

ID-Vit® Folsäure

**Mikrobiologisches Verfahren zur Bestimmung des
Gesamtgehalts an Folsäure in Serum mittels einer
Lactobacillus rhamnosus -beschichteten Mikrotiterplatte
Zur Verwendung in Human- und Veterinärmedizin und zu For-
schungszwecken**

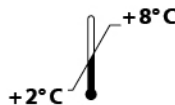
ID-Vit® Folic acid

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

Gültig ab / Valid from 06.07.2011



KIF005



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

- 1. VERWENDUNGSZWECK2**
- 2. EINLEITUNG2**
- 3. TESTPRINZIP3**
- 4. INHALT DER TESTPACKUNG.....4**
- 5. ERFORDERLICHE LABORGERÄTE UND HILFSMITTEL4**
- 6. LAGERUNG DER REAGENZIERN5**
- 7. HINWEISE UND VORSICHTSMASSNAHMEN5**
- 8. PROBENVORBEREITUNG6**
 - 8.1 Probenvorbehandlung / -aufschluss..... 6
 - 8.2 Probenverdünnung..... 6
- 9. TESTDURCHFÜHRUNG.....6**
 - 9.1 Testvorbereitungen..... 7
 - 9.2 Testansatz 8
 - 9.3 Messung 9
- 10. AUSWERTUNG DER ERGEBNISSE9**
- 11. TESTCHARAKTERISTIKA10**
 - Präzision und Reproduzierbarkeit10
 - Wiederfindung10
 - Linearität..... 11
- 12. LITERATUR12**
- 13. ALLGEMEINE HINWEISE ZUM TEST12**

1. VERWENDUNGSZWECK

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

Folsäure, ein wasserlösliches, licht- und temperaturempfindliches Vitamin des B-Komplexes (Vitamin B₉), ist an allen Wachstums- und Entwicklungsprozessen des Körpers beteiligt. Folsäure ist essentiell für die Bildung roter Blutkörperchen, für eine optimale Funktion des Knochenmarks und eine gesunde Nerventätigkeit. Folsäure ist außerdem essentiell für die Zellteilung (daher seine Bedeutung bei der Fötusentwicklung).

Obwohl Folsäure in den meisten pflanzlichen und tierischen Lebensmitteln enthalten ist, ist Folsäuremangel der am weitesten verbreitete Vitaminmangel in Europa und Nordamerika. Nach Angaben der Deutschen Gesellschaft für Ernährung nimmt nur jeder 4. Deutsche genügend Folsäure auf – die Folge einer einseitigen Ernährungsweise mit wenig frischem Obst und Gemüse. Aber auch Alter, Krankheiten und die Einnahme bestimmter Medikamente, wie z.B. Cotrimoxazol, können zu Resorptionsstörungen und einer damit verbundenen Unterversorgung führen.

Erniedrigte Folsäurespiegel kommen zustande durch:

- ein vermindertes Angebot (z.B. durch Alkoholismus oder Folsäure-Antagonisten),
- eine gestörte Resorption (z.B. bei Zöliakie, CED),
- einen vermehrten Bedarf (z.B. in der Schwangerschaft, bei Anämien oder Krebserkrankungen).

Mangelsymptome

Erste Mangelsymptome sind Müdigkeit, Reizbarkeit, Konzentrationsschwäche und Appetitlosigkeit; weitere Folgen sind Entzündungen der Schleimhäute, Anämie und schwere neurologische Schädigungen. Während der Schwangerschaft – in der sich der Folsäurebedarf verdoppelt – kann ein Mangel zu Frühgeburt und schweren Missbildungen führen. Durch eine optimale Folsäureversorgung während der Schwangerschaft kann das Risiko eines Neuralrohrdefekts beim Fötus um 85% vermindert werden. Da sowohl ein Folsäuremangel sowie ein Vitamin B₁₂-Mangel eine megaloblastäre Anämie bedingen können, ist die Bestimmung beider Vitamine bei diesem Krankheitsbild wichtig, um das richtige Vitamin zu supplementieren. Die Behandlung der megaloblastären Anämie bei Vitamin B₁₂-Mangel mit Folsäure kann zu irreversiblen Schäden am zentralen Nervensystem führen.

Folsäure und Arteriosklerose

Ein Folsäuremangel gilt als häufigste Ursache einer Hyperhomocysteinämie. Die Hyperhomocysteinämie wird inzwischen als unabhängiger Faktor für Arteriosklerose angesehen, daher kann die Folsäurebestimmung im Rahmen einer KHK-Risikoermittlung zum Einsatz kommen. Unabhängig vom Einfluss der Folsäure auf den Homocysteinspiegel wurde ein weiterer positiver Effekt auf die Endothelfunktion bei Herzpatienten festgestellt, bei denen sich aufgrund einer andauernden Therapie mit organischen Nitraten eine Nitrattoleranz entwickelt hatte. Ohne Folsäure-Supplementierung kommt es bei solchen Patienten zur vermehrten Freisetzung von Sauerstoffradikalen.

Indikationen

- Hyperchrome, makrozytäre Anämie (Leitsymptom)
- Langzeittherapie mit Antiepileptika bzw. Folsäure Antagonisten
- Langzeithämodialyse
- (Mehrlings-)Schwangerschaft / geplante Schwangerschaft
- gesteigerte Erythropoese
- Chronische Lebererkrankungen
- Hämoblastosen
- Psoriasis; Dermatitis
- Stomatitis; Glossitis
- Chronischer Alkoholabusus

3. TESTPRINZIP

Das Serum wird mit einem Puffergemisch vorbehandelt und verdünnt. Die verdünnte Probe wird in die Kavitäten einer Mikrotiterplatte [PLATE] gegeben, die mit *Lactobacillus rhamnosus* beschichtet sind.

Nach Zugabe von Folsäure 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 rhamnosus* wird als Trübung bei 610 - 630 nm (alternativ bei 540 - 550 nm) im ELISA-Reader gemessen und mit einer Standard-Konzentrationsreihe verglichen. Die Menge der Folsäure ist dabei direkt proportional der Trübung.

4. INHALT DER TESTPACKUNG

Artikel Nr.	Abkürzung	Kit Komponenten	Menge
KIF005MTP	PLATE	1 x Mikrotiterplatte, beschichtet mit <i>Lactobacillus rhamnosus</i> , gebrauchsfertig	12 Streifen à 8 Kavitäten
KIF005SO	SOL	Probenbehandlungspuffer 5 ml, gebrauchsfertig	4 x
KIF005DI	DIL	Wasser 30 ml, gebrauchsfertig	4 x
KIF005ME	ASYMED	Folsäure-Assay-Medium	4 x
KIF005ST	STD	Folsäure -Standard	4 x
KIF005FO	FOL	Abklebefolie	4 x
KIF005FR	FRA	Ersatzrahmen zum Umstecken der Mikrotiterstreifen	1 x
KIF005BU	ASYBUF	Folsäure Medium-Behandlungspuffer 1.5 ml	4 x
KIF005KO1	CTRL1	Folsäure-Kontrolle 1	4 x
KIF005KO2	CTRL2	Folsäure-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)
- Biozentrifuge (10 000 x g)

6. LAGERUNG DER REAGENZIEN

- Den Testkit / die Reagenzien bei 2 - 8 °C lagern.
- Angesetzte Reagenzien unmittelbar verwenden und nach Testansatz verwerfen.
- Nicht angebrochene Reagenzien (Standard, Medium) 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] 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 8 h. Zu einer längeren Lagerung von 6 - 8 Wochen sollte die Probe bei -20 °C aufbewahrt werden (Folsäure ist lichtempfindlich).
- Hämolytische Proben beeinflussen das Testergebnis und sollten nicht verwendet werden. Lipämische Proben vor dem Einsatz im Test bei 13 000 x g zentrifugieren um ein möglichst fettfreies Serum zu erhalten.
- Proben sollten vor dem Einsatz zentrifugiert werden (mind. 5 min bei 10 000 x g). Den resultierenden Überstand im Test einsetzen.

8.1 Probenvorbehandlung / -aufschluss

100 µl Serumprobe oder Kontrolle [CTRL1, CTRL2] mit 400 µl Probenbehandlungspuffer [SOL] versetzen, 30 min bei 95°C erhitzen und schnell abkühlen. Anschließend zentrifugieren (mind. 5 min bei 10 000 x g).

8.2 Probenverdünnung

Vom Überstand der vorbehandelten Serumprobe oder Kontrolle [CTRL1, CTRL2] 50 µl abnehmen, 700 µl Wasser [DIL] zugeben und mischen (alternativ 25 µl Serum und 350 µl Wasser [DIL]). Die Probenvorbehandlung und -verdünnung entsprechen insgesamt einer 1:75-Verdünnung (= Probenverdünnungsfaktor).

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] und Standard [STD]

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

Assay-Medium [ASYMED]

- Das Medium [ASYMED] muss vor jedem Test frisch hergestellt werden.
- Trockenbeutel vom Medium [ASYMED] im Fläschchen mit Pinzette abschütteln, herausnehmen und werfen.
- Zum Assay-Medium [ASYMED] 1 ml Medium-Behandlungspuffer [ASYBUF] und 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) steril filtrieren.

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:

Folsäure [µg / l]	Wasser [DIL] [µl]	+	Standard [STD] [µl]	=	Gesamtvolumen [µl]
Blank: 0	450	+	0	=	450
Standard 1: 0,04	450	+	50	=	500
Standard 2: 0,08	400	+	100	=	500
Standard 3: 0,16	300	+	200	=	500
Standard 4: 0,24	200	+	300	=	500
Standard 5: 0,32	100	+	400	=	500

Kontrollen [CTRL1 CTRL2]

Kontrollen vor dem Test frisch herstellen:

- Kontrollflaschen [CTRL1, CTRL2] öffnen, Schraubdeckel mit dem Kopf nach unten ablegen.
- In die Kontrollflaschen [CTRL1, CTRL2] 0,125 ml Wasser [DIL] aus dem Testkit zugeben, Flaschen vortexen und so Kontrollen lösen (= Kontrolle1, Kontrolle 2).
- Die Kontrollen [CTRL1, CTRL2] nach dem Rekonstituieren wie eine Probe behandeln.
- Pro Kavität werden je 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 Folsäure-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-, Kontrollen- bzw. Probenlösungerspülen.
- 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 aufschüt-teln
- Platte [PLATE] wieder zurückdrehen und die Abklebefolie [FOL] diagonal, von oben rechts beginnend, in einem Winkel von ca. 180°C **vorsichtig** nach hinten abziehen. Mit einer Hand dabei die Streifen fest im Rahmen halten (Folie ist stark klebend!).
- Eventuell vorhandene Bläschen an der Oberfläche der Messlösung in den Kavitäten zerstören, z.B. mit Hilfe einer Pipettenspitze oder einer Nadel.
- Trübung im ELISA-Reader bei E 610 - 630 nm messen (alternativ bei E 540 - 550 nm)

Hinweise

- Nach 48 h Inkubation kann die Mikrotiterplatte [PLATE] auch für max. 48 h im Kühl-schrank aufbewahrt werden, um danach die Trübung zu messen.
- Um Zeitverluste durch Feiertage oder Wochenende zu vermeiden, kann die Mikrotiter-platte [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

Folsäure in $\mu\text{g} / \text{l}$ = Wert aus Standardkurve x Probenverdünnungsfaktor (=75)

Referenzbereich für Humanserum

(n = 74) Serum-Folsäure: 3.8 - 23.2 $\mu\text{g}/\text{l}$

Anmerkung

Bei einem Probenverdünnungsfaktor von 75 ist ein Bereich von 3 - 24 $\mu\text{g}/\text{l}$ Folsäure abgedeckt. Wir empfehlen, dass jedes Labor seinen eigenen Normalwerte-Bereich erstellt, weil Referenz-bereiche stark von der Auswahl des Probandenkollektivs abhängig sind. Die Angabe des Referenzbereichs für Folsäure dient lediglich der Orientierung und kann von anderen publizierten Daten abweichen.

11. TESTCHARAKTERISTIKA (mit Humanserum erhoben)

Präzision und Reproduzierbarkeit

Intra-Assay (n=19)		
Probe 1	Folsäure [µg/l]	VK [%]
	12.69	4.7
Inter-Assay (n=5)		
Probe 1	Folsäure [µg/l]	VK [%]
	12.24	5.68

Wiederfindung

Proben von 4 Patienten wurden unterschiedlich verdünnt (75, 150, 300) und anschließend gespiked mit Folsäure und analysiert. Die Mittelwerte sind im Folgenden dargestellt:

n = 9

Probe	Mittelwert der Originalprobe [µg/l]	Spike [µg/l]	Folsäure erwartet [µg/l]	Folsäure gemessen [µg/l]	Wiederfindungsrate [%]
A	8.2 µg/l	5	13.2	13.8	112
		10	18.2	19.1	109
		15	23.2	24.8	111
Wiederfindungsrate gesamt [%]					111

n = 8

Probe	Mittelwert der Originalprobe [µg/l]	Spike [µg/l]	Folsäure erwartet [µg/l]	Folsäure gemessen [µg/l]	Wiederfindungsrate [%]
B	3.9 µg/l	5	8.9	9.3	108
		10	13.9	14.3	104
		15	18.9	19.5	104
Wiederfindungsrate gesamt [%]					105

n = 8

Probe	Mittelwert der Originalprobe [µg/l]	Spike [µg/l]	Folsäure erwartet [µg/l]	Folsäure gemessen [µg/l]	Wiederfindungsrate [%]
C	4.4	5	9.4	9.6	104
		10	14.4	14.5	101
		15	19.4	20.0	104
Wiederfindungsrate gesamt [%]					103

n = 8

Probe	Mittelwert der Originalprobe [µg/l]	Spike [µg/l]	Folsäure erwartet [µg/l]	Folsäure gemessen [µg/l]	Wiederfindungsrate [%]
D	5.1	5	10.1	10.6	110
		10	15.1	15.3	102
		15	20.1	20.6	103
Wiederfindungsrate gesamt [%]					105

Linearität

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

n = 2

Probe	Verdünnung	Folsäure erwartet [µg/l]	Folsäure gemessen [µg/l]
A	75	13.2	13.7
	150		14.0
	300		13.9
C	150	19.4	20.1
	300		20.7
	450		19.4

12. LITERATUR

Verhaar et al. (2002) Folates and cardiovascular diseases. Arterioscler Thromb Vasc Biol 22: 6-13

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

Obeid R, Herrmann W (2006) Mechanism of homocysteine neurotoxicity in neurodegenerative diseases with special reference to dementia. FEBS Lett May 29;580(13): 2994-3005

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

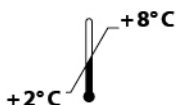
ID-Vit[®] Folic acid

Microbiological test kit for the determination of
folic acid in serum using a
Lactobacillus rhamnosus coated microtitre plate
For use in human and veterinary medicine and in research

Valid from 06.07.2011



KIF005



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 treatment/extraction19
 - 8.2 Sample dilution19
- 9. ASSAY PROCEDURE.....19
 - 9.1 Test preparations.....20
 - 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® Folic acid is a microtiter plate test kit based on a microbiological assay which measures the total folic 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 folic acid content. For use in human and veterinary medicine and in research. For in vitro diagnostic use only.

2. INTRODUCTION

Folic acid, a water soluble, light and temperature sensitive vitamin of the B complex (vitamin B₉), is involved in all growth and development processes of the body. Folic acid is essential for the formation of red blood cells, for optimal functioning of the bone marrow and for healthy nerve activity. Moreover, folic acid is essential for cell division, therefore it is important in foetus development.

Although most plant and animal based foods contain folic acid, a deficiency of folic acid is the most widespread vitamin deficiency in Europe and North America. According to information from the German Nutritional Society (Deutschen Gesellschaft für Ernährung) only one in four Germans absorb sufficient folic acid – the result of one-sided nutritional habits with little fresh fruit and vegetables. But also age, disease and the influence of specific medications e.g. Cotrimoxazol, may lead to resorption disturbances and to an associated deficiency.

Lowered folic acid levels occur because of:

- a decreased supply (e.g. through alcoholism or folic acid antagonists),
- a disrupted resorption (e.g. in celiac disease, CED),
- an increased requirement (e.g. during pregnancy, in anaemic or cancerous diseases).

Symptoms of Deficiency

The first symptoms of deficiency are weariness, irritability, concentration problems and loss of appetite; further consequences are inflammation of the mucous membranes, anaemia and grievous neurological damage.

During pregnancy – when the folic acid requirements are doubled – a deficiency in folic acid may lead to premature birth and severe abnormalities. An optimal supplementation of folic acid during the pregnancy can reduce the risk of neural tube defects in the foetus by 85%.

Because a deficiency of either vitamin B₁₂ or folic acid may lead to megaloblastic anaemia, the determination of both vitamins is important for the clinical picture so that the correct vitamin may be supplemented. Otherwise, in the case of vitamin B₁₂ deficiency, treatment of megaloblastic anaemia with folic acid may lead to irreversible damage of the central nervous system.

Folic Acid and Arteriosclerosis

A folic acid deficiency is known to be the most common cause of hyperhomocysteinaemia. Meanwhile, the hyperhomocysteinaemia has been recognised as an independent factor in arteriosclerosis. Therefore, the determination of folic acid can be carried out within the framework of a coronary disease risk analysis. Beside of the influence of folic acid on the homocysteine levels, a further positive effect on the endothelial function in heart patients has been established – development of nitrate tolerance during continuous nitrate therapy, e.g. in such patients, an increased release of oxygen radicals occurs without folic acid supplementation (Verhaar et al. 2002).

Indications

- Hyperchrome, macrocytic anemia
- Long-term therapy with antiepileptic drugs or folic acid antagonists
- Long-term haemodialysis
- Multiple birth pregnancy/ planned pregnancy
- Enhanced erythropoiesis
- Chronic liver disease s
- Hemoblastosis
- Psoriasis, Dermatitis
- Stomatitis, Glossitis
- Chronic alcohol abus

Reference:

Verhaar et al. (2002) Foliates and cardiovascular diseases. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 22: 6-13

3. PRINCIPLE OF THE TEST

Serum samples are diluted with a buffer solution. The diluted samples are added into the microtiter plate wells [PLATE] coated with *Lactobacillus rhamnosus* which metabolizes folic acid. The addition of folic acid in either standards [STD] or samples gives a folic acid-dependent growth response until it is consumed. After incubation at **37°C for 48 h**, the growth of *Lactobacillus rhamnosus* is measured turbidimetrically at 610 - 630 nm (alternative at 540 - 550 nm) in an ELISA-reader and a standard curve is generated from the dilution series. The amount of folic acid is directly proportional to the turbidity.

4. MATERIAL SUPPLIED

Catalog No	Label	Kit Components	Quantity
KIF005MTP	PLATE	One Lactobacillus rhamnosus-precoated microtiter plate, ready to use	12 x 8 wells
KIF005SO	SOL	Sample treatment solution 5 ml, ready to use	4 x
KIF005DI	DIL	Water 30 ml, ready to use	4 x
KIF005ME	ASYMED	Folic acid-Assay-Medium	4 x
KIF005ST	STD	Folic acid-Standard	4 x
KIF005FO	FOL	Cover plastic foil	4 x
KIF005FR	FRA	Replacement holder for 96-well plates	1 x
KIF005BU	ASYBUF	Folic acid medium treatment buffer 1.5 ml	4 x
KIF005KO1	CTRL1	Control Folic acid 1	4 x
KIF005KO2	CTRL2	Control Folic acid 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 polyethersulfone filter with a sterile tip
- 15 ml centrifugal tubes, sterile (e.g. Falcon tubes)
- Biocentrifuge (10 000 x g)

6. PREPARATION AND STORAGE OF REAGENTS

- Store test kit / reagents at 2-8°C.
- Prepare reagents freshly and use immediately after preparation. Discard remaining unused reagents and waste in accordance with country, federal, state, and local regulations.
- Put unused reagents (standard, medium) in the test kit and store at 2-8°C.
- Store holder with unused strips in the original package with the dry 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).
- GLP (Good Laboratory Practice)-guidelines should be observed.
- Water quality is extremely important. Only the water delivered with the test kit [DIL] should be used for medium dilution [ASYMED], standard [STD] and control [CTRL1, CTRL2] reconstitution as well as for sample preparation.
- It is essential to run a standard curve for each separate assay.
- It is recommended to run a duplicate standard [STD] curve as well as a sample analysis.
- If a higher dilution results in a higher measured value, inhibitors like antibiotics might be present.
- Reagents should not be used beyond the expiration date shown on kit label.
- Wear gloves during the test
- Used microtiter plates [PLATE] and materials that have been in contact with patient's samples should be handled and disposed as potentially infectious.
- Signs for reagent damage: The highest standard should have an absorption higher than 0.6 Extinction units ($A_{630\text{ nm}} > 0,6$)

8. SAMPLE PREPARATION

Notes

- Patient serum is used for analysis.
- Original samples should be kept light-protected at 2-8°C until measurement. The samples are stable for 8 hours at 2-8°C in the dark. For longer storage (6-8 weeks), samples should be frozen at -20°C (folic acid is light sensitive).
- 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 should be centrifuged (5 min at 10000 g) prior to measurement and the resulting supernatant used in the test.

8.1 Sample treatment/extraction

Add 100 µl of serum sample or controls [CTRL1, CTRL2] to 400 µl of sample preparation solution [SOL], heat to 95°C for 30 min and then cool fast. Afterwards, centrifuge (minimum 5 min at 10000 x g).

8.2 Sample dilution

Take 50 µl from the supernatant of the treated serum sample or control [CTRL1, CTRL2], add 700 µl of water [DIL] and mix (alternatively 25 µl serum and 350 µl water [DIL]). The sample treatment and dilution results in a final dilution of 1:75 (= sample dilution factor).

9. ASSAY PROCEDURE

Procedural notes

- Quality control guidelines should be observed.
- Incubation time, incubation temperature and pipetting volumes of the components are defined by the producer. Any variation of the test procedure, which is not coordinated with the producer, may influence the results of the test.
- The assay should always be performed according the enclosed manual.

9.1 Test preparations

Take 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] and standard [STD]

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

Assay medium [ASYMED]

- The medium must be freshly prepared before each test.
- Take the dry bag out of medium vial [ASYMED] by tweezers, shake off and discard.
- Add 1 ml medium treatment buffer [ASYBUF] and 10 ml of water [DIL] to the assay medium [ASYMED], securely close the bottle and shake well. The amount is sufficient for 6 strips.
- Heat the bottle with medium [ASYMED] in a water-bath at 90 - 100 °C for 5 min, while shaking well at least twice. It is important to make sure that the medium bottle is firmly closed at all times.
- Quickly cool the medium bottle to under 30 °C.
- Filter 10 ml medium [ASYMED] sterilely with a 0.2 µm filter in a centrifuge test tube. (e.g. 15 ml, Falcon).

Standard [STD]

Before the test, freshly prepare the standard curve solutions:

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

Folic acid [µg / l]	Water [DIL] [µl]	+	Standard [STD] [µl]	=	Total volume [µl]
Blank: 0	450	+	0	=	450
Standard 1: 0.04	450	+	50	=	500
Standard 2: 0.08	400	+	100	=	500
Standard 3: 0.16	300	+	200	=	500
Standard 4: 0.24	200	+	300	=	500
Standard 5: 0.32	100	+	400	=	500

Controls [CTRL1, CTRL2]

- The controls must be freshly prepared before the test.
- Open the bottle of controls [CTRL1, CTRL2], remove seal. Dispose of screw-top lid and seal.
- Add 0.125 ml of water [DIL] from the test kit to the control bottles [CTRL1, CTRL2], close the bottles and vortex (= control1, control 2).
- Treat the controls [CTRL1, CTRL2] afterwards as the sample is treated.
- Pipette 150 µl of the pretreated and diluted controls [CTRL1, CTRL2] into each well. We recommend to run the controls [CTRL1, CTRL2] in 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. (= 48 cavities)
- Put 150 µl Folic acid assay medium [ASYMED] in the cavities.
- Add 150 µl standard [STD], control [CTRL1, CTRL2] or sample in the respective cavities. Pre-rinse the pipette tip with standard, control or 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 [PLATE] over again and **carefully** remove the foil [FOL], beginning with the upper right corner and pulling diagonally backwards at an angle of 180°. During this fix the strips in the frame with your hand because the foil is highly adhesive.
- Remove air bubbles in the cavities using a pipette tip or a needle.
- Read turbidity in an ELISA-Reader at E 610 - 630 nm (alternatively at 540 - 550 nm)

Please note

- After 48 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

Folic acid in µg / l = Value from the standard curve x dilution factor (= 75)

Reference value for human serum

Folic acid: 3.8 - 23.2 µg/L (n=74)

Please note: A concentration range of 3 - 24 µg/L folic acid is covered using a sample dilution factor of 75.

We recommend each laboratory to develop its own normal range as normal ranges depend on the choice of patient collective. The values mentioned above are only for orientation and can deviate from other published data.

11. PERFORMANCE CHARACTERISTICS (obtained using human serum)

Precision and reproducibility

Intra-Assay (n=19)		
Sample 1	Folic acid [µg/L]	VC [%]
	12.69	4.70
Inter-Assay (n =5)		
Sample 1	Folic acid [µg/L]	VC [%]
	12.24	5.68

Recovery

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

n = 9

Sample	Mean value measured in original sample [µg/L]	Spike [µg/L]	Folic acid expected [µg/L]	Folic acid detected [µg/L]	Recovery Rate [%]
A	8.2 µg/L	5	13.2	13.8	112
		10	18.2	19.1	109
		15	23.2	24.8	111
Recovery rate in total [%]					111

n = 8

Sample	Mean value measured in original sample [µg/L]	Spike [µg/L]	Folic acid expected [µg/L]	Folic acid detected [µg/L]	Recovery Rate [%]
B	3.9 µg/l	5	8.9	9.3	108
		10	13.9	14.3	104
		15	18.9	19.5	104
Recovery rate in total [%]					105

n = 8

Sample	Mean value measured in original sample [µg/L]	Spike [µg/L]	Folic acid expected [µg/L]	Folic acid detected [µg/L]	Recovery Rate [%]
C	4.4	5	9.4	9.6	104
		10	14.4	14.5	101
		15	19.4	20.0	104
Recovery rate in total [%]					103

n = 8

Sample	Mean value measured in original sample [µg/L]	Spike [µg/L]	Folic acid expected [µg/L]	Folic acid detected [µg/L]	Recovery Rate [%]
D	5.1	5	10.1	10.6	110
		10	15.1	15.3	102
		15	20.1	20.6	103
Recovery rate in total [%]					105

Linearity

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

n = 2

Sample	Dilution	Folic acid expected [µg/L]	Folic acid detected [µg/L]
A	75	13.2	13.7
	150		14.0
	300		13.9
C	150	19.4	20.1
	300		20.7
	450		19.4

12. REFERENCES

Verhaar et al. (2002) Folates and cardiovascular diseases. Arterioscler Thromb Vasc Biol 22: 6-13

Obeid R, Herrmann W (2006) Mechanism of homocysteine neurotoxicity in neurodegenerative diseases with special reference to dementia. FEBS Lett May 29;580(13): 2994-3005

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 variation of the test procedure that is not coordinated with the producer may influence the results of the test. ifp Institute for Product Quality GmbH can, therefore, not be held responsible 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