

Arbeitsanleitung / Manual

Nur für den Gebrauch durch Fachpersonal /
For professional use only

ID-Vit[®] Niacin

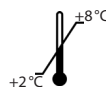
***Mikrobiologisches Verfahren zur Bestimmung des Gesamtgehalts von freiem Niacin (Nikotinsäure/Nikotinsäureamid) in Serum mittels einer Lactobacillus-plantarum-beschichteten Mikrotiterplatte
Zur Verwendung in Human- und Veterinärmedizin und zu Forschungszwecken***

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

Gültig ab / Valid from 2025-03-28

REF KIF003

Σ 96



IVD

CE

REF KIF003.2

Σ 2 x 96



Immundiagnostik AG, Stubenwald-Allee 8a, 64625 Bensheim, Germany

Tel.: +49 6251 70190-0

Fax: + 49 6251 70190-363

e.mail: info@immundiagnostik.com www.immundiagnostik.com

Sicherheitshinweise

Der Assay ist ausschließlich nach der dem Kit beigefügten Arbeitsanleitung durchzuführen. Wichtige Sicherheitshinweise zu diesem Produkt sind dem Kapitel HINWEISE UND VORSICHTSMASSNAHMEN zu entnehmen.

Inhalt

1. ZWECKBESTIMMUNG	2
2. EINLEITUNG	2
3. TESTPRINZIP	3
4. INHALT DER TESTPACKUNG	4
5. ERFORDERLICHE LABORGERÄTE UND HILFSMITTEL	4
6. HINWEISE UND VORSICHTSMASSNAHMEN	4
7. LAGERUNG UND VORBEREITUNG DER REAGENZIEN	5
7.1 Wasser	5
7.2 Herstellung des sterilen Assay-Mediums	5
7.3. Herstellung der Kontrollen	6
7.4 Herstellung der Standardkurve	6
7.5 Mikrotiterplatte [PLATE]	7
8. PROBENLAGERUNG UND -VORBEREITUNG	7
8.1 Probenverdünnung	7
9. TESTDURCHFÜHRUNG	7
9.1 Testvorbereitungen	7
9.2 Testansatz	8
9.3 Messung	8
10. AUSWERTUNG DER ERGEBNISSE	9
10.1 Berechnung	9
10.2 Qualitätskontrolle	9
11. EINSCHRÄNKUNGEN	9
12. TESTCHARAKTERISTIKA	10
12.1 Präzision und Reproduzierbarkeit	10
12.2 Wiederfindung	10
12.3 Linearität	12
13. ALLGEMEINE HINWEISE ZUM TEST	12
14. LITERATUR	13
15. SYMBOLE	14

1. ZWECKBESTIMMUNG

Der ID-Vit® Niacin-Mikrotiterplattentest ist ein mikrobiologisches Verfahren zur Bestimmung des Gesamtgehaltes an freiem Niacin (Nikotinsäure und Nikotinsäureamid) in Serum. Alle benötigten Reagenzien und der Standard sind im Test enthalten. Für die Auswertung ist ein ELISA-Reader notwendig. Zur Verwendung in Human- und Veterinärmedizin und zu Forschungszwecken. Nur zur *In-vitro*-Diagnostik.

2. EINLEITUNG

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

Niacin-Mangelercheinungen

Symptome eines leichten Niacinmangels können sein:

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

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

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

Cholesterinsenker Niacin

Niacin hemmt die Fettsäurefreisetzung aus dem Fettgewebe. Das Molekül ist ein seit langem bekannter Wirkstoff bei der Therapie der Fettstoffwechselstörungen und wird insbesondere bei Patienten mit kombinierter Dyslipidämie, die durch erhöhtes LDL-Cholesterin und erhöhte Triglyzeride sowie niedrige HDL-Cholesterin-Werte gekennzeichnet ist, und bei Patienten mit primärer Hypercholesterinämie verabreicht. Niacin wird zusammen mit Statinen zur Regulation des Fettstoffwechsels bei Fettstoffwechselstörungen eingesetzt, aber auch allein, wenn Statine nicht vertragen werden.

Indikationen

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

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

3. TESTPRINZIP

Das Serum wird verdünnt in die Kavitäten einer Mikrotiterplatte gegeben, die mit *Lactobacillus plantarum* beschichtet sind. Nach Zugabe von Niacin als Standard oder als in einer Serumprobe enthaltenes Vitamin wächst der Keim so lange, bis das Vitamin aufgebraucht ist. Die Inkubation erfolgt bei **37 °C** für **46–50 h**. Das Wachstum des *Lactobacillus plantarum* wird als Trübung bei 610–630 nm (alternativ bei 540–550 nm) im ELISA-Reader gemessen und mit einer Standard-Konzentrationsreihe verglichen. Die Menge des Niacins ist dabei direkt proportional der Trübung.

4. INHALT DER TESTPACKUNG

Art.-Nr.	Bezeichnung	Kit-Komponenten	Menge	
			KIF003	KIF003.2
KIF000.30	DIL	Wasser	6 x 30 ml	7 x 30 ml
KIF003 KIF003.2	PLATE	Mikrotiterplatte, beschichtet mit <i>Lactobacillus plantarum</i>	1 x	2 x
	ASYMED	Niacin-Assay-Medium	4 x	4 x
	STD	Niacin-Standard, lyoph.	4 x	3 x
	FOL	Abklebefolie	1 x ganze 3 x halbe	3 x ganze
	FRA	Ersatzrahmen zum Umstecken der Mikrotiterstreifen	1 x	1 x
	CTRL1	Niacin-Kontrolle 1, lyoph.	4 x	3 x
	CTRL2	Niacin-Kontrolle 2, lyoph.	4 x	3 x

5. ERFORDERLICHE LABORGERÄTE UND HILFSMITTEL

- Inkubator mit dunkler Inkubationskammer, 37 °C
- Mikrotiterplattenphotometer 610–630 nm (540–550 nm)
- Kalibrierte Präzisionspipetten und sterile Pipettenspitzen für den Einmalgebrauch mit variablen Volumina von 20–1 000 µl
- 5-ml- bzw. 10-ml-Pipette
- 1,5–2 ml-Reaktionsgefäße
- 0,2 µm-Polyethersulfon (PES)-Sterilfilter und Einwegspritze (10 ml)
- 15 ml-Zentrifugenröhrchen, (z. B. Falcons)
- Biozentrifuge (10 000 g)
- Vortex-Mixer

6. HINWEISE UND VORSICHTSMASSNAHMEN

- Es handelt sich um einen mikrobiologischen Test. Kontaminationen führen zu falschen Ergebnissen.
- Die Wasserqualität ist von großer Bedeutung für den Testablauf. Nur das im Testkit enthaltene Wasser (**DIL**) verwenden.
- Bei den Sterilfiltern muss es sich um Polyethersulfon-Sterilfilter handeln.

- Bei jeder Testdurchführung muss eine Standardkurve mitgeführt werden.
- Bei jedem Ansatz sind Kontrollen mitzumessen.
- Es wird die Messung in Doppelwerten empfohlen.
- Die Reagenzien dürfen nach Ablauf des Haltbarkeitsdatums nicht mehr verwendet werden.
- Gebrauchte Mikrotiterplattenstreifen sowie andere mit Patientenproben in Kontakt gekommene Materialien sind als potenziell infektiös zu behandeln und entsprechend zu entsorgen.
- Als Vorsichtsmaßnahme wird empfohlen, das verwendete Humanmaterial immer als potentiell infektiös zu betrachten.

7. LAGERUNG UND VORBEREITUNG DER REAGENZIEN

- Den Testkit und die Reagenzien bei 2–8°C lagern.
- Angesetzte Reagenzien unmittelbar verwenden und nach Testansatz verwerfen.
- Bitte achten Sie bei mehrfachem Einsatz des Kits 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 3x (KIF003.2) bzw. 4x (KIF003) je nach Probenaufkommen bis zum angegebenen Haltbarkeitsdatum verwendet werden.

7.1 Wasser

- Wasser (**DIL**) für Medium (**ASYMED**), Standard (**STD**), Kontrollen (**CTRL1**, **CTRL2**) und Verdünnungen.
- Deckel nach oben drücken, nach hinten bis zum Glasrand abziehen und dann durch Drehen den gesamten Verschluss entfernen.

7.2 Herstellung des sterilen Assay-Mediums

- Das sterile Assay-Medium muss vor jedem Test frisch hergestellt werden.
- Trockenmittelbeutel aus dem Fläschchen mit einer Pinzette abschütteln, herausnehmen und verwerfen.

- Zum Assay-Medium (**ASYMED**) 10 ml Wasser (**DIL**) zugeben, das Fläschchen gut verschließen und gut vortexen. Die Menge ist ausreichend für 6 Mikrotiterstreifen.
- Medium mit Einwegspritze (10 ml) und dem 0,2-µm-PES-Filter in ein Zentrifugenröhrchen (15 ml, z. B. Falcon) sterilfiltrieren.
- Das so hergestellte sterile Assay-Medium wird im Test verwendet.
- Hinweis: Eventuell vorhandene Schwebstoffe im Assay-Medium, die durch die Sterilfiltration entfernt werden, haben keinen Einfluss auf den Messwert.

7.3. Herstellung der Kontrollen

- Die lyophilisierten Kontrollen (**CTRL1**, **CTRL2**) sind mit je **x ml** Wasser (**DIL**) (x = siehe Produktspezifikation) aus dem Testkit zu resuspendieren und mittels Vortex-Mixer zu homogenisieren.
- Die Kontrollen werden nach der Rekonstitution wie eine Probe behandelt.
- Die Konzentration der Kontrollen ändert sich von Charge zu Charge und ist der Produktspezifikation zu entnehmen.

7.4 Herstellung der Standardkurve

- Für die Herstellung des für die Standardkurve benötigten Standardkonzentrats ist der lyophilisierte Standard (**STD**) mit x ml Wasser (**DIL**) (x = siehe Quality Control Protocol) aus dem Testkit zu resuspendieren und mittels Vortex-Mixer zu homogenisieren.
- In 6 sterilen Reaktionsgefäßen (Fassungsvermögen 1,5–2 ml) wird mit dem Standardkonzentrat und Wasser (**DIL**) eine Standardkurve nach folgendem Schema hergestellt:

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

7.5 Mikrotiterplatte [PLATE]

- Die Mikrotiterplatte (**PLATE**) ist in der Aluminiumverpackung mit dem Trockenmittelbeutel bei 2–8 °C zu lagern.
- Die Mikrotiterplatte (**PLATE**) muss vor Feuchtigkeit und Kontamination geschützt sein.
- Es ist darauf zu achten, dass die Aluminiumverpackung nicht beschädigt wird.
- Die Aluminiumverpackung nach dem Öffnen wieder sorgfältig verschließen.
- Nur die benötigten Mikrotiterstreifen unmittelbar vor Gebrauch entnehmen, um Kontaminationen zu vermeiden..

8. PROBENLAGERUNG UND -VORBEREITUNG

- Die Analyse ist mit Serum durchzuführen.
- Die Haltbarkeit der Probe beträgt bei 2–8 °C im Dunkeln 3 Tage. Zur längeren Lagerung kann die Probe bei -20 °C bis zu 5 Monate aufbewahrt werden.
- Proben vor dem Einsatz zentrifugieren (mind. 5 min bei 10 000 g). Den resultierenden Überstand im Test einsetzen.
- Hämolytische Proben nicht verwenden, da sie das Testergebnis beeinflussen. Lipämische Proben vor dem Einsatz im Test bei 13 000 g für 10 min zentrifugieren, um ein möglichst fettfreies Serum zu erhalten.

8.1 Probenverdünnung

Von den Serumproben/den Kontrollen je 100 µl abnehmen, 300 µl Wasser (**DIL**) zugeben und mischen. Dies resultiert in einer 1:4-Verdünnung (= Probenverdünnungsfaktor).

9. TESTDURCHFÜHRUNG

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.

9.2 Testansatz

- Benötigte Mikrotiterstreifen entnehmen und in den Ersatzrahmen (**FRA**) stecken.
- 150 µl steriles Assay-Medium in jede Kavität geben.
- Je 150 µl der hergestellten Standardverdünnungen (Blank, Standard 1–5), vorbereiteten Proben und Kontrollen in die jeweiligen Kavitäten pipettieren. Pipettenspitzen jeweils mit der Standard-, Proben- bzw. Kontroll-Lösung vor-spülen.
- Sorgfältig die befüllten Kavitäten mit der im Kit enthaltenen Klebefolie (**FOL**) abkleben. Wichtig: die Kavitäten müssen durch Andrücken mit der Hand luftdicht verschlossen werden!
- Bei **37 °C** für **46–50 h** im Brutschrank inkubieren.

9.3 Messung

- Klebefolie (**FOL**) nochmals mit der Hand fest andrücken.
- Mikrotiterplatte (**PLATE**) über Kopf drehen, auf eine Tischoberfläche legen und Keime gut aufschütteln.
- Mikrotiterplatte (**PLATE**) wieder zurückdrehen und die Abklebefolie (**FOL**) 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 46–50 h Inkubation kann die Mikrotiterplatte (**PLATE**) auch für max. 48 h im Kühlschrank aufbewahrt werden, um danach die Trübung zu messen.

10. AUSWERTUNG DER ERGEBNISSE

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

Der Blank dient als optische Kontrolle zum Ausschluss von Kontaminationen und wird nicht in der Berechnung berücksichtigt. Die optische Dichte muss $<$ Standard 1 haben. Ist dies nicht der Fall, muss die Analyse erneut durchgeführt werden.

10.1 Berechnung

Niacin in $\mu\text{g/l}$ = Wert aus Standardkurve \times Probenverdünnungsfaktor (4)

Referenzbereich für Humanserum

Anhand einer laborinternen Studie mit Serumproben von augenscheinlich Gesunden ($n = 83$) wurden die folgenden Werte ermittelt.

Niacin: 17–85 $\mu\text{g/l}$ (Mittelwert \pm 2 SD)

Anmerkung

Bei einem Probenverdünnungsfaktor von 4 ist ein Bereich von 8–160 $\mu\text{g/l}$ Niacin abgedeckt.

Wir empfehlen jedem Labor, einen eigenen Referenzbereich zu etablieren, da Referenzbereiche stark von der Auswahl des Probandenkollektivs abhängig sind. Die Angabe des Referenzbereichs für Niacin dient lediglich der Orientierung und kann von anderen publizierten Daten abweichen.

10.2 Qualitätskontrolle

Die Extinktion des höchsten Standards muss $> 0,6$ sein.

Die Ergebnisse der Kontrollen müssen auf Richtigkeit überprüft werden. Liegen eine oder mehrere Kontrollen oder der höchste Standard außerhalb des angegebenen Bereiches, kann Immundiagnostik die Richtigkeit der Messergebnisse nicht gewährleisten.

11. EINSCHRÄNKUNGEN

Nur Serum kann im Test eingesetzt werden.

12. TESTCHARAKTERISTIKA

Die nachfolgenden Testcharakteristika wurden mit Humanserum erhoben.

12.1 Präzision und Reproduzierbarkeit

Intra-Assay (n = 6)

	Niacin [$\mu\text{g/l}$]	VK [%]
Probe	64	2,9

Inter-Assay (n = 5)

	Niacin [$\mu\text{g/l}$]	VK [%]
Probe	64	3,4

12.2 Wiederfindung

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

Probe (n=9)	Mittelwert Originalprobe [$\mu\text{g/l}$]	Spike [$\mu\text{g/l}$]	Niacin erwartet [$\mu\text{g/l}$]	Niacin gemessen [$\mu\text{g/l}$]	Wiederfindungsrate [%]
A	21,5	60	81,5	77	93
		120	141,5	134	94
		180	201,5	203	101
Wiederfindungsrate gesamt [%]					96

Probe (n=9)	Mittelwert der Originalprobe [$\mu\text{g/l}$]	Spike [$\mu\text{g/l}$]	Niacin erwartet [$\mu\text{g/l}$]	Niacin gemessen [$\mu\text{g/l}$]	Wiederfindungsrate [%]
B	16,9	60	76,9	76	99
		120	136,9	136	100
		180	196,9	199	101
Wiederfindungsrate gesamt [%]					100

Probe (n=9)	Mittelwert der Originalprobe [$\mu\text{g/l}$]	Spike [$\mu\text{g/l}$]	Niacin erwartet [$\mu\text{g/l}$]	Niacin gemessen [$\mu\text{g/l}$]	Wiederfindungsrate [%]
C	19,9	60	79,9	79	99
		120	139,9	145	104
		180	199,9	203	102
Wiederfindungsrate gesamt [%]					102

Probe (n=10)	Mittelwert Originalprobe [$\mu\text{g/l}$]	Spike [$\mu\text{g/l}$]	Niacin erwartet [$\mu\text{g/l}$]	Niacin gemessen [$\mu\text{g/l}$]	Wiederfindungsrate [%]
D	18,3	60	78,3	82	106
		120	138,3	139	100
		180	198,3	195	98
Wiederfindungsrate gesamt [%]					102

12.3 Linearität

Proben von 2 Patienten wurden verdünnt und analysiert. Die Ergebnisse sind im Folgenden dargestellt:

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

13. ALLGEMEINE HINWEISE ZUM TEST














- Dieser Kit wurde nach der IVD Richtlinie 98/79/EG hergestellt und in den Verkehr gebracht.
- Sämtliche in der Testpackung enthaltene Reagenzien dürfen ausschließlich zur *in-vitro*-Diagnostik eingesetzt werden.
- *ID-Vit®* ist eine Marke der Immundiagnostik AG.
- Reagenzien nach Ablauf des Verfallsdatums nicht mehr verwenden (Verfallsdatum siehe Testpackung).
- Einzelkomponenten mit unterschiedlichen Lot-Nummern aus verschiedenen Testpackungen nicht mischen oder austauschen.
- Für die Qualitätskontrolle sind die dafür erstellten Richtlinien für medizinische Laboratorien zu beachten.
- Die Testcharakteristika wie Inkubationszeiten, Inkubationstemperaturen und Pipettierolumina der verschiedenen Komponenten wurden vom Hersteller 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, zurückzusenden.
- Qualitätskontrollen immer mitmessen.
- Die Bestimmung ist immer nach der dem Kit beigefügten Arbeitsanleitung durchzuführen.
- Schwerwiegende Vorfälle sind der Immundiagnostik AG und den nationalen Aufsichtsbehörden zu melden.

14. LITERATUR

1. Strohecker, R. & Henning, H., **1963**. Vitamin-Bestimmungen. Erprobte Methoden. Weinheim/Bergstraße: *Verlag Chemie GmbH*.
2. Singer, D. et al., 2012. Defective intestinal amino acid absorption in Ace2 null mice. *American journal of physiology. Gastrointestinal and liver physiology*, **303**(6), pp.686-95.
3. Morris, M.C. et al., 2004. Dietary niacin and the risk of incident Alzheimer's disease and of cognitive decline. *Journal of neurology, neurosurgery, and psychiatry*, **75**(8), pp.1093–9.

15. SYMBOLE

	Temperaturbegrenzung		Bestellnummer
	<i>In-vitro</i> -Diagnostikum		Zu verwenden mit
	Hersteller		Inhalt ausreichend für <n> Prüfungen
	Chargenbezeichnung		Verwendbar bis
	Enthält Plasmaperivate oder menschliches Blut		Gebrauchsanweisung beachten
	Spezifikationsdatenblatt beachten		Nicht wiederverwenden
	eindeutige Produktidentifizierung		Enthält Material tierischen Ursprungs
	medizinische Substanz		Enthält Material humanen Ursprungs

Manual
For professional use only

ID-Vit[®] Niacin

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

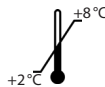
Valid from 2025-03-28

REF KIF003

REF KIF003.2

Σ 96

Σ 2x 96



IVD

CE



Immundiagnostik AG, Stubenwald-Allee 8a, 64625 Bensheim, Germany

Tel.: +49 6251 70190-0

Fax: +49 6251 70190-363

e.mail: info@immundiagnostik.com www.immundiagnostik.com

Table of Contents

1. INTENDED PURPOSE	19
2. INTRODUCTION	19
3. PRINCIPLE OF THE TEST	20
4. MATERIAL SUPPLIED	21
5. MATERIAL REQUIRED BUT NOT SUPPLIED	21
6. PRECAUTIONS	21
7. STORAGE AND PREPARATION OF REAGENTS	22
7.1 Water	22
7.2 Preparation of the sterile assay medium	22
7.3 Preparation of the controls	23
7.4 Preparation of the standard curve	23
7.5 Microtiter plate [PLATE]	23
8. SAMPLE STORAGE AND PREPARATION	24
8.1 Sample dilution	24
9. ASSAY PROCEDURE	24
9.1 Test preparations	24
9.2 Test procedure	24
9.3 Measurement	25
10. EVALUATION OF RESULTS	25
10.1 Calculation	25
10.2 Quality control	26
11. LIMITATIONS	26
12. PERFORMANCE CHARACTERISTICS	26
12.1 Precision and reproducibility	26
12.2 Recovery	27
12.3 Linearity	28
13. GENERAL NOTES ON THE TEST AND TEST PROCEDURE	29
14. REFERENCES	30
15. SYMBOLS	30

Safety information

The assay has to be performed exclusively according to the instructions for use enclosed with the kit. Important safety information for this product can be found in the chapter PRECAUTIONS.

1. INTENDED PURPOSE

ID-Vit® Niacin is a microtiter plate test kit based on a microbiological method which measures the total free niacin content in serum. The test kit contains the standard and all reagents required to perform the test. An ELISA reader is required for the evaluation of the results. For use in human and veterinary medicine and in research. For *in vitro* diagnostic use only.

2. INTRODUCTION

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

Niacin deficiency syndromes

Symptoms of minor niacin deficiency:

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

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

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

Niacin as cholesterol lowering drug

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

Indications

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

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

3. PRINCIPLE OF THE TEST

The serum samples are diluted and then transferred into the wells of a microtiter plate coated with *Lactobacillus plantarum*. The addition of niacin in either standards or samples gives a niacin-dependent growth response until niacin is consumed. After incubation at **37 °C** for **46–50 h**, the growth of *Lactobacillus plantarum* is measured turbidimetrically at 610–630 nm (alternatively at 540–550 nm) in an ELISA reader and compared to a standard curve generated from the dilution series. The amount of niacin is directly proportional to the turbidity.

4. MATERIAL SUPPLIED

Cat. No.	Label	Kit components	Quantity	
			KIF003	KIF003.2
KIF000.30	DIL	Water	6 x 30 ml	7 x 30 ml
KIF003 KIF003.2	PLATE	<i>Lactobacillus plantarum</i> -precoated microtiter plate	1 x	2 x
	ASYMED	Niacin assay medium	4 x	4 x
	STD	Niacin standard, lyoph.	4 x	3 x
	FOL	Adhesive cover foil	1 x whole 3 x half	3 x whole
	FRA	Replacement holder for microtiter strips	1 x	1 x
	CTRL1	Niacin control 1, lyoph.	4 x	3 x
	CTRL2	Niacin control 2, lyoph.	4 x	3 x

5. MATERIAL REQUIRED BUT NOT SUPPLIED

- Incubator with a dark incubation chamber, 37 °C
- ELISA reader 610–630 nm (540–550 nm)
- Calibrated precision pipettors and sterile single use 20–1 000 µl tips
- 5 ml and 10 ml pipets
- 1.5–2 ml reaction vials
- 0.2 µm sterile polyethersulfone (PES) filter with a disposable syringe (10 ml)
- 15 ml centrifuge tubes (e.g. Falcon tubes)
- Biocentrifuge (10 000 g)
- Vortex

6. PRECAUTIONS

- The test is based on a microbiological method. Contaminations lead to erroneous results.
- Water quality is extremely important for the test. Use only the water delivered with the test kit (**DIL**).
- For sterile filtration, only a sterile polyethersulfone filter must be used.
- It is essential to run a standard curve for each separate assay.

- Measure controls with each assay.
- We recommend measurements in duplicate.
- Do not use reagents beyond the expiration date shown on the label.
- As a precaution, it is recommended that the human material used is always considered potentially infectious.
- Used microtiter stripes and materials that have been in contact with patient samples must be handled and disposed of as potentially infectious.

7. STORAGE AND PREPARATION OF REAGENTS

- Store test kit and reagents at 2–8°C.
- Prepare reagents freshly and use them immediately after preparation.
- To run the assay more than once, ensure that reagents are stored at the conditions stated on the label. Prepare only the appropriate amount necessary for each run. The kit can be used up to 3 x (KIF003.2) or 4x (KIF003) within the expiry date stated on the label.

7.1 Water

- Water (**DIL**) for medium (**ASYMED**), standard (**STD**), controls (**CTRL1**, **CTRL2**) and dilutions.
- Push the lid up and pull it back to the rim of the glass, then twist the whole cap off.

7.2 Preparation of the sterile assay medium

- Fresh sterile assay medium has to be prepared each time before performing a test.
- Remove the desiccant bag from the lyophilised assay medium bottle by taking the bag with a forceps and shaking it whilst still inside the bottle. Then remove the clean desiccant bag and discard it.
- Add 10 ml water (**DIL**) to the assay medium bottle (**ASYMED**), close the bottle firmly and vortex well. This amount is sufficient for 6 microtiter stripes.
- Filter the medium using a disposable syringe (10 ml) and the 0.2 µm PES filter into a centrifuge tube (15 ml, e.g. Falcon).

- After this preparation, the sterile assay medium can be used in the test.
- Note: Any suspended solids present in the assay medium, which are removed by the sterile filtration, have no impact on the measured values.

7.3 Preparation of the controls

- The lyophilised controls (**CTRL1**, **CTRL2**) have to be resuspended each with **x ml** water (**DIL**) ($x =$ see product specification) from the test kit, then homogenise using a vortex.
- After reconstitution, the controls are treated like samples.
- The concentration of the controls changes from lot to lot and is stated in the product specification.

7.4 Preparation of the standard curve

- For the preparation of the standard curve, standard concentrate is needed. To prepare standard concentrate, resuspend the lyophilised standard (**STD**) with **x ml** water (**DIL**) ($x =$ see quality control protocol) supplied with the test kit, then homogenise using a vortex.
- Prepare a standard curve in 6 sterile reaction tubes (1.5–2 ml volume) from standard concentrate and water (**DIL**) following the scheme depicted in the table below:

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

7.5 Microtiter plate [PLATE]

- Store the microtiter plate (**PLATE**) in the aluminium packaging containing the desiccant bag at 2–8 °C.
- The microtiter plate (**PLATE**) has to be protected from humidity and contamination.

- Take care that the aluminium packaging is not damaged.
- Carefully close the aluminium packaging after opening.
- Take only the microtiter stripes needed directly before usage to avoid contamination.

8. SAMPLE STORAGE AND PREPARATION

- Use serum for analysis.
- Samples are stable at 2–8°C for three days in the dark. For longer storage, samples can be frozen and kept at -20°C for up to 5 months.
- Centrifuge samples prior to measurement (at least 5 min at 10 000 *g*). Use the resulting supernatant in the test.
- Do not use hemolytic samples for analysis as they may give erroneous results. Centrifuge lipemic samples at 13 000 *g* for 10 min before assaying to obtain a serum that is as fat free as possible.

8.1 Sample dilution

Take 100 µl from the sample/control, add 300 µl water (**DIL**) and mix. This results in a total dilution of 1:4 (= sample dilution factor).

9. ASSAY PROCEDURE

9.1 Test preparations

Take as many microtiter strips as needed from kit. Return unused strips and any unused test kit components to the original packaging, and store in the refrigerator. Bring all necessary reagents to room temperature.

9.2 Test procedure

- Take as many microtiter strips as needed from the kit and put them in the second microtiter strip holder (**FRA**).
- Put 150 µl sterile assay medium into each cavity.

- Add 150 µl of the prepared standard dilutions (blank, standard 1–5), samples and controls into the respective cavities. Pre-rinse each pipet tip with standard, control or sample solution, respectively.
- Carefully seal the plate with adhesive cover foil (**FOL**). Important: the cavities must be made airtight by pressing the foil down with the hand!
- Keep at **37 °C** for **46–50 h** in an incubator.

9.3 Measurement

- Press the adhesive cover foil (**FOL**) firmly down again with the hand.
- Turn the microtiter plate (**PLATE**) upside down, place it onto a tabletop and shake the microbes well.
- Turn the microtiter plate (**PLATE**) over again and carefully remove the adhesive cover foil (**FOL**). 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 pipet tip or a needle.
- Read turbidity in an ELISA reader at E 610–630 nm (alternatively at E 540–550 nm).

Please note

- After 46–50 h incubation time, the microtiter plate (**PLATE**) may be stored for a maximum of 48 h in the refrigerator before measuring the turbidity.

10. EVALUATION OF RESULTS

We recommend to use the 4 parameter algorithm to calculate the results. The sample dilution factor has to be considered for data evaluation.

The blank serves as a visual control to exclude contamination and is not taken into account in the calculation. The optical density must be < standard 1. If this is not the case, the analysis must be carried out again.

10.1 Calculation

Niacin in µg/l = value from the standard curve × sample dilution factor (4)

Reference value for human serum

Based on studies of serum samples of apparently healthy persons ($n = 83$), the following values were estimated.

Niacin: 17–85 $\mu\text{g/l}$ (Mean \pm 2 SD)

Please note

A concentration range of 8–160 $\mu\text{g/l}$ niacin is covered at a sample dilution of 1:4.

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

10.2 Quality control

The extinction of the highest standard has to be > 0.6 .

Results, generated from the analysis of control samples, should be evaluated for acceptability. The results for the samples may not be valid if within the same assay one or more values of the quality control sample or the highest standard are outside the acceptable limits.

11. LIMITATIONS

Only serum can be used in the assay.

12. PERFORMANCE CHARACTERISTICS

The following performance characteristics have been collected using human serum samples.

12.1 Precision and reproducibility

Intraassay ($n = 6$)

	Niacin [$\mu\text{g/l}$]	CV [%]
Sample	64	2.9

Interassay ($n = 5$)

	Niacin [$\mu\text{g/l}$]	CV [%]
Sample	64	3.4

12.2 Recovery

Samples from 4 patients were diluted differently (20, 40, 80, 120, 160), spiked with niacin and analysed. The mean values are shown below.

Sample (n=9)	Mean value original sample [$\mu\text{g/l}$]	Spike [$\mu\text{g/l}$]	Niacin expected [$\mu\text{g/l}$]	Niacin measured [$\mu\text{g/l}$]	Recovery Rate [%]
A	21.5	60	81.5	77	93
		120	141.5	134	94
		180	201.5	203	101
Recovery rate in total [%]					96

Sample (n=9)	Mean value original sample [$\mu\text{g/l}$]	Spike [$\mu\text{g/l}$]	Niacin expected [$\mu\text{g/l}$]	Niacin measured [$\mu\text{g/l}$]	Recovery Rate [%]
B	16.9	60	76.9	76	99
		120	136.9	136	100
		180	196.9	199	101
Recovery rate in total [%]					100

Sample (n=9)	Mean value original sample [µg/l]	Spike [µg/l]	Niacin expected [µg/l]	Niacin measured [µg/l]	Recovery Rate [%]
C	19.9	60	79.9	79	99
		120	139.9	145	104
		180	199.9	203	102
Recovery rate in total [%]					102

Sample (n=9)	Mean value original sample [µg/l]	Spike [µg/l]	Niacin expected [µg/l]	Niacin measured [µg/l]	Recovery Rate [%]
D	18.3	60	78.3	82	106
		120	138.3	139	100
		180	198.3	195	98
Recovery rate in total [%]					102

12.3 Linearity

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

Sample	Dilution	Niacin expected [µg/l]	Niacin detected [µg/l]
A	4	128	128
	8		138
	16		137

Sample	Dilution	Niacin expected [µg/l]	Niacin detected [µg/l]
D	8	196	196
	16		193
	24		203
	32		188

















13. GENERAL NOTES ON THE TEST AND TEST PROCEDURE

- This assay was produced and distributed according to the IVD guidelines of 98/79/EC.
- All reagents in the kit package are for *in vitro* diagnostic use only.
- ID-Vit® is a trademark of Immundiagnostik AG.
- Reagents should not be used beyond the expiration date stated on the kit label.
- Do not interchange different lot numbers of any kit component within the same assay.
- The guidelines for medical laboratories 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 incorrect use.
- Warranty claims and complaints regarding deficiencies must be logged within 14 days after receipt of the product. The product should be send to Immundiagnostik AG along with a written complaint.
- Control samples should be analysed with each run.
- The assay should always be performed according to the enclosed manual.

14. REFERENCES

1. Strohecker, R. & Henning, H., **1963**. Vitamin-Bestimmungen. Erprobte Methoden. Weinheim/Bergstraße: *Verlag Chemie GmbH*.
2. Singer, D. et al., 2012. Defective intestinal amino acid absorption in Ace2 null mice. *American journal of physiology. Gastrointestinal and liver physiology*, **303**(6), pp.G686-95.
3. Morris, M.C. et al., 2004. Dietary niacin and the risk of incident Alzheimer's disease and of cognitive decline. *Journal of neurology, neurosurgery, and psychiatry*, **75**(8), pp.1093-9.

15. SYMBOLS

	Temperature limitation		Catalogue number
	<i>In Vitro</i> Diagnostic Medical Device		To be used with
	Manufacturer		Content sufficient for <n> tests
	Lot number		Use by
	Contains plasma derivatives or human blood		Consult instructions for use
	Consult specification data sheet		Do not re-use
	Unique Device Identification		Contains material of animal origin
	Medicinal substance		Contains material of human origin

Immundiagnostik AG

Stubenwald-Allee 8a
64625 Bensheim, Germany

Tel.: +49 6251 70190-0

Fax: +49 6251 70190-363

info@immundiagnostik.com

www.immundiagnostik.com

