

ID-Vit[®] Pantothensäure

Mikrobiologisches Verfahren zur Bestimmung des Gesamtgehalts an freier Pantothensäure (Vitamin B₅) in Serum mittels einer Lactobacillus plantarum-beschichteten Mikrotiterplatte
Zur Verwendung in Human- und Veterinärmedizin und zu Forschungszwecken

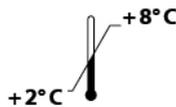
ID-Vit[®] Pantothenic acid

Microbiological test kit for the determination of total pantothenic acid (Vitamin B₅) in serum using a Lactobacillus plantarum coated microtitre plate
For use in human and veterinary medicine and in research

Gültig ab / Valid from 13.09.2010



KIF004



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

1. VERWENDUNGSZWECK

Der **ID-Vit® Pantothensäure** Mikrotiterplattentest ist ein mikrobiologisches Verfahren zur Bestimmung des Gesamtgehaltes an freier Pantothensäure 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

Pantothensäure übernimmt die reaktive Thiofunktion von Coenzym A und ACP

Der Begriff „Pantothensäure“ umfasst die freie Säure, ihr Kalziumsalz (Kalziumpantothenat) sowie ihr Alkohol (D-Panthenol). Pantothensäure (Vitamin B₅) wird von den meisten Mikroorganismen und Pflanzen synthetisiert. Vorstufe ist die Pantoinsäure. Aus ihr und der Aminosäure β-Alanin entsteht die Pantothensäure. Diese wiederum bildet zusammen mit Cysteamin das Pantethin, das eine Komponente des **Coenzym A** darstellt. Das Coenzym A spielt eine Schlüsselrolle im Stoffwechsel verschiedenster Verbindungen (Fettsäuresynthese, Citrat-Zyklus, Cholesterinbiosynthese, Steroidbiosynthese). Eine weitere bedeutende Funktion kommt der Pantothensäure als Bestandteil des ACP (**Acyl Carrier Protein**) bei der Fettsäure-Biosynthese zu. Die Aufnahme der Pantothensäure erfolgt v. a. als Coenzym A, von dem dann im Magen-Darm-Trakt die Pantothensäure abgespalten wird. Im Blut liegt die Pantothensäure an Plasmaproteine gebunden vor. Im Serum überwiegt die freie Pantothensäure, in Erythrozyten liegt sie überwiegend als CoA-Verbindung vor (Böhm U et al. 2003).

Das Pantothensäurederivat Pantethin zeigte in einer Studie eine cholesterinsenkende Wirkung (Coronel et al. 1991). Der Pantothensäure-Antagonist Pantoyl-GABA wird in Japan therapeutisch zur Behandlung von Demenzerkrankungen genutzt (Nutzen möglicherweise durch Erhöhung der cholinergen Aktivität).

Pantothensäure-Mangel

Ein Pantothensäure-Mangel kommt unter normalen Bedingungen selten vor. Zur Erforschung von Mangelerscheinungen wurde daher ein Mangel experimentell durch Gabe eines Antagonisten bzw. durch Einhalten einer entsprechenden Diät induziert. Die Probanden zeigten neben gastrointestinalen Störungen mit Anorexie bzw. Konstipation auch Jähzorn und Persönlichkeitsstörungen. Nervöse Störungen entwickelten sich bis hin zum Burning-Feet-Syndrom.

Indikationen

- Verdacht auf unzureichende Pantothensäure-Aufnahme, z.B. bei
 - Dialysepatienten
 - Alkoholabusus
 - Morbus Crohn, Colitis ulcerosa

3. TESTPRINZIP

Das Serum wird verdünnt und in die Kavitäten einer Mikrotiterplatte [PLATE] gegeben, die mit *Lactobacillus plantarum* beschichtet sind. Nach Zugabe von Pantothensäure 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 **24 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 der Pantothensäure ist dabei direkt proportional der Trübung.

4. INHALT DER TESTPACKUNG

Artikel Nr.	Abkürzung	Kit Komponenten	Menge
KIF004MTP	PLATE	1 x Mikrotiterplatte, beschichtet mit <i>Lactobacillus plantarum</i> , gebrauchsfertig	12 Streifen à 8 Kavitäten
KIF004SO	SOL	Probenstabilisierungspuffer 5 ml, gebrauchsfertig	4 x
KIF004DI	DIL	Wasser 30 ml, gebrauchsfertig	4 x
KIF004ME	ASYMED	Pantothensäure-Assay-Medium	4 x
KIF004ST	STD	Pantothensäure -Standard	4 x
KIF004FO	FOL	Abklebefolie	4 x
KIF004FR	FRA	Ersatzrahmen zum Umstecken der Mikrotiterstreifen	1 x
KIF004KO1	CTRL1	Pantothensäure-Kontrolle 1	4 x
KIF004KO2	CTRL2	Pantothensäure-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 REAGENZIIEN

- Den Testkit / die Reagenzien bei 2 - 8 °C lagern.
- Angesetzte Reagenzien unmittelbar verwenden und nach Testansatz verwerfen.
- Nicht angebrochene Reagenzien (Standard, Medium) 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. Pantothensäure 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 Kontrollen [CTRL1, CTRL2] müssen vor dem Einsatz im Test 1 : 8 (= Probenverdünnungsfaktor) mit dem Probenstabilisierungspuffer [SOL] aus dem Testkit verdünnt werden: 50 µl Probe oder Kontrolle [CTRL1, CTRL2] + 350 µl [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.
- Mit einer Pinzette das Medium [ASYMED] vom Trockenbeutel im Fläschchen abschüt-teln; Trockenbeutel 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 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:

Pantothensäure [µg / l]	Wasser [DIL] [µl]	+	Standard [STD] [µl]	=	Gesamtvolumen [µl]
Blank: 0	975	+	0	=	975
Standard 1: 2,3	975	+	25	=	1000
Standard 2: 4.6	950	+	50	=	1000
Standard 3: 18.4	400	+	100	=	500
Standard 4: 27.6	350	+	150	=	500
Standard 5: 36.8	300	+	200	=	500

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] 1,25 ml Wasser [DIL] aus dem Testkit zugeben, Flasche vortexen und so Kontrolllösungen herstellen (= Kontrolle 1, Kontrolle 2).
- Die Kontrollen [CTRL1, CTRL2] nach dem Rekonstituieren wie eine Probe behandeln.
- 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 Pantothensäure-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 24 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 aufschüttern
- 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 24 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 65 h Inkubation ausgewertet werden.

10. AUSWERTUNG DER MESSERGEBNISSE

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

Pantothensäure in $\mu\text{g/l}$ = Wert aus der Standardkurve x Probenverdünnungsfaktor

11. ERWARTUNGSWERTE

Der Pantothensäuregehalt wurde in 74 verschiedenen Blutspenderproben ermittelt. Als Mittelwert (Median) wurde 91.4 (81.4) $\mu\text{g/L}$ gefunden. Der 2-SD-Bereich erstreckte sich von 36 - 147 $\mu\text{g/L}$. Aus Abb. 1 geht die Verteilung der Blutspenderwerte hervor.

Wertebereich

Anzahl Proben	74
Mittelwert	91.4
Median	81.35
SD	27.7
MW-2* SD	36.0
MW+2*SD	146.8

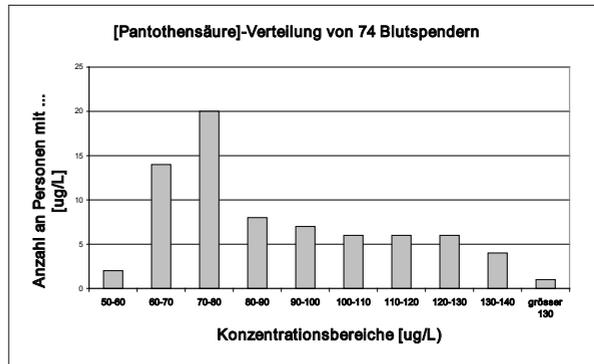


Abb. 1: Verteilung der Pantothensäurewerte in Blutspenderwerte

Anmerkung

Bei einem Probenverdünnungsfaktor von 8 ist ein Bereich von 18.4 - 294,4 $\mu\text{g/l}$ Pantothensäure abgedeckt. Wir empfehlen jedem Labor seinen eigenen Normalwerte-Bereich zu erstellen, weil Referenzbereiche stark von der Auswahl des Probandenkollektivs abhängen. Die Angabe des Referenzbereichs für Pantothensäure dient lediglich der Orientierung und kann von anderen publizierten Daten abweichen.

12. TESTCHARAKTERISTIKA (mit Humanserum erhoben)

Präzision und Reproduzierbarkeit

Intra-Assay (n = 28)		
	Pantothensäure [$\mu\text{g/l}$] Mittelwert	VK [%]
Probe 1	81.0	3.0
Inter-Assay (n = 5)		
	Pantothensäure [$\mu\text{g/l}$] Mittelwert	VK [%]
Probe 1	92.36	4.91

Wiederfindung

Proben von 3 Patienten wurden mit Pantothensäure gespiked und analysiert. Die Mittelwerte sind im Folgenden dargestellt:

n = 5

Probe	Mittelwert der Originalprobe [$\mu\text{g/l}$]	Spike [$\mu\text{g/l}$]	Pantothensäure erwartet [$\mu\text{g/l}$]	Pantothensäure gemessen [$\mu\text{g/l}$]	Wiederfindungsrate [%]
A	112.5	18.4	130.9	131.88	105
		36.8	149.3	141.47	79
		55.2	167.7	158.12	83
Wiederfindungsrate gesamt [%]					89

n = 5

Probe	Mittelwert der Originalprobe [$\mu\text{g/l}$]	Spike [$\mu\text{g/l}$]	Pantothensäure erwartet [$\mu\text{g/l}$]	Pantothensäure gemessen [$\mu\text{g/l}$]	Wiederfindungsrate [%]
B	96.61	18.4	115.01	113.79	93
		36.8	133.41	133.80	101
		55.2	151.81	165.33	125
Wiederfindungsrate gesamt [%]					106

n = 5

Probe	Mittelwert der Originalprobe [$\mu\text{g/l}$]	Spike [$\mu\text{g/l}$]	Pantothensäure erwartet [$\mu\text{g/l}$]	Pantothensäure gemessen [$\mu\text{g/l}$]	Wiederfindungsrate [%]
C	106.21	18.4	124.61	122.45	88
		36.8	143.01	138.62	88
		55.2	161.41	176.12	127
Wiederfindungsrate gesamt [%]					101

13. LITERATUR

Burtis C A, Ashwood E R (Eds): Tietz Textbook of Clinical Chemistry, 3rd Edition, 1999

Coronel F et al. (1991) Treatment of hyperlipemia in diabetic patients on dialysis with a physiological substance. Am J Nephrol 11(1):32-6

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 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

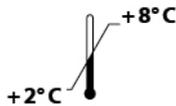
ID-Vit[®] Pantothenic acid

Microbiological test kit for the determination of
total pantothenic acid in serum
using a *Lactobacillus plantarum* coated microtitre plate
For use in human and veterinary medicine and in research

Valid from 13.09.2010



KIF004



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 _____	15
2. INTRODUCTION _____	15
3. PRINCIPLE OF THE TEST _____	16
4. MATERIAL SUPPLIED _____	16
5. MATERIAL REQUIRED BUT NOT SUPPLIED _____	17
6. PREPARATION AND STORAGE OF REAGENTS _____	17
7. PRECAUTIONS _____	17
8. SAMPLE PREPARATION _____	18
8.1 Sample dilution _____	18
9. ASSAY PROCEDURE _____	18
9.1. Test preparations _____	19
9.2. Test Initiation _____	20
9.3. Measurement _____	20
10. EVALUATION OF RESULTS _____	21
11. EXPECTED VALUES _____	21
12. PERFORMANCE CHARACTERISTICS _____	22
13. REFERENCES _____	24
14. GENERAL NOTES ON THE TEST AND TEST PROCEDURE _____	24

1. INTENDED USE

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

2. INTRODUCTION

Pantothenic acid is the reactive thiol function of CoA and ACP

Pantothenic acid (vitamin B₅) is synthesized by most microorganisms and plants from pantoic acid. The vitamin is an integral part of 4'-phosphopantetheine, which is a component of **coenzyme A (CoA)**. CoA plays a key role in the metabolism of numerous compounds, especially lipids and the ultimate catabolic disposition of carbohydrates and ketogenic amino acids. About 80% of the vitamin in animal tissues is in CoA form, and the rest exists mainly as phosphopantetheine and phosphopantethenate.

Another essential role of pantothenic acid is its participation in the 4'-phosphopantetheine moiety of acyl carrier protein (ACP), where the phosphodiester-linked prosthetic group uses the sulfhydryl terminus to exchange with malonyl-CoA to form an ACP-S malonyl thioester, which can chain elongate during fatty acid biosynthesis.

Pantothenic acid deficiency

Pantothenic acid deficiency is exceedingly rare. Because of its rarity, most information about pantothenic acid deficiency has been obtained from experiments: Pantothenic acid deficiency has been induced in humans by use of a metabolic antagonist, *w*-methyl pantothenic acid along with a pantothenic acid-deficient diet. Subjects became irascible and developed postural hypotension and rapid heart rate on exertion, epigastric distress with anorexia and constipation, numbness and tingling of the hands and feet. Because pantothenic acid is involved with so many vital processes in the body, it is not surprising that a broad number of complications might result from deficiency.

From recent research it is known that the pantothenic acid derivative, pantetheine (two molecules of pantetheine joined by a disulfide bond), has a hypocholesterolemic effect. A metabolic antagonist of pantothenic acid, pantoyl γ -amino butyric acid (called pantoyl-GABA), is widely used in Japan as an antidementia drug for treating cognitive impairments in pathological states such as Alzheimer's disease, presumably through increasing cholinergic activity in vivo.

Indications

- Suspicion of inadequate intake of pantothenic acid (e.g. in patients at high risk for malnutrition)

3. PRINCIPLE OF THE TEST

Serum samples are diluted and added into the microtiter plate wells coated with *Lactobacillus plantarum* which metabolizes pantothenic acid. The presence of pantothenic acid both in standards [STD] and samples gives a pantothenic acid-dependent growth response. After incubation at 37°C for 24 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. Pantothenic acid present in the patient samples is determined directly from this curve.

4. MATERIAL SUPPLIED

Catalog No	Label	Kit Components	Quantity
KIF004MTP	PLATE	One <i>Lactobacillus plantarum</i> -precoated microtiter plate, ready to use	12 x 8 wells
KIF004SO	SOL	Sample stabilizing solution 5 ml, ready to use	4 x
KIF004DI	DIL	Water 30 ml	4 x
KIF004ME	ASYMED	Pantothenic acid assay medium	4 x
KIF004ST	STD	Pantothenic acid - standard	4 x
KIF004FO	FOL	Cover plastic foil	4 x
KIF004FR	FRA	Replacement holder for 96-well plates	1 x
KIF004KO1	CTRL1	Control 1 Pantothenic acid	4 x
KIF004KO2	CTRL2	Control 2 Pantothenic acid	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) 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 [DIL] delivered with the test kit should be used for medium [ASYMED] dilution, 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 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.
- 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 Extinktion units (A630nm > 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. Pantothenic acid 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 : 8 (= dilution factor) with sample stabilizing solution [SOL] from the kit prior to analysis:

→ 50 µl sample or control [CTRL1, CTRL2] + 350 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], standard [STD] and controls [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 the test.
- Take the dry bag out of medium vial [ASYMED] by tweezers, shake off and discard.
- Add 10 ml of water 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 95 °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 sterilely with a 0.2 µm filter in a 15 ml centrifuge test tube.

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) of 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:

Pantothenic acid [µg / l]	Water [DIL] [µl]	+	Standard [STD] [µl]	=	Total volume [µl]
Blank: 0	975	+	0	=	975
Standard 1: 2,3	975	+	25	=	1000
Standard 2: 4.6	950	+	50	=	1000
Standard 3: 18.4	400	+	100	=	500
Standard 4: 27.6	350	+	150	=	500
Standard 5: 36.8	300	+	200	=	500

Controls [CTRL1, CTRL2]

- The control must be freshly prepared before 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 control afterwards as the sample is 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 pantothenic acid assay medium [ASYMED] in the cavities.
- Add 150 µl of standard [STD], control [CTRL1, CTRL2] respectively, sample in the 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 24 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 24 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.

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

11. EXPECTED VALUES

Range of concentration

The concentration of pantothenic acid was determined in 74 samples of different blood donors. The median value was 91.4 (81.4) $\mu\text{g/L}$. The 2-SD area was 36 to 147 $\mu\text{g/L}$. Figure 1 shows the distribution of the values.

Number of samples	74
Mean	91.4
Median	81.35
SD	27.7
MW-2* SD	36.0
MW+2*SD	146.8

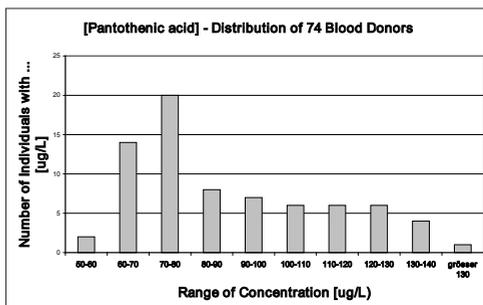


Fig. 1: Distribution of pantothenic acid values in blood donor samples

Please note: A concentration range of 18.4 - 294.4 $\mu\text{g/L}$ pantothenic acid is covered at a sample dilution 1 : 8. 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.

12. PERFORMANCE CHARACTERISTICS (obtained using human serum)

Precision and reproducibility

Intra-Assay (n = 28)		
	Pantothenic acid [$\mu\text{g/l}$] Mean value	VC [%]
Sample 1	81.0	3.0
Inter-Assay (n = 5)		
	Pantothenic acid [$\mu\text{g/l}$] Mean value	VC [%]
Sample 1	92.36	4.91

Recovery

Samples from 3 patients were spiked with Pantothenic acid and analyzed. The mean values are shown below:

n = 5

Sample	Mean value measured in original sample [$\mu\text{g/L}$]	Spike [$\mu\text{g/L}$]	Pantothenic acid expected [$\mu\text{g/L}$]	Pantothenic acid measured [$\mu\text{g/L}$]	Recovery Rate [%]
A	112.5	18.4	130.9	131.88	105
		36.8	149.3	141.47	79
		55.2	167.7	158.12	83
Recovery rate in total [%]					89

n = 5

Sample	Mean value measured in original sample [$\mu\text{g/L}$]	Spike [$\mu\text{g/L}$]	Pantothensäure expected [$\mu\text{g/L}$]	Pantothensäure measured [$\mu\text{g/L}$]	Recovery Rate [%]
B	96.61	18.4	115.01	113.79	93
		36.8	133.41	133.80	101
		55.2	151.81	165.33	125
Recovery rate in total [%]					106

n = 5

Sample	Mean value measured in original sample [$\mu\text{g/L}$]	Spike [$\mu\text{g/L}$]	Pantothensäure expected [$\mu\text{g/L}$]	Pantothensäure measured [$\mu\text{g/L}$]	Recovery Rate [%]
C	106.21	18.4	124.61	122.45	88
		36.8	143.01	138.62	88
		55.2	161.41	176.12	127
Recovery rate in total [%]					101

13. REFERENCES

Burtis C A, Ashwood E R (Eds): Tietz Textbook of Clinical Chemistry, 3rd Edition, 1999

Coronel F et al. (1991) Treatment of hyperlipemia in diabetic patients on dialysis with a physiological substance. Am J Nephrol 11(1):32-6

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 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