

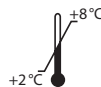
ID-Vit[®] Niacin

***Mikrobiologisches Verfahren zur Bestimmung des Gesamtgehalts von freiem Niacin (Nikotinsäure/Nikotinsäureamid) 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 niacin (nicotinic acid/nicotinamid acid) in serum using a Lactobacillus plantarum-coated microtitre plate
For use in human and veterinary medicine and in research***

Gültig ab / Valid from 2022-06-20

REF KIF003



IVD



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

Tel.: +49 6251 70190-0

Fax: + 49 6251 70190-363

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

Inhalt

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

1. VERWENDUNGSZWECK

Der ID-Vit® Niacin-Mikrotiterplattentest ist ein mikrobiologisches Verfahren zur Bestimmung des Gesamtgehaltes an freiem Niacin (Nikotinsäure und Nikotinsäureamid) in Serum. Alle benötigten Reagenzien und der Standard sind im Test enthalten. Mit dem Test können 96 Bestimmungen inklusive der Standards durchgeführt werden. Für die Auswertung ist ein ELISA-Reader notwendig. Zur Verwendung in Human- und Veterinärmedizin und zu Forschungszwecken. Nur zur *In-vitro*-Diagnostik.

2. EINLEITUNG

Niacin (= Sammelbegriff für Nikotinsäure und Nikotinsäureamid) wird vom menschlichen Organismus zur Biosynthese der Coenzyme NAD⁺ bzw. NADP⁺ verwendet. Nicht weniger als 200 Enzyme benötigen eines dieser beiden Coenzyme, daher ist es nicht verwunderlich, dass sich ein Niacin-Mangel auf vielfältige Bereiche des Stoffwechsels auswirkt. In diesem Zusammenhang spricht man auch von den 4 Ds, die durch einen Niacin-Mangel hervorgerufen werden können: Dermatitis, Diarrhö, Demenz und Tod (Death).

Niacin-Mangelercheinungen

Symptome eines leichten Niacinmangels können sein:

- Appetitmangel
- Depressivität
- Gedächtnisstörungen
- Schlaflosigkeit
- Verminderte Leistungsfähigkeit
- Verwirrtheit

Ein ausgeprägter Niacinmangel äußert sich in Form des Krankheitsbilds „Pellagra“. Der aus dem Italienischen stammende Ausdruck *pelle agra* bedeutet so viel wie „rauh Haut“. Jedoch ist nicht nur die Haut betroffen, auch die Schleimhäute zeigen Veränderungen:

- Glossitis (Himbeerzunge)
- Zungenbrennen
- Übermäßige Pigmentierung und Veränderungen der Haut, besonders nach Sonnenbestrahlung

Cholesterinsenker Niacin

Niacin hemmt die Fettsäurefreisetzung aus dem Fettgewebe. Das Molekül ist ein seit langem bekannter Wirkstoff bei der Therapie der Fettstoffwechselstörungen und wird insbesondere bei Patienten mit kombinierter Dyslipidämie, die durch erhöhtes LDL-Cholesterin und erhöhte Triglyzeride sowie niedrige HDL-Cholesterin-Werte ge-

kennzeichnet ist, und bei Patienten mit primärer Hypercholesterinämie verabreicht. Niacin wird zusammen mit Statinen zur Regulation des Fettstoffwechsels bei Fettstoffwechselstörungen eingesetzt, aber auch allein, wenn Statine nicht vertragen werden.

Indikationen

- Veränderte Hautpigmentierung nach Sonneneinstrahlung
- Alkoholabusus
- Demenz
- Mundtrockenheit
- Taubheitsgefühle der Extremitäten
- Entzündungen der Mund- und Zungenschleimhaut
- Verdauungsstörungen

Aufgrund der Verknüpfung des Nikotinsäurestoffwechsels mit dem des Tryptophans müssen nahrungsbedingte Mangelzustände als kombinierte Protein (Tryptophan)- und Vitamin (Niacin)-Mangelzustände gesehen werden. Da Tryptophan mit Hilfe von Pyridoxin (Vitamin B₆) in Nikotinsäure umgewandelt wird, kann auch ein Pyridoxinmangel den Nikotinsäurestoffwechsel beeinträchtigen.

3. TESTPRINZIP

Das Serum wird verdünnt in die Kavitäten einer Mikrotiterplatte gegeben, die mit *Lactobacillus plantarum* beschichtet sind. Nach Zugabe von Niacin als Standard oder als in einer Serumprobe enthaltenes Vitamin wächst der Keim so lange, bis das Vitamin aufgebraucht ist. Die Inkubation erfolgt bei **37 °C** für **48 h**. Das Wachstum des *Lactobacillus 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 des Niacins ist dabei direkt proportional der Trübung.

4. INHALT DER TESTPACKUNG

Art.-Nr.	Bezeichnung	Kit-Komponenten	Menge	
			KIF003	KIF003.2
KIF003	PLATE	Mikrotiterplatte, beschichtet mit <i>Lactobacillus plantarum</i>	1 x	2 x
	DIL	Wasser	6 x 30 ml	7 x 30 ml
	ASYMED	Niacin-Assay-Medium	4 x	4 x
	STD	Niacin-Standard, lyoph.	4 x	3 x
	FOL	Ablebefolie	1 x ganze 3 x halbe	3 x ganze
	FRA	Ersatzrahmen zum Umstecken der Mikrotiterstreifen	1 x	1 x
	CTRL1	Niacin-Kontrolle 1, lyoph.	4 x	3 x
	CTRL2	Niacin-Kontrolle 2, lyoph.	4 x	3 x

5. ERFORDERLICHE LABORGERÄTE UND HILFSMITTEL

- Inkubator mit dunkler Inkubationskammer, 37 °C
- Wasserbad (90 °C–100 °C)
- ELISA-Reader 610–630 nm (540–550 nm)
- Präzisionspipetten und sterile Pipettenspitzen für den Einmalgebrauch mit variablen Volumina von 20–1000 µl
- 5-ml- bzw. 10-ml-Pipette
- 1,5–2 ml-Reaktionsgefäße, steril
- 0,2 µm-Polyethersulfon (PES)-Sterilfilter und Einwegspritze (10 ml)
- 15 ml-Zentrifugenröhrchen, steril (z. B. Falcons)
- Biozentrifuge (10000 g)

6. HINWEISE UND VORSICHTSMASSNAHMEN

- Es handelt sich um einen mikrobiologischen Test, daher sollten alle Maßnahmen, soweit möglich, für ein steriles Arbeiten getroffen werden (bevorzugt unter Sterilbank bzw. PCR-Hood arbeiten, sterile Arbeitsgeräte verwenden).
- Die GLP (Good Laboratory Practice)-Regeln sind bei der Testdurchführung einzuhalten.

- Die Wasserqualität ist von großer Bedeutung für den Testablauf. Nur das im Testkit enthaltene Wasser [DIL] verwenden.
- Bei den Sterilfiltern muss es sich um Polyethersulfon-Sterilfilter handeln.
- Bei jeder Testdurchführung muss eine Standardkurve mitgeführt werden.
- Die Kontrollen sollten bei jedem Ansatz mitgemessen werden.
- Es wird die Messung in Doppelwerten empfohlen.
- Ergibt die höhere Verdünnung einen höheren Messwert, können Hemmstoffe wie Antibiotika vorliegen.
- Die Reagenzien dürfen nach Ablauf des Haltbarkeitsdatums nicht mehr verwendet werden.
- Während der Testdurchführung Handschuhe tragen.
- Gebrauchte Mikrotiterplattenstreifen sowie andere mit Patientenproben in Kontakt gekommene Materialien als potenziell infektiös behandeln und entsprechend entsorgen.

7. LAGERUNG UND VORBEREITUNG DER REAGENZIEN

- Den Testkit und die Reagenzien bei 2–8 °C lagern.
- Angesetzte Reagenzien unmittelbar verwenden und nach Testansatz verworfen.
- Bitte achten Sie bei mehrfachem Einsatz des Kits darauf, dass die Reagenzien wie in der Vorschrift beschrieben gelagert und nur die für den jeweiligen Ansatz benötigten Reagenzienmengen frisch angesetzt werden. Der Kit kann so bis zu 4x je nach Probenaufkommen bis zum angegebenen Haltbarkeitsdatum verwendet werden.

7.1 Wasser

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

7.2 Herstellung der Kontrollen

- Die lyophilisierten Kontrollen [CTRL1, CTRL2] sind mit je 1,25 ml Wasser [DIL] aus dem Testkit zu resuspendieren und mittels Vortex-Wirbelmischer zu homogenisieren.
- Die Kontrollen werden nach der Rekonstitution wie eine Probe behandelt.
- Die Konzentration der Kontrollen ändert sich von Charge zu Charge und ist der Produktspezifikation zu entnehmen.

7.3 Herstellung der Standardkurve

- Für die Herstellung des für die Standardkurve benötigten Standardkonzentrats ist der lyophilisierte Standard [STD] mit x ml (x = genaues Volumen bitte dem beiliegenden Quality Control Protocol entnehmen) Wasser [DIL] aus dem Testkit zu resuspendieren und mittels Vortex-Wirbelmischer zu homogenisieren.
- In 6 sterilen Reaktionsgefäßen (Fassungsvermögen 1,5–2 ml) wird mit dem Standardkonzentrat und Wasser [DIL] eine Standardkurve nach folgendem Schema hergestellt:

Niacin [µg/l]	Wasser [DIL] [µl]	+	Standard- konzentrat [µl]	=	Gesamtvolumen [µl]
Blank:	0	+	0	=	500
Standard 1:	2	+	25	=	500
Standard 2:	8	+	100	=	500
Standard 3:	16	+	200	=	500
Standard 4:	24	+	300	=	500
Standard 5:	40	+	500	=	500

7.4 Herstellung des sterilen Assay-Mediums

- Das sterile Assay-Medium muss vor jedem Test frisch hergestellt werden.
- Trockenmittelbeutel aus dem Fläschchen mit einer Pinzette abschütteln, herausnehmen und verwerfen.
- Zum Assay-Medium [ASYMED] 10 ml Wasser [DIL] zugeben, das Fläschchen gut verschließen und schütteln. Die Menge ist ausreichend für 6 Mikrotiterstreifen.

- Mediumflasche im Wasserbad bei 90–100°C für 5 min erhitzen; währenddessen mindestens 2 mal gut schütteln. Es ist darauf zu achten, dass dabei die Mediumflasche immer fest verschlossen ist.
- Mediumflasche schnell auf unter 30°C abkühlen (bei 2–8°C für 10 min).
- Medium mit Einwegspritze (10 ml) und dem 0,2-µm-PES-Filter in ein steriles Zentrifugenröhrchen (15 ml, z. B. Falcon) steriltrieren.
- Das so hergestellte sterile Assay-Medium wird im Test verwendet.

7.5 Mikrotiterplatte [PLATE]

- Die Mikrotiterplatte [PLATE] ist in der Aluminiumverpackung mit dem Trockenmittelbeutel bei 2–8°C zu lagern.
- Die Mikrotiterplatte [PLATE] muss vor Feuchtigkeit und Kontamination geschützt sein.
- Es ist darauf zu achten, dass die Aluminiumverpackung nicht beschädigt wird.
- Die Aluminiumverpackung nach dem Öffnen wieder sorgfältig verschließen.
- Nur die benötigten Mikrotiterstreifen unmittelbar vor Gebrauch entnehmen, um Kontaminationen zu vermeiden.

8. PROBENLAGERUNG UND -VORBEREITUNG

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

8.1 Probenverdünnung

Von den Serumproben/den Kontrollen je 100 µl abnehmen, 300 µl Wasser [DIL] zugeben und mischen. Dies resultiert in einer 1:4-Verdünnung (= Probenverdünnungsfaktor).

9. TESTDURCHFÜHRUNG

9.1 Testvorbereitungen

Entnehmen Sie die benötigten Reagenzien und Materialien für den durchzuführenden Test und legen Sie den restlichen Testkit zurück in den Kühlschrank. Bringen Sie die benötigten Reagenzien auf Raumtemperatur.

9.2 Testansatz

- Benötigte Mikrotiterstreifen entnehmen und in den Ersatzrahmen [FRA] stecken.
- 150 µl steriles Assay-Medium in die Kavitäten geben.
- Je 150 µl der hergestellten Standardkurve, vorbereiteten Proben und Kontrollen in die jeweiligen Kavitäten pipettieren. Pipettenspitzen jeweils mit der Standard-, Proben- bzw. Kontroll-Lösung vorspülen.
- Sorgfältig die befüllten Kavitäten mit der im Kit enthaltenen Klebefolie [FOL] abkleben. Wichtig: die Kavitäten müssen durch Andrücken mit der Hand luftdicht verschlossen werden!
- Bei 37 °C für 48 h im Brutschrank inkubieren.

9.3 Messung

- Klebefolie [FOL] nochmals mit der Hand fest andrücken
- Mikrotiterplatte [PLATE] über Kopf drehen, auf eine Tischoberfläche legen und Keime gut aufschütteln
- Mikrotiterplatte [PLATE] wieder zurückdrehen und die Abklebefolie [FOL] vorsichtig nach hinten abziehen. Mit einer Hand dabei die Streifen fest im Rahmen halten (Folie ist stark klebend!).
- Eventuell vorhandene Bläschen an der Oberfläche der Messlösung in den Kavitäten zerstören, z. B. mit Hilfe einer Pipettenspitze oder einer Nadel
- Trübung im ELISA-Reader bei E 610–630 nm messen (alternativ bei E 540–550 nm)

Hinweise

- Nach 48 h Inkubation kann die Mikrotiterplatte [PLATE] auch für max. 48 h im Kühlschrank aufbewahrt werden, um danach die Trübung zu messen.

- Um Zeitverluste durch Feiertage oder Wochenende zu vermeiden, kann die Mikrotiterplatte [PLATE] auch noch nach bis zu 60h Inkubation ausgewertet werden.

10. AUSWERTUNG DER ERGEBNISSE

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

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

10.1 Berechnung

Niacin in $\mu\text{g/l}$ = Wert aus Standardkurve \times Probenverdünnungsfaktor (4)

Referenzbereich für Humanserum

Anhand einer laborinternen Studie mit Serumproben von augenscheinlich Gesunden ($n = 83$) wurden die folgenden Werte ermittelt.

Niacin: 17–85 $\mu\text{g/l}$ (Mittelwert \pm 2 SD)

Anmerkung

Bei einem Probenverdünnungsfaktor von 4 ist ein Bereich von 8–160 $\mu\text{g/l}$ Niacin 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 Niacin dient lediglich der Orientierung und kann von anderen publizierten Daten abweichen.

10.2 Qualitätskontrolle

Die Extinktion des höchsten Standards muss $> 0,6$ sein.

Die Ergebnisse der Kontrollen müssen auf Richtigkeit überprüft werden. Liegen eine oder mehrere Kontrollen oder der höchste Standard außerhalb des angegebenen Bereiches, kann Immundiagnostik die Richtigkeit der Messergebnisse nicht gewährleisten.

11. EINSCHRÄNKUNGEN

Vollblut kann nicht im Test eingesetzt werden.

12. TESTCHARAKTERISTIKA

Die nachfolgenden Testcharakteristika wurden mit Humanserum erhoben.

12.1 Präzision und Reproduzierbarkeit

Intra-Assay (n = 6)

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

Inter-Assay (n = 5)

	Niacin [$\mu\text{g/l}$]	VK [%]
Probe	64	3,4

12.2 Wiederfindung

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

Probe (n=9)	Mittelwert Originalprobe [$\mu\text{g/l}$]	Spike [$\mu\text{g/l}$]	Niacin erwartet [$\mu\text{g/l}$]	Niacin gemessen [$\mu\text{g/l}$]	Wiederfindungsrate [%]
A	21,5	60	81,5	77	93
		120	141,5	134	94
		180	201,5	203	101
Wiederfindungsrate gesamt [%]					96

Probe (n=9)	Mittelwert der Originalprobe [µg/l]	Spike [µg/l]	Niacin erwartet [µg/l]	Niacin gemessen [µg/l]	Wiederfindungsrate [%]
B	16,9	60	76,9	76	99
		120	136,9	136	100
		180	196,9	199	101
Wiederfindungsrate gesamt [%]					100

Probe (n=9)	Mittelwert der Originalprobe [µg/l]	Spike [µg/l]	Niacin erwartet [µg/l]	Niacin gemessen [µg/l]	Wiederfindungsrate [%]
C	19,9	60	79,9	79	99
		120	139,9	145	104
		180	199,9	203	102
Wiederfindungsrate gesamt [%]					102

Probe (n=10)	Mittelwert Originalprobe [µg/l]	Spike [µg/l]	Niacin erwartet [µg/l]	Niacin gemessen [µg/l]	Wiederfindungsrate [%]
D	18,3	60	78,3	82	106
		120	138,3	139	100
		180	198,3	195	98
Wiederfindungsrate gesamt [%]					102

12.3 Linearität

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

Probe	Verdünnung	Niacin erwartet [µg/l]	Niacin gemessen [µg/l]
A	4	128	128
	8		138
	16		137
D	8	196	196
	16		193
	24		203
	32		188

13. LITERATUR












1. Strohecker, R. & Henning, H., **1963**. Vitamin-Bestimmungen. Erprobte Methoden. Weinheim/Bergstraße: Verlag Chemie GmbH.
2. Singer, D. et al., 2012. Defective intestinal amino acid absorption in Ace2 null mice. American journal of physiology. *Gastrointestinal and liver physiology*, **303**(6), pp.G686-95.
3. Morris, M.C. et al., 2004. Dietary niacin and the risk of incident Alzheimer's disease and of cognitive decline. *Journal of neurology, neurosurgery, and psychiatry*, **75**(8), pp.1093–9.

14. ALLGEMEINE HINWEISE ZUM TEST

- Dieser Kit wurde nach der IVD Richtlinie 98/79/EG hergestellt und in den Verkehr gebracht.
- Sämtliche in der Testpackung enthaltene Reagenzien dürfen ausschließlich zur *in-vitro*-Diagnostik eingesetzt werden.
- ID-Vit® ist eine Marke der Immundiagnostik AG.
- Die Reagenzien sollten nach Ablauf des Verfallsdatums nicht mehr verwendet werden (Verfallsdatum siehe Testpackung).

-
- Einzelkomponenten mit unterschiedlichen Lot-Nummern aus verschiedenen Testpackungen sollten nicht gemischt oder ausgetauscht werden.
- Für die Qualitätskontrolle sind die dafür erstellten Richtlinien für medizinische Laboratorien zu beachten.
- Die Testcharakteristika wie Inkubationszeiten, Inkubationstemperaturen und Pipettiervolumina der verschiedenen Komponenten wurden vom Hersteller festgelegt. Nicht mit dem Hersteller abgesprochene Veränderungen in der Testdurchführung können die Resultate beeinflussen. Die Firma Immundiagnostik AG übernimmt für die hierdurch entstandenen Schäden und Folgeschäden keine Haftung.
- Bei Gewährleistungsansprüchen ist das beanstandete Material mit schriftlicher Erklärung innerhalb von 14 Tagen zum Hersteller, der Immundiagnostik AG, zurückzusenden.
- Qualitätskontrollen sollten immer mitgemessen werden.
- Die Bestimmung ist immer nach der dem Kit beigefügten Arbeitsanleitung durchzuführen.

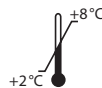
Verwendete Symbole:

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

ID-Vit[®] Niacin

***Microbiological test kit for the determination of total free niacin (nicotinic acid/nicotinamid acid) in serum using a Lactobacillus plantarum-coated microtitre plate
For use in human and veterinary medicine and in research***

Valid from 2022-06-20



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

Tel.: +49 6251 70190-0

Fax: + 49 6251 70190-363

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

Table of Contents

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

1. INTENDED USE

ID-Vit® Niacin is a microtiter plate test kit based on a microbiological method which measures the total free niacin content in serum. The test kit contains the standard and all reagents required to perform the test. It is sufficient for 96 determinations including standard curves. An ELISA reader is required for the evaluation of the results. For use in human and veterinary medicine and in research. For *in vitro* diagnostic use only.

2. INTRODUCTION

Niacin (nicotinic acid and nicotinamide) is used by the body to form coenzymes such as nicotinamide adenine dinucleotide (NAD⁺) and nicotinamide adenine dinucleotide phosphate (NADP⁺). As many as 200 enzymes require the two coenzymes, NAD⁺ and NADP⁺, mainly to accept or donate electrons for redox reactions. NAD⁺ functions most often in reactions involving the degradation (catabolism) of carbohydrates, fats, proteins, and alcohol to produce energy. NADP⁺ functions more often in biosynthetic (anabolic) reactions, such as in the synthesis of fatty acids and cholesterol. Since almost every metabolic pathway uses either NAD⁺ or NADP⁺, it is not surprising to find signs and symptoms of niacin deficiency in severe metabolic disorders. The worst of these is pellagra which is characterized by the four Ds, representing dermatitis, diarrhoea, dementia and death.

Niacin deficiency syndromes

Symptoms of minor niacin deficiency:

- Loss of appetite
- Depressiveness
- Dementia
- Insomnia
- Weakness
- Irritability

Severe niacin deficiency may cause pellagra. The term pellagra is derived from the Italian words “pelle agra” meaning “rough” or “smarting skin”. Pellagra is characterized by symptoms such as:

- Glossitis
- Sore, swollen, purple-red tongue
- Skin lesions primarily located on sun-exposed areas

Niacin as cholesterol lowering drug

Niacin increases HDL cholesterol and reduces LDL cholesterol and triglycerides. When taken in conjunction with another cholesterol medication, diet or exercise, ni-

acin has been proven to reduce „bad“ cholesterol levels. A niacin-statin combination therapy substantially improves 4 major lipoprotein levels associated with atherosclerotic disease (Insull et al. 2004). The drug combination had good records in clinical trials for reduction in cardiovascular events and improvement in progression/regression of coronary lesions.

Indications

- Deeply pigmented skin on sun-exposed areas
- Alcohol abuse
- Dementia
- Dry skin and mouth
- Numbness of the extremities
- Inflammation of the mucous membranes of the tongue and mouth
- Digestive disorders

Niacin can be synthesized in the body from tryptophan, whereby the conversion requires the presence of thiamine, pyridoxine, and riboflavin. Any deficiency in these vitamins can affect the niacin metabolism.

3. PRINCIPLE OF THE TEST

The serum samples are diluted and then transferred into the wells of a microtiter plate coated with *Lactobacillus plantarum*. The addition of niacin in either standards or samples gives a niacin-dependent growth response until niacin is consumed. After incubation at **37°C** for **48 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 niacin is directly proportional to the turbidity.

4. MATERIAL SUPPLIED

Cat. No.	Label	Kit components	Quantity	
			KIF003	KIF003.2
KIF003	PLATE	<i>Lactobacillus plantarum</i> -precoated microtiter plate	1 x	2 x
	DIL	Water	6 x 30 ml	7 x 30 ml
	ASYMED	Niacin assay medium	4 x	4 x
	STD	Niacin 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	Niacin control 1, lyoph.	4 x	3 x
	CTRL2	Niacin control 2, lyoph.	4 x	3 x

5. MATERIAL REQUIRED BUT NOT SUPPLIED

- Incubator with a dark incubation chamber, 37 °C
- Water bath (90 °C–100 °C)
- ELISA reader 610–630 nm (540–550 nm)
- Calibrated precision pipettors and sterile 20–1000 µl tips
- 5 ml and 10 ml pipets
- 1.5–2 ml reaction vials, sterile
- 0.2 µm sterile polyethersulfone (PES) filter with a sterile disposable syringe
- 15 ml centrifuge tubes, sterile (e.g. Falcon tubes)
- Biocentrifuge (10000g)

6. PRECAUTIONS

- As the test is based on a microbiological method, the general guidelines for sterile work should be observed as far as possible (preferably work in a sterile bench / PCR hood, use of sterile instruments or equipment).
- GLP (Good Laboratory Practice) guidelines have to be observed.
- Water quality is extremely important for the test. Only the water delivered with the test kit [DIL] should be used.

- For sterile filtration, only a sterile polyethersulfone filter must be used.
- It is essential to run a standard curve for each separate assay.
- Controls should be measured with each assay.
- We recommend measurements in duplicate.
- If a higher dilution results in a higher value measured, inhibitors like antibiotics might be present.
- Reagents should not be used beyond the expiration date shown on the label.
- Wear gloves during the test.
- Used microtiter stripes [PLATE] and materials that have been in contact with patient samples should be handled and disposed as potentially infectious.

7. STORAGE AND PREPARATION OF REAGENTS

- Store test kit and reagents at 2–8 °C.
- Prepare reagents freshly and use them immediately after preparation. Discard remaining unused reagents and waste in accordance with country, federal, state, and local regulations.
- To run the assay more than once, ensure that reagents are stored at the conditions stated on the label. Prepare only the appropriate amount necessary for each run. The kit can be used up to 4 times within the expiry date stated on the label.

7.1 Water

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

7.2 Preparation of the controls

- The lyophilised controls [CTRL1, CTRL2] have to be resuspended with each 1,25 ml water [DIL] from the test kit, then homogenise using a vortex.
- After reconstitution, the controls are treated like samples.

- The concentration of the controls changes from lot to lot and is stated in the product specification.

7.3 Preparation of the standard curve

- For the preparation of the standard curve, standard concentrate is needed. To prepare standard concentrate, resuspend the lyophilised standard [STD] with x ml (x = please see the enclosed quality control protocol for the volume needed) water [DIL] supplied with the test kit, then homogenise using a vortex.
- Prepare a standard curve in 6 sterile reaction tubes (1.5–2 ml volume) from standard concentrate and water [DIL] following the scheme depicted in the table below:

	Niacin [µg/l]	Water [DIL] [µl]	+	Standard concentrate [µl]	=	Total volume [µl]
Blank:	0	500	+	0	=	500
Standard 1:	2	475	+	25	=	500
Standard 2:	8	400	+	100	=	500
Standard 3:	16	300	+	200	=	500
Standard 4:	24	200	+	300	=	500
Standard 5:	40	0	+	500	=	500

7.4 Preparation of the sterile assay medium

- Fresh sterile assay medium has to be prepared each time before performing a test.
- Remove lyophilised assay medium from the desiccant bag in the assay medium bottle by taking the bag with a forceps and shaking it whilst still inside the bottle. Then remove the clean desiccant bag and discard it.
- Add 10 ml water [DIL] to the assay medium bottle [ASYMED], close the bottle firmly and shake it. This amount is sufficient for 6 microtiter stripes.
- Heat the medium bottle in a water bath at 90–100°C for 5 min, shake well at least 2 times during this incubation time. Take care that the medium bottle is always firmly closed.
- Quickly cool the medium bottle to < 30°C (at 2–8°C for 10 min).

- Filter the medium using a disposable syringe (10 ml) and the 0.2 µm PES filter into a sterile centrifuge tube (15 ml, e. g. Falcon).
- After this preparation, the sterile assay medium can be used in the test.

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

8.1 *Sample dilution*

Take 100 µl from the sample/control, add 300 µl water [DIL] and mix. This results in a total dilution of 1:4 (= sample dilution factor).

9. ASSAY PROCEDURE

9.1 Test preparations

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

9.2 Test procedure

- Take as many microtiter strips as needed from the kit and put them in the second microtiter strip holder [FRA].
- Put 150 µl sterile assay medium into the cavities.
- Add each 150 µl of the prepared standard curve, samples and controls into the respective cavities. Pre-rinse each pipet tip with standard, control or sample solution, respectively.
- Carefully seal the plate with adhesive cover foil [FOL]. Important: the cavities must be made airtight by pressing the foil down with the hand!
- Keep at 37°C for 48 h in an incubator.

9.3 Measurement

- Press the adhesive cover foil [FOL] firmly down again with the hand.
- Upturn the microtiter plate [PLATE], put it onto a tabletop and shake the microbes well.
- Turn the microtiter plate [PLATE] over again and carefully remove the adhesive cover foil [FOL]. During this, fix the strips in the frame with your hand because the foil is highly adhesive.
- Remove air bubbles in the cavities using a pipet tip or a needle.
- Read turbidity in an ELISA reader at E 610–630 nm (alternatively at E 540–550 nm).

Please note

- After 48 h incubation time, the microtiter plate [PLATE] may be stored for a maximum of 48 h in the refrigerator before measuring the turbidity.
- To prevent time-loss through public holidays or weekends, the microtiter plate [PLATE] may also be evaluated after 60 h incubation.

10. EVALUATION OF RESULTS

We recommend to use the 4 parameter algorithm to calculate the results. The sample dilution factor has to be considered for data evaluation.

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

10.1 Calculation

Niacin in $\mu\text{g/l}$ = value from the standard curve \times sample dilution factor (4)

Reference value for human serum

Based on studies of serum samples of apparently healthy persons ($n = 83$), the following values were estimated.

Niacin: 17–85 $\mu\text{g/l}$ (Mean \pm 2 SD)

Please note

A concentration range of 8–160 $\mu\text{g/l}$ niacin is covered at a sample dilution of 1:4.

We recommend each laboratory to develop its own normal range as normal ranges strongly depend on the choice of the patient collective. The values mentioned above are only for orientation and can deviate from other published data.

10.2 Quality control

The extinction of the highest standard has to be > 0.6 .

Results, generated from the analysis of control samples, should be evaluated for acceptability. The results for the samples may not be valid if within the same assay one or more values of the quality control sample or the highest standard are outside the acceptable limits.

11. LIMITATIONS

Whole blood cannot be used in the assay.

12. PERFORMANCE CHARACTERISTICS

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

12.1 Precision and reproducibility

Intraassay (n = 6)

	Niacin [$\mu\text{g/l}$]	CV [%]
Sample	64	2.9

Interassay (n = 5)

	Niacin [$\mu\text{g/l}$]	CV [%]
Sample	64	3.4

12.2 Recovery

Samples from 4 patients were differently diluted (20, 40, 80, 120, 160), spiked with niacin and analysed. The mean values are shown below.

Sample (n=9)	Mean value original sample [$\mu\text{g/l}$]	Spike [$\mu\text{g/l}$]	Niacin expected [$\mu\text{g/l}$]	Niacin measured [$\mu\text{g/l}$]	Recovery Rate [%]
A	21.5	60	81.5	77	93
		120	141.5	134	94
		180	201.5	203	101
Recovery rate in total [%]					96

Sample (n=9)	Mean value original sample [$\mu\text{g/l}$]	Spike [$\mu\text{g/l}$]	Niacin expected [$\mu\text{g/l}$]	Niacin measured [$\mu\text{g/l}$]	Recovery Rate [%]
B	16.9	60	76.9	76	99
		120	136.9	136	100
		180	196.9	199	101
Recovery rate in total [%]					100

Sample (n=9)	Mean value original sample [µg/l]	Spike [µg/l]	Niacin expected [µg/l]	Niacin measured [µg/l]	Recovery Rate [%]
C	19.9	60	79.9	79	99
		120	139.9	145	104
		180	199.9	203	102
Recovery rate in total [%]					102

Sample (n=9)	Mean value original sample [µg/l]	Spike [µg/l]	Niacin expected [µg/l]	Niacin measured [µg/l]	Recovery Rate [%]
D	18.3	60	78.3	82	106
		120	138.3	139	100
		180	198.3	195	98
Recovery rate in total [%]					102

12.3 Linearity

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

Sample	Dilution	Niacin expected [µg/l]	Niacin detected [µg/l]
A	4	128	128
	8		138
	16		137

Sample	Dilution	Niacin expected [µg/l]	Niacin detected [µg/l]
D	8	196	196
	16		193
	24		203
	32		188

13. REFERENCES












1. Strohecker, R. & Henning, H., **1963**. Vitamin-Bestimmungen. Erprobte Methoden. Weinheim/Bergstraße: Verlag Chemie GmbH.
2. Singer, D. et al., 2012. Defective intestinal amino acid absorption in Ace2 null mice. American journal of physiology. *Gastrointestinal and liver physiology*, **303**(6), pp.G686-95.
3. Morris, M.C. et al., 2004. Dietary niacin and the risk of incident Alzheimer's disease and of cognitive decline. *Journal of neurology, neurosurgery, and psychiatry*, **75**(8), pp.1093–9.

14. GENERAL NOTES ON THE TEST AND TEST PROCEDURE

- This assay was produced and distributed according to the IVD guidelines of 98/79/EC.
- All reagents in the kit package are for *in vitro* diagnostic use only.
- ID-Vit® is a trademark of Immundiagnostik AG.
- Reagents should not be used beyond the expiration date stated on the kit label.
- Do not interchange different lot numbers of any kit component within the same assay.
- The guidelines for medical laboratories should be followed.
- Incubation time, incubation temperature and pipetting volumes of the components are defined by the producer. Any variation of the test procedure, which is not coordinated with the producer, may influence the results of the test. Immundiagnostik AG can therefore not be held responsible for any damage resulting from incorrect use.

- Warranty claims and complaints regarding deficiencies must be logged within 14 days after receipt of the product. The product should be sent to Immunodiagnostik AG along with a written complaint.
- Control samples should be analysed with each run.
- The assay should always be performed according to the enclosed manual.

Used symbols:

	Temperature limitation		Catalogue number
	In Vitro Diagnostic Medical Device		To be used with
	Manufacturer		Contains sufficient for <n> tests
	Lot number		Use by
	Attention		Consult instructions for use
	Consult specification data sheet		

Immundiagnostik AG

Stubenwald-Allee 8a
64625 Bensheim, Germany

Tel.: +49 6251 70190-0

Fax: +49 6251 70190-363

info@immundiagnostik.com

www.immundiagnostik.com

