

ID-Vit[®] Vitamin B₁

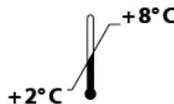
Mikrobiologisches Verfahren zur Bestimmung
des Gesamtgehalts von Vitamin B₁ in Vollblut mittels einer
Lactobacillus fermentum-beschichteten Mikrotiterplatte
Zur Verwendung in Human- und Veterinärmedizin und zu For-
schungszwecken

Microbiological test kit for the determination of
vitamin B₁ in whole blood using a
Lactobacillus fermentum coated microtiter plate
For use in human and veterinary medicine and in research

Gültig ab / Valid from 02.05.2011



KIF001



ifp Institut für Produktqualität GmbH
Teltowkanalstr. 2
12247 Berlin, Germany
www.produktqualitaet.com

Vertrieb durch/ distributed by:
Immundiagnostik AG
Stubenwald-Allee 8a
64625 Bensheim, Germany
www.immundiagnostik.com

Inhalt

Content	12
1. VERWENDUNGSZWECK	2
2. EINLEITUNG	2
3. TESTPRINZIP	3
4. INHALT DER TESTPACKUNG	3
5. ERFORDERLICHE LABORGERÄTE UND HILFSMITTEL	4
6. LAGERUNG DER REAGENZIEN	4
7. HINWEISE UND VORSICHTSMASSNAHMEN	4
8. PROBENVORBEREITUNG	5
8.1 Probenvorbehandlung	5
8.2 Probenverdünnung	5
9. TESTDURCHFÜHRUNG	6
9.1 Testvorbereitungen	6
9.2 Testansatz	7
9.3 Messung	8
10. AUSWERTUNG DER ERGEBNISSE	8
11. ERWARTUNGSWERTE	8
12. TESTCHARAKTERISTIKA	9
13. LITERATUR	10
14. ALLGEMEINE HINWEISE ZUM TEST	10

1. VERWENDUNGSZWECK

Der **ID-Vit® Vitamin B₁** Mikrotiterplattentest ist ein mikrobiologisches Verfahren zur Bestimmung des Gehaltes an Vitamin B₁ im Vollblut. Alle benötigten Reagenzien und der Standard sind im Test enthalten. Mit dem Test können 96 Bestimmungen incl. 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

Die bioaktive Komponente des B₁ ist Thiaminpyrophosphat. Sie wirkt als Cofaktor an Enzymen, die eine wichtige Rolle im Kohlenhydrat- und Aminosäure-Stoffwechsel spielen.

Als Coenzym spielt Vitamin B₁ im Fett- und Kohlenhydratstoffwechsel eine wichtige Rolle (Erhaltung des Nervengewebes und des Herzmuskels, Vermittlung der Nervenleitung, Umwandlung von Kohlenhydraten in Fett im Gehirn und in den Muskeln).

Vitamin-B₁-Mangel

Ein schwerer Vitamin B₁-Mangel, verbunden mit eiweißarmer Ernährung führt zur BERE-BERE-Krankheit. Schwerwiegender in der Zivilisationsgesellschaft dürfte der Vitamin-B₁-Mangel bei künstlicher Ernährung sein, der zu folgenschwerer Schädigung der Gehirnfunktion führen kann. Weitere Thiamin-Mangelerkrankungen sind die Wernicke-Enzephalopathie, das Korsakow-Syndrom und einige Formen der Landry'schen Paralyse. Als Folgeerkrankung eines Vitamin-B₁- Mangels wurden auch Myopathien beobachtet.

Indikationen für eine Vitamin-B₁-Bestimmung

- Ermittlung des stoffwechselaktiven Vitamin B₁
- Kontrolle der Vitamin-B₁-Versorgung bei künstlicher Ernährung (Ernährung durch AKE-Lösung)
- Störungen des Aminosäurestoffwechsels
- Malabsorption in Verbindung mit Alkoholismus
- Verdacht auf Neuritis

3. TESTPRINZIP

Die Blutproben werden enzymatisch vorbehandelt und verdünnt in die Kavitäten einer Mikrotiterplatte [PLATE] gegeben, die mit *Lactobacillus fermentum* beschichtet sind. Nach Zugabe von Vitamin B₁ als Standard [STD], Kontrolle [CTRL1, CTRL2] oder als in einer Blutprobe enthaltenes Vitamin wächst der Keim solange bis das Vitamin aufgebraucht ist. Die Inkubation erfolgt bei **37 °C** für **48 h**. Das Wachstum des *Lactobacillus fermentum* wird als Trübung bei 610-630 nm (alternativ 540-550 nm) im ELISA-Reader gemessen und mit einer Standard-Konzentrationsreihe verglichen. Die Menge des Vitamins B₁ ist dabei direkt proportional der Trübung.

4. INHALT DER TESTPACKUNG

Artikel Nr.	Abkürzung	Kit Komponenten	Menge
KIF001MTP	PLATE	1 x Mikrotiterplatte, beschichtet mit <i>Lactobacillus fermentum</i> , gebrauchsfertig	12 Streifen à 8 Kavitäten
KIF001SO	SOL	Probenvorbereitungspuffer 5 ml, gebrauchsfertig	5 x
KIF001ENZ	ENZ	Enzym, lyophilisiert	5 x
KIF001DI	DIL	Wasser 30 ml, gebrauchsfertig	4 x
KIF001ME	ASYMED	Vitamin B ₁ -Assay-Medium	4 x
KIF001ST	STD	Vitamin B ₁ -Standard	4 x
KIF001KO1	CTRL1	Vitamin B ₁ Kontrolle 1	4 x
KIF001KO2	CTRL2	Vitamin B ₁ Kontrolle 2	4 x
KIF001FO	FOL	Abklebefolie	4 x
KIF001FR	FRA	Ersatzrahmen zum Umstecken der Mikrotiterstreifen	1 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)
- Mikropipette 20 - 200 µl
- Mikropipette 100 -1000 µl
- Mikropipettenspitzen 20 - 200 µl und 100 -1000 µl, steril
- Pipette 5 bzw. 10 ml
- 1,5 - 2 ml Reaktionsgefäße, steril
- 0,2 µm Sterilfilter (Polyethersulfon) und Einwegspritze (10 ml)
- 15 ml Zentrifugenröhrchen, steril (z.B. Falcons)
- Biozentrifuge (10 000 x g)

6. LAGERUNG DER REAGENZIEN

- Den Testkit / die Reagenzien bei 2 - 8 °C lagern.
- Angesetzte Reagenzien unmittelbar verwenden und nach Testansatz verwerfen.
- Nicht angebrochene Reagenzien (Standard, Medium, Kontrollen) in den Testkit zurücklegen und bei 2 - 8 °C lagern.
- Nicht benötigte Mikrotiterplatten-Streifen zusammen im Rahmen mit dem Trockenmittel im Folienbeutel gut verschlossen aufbewahren und bei 2- 8 °C lagern. Die Mikrotiterplatten-Streifen müssen vor Kontamination und Feuchtigkeit geschützt sein.
- Nach Ablauf des Verfallsdatums (siehe Testkit - Außenetikett) kann keine Qualitätsgarantie mehr übernommen werden.
- Bitte achten Sie bei mehrfachem Einsatz der Platte [PLATE] 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 4 x je nach Probenaufkommen bis zum angegebenen Haltbarkeitsdatum verwendet werden.

7. 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] für den Ansatz des Mediums [ASYMED] und die Rekonstitution des Standards [STD] und der Kontrollen [CTRL1, CTRL2] verwenden.

- Bei jeder Testdurchführung sollte eine **Kalibration** mitgeführt werden.
- Es wird eine **Doppelbestimmung** der Standards [STD], der Kontrollen [CTRL1, CTRL2] und der Proben empfohlen.
- Ergibt die höhere Verdünnung einen höheren Messwert, können **Hemmstoffe wie Antibiotika** vorliegen.
- Die Reagenzien dürfen nach Ablauf des Mindesthaltbarkeitsdatums 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.
- Anzeichen für Reagenzienverfall: Der höchste Standard sollte eine Absorption größer als 0,6 Extinktionseinheiten ($A_{630nm} > 0,6$) erreichen.

8. PROBENVORBEREITUNG

- Als Probe eignet sich EDTA-Vollblut, das aus venösem Nüchternblut gewonnen wird. Da Vitamin B₁ sehr licht- und temperaturempfindlich ist, muss die Probe gekühlt vor Licht geschützt werden. Die Haltbarkeit der Probe beträgt bei 2-8 °C im Dunkeln 1 Tag. Zur längeren Lagerung sollte die Probe bei -20 °C aufbewahrt werden. Die Probe darf **nicht** mehrfach eingefroren und aufgetaut werden.

8.1 Probenvorbehandlung

4 ml des Probenvorbereitungspuffers [SOL] in Fläschchen mit dem lyophilisierten Enzym [ENZ] überführen, verschließen und vortexen.

100 µl Blut oder Kontrolle [CTRL1, CTRL2] mit 400 µl dieser vorbereiteten Enzymlösung versetzen, mischen und 30 min bei 37 °C im Dunkeln inkubieren. Anschließend den Ansatz 30 min bei 95 °C erhitzen, schnell abkühlen und zentrifugieren (10 min bei 10000 x g).

8.2 Probenverdünnung

Vom Überstand der vorbehandelten Probe 200 µl bzw. Kontrolle [CTRL1, CTRL2] abnehmen, 200 µl Wasser [DIL] zugeben und mischen. Die Probenvorbehandlung und -verdünnung entsprechen insgesamt einer 1:10 Verdünnung (= Probenverdünnungsfaktor).

9. TESTDURCHFÜHRUNG

Hinweise

- Qualitätskontrollen sollten immer mitgemessen werden.
- Inkubationszeit, Temperatur und Pipettier Volumina sind vom Hersteller festgelegt. Jegliche Abweichung der Testvorschrift, die nicht den Angaben des Herstellers entspricht, kann zu fehlerhaften Ergebnissen führen.
- Die Bestimmung ist immer nach der im Kit beigefügten Arbeitsanleitung durchzuführen.

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.

Wasser [DIL] für Medium [ASYMED], Standard [STD] und Kontrollen [CTRL1, CTRL2]

- Alu-Bördelkappe nach oben drücken, nach hinten bis zum Glasrand abziehen und dann durch Drehen den gesamten Verschluss entfernen.

Assay-Medium [ASYMED]

- Das Medium [ASYMED] muss vor jedem Test frisch hergestellt werden.
- Mit einer Pinzette das Medium [ASYMED] vom Trockenbeutel im Fläschchen abschütten; Trockenbeutel 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 [ASYMED] im Wasserbad bei 95 °C für 5 min erhitzen; währenddessen mindestens 2 mal gut schütteln. Es ist darauf zu achten, dass dabei die Mediumflasche [ASYMED] immer fest verschlossen ist.
- Mediumflasche [ASYMED] schnell auf unter 30 °C abkühlen.
- Medium [ASYMED] mit Einwegspritze (10 ml) und einem 0,2 µm-Filter in ein steriles Zentrifugenröhrchen (15 ml, z.B. Falcon) sterilfiltrieren.

Standard [STD]

Standardverdünnungsreihe vor dem Test frisch herstellen:

- Standardflasche [STD] öffnen, Schraubdeckel mit dem Kopf nach unten ablegen.
- In die Standardflasche [STD] x ml (x = siehe dem Testkit beiliegendes QS-Datenblatt) Wasser [DIL] aus dem Testkit zugeben, mit dem Schraubdeckel verschließen und schütteln = Standard (Konzentrat).

- In 6 sterilen Reaktionsgefäßen (Fassungsvermögen 1,5 - 2,0 ml) Wasser [DIL] aus dem Testkit vorlegen und anschließend Standard (Konzentrat) hinzupipettieren, d.h. eine Standardkurve nach folgendem Schema erstellen:

Vitamin B ₁ [µg / l]	Wasser [DIL] [µl]	+	Standard [STD] [µl]	=	Gesamtvolumen [µl]
Blank: 0	850	+	0	=	850
Standard 1: 3	850	+	150	=	1000
Standard 2: 6	700	+	300	=	1000
Standard 3: 9	370	+	300	=	670
Standard 4: 12	200	+	300	=	500
Standard 5: 15	200	+	600	=	800

Kontrollen [CTRL1, CTRL2]

Kontrollen vor dem Test frisch herstellen:

- Kontrollflasche [CTRL1, CTRL2] öffnen, Schraubdeckel mit dem Kopf nach unten ablegen.
- In die Kontrollflasche [CTRL1, CTRL2] 0,5 ml Wasser [DIL] aus dem Testkit zugeben, Deckel schließen und Fläschchen vortexten (= Kontrolle 1, Kontrolle 2).
- Die Kontrolle [CTRL1, CTRL2] wird nach dem Rekonstituieren wie eine Probe behandelt.
- Pro Kavität werden 150 µl der verdünnten Kontrolle [CTRL1, CTRL2] pipettiert. Wir empfehlen eine Doppelbestimmung der Kontrollen [CTRL1, CTRL2].
- Die Konzentration der Kontrollen [CTRL1, CTRL2] entnehmen Sie bitte der Kontrollspezifikation.

9.2 Testansatz

- Benötigte Mikrotiterstreifen entnehmen und in den Ersatzrahmen [FRA] stecken. Die nicht gebrauchten Streifen im Rahmen sofort in den Beutel zurücklegen und diesen sorgfältig verschließen. Die Mikrotiterplatten-Streifen müssen vor Kontamination und Feuchtigkeit geschützt sein.
- Ein Mediumansatz ist ausreichend für 6 Mikrotiterstreifen (= 48 Kavitäten).
- 150 µl steriles Vitamin B₁-Assay-Medium [ASYMED] in die Kavitäten geben.
- 150 µl Standard [STD] bzw. vorbehandelte, verdünnte Probe bzw. Kontrolle [CTRL1, CTRL2] in die jeweiligen Kavitäten pipettieren. Pipettenspitzen jeweils mit der Standard- bzw. Probenlösung vorspülen.
- Sorgfältig die befüllten Kavitäten mit Folie [FOL] abkleben. Wichtig: die Kavitäten müssen durch Andrücken mit Hand luftdicht verschlossen werden!
- Bei 37 °C für 48 h im Brutschrank inkubieren.

9.3 Messung

- Klebefolie [FOL] nochmals mit der Hand fest andrücken
- Platte [PLATE] über Kopf drehen, auf eine Tischoberfläche legen und Keime gut aufschütteln
- Platte [PLATE] wieder zurückdrehen und die Abklebefolie [FOL] diagonal, von oben rechts beginnend, in einem Winkel von ca. 180°C **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.

10. AUSWERTUNG DER ERGEBNISSE

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

Vitamin B₁ in µg/l = Wert aus Standardkurve x Probenverdünnungsfaktor (10)

11. ERWARTUNGSWERTE

Der Vitamin-B₁-Gehalt wurde in 42 verschiedenen Blutspenderproben ermittelt. Als Mittelwert (Median) wurde 48.1 (44.3) µg/L gefunden. Der 2-SD-Bereich erstreckte sich von 30 - 66 µg/L. Aus Abb. 1 geht die Verteilung der Blutspenderwerte hervor.

Da die Referenzbereiche stark von der Auswahl der jeweiligen Probandenkollektive abhängig sind, soll gemäß den Empfehlungen jedes Labor seine eigenen Referenzwerte erstellen.

Verteilungsbereich

Anzahl Proben	42
Mittelwert	48.1
Median	44.3
SD	8.9
MW-2* SD	30.2
MW+2*SD	65.9

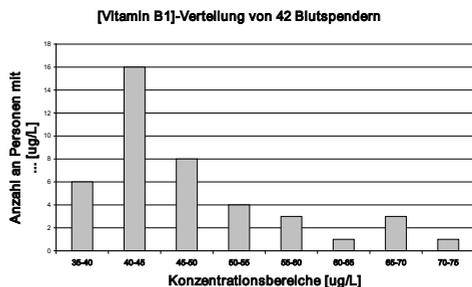


Abb. 1: Verteilung der Blutspenderwerte

Anmerkung

Bei einem Probenverdünnungsfaktor von 10 ist ein Bereich von 30-150 µg/l Vitamin B₁ abgedeckt. Wir empfehlen jedem Labor seinen eigenen Referenzbereich zu erstellen, weil Referenzbereiche stark von der Auswahl des Probandenkollektivs abhängig sind. Die Angabe des Referenzbereichs für Vitamin B₁ dient lediglich der Orientierung und kann von anderen publizierten Daten abweichen.

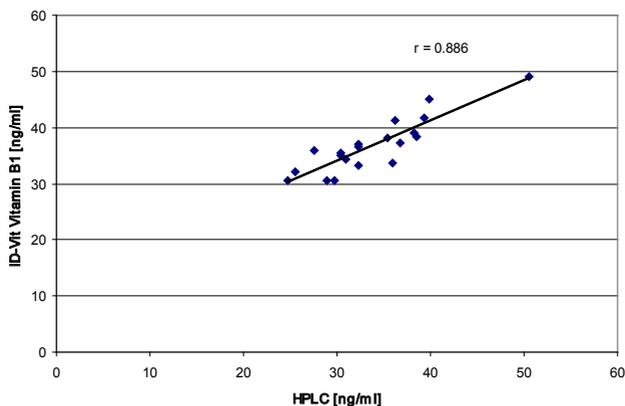
12. TESTCHARAKTERISTIKA (mit humanem Vollblut erhoben)

Präzision und Reproduzierbarkeit

Intra-Assay (n = 28)		
	Vitamin B ₁ [µg/l] Mittelwert	VK [%]
Probe 1	54.5	2.75
Inter-Assay (n = 5)		
	Vitamin B ₁ [µg/l] Mittelwert	VK [%]
Probe 1	56.94	3.81

Vergleichbarkeit der Werte

Der Vitamin-B₁-Gehalt wurde parallel sowohl mit der HPLC als auch mit dem mikrobiologischen Verfahren in 21 Proben gemessen. Der Korrelationskoeffizient betrug $r = 0.886$. Die berechnete Regressionsgerade war: $y = 0,7215x + 12,376$.



13. LITERATUR

Koike H et al. (2006) Myopathy in thiamine deficiency: Analysis of a case. J Neurol Sci Aug 18
 Lonsdale D (2006) A review of the biochemistry, metabolism and clinical benefits of thiamin(e)
 and its derivatives. Evid Based Complement Alternat Med. 2006 Mar;3(1):49-59

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.
- 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 charakteristischen Testdaten wie Pipettiervolumina der verschiedenen Komponenten und der Aufbereitung der Proben wurden firmenintern festgelegt. Nicht mit dem Hersteller abgesprochene Veränderungen in der Testdurchführung können die Resultate beeinflussen. Das ifp Institut für Produktqualität GmbH übernimmt für direkt daraus resultierende Schäden und Folgeschäden keine Haftung.

Verwendete Symbole:



Temperaturbegrenzung



Bestellnummer



In-Vitro-Diagnostikum



Inhalt ausreichend für <n>
Prüfungen



Hersteller



Verwendbar bis



Chargenbezeichnung

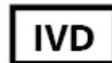
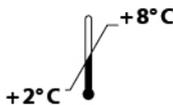
ID-Vit[®] Vitamin B₁

Microbiological test kit for the determination of
vitamin B₁ in whole blood using a
Lactobacillus fermentum coated microtiter plate
For use in human and veterinary medicine and in research

Valid from 02.05.2011



KIF001



ifp Institut für Produktqualität GmbH
Teltowkanalstr. 2
12247 Berlin, Germany
www.produktqualitaet.com

Distributed by:
Immundiagnostik AG
Stubenwald-Allee 8a
64625 Bensheim, Germany
www.immundiagnostik.com

Content

1. INTENDED USE _____	13
2. INTRODUCTION _____	13
3. PRINCIPLE OF THE TEST _____	14
4. MATERIAL SUPPLIED _____	14
5. MATERIAL REQUIRED BUT NOT SUPPLIED _____	15
6. PREPARATION AND STORAGE OF REAGENTS _____	15
7. PRECAUTIONS _____	16
8. SAMPLE PREPARATION _____	16
8.1 Sample pretreatment _____	16
8.2 Sample dilution _____	17
9. ASSAY PROCEDURE _____	17
9.1 Test preparations _____	17
9.2 Test Initiation _____	18
9.3 Measurement _____	19
10. EVALUATION OF RESULTS _____	19
11. EXPECTED VALUES _____	19
12. PERFORMANCE CHARACTERISTICS _____	20
13. REFERENCES _____	21
14. GENERAL NOTES ON THE TEST AND TEST PROCEDURE _____	21

1. INTENDED USE

ID-Vit® Vitamin B₁ is a microtiter plate test kit based on a microbiological assay which measures the Vitamin B₁ content in whole blood. The test kit contains all required reagents, e.g. standard, medium and microtiter plate coated with a specific microorganism, sufficient for 96 determinations including standard curves. An ELISA reader is required for evaluation of the Vitamin B₁ content. For use in human and veterinary medicine and in research. The test kit is for in vitro diagnostic use only.

2. INTRODUCTION

The bioactive form of vitamin B₁ is thiamin pyrophosphate. It plays an important role as a co-enzyme in carbohydrate and amino acid metabolism. Thiamine pyrophosphate is a vital co-factor for enzymes involved in several key metabolic processes in the nervous system, the heart, the blood cells, and the muscle. Vitamin B₁ assists in the conversion of carbohydrates into energy, necessary for healthy brain and nerve cells and heart function.

Vitamin B₁ deficiency

Vitamin B₁ deficiency may result from a deficiency in the diet. Eventually, a severe vitamin B₁ deficiency may lead to BERI-BERI, characterized by nerve, heart, and brain abnormalities. Deficiency may occur in alcoholics or in special clinical situations such as hemodialysis, chronic peritoneal dialysis, or after administration of glucose to a vitamin B₁-depleted patient. Further vitamin B₁ deficiency diseases are Wernicke's encephalopathy, Korsakow-syndrome, and some forms of Landry's paralysis. Also myopathie was found in relation to thiamine deficiency.

Indications for vitamin B₁ determination

- Suspicion of Vitamin B₁ deficiency
- Determination of the metabolic active Vitamin B₁
- Vitamin-B₁-supplementation of patients receiving total parenteral nutrition
- Disorders of the amino acid metabolism
- Malabsorption due to alcoholism
- Patients with suspicion of neuritis

3. PRINCIPLE OF THE TEST

The blood samples are enzymatically pre-treated and then transferred in the wells of a microtiter plate [PLATE] coated with *Lactobacillus fermentum*. The addition of vitamin B₁ in either standards [STD], control [CTRL1, CTRL2] or samples gives a vitamin B₁-dependent growth response until vitamin B₁ is consumed. After incubation at **37 °C for 48 h**, the growth of *Lactobacillus fermentum* is measured turbidimetrically at 610 - 630 nm (alternatively at 540 - 550 nm) in an ELISA-reader and a standard curve is generated from the dilution series. The amount of vitamin B₁ is directly proportional to the turbidity.

4. MATERIAL SUPPLIED

Catalog No	Label	Kit Components	Quantity
KIF001MTP	PLATE	One <i>Lactobacillus fermentum</i> -precoated microtiter plate, ready to use	12 x 8 wells
KIF001SO	SOL	Sample preparation buffer 5 ml, ready to use	5 x
KIF001ENZ	ENZ	Enzyme, lyophilized	5 x
KIF001DI	DIL	Water 30 ml	4 x
KIF001ME	ASYMED	Vitamin B ₁ assay medium	4 x
KIF001ST	STD	Vitamin B ₁ standard	4 x
KIF001KO1	CTRL1	Vitamin B ₁ control 1	4 x
KIF001KO2	CTRL2	Vitamin B ₁ control 2	4 x
KIF001FO	FOL	Cover plastic foil	4 x
KIF001FR	FRA	Replacement holder for 96-well plates	1 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)
- Micropipette 20 - 200 µl
- Micropipette 100 -1000 µl
- Micropipette tips to deliver 20 - 200 µl and 100 -1000 µl, sterile
- Pipettes of 5 and 10 ml
- 1,5 - 2 ml reaction vials, sterile
- 0,2 µm sterile polyethersulfone filter with a sterile tip
- 15 ml centrifugal tubes, sterile (e.g. Falcon tubes)
- Biocentrifuge (10 000 x g)

6. PREPARATION AND STORAGE OF REAGENTS

- Store test kit / reagents at 2-8 °C.
- Prepare reagents freshly and use immediately after preparation. Discard remaining unused reagents and waste in accordance with country, federal, state, and local regulations.
- Put unused reagents (standard, medium, controls) in the test kit and store at 2-8 °C.
- Store unused strips in the original package with dry bag securely closed at 2-8 °C to prevent contamination or moisture exposure.
- No warranty can be given after the expiry date (see label of test package).
- To run assay more than once, ensure that reagents are stored at conditions stated on the label. Prepare only the appropriate amount necessary for each assay. The kit can be used up to 4 times within the expiry date stated on the label.

7. PRECAUTIONS

- As the test is based on a microbiological method, the general guidelines for sterile work must be observed as far as possible, (work in a sterile bench, PCR-Hood, use of sterile instruments or equipment).
- GLP (Good Laboratory Practice)-guidelines should be observed.
- Water quality is extremely important. Only the water delivered with the test kit [DIL] should be used for medium dilution [ASYMED], standard [STD] and control [CTRL1, CTRL2] reconstitution as well as for sample preparation.
- It is essential to run a standard curve for each separate assay.
- It is recommended to run a duplicate standard [STD] curve and controls [CTRL1, CTRL2] as well as samples.
- If a higher dilution results in a higher measured value, inhibitors like antibiotics might be present.
- Reagents should not be used beyond the expiration date shown on kit label.
- Wear gloves during the test.
- Used microtiter plates [PLATE] and materials that have been in contact with patient's samples should be handled and disposed as potentially infectious.
- Signs for reagent damage: The highest standard should have an absorption higher than 0.6 Extinktion units ($A_{630nm} > 0,6$).

8. SAMPLE PREPARATION

- Venous fasting blood samples are suited for this test system. EDTA-whole-blood must be collected.
- Vitamin B₁ is light- and temperature sensitive; therefore the samples must be protected from light and refrigerated at 2-8° C.
- Samples are stable in the dark at 2-8° C for 1 day. For longer storage, samples should be frozen at -20 °C. **Do not** freeze and thaw repeatedly.

8.1 Sample pretreatment

Add 4 ml sample preparation buffer [SOL] to the bottle with the lyophilized enzyme [ENZ], close it and vortex.

Add 100 µl whole blood or control [CTRL1, CTRL2] to 400 µl of the prepared enzyme solution, mix and incubate at 37° C for 30 min in the dark. Afterwards, heat to 95 °C for 30 min, then cool quickly and centrifuge for 10 min at 10000 x g.

8.2 Sample dilution

Take 200 µl from the supernatant of the treated sample or control [CTRL1, CTRL2], add 200 µl water [DIL] and mix. The treatment and dilution results in a final dilution of 1:10 (= sample dilution factor).

9. ASSAY PROCEDURE

Procedural notes

- Quality control guidelines should be observed.
- 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.
- The assay should always be performed according the enclosed manual.

9.1 Test preparations

Take from the kit the reagents and materials needed for the test. Put unused test kit components back into the refrigerator. Bring all necessary reagents to room temperature.

Water [DIL] for medium [ASYMED], standard [STD] and control [CTRL1, CTRL2]

Push the lid up, pull it back to the rim of the glass and then remove the entire seal by turning.

Assay medium [ASYMED]

- The medium must be freshly prepared before each test.
- Take the dry bag out of medium vial [ASYMED] by tweezers, shake off and discard.
- Add 10 ml of water [DIL] to the assay medium [ASYMED], securely close the bottle and shake well. The amount is sufficient for 6 strips.
- Heat the bottle with medium [ASYMED] in a water-bath at 95 °C for 5 min, while shaking well at least twice. It is important to make sure that the medium bottle [ASYMED] is firmly closed at all times.
- Quickly cool the medium bottle [ASYMED] to under 30 °C.
- Filter 10 ml medium [ASYMED] sterilely with a 0.2 µm filter in a centrifuge test tube (e.g. 15 ml, Falcon).

Standard [STD]

Before the test, freshly prepare the standard curve solutions:

- Open the bottle of standard [STD], place the screw-top lid upside-down on the work bench.

- Add x ml (x = see QS test kit data sheet) water [DIL] from the test kit to the standard bottle [STD], close the bottle and shake (= standard concentrate).
- Add water [DIL] into 6 sterile reaction vials (capacity 1.5 – 2.0 ml) and then pipet the standard concentrate to the vials. Prepare a standard curve using the following scheme:

Vitamin B ₁ [µg / l]	Water [DIL] [µl]	+	Standard [STD] [µl]	=	Total volume [µl]
Blank: 0	850	+	0	=	850
Standard 1: 3	850	+	150	=	1000
Standard 2: 6	700	+	300	=	1000
Standard 3: 9	370	+	300	=	670
Standard 4: 12	200	+	300	=	500
Standard 5: 15	200	+	600	=	800

Control [CTRL1, CTRL2]

- The controls must be freshly prepared before the test.
- Open the bottle of control [CTRL1, CTRL2], remove seal. Dispose of screw-top lid and seal.
- Add 0.5 ml water [DIL] from the test kit to the control bottle [CTRL1, CTRL2], close the bottle and dissolve by vortexing the bottle (= control 1, control 2).
- Treat the control afterwards as the sample is treated.
- Pipette 150 µl of the diluted control [CTRL1, CTRL2] into each well. We recommend to run a duplicate.
- For the concentration of the controls [CTRL1, CTRL2] please see control specification.

9.2 Test Initiation

- Take as many microtiter strips as needed from the kit in put them in the second microtiter strip holder [FRA]. Return unused strips to the original foil bag, reseal them together with the desiccant provided, and store at 2-8° C to prevent contamination or moisture exposure.
- A medium solution is sufficient for 6 strips.
- Put 150 µl Vitamin B₁ assay medium [ASYMED] in the cavities.
- Add 150 µl of standard [STD], respectively, sample or control [CTRL1, CTRL2] in the cavities. Pre-rinse the pipette tip with standard and sample solution respectively.
- Carefully seal the plate with plastic foil [FOL]. Important: the cavities must be made airtight by pressing down with the hand!
- Keep at 37 °C für 48 h in an incubator.

9.3 Measurement

- Securely press the foil [FOL] down with the hand.
- Upturn the plate [PLATE] onto a tabletop and shake the germination well.
- Turn the plate [PLATE] over again and **carefully** remove the foil [FOL], beginning with the upper right corner and pulling diagonally backwards at an angle of 180°. 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 pipette tip or a needle.
- Read turbidity in an ELISA-Reader at E 610 - 630 nm (alternatively at 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 hrs incubation.

10. EVALUATION OF RESULTS

We recommend to use the 4-Parameter-algorithm to calculate the results. The sample dilution factor should be considered for data evaluation.

Vitamin B₁ in µg/l = Value from the standard curve x sample dilution factor (10)

11. EXPECTED VALUES

Vitamin B₁ concentration was determined in 42 samples of blood donors. The median value of this set of numbers was 48.1 (44.3) µg/L. The array of 2-SD was 30 - 66 µg/L. Figure 1 shows the distribution of the blood donor's values.

Distribution of concentrations

Numer of samples	42
Mean	48.1
Median	44.3
SD	8.9
MW-2* SD	30.2
MW+2*SD	65.9

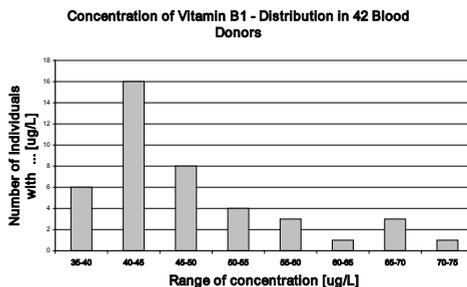


Fig. 1: Distribution of blood donor values

Please note: A concentration range of 30-150 µg/l Vitamin B₁ is covered at a sample dilution 1 : 10. We recommend each laboratory to develop its own normal range as normal ranges depend on the choice of patient collective. The values mentioned above are only for orientation and can deviate from other published data.

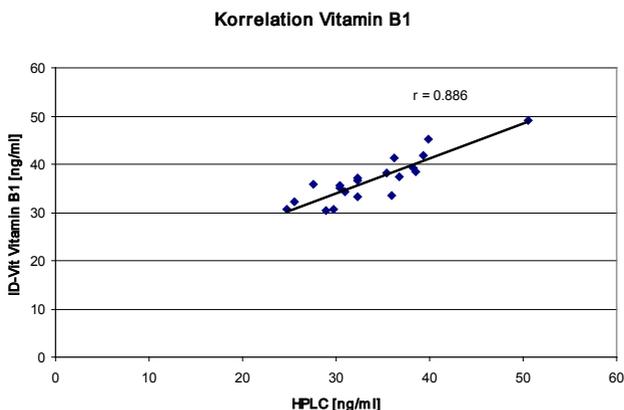
12. PERFORMANCE CHARACTERISTICS (obtained using human whole blood)

Precision and reproducibility

Intra-Assay (n = 28)		
	Vitamin B ₁ [$\mu\text{g/l}$] Mean value	VK [%]
Sample 1	54.5	2.75
Inter-Assay (n = 5)		
	Vitamin B ₁ [$\mu\text{g/l}$] Mean value	VK [%]
Sample 1	56.94	3.81

Correlation to HPLC

The concentration of vitamin B₁ was determined by the ID-Vit® Vitamin B₁ assay in parallel to HPLC in 21 samples. Correlation coefficient: $r = 0.886$. Regression line: $y = 0,7215x + 12,376$.



13. REFERENCES

Koike H et al. (2006) Myopathy in thiamine deficiency: Analysis of a case. J Neurol Sci Aug 18
 Lonsdale D (2006) A review of the biochemistry, metabolism and clinical benefits of thiamin(e) and its derivatives. Evid Based Complement Alternat Med. 2006 Mar;3(1):49-59

14. GENERAL NOTES ON THE TEST AND TEST PROCEDURE

- This assay was produced and put on the market according to the IVD guidelines of 98/79/EC.
- Test components contain organic solvents. Contact with skin or mucous membranes must be avoided.
- All reagents in the test package are for in vitro diagnostic use only.
- Reagents should not be used after the date of expiry stated on the label.
- Single components with different lot numbers should not be mixed or exchanged.
- Guidelines for medical laboratories should be observed.
- Incubation time, incubation temperature and pipetting volumes of the different components are defined by the producer. Any variations of the test procedure that are not coordinated with the producer may influence the results of the test. ifp Institute for Product Quality GmbH can, therefore, not be held reliable for any damage resulting from this.

Used symbols:



Temperature limitation



Catalogue Number



In Vitro Diagnostic Medical Device



Contains sufficient for <n> tests



Manufacturer



Use by



Lot number



Immundiagnostik AG

Stubenwald-Allee 8a
D-64625 Bensheim

Tel.: +49(0) 62 51/70 19 00

Fax: +49(0) 62 51/84 94 30

info@immundiagnostik.com

www.immundiagnostik.com