6. PRECAUTIONS	19
7. STORAGE AND PREPARATION OF REAGENTS	19
7.1 Water	19
7.2 Preparation of the sterile assay medium	20
7.3 Preparation of the of the controls	20
7.4 Preparation of the standard curve	20
7.5 Microtiter plate [PLATE]	21
8. SAMPLE STORAGE AND PREPARATION	21
8.1 Sample dilution	22
9. ASSAY PROCEDURE	22
9.1 Test preparations	22
9.2 Test procedure	22
9.3 Measurement	22
10. EVALUATION OF RESULTS	23
10.1 Calculation	23
10.2 Quality control	23
11. LIMITATIONS	23
12. PERFORMANCE CHARACTERISTICS	24
12.1 Precision and reproducibility	24
12.2 Recovery	24
12.3 Linearity	26
13. GENERAL NOTES ON THE TEST AND TEST PROCEDURE	26
14. REFERENCES	27
15. SYMBOLS	27

1. INTENDED PURPOSE

ID-Vit® Biotin is a microtiter plate test kit based on a microbiological method which measures the Biotin 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

Biotin (vitamin H) is widespread in bacteria, fungi, higher plants and animal tissues. The major part of biotin in food is covalently bound to protein with only a small part being freely available. During digestion, biocytin (biotinyl-lysine) is released from the proteins and can, similarly to biotin, easily be taken up from the intestine. Biotin is then released by the enzyme biocytinase from biocytin in plasma and erythrocytes and is available as prosthetic group for several biotin-dependent enzymes.

The daily biotin requirement is difficult to estimate because a healthy intestinal flora endogenously synthesises biotin and thereby helps to satisfy this need. Recent findings suggest that adults need a daily intake of 100–200 µg biotin. Supplementation on a milligram scale leads to significant improvement regarding neuropathology and glucose metabolism of chronic hemodialysis patients.

Biotin deficiency

Symptoms of biotin deficiency are caused by e.g. damage to the intestinal flora or extreme diets (e.g. frequent consumption of raw eggs). Consequences of biotin deficiency include dermatitis, hair loss, anorexia, muscular hypotonia, depression and sexual dysfunction.

Indications for a determination of biotin

- Defects in enzymes (e.g. genetic deficiency of biotinidase)
- Short gut syndrome
- Altered intestinal flora
- Malnutrition

3. PRINCIPLE OF THE TEST

The serum samples are diluted and then added into the wells of a microtiter plate coated with *Lactobacillus plantarum*. The addition of biotin in either standards or samples gives a biotin-dependent growth response until biotin is consumed. After incubation at 37 °C for 46–50 h, the growth of *Lactobacillus plantarum* is measured turbidimetrically at 610–630 nm (alternatively at 540–550 nm) in an ELISA reader and compared to a standard curve generated from the dilution series. The amount of biotin is directly proportional to the turbidity.

4. MATERIAL SUPPLIED

Cat. No.	Label	Kit components	Quantity	
			KIF007	KIF007.2
KIF007/ KIF007.2	DIL	Water	4 x 30 ml	8 x 30 ml
	PLATE	<i>Lactobacillus plantarum</i> -precoated microtiter plate	1 x	2 x
	ASYMED	Biotin assay medium	4 x	4 x
	STD	Biotin 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
	CTRL1	Biotin control 1, lyoph.	4 x	3 x
	CTRL2	Biotin control 2, lyoph.	4 x	3 x

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 (KIF007.2) or 4 x (KIF007) 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 of the controls

- The lyophilised controls (**CTRL1**, **CTRL2**) have to be resuspended each with **200 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:

Biotin [µg/l]	Water (DIL) [µl]	+	Standard concentrate [µl]	=	Total volume [µl]
Blank: 0	500	+	0	=	500
Standard 1: 0.02	450	+	50	=	500
Standard 2: 0.06	350	+	150	=	500
Standard 3: 0.10	250	+	250	=	500
Standard 4: 0.14	150	+	350	=	500
Standard 5: 0.18	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 3 days in the dark. For longer storage, samples can be frozen and kept at -20 °C for p 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 50 µl from each sample/control, add 950 µl water (**DIL**) and mix. The sample dilution results in a total dilution of 1:20 (= 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

Biotin in µg/l = value from the standard curve × sample dilution factor (20)

Reference value for human serum

Based on studies of serum samples of apparently healthy persons (n = 84), the following biotin values were estimated.

<750 ng/l	biotin deficiency requiring treatment
750–1 250 ng/l	suboptimal biotin status
>1 250 ng/l	sufficient levels of biotin

Please note

A concentration range of 0.4–3.6 µg/l Biotin is covered at a sample dilution of 1:20.

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 = 5)

	Biotin [$\mu\text{g/l}$]	CV [%]
Sample	63.5	3.4

Interassay (n = 5)

	Biotin [$\mu\text{g/l}$]	CV [%]
Sample	64.3	2.9

12.2 Recovery

Samples from 4 patients were spiked with biotin and analysed. The mean values are shown below.

Sample (n=5)	Mean value original sample [$\mu\text{g/l}$]	Spike [$\mu\text{g/l}$]	Biotin expected [$\mu\text{g/l}$]	Biotin measured [$\mu\text{g/l}$]	Recovery Rate [%]
A	1.1	2	3.1	3.3	110
		4	5.1	5.2	103
		6	7.1	7.3	103
Recovery rate in total [%]					105

Sample (n=5)	Mean value measured in original sample [µg/l]	Spike [µg/l]	Biotin expected [µg/l]	Biotin measured [µg/l]	Recovery Rate [%]
B	1.5	2	3.5	3.2	85
		4	5.5	4.7	80
		6	7.5	7.4	98

Recovery rate in total [%]

88

Sample (n=5)	Mean value measured in original sample [µg/l]	Spike [µg/l]	Biotin expected [µg/l]	Biotin measured [µg/l]	Recovery Rate [%]
C	1.4	2	3.4	3.3	95
		4	5.4	5.6	105
		6	7.4	7.0	93

Recovery rate in total [%]

98

Sample (n=5)	Mean value measured in original sample [µg/l]	Spike [µg/l]	Biotin expected [µg/l]	Biotin measured [µg/l]	Recovery Rate [%]
D	1.3	2	3.3	3.6	115
		4	5.3	5.7	110
		6	7.3	6.9	93

Recovery rate in total [%]

106

12.3 Linearity

Two patient samples were diluted and analysed. The results are shown below:

Sample	Dilution	Biotin expected [µg/l]	Biotin measured [µg/l]
A	20	3.0	3.1
	40		3.5
	80		3.3
	120		2.9
	160		3.4
B	20	1.3	1.3
	40		1.3
	80		1.6

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

Burtis, C.A. & Ashwood, E.R. eds., Tietz Textbook of Clinical Chemistry 3rd ed., Saunders.

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

