

# Biotin ELISA Kit

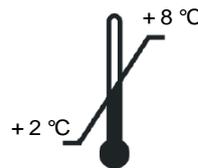
*Zur in vitro Bestimmung des Biotin (Vitamin H) in Serum, Plasma,  
Arznei-, Lebens- und Futtermitteln*

*For the in vitro determination of Biotin (Vitamin H) in Serum,  
Plasma, Drugs and Food*

Gültig ab/valid from 17.10.2006



K 8140



Immundiagnostik AG, Stubenwald-Allee 8a, D 64625 Bensheim  
Tel.: ++49 6251 70190-0  
Fax: ++ 49 6251 849430  
e.mail: [Info@immundiagnostik.com](mailto:Info@immundiagnostik.com)  
[www.immundiagnostik.com](http://www.immundiagnostik.com)

<b>INHALTSVERZEICHNIS/TABLE OF CONTENT</b>	<b>SEITE/PAGE</b>
<b>1. VERWENDUNGSZWECK</b>	<b>4</b>
<b>2. EINLEITUNG</b>	<b>4</b>
<b>3. TESTPRINZIP</b>	<b>5</b>
<b>4. INHALT DER TESTPACKUNG</b>	<b>6</b>
<b>5. ERFORDERLICHE LABORGERÄTE UND HILFSMITTEL</b>	<b>6</b>
<b>6. VORBEREITUNG UND LAGERUNG DER REAGENZIEN</b>	<b>7</b>
<b>7. HINWEISE UND VORSICHTSMABNAHMEN</b>	<b>8</b>
<b>8. PROBENVORBEREITUNG</b>	<b>8</b>
<b>9. TESTDURCHFÜHRUNG</b>	<b>9</b>
HINWEISE	9
PIPETTIERSHEMA	10
<b>10. ERGEBNISSE</b>	<b>11</b>
MUSTEREICHKURVE	12
<b>11. EINSCHRÄNKUNGEN</b>	<b>12</b>
<b>12. QUALITÄTSKONTROLLE</b>	<b>13</b>
ERWATETE ERGEBNISSE	13
<b>13. TESTCHARAKTERISTIKA</b>	<b>14</b>
PRÄZISION UND REPRODUZIERBARKEIT	14
WIEDERFINDUNG	15
SENSITIVITÄT	15
SPEZIFITÄT	15
LINEARITÄT	16
VARIATION DER KALIBRIERKURVE	16
<b>14. ALLGEMEINE HINWEISE ZUM TEST</b>	<b>17</b>

<b>INHALTSVERZEICHNIS/TABLE OF CONTENT</b>	<b>SEITE/PAGE</b>
<b>1. INTENDED USE</b>	<b>19</b>
<b>2. SUMMARY AND EXPLANATION OF THE TEST</b>	<b>19</b>
<b>3. PRINCIPLE OF THE TEST</b>	<b>19</b>
<b>4. MATERIAL SUPPLIED</b>	<b>20</b>
<b>5. MATERIAL REQUIRED BUT NOT SUPPLIED</b>	<b>21</b>
<b>6. PREPARATION AND STORAGE OF REAGENTS</b>	<b>21</b>
<b>7. PRECAUTIONS</b>	<b>22</b>
<b>8. SPECIMEN COLLECTION AND PREPARATION</b>	<b>22</b>
<b>9. ASSAY PROCEDURE</b>	<b>23</b>
PROCEDURAL NOTES	23
TEST PROCEDURE	24
<b>10. RESULTS</b>	<b>25</b>
<b>11. LIMITATIONS</b>	<b>26</b>
<b>12. QUALITY CONTROL</b>	<b>26</b>
EXPECTED VALUES	26
<b>13. PERFORMANCE CHARACTERISTICS</b>	<b>27</b>
SPECIFICITY	27
SENSITIVITY	27
RECOVERY	27
INTRA- AND INTERASSAY VARIATION	28
VARIATION IN CALIBRATION CURVE	28
DILUTION LINEARITY	29
<b>14. REFERENCES</b>	<b>30</b>
<b>15. GENERAL NOTES ON THE TEST AND TEST PROCEDURE</b>	<b>31</b>

## 1. VERWENDUNGSZWECK

Der hier beschriebene Assay ist für die Bestimmung von **Biotin** in Serum, Plasma und anderen biologischen Flüssigkeiten und Nahrungsmitteln geeignet. Der Assay ist für *in vitro* Diagnostik.

## 2. EINLEITUNG

Biotin (Vitamin H) findet sich weit verbreitet in Bakterien, Pilzen, höheren Pflanzen und tierischen Geweben. In Nahrungsmitteln tritt der Großteil des Biotins kovalent an Protein gebunden auf, während nur ein geringer Teil in freier Form zur Verfügung steht. Während des Verdauungsvorgangs wird das Biozytin (Biotinyl-Lysin) aus den Proteinen freigesetzt, das ähnlich dem Biotin leicht aus dem Intestinaltrakt resorbiert werden kann. Biotin wird anschließend im Plasma und in den Erythrozyten durch das Einwirken des Enzyms Biozytinase aus dem Biozytin freigesetzt und steht danach als prosthetische Gruppe für eine Reihe von Biotin-abhängigen Enzymen zur Verfügung.

Der tägliche Bedarf an Biotin ist schwer abzuschätzen, da eine gesunde Darmflora durch endogene Synthese wesentlich zur Deckung des Vitamin H-Bedarfs beiträgt. Nach neuesten Kenntnissen wird für Erwachsene eine tägliche Zufuhr von 100-200 µg empfohlen. Bei chronischen Hämodialysepatienten zeigt eine Supplementierung im Milligrammbereich eine deutliche Verbesserung der neuropathologischen Lage und des Glukosestoffwechsels.

Biotin-Mangelerkrankungen werden z. B. verursacht durch eine Zerstörung der Darmflora oder durch extreme Ernährungsgewohnheiten (z.B. häufiger Verzehr von rohen Eiern). Folgen des Biotinmangels können sein: Dermatitis, Haarausfall, Anorexie, muskuläre Hypotonie, Depressionen und Störungen der Fortpflanzung.

### 3. TESTPRINZIP

Der vorliegende Assay ist als kompetitiver Enzyme-Linked-Assay aufgebaut und wurde *speziell zum Nachweis von Biotin in humanem Serum und Plasma entwickelt*.

Proben, Standards und Kontrollen werden mit einem Streptavidin-Enzymkonjugat vorinkubiert. Danach werden jeweils 100 µl in Kavitäten einer Mikrotiterplatte überführt, wobei die Vertiefungen der Mikrotiterplatte bereits mit einem Biotin-Albumin-Konjugat beschichtet sind. Falls die Streptavidin-Enzymkonjugate noch freie Valenzen für Biotin haben, findet eine Bindung der Konjugate an die Kavitäten der Mikrotiterplatte statt. Nach Zugabe des Enzymsubstrates wird die Absorption bestimmt, die sich umgekehrt proportional der Biotinkonzentration in den Proben, Standards und Kontrollen verhält.

#### 4. INHALT DER TESTPACKUNG

Artikel Nr.	Inhalt	Kit Komponenten	Menge
K 8140MTP	PLATE	Mikrotiterplatte, vorbeschichtet	96
K 8140WP	WASHBUF	ELISA Waschpufferkonzentrat 10x	2 x 25 ml
K 8140VP	SAMPLEBUF	Probenverdünnungspuffer, gebrauchsfertig	1 x 15 ml
K 8140KP	CONJBUF	Konjugatverdünnungspuffer, gebrauchsfertig	1 x 25 ml
K 8140ST	STD	Standards, gebrauchsfertig (roter Verschluss)  (0; 37.5; 75; 150; 300; 600 ng/l)	6 x 1 ml
K 8140K	CONJ	Konjugat, Streptavidin Meerretich- Peroxidase (grüner Verschluss)	1 x 0.3 ml
K 8140KO	CTRL	Kontrollen, gebrauchsfertig (gelber Verschluss)	2 x 1 ml
K 8140TMB	SUB	TMB Substrat (Tetramethylbenzidin), gebrauchsfertig	1 x 12 ml
K 6750AC	STOP	ELISA Stopplösung, gebrauchsfertig	1 x 12 ml

#### 5. ERFORDERLICHE LABORGERÄTE UND HILFSMITTEL

- destilliertes oder deionisiertes Wasser
- Präzisionspipetten und Pipettenspitzen für den Einmalgebrauch für Volumina 2- 20 µl, 20 - 200 µl und 200 - 1000 µl
- saubere Reagenzröhrchen für Einmalgebrauch, verschiedene saubere Messgefäße
- absorbierende Papiertücher
- Vortex-Mixer
- Microtiterplattenreader mit Filter 450 nm

## 6. VORBEREITUNG UND LAGERUNG DER REAGENZIEN

- Bitte achten Sie bei mehrfachem Einsatz der Platte 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.
- Reagenzien mit einem **Volumen kleiner als 100 µl** sollten vor Gebrauch zentrifugiert werden um Volumenverluste zu vermeiden.
- Das **Waschpufferkonzentrat** (WASHBUF) muss vor Gebrauch **1:10** in destilliertem Wasser (aqua bidest.) verdünnt werden (50 ml WASHBUF + 450 ml aqua dest.), gut mischen. Aufgrund der hohen Salzkonzentration in den Stammlösungen kann es zu Kristallbildungen kommen. Die Kristalle lösen sich bei Raumtemperatur bzw. im Wasserbad bei 37 °C auf. Das **Pufferkonzentrat** kann bei **2-8°C** bis zum angegebenen Haltbarkeitsdatum aufbewahrt werden. Die **verdünnte Pufferlösung** ist bei **2-8 °C einen Monat** in einem geschlossenen Gefäß haltbar.
- Die erforderliche Menge an **Streptavidin-Enzymkonjugat** (CONJ) wird **1:100** mit dem Konjugatpuffer (CONJBUF) verdünnt. Verdünntes Konjugat ist für etwa 8 Stunden im Dunkeln bei Raumtemperatur (18-25° C) haltbar.
- Alle anderen Testreagenzien sind bei **2-8 °C** zu lagern und bei entsprechender Lagerung bis zum angegebenen Verfallsdatum (siehe Etikett) verwendbar.

## 7. HINWEISE UND VORSICHTSMAßNAHMEN

- Standards und Kontrollen sind auf Humanserum aufgebaut. Sie sind auf HIV und Hepatitis B getestet und für negativ befundet worden. Jedoch sollten die Testkomponenten als Vorsichtsmaßnahme immer wie potentiell infektiöses Material behandelt werden.
- Die Stopplösung (STOP) besteht aus HCl. HCl ist eine starke Säure und muss auch im verdünnten Zustand mit Vorsicht verwendet werden. HCl verursacht bei Kontakt mit der Haut Verätzungen. Es sollte daher mit Schutzhandschuhen und Schutzbrille gearbeitet werden. Bei Kontakt mit der Säure muss die verätzte Stelle sofort mit viel Wasser gespült werden.
- Die Reagenzien dürfen nach Ablauf des Mindesthaltbarkeitsdatums nicht mehr verwendet werden.

## 8. PROBENVORBEREITUNG

### Serum und Plasma

Humanes Serum bzw. Plasma kann im Assay direkt eingesetzt werden, sollte aber frei von unlöslichen Partikeln sein. Trübe Serumproben sollten kurz und scharf anzentrifugiert werden (3000xg).

Serumproben können bei 2 - 8° C bis zu 24 h gelagert werden. Bei längerer Lagerzeit ist das Material bei -20° C einzufrieren. Wiederholtes Einfrieren und Auftauen ist zu vermeiden.

Serum- und Plasmaproben mit erwarteter hoher Biotinkonzentration (über 600 ng/l) müssen mit dem in der Kitpackung enthaltenen Probenverdünnungspuffer (SAMPLEBUF) entsprechend vorverdünnt werden.

### Milch

Milchproben müssen mindestens 1:100 mit dem in der Kitpackung enthaltenen Probenverdünnungspuffer (SAMPLEBUF) verdünnt werden.

### Hinweise zum Waschen der Kavitäten

Zum Waschen der Vertiefungen wird jeder Kavität 0,3 ml Waschpuffer zugegeben und anschließend abgesaugt. Dieser Wasch- Absaugvorgang ist jeweils **5x zu wiederholen**. Automatische Wascheinrichtungen können eingesetzt werden, vorausgesetzt sie ermöglichen ein komplettes Absaugen der Kavitäten bis auf den Boden ohne den Boden der Kavitäten zu berühren, bzw. auf dem Boden zu kratzen.

Nach Abschluss des letzten Waschschruttes wird die Mikrotiterplatte über Kopf gedreht und auf saugfähiges Papier ausgeschlagen, bis keine Flüssigkeitsrückstände mehr sichtbar sind.

## 9. TESTDURCHFÜHRUNG

### *Hinweise*

- Reagenzien der Testpackung dürfen nicht mit anderen Chargen gemischt werden.
- Qualitätskontrollen sollten immer mitgemessen werden.
- Inkubationszeit, Temperatur und Pipettiervolumen sind vom Hersteller festgelegt. Jegliche Abweichung von der Testvorschrift, die nicht mit dem Hersteller koordiniert wurde, kann zu fehlerhaften Ergebnissen führen. Die Firma Immundiagnostik AG übernimmt für die hierdurch entstandenen Schäden und Folgeschäden keine Haftung.
- Die Inkubationszeit der Proben (30 min, Punkt 4) ist einzuhalten. Das Pipettieren der Proben in die Mikrotiterplatte sollte 10 min nicht überschreiten. Bei längerer Pipettierdauer entsteht eine Zeitdrift. Die Resultate werden dadurch verfälscht.

## Pipettierschema

1. Die benötigten Mikrotiterstreifen (PLATE) aus dem Kit nehmen. Nicht verwendete Mikrotiterstreifen können abgeklebt bis zum angegebenen Haltbarkeitsdatum bei 2-8 °C gelagert werden. Im Test nur Reagenzien und Proben verwenden, die Raumtemperatur (18-26°C) aufweisen.
2. **150 µl** Standard (STD), Kontrollen (CTRL) und Proben in individuelle Teströhrchen vorgelegen.
3. **150 µl** verdünnte Streptavidin-Enzymkonjugatlösung in jedes Teströhrchen pipettieren und auf dem Vortexer mischen.
4. **30 min** bei 18 - 25° C inkubieren.
5. **100 µl** von jedem Teströhrchen in individuelle Kavitäten der Mikrotiterplatte in Doppelbestimmung überführen.
6. **30 min** bei 18 -25° C inkubieren.
7. **5-mal** jede Kavität waschen (Vergl. Hinweise zum Waschen).
8. **100 µl** TMB-Substratlösung (SUB) je Kavität pipettieren.
9. **10-30 min** bei 18 - 25° C inkubieren.\*
10. **100 µl** Stopplösung(STOP) je Kavität pipettieren und vorsichtig schütteln.
11. Innerhalb von 30 min nach Zugabe der Stopplösung die Absorption bei **450 nm** auf einem Microtiterplatten-Reader messen. Bei Einstrahllesegeräten dient Luft als Blank sofern vom Gerätehersteller keine andere Vorschrift gemacht wird. Bei Zweistrahllesegeräten wird als Referenzstrahl entweder 620 nm, 550 nm oder 690 nm empfohlen.

\* Die Intensität der Farbentwicklung ist temperaturabhängig. Es wird empfohlen, den Farbumschlag während der Inkubationszeit zu beobachten und entsprechend der Farbentwicklung die Reaktion zu stoppen. Bei dem in vitro *Biotin* Test benötigt die Farbentwicklung ca. 10 Minuten.

## 10. ERGEBNISSE

Bestimmung des mittleren Absorptionswertes jeder Doppelbestimmung von Standards, Kontrollen und Proben als Prozentsatz der Absorption bezogen auf den Nullstandard. Die Doppelwerte sollten innerhalb von  $\pm 20\%$  des Mittelwertes liegen:

$$\frac{\text{Absorption von Standard (Kontrolle, Probe)}}{\text{Absorption des Nullstandards}} \times 100\% = \% \text{ Absorption}$$

Erstellen einer Standardkurve, bei welcher der Logarithmus der Biotinkonzentration der Standards auf der Y-Achse gegenüber % Absorption der Standards auf der X-Achse aufgetragen wird. Die Biotinkonzentrationen (ng/l) der Proben und Kontrollen werden dann aus der Standardkurve abgelesen. Die Konzentration vorverdünnter Proben muss mit dem Verdünnungsfaktor multipliziert werden.

Eine repräsentative Standardkurve ist in Abbildung 1 wiedergegeben. Diese Kurve kann nicht verwendet werden um Testresultate auszuwerten. Jedes Labor muss die Standardkurve für jeden individuellen Ansatz neu erstellen.

## Mustereichkurve

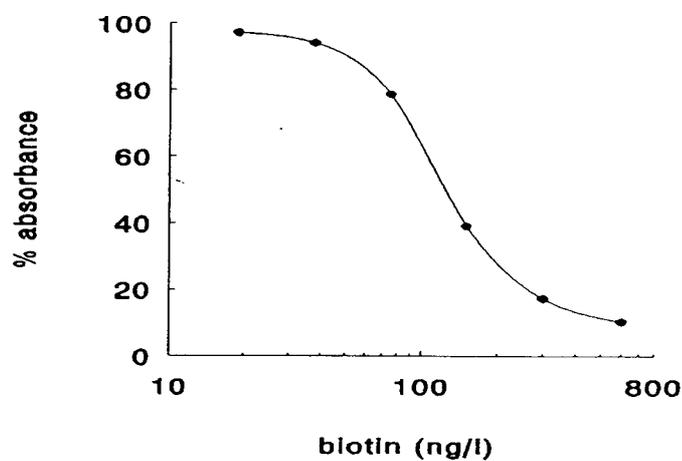


Abbildung 1

Tabelle 1

Biotin (ng/l)	Absorption	% Absorption
600	0.210-0.210	10,5
300	0.346-0.347	17.4
150	0.783-0.777	39.1
75	1.574-1.566	78.6
37,5	1.876-1.880	94.0
0	2.051-1.952	100

## 11. EINSCHRÄNKUNGEN

Proben mit einer Biotin Konzentration größer als der größte Standard sollten mit Probenverdünnungspuffer verdünnt und nochmals im Assay eingesetzt werden.

## 12. QUALITÄTSKONTROLLE

Für die Qualitätskontrolle empfehlen wir die Verwendung unabhängiger externer Kontrollen oder der im Kit mitgelieferten.

### *Erwartete Ergebnisse*

#### **Normwerte**

Gesunde:  $\geq 200$  ng/l

Suboptimaler Status: 100 - 200 ng/l

Avitaminose:  $< 100$  ng/l

## 13. TESTCHARAKTERISTIKA

### *Präzision und Reproduzierbarkeit*

#### **Intra- und Interassayvariation**

Die Intra- und Interassayvariation beträgt 1,5%, bzw. 4,9%.

#### **Präzision**

Das Präzisionsprofil wurde durch die Messung von jeweils 5 Replikaten jedes einzelnen Standards und die Bestimmung des Variationskoeffizienten für jeden einzelnen Konzentrationswert ermittelt. Der mittlere Variationskoeffizient der Standards lag bei 1,8%.

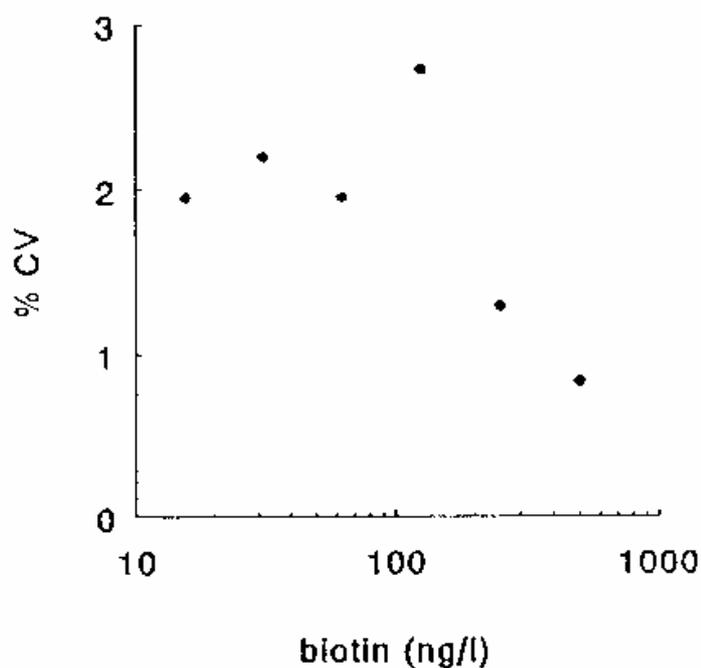


Abbildung 2

## Wiederfindung

Humanserum mit 86 ng/l endogenem Biotin wurde mit unterschiedlichen Mengen Biotin versetzt und mit dem Testkit ausgewertet:

Tabelle 2

Spike mit (ng/l) Biotin	Biotin erwartet (ng/l)	Biotin gemessen (ng/l)	Wieder- findung (%)
250	336	366	109
125	211	213	101
62,5	147,5	141	95
31,25	117,25	110	94

Die durchschnittliche Wiederfindung beträgt 100%  $\pm$  7%.

## Sensitivität

Die Sensitivität wurde entsprechend der Richtlinien der internationalen Gesellschaft für Klinische Chemie definiert: die Nachweisgrenze ist der geringste vom Nullstandard zu unterscheidende Wert der Biotinkonzentration minus 3 SD.

Die Nachweisgrenze beträgt **15 ng Biotin/l**.

Die effektive Dosis für 50% des Maximalwertes lag bei 100 ng Biotin/l.

## Spezifität

Die Spezifität wurde durch Bestimmung der Kreuzreaktivität verwandter Substanzen nachgewiesen. Die Kreuzreaktivität bezogen auf die Biotin-Reaktivität ist in Prozent angegeben:

Biotin-4-Amidobenzoensäure: 81%

Biozitin: 106%

## Linearität

Die Verdünnungsechtheit wurde durch Verdünnung von Serum mit Probenverdünnungspuffer bestimmt.

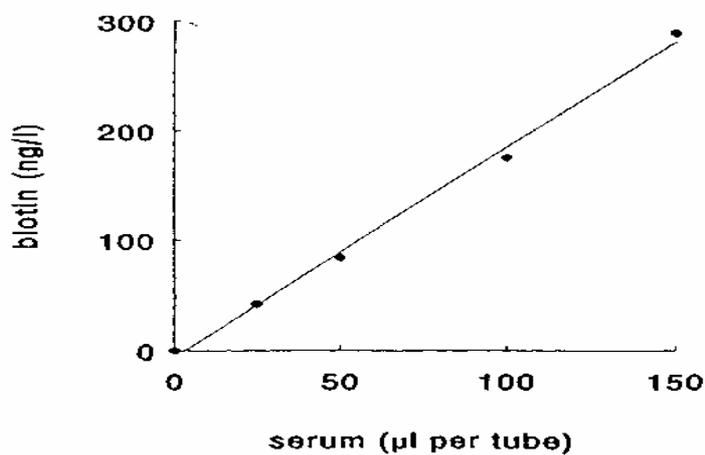


Abbildung 3

## Variation der Kalibrierkurve

Durch die Messung von jeweils 5 Replikaten jedes einzelnen Standards wurde das Präzisionsprofil bestimmt und der Variationskoeffizient für jeden einzelnen Konzentrationswert berechnet. Der mittlere Variationskoeffizient der Standards lag bei 1,8%.

## 14. ALLGEMEINE HINWEISE ZUM TEST

- Das für Kitkomponenten verwendete humane Material wurde auf HIV, Hepatitis B und Hepatitis C getestet und für negativ befundet. Dennoch wird empfohlen, die Kitkomponenten als Vorsichtsmaßnahme immer wie potentiell infektiöses Material zu behandeln.
- Die Testkomponenten enthalten zum Schutz vor bakteriellen Kontaminationen Natriumazid. Natriumazid ist giftig. Substrate für enzymatische Farbreaktionen sind als giftig und karzinogen beschrieben. Jeder Kontakt mit der Haut oder der Schleimhaut ist zu vermeiden.
- Alle im Test enthaltenen Reagenzien dürfen ausschließlich zu wissenschaftlichen Zwecken oder, wenn vermerkt, zur *in vitro* Diagnostik eingesetzt werden.
- Die Reagenzien dürfen nach Ablauf des auf der Verpackung angegebenen Datums nicht mehr verwendet werden. Einzelkomponenten verschiedener Chargen dürfen nicht gemischt oder ausgetauscht werden.
- Für die Qualitätskontrolle sind die für medizinische Laboratorien erstellten Richtlinien zu beachten.
- Die charakteristischen Testdaten wie Inkubationszeiten, Inkubationstemperaturen und Pipettiervolumina der verschiedenen Komponenten wurden firmenintern festgelegt. Nicht mit dem Hersteller abgesprochene Veränderungen in der Testdurchführung können die Resultate beeinflussen. Die Firma Immundiagnostik AG übernimmt für die hierdurch entstandenen Schäden und Folgeschäden keine Haftung.
- Bei Gewährleistungsansprüchen ist das beanstandete Material mit schriftlicher Erklärung innerhalb von 14 Tagen zum Hersteller - der Immundiagnostik AG - zurück zu senden.

17.10.2006 10012002.doc

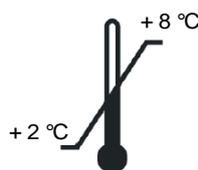
# Biotin ELISA Kit

*For the in vitro determination of Biotin (Vitamin H) in Serum,  
Plasma, Drugs and Food*

Gültig ab/valid from 17.10.2006



K 8140



## 1. INTENDED USE

The *Immundiagnostik* Assay is intended for the quantitative determination of **Biotin** in serum, plasma and foods. For research use only.

## 2. SUMMARY AND EXPLANATION OF THE TEST

In the late 1950s Lynen (1) and Wakil (2) reported the discovery of covalently bound biotin with a coenzyme function. Biotin is a growth factor present in minute amounts in every living cell. It plays an indispensable role in numerous naturally occurring carboxylation reactions. The daily biotin requirements for adults lie between 100 and 200 mg. Renewed interest in the role of biotin in human nutrition and therapy stems from the accumulating reports of various biotin-responsive syndromes (3-5). A variety of methods for the assay of biotin are currently available (6-11). However most of them are either cumbersome to perform or based on the use of radioactive materials. This assay is a convenient reciprocal assay for biotin. It is extremely sensitive, easy to perform and doesn't use radiolabels.

## 3. PRINCIPLE OF THE TEST

The test is a competitive enzyme-linked assay for biotin determination in human serum. Samples, standards and controls are incubated with streptavidin-enzyme conjugate for 15 minutes at 18-25 °C. Then 100 µl of each incubation mixture is transferred in duplicate into microtiter plate wells coated with biotin-albumin conjugate. After a second incubation step of 30 minutes at 18-25 °C, the enzyme substrate TMB is added. Finally, the reaction is terminated by an acidic stop solution causing a color change from blue to yellow. The color intensity is inversely proportional to the biotin concentration. A dose response curve of the absorbance unit (optical density, OD at 450 nm) vs. concentration is generated using the values obtained from the standards. Biotin present in the patient samples is determined from this curve.

**4. MATERIAL SUPPLIED**

Cat. No	Content	Kit Components	Quantity
K 8140MTP	PLATE	one holder with precoated strips	96
K 8140WP	WASHBUF	ELISA wash buffer concentrate 10x	2 x 25 ml
K 8140VP	SAMPLEBUF	Sample dilution buffer, ready-to-use	1 x 15 ml
K 8140KP	CONJBUF	Conjugate dilution buffer, ready-to-use	1 x 25 ml
K 8140ST	STD	Calibrators, ready-to-use (red cap) (0; 37.5; 75; 150; 300; 600 ng/l)	6 x 1 ml
K 8140K	CONJ	Conjugate, horseradish peroxidase labeled streptavidin (green cap)	1 x 0.3 ml
K 8140KO	CTRL	Controls, ready-to-use (yellow cap)	2 x 1 ml
K 8140TMB	SUB	TMB Substrate (Tetramethylbenzidin), ready-to-use	1 x 12 ml
K 6750AC	STOP	ELISA Stop solution, ready-to-use	1 x 12 ml

## 5. MATERIAL REQUIRED BUT NOT SUPPLIED

- Distilled or deionized water.
- Precision pipettes with disposable tips to deliver in the ranges 2-20 µl,
- 20-200 µl and 200-1000 µl.
- Clean disposable test tubes.
- Range of standard, clean volumetric laboratory glassware.
- Absorbent paper towels.
- Vortex mixer.
- Microtiter plate reader with 450 nm filter.

## 6. PREPARATION AND STORAGE OF REAGENTS

- 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.
- The **ELISA wash buffer concentrate** (WASHBUF) should be diluted with aqua dest. **1:10** before use (add 450 ml aqua dest. to 50 ml concentrate). Crystals could occur due to high salt concentration. The crystals must be resuspended **before dilution of the buffer solutions** using a water bath at 37°C. The buffer concentrates are stable at 2-8°C until the expiry date stated on the label. Diluted solutions can be stored at 2-8°C for 2 weeks.
- Reagents with a volume less than **100 µl** should be centrifuged before use to avoid loss of volume.
- The **Conjugate** (CONJ) must be diluted **1:100** in conjugate dilution buffer (CONJBUF). The antibody is stable at 18-25 °C in the dark for 8 hours.
- All other test reagents are ready for use. The test reagents are stable up to the date of expiry (see label of test package) when stored at **2 – 8 °C**.

## 7. PRECAUTIONS

- For *in vitro* diagnostic use only.
- Human materials used in kit components were tested and found to be negative for HIV, Hepatitis B and Hepatitis C. However, for safety reasons, all kit components should be treated as potentially infectious.
- Stop solution (STOP) consists of diluted HCl. This is a strong acid. Although diluted, it still must be handled with care. It can cause burns and should be handled with gloves, eye protection, and appropriate protective clothing. Any spill should be wiped out immediately with copious quantities of water. Do not breathe vapor and avoid inhalation.
- Reagents should not be used beyond the expiration date shown on kit label.

## 8. SPECIMEN COLLECTION AND PREPARATION

### Serum and plasma

Human serum can directly be processed but it should be free from insoluble particles. Remove insoluble particles by centrifugation. Serum samples can be stored at 2-8 °C for one day. For long time storage serum samples should be frozen. Repeated freezing and thawing should be avoided. Serum samples with expected high biotin concentrations (exceeding 600 ng/liter) should be properly diluted with the provided sample diluent (SAMPLEBUF).

### Milk

Milk can be assayed without pre-treatment but should be diluted 1:100 in sample dilution buffer in the following way: first, add 50 µl milk to 450 µl sample dilution buffer (SAMPLEBUF) in a test tube, vortex and then add 50 µl of this solution to 450 µl sample dilution buffer in a second test tube.

***Instructions for washing***

Wash each well 5 times by dispensing 0.3 ml of diluted wash solution into each well. Aspirate completely the contents of each well. After the final washing step, the inverted microtiter plate should be firmly tapped on absorbent paper to remove excess solution.

Alternatively, automatic washers may be used. Ensure that automatic washers are functioning correctly, i.e. that the contents of the wells are aspirated completely and the bottoms of the wells are not scratched.

**9. ASSAY PROCEDURE*****Procedural notes***

- Do not interchange different lot numbers of any kit component within the same assay.
- Quality control guidelines should be observed.
- Incubation time, incubation temperature and pipetting volumes of the different components are defined by the producer. Any variation of the test procedure, that is not coordinated with the producer, may influence the test results. Immundiagnostik AG can therefore not be held responsible for any damage resulting from wrong use.
- The incubation time (Point 4) must be 30 min. The pipetting time of the samples should not take longer than 10 min.
- The assay should always be performed according the enclosed manual.

## Test procedure

1. Take as many microtiter strips (PLATE) as needed from kit. Store unused strips covered at 2-8° C. Strips are stable until the expiry date stated on the label. Allow all reagents to come to room temperature (18-25 °C) prior to use.
2. Add **150 µl** of STD/SAMPLE/CTRL (Standard/Sample/Control) into individual test tubes.
3. Add **150 µl** of diluted streptavidin-enzyme conjugate solution into each test tube, vortex-mix.
4. Incubate for **30 minutes** at 18-25 °C.
5. Transfer **100 µl** of the content of each tube in duplicate into individual microtiter wells.
6. Incubate for **30 minutes** at 18-25 °C.
7. **Wash wells 5 times** (see instructions for washing).
8. Pipet **100 µl** of the TMB substrate (SUB) solution into all wells.
9. Incubate for **10-30 minutes** at 18-25 °C.\*
10. Stop the reaction by adding **100 µl** of hydrochloric acid (STOP) to each well and mix carefully.
11. Read OD on ELISA reader at **450 nm** within 30 minutes after adding the stop solution. For dual wavelength analysis, 620 nm, 655 nm or 690 nm should be used as a reference wavelength.

\*The intensity of the color change is temperature sensitive. We recommend to observe the color change and to stop the reaction upon good color differentiation. For the *in vitro* *biotin* test it takes approximately 10 minutes.

## 10. RESULTS

Calculate the average absorbance values for each set of duplicate standards and samples as a percentage of the absorbance value of the zero standard. Duplicates should be within 20 percent of the mean.

$$\frac{\text{Absorbance standard/sample}}{\text{Absorbance zero standard}} \times 100\% = \% \text{ Absorbance}$$

Draw a standard curve by plotting the log biotin concentration on the ordinate against the % absorbance for each standard concentration on the abscissa. Determine the concentration biotin (ng/liter) for each sample. The concentration read from the standard curve must be further multiplied by the corresponding dilution factor.

A representative standard curve is shown in figure 1. This curve cannot be used to evaluate test results. Each laboratory must prepare a standard curve for each test run.

Table 1.

Biotin (ng/liter)	Absorbance (450 nm)	% Absorbance
600	0.210-0.210	10.5
300	0.346-0.347	17.4
150	0.783-0.777	39.1
75	1.574-1.566	78.6
37.5	1.876-1.880	94.0
0	2.041-1.952	100

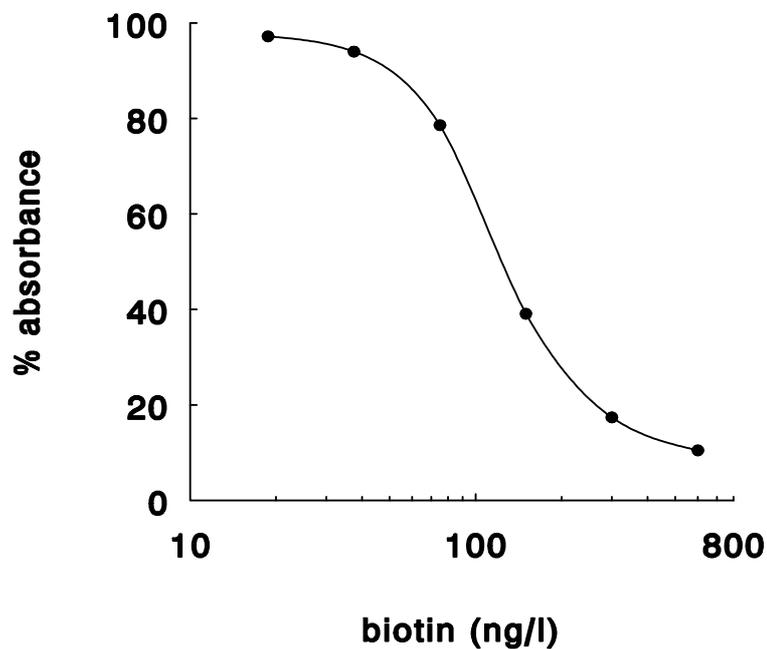


Figure 1

## 11. LIMITATIONS

Samples with Biotin levels greater than the highest calibrator value should be diluted and re-assayed.

## 12. QUALITY CONTROL

### *Expected values*

Healthy:  $\geq 200$  ng/l

Optimal Status: 100 - 200 ng/l

Vitamin deficiency:  $< 100$  ng/l

## 13. PERFORMANCE CHARACTERISTICS

### *Specificity*

The specificity of the *BIOTIN* assay was established by analyzing the cross-reactivity with related compounds. The values represent the cross-reactivity as a percentage of the biotin reactivity; biotin-4-amidobenzoic acid - 81%, biocytin - 106%.

### *Sensitivity*

The limit of detection was defined as the lowest biotin concentration distinguishable from the zero standard and calculated as the concentration causing an absorbance value lower than the absorbance of the zero standard minus 3 SD, according to the recommendation of the International Federation of Clinical Chemistry (12). The detection limit was determined to be 15 ng biotin/liter. The effective dose for 50% of maximal response was 100 ng biotin/liter.

### *Recovery*

Human serum with 86 ng/liter endogenous biotin was spiked with variable amounts of biotin and assayed with the *in VITRO TEST BIOTIN* (table 2).

Table 2.

Spiked with (ng/liter) biotin	Biotin expected (ng/liter)	Biotin measured (ng/liter)	Recovery (%)
250	336	366	109
125	211	213	101
62.5	148.5	141	95
31.25	117.25	110	94

The overall recovery is 100% ± 7%.

### *Intra- and interassay variation*

The intra- and interassay variation was respectively 1.5% and 4.9%.

### *Variation in calibration curve*

The precision profile was generated by preparing five replicates of each of the standards and calculating the standard variation and percent coefficient of variation (CV) at each concentration (figure 2). The average CV between the standards was 1.8 %.

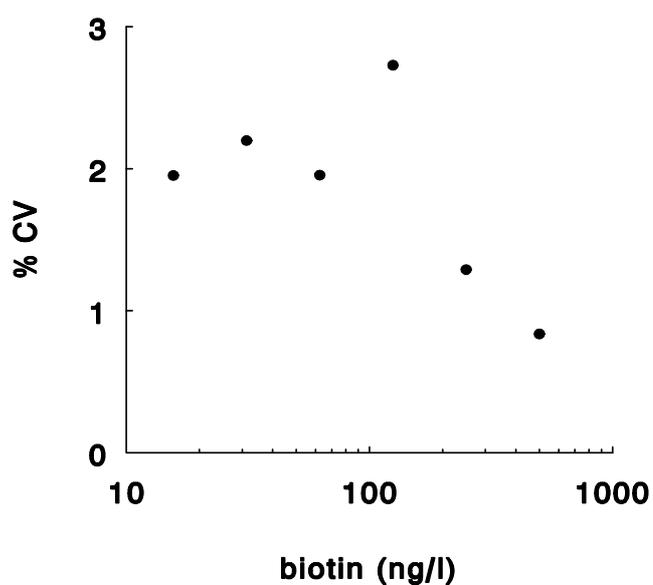


Figure 2

## Dilution linearity

The dilution linearity profile was generated by diluting serum, with a normal amount of endogenous biotin, with sample diluent. The assay was carried out as described.

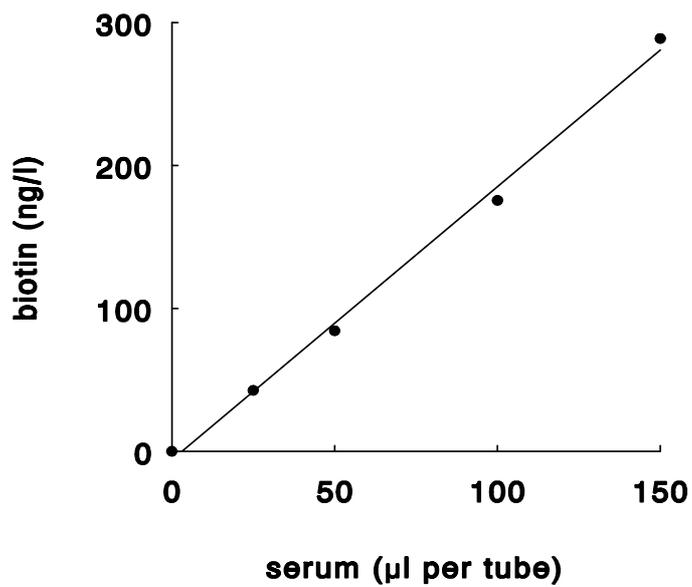


Figure 3

## 14. REFERENCES

1. Lynen, F., Knappe, J., Lorch, E., Jutting, G. and Ringelmann, E. (1959) *Angew. Chem.* **71**, 481.
2. Wakil, S. J. and Gibson, D.M. (1960) *Biochim. Biophys. Acta* **41**, 122.
3. Bonjour, J.P. (1977) *Int. J. Vit. Nutr. Res.* **47**, 107.
4. Dakshinamurti, K. and Bhagavan, H.N. eds. (1985) Biotin, Vol. 447, pp. 1-441, *Ann. N.Y. Acad. Sci.*, New York
5. Watanabe, T. (1983) *J. Nutr.* **113**, 574.
6. Green, N.M. (1970) in *Methods in Enzymology* (McCormick, D.B. and Wright, L.D., eds), Vol. 18, pp. 383-385, Academic press, New York.
7. Hood, R.L. (1979) in *Methods in Enzymology* (McCormick, D.B. and Wright, L.D., eds), Vol. 62, pp. 279-283, Academic Press, New York.
8. Dakshinamurti, K. and Allan, L. in *Methods in Enzymology* (McCormick, D.B. and Wright, L.D., eds), Vol. 62, pp. 284-287, Academic press, New York. 11 January 2006. Green, N.M. (1970) in *Methods in Enzymology* (McCormick, D.B. and Wright, L.D., eds), Vol. 18, pp. 418-424, Academic press, New York.
9. Lin, H.J. and Kirsch, J.F. (1979) in *Methods in Enzymology* (McCormick, D.B. and Wright, L.D., eds), Vol. 62, pp. 287-289, Academic press, New York.
10. Al-Hakiem, M.H.H., Landon, J., Smith, D.S. and Nargessi, R.D. (1981) *Anal. Biochem.* **116**, 264.
11. Büttner, J., Borth, R., Boutwell, J.H., Broughton, P.M.G. and Bowyer, R.C. (1979) Quality control in clinical chemistry. *Clin. Chim. Acta* **98**, 145F-162F.
12. Livaniou, E., Evangelatos, G.P. and Ithakissios, D.S. (1987) *Clin. Chem.* **33**, 1983-1988.

## 15. GENERAL NOTES ON THE TEST AND TEST PROCEDURE

- Human materials used in kit components were tested and found to be negative for HIV, Hepatitis B and Hepatitis C. However, for safety reasons, all kit components should be treated as potentially infectious.
- Kit reagents contain sodium azide or thimerosal as bactericides. Sodium azide and thimerosal are toxic. Substrates for the enzymatic color reactions are toxic and carcinogenic. Avoid contact with skin or mucous membranes.
- For *in vitro* diagnostic use only.
- Reagents should not be used beyond the expiration date shown on the kit label.
- Do not mix different lot numbers of any kit component.
- Quality control guidelines should be followed.
- 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. Immundiagnostik AG can therefore not be held responsible for any damage resulting from wrong use.

17.10.2006\_050201.doc