

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

Gültig ab / Valid from 2022-04-22



KIF005VB



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. INHALT DER TESTPACKUNG	4
4. ERFORDERLICHE LABORGERÄTE UND HILFSMITTEL	4
5. TESTPRINZIP	5
6. LAGERUNG UND VORBEREITUNG DER REAGENZIEN	5
6.1 Wasser	5
6.2 Herstellung des Lyse-Reagenz	6
6.3 Herstellung der Kontrollen	6
6.4 Herstellung der Standardkurve	6
6.5 Herstellung des sterilen Assay-Mediums	7
6.6 Mikrotiterplatte [PLATE]	7
7. PROBENLAGERUNG UND -VORBEREITUNG	7
7.1 Probenvorbehandlung	8
7.2 Probenverdünnung	8
8. TESTDURCHFÜHRUNG	8
8.1 Testvorbereitungen	8
8.2 Testansatz	8
8.3 Messung	9
9. AUSWERTUNG DER ERGEBNISSE	9
9.1 Berechnung	9
9.2 Qualitätskontrolle	10
10. EINSCHRÄNKUNGEN	10
11. TESTCHARAKTERISTIKA	10
11.1 Präzision und Reproduzierbarkeit	10
11.2 Wiederfindung	11
11.3 Linearität	12
12. VORSICHTSMASSNAHMEN	13
13. ALLGEMEINE HINWEISE ZUM TEST	14
14. LITERATUR	15

1. VERWENDUNGSZWECK

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. Mit dem Test können 96 Bestimmungen inklusive der Standards durchgeführt werden. Für die Auswertung ist ein ELISA-Reader notwendig. Zur Verwendung in Human- und Veterinärmedizin und zu Forschungszwecken. Nur zur *In-vitro*-Diagnostik.

2. EINLEITUNG

Folsäure (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 Fötus Entwicklung).

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, Konzentrationsschwäche und Appetitlosigkeit; weitere Folgen sind Entzündungen der Schleimhäute, Anämie und schwere neurologische Schädigungen. Während der Schwangerschaft, in der sich der Folsäurebedarf verdoppelt, kann ein Mangel zu Frühgeburt und schweren Missbildungen führen. Durch eine optimale Folsäureversorgung während der Schwangerschaft kann das Risiko eines Neuralrohrdefekts beim Fötus um 85% vermindert werden. Da sowohl ein Folsäuremangel sowie ein Vitamin-B₁₂-Mangel eine megaloblastäre Anämie bedingen können, ist die Bestimmung beider Vitamine bei diesem Krankheitsbild besonders bedeutsam wichtig, um das richtige Vitamin zu supplementieren. Die Behandlung einer durch Vitamin-B₁₂-Mangel verursachten megaloblastären Anämie allein mit Folsäure, kann zu irreversiblen Schäden am zentralen Nervensystem führen.

Folsäure und Arteriosklerose

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

Indikationen

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

3. INHALT DER TESTPACKUNG

Art.-Nr.	Bezeichnung	Kit-Komponenten	Menge	
			KIF005VB	KIF005VB.2
KIF005VB	PLATE	Mikrotiterplatte, beschichtet mit <i>Lacto- bacillus rhamnosus</i>	1 x	2 x
	SOL	Probenbehandlungspuffer, gebrauchsfertig	5 x 4,6 ml	10 x 4,6 ml
	DIL	Wasser	4 x 30 ml	7 x 30 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 Umste- cken der Mikrotiterstreifen	1 x	1 x

4. ERFORDERLICHE LABORGERÄTE UND HILFSMITTEL

- Inkubator mit dunkler Inkubationskammer, 37°C
- ELISA-Reader 610–630 nm (540–550 nm)
- Präzisionspipetten und sterile Pipettenspitzen für den Einmalgebrauch mit variablen Volumina von 2–1 000 µl

- 1,5–2 ml-Reaktionsgefäße, steril
- 0,2 µm-Polyethersulfon (PES)-Sterilfilter und Einwegspritze (10 ml)
- 15 ml-Zentrifugenröhrchen, steril (z. B. Falcons)
- Biozentrifuge (10 000 g)

5. 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 **48 h**. Das Wachstum des *Lactobacillus rhamnosus* wird als Trübung bei 610–630 nm (alternativ bei 540–550 nm) im ELISA-Reader gemessen und mit einer Standard-Konzentrationsreihe verglichen. Die Menge der Folsäure ist dabei direkt proportional der Trübung.

6. LAGERUNG UND VORBEREITUNG DER REAGENZIEN

- Den Testkit und die Reagenzien bei 2–8 °C lagern.
- Angesetzte Reagenzien unmittelbar verwenden und nach Testansatz verwerfen. Verbleibende, unbenutzte Reagenzien und Abfälle immer gemäß den Vorschriften des Landes entsorgen.
- 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.

6.1 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.

6.2 Herstellung des Lyse-Reagenz

- 4,5 ml Probenvorbereitungspuffer [SOL] in Fläschchen mit lyophilisiertem Puffer [PAF] überführen und mittels Vortex-Wirbelmischer homogenisieren.
- Das Lyse-Reagenz kann nicht aufbewahrt werden

6.3 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-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.

6.4 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:

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

6.5 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] und 1 ml Medium-Behandlungspuffer [ASYBUF] zugeben, das Fläschchen gut verschließen und schütteln. Die Menge ist ausreichend für 6 Mikrotiterstreifen.
- Mediumflasche im Wasserbad bei 90–100 °C für 5 min erhitzen; währenddessen mindestens 2 mal gut schütteln. Es ist darauf zu achten, dass dabei die Mediumflasche immer fest verschlossen ist.
- Mediumflasche schnell auf unter 30 °C abkühlen (bei 2–8 °C für 10 min).
- Medium mit Einwegspritze (10 ml) und dem 0,2-µm-PES-Filter in ein steriles Zentrifugenröhrchen (15 ml, z. B. Falcon) sterilfiltrieren.
- Das so hergestellte sterile Assay-Medium wird im Test verwendet.

6.6 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.

7. PROBENLAGERUNG UND -VORBEREITUNG

- Die Proben sind bei 2–8 °C für 8 Stunden im Dunkeln stabil. Für eine längere Lagerung, sollten die Proben eingefroren und bei -20 °C aufbewahrt werden.

7.1 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, schnell abkühlen lassen (bei 2–8 °C für 10 min) und 10 min zentrifugieren (10 000 g).

7.2 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).

8. TESTDURCHFÜHRUNG

8.1 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.

8.2 Testansatz

- Benötigte Mikrotiterstreifen entnehmen und in den Ersatzrahmen [FRA] stecken.
- 150 µl steriles Assay-Medium (ASYMED) in die Kavitäten geben.
- Je 150 µl der hergestellten Standardlösungen, 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 luftdicht verschlossen werden, z. B. durch Andrücken mit der Hand.
- Bei 37 °C für 48 h im Brutschrank inkubieren.

8.3 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 60 h Inkubation ausgewertet werden.

9. AUSWERTUNG DER ERGEBNISSE

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

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

9.1 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 µg/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.

9.2 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.

10. EINSCHRÄNKUNGEN

Serum und Plasma können nicht im Test eingesetzt werden. Der Test wurde ausschließlich mit EDTA-Vollblut validiert. Sollte eine andere Form von Vollblut erwünscht sein, muss dieses erst validiert werden.

11. TESTCHARAKTERISTIKA

Die nachfolgenden Testcharakteristika wurden mit EDTA-Vollblut erhoben.

11.1 Präzision und Reproduzierbarkeit**Intra-Assay (n = 22)**

Probe	Folsäure [µg/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

11.2 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 [$\mu\text{g/l}$]	Spike [$\mu\text{g/l}$]	Folsäure erwartet [$\mu\text{g/l}$]	Folsäure gemessen [$\mu\text{g/l}$]	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

11.3 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]	Wiederfindungsrate [%]
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

Probe	Verdünnung		Folsäure erwartet [µg/l]	Folsäure gemessen [µg/l]	Wiederfin- dungsrate [%]
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

12. VORSICHTSMASSNAHMEN

- Es handelt sich um einen mikrobiologischen Test, daher sollten alle Maßnahmen, soweit möglich, für ein steriles Arbeiten getroffen werden (bevorzugt unter Sterilwerkbank 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.
- Für die Sterilfiltration ist ein **steriler Polyethersulfonfilter** zwingend erforderlich.
- Bei jeder Testdurchführung muss eine Standardkurve mitgeführt werden.

- Es wird die Messung in Doppelwerten empfohlen.
- Ergibt die höhere Verdünnung einen höheren Messwert, können Hemmstoffe wie Antibiotika vorliegen.
- Während der Testdurchführung Handschuhe tragen.
- Als Vorsichtsmaßnahme wird empfohlen, das verwendete Humanmaterial immer als potentiell infektiös zu betrachten.
- Gebrauchte Mikrotiterplattenstreifen sowie andere mit Patientenproben in Kontakt gekommene Materialien als potenziell infektiös behandeln und entsprechend entsorgen.

13. ALLGEMEINE HINWEISE ZUM TEST












- Dieser Kit wurde nach der IVD Richtlinie 98/79/EG hergestellt und in den Verkehr gebracht.
- Sämtliche in der Testpackung enthaltene Reagenzien dürfen ausschließlich zur *in-vitro*-Diagnostik eingesetzt werden.
- ID-Vit® ist eine Marke der Immundiagnostik AG.
- Die Reagenzien sollten nach Ablauf des Verfallsdatums nicht mehr verwendet werden (Verfallsdatum siehe Testpackung).
- Einzelkomponenten mit unterschiedlichen Lot-Nummern aus verschiedenen Testpackungen sollten nicht gemischt oder ausgetauscht werden.
- Für die Qualitätskontrolle sind die dafür erstellten Richtlinien für medizinische Laboratorien zu beachten.
- Die Testcharakteristika wie Inkubationszeiten, Inkubationstemperaturen und Pipettiervolumina der verschiedenen Komponenten wurden vom Hersteller festgelegt. Nicht mit dem Hersteller abgesprochene Veränderungen in der Testdurchführung können die Resultate beeinflussen. Die Firma Immundiagnostik AG übernimmt für die hierdurch entstandenen Schäden und Folgeschäden keine Haftung.
- Schwerwiegende Vorkommnisse sind der Immundiagnostik AG und den nationalen Aufsichtsbehörden zu melden.

- 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.

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.

Verwendete Symbole:

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

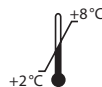
ID-Vit[®] **Folic acid in whole blood**

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

Valid from 2022-04-22



KIF005VB



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	19
2. INTRODUCTION	19
3. MATERIAL SUPPLIED	21
4. MATERIAL REQUIRED BUT NOT SUPPLIED	21
5. PRINCIPLE OF THE TEST	22
6. STORAGE AND PREPARATION OF REAGENTS	22
6.1 Water	22
6.2 Preparation of the lysis-reagent	22
6.3 Preparation of the controls	23
6.4 Preparation of the standard curve	23
6.5 Preparation of the sterile assay medium	23
6.6 Microtiter plate [PLATE]	24
7. SAMPLE STORAGE AND PREPARATION	24
7.1 Sample pretreatment	24
7.2 Sample dilution	25
8. ASSAY PROCEDURE	25
8.1 Test preparations	25
8.2 Test procedure	25
8.3 Measurement	25
9. EVALUATION OF RESULTS	26
9.1 Calculation	26
9.2 Quality control	26
10. LIMITATIONS	27
11. PERFORMANCE CHARACTERISTICS	27
11.1 Precision and reproducibility	27
11.2 Recovery	27
11.3 Linearity	29
12. PRECAUTIONS	30
13. GENERAL NOTES ON THE TEST	31
14. REFERENCES	31

1. INTENDED USE

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. With the test 96 determinations including the standards. 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. Meanwhile, the hyperhomocysteinaemia has been recognised as an independent factor in arteriosclerosis. Therefore, the determination of folic acid can be carried out within the framework of a coronary disease risk analysis. Beside of the influence of folic acid on the homocysteine levels a further positive effect on the endothelial function in heart patients has been established – development of nitrate tolerance during continuous nitrate therapy, e.g. in such patients, an increased release of oxygen radicals occurs without folic acid supplementation (Verhaar et al. 2002).

Indications

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

3. MATERIAL SUPPLIED

Cat. No.	Label	Kit components	Quantity	
			KIF005VB	KIF005VB.2
KIF005VB	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
	DIL	Water	4 x 30 ml	7 x 30 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 treatment 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.

4. 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 2–1 000 µl tips
- 1.5–2 ml reaction vials, sterile
- 0.2 µm sterile polyethersulfone (PES) filter with a sterile disposable syringe (10 ml)

- 15 ml centrifuge tubes, sterile (e.g. Falcon tubes)
- Centrifuge (10000g)

5. 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 **48 h** the growth of *Lactobacillus rhamnosus* is measured turbidimetrically at 610–630 nm (alternatively at 540–550 nm) in an ELISA reader and compared to a standard curve generated from the dilution series. The amount of folic acid is directly proportional to the turbidity.

6. 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.

6.1 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.

6.2 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.

6.3 Preparation of the controls

- Each lyophilised control [CTRL1, CTRL2] have to be resuspended 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.

6.4 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 (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:

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

6.5 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 10ml water [DIL] and 1 ml medium treatment buffer [ASYMED] to the assay medium bottle [ASYMED], close the bottle firmly and shake it. This amount is sufficient for 6 microtiter stripes.
- Heat the medium bottle in a water bath at 90–100°C for 5 min. shake well at least 2 times during this incubation time. Take care that the medium bottle is always firmly closed.
- Quickly cool the medium bottle to < 30°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.

6.6 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.

7. SAMPLE STORAGE AND PREPARATION

- Samples are stable at 2–8°C for 8 hours in the dark. For longer storage samples should be frozen and kept at -20°C.

7.1 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 rapidly (at 2–8°C for 10 min) and centrifuge (10 000 g) for 10 min.

7.2 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).

8. ASSAY PROCEDURE

8.1 Test preparations

Remove only the reagents and materials as needed to performed the test and put the rest of the test kit back in the refrigerator. Bring all the required reagents to room temperature before start.

8.2 Test procedure

- Take as many microtiter strips as needed from the kit and place them in the second microtiter strip holder [FRA].
- Add 150 µl sterile assay medium (ASYMED) into the cavities.
- Add each 150 µl of the prepared standard solutions, 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, e.g. by pressing the foil down with the hand!
- Keep at 37 °C for 48 h in an incubator.

8.3 Measurement

- Press the adhesive cover foil [FOL] firmly down again with the hand.
- Turn the microtiter plate [PLATE] upsidedown 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.

9. 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.

9.1 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 sample collective. The reference range for folic acid is given for guidance only and may differ from other published data.

9.2 Quality control

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

Immundiagnostik AG recommends the use of external controls for internal quality control, if possible.

Control samples should be analysed with each run. Results generated from the analysis of control samples should be evaluated for acceptability using appropriate statistical methods. If one of the controls or the highest standard are outside the specified range Immundiagnostik AG cannot guarantee the accuracy of the measurement results.

10. LIMITATIONS

Serum and plasma cannot be used in the test. The test was validated with EDTA whole blood only. If another form of whole blood is desired it must first be validated.

11. PERFORMANCE CHARACTERISTICS

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

11.1 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

11.2 Recovery

For the determination of recovery samples of 4 EDTA whole blood samples were spiked with folic acid concentrations 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

11.3 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

12. 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 a **sterile polyethersulfone** filter is mandatory.
- It is essential to run a standard curve for each separate assay.
- We recommend measurements in duplicate.
- If a higher dilution results in a higher value measured, inhibitors like antibiotics might be present.
- Wear gloves during the test.
- As a precaution, it is recommended that the human material used is always considered potentially infectious.
- Used microtiter stripes [PLATE] and materials that have been in contact with patient samples should be handled and disposed as potentially infectious.












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

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

