

Arbeitsanleitung / Manual
(Vorläufige / Preliminary)

ID-Vit[®] Vitamin B₂

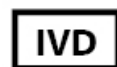
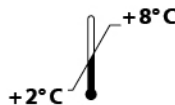
Mikrobiologisches Verfahren zur Bestimmung des Gesamtgehalts
von Vitamin B₂ (Riboflavin) in Serum mittels einer
Lactobacillus rhamnosus -beschichteten Mikrotiterplatte
Zur Verwendung in Human- und Veterinärmedizin und zu For-
schungszwecken

Microbiological test kit for the determination of
vitamin B₂ (riboflavin) in serum using a
Lactobacillus rhamnosus coated microtitre plate
For use in human and veterinary medicine and in research

Gültig ab / Valid from 02.03.2010



KIF002



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

1. VERWENDUNGSZWECK

Der **ID-Vit® Vitamin B₂** Mikrotiterplattentest ist ein mikrobiologisches Verfahren zur Bestimmung des Gesamtgehaltes an freiem Vitamin B₂ Serum. 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

Vitamin B₂ (Riboflavin) ist als Bestandteil von Flavinnukleotiden am Wasserstoff- und Elektronentransport beteiligt und gehört dabei zu den wichtigsten Koenzymen des Kohlenhydrat-, Fettsäure- und Proteinstoffwechsels.

Die biologische Form von Vitamin B₂ ist das **Riboflavinphosphat**. Die wichtigsten Derivate sind Flavinmononukleotid (FMN) und Flavinadenindinukleotid (FAD). Im Blut liegt der größte Teil als FAD und FMN vor. In freier Form liegen nur etwa 0,5 - 2 % vor. Die Bindung erfolgt meist an Riboflavin und Albumin bindende Proteine. Die Elimination erfolgt vorwiegend renal. Da sie jedoch starken Schwankungen unterliegt, ist die Bestimmung des Riboflavinstatus im Urin nur bedingt sinnvoll.

Indikationen zur Bestimmung von Vitamin B₂

- Chronische Diarrhö
- Präeklampsie
- Schilddrüsendysfunktionen
- Diabetes mellitus
- Alkoholabusus
- Anorexie
- Laktoseintoleranz

3. TESTPRINZIP

Serumproben werden unverdünnt in die Kavitäten einer Mikrotiterplatte [PLATE] gegeben, die mit *Lactobacillus rhamnosus* beschichtet sind. Nach Zugabe von Vitamin B₂ als Standard [STD], Kontrolle [CTRL] oder als in einer Serumprobe enthaltenes Vitamin wächst der Keim solange, 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 des Vitamins B₂ ist dabei direkt proportional der Trübung.

4. INHALT DER TESTPACKUNG

Artikel Nr.	Abkürzung	Kit Komponenten	Menge
KIF002MTP	PLATE	1 x Mikrotiterplatte, beschichtet mit <i>Lactobacillus rhamnosus</i> , gebrauchsfertig	12 Streifen à 8 Kavitäten
KIF002DI	DIL	Wasser 30 ml, gebrauchsfertig	4 x
KIF002ME	ASYMED	Vitamin B ₂ -Assay-Medium	4x
KIF002ST	STD	Vitamin B ₂ -Standard	4 x
KIF002KO	CTRL	Vitamin-B ₂ -Kontrolle	4 x
KIF002FO	FOL	Abklebefolie	4 x
KIF002FR	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 REAGENZIEIN

- Den Testkit / die Reagenzien bei 2 - 8 °C lagern.
- Angesetzte Reagenzien unmittelbar verwenden und nach Testansatz verwerfen.
- Nicht angebrochene Reagenzien (Standard, Medium, Kontrolle) 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], die Rekonstitution von Standards [STD] und Kontrollen [CTRL] und die Probenverdünnung verwenden.
- Bei jeder Testdurchführung sollte eine **Kalibration** mitgeführt werden.
- Es wird eine **Doppelbestimmung** der Standards [STD] 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

Hinweise

- Als Probe eignet sich Serum.
- Die Haltbarkeit der Probe beträgt bei 2 - 8 °C im Dunkeln 1 Tag. 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 x g). Den resultierenden Überstand im Test einsetzen.

8.1. Probenvorbehandlung

Die zentrifugierte Probe kann direkt auf die Platte gegeben werden.

9. TESTDURCHFÜHRUNG

Hinweise

- Qualitätskontrollen sollten immer mitgemessen werden.
- Inkubationszeit, Temperatur und Pipettiervolumina 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 beigelegten 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] Kontrolle [CTRL] und Standard [STD]

- 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.
- Medium [ASYMED] vom in der Flasche befindlichen Trockenbeutel abschütteln (Pinzette). 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 90 - 100 °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 ₂ [µg / l]	Wasser [DIL] [µl]	+	Standard [STD] [µl]	=	Gesamtvolumen [µl]
Blank: 0	900	+	0	=	900
Standard 1: 5	950	+	50	=	1000
Standard 2: 10	900	+	100	=	1000
Standard 3: 20	400	+	100	=	500
Standard 4: 30	350	+	150	=	500
Standard 5: 60	200	+	300	=	500

Kontrolle [CTRL]

Kontrolle vor dem Test frisch herstellen:

- Kontrollflasche [CTRL] öffnen, Schraubdeckel mit dem Kopf nach unten ablegen.
- In die Kontrollflasche [CTRL] 5 ml Wasser [DIL] aus dem Testkit zugeben, Deckel schließen und Fläschchen vortexten (= Kontrolle).

- Die Kontrolle [CTRL] wird nach dem Rekonstituieren wie eine Probe behandelt.
- Pro Kavität werden 150 µl der verdünnten Kontrolle [CTRL] pipettiert. Wir empfehlen eine Doppelbestimmung der Kontrolle [CTRL].
- Die Konzentration der Kontrolle [CTRL] 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 B₂-Assay-Medium [ASYMED] in die Kavitäten geben.
- 150 µl Standard [STD], Kontrolle [CTRL] bzw. Probe 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 Abklebefolie [FOL] diagonal, von unten links beginnend, 180° nach hinten vorsichtig abziehen. Die Platte dabei fixieren.
- 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.

Serum

Vitamin B₂ in µg/l = Wert aus Standardkurve

Referenzbereich für Humanserum

(folgt in Kürze)

Anmerkung

Wir empfehlen jedem Labor seinen eigenen Normalwerte-Bereich zu erstellen, weil Referenzbereiche stark von der Auswahl des Probandenkollektivs abhängig sind. Die Angabe des Referenzbereichs für Vitamin B₂ dient lediglich der Orientierung und kann von anderen publizierten Daten abweichen.

11. TESTCHARAKTERISTIKA (mit Humanserum erhoben)

Präzision und Reproduzierbarkeit

Intra-Assay		
	Vitamin B ₂ [µg/l]	VK [%]
Probe 1 (n = 10)	12.21	4.47
Probe 2 (n = 6)	14.28	7.98
Inter-Assay		
	Vitamin B ₂ [µg/l]	VK [%]
Probe 1 (n = 10)	13.87	11.57
Probe 2 (n = 6)	11.30	10.69

12. LITERATUR

Powers HJ (2003) Riboflavin (vitamin B-2) and health. Am J Clin Nutr 77(6):1352-60. Review

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.
- 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

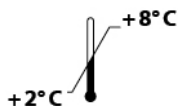
ID-Vit[®] Vitamin B₂

**Microbiological test kit for the determination of
vitamin B₂ (riboflavin) in serum using a
Lactobacillus rhamnosus coated microtitre plate
For use in human and veterinary medicine and in research**

Valid from 02.03.2010



KIF002



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 USE13
- 2. INTRODUCTION13
- 3. PRINCIPLE OF THE TEST14
- 4. MATERIAL SUPPLIED.....14
- 5. MATERIAL REQUIRED BUT NOT SUPPLIED14
- 6. PREPARATION AND STORAGE OF REAGENTS15
- 7. PRECAUTIONS15
- 8. SAMPLE PREPARATION16
 - 8.1 Sample pretreatment16
- 9. ASSAY PROCEDURE.....16
 - 9.1. Test preparations.....16
 - 9.2. Test Initiation18
 - 9.3. Measurement.....18
- 10. EVALUATION OF RESULTS18
- 11. PERFORMANCE CHARACTERISTICS19
- 12. REFERENCES19
- 13. GENERAL NOTES ON THE TEST AND TEST PROCEDURE20

1. INTENDED USE

ID-Vit® Vitamin B₂ is a microtiter plate test kit based on a microbiological assay which measures the total Vitamin B₂ content in serum. 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 B₂ content. For use in human and veterinary medicine and in research. The test kit is for in vitro diagnostic use only.

2. INTRODUCTION

Vitamin B₂ (riboflavin), as flavin mononucleotide (FMN) or flavin adenine dinucleotide (FAD), acts as an essential coenzyme in many oxidation-reduction reactions. Flavins are critical for the metabolism of carbohydrates, fats, and proteins. FAD is part of the electron transport (respiratory) chain, which is central to energy production. In conjunction with cytochrome P-450, flavins also participate in the metabolism of drugs and toxins.

Vitamin B₂ -Deficiency

Riboflavin is unique among the water soluble vitamins in that milk and dairy products make the greatest contribution to its intake in Western diets. Biochemical signs of depletion arise within only a few days of dietary deprivation. Poor riboflavin status in Western countries seems to be of most concern for the elderly and adolescents, despite the diversity of riboflavin-rich foods available. Deficiency results in oral, ocular, cutaneous, and genital lesions.

Primary riboflavin deficiency is associated with inadequate consumption of milk and other animal products. **Secondary deficiencies** are most common in chronic diarrheas, liver disease, chronic alcoholism, and postoperative situations in which nutrient infusions lack supplementary vitamins.

Indications for Vitamin-B₂-determination:

- Chronic diarrhoe
- Preeclampsia
- Alcohol abuse
- Anorexia
- Lactose intolerance
- Hypothyroidism
- Diabetes mellitus

3. PRINCIPLE OF THE TEST

Serum samples are transferred in the wells of a microtiter plate [PLATE] coated with *Lactobacillus rhamnosus*. The addition of Vitamin B₂ in either standards [STD] or samples gives a Vitamin B₂-dependent growth response until Vitamin B₂ 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 a standard curve is generated from the dilution series. The amount of Vitamin B₂ is directly proportional to the turbidity.

4. MATERIAL SUPPLIED

Catalog No	Label	Kit Components	Quantity
KIF002MTP	PLATE	One <i>Lactobacillus rhamnosus</i> -precoated microtiter plate, ready to use	12 x 8 wells
KIF002DI	DIL	Water 30 ml	4 x
KIF002ME	ASYMED	Vitamin B ₂ assay medium	4 x
KIF002ST	STD	Vitamin B ₂ standard	4 x
KIF002KO	CTRL	Vitamin B ₂ control	4 x
KIF002FO	FOL	Cover plastic foil	4 x
KIF002FR	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) 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] 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 as well as a sample analysis.
- 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 Extinction units ($A_{630\text{ nm}} > 0,6$)

8. SAMPLE PREPARATION

Notes

- Patient serum is used for analysis.
- Original samples should be kept light-protected at 2-8°C until measurement. The samples are stable for 8 hours at 2-8°C 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 x g before assaying to obtain fat free serum as far as possible.
- Samples should be centrifuged (5 min at 10000 g) prior to measurement and the resulting supernatant used in the test.

8.1 Sample pretreatment

Centrifuged serum samples can be added undiluted.

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 as many microtiter strips as needed from kit. Return unused strips and any unused test kit component to the original foil bag, reseal them together with the desiccant provided, and put in the refrigerator. Bring all necessary reagents to room temperature.

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

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 90 - 100 °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] sterily 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 ₂ [µg / l]	Water [DIL] [µl]	+	Standard [STD] [µl]	=	Total volume [µl]
Blank: 0	900	+	0	=	900
Standard 1: 5	950	+	50	=	1000
Standard 2: 10	900	+	100	=	1000
Standard 3: 20	400	+	100	=	500
Standard 4: 30	350	+	150	=	500
Standard 5: 60	200	+	300	=	500

Control [CTRL]

- The control must be freshly prepared before the test.
- Open the bottle of control [CTRL], remove seal. Dispose of screw-top lid and seal.
- Add 5 ml water [DIL] from the test kit to the control bottle [CTRL], close the bottle and dissolve by vortexing the bottle (= control).
- Treat the control afterwards as the sample is treated.
- Pipette 150 µl of the reconstituted control [CTRL] into each well. We recommend to run a duplicate.

- For the concentration of the control [CTRL] 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 B₂ assay medium [ASYMED] in the cavities.
- Add 150 µl standard [STD], control [CTRL], respectively, sample in the cavities. Pre-rinse the pipette tip with standard, control 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** for **48 hrs** 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 lower, left corner and pulling diagonally backwards at an angle of 180°.
- 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 hrs 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.

Serum

Vitamin B₂ in µg/l = Value from the standard curve

Reference value for human serum

(Data available soon)

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.

11. PERFORMANCE CHARACTERISTICS (obtained using human serum)**Precision and reproducibility**

Intra-Assay		
	Vitamin B ₂ [µg/l]	CV [%]
Sample 1 (n = 10)	12.21	4.47
Sample 2 (n = 6)	14.28	7.98
Inter-Assay		
	Vitamin B ₂ [µg/l]	CV [%]
Sample 1(n = 10)	13.87	11.57
Sample 2 (n = 6)	11.30	10.69

12. REFERENCES

Powers HJ (2003) Riboflavin (vitamin B-2) and health. Am J Clin Nutr 77(6):1352-60. Review

13. 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