

ID-Vit® Niacin

Mikrobiologisches Verfahren zur Bestimmung des Gesamtgehalts an freiem Niacin (Nikotinsäure/Nikotinsäureamid) in Serum mittels einer Lactobacillus-beschichteten Mikrotiterplatte
Zur Verwendung in Human- und Veterinärmedizin und zu Forschungszwecken

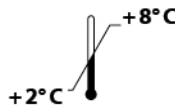
ID-Vit® Niacin

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

Gültig ab / Valid from 18.04.2011



KIF003



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 14

1. VERWENDUNGSZWECK 2

2. EINLEITUNG 2

3. TESTPRINZIP 3

4. INHALT DER TESTPACKUNG 4

5. ERFORDERLICHE LABORGERÄTE UND HILFSMITTEL 4

6. LAGERUNG DER REAGENZIEN 4

7. HINWEISE UND VORSICHTSMASSNAHMEN 5

8. PROBENVORBEREITUNG 6

 8.1. Probenverdünnung 6

9. TESTDURCHFÜHRUNG 6

 9.1. Testvorbereitungen 6

 9.2. Testansatz 8

 9.3. Messung 8

10. AUSWERTUNG DER ERGEBNISSE 8

11. TESTCHARAKTERISTIKA 9

 Präzision und Reproduzierbarkeit 9

 Wiederfindung 9

 Linearität 11

12. LITERATUR 11

13. ALLGEMEINE HINWEISE ZUM TEST 12

1. VERWENDUNGSZWECK

Der **ID-Vit® Niacin** Mikrotiterplattentest ist ein mikrobiologisches Verfahren zur Bestimmung des Gesamtgehaltes an freiem Niacin (Nikotinsäure und Nikotinsäureamid) in Serum. Alle benötigten Reagenzien und der Standard sind im Test enthalten. Mit dem Test können 96 Bestimmungen 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

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

Niacin-Mangelercheinungen

Symptome eines **leichten Niacinmangels** können sein:

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

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

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

Cholesterinsenker Niacin

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

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

Indikationen

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

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

3. TESTPRINZIP

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

4. INHALT DER TESTPACKUNG

Artikel Nr.	Abkürzung	Kit Komponenten	Menge
KIF003MTP	PLATE	1 x Mikrotiterplatte, beschichtet mit <i>Lactobacillus plantarum</i> , gebrauchsfertig	12 Streifen à 8 Kavitäten
KIF003SO	SOL	Probenstabilisierungspuffer 5 ml, gebrauchsfertig	4 x
KIF003DI	DIL	Wasser 30 ml, gebrauchsfertig	4 x
KIF003ME	ASYMED	Niacin-Assay-Medium	4 x
KIF003ST	STD	Niacin -Standard	4 x
KIF003FO	FOL	Ablebefolie	4 x
KIF003FR	FRA	Ersatzrahmen zum Umstecken der Mikrotiterstreifen	1 x
KIF003KO1	CTRL1	Niacin-Kontrolle 1	4 x
KIF003KO2	CTRL2	Niacin-Kontrolle 2	4 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)

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, Wasser, Proben-

stabilisierungspuffer) 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

Hinweise

- Als Probe eignet sich Serum.
- Die Haltbarkeit der Probe beträgt bei 2 - 8 °C im Dunkeln 3 Tage. Niacin an sich ist bei 2 - 8 °C auch länger haltbar, das Serum jedoch nicht. Deshalb sollte die Probe zur längeren Lagerung 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, die sichtbare Mengen an Feststoff (meist Kryoproteine) enthalten, sollten vor Einsatz zentrifugiert werden (mind. 5 min bei 10000 g) und der resultierende Überstand sollte im Test eingesetzt werden.

8.1. Probenverdünnung

Serumproben und die Kontrollen [CTRL1, CTRL2] müssen vor dem Einsatz im Test 1 : 4 (= Probenverdünnungsfaktor) mit dem Probenstabilisierungspuffer [SOL] aus dem Testkit verdünnt werden: 100 µl Probe + 300 µl Probenstabilisierungspuffer [SOL]. Sind weitere Verdünnungen notwendig, sollte dies mit dem Probenstabilisierungspuffer [SOL] erfolgen.

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 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.
- Trockenbeutel vom Medium [ASYMED] im Fläschchen mit Pinzette abschütteln, herausnehmen und werfen.
- 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:

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

Kontrollen [CTRL1, CTRL2]

Kontrollen vor dem Test frisch herstellen:

- Kontrollflaschen [CTRL1, CTRL2] öffnen, Schraubdeckel mit dem Kopf nach unten ablegen.
- 1,25 ml Wasser [DIL] aus dem Testkit in die Kontrollflasche [CTRL1, CTRL2] zugeben, Deckel schließen und Fläschche vortexten (= Kontrolle 1, Kontrolle 2).
- Die Kontrollen [CTRL1, CTRL2] werden nach dem Rekonstituieren wie Proben behandelt.

- Pro Kavität werden 150 µl der verdünnten Kontrollen [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 Niacin-Assay-Medium [ASYMED] in die Kavitäten geben.
- 150 µl Standard [STD], Kontrolle [CTRL1, CTRL2] bzw. Probe in die jeweiligen Kavitäten pipettieren. Pipettenspitzen jeweils mit der Standard-, Kontroll- 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

Niacin in µg / l = Wert aus Standardkurve x Probenverdünnungsfaktor

Referenzbereich für Humanserum

(n = 83) Niacin (freies): 17 - 85 µg/l (Mittelwert ± 2 SD)

Anmerkung

Bei einem Probenverdünnungsfaktor von 4 ist ein Bereich von 8 - 160 µg/l Niacin abgedeckt (Referenzbereich 17 - 85 µg/l).

Wir empfehlen, dass jedes Labor seinen eigenen Normalwerte-Bereich erstellt, weil Referenzbereiche stark von der Auswahl des Probandenkollektivs abhängig sind. Die Angabe des Referenzbereichs für Niacin dient lediglich der Orientierung und kann von anderen publizierten Daten abweichen.

11. TESTCHARAKTERISTIKA (mit Humanserum erhoben)

Präzision und Reproduzierbarkeit

Intra-Assay (n = 6)		
	Niacin [µg/l]	VK [%]
Probe 1	64	2.9
Inter-Assay (n = 5)		
	Niacin [µg/l]	VK [%]
Probe 1	64	3.4

Wiederfindung

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

n = 9

Probe	Mittelwert der Originalprobe [µg/l]	Spike [µg/l]	Niacin erwartet [µg/l]	Niacin gemessen [µg/l]	Wiederfindungsrate [%]
A	21.5	60	81.5	77	93
		120	141.5	134	94
		180	201.5	203	101

Wiederfindungsrate gesamt [%]

96

n = 9

Probe	Mittelwert der Originalprobe [µg/l]	Spike [µg/l]	Niacin erwartet [µg/l]	Niacin gemessen [µg/l]	Wiederfindungsrate [%]
B	16.9	60	76.9	76	99
		120	136.9	136	100
		180	196.9	199	101
Wiederfindungsrate gesamt [%]					100

n = 9

Probe	Mittelwert der Originalprobe [µg/l]	Spike [µg/l]	Niacin erwartet [µg/l]	Niacin gemessen [µg/l]	Wiederfindungsrate [%]
C	19.9	60	79.9	79	99
		120	139.9	145	104
		180	199.9	203	102
Wiederfindungsrate gesamt [%]					102

n = 10

Probe	Mittelwert der Originalprobe [µg/l]	Spike [µg/l]	Niacin erwartet [µg/l]	Niacin gemessen [µg/l]	Wiederfin- dungsrate [%]
D	18.3	60	78.3	82	106
		120	138.3	139	100
		180	198.3	195	98
Wiederfindungsrate gesamt [%]					102

Linearität

Proben von 2 Patienten wurden verdünnt und analysiert. Die Ergebnisse:

n = 2

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

12. LITERATUR

Morris M C et al. (2004) Dietary niacin and the risk of incident Alzheimer´s disease and of cognitive decline. J Neurol Neurosurg Psychiatry 75: 1093-1099

Strohecker R, Henning H (1963) Vitamin-Bestimmungen. Hrsg. E. Merck AG, Darmstadt. Verlag Chemie, Weinheim

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 Diagnostik in Human- und Veterinärmedizin und zu Forschungszwecken eingesetzt werden. Nur zur In-vitro-Diagnostik.
- 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

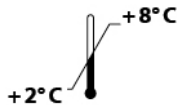
ID-Vit® Niacin

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

Valid from 18.04.2011



KIF003



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 USE15
- 2. INTRODUCTION15
- 3. PRINCIPLE OF THE TEST16
- 4. MATERIAL SUPPLIED.....17
- 5. MATERIAL REQUIRED BUT NOT SUPPLIED17
- 6. PREPARATION AND STORAGE OF REAGENTS18
- 7. PRECAUTIONS18
- 8. SAMPLE PREPARATION.....19
 - 8.1 Sample dilution19
- 9. ASSAY PROCEDURE.....19
 - 9.1. Test preparations.....19
 - 9.2. Test Initiation21
 - 9.3. Measurement21
- 10. EVALUATION OF RESULTS22
- 11. PERFORMANCE CHARACTERISTICS22
 - Precision and reproducibility22
 - Recovery23
 - Linearity24
- 12. REFERENCES24
- 13. GENERAL NOTES ON THE TEST AND TEST PROCEDURE25

1. INTENDED USE

ID-Vit® Niacin is a microtiter plate test kit based on a microbiological assay which measures the total niacin content (nicotinic acid and nicotinamide) 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 niacin content. For use in human and veterinary medicine and in research. For in vitro diagnostic use only.

2. INTRODUCTION

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

Niacin deficiency syndromes

Symptoms of **minor niacin deficiency**:

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

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

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

Niacin as cholesterol lowering drug

Niacin increases HDL cholesterol and reduces LDL cholesterol and triglycerides. When taken in conjunction with another cholesterol medication, diet or exercise, niacin has been proven to reduce „bad“ cholesterol levels. A niacin-statin combination therapy substantially improves 4 major lipoprotein levels associated with atherosclerotic disease (Insull et al. 2004). The drug combination had good records in clinical trials for reduction in cardiovascular events and improvement in progression/regression of coronary lesions.

Indications

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

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

3. PRINCIPLE OF THE TEST

Serum samples are diluted and added into the microtiter plate wells coated with *Lactobacillus plantarum* which metabolizes niacin. The presence of niacin both in standards [STD] and samples gives a niacin-dependent growth response. After incubation at 37°C for 48 h, the growth of *Lactobacillus plantarum* is measured turbidimetrically at 610 - 630 nm (alternative at 540 - 550 nm) in an ELISA-reader. A dose response curve of absorbance unit (optical density, OD at 610 nm) vs. concentration is generated using the values obtained from standard. Niacin present in the patient samples is determined directly from this curve.

4. MATERIAL SUPPLIED

Catalog No	Label	Kit Components	Quantity
KIF003MTP	PLATE	One Lactobacillus plantarum-pre-coated microtiter plate, ready to use	12 x 8 wells
KIF003SO	SOL	Sample stabilizing solution 5 ml, ready to use	4 x
KIF003DI	DIL	Water 30 ml	4 x
KIF003ME	ASYMED	Niacin-Assay-Medium	4 x
KIF003ST	STD	Niacin -Standard	4 x
KIF003FO	FOL	Cover plastic foil	4 x
KIF003FR	FRA	Replacement holder for 96-well plates	1 x
KIF003KO1	CTRL1	Niacin Control 1	4 x
KIF003KO2	CTRL2	Niacin Control 2	4 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 polyethersulfon filter with a sterile tip
- 15 ml centrifugal tubes, sterile (e.g. Falcon tubes)

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, water, sample stabilizing solution) in the test kit and store at 2-8°C.
- Take as many microtiter strips as needed from kit. Store unused strips in the original package bag 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).
- Water quality is extremely important. Only the water delivered with the test kit should be used for medium [ASYMED], standard [STD] and control [CTRL1, CTRL2] reconstitution.
- It is essential to run a standard curve for each separate assay.
- It is recommended to run standard curve, controls as well as samples in duplicate.
- 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.
- By finishing the test, the used microtiter plates [PLATE] should be autoclaved.
- Signs for reagent damage: The highest standard should have an absorption higher than 0.6 Extinction units ($A_{630nm} > 0,6$)

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 3 days at 2–8°C in the dark. Niacin itself can be stored for longer at 2 - 8 °C, but not the serum. Therefore, samples should be frozen at -20°C for longer storage.
- 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.
- Samples with visible amounts of precipitates should be centrifuged (5 min at 10000 g) prior to measurement and the resulting supernatant should be used in the test.

8.1 Sample dilution

Serum samples and controls [CTRL1, CTRL2] should be diluted 1 : 4 (= dilution factor) with sample stabilizing solution [SOL] from the kit prior to analysis:

→ 100 µl sample + 300 µl sample stabilizing solution [SOL]

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. Put unused strips in the original package bag, and return the remaining parts of the test kit to the refrigerator. Bring all necessary reagents to room temperature.

Water [DIL] for medium [ASYMED], controls [CTRL1, CTRL2] 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 the test.
- Take the dry bag out of medium vial [ASYMED] by tweezers, shake off and discard.
- Add 10 ml of water [DIL] from the test kit to the assay medium, securely close the bottle and shake well. The amount is sufficient for 6 strips.
- Heat the bottle with medium 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 is firmly closed at all times.
- Quickly cool the medium bottle to under 30 °C.
- Filter the medium with a 0.2 µm sterile filter in a 15 ml centrifugal test tube.

Standard [STD]

Before the test freshly prepare the standard curve solutions:

- Open the bottle of standard [STD], remove seal. Dispose of screw-top lid and seal.
- Add x ml (x = see QS test kit data sheet) of water [DIL] from the test kit to the standard bottle [STD], close the bottle and dissolve by repeatedly (2-3 times= standard) vortexing it.
- Add water [DIL] from the test kit into 6 sterile reaction vials (capacity 1.5 – 2.0 ml) and then pipet the standard to the vials. Prepare a standard curve using the following scheme:

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

Controls [CTRL1, CTRL2]

- The controls must be freshly prepared before use in the test.
- Open the bottle of controls [CTRL1, CTRL2], remove seal. Dispose of screw-top lid and seal.
- Add 1.25 ml of 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 controls [CTRL1, CTRL2] afterwards as the samples are treated.

- Pipette 150 µl of the diluted controls [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]. Store unused strips in the original package bag at 2-8° C to prevent contamination or moisture exposure.
- A medium solution is sufficient for 6 strips.
- Put 150 µl Niacin assay medium [ASYMED] in the cavities.
- Add 150 µl of standard [STD], controls [CTRL1, CTRL2] and sample in the respective cavities. Pre-rinse the pipette tip with standard, control and sample solution, respectively.
- Carefully seal the cavities 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 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 hrs incubation time, the microtiter platter 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 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

Niacin in $\mu\text{g} / \text{l} = \text{Value from the standard curve} \times \text{dilution factor}$

Reference value for human serum

Serum (n = 83): Niacin (total soluble forms): 17 - 85 $\mu\text{g}/\text{L}$ (Median $\pm$ 2 SD)

Please note: A concentration range of 8 - 160 $\mu\text{g}/\text{L}$ Niacin is covered at a sample dilution 1 : 4. We recommend each laboratory to develop its own normal range. 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 (n = 6)		
	Niacin [$\mu\text{g}/\text{l}$]	VK [%]
Sample 1	64	2.9
Inter-Assay (n = 5)		
	Niacin [$\mu\text{g}/\text{l}$]	VK [%]
Sample 1	64	3.4

Recovery

Samples from 4 patients were diluted differently, spiked with Niacin and analyzed. The mean values are shown below:

n = 9

Sample	Mean value measured in original sample [µg/L]	Spike [µg/L]	Niacin expected [µg/L]	Niacin detected [µg/L]	Recovery Rate [%]
A	21.5	60	81.5	77	93
		120	141.5	134	94
		180	201.5	203	101
Recovery rate in total [%]					96

n = 9

Sample	Mean value measured in original sample [µg/L]	Spike [µg/L]	Niacin expected [µg/L]	Niacin detected [µg/L]	Recovery Rate [%]
B	16.9	60	76.9	76	99
		120	136.9	136	100
		180	196.9	199	101
Recovery rate in total [%]					100

n = 9

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

n = 10

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

Linearity

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

n = 2

Sample	Dilution	Niacin expected [µg/L]	Niacin detected [µg/L]
A	4	128	128
	8		138
	16		137
D	8	196	196
	16		193
	24		203
	32		188

12. REFERENCES

Morris M C et al. (2004) Dietary niacin and the risk of incident Alzheimer's disease and of cognitive decline. J Neurol Neurosurg Psychiatry 75: 1093-1099

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 use in human and veterinary medicine and in research. 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