

IMMULITE®

Vitamin B12

For use on the IMMULITE®
and IMMULITE® 1000 systems

DPC®

IMMULITE®/IMMULITE® 1000 Vitamin B12

English

Intended Use: For *in vitro* diagnostic use with the IMMULITE and IMMULITE 1000 Analyzers — for the quantitative measurement of vitamin B12 in serum or heparinized plasma, as an aid in clinical diagnosis and treatment of anemia.

Catalog Number: **LKVB1** (100 tests),
LKVB5 (500 tests)

Test Code: **VB** Color: **Violet**

Summary and Explanation

Vitamin B12 (cobalamin) and folate are nutrients essential to hematopoiesis.⁶ Megaloblastic anemia is almost always due to lack of one of these two vitamins.⁶ Vitamin B12 deficiency can also result in severe neurological impairment.^{1,2,7}

Circulating levels of vitamin B12 are usually a good index to tissue stores. That is, vitamin B12 levels as measured in serum or plasma by an optimized assay system are typically low in vitamin B12 deficiency, and normal or elevated otherwise.¹ Exceptions to this rule can occur in those relatively uncommon situations where levels of vitamin B12 transport proteins are abnormal.² Thus, low circulating vitamin B12 levels can occur in the absence of vitamin B12 deficiency where the level of transcobalamin I (a physiologically inactive transport protein) is low.⁸

Conversely, vitamin B12 deficiency can occur in the presence of normal or even elevated plasma vitamin B12 levels, where transcobalamin II levels are low or where levels of inactive vitamin B12 transport proteins are high, as in chronic myelogenous leukemia.^{5,8,11} (Circulating folate levels are usually normal or elevated in vitamin B12 deficiency, but red cell folate levels are frequently low in this condition.¹⁰)

Vitamin B12 deficiency occurs only rarely as a result of dietary lack of this vitamin.^{3,6} More commonly, it results from impaired absorption, as in partial or total gastrectomy, or in pernicious anemia, a condition characterized by absence or

near absence of intrinsic factor.⁶ Since roughly two thirds of all patients with pernicious anemia have blocking antibodies to intrinsic factor (IFbAb), while IFbAb are only very rarely encountered in other situations, IFbAb determinations represent a useful follow-up test for the differential diagnosis of vitamin B12 deficiency.^{4,8,10} (Circulating intrinsic factor antibodies are present in more than half of all pernicious anemia patients. Increased transport protein levels can occur, for example, in chronic myelogenous leukemia.)

Common causes of high vitamin B12 levels include liver disease, myeloproliferative disease (with chronic myelogenous leukemia as a special case) and the use of multivitamin supplements.

Principle of the Procedure

IMMULITE/IMMULITE 1000 Vitamin B12 is a solid-phase, competitive chemiluminescent enzyme immunoassay.

IMMULITE/IMMULITE 1000 Vitamin B12 involves a preliminary heat denaturation step. Vitamin B12 in the patient sample is released from carrier proteins by incubation at 100°C in the presence of dithiothreitol and potassium cyanide to inactivate vitamin B12-binding proteins, even at extreme levels, as well as antibodies to intrinsic factor.

After the heat denaturation step, the treated patient sample and hog intrinsic factor are simultaneously introduced into an IMMULITE/IMMULITE 1000 Test Unit containing a polystyrene bead coated with a B12 analog, and incubated for approximately 30 minutes at 37°C with intermittent agitation. During this incubation, vitamin B12 in the treated sample competes with the B12 analog on the solid phase for a limited number of vitamin B12 binding sites on the purified intrinsic factor. (Endogenous vitamin B12 analogs do not interfere, because the binder is free of R-protein.) Alkaline phosphatase-labeled anti-hog intrinsic factor is introduced, and the Test Unit is incubated for another 30-minute cycle. The unbound enzyme conjugate is removed by a centrifugal wash.

Incubation Cycles: 2 × 30 minutes.

Specimen Collection

Note: If sample is to be analyzed for both vitamin B12 and folic acid, the patient must be in a fasting state.¹⁸

Although neither bilirubin nor hemolysis has any clinically significant effects on the vitamin B12 results, the presence of hemoglobin in the sample will increase folic acid values. Additionally, hemolysis may indicate mistreatment of the specimen before receipt by the laboratory, hence the results should be interpreted with caution.

Because EDTA has a significant effect on results, it should not be used as an anticoagulant.

The use of an ultracentrifuge is recommended to clear lipemic samples.

Centrifuging serum samples before a complete clot forms may result in the presence of fibrin. To prevent erroneous results due to the presence of fibrin, ensure that complete clot formation has taken place prior to centrifugation of samples. Some samples, particularly those from patients receiving anticoagulant therapy, may require increased clotting time.

Blood collection tubes from different manufacturers may yield differing values, depending on materials and additives, including gel or physical barriers, clot activators and/or anticoagulants.

IMMULITE/IMMULITE 1000 Vitamin B12 has not been tested with all possible variations of tube types. Consult the section on Alternate Sample Types for details on tubes that have been tested.

Volume Required: 200 µL of sample — serum or plasma — is required for the sample pretreatment step. A single determination uses 100 µL of the *treated* sample: the sample cup should contain at least 250 µL more of the treated sample than the total volume required for the number of vitamin B12 determinations to be performed.

Storage: If not assayed within 8 hours, store at –20°C: stable for 6-8 weeks.¹⁴ Avoid excessive exposure to direct light.

Dilution of High Samples: The IMMULITE Vitamin B12 procedure has a

calibration range of 150 to 1,200 pg/mL (111 to 885 pmol/L). All samples expected to have vitamin B12 levels greater than this value should be diluted with Vitamin B12 Sample Diluent before assay.

Warnings and Precautions

For *in vitro* diagnostic use.

Reagents: Store at 2–8°C. Dispose of in accordance with applicable laws.

The Borate-KCN Buffer Solution contains cyanide. Extreme care must be taken to avoid all bodily contact with this reagent.

Follow universal precautions, and handle all components as if capable of transmitting infectious agents. Source materials derived from human blood were tested and found nonreactive for syphilis; for antibodies to HIV 1 and 2; for hepatitis B surface antigen; and for antibodies to hepatitis C.

Sodium azide, at concentrations less than 0.1 g/dL, has been added as a preservative. On disposal, flush with large volumes of water to prevent the buildup of potentially explosive metal azides in lead and copper plumbing.

Chloramphenicol, at concentrations less than 0.1 g/dL has been added as a preservative. Chloramphenicol is known to cause cancer; this disclosure is required by the state of California.

Chemiluminescent Substrate: Avoid contamination and exposure to direct sunlight. (See insert.)

Water: Use distilled or deionized water.

Materials Supplied

Components are a matched set. The barcode labels are needed for the assay.

Vitamin B12 Test Units (LVB1)

Each barcode-labeled unit contains one bead coated with vitamin B12 analog. Stable at 2–8°C until expiration date.

LKVB1: 100 units. **LKVB5:** 500 units.

Allow the Test Unit bags to come to room temperature before opening. Open by cutting along the top edge, leaving the ziplock ridge intact. Reseal the bags to protect from moisture.

Vitamin B12 Reagent Wedges (LVBA, LVBB)

With barcodes **LVBA**: one wedge (7.5 mL) containing vitamin B12 binding protein (purified hog intrinsic factor), with preservative. **LVBB**: one wedge (7.5 mL) containing alkaline phosphatase (bovine calf intestine) conjugated to murine monoclonal anti-hog intrinsic factor antibody in buffer, with preservative. Store capped and refrigerated: stable at 2–8°C until expiration date. Recommended usage is within 30 days after opening when stored as indicated.

LKVB1: 1 set. **LKVB5**: 5 sets.

Vitamin B12 Adjustors (LVBL, LVBH)

Two vials (Low and High) of lyophilized vitamin B12 in a human protein-based matrix, with preservative. Reconstitute each vial with **4.0 mL** distilled or deionized water. Mix by gentle swirling or inversion until the lyophilized material is fully dissolved. Stable at 2–8°C for 30 days after reconstitution, or for 6 months (aliquotted) at –20°C.

LKVB1: 1 set. **LKVB5**: 2 sets.

Note: The Adjustors must be subjected to the same heat denaturation step as patient samples. (See Sample Pretreatment section.)

Borate-KCN Buffer Solution (LBCN)

125 mL of Borate-KCN Buffer Solution, with preservative. Stable at 2–8°C for 30 days after opening.

LKVB1: 1 vial. **LKVB5**: 5 vials.

Caution! Contains cyanide. Extreme care must be taken to avoid all bodily contact with this reagent.

Dithiothreitol Solution (LDTT)

3 mL of a dithiothreitol solution. Stable at 2–8°C for 30 days after opening.

LKVB1: 1 vial. **LKVB5**: 5 vials.

Kit Components Supplied Separately**Vitamin B12 Sample Diluent (LVBZ)**

For the manual dilution of patient samples. One vial containing 25 mL of human serum protein-based diluent, with preservative. Stable at 2–8°C for 30 days after opening, or for 6 months (aliquotted) at –20°C.

LSUBX: Chemiluminescent Substrate

LPWS2: Probe Wash Module

LKPM: Probe Cleaning Kit

LCHx-y: Sample Cup Holders (barcoded)

LSCP: Sample Cups (disposable)

LSCC: Sample Cup Caps (optional)

CON6: Tri-level, multi-constituent control

Also Required

Sample transfer pipets, distilled or deionized water, controls.

Plain 12x75 mm polypropylene tubes, with loose-fitting caps — available from DPC.

Micropipets: 20, 200, and 1,000 µL. For the 1 mL reagent addition, a reliable repeating dispenser is suitable.

Plastic container with lid (for preparing the Working Solution).

Foil — or other means for protecting the hemolysates from light.

Covered boiling waterbath (100°C). Do *not* use an oven or a heat block.

Ambient temperature waterbath — for cooling the tubes after the boiling step.

4.0 mL volumetric pipet (± 0.02 mL) for reconstitution of Adjustors.

Preparation of Working Solution

Note: Samples being tested for both vitamin B12 and folic acid must be pretreated with the Working Solution described in the package insert for IMMULITE Folic Acid, catalog number LKFO.

The amount of each component depends on the number of tests to be performed. The volumes required, in microliters per test, are tabulated below. Be sure to multiply these volumes by a number slightly greater than the number of tests to be run. (The components are supplied in volumes sufficient for making up the Working Solution in approximately a 20% excess.)

	µL/test
Borate-KCN Buffer Solution	1,000
Dithiothreitol Solution	20

Important: The Working Solution should be prepared on a daily basis. If not used immediately, it should be refrigerated at

2–8°C for a period of not more than 24 hours.

Sample Pretreatment

1. Pipet **200 µL** of each Adjustor, control, or patient sample — serum or plasma — into the tubes prepared.

For patient samples expected to have vitamin B12 levels above the assay's calibration range, dilute the serum or plasma with Vitamin B12 Sample Diluent.

2. Add **1,000 µL** of the Working Solution to all tubes. Vortex.
3. Loosely cap all tubes and place them in a covered, boiling waterbath (100°C) for **15 – 20 minutes**.
4. Remove the tubes from the boiling waterbath, and cool them in an ambient waterbath for **5 minutes**.
5. Pipet at least **350 µL** of the treated sample to an IMMULITE/IMMULITE 1000 Sample Cup.

Treated samples, both serum and plasma, are stable at room temperature 15 – 28°C or refrigerated at 2 – 8°C for 1 hour prior to assay. Note that commercial controls may show variable stability after treatment.

Assay Procedure

Note that for optimal performance, it is important to perform all routine maintenance procedures as defined in the IMMULITE or IMMULITE 1000 Operator's Manual.

See the IMMULITE or IMMULITE 1000 Operator's Manual for: preparation, setup, adjustment, assay and quality control procedures.

Visually inspect each Test Unit for the presence of a bead before loading it onto the system.

Note that both Reagent Wedges A and B must be loaded on the carousel to run this assay.

Each Sample cup holder can be followed by up to four test units.

Recommended Adjustment Interval:
2 weeks.

Quality Control Samples: Use controls or serum pools with at least two levels (low and high) of vitamin B12.

Expected Values

Serum samples from 245 apparently healthy male and female blood donors who had not donated blood within the last 12 months, and 147 serum samples from apparently healthy volunteers were processed with the IMMULITE Vitamin B12 assays, yielding a reference range of 174 to 878 pg/mL (128 to 648 pmol/L)

Consider these limits as guidelines only. Each laboratory should establish its own reference ranges.

Limitations

EDTA plasma is not recommended for use.

Heterophilic antibodies in human serum can react with the immunoglobulins included in the assay components causing interference with *in vitro* immunoassays. [See Boscato LM, Stuart MC. Heterophilic antibodies: a problem for all immunoassays. Clin Chem 1998;34:27-33.] Samples from patients routinely exposed to animals or animal serum products can demonstrate this type of interference potentially causing an anomalous result. These reagents have been formulated to minimize the risk of interference; however, potential interactions between rare sera and test components can occur. For diagnostic purposes, the results obtained from this assay should always be used in combination with the clinical examination, patient medical history, and other findings.

Performance Data

See Tables and Graphs for data *representative* of the assay's performance. Results are expressed in pg/mL. (Unless otherwise noted, all were generated on serum samples collected in tubes without anticoagulants, gel barriers or clot-promoting additives.)

Conversion Factor:
 $\text{pg/mL} \times 0.7378 \rightarrow \text{pmol/L}$

Calibration Range: 150 – 1,200 pg/mL (111 – 885 pmol/L).

Analytical Sensitivity: 125 pg/mL (92 pmol/L).

Intraassay Precision (Within-Run): Statistics were calculated for samples from the results of 15 replicates in a single run. (See "Intraassay Precision" table.)

Interassay Precision (Run-to-Run): Statistics were calculated for samples assayed in 10 different runs. (See "Interassay Precision" table.)

Linearity: Samples were assayed under various dilutions. (See "Linearity" table for representative data.)

Recovery: Samples spiked 1 to 19 with four vitamin B12 solutions (2,160, 3,640, 5,460 and 7,640 pg/mL) were assayed. (See "Recovery" table for representative data.)

Specificity: As one test of the specificity of the purified intrinsic factor binder, mixtures of vitamin B12 analogs (containing mostly cobinamide) were assayed for vitamin B12 by the IMMULITE Vitamin B12 assay. The results showed no crossreactivity with cobinamide, even at concentrations as high as 1,800,000 pg/mL and 50,000,000 pg/mL.

Bilirubin: Presence of bilirubin in concentrations up to 200 mg/L has no effect on results, within the precision of the assay.

Hemolysis: Presence of hemoglobin in concentrations up to 381 mg/dL has no effect on results, within the precision of the assay.

Lipemia: Presence of triglycerides in concentrations up to 3,000 mg/dL has no effect on results, within the precision of the assay.

Alternate Sample Type: Samples ($n=22$) collected into plain and heparinized vacutainer tubes were assayed:

(Heparin) = 0.95 (Serum) + 8.5 pg/mL
 $r = 0.987$

Means:
474 pg/mL (Serum)
460 pg/mL (Heparin)

Because EDTA would have a significant effect on results, it should not be used as an anticoagulant.

Protein Effect: Two patient serum samples, spiked with varying amounts of human serum albumin (HSA) and normal

human IgG, were assayed. (See "Protein Effect" table for results.)

Method Comparison 1: The assay was compared to DPC's Dualcount[®] Solid Phase No Boil (SPNB) assay on 83 patient serum samples. (Concentration range: approximately 155 to 1,143 pg/mL. See "Method Comparison 1" graph.) By linear regression:

(IML) = 1.00 (SPNB) + 13.6 pg/mL
 $r = 0.979$

Means:
426 pg/mL (IMMULITE)
414 pg/mL (SPNB)

Method Comparison 2: The IMMULITE Vitamin B12 procedure was also compared to a commercially available radioimmunoassay (Kit A) on 97 patient serum samples. (Concentration range: approximately 153 to 1,218 pg/mL. See "Method Comparison 2" graph.) By linear regression:

(IML) = 0.91 (Kit A) + 18.6 pg/mL
 $r = 0.963$

Means:
406 pg/mL (IMMULITE)
424 pg/mL (Kit A)

References

- 1) Allen RH. Clinical role and current status of serum cobalamin (Vitamin B12) assays. *Ligand Quarterly* 1981 Fall;4(3):37-44, 67.
- 2) Carmel R. Megaloblastic anemia: vitamin B12 and folate. In: Fairbanks VF, editor. *Current hematology*. New York: John Wiley, 1983: 243-80.
- 3) Colman N. The radioisotopic investigation of anemia. *Ligand Quarterly* 1981 Fall;4(3):24-30.
- 4) Dawson DW. Diagnosis of vitamin B12 deficiency. *Br Med J* 1984;289:938-9.
- 5) Grsbeck R. Biochemistry and clinical chemistry of vitamin B12 transport and the related diseases. *Clin Biochem* 1984;17:99-107.
- 6) Herbert V. The nutritional anemias. *Hosp Pract* 1980 Mar;15(3):65-83, 87-9.
- 7) Herbert V. Biology of disease: megaloblastic anemias. *Lab Invest* 1985;52:3-19.
- 8) Kapadia CR, Donaldson RM. Disorders of cobalamin (vitamin B12) absorption and transport. *Ann Rev Med* 1985;36:93-110.
- 9) Kolhouse JF, et al. Cobalamin analogues are present in human plasma and can mask cobalamin deficiency because current radioisotope dilution assays are not specific for true cobalamin. *New Engl J Med* 1978;299:785-92.
- 10) Lindenbaum J. Status of laboratory testing in the diagnosis of megaloblastic anemia. *Blood* 1983;61:624-7.
- 11) Parry TE. The diagnosis of megaloblastic anemia. *Clin Lab Haematol* 1980;2:89-109.
- 12) Mollin DL, Ross GIM. Serum vitamin B12 concentrations in leukemia and in some other

hematological conditions. Brit J Haemat 1995;1:155-72. 13) Gilbert HS, et al. Serum vitamin B12 content and unsaturated vitamin B12 binding capacity in myeloproliferative disease. Ann Intern Med 1969;71:719-29. 14) Tietz NW, editor. Clinical guide to laboratory tests. 3rd ed. Philadelphia: WB Saunders, 1995:636. 15) National Committee for Clinical Laboratory Standards. Procedures for the collection of diagnostic blood specimens by venipuncture; approved standard. 4th ed. NCCLS Document H3-A4, Wayne, PA: NCCLS, 1998. 16) Food and Drug Administration (FDA), Letters from the Bureau of Medical Devices (BMD) to manufacturers of Vitamin B12 radioassay kits. April 1980, January 1981. 17) National Committee for Clinical Laboratory Standards (NCCLS). Guidelines for evaluating a B12 (cobalamin) assay. (Villanova, PA: NCCLS proposed standard PLSA-12, March 1979). Revised as "NCCLS recommendations with respect to vitamin B12 assays" — presented to the Food and Drug Administration (FDA) panel, 9 July 1979. 18) Chanarin I. The megaloblastic anemias. 2nd ed. Oxford: Blackwell Scientific, 1979. 19) Zucker RM, Podell E, Allen RH. Multiple problems with current no-boil assays for serum cobalamin. Ligand Quarterly 1981 Fall;4(3):52-8. See further: letters by Ziering S, et al, and by Zucker RM, et al, *ibid*, 60-3, and by Allen RH, *ibid*, 1982 Spring;5(1):48-9. 20) Kubasik NP, Ricotta M, Sine HE. Commercially-supplied binders for plasma cobalamin (vitamin B12) analysis — "purified" intrinsic factor, "cobinamide"-blocked R-protein binder, and non-purified intrinsic factor-R-protein binder — compared to microbiological assay. Clin Chem 1980;26:598-600.

Technical Assistance

In the United States, contact DPC's Technical Services department.
Tel: 800.372.1782 or 973.927.2828
Fax: 973.927.4101. Outside the United States, contact your National Distributor.

The Quality System of Diagnostic Products Corporation is registered to ISO 13485:2003.

Tables and Graphs

Intraassay Precision (pg/mL)

	Mean ¹	SD ²	CV ³
1	159	18	11.3%
2	204	21	10.3%
3	401	27	6.7%
4	736	39	5.3%
5	1,308	77	5.9%

Interassay Precision (pg/mL)

	Mean ¹	SD ²	CV ³
1	310	23	7.4%
2	660	40	6.1%
3	1,192	202	17%

Linearity (pg/mL)

	Dilution ¹	Observed ²	Expected ³	%O/E ⁴
1	8 in 8 ⁵	558	—	—
	4 in 8	229	279	82%
	2 in 8	140	140	100%
	1 in 8	77	70	110%
2	8 in 8	1,052	—	—
	4 in 8	561	526	107%
	2 in 8	270	263	103%
	1 in 8	147	132	111%

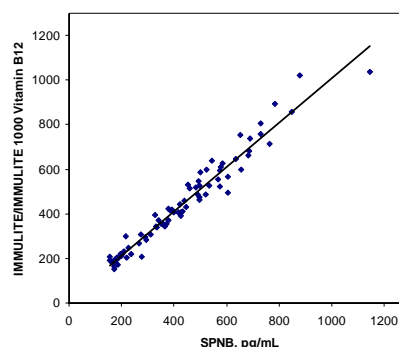
Recovery (pg/mL)

	Solution ¹	Observed ²	Expected ³	%O/E ⁴
1	—	250	—	—
	A	323	346	93%
	B	408	420	97%
	C	550	511	108%
	D	711	620	115%
2	—	527	—	—
	A	627	609	103%
	B	723	683	106%
	C	815	774	105%
	D	880	883	100%
3	—	816	—	—
	A	830	883	94%
	B	903	957	94%
	C	1,000	1,048	95%
	D	1,122	1,157	97%

Protein Effect (pg/mL)

	Added ¹	Vitamin B12, pg/mL ²
1	—	541
	30 g/L HAS	494
	50 g/L HAS	493
	20 g/L IgG	533
	30 g/L IgG	537
	60 g/L IgG	412
	50 g/L HSA plus	517
	30 g/L IgG	517
2	—	854
	30 g/L HAS	800
	50 g/L HAS	745
	20 g/L IgG	775
	30 g/L IgG	783
	60 g/L IgG	642
	50 g/L HSA plus	741
	30 g/L IgG	741

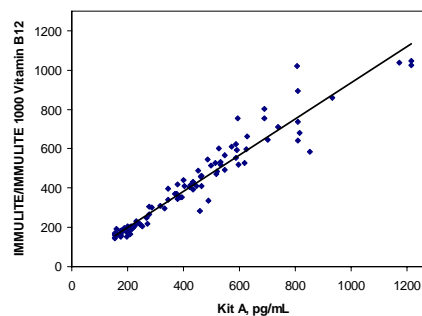
Method Comparison 1



$$(IML) = 1.00 (SPNB) + 13.6 \text{ pg/mL}$$

$$r = 0.979$$

Method Comparison 2



$$(IML) = 0.91 (\text{Kit A}) + 18.6 \text{ pg/mL}$$

$$r = 0.963$$

Deutsch. Intraassay Precision: ¹Mittelwert, ²S (Standardabweichung), ³CV (Variationskoeffizient). **Interassay Precision:** ¹Mittelwert, ²S (Standardabweichung), ³CV (Variationskoeffizient). **Linearity:** ¹Verdünnung, ²Beobachtet (B), ³Erwartet (E), ⁴% B/E, ⁵8 in 8. **Recovery:** ¹Probe, ²Beobachtet (B), ³Erwartet (E), ⁴% B/E. **Protein Effect:** ¹zugesezt, ²Vitamin B12, pg/ml. **Method Comparison:** Vitamin B12: Vitamin B12.

Español. Intraassay Precision: ¹Media, ²DS, ³CV. **Interassay Precision:** ¹Media, ²DS, ³CV. **Linearity:** ¹Dilución, ²Observado (O), ³Esperado (E), ⁴%O/E, ⁵8 en 8. **Recovery:** ¹Solución, ²Observado (O), ³Esperado (E), ⁴%O/E. **Protein Effect:** ¹Added, ²Vitamin B12, pg/ml. **Method Comparison:** Vitamin B12: Vitamina B12.

Français. Intraassay Precision: ¹Moyenne, ²SD, ³CV. **Interassay Precision:** ¹Moyenne, ²SD, ³CV. **Linearity:** ¹Dilution, ²Observé (O), ³Attendu (A), ⁴%O/A, ⁵8 dans 8. **Recovery:** ¹Solution, ²Observé (O), ³Attendu (A), ⁴%O/A. **Protein Effect:** ¹Added, ²Vitamin B12, pg/ml. **Method Comparison:** Vitamin B12: Vitamine B12.

Italiano. Intraassay Precision: ¹Media, ²SD (Deviazione Standard), ³CV (Coefficiente di Variazione). **Interassay Precision:** ¹Media, ²SD (Deviazione Standard), ³CV (Coefficiente di Variazione). **Linearity:** ¹Diluizione, ²Osservato (O), ³Atteso (A), ⁴%O/A, ⁵8 in 8. **Recovery:** ¹Soluzione, ²Osservato (O), ³Atteso (A), ⁴%O/A. **Protein Effect:** ¹Added, ²Vitamin B12, pg/ml **Method Comparison:** Vitamin B12: Vitamina B12.

Português. Intraassay Precision: ¹Média, ²Desvio padrão, ³Coefficiente de variação. **Interassay Precision:** ¹Média, ²Desvio padrão, ³Coefficiente de variação. **Linearity:** ¹Diluição, ²Observado (O), ³Esperado (E), ⁴%O/E, ⁵8 em 8. **Recovery:** ¹Solução, ²Observado (O), ³Esperado (E), ⁴%O/E. **Protein Effect:** ¹Added, ²Vitamin B12, pg/ml **Method Comparison:** Vitamin B12: Vitamina B12.

Deutsch

IMMULITE Vitamin B12

Anwendung: Zur *in vitro*-Diagnostik unter Verwendung der IMMULITE und IMMULITE 1000 Systeme – für die quantitative Bestimmung von Vitamin B12 im Serum oder Heparin-Plasma, als Hilfestellung zur klinischen Diagnose und Therapie von Anämien.

Artikelnummern: **LKVB1** (100 Tests), **LKVB5** (500 Tests)

Testcode: **VB** Farbe: **Violett**

Klinische Relevanz

Vitamin B12 und Folsäure sind essentielle Faktoren der Hämatopoese.⁶ Eine megaloblastäre Anämie ist in fast allen Fällen auf den Mangel eines dieser beiden Vitamine zurückzuführen.⁶ Ein Vitamin B12-Mangel kann ebenfalls zu verschiedenen neurologischen Beeinträchtigungen führen.^{1,2,7}

Die zirkulierenden Vitamin B12 Spiegel sind gewöhnlich ein guter Index für die Gewebespeicher. Die im Serum oder Plasma mittels eines optimierten Assays gemessenen Vitamin B12 Spiegel sind bei einem Vitamin B12-Mangel gewöhnlich niedrig, bei anderen klinischen Situationen normal oder erhöht.¹ Eine Ausnahme von dieser Regel kann in seltenen klinischen Fällen auftreten, bei denen die Spiegel des Transportproteins für Vitamin B12

abnormal sind.² Daher können erniedrigte Vitamin B12 Spiegel im Serum auftreten, auch wenn kein Vitamin B12-Mangel vorliegt, wenn die Spiegel des Transcobalamin I (eines physiologisch inaktiven Transportproteins) erniedrigt sind.⁸

Umgekehrt kann ein Vitamin B12 Mangel trotz normalen oder leicht erhöhten Vitamin B12 im Serum vorliegen, wenn die Spiegel des Transcobalamin II niedrig, oder die des inaktiven Transcobalamin I erhöht sind (z.B. bei chronisch myeloischer Leukämie).^{5,8,11} (Die Folsäurespiegel im Serum sind bei Vitamin B12 Mangel meist normal oder leicht erhöht, während die Erythrozytenfolsäure in diesen Fällen gewöhnlich erniedrigt ist).¹⁰

Ein Vitamin B12 Mangel resultiert selten aus einer ungenügenden Zufuhr über die Nahrung (Diät).^{3,6} Meist ist er das Ergebnis einer gestörten Resorption, wie in Fällen einer partiellen oder totalen Gastrektomie, oder einer perniziösen Anämie, verursacht durch totalen oder partiellen Mangel an Intrinsic Faktor.⁶ Nahezu zwei Drittel der Patienten mit perniziöser Anämie weisen blockierende Antikörper gegen Intrinsic Faktor (IFbAb) auf während IFbAb sonst nur sehr selten nachweisbar sind. IFbAb-Bestimmungen sind sehr hilfreich für die Differential-diagnose des Vitamin B12 Mangels.^{4,8,10} (Zirkulierende IFbAb-Spiegel sind bei mehr als der Hälfte aller Patienten mit perniziöser Anämie nachweisbar. Erhöhte Transportproteinspiegel können z. B. bei chronisch myeloischer Leukämie auftreten).

Häufige Ursache für hohe Vitamin B12 Spiegel im Serum sind Lebererkrankungen, myeloproliferative Erkrankungen (mit dem Spezialfall chronisch myeloische Leukämie) und der Gebrauch von Multivitaminpräparaten.

Methodik

Der Vitamin B12 – IMMULITE/IMMULITE 1000-Test ist ein kompetitiver Festphasen-Chemilumineszenz-Immunoassay.

Der IMMULITE/IMMULITE 1000 Vitamin B12 beinhaltet einen Probenvorbereitungsschritt des Patientenserums oder Plasmas. Das Vitamin B12 in der Probe wird von den Transportproteinen durch Inkubation bei

100°C in Anwesenheit von Dithiothreitol (DTT) und Kaliumcyanid (KCN) gelöst, um Vitamin B12-Bindeproteine (auch in hohen Konzentrationen) und Antikörper gegen den Intrinsic Faktor zu inaktivieren.

Nach dem Hitzedenaturierungsschritt wird die vorbehandelte Patientenprobe gemeinsam mit Intrinsic Faktor (Schwein) in ein IMMULITE/IMMULITE 1000-Testeinheit überführt, welches eine mit einem Vitamin B12-Analog beschichtete Polystyrolkugel enthält und für 30 Minuten bei 37°C unter intermittierendem Schütteln inkubiert. Während dieses Inkubationsschrittes konkurriert das Vitamin B12 in der vorbehandelten Probe mit dem Vitamin B12-Analog um eine limitierte Zahl von Bindungsstellen an dem gereinigten Intrinsic Faktor (Endogene Vitamin B12-Analoga interferieren nicht, da der Binder frei von R-Protein ist). Anschließend wird mit alkalischer Phosphatase markierter anti-Schwein-Intrinsic Faktor zugegeben und das Testeinheit für weitere 30 Minuten inkubiert. Ungebundenes Enzymkonjugat wird durch zentrifugales Waschen entfernt.

Inkubationszyklen: 2 x 30 Minuten

Probengewinnung

Bitte beachten: Sollen aus der Patientenprobe gleichzeitig Vitamin B12 und Folsäure bestimmt werden, muss der Patient nüchtern sein.¹⁸

Weder Bilirubin noch Hämolyse haben einen klinisch signifikanten Effekt auf den Assay. Hämolytische Proben geben einen Hinweis auf eine fehlerhafte Probenbehandlung in der präanalytischen Phase. Daher sollten solche Proben mit Vorsicht interpretiert werden.

Da EDTA einen signifikanten Effekt auf die Ergebnisse hat, kann es nicht als Antikoagulant verwendet werden.

Zur Klärung lipämischer Proben sollte eine Ultrazentrifuge eingesetzt werden.

Die Zentrifugation der Serumproben vor dem völligen Abschluss der Gerinnung kann zu Fibringerinnseln führen. Um fehlerhaften Analyseergebnissen infolge von Gerinnseln vorzubeugen, ist sicherzustellen, dass die Gerinnung vor der Zentrifugation der Proben vollständig abgeschlossen ist. Insbesondere Proben

von Patienten unter Antikoagulantien-therapie können eine verlängerte Gerinnungszeit aufweisen.

Blutentnahmeröhrchen von verschiedenen Herstellern können differierende Werte verursachen. Dies hängt von den verwendeten Materialien und Additiven (Gel oder physische Trennbarrieren, Gerinnungsaktivatoren und /oder Antikoagulantien) ab.

IMMULITE/IMMULITE 1000 Vitamin B12 sind nicht mit allen möglichen Röhrchenvariationen ausgetestet worden. Details der getesteten Röhrchenarten sind dem Kapitel "Alternative Probenarten" zu entnehmen.

Erforderliche Menge: 200 µl Probe (Serum oder Plasma) werden für den Vorbehandlungsschritt benötigt. Für eine Einzelbestimmung sind 100 µl der vorbehandelten Probe notwendig. Das Probenröhrchen muss aber mindestens 250 µl mehr an vorbehandelter Probe enthalten als für die Bestimmung selbst benötigt wird, da ein bestimmtes Überschussvolumen für die Vitamin B12-Bestimmungen gebraucht wird.

Lagerung: 8 Stunden bei 2–8°C oder 6–8 Wochen bei –20°C.¹⁴ Da Vitamin B12 lichtempfindlich ist, ist eine direkte Einwirkung von Licht auf die Proben zu vermeiden!

Verdünnung von Proben mit hoher Vitamin B12-Konzentration: Der IMMULITE Vitamin B12-Assay hat einen Kalibrationsbereich von 150 – 1 200 pg/ml (111–885 pmol/l). Alle Proben mit Konzentrationen > 1 200 pg/ml müssen vor der Bestimmung mit Vitamin B12-Verdünnungspuffer (LVBZ) verdünnt werden.

Hinweise und Vorsichtsmaßnahmen

Zur *In-vitro*-Diagnostik.

Reagenzien: Bei 2–8°C lagern. Unter Einhaltung der geltenden gesetzlichen Vorschriften entsorgen.

Der Borat-KCN-Puffer enthält Cyanid. Cyanid ist extrem giftig. Der Kontakt mit dieser Lösung sollte vermieden werden!

Die generell geltenden Vorsichtsmaßnahmen sind einzuhalten und alle Komponenten als potenziell

infektiös zu behandeln. Alle aus menschlichem Blut gewonnenen Materialien wurden auf Syphilis, Antikörper gegen HIV-1 und HIV-2, Hepatitis-B-Oberflächenantigen und Hepatitis-C-Antikörper untersucht und negativ befundet.

Bestimmten Komponenten wurde Natriumazid (<0,1 g/dl) hinzugefügt. Um die Bildung von explosiven Metallaziden in Blei- und Kupferrohren zu vermeiden, sollten die Reagenzien nur zusammen mit großen Wassermengen in die Kanalisation gespült werden.

Chloramphenicol wurde mit einer Konzentration von weniger als (<0,1 g/dl) als Konservierungsmittel zugesetzt. Chloramphenicol gilt als cancerogen; dieser Hinweis wird durch Vorgaben des Staates Kalifornien erforderlich.

Chemilumineszenz-Substrat:

Kontamination und direkte Sonneneinstrahlung vermeiden. Siehe Packungsbeilage.

Wasser: Destilliertes oder deionisiertes Wasser verwenden.

Im Lieferumfang enthalten

Die Komponenten sind aufeinander abgestimmt. Die Barcode-Etiketten werden für den Assay benötigt.

Vitamin B12-Testeinheiten (LVB1)

Jede mit Barcode-Etikette versehene Einheit enthält eine Vitamin B12-Analog beschichtete Kugel. Bei 2–8°C bis zum Ablaufdatum haltbar.

LKVB1: 100 Testeinheiten.

LKVB5: 500 Testeinheiten.

Verpackte Testeinheiten vor dem Öffnen stehen lassen, bis sie Zimmertemperatur erreicht haben. Oben entlang der Kante aufschneiden, ohne den Plastikverschluss zu beschädigen. Verpackungen wieder dicht verschließen, damit der Inhalt trocken bleibt.

Vitamin B12-Reagenzbehälter (LVBA, LVBB)

Mit Barcodes. **LVBA:** 1 Behälter 7,5 ml Vitamin B12-Bindungsprotein, mit Konservierungsmitteln (gereinigter Schweine-Intrinsic-Faktor). **LVBB:** 1 Behälter 7,5 ml mit alkalischer Phosphatase (Rinderkalbsdarm)

konjugierten Antikörper, (monoklonal, Maus) gegen Schweine-Intrinsic-Faktor in einem Puffersystem mit Konservierungsmittel. Verschlöschen und gekühlt aufbewahren: Bei 2–8°C bis zum Ablaufdatum haltbar. Bei entsprechender Lagerung beträgt die empfohlene Aufbewahrungsfrist nach dem Öffnen 30 Tage. **LKVB1:** 1 Set. **LKVB5:** 5 Sets.

Vitamin B12-Kalibratoren (LVBL, LVBH)

Zwei Fläschchen (niedrig und hoch) mit lyophilisiertem Vitamin B12 in einer humanen Protein-matrix, mit Konservierungsmittel. Fläschchen mit je **4,0 ml** destilliertem oder deionisiertem Wasser rekonstituieren. Zum Mischen leicht schwenken oder umdrehen, bis das lyophilisierte Material vollständig aufgelöst ist. Nach Rekonstituierung 30 Tage bei 2–8°C oder aliquotiert 6 Monate bei –20°C haltbar.

LKVB1: 1 set. **LKVB5:** 2 sets.

Achtung: Die Kalibratoren müssen ebenfalls wie die Patientenproben dem Hitze-Denaturierungsschritt unterzogen werden (siehe Probenvorbereitung).

Borat-KCN-Puffer (LBCN)

125 ml Borat-KCN-Puffer mit Konservierungsmittel. 30 Tage nach dem Öffnen bei 2–8°C haltbar.

LKVB1: 1 Flaschen.

LKVB5: 5 Flaschen.

Wichtiger Hinweis: Der Borat-KCN-Puffer enthält Cyanid. Cyanid ist extrem giftig. Es ist äußerste Vorsicht geboten, um jeden körperlichen Kontakt mit diesem Reagenz zu vermeiden.

Dithiothreitol-Lösung (LDTT)

3 ml Dithiothreitol-Lösung. 30 Tage nach dem Öffnen bei 2–8°C haltbar.

LKVB1: 1 Flaschen.

LKVB5: 5 Flaschen.

Separat erhältliche Testsystem-Komponenten

Vitamin B12-Probenverdünner (LVBZ)

Zur manuellen Verdünnung von Patientenproben. Eine Flasche enthält 25 ml eines Diluents auf humaner Serumproteinbasis mit Konservierungsmittel. 30 Tage nach dem

Öffnen bei 2–8°C haltbar oder aliquotiert
6 Monate bei –20°C.

LSUBX: Chemilumineszenz-Substrat

LPWS2: Pipettenwaschlösung

LKPM: Reinigungsmodul

LCHx-y: Probenträger (mit Barcodierung)

LSCP: (Einmal) Probengefäße

LSCC: Verschlüsse für die Probenträger
(optional)

CON6: Multikomponentenkontrolle in drei
Konzentrationen.

Ebenfalls benötigt werden:

Transferpipetten für die Proben,
destilliertes bzw. deionisiertes Wasser,
Kontrollen.

12x75 mm Polypropylen-Röhrchen mit
lose schließenden Stopfen (können über
DPC bezogen werden).

Mikropipetten: 20, 200 und 1 000 µl. Für
die Zugabe von 1 ml Reagenz eignet sich
ein Dispenser.

Plastik-Gefäß mit Deckel für die
Vorbereitung der Arbeitslösung.

Folie oder ähnliche Vorrichtung zum
Schutz des Hämolyrats vor Licht.

Geschlossenes, kochendes Wasserbad
(100°C). Keinen Inkubator oder Heizblock
benutzen.

Raumtemperatur-Wasserbad zum
Abkühlen der Proben nach dem Kochen.

4,0 ml volumetrische Pipette (± 0,02 ml)
für die Rekonstitution der Kalibratoren.

Herstellung der Arbeitslösung

Sollen aus einer Probe Vitamin B12 und
Folsäure bestimmt werden, muß für die
Probenvorbehandlung der Puffer
verwendet werden, der in der
Arbeitsanleitung des IMMULITE-Folsäure
Assays beschrieben ist catalog number
LKFO.

Die benötigte Menge jeder Komponente
hängt von der Anzahl der
durchzuführenden Tests ab. Die
benötigten Volumina sind in der Tabelle in
µl pro Test aufgeführt. Diese Volumina mit
einer etwas höheren Anzahl als die der
Tests multiplizieren. (Die Komponenten
sind in ausreichender Menge vorhanden,
so dass ein 20%-iger Überschuss an
Arbeitslösung hergestellt werden kann.)

	µl/Test
Borat/KCN-Puffer	1 000
Dithiothreitol-Lösung	20

Wichtig: Die benötigte Arbeitslösung ist
täglich frisch herzustellen. Nicht benötigte
Arbeitslösung ist bei 2–8°C höchstens für
24 Stunden stabil.

Probenvorbehandlung

1. Probenvorbehandlung
200 µl der Kalibratoren, Kontrollen
und Serum- bzw. Plasmaproben in
verschließbare 12 x 75 mm
Polypropylenröhrchen pipettieren.

Proben mit zu erwartenden Werten
außerhalb des Messbereichs sollten
zusätzlich mit Vitamin B12-
Probenverdünnungsreagenz manuell
verdünnt werden.
2. Jeweils **1 000 µl** der frisch
hergestellten Arbeitslösung zu allen
Röhrchen pipettieren und gut
mischen.
3. Alle Röhrchen mit lose sitzenden
Stopfen verschließen und **15 – 20
Minuten** bei 100°C im kochenden
Wasserbad erhitzen.
4. Die Röhrchen **5 Minuten** in einem
zweiten, unbeheizten Wasserbad auf
Raumtemperatur abkühlen.
5. Mindestens **350 µl** der so
vorbehandelten Proben in die
jeweiligen IMMULITE/IMMULITE
1000-Proberöhrchen pipettieren.

Die vorbehandelten Proben (Serum oder
Plasma) sind nur eine Stunde bei
Raumtemperatur (15–28°C) oder im
Kühlschrank (2–8°C) haltbar. Bitte
beachten Sie, dass kommerziell
erhältliche Kontrollen nach der
Vorbehandlung unterschiedliche
Stabilitäten zeigen können.

Testdurchführung

Für eine optimale Funktion des Gerätes ist
unbedingt zu beachten, dass die
Wartungen, wie im IMMULITE oder
IMMULITE 1000-Handbuch beschrieben,
regelmäßig durchgeführt werden.

Das Handbuch für das IMMULITE oder
IMMULITE 1000 enthält die Anweisungen
für: Vorbereitung, Geräteeinstellungen,

Kalibrierung, Testdurchführung und Qualitätskontrollen.

Überprüfen Sie jede Testeinheit auf das Vorhandensein der Polystyrol-Kugel vor dem Einsetzen in das Gerät.

Beachten Sie, dass zur Durchführung dieses Tests beide Reagenzbehälter (A und B) auf das Karussell geladen werden müssen.

Hinter jedem Probenträger können bis zu 4 Testeinheiten nachfolgen.

Empfohlenes Kalibrationsintervall:
2 Wochen.

Proben zur Qualitätskontrolle:
Kontrollen oder Poolseren mit Vitamin B12 in mindestens zwei Konzentrationen (niedrig und hoch) verwenden.

Referenzwerte

In einer Studie des Herstellers mit 245 Probanden, ohne Hinweis auf eine Erkrankung und keiner Blutspende innerhalb der letzten 12 Monate, sowie in einer Studie mit 147 gesunden Probanden wurden folgende Werte mittels des IMMULITE Vitamin B12 Assays ermittelt:

174 – 878 pg/ml (128 – 648 pmol/l)

Diese Grenzwerte sind lediglich als *Richtlinien* aufzufassen. Jedes Labor sollte seine eigenen Referenzbereiche etablieren.

Grenzen der Methode

Die Verwendung von EDTA-Plasma ist nicht empfehlenswert.

Heterophile Antikörper in Humansenen können mit Immunglobulinen aus den Assaykomponenten reagieren und Interferenzerscheinungen innerhalb des in vitro Immunoassays verursachen. (Clin. Chem. 1998;34:27-33) Proben von Patienten, die häufig mit Tier- bzw. Tierserumprodukten zu tun haben, können die erwähnten Interferenzen verursachen und zu anomalen Resultaten führen. Die verwendeten Reagenzien sind so konzipiert, dass das Risiko einer Interferenz mit den zu messenden Proben minimiert ist. Dennoch können potentiell Interaktionen zwischen seltenen Seren und den Testkomponenten auftreten. Zu diagnostischen Zwecken sollten die mit dem Assay erhaltenen Ergebnisse immer in Kombination mit der klinischen

Untersuchung, der Patientenanamnese und anderen Befunden gesehen werden.

Leistungsdaten

Siehe Tabellen und Grafiken mit *repräsentativen* Daten für den Assay. Die Ergebnisse sind als pg/ml ausgedrückt. (Alle Daten wurden – sofern nicht anders angegeben – aus Serumproben in Röhrchen ohne Gelbarrieren oder gerinnungsfördernden Zusätze gewonnen.)

Umrechnungsfaktor:
 $\text{pg/ml} \times 0,7378 \rightarrow \text{pmol/l}$

Messbereich: 150 – 1 200 pg/ml
(111 – 885 pmol/l).

Analytische Sensitivität: 125 pg/ml
(92 pmol/l).

Präzision im einzelnen Testansatz (*intraassay*): Statistik aus einem einzelnen Testansatz mit 15 Einzelmessungen (siehe Tabelle „Intraassay Precision“).

Präzision zwischen Testansätzen (*interassay*): Statistik aus 10 verschiedenen Testansätzen (siehe Tabelle „Interassay Precision“).

Linearität: Proben wurden in verschiedenen Verdünnungen getestet. (Repräsentative Daten entnehmen Sie bitte der Tabelle „Linearity“.)

Wiederfindung: Die getesteten Proben waren mit vier Vitamin B12-Lösungen (2 160, 3 640, 5 460 und 7 640 pg/ml) 1:19 versetzt. (Repräsentative Daten entnehmen Sie bitte der Tabelle „Recovery“.)

Spezifität: Durch Verwendung des hochgereinigten Binders (Intrinsic Faktor) ist der IMMULITE-Vitamin B12 hochspezifisch für Vitamin B12. Für Cobinamid (ein Vitamin B12-Analog) konnte keine Kreuzreaktivität bei Konzentrationen von 1 800 000 pg/ml und 50 000 000 pg/ml nachgewiesen werden.

Bilirubin: Bilirubin hat in Konzentrationen bis zu 200 mg/l keinen Einfluss auf die Ergebnisse, der größer als die Impräzision des Assays selbst ist.

Hämolyse: Hämoglobin hat in Konzentrationen bis zu 381 mg/dl keinen Einfluss auf die Ergebnisse, der größer als die Impräzision des Assays selbst ist.

Lipämie: Triglyceride hat in Konzentrationen bis zu 3 000 mg/dl keinen Einfluss auf die Ergebnisse, der größer als die Impräzision des Assays selbst ist.

Alternativer Probentyp: Die Proben ($n=22$) wurden in unbehandelte und heparinisierte Vacutainer-Röhrchen gefüllt.

(Heparin) = 0,95 (Serum) + 8,5 pg/ml
 $r = 0,987$

Mittelwerte:
474 pg/ml (Serum)
460 pg/ml (Heparin)

Da EDTA die Ergebnisse beeinflussen würde, sollte es nicht als Antikoagulanzen verwendet werden.

Proteineffekt: Unterschiedliche Mengen an humanem Serumalbumin (HSA) und normalem humanen IgG wurden zwei Patientenseren hinzugefügt und diese dann bestimmt. (Ergebnisse entnehmen Sie bitte der Tabelle „Protein Effect“.)

Methodenvergleich 1: Der Assay wurde anhand von 83 Patientenproben (Konzentrationsbereich

155 – 1 143 pg/ml) mit dem Dualcount® Solid Phase No Boil (SPNB) Assay von DPC verglichen (siehe „Method Comparison 1“). Durch lineare Regression:

(IML) = 1,00 (SPNB) + 13,6 pg/ml
 $r = 0,979$

Mittelwerte:
426 pg/ml (IMMULITE)
414 pg/ml (SPNB)

Methodenvergleich 2: Der IMMULITE Vitamin B12 Assay wurde weiterhin anhand von 97 Patientenproben (Konzentrationsbereich 153 – 1 218 pg/ml) mit einem kommerziell erhältlichen Radioimmunoassay (Kit A) verglichen (siehe „Method Comparison 2“). Durch lineare Regression:

(IML) = 0,91 (Kit A) + 18,6 pg/ml
 $r = 0,963$

Mittelwerte:
406 pg/ml (IMMULITE)
424 pg/ml (Kit A)

Anwendungsberatung

Bei Rückfragen wenden Sie sich bitte an Ihre DPC Niederlassung.

Das Qualitätssystem der Diagnostic Products Corporation ist nach ISO 13485:2003 registriert.

Español

IMMULITE Vitamina B12

Utilidad del análisis: Para su uso en el diagnóstico *in vitro* con los analizadores IMMULITE e IMMULITE 1000 — para la medición cuantitativa de la vitamina B12 en suero y plasma heparinizado, como ayuda en el diagnóstico clínico y tratamiento de la anemia.

Referencia: **LKVB1** (100 tests),
LKVB5 (500 tests)

Código del Test: **VB**
Código de Color: **Violeta**

Resumen y Explicación del Test

La vitamina B12 (cobalamina) y el folato son nutrientes esenciales para la hematopoyesis.⁶ La anemia megaloblástica casi siempre es consecuencia de la deficiencia de una de estas vitaminas.⁶ La deficiencia de vitamina B12 también puede dar lugar a daños neurológicos severos.^{1,2,7}

Los niveles circulantes de vitamina B12 son buenos indicadores de las reservas tisulares. Los niveles de vitamina B12 en suero o plasma determinados por un ensayo eficiente son normalmente bajos en situaciones de deficiencia de vitamina B12.¹ Excepciones a esta regla pueden ocurrir en algunas situaciones poco comunes donde los niveles de proteínas transportadoras de vitamina B12 son anormales.² Así, pueden darse niveles bajos de vitamina B12 circulante sin deficiencia de vitamina B12, cuando los niveles de transcobalamina I (un transportador de proteínas fisiológicamente inactivo) son bajos.⁸

Por el contrario, la deficiencia de vitamina B12 puede ocurrir en presencia de niveles normales o incluso elevados de vitamina B12 en plasma, cuando los niveles de transcobalamina II son bajos o en casos donde los niveles de proteínas transportadoras inactivas de vitamina B12 son altos, como en la leucemia mieloide crónica.^{5,8,11} (Los niveles de folato son

usualmente normales o elevados en situaciones de deficiencia de vitamina B12, pero los niveles de folato de los eritrocitos son normalmente bajos en esta enfermedad.¹⁰⁾

La deficiencia de vitamina B12 raramente ocurre sólo como consecuencia de una dieta deficiente en esta vitamina.^{3,6} Normalmente, se produce como resultado de un defecto en la absorción, a raíz de una gastrectomía total o parcial, o una anemia perniciosa, a consecuencia de ausencia o deficiencia de factor intrínseco.⁶ Dado que aproximadamente dos tercios de todos los pacientes con anemia perniciosa poseen anticuerpos bloqueantes del factor intrínseco (IFbAb), y que dichos anticuerpos raramente son encontrados en otras situaciones, las determinaciones de IFbAb son un test de utilidad para el diagnóstico diferencial de las deficiencias de vitamina B12.^{4,8,10} (Los anticuerpos frente al actor intrínseco circulante están presentes en más de la mitad de todos los pacientes con anemia perniciosa. Niveles elevados de proteínas transportadoras pueden ocurrir, por ejemplo, en leucemia mieloide crónica.)

Las causas más comunes de niveles altos de vitamina B12 incluyen enfermedades hepáticas, enfermedades mieloproliferativas (leucemia mieloide crónica) y el uso de suplementos multivitamínicos.

Principio del análisis

El IMMULITE/IMMULITE 1000 Vitamina B12 es un inmunoensayo enzimático quimioluminiscente competitivo en fase sólida.

IMMULITE/IMMULITE 1000 Vitamina B12 incluye un paso previo de desnaturalización por calor. La Vitamina B12 en la muestra del paciente se libera de las proteínas transportadoras por incubación a 100°C en presencia de ditiotritol y cianuro potásico para inactivar las proteínas transportadoras de Vitamina B12, incluso a niveles extremos, así como anticuerpos frente al factor intrínseco.

Después del paso de desnaturalización, la muestra tratada del paciente y el factor intrínseco purificado porcino, se introducen simultáneamente en la Unidad de Reacción que contiene una bola de poliestireno recubierta con un análogo de

la Vitamina B12 y se incuban durante aproximadamente 30 minutos a 37°C con agitación intermitente. Durante la incubación, la Vitamina B12 presente en la muestra compete con el análogo de la fase sólida por una serie de puntos de unión de la vitamina B12 en el factor intrínseco purificado. (Los análogos endógenos de la vitamina B12 no interfieren, porque el ligante está libre de proteína R). Se introduce anti factor intrínseco porcino marcado con fosfatasa alcalina y la Unidad de Reacción se incuba durante otro ciclo de 30 minutos. El conjugado no ligado se elimina por un lavado con centrifugación, después del cual se añade el sustrato y la Unidad de Reacción se incuba durante 10 minutos más.

Ciclos de incubación: 2 x 30 minutos.

Recogida de la muestra

Nota: Si la muestra va a analizarse para vitamina B12 y ácido fólico, ambos incluidos, el paciente debe estar en ayunas.¹⁸

Aunque ni la bilirrubina ni la hemólisis tienen efectos clínicamente significativos en los resultados de vitamina B12, la presencia de hemoglobina en la muestra puede aumentar los valores de ácido fólico. Además, la hemólisis puede indicar un tratamiento indebido de la muestra antes de su recepción en el laboratorio, por lo que los resultados deben interpretarse con cuidado.

Debido a que el EDTA tiene un efecto significativo en los resultados, no debería usarse como anticoagulante.

Se recomienda el uso de ultracentrífuga para aclarar las muestras lipémicas.

La centrifugación de las muestras de suero antes de que se forme el coágulo puede ocasionar la presencia de fibrina. Para evitar resultados erróneos debidos a la presencia de fibrina, asegurarse que se ha formado el coágulo completamente antes de centrifugar las muestras. Algunas muestras, particularmente aquellas de pacientes sometidos a terapia anticoagulante, pueden requerir mayor tiempo de coagulación.

Los tubos para recoger sangre de distintos fabricantes pueden producir

valores diferentes, dependiendo del material del tubo y de los aditivos, incluyendo barreras de gel o barreras físicas, activadores de la coagulación y/o anticoagulantes. El Vitamina B12 IMMULITE/IMMULITE 1000 no ha sido analizado con todos los distintos tipos de tubos. Para obtener detalles sobre los tipos tubos que se han analizado, consulte la sección de Tipos de Muestras Alternativos.

Volumen de Muestra: 200 µl de la muestra — suero o plasma — se requieren para el pretratamiento. Una única determinación requiere 100 µl de la muestra tratada: La copa de muestra debería contener al menos 250 µl más que el volumen total de muestra requerido para todas las determinaciones de vitamina B12 a ser realizados sobre la muestra.

Conservación: Si la muestra no se analiza en el plazo de 8 horas, debe conservarse a -20°C: estable durante 6–8 semanas.¹⁴ Evitar la exposición excesiva a la luz directa.

Dilución de muestras: El ensayo IMMULITE Vitamina B12 tiene un rango de calibración de 150 a 1 200 pg/ml (de 111 a 885 pmol/l). Todas las muestras de las que se esperen niveles mayores de vitamina B12 deben ser diluidas con el Diluyente de muestras de Vitamina B12 antes del ensayo.

Advertencias y precauciones

Para uso diagnóstico *in vitro*.

Reactivos: Mantener a 2–8°C. Desechar de acuerdo con las normas aplicables.

La solución tamponada de borato-KCN contiene cianuro. Sea extremadamente cuidadoso para evitar todo contacto corporal con este reactivo.

Siga las precauciones universales y manipule todos los componentes como si fueran capaces de transmitir agentes infecciosos. Los materiales derivados de sangre humana han sido analizados y son negativos para sífilis; para anticuerpos frente al HIV 1 y 2; para el antígeno de superficie de hepatitis B y para los anticuerpos de hepatitis C.

Se ha usado Azida sodica, en concentraciones menores de 0,1 g/dl, como conservante. Para su eliminación,

lavar con grandes cantidades de agua para evitar la constitución de residuos de azidas metálicas, potencialmente explosivos, en las canerías de cobre y plomo.

Se ha añadido cloranfenicol, a concentraciones menores de 0,1 g/dl, como conservante. Se sabe que el cloranfenicol produce cáncer (esta información es necesaria comunicarla al estado de California).

Sustrato quimioluminiscente: evite la contaminación y exposición a la luz directa del sol. (Ver el prospecto.)

Agua: Use agua destilada o desionizada.

Materiales Suministrados

Los componentes representan un juego completo. Las etiquetas de código de barras son necesarias para el ensayo.

Unidades de análisis de Vitamina B12 (LVB1)

Cada unidad etiquetada con código de barras contiene una bola recubierta con un análogo de la vitamina B12. Estable a 2–8°C hasta la fecha de caducidad.

LKVB1: 100 unidades.

LKVB5: 500 unidades.

Espere a que las bolsas de las unidades de análisis alcancen la temperatura ambiente antes de abrirlas. Ábralas cortando por el extremo superior, dejando el borde del cierre de cremallera intacto. Vuelva a cerrar las bolsas herméticamente para protegerlas de la humedad.

Viales de reactivos de Vitamina B12 (LVBA, LVBB)

Con código de barras. **LVBA:** una cuña (7,5 ml) que contiene la proteína de unión a la vitamina B12 (factor intrínseco purificado del cerdo), con conservante.

LVBB: una cuña (7,5 ml) que contiene fosfatasa alcalina (de intestino de ternera) conjugada a un anticuerpo monoclonal murino anti-factor intrínseco de cerdo en solución tampón, con conservante.

Guardar tapado y refrigerado: estable a 2–8°C hasta la fecha de caducidad. Se recomienda utilizarlo antes de que pasen 30 días después de su apertura, cuando se guarda según lo indicado.

LKVB1: 1 juego. **LKVB5:** 5 juegos.

Ajustadores de Vitamina B12 (LVBL, LVBH)

Dos viales (bajo y alto), de Vitamina B12 liofilizada en una matriz de proteína humana, con conservante. Reconstituir cada vial con **4,0 ml** de agua destilada o desionizada. Mezclar por agitación o inversión suave hasta que se haya disuelto completamente el material liofilizado. Estable a 2–8°C durante 30 días después de la reconstitución o hasta 6 meses (aliquotados) a –20°C.
LKVB1: 1 juego. **LKVB5:** 2 juegos.

Nota: Los Ajustadores deben someterse al mismo paso de desnaturalización por calor que las muestras de los pacientes.

Solución Tampón Borato-KCN (LBCN)

125 ml Solución Tampón Borato-KCN con conservante. Estable a 2–8°C durante 30 días después de abrirse.
LKVB1: 1 vial. **LKVB5:** 5 viales.

Precaución ! Contiene cianuro. Debe tenerse extremo cuidado para evitar cualquier contacto corporal con este reactivo.

Solución de Ditiotreitól (LDTT)

3 ml Solución de Ditiotreitól. Estable a 2–8°C durante 30 días después de abrirse.
LKVB1: 1 vial. **LKVB5:** 5 viales.

Componentes del kit que se suministran por separado

Diluyente de muestra de Vitamina B12 (LVBZ)

Para la dilución manual de las muestras de los pacientes. Un vial que contiene 25 ml de un diluyente de proteína sérica humana, con conservante. Estable a 2–8°C durante 30 días después de abrirse, o hasta 6 meses (aliquotados) a –20°C.

LSUBX: Sustrato quimioluminiscente

LPWS2: Lavado de sonda

LKPM: Kit de limpieza de sonda

LCHx-y: Soportes de recipientes de muestras (con códigos de barras)

LSCP: Recipientes de muestras (desechables)

LSCC: Tapas para los recipientes de muestras (opcionales)

CON6: control multiconstituyente de tres niveles.

También necesarios

Pipetas de transferencia de muestras; agua destilada o desionizada; controles.

Tubos de polipropileno de 12x75 mm sin anticoagulante, con tapones no ajustables— ofrecidos por DPC.

Micropipetas: 20, 200 y 1 000 µl. Para la adición de 1,0 ml de reactivo, se puede utilizar un distribuidor.

Un contenedor de plástico con tapa (para preparar la solución de trabajo).

Papel aluminio — u otro material para proteger los hemolisados de la luz.

Baño María con tapa (100°C). No usar en un horno ni en un bloque.

Baño María a temperatura ambiente — para enfriar los tubos después de hervirlos.

Pipeta volumétrica de 4,0 ml (± 0,02 ml) para la reconstitución de ajustadores.

Preparación de la Solución de Trabajo

Nota: Las muestras a ser probadas para Vitamina B12 y ácido fólico deben ser tratadas con la Solución de Trabajo descrita en el prospecto de IMMULITE Acido Fólico, código LKFO.

La cantidad de cada componente depende del número de test que se vayan a realizar. El volumen requerido, en microlitros por test, están tabulados a continuación. Asegurarse de multiplicar estos volúmenes por un número ligeramente superior al número de test que van a realizarse (Estos componentes son suministrados en volumen suficiente para preparar Solución de Trabajo un 20%.en exceso).

	µl/test
Solución Tampón Borato-KCN	1 000
Solución de Ditiotreitól	20

Importante: Debe prepararse diariamente. De no usarse de inmediato refrigerar a 2–8°C durante no más de 24 horas.

Pretratamiento de la Muestra

1. Pipetear **200 µl** de cada ajustador, control o muestra de paciente, en los tubos preparados

(Diluir previamente con Diluyente de Muestras de Vitamina B12, las muestras de las que se esperen altas concentraciones.)

2. Añadir **1 000 µl** de Solución de Trabajo a todos los tubos. Vortex.
3. Tapar los tubos y colocarlos en un baño de agua hirviendo (100°C) durante **15–20 minutos**.
4. Retirar del baño y enfriar en un baño de agua a temperatura ambiente durante **5 minutos**.
5. Pipetear al menos **350 µl** de la muestra en una Copa de Muestra IMMULITE/IMMULITE 1000.

Las muestras tratadas, ya sean suero o plasma, son estables a temperatura ambiente (15–28°C) o refrigeradas a 2–8°C durante una hora antes de su análisis. Nótese que los controles comerciales puede presentar una estabilidad variable después del tratamiento.

Ensayo

Aviso: para obtener el funcionamiento óptimo, es importante realizar todos los procedimientos del mantenimiento general según lo definido en el manual del operador de IMMULITE o IMMULITE 1000.

Ver el Manual del Operador del IMMULITE o IMMULITE 1000 para: preparación, procesamiento, ajuste, procedimientos de ensayo y control de calidad.

Inspeccionar visulamente cada unidad de rección para asegurarse de que hay una bola antes de introducirla en el Sistema.

Tener en cuenta que hay que colocar los viales de reactivos A y B en el carrusel para ejecutar este ensayo.

Cada soporte de recipientes de muestras puede acompañarse de cuatro unidades de reaccion como maximo.

Intervalo de ajuste recomendado:
2 semanas.

Muestras de Control de calidad: Use controles o pools de muestrasro con dos niveles diferentes, como mínimo, de vitamina B12 (bajo y alto).

Valores esperados

Se procesaron muestras de suero de 245 donantes de sangre, de ambos sexos, aparentemente sanos, que no habian donado sangre en los ultimos 12 meses, y 147 muestras de suero de voluntarios aparentemente en buen estado de salud, con el ensayo IMMULITE Vitamina B12, estableciendose un rango de normalidad de:

174 a 878 pg/ml (128 a 648 pmol/l)

Estos límites han de considerarse sólo como una guía. Cada laboratorio deberá establecer sus propios intervalos de referencia.

Limitación

El plasma EDTA no está recomendado para su uso.

Los anticuerpos heterofílicos en el suero humano pueden reaccionar con las inmunoglobulinas de los componentes del ensayo provocando interferencias con los inmunoanálisis in vitro. [Ver Boscato LM, Stuart MC. Heterophilic antibodies: a problem for all immunoassays. Clin Chem 1998;34:27-33.] Las muestras de los pacientes que frecuentemente están expuestos a animales o a productos séricos animales pueden presentar este tipo de interferencia que potencialmente ocasione un resultado anómalo. Estos reactivos han sido formulados para minimizar el riesgo de interferencia, no obstante, pueden darse interacciones anómalas entre sueros conflictivos y los componentes del ensayo. Con fines de diagnóstico, los resultados obtenidos con este ensayo siempre deben ser usados en combinación con el examen clínico, la historia médica del paciente y cualquier otro dato clínico relevante.

Características analíticas

Para ver resultados *representativos* de las cualidades del ensayo, consulte las tablas y los gráficos. Los resultados se expresan en pg/ml. (A no ser que se indique lo contrario, todos los resultados fueron generados en muestras de suero)

recogidas en tubos sin geles o activadores de la coagulación).

Factor de Conversión:

pg/ml \times 0,7378 \rightarrow pmol/l

Intervalo de calibración:

150 – 1 200 pg/ml (111 – 885 pmol/l).

Sensibilidad: 125 pg/ml (92 pmol/l).

Precisión intraensayo (dentro de una tanda):

Se han calculado datos estadísticos para las muestras a partir de los resultados de 15 replicados en una sola tanda. (Véase la tabla "Intraassay Precision").

Precisión entre ensayos (de una tanda a otra):

Se han calculado datos estadísticos para las muestras analizadas en 10 tomas distintas. (Véase la tabla de "Interassay Precision").

Linealidad: las muestras fueron analizadas con varias diluciones. (Véase la tabla "Linearity" para resultados representativos).

Recuperación: Se han analizado las muestras cargadas 1 a 19 con cuatro soluciones (2 160, 3 640, 5 460 y 7 640 pg/ml) de vitamina B12. (Ver la tabla "Recovery" para resultados representativos).

Especificidad: En un análisis de mezclas de análogos de Vitamina B12 (conteniendo principalmente cobinamida) se demostró que no exhibe reactividad cruzada con cobinamida, incluso a concentraciones tan altas como 1 800 000 pg/ml y 50 000 000 pg/ml.

Bilirrubina: La presencia de bilirrubina en concentraciones hasta 200 mg/l, no tienen ningún efecto sobre los resultados en términos de precisión.

Hemolisis: La presencia de hemoglobina, en concentraciones hasta 381 mg/dl, no tienen ningún efecto sobre los resultados en términos de precisión.

Lipemia: La presencia de triglicéridos en concentraciones hasta 3 000 mg/dl no tiene efecto alguno en los resultados, en lo correspondiente a la precisión del ensayo.

Tipo de Muestra Alternativa: Se han recogido muestras ($n=22$) en tubos Vacutainers sin anticoagulante y heparinizados.

(Heparina) = 0,95 (Suero) + 8,5 pg/ml
 $r = 0,987$

Medias:

474 pg/ml (Suero)

460 pg/ml (Heparina)

Como EDTA tendría un efecto significativo en los resultados, no debe usarse como anticoagulante.

Efecto de proteínas: se analizaron dos muestras de suero de pacientes sobrecargadas con distintas cantidades de albúmina sérica humana (HSA) y de IgG humana normal. (Ver los resultados en la tabla "Protein Effect").

Comparación con otros métodos 1:

El procedimiento se comparó con Dualcount Solid Phase No Boil (SPNB) de DPC sobre 83 muestras de pacientes, con concentraciones de Vitamina B12 que variaban desde aproximadamente 155 a 1 143 pg/ml. Véase el "Method Comparison 1" gráfico. Por regresión lineal:

(IMMULITE) = 1,00 (SPNB) + 13,6 pg/ml
 $r = 0,979$

Medias:

426 pg/ml (IMMULITE)

414 pg/ml (SPNB)

Comparación de los métodos 2:

El ensayo fue comparado con un ensayo inmunoradiométrico disponible comercialmente (Kit A) con 97 muestras. (Rango de concentraciones: aproximadamente 153 – 1 218 pg/ml. Véase el "Method Comparison 2" gráfico). Por regresión lineal:

(IML) = 0,91 (Kit A) + 18,6 pg/ml
 $r = 0,963$

Medias:

406 pg/ml (IMMULITE)

424 pg/ml (Kit A)

Asistencia técnica

Contáctese con su Distribuidor Nacional.

El Sistema de Calidad de Diagnostic Products Corporation está registrado para la ISO 13485:2003.

Français

IMMULITE Vitamine B12

Domaine d'utilisation : dosage quantitatif de la Vitamine B12 dans le sérum ou le plasma hépariné. Ce test est réservé à un usage diagnostique *in vitro* avec l'Analyseur IMMULITE et de IMMULITE 1000 et constitue une aide au diagnostic clinique et au traitement de l'anémie.

Référence catalogue : **LKVB1** (100 tests), **LKVB5** (500 tests)

Code produit : **VB**

Code couleur : **Violeta**

Introduction

La vitamine B12 (Cobalamine) et l'acide folique sont essentiels à l'hématopoïèse.⁶ L'anémie mégaloblastique est presque toujours due à une carence en l'une de ces vitamines.⁶ Le déficit en vitamine B12 peut aussi provoquer une altération neurologique sévère.^{1,2,7}

Les taux circulants de vitamine B12 sont habituellement un bon index des réserves tissulaires. C'est pourquoi, les taux plasmatiques ou sériques de vitamine B12, s'ils sont mesurés par un bon système sont typiquement bas en cas de carence en vitamine B12, et normaux ou élevés dans les autres cas.¹ Une exception à cette règle peut se produire dans la situation relativement rare où le taux de protéine de transport de la vitamine B12 est anormal.² Des taux circulants abaissés de vitamine B12 sont observés en l'absence de carence en vitamine B12 quand le taux de transcobalamine I (protéine de transport physiologiquement inactive) est bas.⁸

A l'inverse, une carence en vitamine B12 est possible même si les taux plasmatiques de vitamine B12 sont normaux ou même élevés, et les taux de transcobalamine II sont bas ou les taux de protéines de transport de la vitamine B12 sont élevés, comme dans la leucémie myéloïde chronique.^{5,8,11} (Les taux circulants d'acide folique sont habituellement normaux ou élevés dans les carences en vitamine B12, mais les folates érythrocytaires sont fréquemment bas dans cette situation).¹⁰

La carence en vitamine B12 apparaît rarement comme le résultat d'un défaut d'apport alimentaire de cette vitamine.^{3,6} Plus souvent, elle est due à une mauvaise absorption, comme dans la gastrectomie partielle ou totale, ou l'anémie de Biermer, caractérisée par l'absence, totale ou presque, de facteur intrinsèque.⁶ Comme, pratiquement 2/3 des patients ayant une anémie de Biermer ont des anticorps bloquants anti-Facteur Intrinsèque (IFbAb), et que ces anticorps sont très rarement rencontrés dans d'autres situations, leur recherche est un test utile de suivi pour le diagnostic étiologique des carences en vitamine B12.^{4,8,10} (Les anticorps anti-Facteur Intrinsèque circulants sont présents dans plus de la moitié des patients ayant une anémie pernicieuse. Les taux augmentés de protéine de transport sont retrouvés, par exemple, dans les leucémies myéloïdes chroniques).

Les causes habituelles d'augmentation des taux de vitamine B12 sont les maladies hépatiques, les maladies myéloprolifératives (dont la leucémie myéloïde chronique) et l'utilisation de suppléments multivitaminés.

Principe du test

IMMULITE/IMMULITE 1000 Vitamine B12 est une immunoenzymologie chimioluminescente compétitive à phase solide.

La trousse IMMULITE/IMMULITE 1000 Vitamine B12 inclue une étape préliminaire de dénaturation par chauffage. La vitamine B12 de l'échantillon du patient est séparée des protéines porteuses par une incubation à 100°C en présence de dithiothreitol et de cyanure de potassium, pour inactiver les protéines liant la vitamine B12, même à des taux très élevés ainsi que les anticorps anti-Facteur Intrinsèque.

Après l'étape de dénaturation par chauffage, les échantillons de patient prétraités et du facteur intrinsèque de porc purifié sont introduits simultanément et incubés dans l'Unité-test contenant une bille de polystyrène revêtue par un analogue de la vitamine B12 durant 30 minutes à + 37°C sous agitation. Pendant cette incubation, la vitamine B12 de l'échantillon prétraité entre en compétition

avec l'analogue de la B12 sur la phase solide pour la fixation sur un nombre limité de sites de liaison pour la vitamine B12 sur le facteur intrinsèque de porc purifié. (Les analogues endogènes de la vitamine B12 n'interfèrent pas car la liaison ne fait pas intervenir de protéine R). Un anti Facteur Intrinsèque marqué à la phosphatase alcaline est ajouté et l'Unité-Test est incubé pendant 30 minutes supplémentaires. L'anticorps marqué en excès est éliminé par un lavage utilisant le principe de la centrifugation axiale.

Cycles d'incubation : 2 x 30 minutes.

Recueil des échantillons

N.B. : si l'échantillon doit être analysé à la fois pour la vitamine B12 et l'acide folique, le patient doit être à jeun.¹⁸

Bien que ni la bilirubine ni l'hémolyse n'aient d'effet cliniquement significatif sur les résultats de Vitamine B12, la présence d'hémoglobine dans l'échantillon augmente la valeur d'acide folique. De plus, des échantillons hémolysés peuvent être signe d'une souffrance du prélèvement avant son arrivée au laboratoire ; il faudra donc interpréter les résultats avec prudence.

L'EDTA ayant un effet significatif sur les résultats, il ne doit pas être utilisé comme anticoagulant.

Il est recommandé de clarifier les échantillons lipémiques par ultracentrifugation.

La centrifugation des échantillons sériques avant la formation complète du caillot peut entraîner la présence de fibrine. Pour éviter les résultats erronés dus à la présence de fibrine, s'assurer de la formation complète du caillot avant de centrifuger les échantillons. Certains échantillons, en particulier ceux provenant de patients sous anti-coagulants, peuvent nécessiter un temps plus long pour la formation du caillot.

Des tubes pour prélèvements sanguins provenant de fabricants différents peuvent donner des résultats différents, selon les matériaux et additifs utilisés, y compris gels ou barrières physiques, activateurs de la coagulation et/ou anticoagulants. Le coffret Vitamine B12 IMMULITE/ IMMULITE 1000 n'a pas été testé sur tous les types de tubes possibles. Veuillez

consulter le chapitre intitulé Autres Types d'Échantillons pour plus de renseignements sur les tubes qui ont été évalués.

Volume nécessaire : 200 µl d'échantillon, sérum ou plasma, pour l'étape de prétraitement des échantillons. Un dosage en simple nécessite 100 µl d'échantillon prétraité. L'unité-échantillon doit contenir au moins 250 µl d'échantillon traité de plus que le volume total nécessaire, pour le nombre de détermination de vitamine B12.

Conservation : Les échantillons non-dosés dans les 8 heures devront être conservés à -20°C : stable pendant 6 à 8 semaines.¹⁴ Éviter une exposition prolongée à la lumière vive.

Dilution des échantillons fortement concentrés : Le domaine de mesure du test IMMULITE Vitamine B12 va de 150 à 1 200 pg/ml (111 à 885 pmol/l). Tous les échantillons pour lesquels on s'attend à des valeurs situées au delà de l'intervalle de linéarité du dosage devront être dilués avec le diluant Vitamine B12 avant de procéder au dosage.

Précautions d'emploi

Réservé à un usage diagnostique *in vitro*.

Réactifs : conserver les réactifs à +2/+8°C. Éliminer les déchets conformément à la réglementation en vigueur.

Le tampon borate-KCN contient des cyanides. Il faut impérativement éviter tout contact entre les parties exposées du corps et ce réactif.

Respecter les précautions d'emploi et manipuler tous les composants du coffret comme des produits potentiellement infectieux. Les réactifs dérivés de produits humains et utilisés dans ce coffret ont subi un test sérologique pour la Syphilis et des tests de dépistage pour les anticorps anti-VIH1 et 2, anti-VHC et pour l'antigène de surface de l'hépatite B, qui se sont tous avérés négatifs.

De l'azide de sodium à des concentrations inférieures à 0,1 g/dl a été ajouté comme conservateur ; lors de l'élimination, l'évacuer avec de grandes quantités d'eau pour éviter une accumulation d'azides métalliques explosifs dans les canalisations.

Du chloramphénicol, à des concentrations ne dépassant pas 0,1 g/dl, a été ajouté comme conservateur. Le chloramphénicol pouvant être cause de cancer, cette notification est demandée par l'Etat de Californie.

Substrat chimiluminescent : éviter toute contamination et l'exposition directe à la lumière solaire (voir la fiche technique).

Eau : utiliser uniquement de l'eau distillée ou désionisée.

Matériel fourni

Les composants de la trousse ne peuvent être utilisés que conjointement. Les étiquettes à l'intérieur du coffret sont nécessaires au dosage.

Tests unitaires Vitamine B12 (LVB1)

Unité à code-barre contient une bille revêtue d'un analogue de la Vitamine B12. Stables à +2°C/+8°C, jusqu'à la date de péremption.

LKVB1 : 100 unités.

LKVB5 : 500 unités.

Porter les sachets à température ambiante avant d'ouvrir. Ouvrir le sachet avec des ciseaux en préservant le dispositif de fermeture. Refermer les sachets pour les protéger de l'humidité.

Cartouches de réactif Vitamine B12 (LVBA, LVBB)

Avec code-barre. **LVBA** : un flacon (7,5 ml) contenant de la protéine de liaison de la vitamine B12 (facteur intrinsèque de porc purifié), avec un conservateur. **LVBB** : un flacon (7,5 ml) contenant un anticorps monoclonal murin anti-facteur intrinsèque de porc marqué à la phosphatase alcaline, dans un tampon avec un conservateur. Conserver bouchés et réfrigérés : stables à +2°C/+8°C jusqu'à la date de péremption. A utiliser de préférence dans les 30 jours qui suivent l'ouverture, si les recommandations de stockage sont respectées.

LKVB1 : 1 jeu. **LKVB5** : 5 jeux.

Ajusteurs Vitamine B12 (LVBL, LVBH)

2 flacons (« Bas » et « Haut ») de vitamine B12 lyophilisée dans une matrice protéique humaine, avec conservateur. Reconstituer chaque flacon avec **4,0 ml** d'eau distillée ou désionisée. Mélanger doucement jusqu'à complète dissolution

du produit lyophilisé. Stable à +2°C/+8°C pendant 30 jours après reconstitution ou 6 mois (aliquoté) à -20°C.

LKVB1 : 1 jeu. **LKVB5** : 2 jeux.

Note : Les ajusteurs sont soumis à la même étape de dénaturation par la chaleur que les échantillons (voir prétraitement des échantillons).

Solution tampon Borate-Cyanure de Potassium (LBCN)

125 ml de tampon Borate-Cyanure de Potassium avec conservateur. Stable à +2°C/+8°C pendant 30 jours après ouverture.

LKVB1 : 1 flacon. **LKVB5** : 5 flacons.

Attention ! Cette trousse contient du cyanure. Eviter tout contact avec la peau.

Solution de Dithiothreitol (LDTT)

3 ml d'une solution de dithiothreitol. Stable à +2°C/+8°C pendant 30 jours après ouverture.

LKVB1 : 1 flacon. **LKVB5** : 5 flacons.

Composants du coffret fournis séparément

Diluant Vitamine B12 (LVBZ) :

Pour la dilution manuelle des échantillons de patients. Un flacon contenant 25 ml de diluant de base protéique sérique humaine, avec conservateur. Stable à +2°C/+8°C pendant 30 jours après ouverture ou 6 mois (aliquoté) à -20°C.

LSUBX : Substrat chimiluminescent

LPWS2 : Solution de lavage

LKPM : Coffret de décontamination de l'aiguille de prélèvement

LCHx-y : Supports pour godets échantillons (avec code-barre)

LSCP : Godets échantillons (à usage unique)

LSCC : Bouchons pour godets échantillons (optionnel)

CON6 : contrôle multiparamétrique à trois niveaux de concentration.

Egalement requis

Pipettes pour le transfert des échantillons ; eau distillée ou désionisée ; contrôles.

Tubes de polypropylène secs 12 x 75 mm avec bouchon non-hermétique – disponibles chez DPC.

Micropipettes : 20, 200 et 1 000 µl. Pour l'addition de 1 ml de réactif, un distributeur fiable convient.

Boîte plastique avec couvercle (pour préparer la solution de travail).

Papier aluminium – ou autre – pour protéger les hémolysats de la lumière.

Bain-marie bouillant couvert (100°C). Ne pas utiliser de four ou de bloc chauffant.

Bain-marie à température ambiante – pour refroidir les échantillons après l'étape de chauffage.

Pipette volumétrique de 4,0 ml (± 0,02 ml) pour la reconstitution des ajusteurs.

Préparation de la solution de travail

Note : les échantillons qui vont être testés à la fois en Acide Folique et IMMULITE B12 doivent être prétraités avec la solution de travail décrite dans la fiche technique Acide Folique (référence LKFO).

La quantité de chacun des composants dépend du nombre de tests à réaliser. Les volumes nécessaires en microlitres par test, sont décrits ci-dessous. S'assurer de multiplier ces volumes par un facteur légèrement supérieur au nombre d'analyses à réaliser. (Les différents réactifs sont fournis avec un excès d'environ 20%).

	µl/test
Sol. borate/tampon KCN	1 000
Solution de dithiothreitol	20

Important : Cette solution doit être préparée quotidiennement. Si elle n'est pas utilisée immédiatement, elle doit être conservée à + 2°C/+8°C pendant 24 heures au maximum.

Préparation des échantillons

- 1 Pipetter **200 µl** de chaque ajusteur, contrôle ou échantillon de patient dans des tubes préalablement préparés.

Pour les échantillons où l'on suspecte une forte concentration en Vitamine B12, supérieure à la limite du domaine de mesure, diluer le sérum ou le plasma avec le diluant échantillon Vitamine B12.

- 2 Ajouter **1 000 µl** de solution de préparation dans tous les tubes. Mélanger.
- 3 Fermer non-hermétiquement tous les tubes et les placer dans un bain d'eau chaude à ébullition (100°C) pendant **15 à 20 minutes**.
- 4 Enlever les tubes et les refroidir dans un bain d'eau à température ambiante pendant **5 minutes**.
- 5 Pipeter au moins **350 µl** de l'échantillon ainsi préparé dans une Unité-Echantillon IMMULITE/IMMULITE 1000.

Les échantillons prétraités, sérum et plasma, restent stables à température ambiante (+15°C/+28°C) ou réfrigérés à +2°C/+8°C pendant 1 heure avant dosage. Noter que la stabilité des contrôles du commerce peut varier après traitement.

Protocole de dosage

Noter que pour des performances optimales, il est important de réaliser toutes les procédures de maintenance de routine selon les instructions du Manuel d'Utilisation de l'IMMULITE ou de l'IMMULITE 1000.

Voir le manuel d'utilisation de l'IMMULITE ou de l'IMMULITE 1000 pour la préparation, le démarrage du système, les ajustements, le dosage et les procédures de contrôle de qualité.

Vérifier visuellement que chaque Unité-Test contient bien une bille avant de la charger dans l'automate.

Noter que les deux flacons-réactifs A et B doivent être placés sur le carrousel pour réaliser ce dosage.

Chaque unité-échantillon peut être suivie par jusqu'à quatre unités-tests.

Intervalle d'ajustement recommandé : 2 semaines.

Echantillons pour le contrôle de qualité : Utiliser des contrôles ou des pools de sérums avec au moins deux niveaux de concentration (faible ou élevé) de Vitamine B12.

Valeurs attendues

Des échantillons sériques provenant de 245 donneurs de sang, hommes et

femmes n'ayant pas fait de don du sang depuis 12 mois, et 147 échantillons sériques provenant de volontaires apparemment en bonne santé, ont été dosés avec le test IMMULITE Vitamine B12. Les résultats ont donné un intervalle de référence de

174 à 878 pg/ml (128 à 648 pmol/l)

Utiliser ces valeurs à *titre indicatif* uniquement. Chaque laboratoire devra établir ses propres valeurs de référence.

Limites

Le plasma EDTA est déconseillé.

Les anticorps hétérophiles du sérum humain peuvent réagir avec les immunoglobulines faisant partie des composants du coffret et interférer avec les immunodosages in vitro. [Voir Boscato LM, Stuart MC. Heterophilic antibodies: a problem for all immunoassays. Clin Chem 1998;34:27-33.] Les échantillons provenant de patients fréquemment exposés aux animaux ou aux produits sériques d'origine animale peuvent présenter ce type d'interférence pouvant potentiellement donner un résultat anormal. Ces réactifs ont été mis au point afin de minimiser le risque d'interférence, cependant des interactions potentielles entre des sérums très exceptionnels et les composants du test peuvent se produire. Dans un but diagnostique, les résultats obtenus avec ce dosage doivent toujours être utilisés en association avec un examen clinique, l'histoire médicale du patient et d'autres résultats.

Performances du test

Consulter les tableaux et graphiques pour obtenir les données *représentatives* des performances du test. Les résultats sont donnés en pg/ml. (En l'absence d'indication contraire, les résultats ci-dessous ont été obtenus avec des échantillons sériques prélevés sur tube sans anticoagulants, ni gel, ni activateur de coagulation.)

Facteur de conversion :

pg/ml x 0,7378 → pmol/l

Domaine de mesure : 150 – 1 200 pg/ml (111 – 885 pmol/l).

Sensibilité analytique : 125 pg/ml (92 pmol/l).

Précision intra-essai : les valeurs ont été établies pour chacun des échantillons à partir de 15 doublets dosés au cours d'une même série. (Voir le tableau " Intraassay Precision ".)

Précision inter-essais : les valeurs ont été établies pour chacun des échantillons dosés dans 10 séries différentes. (Voir le tableau " Interassay Precision ".)

Linéarité : les échantillons ont été testés avec des taux de dilution variés. (Voir le tableau " Linearity " pour des données représentatives.)

Récupération : les échantillons testés ont été chargés dans un rapport de 1 à 19 avec quatre solutions de vitamine B12 (2 160, 3 640, 5 460 et 7 640 pg/ml). (Voir le tableau " Recovery " pour des données représentatives.)

Spécificité : Pour tester la spécificité de la liaison au facteur intrinsèque purifié, des mélanges d'analogues de vitamine B12 (contenant principalement de la cobinamide) ont été testés avec le dosage IMMULITE Vitamine B12. Il n'y a pas de réaction croisée avec la cobinamide, même à des concentrations très élevées de 1 800 000 pg/ml et de 50 000 000 pg/ml.

Bilirubine : La présence de bilirubine ne présente aucun effet sur les résultats ni sur la précision du dosage si la concentration ne dépasse pas 200 mg/l.

Hémolyse : La présence d'hémoglobine ne présente aucun effet sur les résultats ni sur la précision du dosage si la concentration ne dépasse pas 381 mg/dl.

Lipémie : La présence de triglycérides jusqu'à une concentration de 3 000 mg/dl n'interfère ni sur la précision du dosage, ni sur les résultats.

Autres types d'échantillons : des échantillons (n=22) prélevés sur tubes vacutainer secs et héparinés ont été testés.

(Héparine) = 0,95 (Sérum) + 8,5 pg/ml
r = 0,987

Moyennes :
474 pg/ml (Sérum)
460 pg/ml (Héparine)

Les prélèvements EDTA ne doivent pas être utilisés avec ce test, en raison d'une interférence possible de l'EDTA.

Action des protéines : 2 sérums de patient ont été chargés avec des concentrations variées de sérum albumine humaine (HSA) et d'IgG normales humaines ont été testés. (Voir le tableau " Protein Effect ".)

Comparaison de méthode 1 : Le test a été comparé au test Dualcount Solid Phase No Boil (SPNB) de DPC sur 83 sérums de patients (dont les concentrations allaient de 155 à 1 143 pg/ml. Voir le graphique " Method Comparison 1 ".) Par régression linéaire :

$$(IML) = 1,00 (SPNB) + 13,6 \text{ pg/ml}$$
$$r = 0,979$$

Moyennes :
426 pg/ml (IMMULITE)
414 pg/ml (SPNB)

Comparaison de méthode 2 : Le test IMMULITE Vitamine B12 a aussi été comparé à un test commercialisé de radio immunologie (Coffret A) sur 97 sérums de patients (dont les concentrations en vitamine B12 allaient de 153 à 1 218 pg/ml. Voir le graphique " Method Comparison 2 ".) Par régression linéaire :

$$(IML) = 0,91 (\text{Coffret A}) + 18,6 \text{ pg/ml}$$
$$r = 0,963$$

Moyennes :
406 pg/ml (IMMULITE)
412 pg/ml (Coffret A)

Assistance technique

En France distribué par DPC France 90
bd National 92257 La Garenne-Colombes.

Le système d'assurance qualité de DPC est
certifié ISO 13485 (2003).

Italiano

IMMULITE Vitamina B12

Uso: Ad uso diagnostico *in vitro* con gli Analizzatori IMMULITE ed IMMULITE 1000 — per la misurazione quantitativa della vitamina B12 nel siero o nel plasma eparinizzato, quale ausilio nella diagnosi clinica e nel trattamento dell'anemia.

Codice: **LKVB1** (100 test), **LKVB5** (500 test)

Codice del Test: **VB** Colore: **Violetto**

Riassunto e Spiegazione del Test

La vitamina B12 (cobalamina) ed il folato sono elementi nutrienti essenziali per l'ematopoiesi.⁶ L'anemia megaloblastica è quasi sempre dovuta alla mancanza di una di queste due vitamine.⁶ La carenza di vitamina B12 può anche causare gravi problemi neurologici.^{1,2,7}

I livelli in circolo di vitamina B12 rappresentano un buon indice di conservazione dei tessuti. I livelli di vitamina B12 misurati nel siero o nel plasma con un dosaggio ottimizzato sono tipicamente bassi nella carenza di vitamina B12, e normali o elevati negli altri casi.¹ Eccezioni a questa regola si rilevano in quelle situazioni poco frequenti in cui i livelli di proteine che contengono la vitamina B12 sono anomali.² Per questo motivo, livelli circolanti bassi di vitamina B12 possono presentarsi in assenza di carenza di vitamina B12 in cui il livello di trascobalamina I (una proteina fisiologicamente inattiva) è basso.⁸

In maniera opposta, la carenza di vitamina B12 può avvenire in presenza di livelli normali od anche elevati di vitamina B12 nel plasma, in cui i livelli di trascobalamina II sono bassi o in cui i livelli delle proteine inattive che contengono la vitamina B12 sono alti, come nel caso della leucemia mielogena cronica.^{5,8,11} (Di solito i livelli circolanti di folato sono normali o elevati nella carenza di vitamina B12, ma i livelli di folato nei globuli rossi sono tipicamente bassi in questa condizione.¹⁰)

La carenza di vitamina B12 si verifica raramente ed è dovuta alla mancanza di questa vitamina nella dieta.^{3,6} Più spesso, viene causata da un cattivo assorbimento come nel caso di gastrectomia parziale o totale, o nell'anemia perniziosa, una condizione caratterizzata dall'assenza o quasi assenza del fattore intrinseco.⁶ Siccome circa il due terzi di tutti i pazienti affetti da anemia perniziosa hanno anticorpi che bloccano il fattore intrinseco (IFbAb), mentre gli IFbAb sono riscontrati raramente in altre situazioni, le determinazioni degli IFbAb rappresentano un test utile per la diagnosi differenziale della carenza di vitamina B12.^{4,8,10} (Anticorpi circolanti anti fattore intrinseco sono presenti in più della metà di tutti i pazienti con anemia perniziosa. Livelli

elevati di proteine di trasporto possono riscontrarsi, per esempio, nella leucemia mielogena cronica.)

Le cause comuni di livelli elevati di vitamina B12 includono malattie epatiche, malattia mieloproliferativa (leucemia mielogena cronica come caso particolare) e l'uso di integratori multi-vitaminici.

Principio del Dosaggio

IMMULITE/IMMULITE 1000 Vitamina B12 è un enzima di fase solida, chimico luminescente, immuno-analisi.

Il kit IMMULITE/IMMULITE 1000 Vitamina B12 presuppone un passaggio preliminare con denaturazione attraverso il calore. La vitamina B12 nel campione è rilasciata dalle proteine carrier attraverso incubazione a 100°C in presenza di ditiotreitolo e cianuro di potassio per inattivare le proteine leganti la vitamina B12 anche a livelli estremi, cosiccome gli anticorpi anti fattore intrinseco.

Dopo denaturazione attraverso il calore, il campione trattato ed il fattore intrinseco di suino vengono introdotti simultaneamente nelle Test Unit IMMULITE/IMMULITE 1000 contenenti una sferetta di polistirene coattata all'analogo B12 ed incubate per circa 30 minuti a 37°C con agitazione intermittente. Durante questa incubazione, la vitamina B12 presente nel campione trattato compete con l'analogo B12 sulla fase solida per un numero limitato di siti leganti la vitamina B12 sul fattore intrinseco purificato. (Gli analoghi endogeni della vitamina B12 non interferiscono poiché il legante è libero da proteine R) Viene introdotto il fattore intrinseco anti-suino marcato con fosfatasi alcalina, e la Test Unit viene incubata per un ciclo di 30 minuti. Il coniugato enzimatico non legato viene eliminato attraverso centrifugazione.

Cicli d'incubazione: 2 × 30 minuti.

Prelievo dei Campioni

Nota: Se il campione viene testato per la vitamina B12 e l'acido folico, il paziente deve essere a digiuno.¹⁸

Benché né la bilirubina, né l'emolisi abbiano effetti clinici significativi sui risultati relativi alla vitamina B12, la presenza di emoglobina nel campione provocherà un aumento dei valori di acido

folico. Inoltre, l'emolisi può essere indice di un trattamento non idoneo del campione prima dell'arrivo al laboratorio, i risultati devono quindi essere interpretati con cautela.

Poiché l'EDTA ha effetti significativi sui risultati, non deve essere utilizzato come anticoagulante.

Si consiglia l'utilizzo di un'ultracentrifuga per eliminare i campioni lipemici.

La centrifugazione dei campioni di siero prima che la coagulazione sia completa può produrre fibrina. Per evitare risultati errati dovuti alla presenza di fibrina, assicurarsi che il processo di coagulazione sia completo prima di centrifugare i campioni. Alcuni campioni, in modo particolare quelli di pazienti sottoposti a terapia con anticoagulanti, possono richiedere tempi di coagulazione più lunghi.

Provette per il prelievo di sangue di produttori diversi possono dare valori differenti, a seconda dei materiali e degli additivi usati, incluso gel o barriere fisiche, attivatori di coaguli e/o anticoagulanti. L'IMMULITE/IMMULITE 1000 Vitamina B12 non è stato verificato con tutte le possibili variazioni di tipi di provette. Consultare la sezione riguardante Campioni Alternativi per dettagli sulle provette testate.

Volume Richiesto: si richiedono 200 µL di campione — siero o plasma — per la fase di pretrattamento del campione. Per una singola determinazione utilizzare 100 µL di campione *trattato*: il porta campioni deve contenere almeno 250 µL più del volume totale richiesto per il numero di determinazioni di Vitamina B12 da effettuarsi.

Conservazione: Se il campione non viene dosato entro 8 ore, conservarlo a -20°C: stabile per 6-8 settimane.¹⁴ Evitare l'esposizione alla luce solare diretta.

Diluizione di Campioni Elevati: Il dosaggio IMMULITE Vitamina B12 ha un range di calibrazione da 150 a 1 200 pg/mL (da 111 a 885 pmol/L). Tutti i campioni con livelli superiori al range di calibrazione del dosaggio devono essere diluiti con il Diluente del Campione Vitamina B12 prima del dosaggio.

Avvertenze e Precauzioni

Ad uso diagnostico *in vitro*.

Reagenti: Conservare i reagenti a 2–8°C. Eliminare in conformità alle leggi vigenti.

La soluzione/tampone Borato-KCN contiene cianuro. E' necessario fare molta attenzione per evitare il contatto con questo reagente.

Seguire le precauzioni generali e manipolare tutti i componenti come se fossero potenzialmente infetti. I materiali derivati dal sangue umano sono stati testati con esito negativo per la Sifilide, gli Anticorpi Anti-HIV 1 e 2, l'Antigene di Superficie dell'Epatite B e gli Anticorpi Anti-Epatite C.

E' stata aggiunta Sodio Azide a concentrazioni inferiori a 0,1 g/dL come conservante. Al momento dell'eliminazione, irrorare con molta acqua per evitare la formazione di azidi metalliche potenzialmente esplosive nelle tubature di piombo e di rame.

A concentrazioni inferiori a 0,1 g/dL, è stato aggiunto Cloranfenicolo come conservante. Il Cloranfenicolo è un noto cancerogeno; tale informazione è prescritta dallo stato della California

Substrato Chemiluminescente: Evitare la contaminazione e l'esposizione alla luce solare diretta. (Vedi metodica.)

Acqua: Utilizzare solo acqua distillata o deionizzata.

Materiali Forniti

I componenti costituiscono un set misto. Le etichette provviste di codice a barre sono necessarie per l'esecuzione del dosaggio.

Test Unit Vitamina B12 (LVB1)

Ogni test unit con codice a barra contiene una biglie coattata con l'analogo della vitamina B12. Stabile a 2–8°C fino alla data di scadenza.

LKVB1: 100 unit. **LKVB5:** 500 unit.

Le confezioni delle test unit devono essere portate a temperatura ambiente prima dell'apertura. Aprire tagliando lungo il bordo superiore, lasciando intatta la chiusura ermetica. Risigillare le confezioni per proteggere le sferette dall'umidità.

Porta Reagenti Vitamina B12 (LVBA, LVBB)

Con codice a barre. **LVBA:** un porta reagente (7,5 mL) contenente proteina legante la vitamina B12 (fattore intrinseco purificato di suino), con conservanti.

LVBB: un porta reagente (7,5 mL) contenente fosfatasi alcalina (intestino di vitello) coniugata con un anticorpo monoclonale murino anti fattore intrinseco di suino in un tampone, con conservanti. Conservare sigillato nel frigorifero: stabile a 2–8°C fino alla data di scadenza. Si consiglia di utilizzare il prodotto entro 30 giorni dall'apertura se conservato nella maniera indicata.

LKVB1: 1 set. **LKVB5:** 5 set.

Calibratori Vitamina B12 (LVBL, LVBH)

Due flaconi (Basso ed Alto) di vitamina B12 liofila in una matrice umana a base proteica, con conservanti. Ricostituire ogni flacone con **4,0 mL** di acqua distillata o deionizzata. Mescolare agitando delicatamente o invertendo la miscela finché il materiale liofilo sia completamente dissolto. Stabile a 2–8°C per 30 giorni dopo la ricostituzione, o per 6 mesi (aliquotato) a –20°C.

LKVB1: 1 set. **LKVB5:** 2 set.

Nota: I calibratori devono essere denaturati con il calore come i campioni dei pazienti. (Vedi Sezione sul Pretrattamento dei Campioni).

Soluzione Tampone Borato-KCN (LBCN)

125 mL di una Soluzione Tampone Borato-KCN con conservanti. Stabile a 2–8°C per 30 giorni dopo l'apertura

LKVB1: 1 flacone. **LKVB5:** 5 flaconi.

Prudenza! La soluzione/ tampone Borato-KCN contiene cianuro. E' necessario fare molta attenzione per evitare il contatto con questo reagente.

Soluzione di Ditiotreitolo (LDTT)

3 mL di una Soluzione di Ditiotreitolo. Stabile a 2–8°C per 30 giorni dopo l'apertura.

LKVB1: 1 flacone. **LKVB5:** 5 flaconi.

Componenti del Kit Forniti Separatamente

Diluyente della Vitamina B12 (LVBZ)

Per la diluizione manuale dei campioni dei pazienti. Un flacone 25 mL di siero umano su base proteica con conservanti. Stabile a 2–8°C per 30 giorni dopo l'apertura, o per 6 mesi (aliquotato) a –20°C.

LSUBX: Substrato Chemiluminescente

LPWS2: Tampone di Lavaggio dell'Ago

LKPM: Kit di Pulizia dell'Ago

LCHX-Y: Tubi Porta Campioni (con codice a barre)

LSCP: Porta Campioni (monouso)

LSCC: Coperchi per Porta Campioni (opzionali)

CON6: 3 livelli, controllo multiconstituito

Materiali Richiesti

Pipette per la dispensazione dei campioni; acqua distillata o deionizzata; controlli.

Tubi di polipropilene 12x75 mm, con tappi non ermetici – disponibili presso DPC.

Micropipette: 20, 200 e 1 000 µL. Per l'aggiunta di 1,0 mL di reagente, può essere utilizzato un dispensatore.

Contenitore di plastica con coperchio (per la preparazione della Soluzione di Lavoro).

Foglio di alluminio – o altro per proteggere gli emolisati dalla luce.

Bagnetto termostato coperto per bollire l'acqua (100°C). Non utilizzare un forno o altro.

Bagnetto termostato a temperatura ambiente – per raffreddare i tubi dopo l'ebollizione.

Pipetta volumetrica da 4,0 mL (± 0,02 mL) per la ricostituzione dei Calibratori.

Preparazione della Soluzione di Lavoro

Nota: I campioni dosati sia per la vitamina B12 che per l'acido folico devono essere pretrattati con la soluzione di lavoro descritta nella metodica dell'acido folico IMMULITE, codice LKFO.

La quantità di ogni componente dipende dal numero di dosaggi da eseguire. I volumi richiesti, in microlitri per dosaggio, sono tabulati di seguito. Assicurarsi di moltiplicare questi volumi per un numero

maggiore del numero di dosaggi da eseguire. (I componenti sono forniti in volumi sufficienti per la preparazione della soluzione di lavoro con un eccesso di circa il 20%).

	µL/test
Soluzione tampone Borato-KCN	1 000
Soluzione di ditiotreitolo	20

Importante: La Soluzione di Lavoro deve essere preparata ogni giorno. Se non è utilizzata immediatamente, dovrebbe essere conservata nel frigorifero a 2–8°C per un periodo di non più di 24 ore.

Pretrattamento del Campione

1. Dispensare **200 µL** di ogni Calibratore, Controllo o Campione dei pazienti – siero o plasma – nelle provette preparate.

Per i campioni dei pazienti da cui si attendono livelli di vitamina B12 superiori al range di calibrazione del dosaggio, diluire il siero o il plasma con il Diluyente dei Campioni Vitamina B12.
2. Aggiungere **1 000 µL** della Soluzione di Lavoro a tutte le provette. Vortexare.
3. Mettere il tappo a tutte le provette e metterle in un bagnetto coperto di acqua bollente (100°C) per **15 – 20 minuti**.
4. Rimuovere le provette dal bagno di acqua e raffreddarle in un bagno di acqua a temperatura ambiente per **5 minuti**.
5. Dispensare almeno **350 µL** del campione trattato in un porta campioni IMMULITE/IMMULITE 1000.

I campioni trattati, sia siero che plasma, sono stabili a temperatura ambiente (15–28°C) o conservati nel frigorifero a 2–8°C per 1 ora prima del dosaggio. Notare che i controlli commerciali possono dimostrare una stabilità variabile dopo il trattamento.

Procedura del Dosaggio

Attenzione: per avere prestazioni ottimali, è importante effettuare le procedure di manutenzione di routine cosiccome

definito nel Manuale dell'Operatore IMMULITE o IMMULITE 1000.

Vedi il Manuale dell'Operatore IMMULITE o IMMULITE 1000 per: preparazione, setup, calibrazione, dosaggio e controllo di qualità.

Controllate ogni test unit verificando la presenza della sferetta prima di caricarla sullo strumento.

I due porta reagenti A e B devono essere caricati sul carosello per eseguire questo dosaggio.

Ogni tubo porta campioni può essere seguito da quattro test unit.

Intervallo di Calibrazione Consigliato:
2 settimane.

Controllo di Qualità: Utilizzare controlli o pool di sieri con almeno due livelli (Alto e Basso) di vitamina B12.

Valori Attesi

I campioni di siero provenienti da 245 donatori maschi e femmine in apparente buono stato di salute che hanno effettuato una donazione di sangue entro gli ultimi 12 mesi e 147 campioni di siero provenienti da volontari in apparente buono stato di salute sono stati processati con i dosaggi della Vitamina B12 IMMULITE ottenendo il seguente range da 174 a 878 pg/mL (128 a 648 pmol/L).

Considerare questi limiti soltanto come *linee guida*. Ogni laboratorio dovrebbe stabilire i propri range di riferimento.

Limiti

Non si consiglia di utilizzare plasma EDTA.

Gli anticorpi eterofili presenti nel siero umano possono reagire con le immunoglobuline presenti nelle componenti del dosaggio provocando un'interferenza con i dosaggi in vitro. [Vedi Boscato LM, Stuart MC. Heterophilic antibodies: a problem for all immunoassays. Clin Chem 1998;34:27-33.] Campioni di pazienti routinariamente esposti agli animali o a prodotti derivati da siero di animali possono presentare questo tipo di interferenza causa potenziale di risultati anomali. Questi reagenti sono stati formulati per minimizzare il rischio di interferenze,

tuttavia, possono verificarsi interazioni potenziali tra sieri rari e componenti del test. A scopo diagnostico, i risultati ottenuti con questo dosaggio devono sempre essere utilizzati unitamente all'esame clinico, all'anamnesi del paziente e ad altre indagini di laboratorio.

Prestazioni del Dosaggio

Vedi Tabelle e Grafici per dati *rappresentativi*. I risultati sono indicati in pg/mL. (Se non diversamente specificato, tutti i risultati sono stati generati da campioni di siero raccolti in tubi senza barriere di gel o additivi che favoriscano la formazione di coaguli.)

Fattore di Conversione:
 $\text{pg/mL} \times 0,7378 \rightarrow \text{pmol/L}$

Range di Calibrazione:
150 – 1 200 pg/mL (111 – 885 pmol/L).

Sensibilità Analitica: 125 pg/mL
(92 pmol/L).

Precisione Intra-Dosaggio (All'interno della stessa seduta): Sono state calcolate statistiche per campioni dai risultati di 15 replicati in un'unica seduta (Vedi la Tabella "Intraassay Precision").

Precisione Inter-Dosaggio (Da una seduta all'altra): Sono state calcolate statistiche per campioni dai risultati di 10 sedute diverse. (Vedi la Tabella "Interassay Precision").

Linearità: Sono stati dosati campioni in varie forme diluite. (Vedi la Tabella "Linearity" per dati rappresentativi.)

Recupero: Sono stati dosati campioni 1:19 ai quali sono state aggiunte quattro soluzioni di Vitamina B12 (2 160, 3 640, 5 460 e 7 640 pg/mL) (Vedi la Tabella "Recovery" per dati rappresentativi.)

Specificità: In un test della specificità del legante il fattore intrinseco purificato, sono state dosate miscele degli analoghi della vitamina B12 (contenenti principalmente cobinamide) mediante il dosaggio della vitamina B12 IMMULITE. I risultati non hanno presentato nessuna crossreattività con il cobinamide, anche a concentrazioni fino a 1 800 000 pg/mL e 50 000 000 pg/mL.

Bilirubina: La presenza di bilirubina in concentrazioni fino a 200 mg/L non ha nessun effetto sui risultati entro il range di precisione del dosaggio.

Emolisi: La presenza di emoglobina in concentrazioni fino a 381 mg/dL non ha nessun effetto sui risultati entro il range di precisione del dosaggio.

Lipemia: La presenza di trigliceridi in concentrazioni fino a 3 000 mg/dL non ha nessun effetto sui risultati entro il range di precisione del dosaggio.

Tipo di campione alternativo: Sono stati dosati i campioni (n=22) prelevati in provette semplici ed eparinizzate:

(Eparina) = 0,95 (Siero) + 8,5 pg/mL
r = 0,987

Valore Medio:
474 pg/mL (Siero)
460 pg/mL (Eparina)

Siccome l'EDTA ha un effetto significativo sui risultati, non dovrebbe essere utilizzato come anticoagulante.

Effetto delle Proteine: Sono stati dosati due campioni di siero, con l'aggiunta di varie quantità di albumina sierica umana (HSA) ed IgG umane normali. (Vedi tabella "Protein Effect" per i risultati).

Comparazione dei Metodi 1: Il dosaggio è stato comparato al kit Dualcount® Solid Phase No Boil (SPNB) della DPC in 83 campioni di siero dei pazienti. (Range di concentrazione: da 155 fino a 1 143 pg/mL. Vedi grafico "Method Comparison 1".) Con regressione lineare:

(IML) = 1,00 (SPNB) + 13,6 pg/mL
r = 0,979

Valore Medio:
426 pg/mL (IMMULITE)
414 pg/mL (SPNB)

Comparazione di Metodi 2: Il dosaggio è stato comparato ad un radioimmunosaggio disponibile sul mercato (Kit A) in 97 campioni di siero dei pazienti. (Range di concentrazione: approssimativamente da 153 a 1 218 pg/mL. Vedi grafico "Method Comparison 2".) Con regressione lineare:

(IML) = 0,91 (Kit A) + 18,6 pg/mL
r = 0,963

Valore Medio:
406 pg/mL (IMMULITE)
424 pg/mL (Kit A)

Assistenza Tecnica

All'estero: Si prega di contattare il proprio Distributore DPC Nazionale.

Il Sistema Qualità della Diagnostic Products Corporation è certificato secondo le norme ISO 13485:2003.

Português

Vitamina B12

Utilização: Para o doseamento da vitamina B12 diagnóstico *in vitro* em soro ou plasma heparinizado, no auxílio do diagnóstico clínico e tratamento de anemia, em conjunto com o Analisador IMMULITE e IMMULITE 1000.

Números de catálogo: **LKVB1** (100 testes), **LKVB5** (500 testes)

Código do teste: **VB**

Cor: **Violeta**

Sumário e explicação do teste

A vitamina B12 (cobalamina) e folato são nutrientes essenciais à hematopoiese.⁶ A anemia megaloblástica é quase sempre causada pela deficiência de uma destas duas vitaminas.⁶ A deficiência de vitamina B12 também pode resultar em deterioração neurológica severa.^{1,2,7}

Os níveis de vitamina B12 circulante são geralmente um bom índice para determinar armazenamento em tecido. Isto é, os níveis de vitamina B12 medidos em soro ou plasma por um sistema otimizado de doseamento apresentam um resultado tipicamente baixo quando existe deficiência de vitamina B12, e resultado normal ou elevado quando não há deficiência.¹ As exceções a esta regra podem ocorrer em situações relativamente pouco comuns onde o nível de proteínas de transporte de vitamina B12 é anormal.² Logo, níveis baixos de vitamina B12 circulante podem ocorrer na ausência de deficiência de vitamina B12 quando o nível de transcobalamina I (uma proteína de transporte fisiologicamente inativa) for baixo.⁸

Inversamente, a deficiência de vitamina B12 pode ocorrer em presença de níveis normais ou altos de vitamina B12 em plasma, quando os níveis de transcobalamina II forem baixos ou quando os níveis de proteínas de transporte de vitamina B12 inativa forem altos, como é o caso em leucemia

mielóide crónica.^{5,8,11} (Os níveis de folato circulante são geralmente normais ou elevados na deficiência de vitamina B12, mas níveis de folato em hemácias são frequentemente baixos nesta condição.¹⁰)

A deficiência de vitamina B12 só raramente é que ocorre como resultado da ausência desta vitamina na dieta.^{3,6} São mais comuns os casos de absorção deficitária, como em gastrectomia parcial ou total, ou de anemia perniciosa, uma condição caracterizada por ausência completa ou quase completa de factor intrínseco.⁶ Já que aproximadamente dois terços de todos os doentes com anemia perniciosa possuem anticorpos de bloqueio ao factor intrínseco (IFbAb), da mesma forma que IFbAb são raramente encontrados noutras situações, as determinações de IFbAb representam um teste útil de acompanhamento para o diagnóstico diferencial de deficiência de vitamina B12.^{4,8,10} (Anticorpos ao factor intrínseco circulantes estão presentes em mais da metade de todos os doentes de anemia perniciosa. Níveis de proteína de transporte elevados podem ocorrer, por exemplo, em leucemia mielóide crónica.)

Causas comuns de níveis elevados de vitamina B12 podem incluir doença do fígado, doença mieloproliferativa (sendo a leucemia mielógena crónica um caso especial) e o uso de suplementos multivitamínicos.

Princípio do procedimento

O IMMULITE/IMMULITE 1000 Vitamina B12 é um imunoensaio competitivo de fase sólida, de enzimas quimico-luminosas.

A Vitamina B12 IMMULITE/IMMULITE 1000 requer um passo preliminar de desnaturação pelo calor. A Vitamina B12 na amostra do doente é liberta das proteínas de transporte por incubação a 100°C na presença de dithiothreitol e cianeto de potássio para inactivar as proteínas de ligação à vitamina B12, mesmo a valores extremos bem como os anticorpos ao factor intrínseco.

Após o passo de desnaturação pelo aquecimento, a amostra tratada e o factor intrínseco de suínos são simultaneamente introduzidos numa unidade de teste IMMULITE/IMMULITE 1000 contendo uma pérola de polistireno revestida com

análogo de B12, e é incubada aproximadamente 30 minutos a 37°C com agitação intermitente. Durante esta incubação, a vitamina B12 na amostra tratada compete com o análogo de B12 em fase sólida para um número limitado de pontos de ligação de vitamina B12 no factor intrínseco purificado. (Os análogos da vitamina B12 endógena não interferem, porque o ligante é livre de proteína R). A fosfatase alcalina marcada anti-factor intrínseco de suínos é introduzida, e a unidade de teste é incubada para um novo ciclo de 30 minutos. A enzima conjugada não ligada é removida por lavagem centrífuga.

Ciclos de incubação: 2 x 30 minutos.

Colheita

Nota: Na amostra analisada para vitamina B12 e ácido fólico, o doente deve estar em jejum.¹⁸

A bilirrubina e a hemólise não têm efeitos clínicos significativos nos resultados da Vitamina B12, a presença de hemoglobina na amostra aumenta os valores de Ácido Fólico. Adicionalmente, a hemólise pode indicar um deficiente manuseamento da amostra antes da recepção no laboratório, devendo os resultados ser interpretados com cuidado.

Porque o EDTA tem um efeito significativo nos resultados, não deve ser usado como anticoagulante.

Uma ultracentrifugação é recomendada para clarificar amostras lipémicas.

A centrifugação de amostras de soro antes da formação completa do coágulo pode resultar na presença de fibrina. Para prevenir resultados errados devido à presença de fibrina, certifique-se que a formação do coágulo foi completa antes da centrifugação das amostras. Algumas amostras, em especial as de doentes que recebem terapia anticoagulante podem requerer um maior tempo de formação do coágulo.

Os tubos para colheita sanguínea de diferentes fabricantes, podem originar diferentes valores, dependendo dos materiais e aditivos, incluindo gel ou barreiras físicas, activadores do coágulo e/ou anti coagulantes. IMMULITE/IMMULITE 1000 Vitamina B12 não foram ainda testados com todas as

possíveis variações originadas pelos tipos de tubos. Consultar a secção Tipos de Amostras Alternativas para obter detalhes sobre os tubos que foram testados.

Volume de amostra: São necessários 200 µL de amostra — soro ou plasma — para a etapa de pré-tratamento de amostra. Uma única determinação utiliza 100 µL da amostra *tratada*: a cuvete de amostra deve conter ao menos 250 µL a mais da amostra tratada além do volume total da amostra para o número de determinações de vitamina B12 a serem realizados.

Estabilidade: Se não for doseada em 8 horas, armazene a -20°C: estável por 6-8 semanas.¹⁴ Evite exposição excessiva à luz directa.

Diluição de amostras elevadas: O procedimento da vitamina B12 de IMMULITE tem uma escala da calibração de 150 a 1 200 de pg/mL (111 a 885 pmol/L). Todas as amostras em que se esperam níveis acima da calibração do doseamento devem ser diluídas com diluent da amostra da vitamina B12 antes do doseamento.

Precauções

Para uso de diagnóstico *in vitro*.

Reagentes: Manter a 2–8°C. Elimine de acordo com as normas aplicadas.

A Solução Tamponizada de Borato-KCN contém cianeto. Extremo cuidado deve ser praticado para evitar todos os contactos corporais com este reagente.

Manipule com as devidas precauções todos os materiais capazes de transmitir doenças infecciosas. As matérias primas obtidas de soro humano foram testadas, dando resultados negativos para a sífilis, para os anticorpos do vírus da imunodeficiência humana (HIV) 1 e 2; para o antigénio de superfície da hepatite B (HBsAg) e para os anticorpos do vírus da hepatite C.

Azida de sódio foi adicionada como conservante; para evitar acumulações de azidas metálicas explosivas em canalizações de cobre e alumínio, os reagentes devem ser rejeitados no esgoto apenas se estiverem diluídos e forem lavados com grandes volumes de água.

Foi adicionado Clorafenicol em concentrações inferiores a 0,1 g/dL, como conservante. O Clorafenicol é conhecido como causa de cancro; esta divulgação é exigida pelo estado da Califórnia.

Substrato quimioluminescente: Evite contaminação e exposição à luz directa (ver bula do substrato).

Água: Utilize água destilada ou desionizada.

Materiais fornecidos

Os componentes formam um conjunto uno e indivisível. Os códigos de barras no interior das caixas são necessários para o ensaio.

Unidades de Teste de Vitamina B12 (LVB1)

Cada unidade rotulada com código de barras contém uma pérola revestida com análogo de vitamina B12. Estável até a data de validade a 2–8°C.

LKVB1: 100 unidades.

LKVB5: 500 unidades.

Antes de abrir as saquetas com Unidades de Teste, deixe que estas atinjam a temperatura ambiente. Corte as saquetas pela borda superior, mantendo o fecho intacto. Feche novamente as saquetas para proteger contra a humidade.

Embalagens de reagentes de Vitamina B12 (LVBA, LVBB)

Com código de barras. **LVBA:** uma embalagem (7,5 mL) com proteína ligante de vitamina B12 (factor intrínseco de porco purificado, com conservante.).

LVBB: uma embalagem (7,5 mL) com fosfatase alcalina (de intestino de vitela) conjugada a anticorpo monoclonal de rato de factor intrínseco anti-porco tamponizado, com conservante.

Armazene tapado e refrigerado: Estável até à data de validade a 2–8°C.

Recomenda-se a utilização até 30 dias após aberto quando armazenado de acordo com as indicações.

LKVB1: 1 conjunto. **LKVB5:** 5 conjuntos.

Ajustes Vitamina B12 (LVBL, LVBH)

Dois frascos (alto e baixo) de vitamina B12 liofilizada em matriz baseada em proteína humana, com conservante. Reconstitua cada frasco com 4,0 mL de água destilada ou desionizada. Misture

Comment [translation 6

por inversão ou movimentos lentos até o material liofilizado dissolver completamente. Estável, após a reconstituição, durante 30 dias a 2–8°C, ou por 6 meses (aliquotado) a –20°C. **LKVB1:** 1 conjunto. **LKVB5:** 2 conjuntos.

Nota: Os Ajustes devem ser submetidos à mesma etapa de desnaturação de calor que as amostras. (Veja a secção de Pré-tratamento de Amostra.)

Solução Tamponizada de Borato-KCN (LBCN)

125 mL de matriz com Solução Tamponizada de Borato-KCN com conservante. Estável por 30 dias após a abertura a 2–8°C.

LKVB1: 1 frasco. **LKVB5:** 5 frascos.

Cuidado! A Solução Tamponizada de Borato-KCN contém cianeto. Extremo cuidado deve ser praticado para evitar todos os contactos corporais com este reagente.

Solução de Ditiotreitol (LDTT)

3 mL Solução Tamponizada de Borato-KCN. Estável por 30 dias após a abertura a 2–8°C.

LKVB1: 1 frasco. **LKVB5:** 5 frascos.

Componentes do kit fornecidos separadamente

Diluyente de Amostra de Vitamina B12 (LVBZ)

Para a diluição manual de amostras de doentes. Um vial que contém 25 mL de diluente protein-based do serum humano, com conservante. Estável, após a abertura, durante 30 dias a 2–8°C, ou por 6 meses (aliquotado) a –20°C.

LSUBX: Substrato quimioluminescente

LPWS2: Solução de lavagem

LKPM: Kit de limpeza do pipetador

LCHx-y: Suportes de cuvetes de amostra (com código de barras)

LSCP: Cuvetes de amostra (descartáveis)

LSCC: Tampa de cuvetes de amostra (opcional)

CON6: Controlo multiparamétrico de três níveis.

Também necessário:

Pipetas de transferência de amostra; água destilada ou desionizada; controlos.

Tubos de polipropileno simples de 12x75 mm, com tampas, disponíveis na DPC.

Micropipetas: 20, 200 e 1 000 µL. Para a adição de 1,0 mL de reagente, um dispensador repetitivo é adequado.

Recipiente plástico com tampa (para a preparação da Solução de Trabalho).

Alumínio — ou outro meio de protecção contra a luz para os hemolisados.

Banho-maria a ferver coberto (100°C). Não use forno ou placa de aquecimento.

Banho-maria à temperatura ambiente — para arrefecer os tubos após a fervura.

Pipeta volumétrica de 4,0 mL (± 0,02 mL) para reconstituição dos Ajustes.

Preparação de Solução de Trabalho

Nota: As amostras a serem testadas tanto para vitamina B12 quanto ácido fólico devem ser pré-tratadas com a Solução de Trabalho descrita na bula para Ácido Fólico IMMULITE, número de catálogo LKFO.

A quantidade de cada componente depende do número de testes a serem realizados. Os volumes necessários, em microlitros por teste, estão tabelados abaixo. Certifique-se de multiplicar estes volumes por um número ligeiramente maior que o número de testes a serem executados. (Os componentes são fornecidos em volume suficiente para preparar a Solução de Trabalho com um excesso de aproximadamente 20%.)

	µL/teste
Solução Tamponizada de Borato-KCN	1 000
Solução de Ditiotreitol	20

Importante: A Solução de Trabalho deve ser preparada diariamente. Caso não seja usada imediatamente, deve ser refrigerada a 2–8°C por um período inferior a 24 horas.

Pré-tratamento de Amostra

1. Doseie **200 µL** de cada Ajuste, controlo, ou amostra — soro ou plasma — nos tubos preparados.

- Para amostras de doentes, onde se esperam níveis de vitamina B12 acima do limite superior de calibração do doseamento, dilua o soro, plasma, ou hemolisado com o Diluente de Amostra de Vitamina B12.
2. Adicione **1 000 µL** da Solução de Trabalho a todos os tubos. Vortex.
 3. Tape sem apertar todos os tubos e coloque-os em banho-maria a ferver, tapado (100°C) por **15 – 20 minutos**.
 4. Remova os tubos do banho-maria a ferver, e deixe-os num banho-maria à temperatura ambiente por **5 minutos**.
 5. Doseie pelo menos **350 µL** da amostra tratada numa cuvete de Amostra IMMULITE/IMMULITE 1000.

Amostras tratadas, tanto de soro quanto de plasma, são estáveis à temperatura ambiente (15–28°C) ou refrigeradas a 2–8°C por 1 hora antes do doseamento. Note que controlos comerciais podem apresentar estabilidade variável após o tratamento.

Procedimento do doseamento

Têr em atenção que para obter um desempenho óptimo, é importante efectuar todos os procedimentos de manutenção de rotina conforme definido no Manual de Operador do IMMULITE ou IMMULITE 1000.

Ver o Manual do Operador do IMMULITE ou IMMULITE 1000 para: preparação, setup, ajustes, procedimento do ensaio e controlo de qualidade.

Confirme a presença da esfera em cada Unidade de Teste antes de a colocar no sistema.

Repare que as Embalagens de Reagente A e B devem ser colocadas no carrossel para executar este doseamento.

Cada suporte de cuvete de amostra pode ser seguido por quatro unidades de teste.

Intervalo entre ajustes aconselhável:
2 semanas.

Amostras de controlo de qualidade:
utilize controlos ou "pools" com, pelo menos, dois níveis (alto e baixo) de vitamina B12.

Valores de Referência

245 amostras de soro de dadores de sangue, incluindo homens e mulheres aparentemente saudáveis e que não davam sangue à 12 meses, e 147 amostras de soro de voluntários, foram processadas utilizando o método Vitamina B12 IMMULITE; os seguintes valores de referência foram obtidos:

174 e 878 pg/mL (128 e 648 pmol/L)

Considere estes limites apenas como *directrizes*. Cada laboratório deve estabelecer os seus próprios valores de referência.

Limitações

O plasma EDTA não é recomendado para uso.

Os anticorpos heterófilicos no soro humano podem reagir com as imunoglobulinas presentes no ensaio, causando interferência com os imunoensaios in vitro. [Ver Boscato LM, Stuart MC. Heterophilic antibodies: a problem for all immunoassays. Clin Chem 1998;34:27-33.] Amostras de doentes expostas em rotina a produtos ou soros de animais podem demonstrar este tipo de interferência, potencial causador de resultados anómalos. Estes reagentes foram formulados para minimizar o risco de interferência, contudo podem ocorrer potenciais interações entre soros (raros) e componentes do teste. Para fins de diagnóstico, os resultados obtidos neste ensaio devem ser sempre analisados em combinação com o exame clínico, história de medicação do doente e outros achados que possam correlacionar.

Características do ensaio

Ver tabelas e gráficos para dados representativos da performance do doseamento. Os resultados são apresentados em pg/mL. (Salvo referência em contrário, todos os dados provêm de amostras de soro colhidas em tubos sem anticoagulantes, barreiras de gel ou aditivos promotores da coagulação.)

Factor de conversão:
 $\text{pg/mL} \times 0,7378 \rightarrow \text{pmol/L}$

Calibração: 150 – 1 200 pg/mL
(111 – 885 pmol/L).

Sensibilidade Analítica: 125 pg/mL (92 pmol/L).

Precisão Intra-ensaio (Entre ensaio): Estatísticas foram calculadas para amostras dos resultados de 15 réplicas num único ensaio. (Ver a tabela de "Intraassay Precision")

Precisão Inter-ensaio (Ensaio a ensaio): Estatísticas foram calculadas para amostras doseadas em 10 ensaios diferentes. (Ver a tabela de "Interassay Precision").

Linearidade: As amostras foram doseadas sob vários níveis de diluição. (Ver a tabela de "Linearity" para dados representativos.)

Recuperação: Às amostras foram adicionadas na relação de 1 para 19 com quatro soluções Vitamina B12 (2 160, 3 640, 5 460 e 7 640 pg/mL) antes do doseamento. (Ver tabela de "Recovery" para dados representativos.)

Especificidade: Como um teste da especificidade do ligante de factor intrínseco purificado, misturas de análogos de vitamina B12 (contendo principalmente cobinamida) foram doseadas para vitamina B12 pelo doseamento de Vitamina B12 IMMULITE. Os resultados não apresentaram reactividade cruzada com a cobinamida, mesmo em concentrações tão altas quanto 1 800 000 pg/mL e 50 000 000 pg/mL.

Bilirrubina: A presença de bilirrubina em concentrações até 200 mg/L não tem efeito em resultados, dentro da precisão do ensaio.

Hemolise: A presença de hemoglobina em concentrações até 381 mg/dL não tem efeito em resultados, dentro da precisão do ensaio.

Lipemia: A presença de trigliceridos em concentrações até 3 000 mg/dL não tem efeito nos resultados, dentro da precisão do ensaio.

Tipo de amostra alternativa: Amostras (n=22) colhidas em tubos simples e heparinizados de contenção a vácuo foram doseadas:

(Heparina) = 0,95 (Soro) + 8,5 pg/mL
r = 0,987

Medias:
474 pg/mL (Soro)
460 pg/mL (Heparina)

Como o EDTA teria um efeito significativo nos resultados, não deve ser usado como anticoagulante.

Efeito Proteico: Foram doseadas duas amostras de soro de doentes, adicionadas com diversas quantidades de albumina de soro humano (HSA) e IgG humano normal. (Veja a tabela "Protein Effect" para resultados.)

Comparação de Métodos 1:

O doseamento foi comparado à Fase Sólida Sem Fervura (SPNB) Dualcount® da DPC em 83 amostras de soro. (Zona de trabalho: aproximadamente 155 a 1 143 pg/mL. Ver gráfico "Method Comparison 1".) Regressão linear:

(IML) = 1,00 (SPNB) + 13,6 pg/mL
r = 0,979

Medias:
426 pg/mL (IMMULITE)
414 pg/mL (SPNB)

Comparação de Métodos 2: O método Vitamina B12 IMMULITE também foi comparado a um doseamento de radioimunoensaio disponível comercialmente (Kit A) em 97 amostras de soro. (Concentração: aprox. 153 a 1 218 pg/mL. Ver gráfico "Method Comparison 2".) Por regressão linear:

(IML) = 0,91 (Kit A) + 18,6 pg/mL
r = 0,963

Medias:
406 pg/mL (IMMULITE)
424 pg/mL (Kit A)

Assistência Técnica:

Por favor contacte o seu Distribuidor Nacional.

O Sistema de Qualidade da Diagnostic Products Corporation está registado sob ISO 13485:2003.



Diagnostic Products Corporation
Corporate Offices
5210 Pacific Concourse Drive
Los Angeles, CA 90045-6900
USA

2006-06-12

PILKVB – 10



EC	REP
----	-----

 DPC Biermann GmbH
61231 Bad Nauheim
Germany
+49 -6032-994-00