



Vitamin B12

DPC®

IMMULITE[®] 2000 Vitamin B12

English

Intended Use: For *in vitro* diagnostic use with the IMMULITE 2000 Analyzer — for the quantitative measurement of vitamin B12 in serum or heparinized plasma, as an aid in clinical diagnosis and treatment of anemia.

Catalog Number: **L2KVB2** (200 tests),
L2KVB6 (600 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 2000 Vitamin B12 is a solid-phase, competitive chemiluminescent enzyme immunoassay involving an automated alkaline denaturation procedure.

The IMMULITE 2000 performs a one-cycle, sample treatment of patient serum or plasma with dithiothreitol (DTT) and a sodium hydroxide/potassium cyanide solution (NaOH/KCN) in a reaction tube containing no bead. After a 30-minute incubation, the treated sample is transferred to a second reaction tube containing a vitamin B12-coated polystyrene bead and hog intrinsic factor (HIF). During this subsequent 30-minute incubation, the vitamin B12 released from endogenous binding proteins during sample treatment competes with immobilized vitamin B12 for binding with HIF. Alkaline phosphatase-labeled anti-hog intrinsic factor is then introduced which binds to any HIF that is immobilized on the B12-coated bead in the final 30 minute incubation. Unbound enzyme conjugate is removed by centrifugal wash. Substrate is added and the procedure continues as described for typical immunoassays in the Operator's Manual.

Incubation Cycles: 3 × 30 minutes. 2 test positions per assay: 1 sample treatment cup; 1 immunoreaction cup.

Cycle 1: Alkaline denaturation of endogenous binding proteins.

Cycles 2 & 3: Immunoreaction.

Folic Acid Panel / Vitamin B12: To achieve maximum assay throughput, patient samples for folic acid and vitamin B12 should be run alternately, beginning with a folic acid sample. See Operator's Manual on creating a panel.

Specimen Collection

Note: If sample is to be analyzed for both vitamin B12 and folic acid, the patient must be in a fasting state.¹⁷

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.

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

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

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 2000 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: 75 µL serum or heparinized plasma.

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

Warnings and Precautions

For *in vitro* diagnostic use.

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

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.

NaOH/KCN: Solution contains cyanide. Avoid all bodily contact.

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

Water: Use distilled or deionized water.

Materials Supplied

Components are a matched set. Labels on the inside box are needed for the assay.

Vitamin B12 Bead Pack (L2VB12)

With barcode. 200 beads, coated with vitamin B12 analog. Stable at 2–8°C until the expiration date.

L2KVB2: 1 pack. **L2KVB6:** 3 packs.

Vitamin B12 "A" Reagent Wedge (L2VBA2)

With barcodes. Wedges (labeled "A"), each containing 15 mL dithiothreitol (DTT) in buffer, and 15 mL NaOH/KCN (NH₄CN) solution in buffer, with preservative. Prior to opening, stable at 2–8°C until expiration date. *After opening*, stable at 2–8°C for 30 days.

L2KVB2: 3 wedges. **L2KVB6:** 6 wedges.

Before use, tear off the top of the label at the perforations, without damaging the barcode. Remove the foil seal from the top of wedge; snap the sliding cover down into the ramps on the reagent lid.

Vitamin B12 “D” Reagent Wedge (L2VBD2)

With barcodes. Wedges (labeled “D”), each containing 11.5 mL alkaline phosphatase (bovine calf intestine) conjugated to murine monoclonal anti-hog intrinsic factor in buffer, and 11.5 mL vitamin B12 binding protein (purified hog intrinsic factor) in buffer, with preservative. Stable at 2–8°C until expiration date.
L2KVB2: 1 wedge. **L2KVB6:** 3 wedges.

Before use, tear off the top of the label at the perforations, without damaging the barcode. Remove the foil seal from the top of wedge; snap the sliding cover down into the ramps on the reagent lid.

Vitamin B12 Adjustors (LVBL, LVBH)

Two vials (Low and High), lyophilized vitamin B12 in a human protein-based matrix, with preservative. Reconstitute each vial with **4.0 mL** sterile distilled water, and mix by gentle inversion. Stable at 2–8°C for 30 days after reconstitution, or for 6 months (aliquotted) at –20°C.
L2KVB2: 2 sets. **L2KVB6:** 3 sets.

Before making an adjustment, place the appropriate Aliquot Labels (supplied with the kit) on test tubes so that the barcodes can be read by the on-board reader.

Kit Components Supplied Separately

Vitamin B12/Folic Acid Sample Diluent (L2FVZ)

For on-board dilution of high samples. 25 mL of concentrated (ready-to-use), vitamin B12/folic acid-free human protein-based matrix, with preservative. Stable at 2–8°C for 30 days after opening, or for 6 months (aliquotted) at –20°C.

Barcode labels are provided for use with the diluent. Before use, place an appropriate label on a 16 × 100 mm test tube, so that the barcodes can be read by the on-board reader.

L2FVZ: 3 labels

L2SUBM: Chemiluminescent Substrate

L2PWSM: Probe Wash

L2KPM: Probe Cleaning Kit

LRXT: Reaction Tubes (disposable)

L2ZT: 250 Sample Diluent Test Tubes (16 × 100 mm)

L2ZC: 250 Sample Diluent Tube Caps

CON6: Tri-level, multi-constituent control

Also Required

Distilled or deionized water; test tubes; controls.

Assay Procedure

Note that for optimal performance, it is important to perform all routine maintenance procedures as defined in the IMMULITE 2000 Operator's Manual.

See the IMMULITE 2000 Operator's Manual for: preparation, setup, dilutions, adjustment, assay and quality control procedures.

Both Reagent Wedge A (L2VBA2) and Reagent Wedge D (L2VBD2) must be loaded onto the instrument prior to assay.

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 147 apparently healthy male and female volunteers were processed by the IMMULITE 2000 Vitamin B12 assay. Nonparametric analysis yielded a median value of 432 pg/mL (319 pmol/L) and a central 95% range of 193 – 982 pg/mL (142 – 725 pmol/L).

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

Limitations

EDTA plasma is not recommended for use.

Blocking antibodies specific for intrinsic factor are present in more than half of all pernicious anemia patients. In order to accurately measure vitamin B12 levels in such samples it is necessary to inactivate these antibodies. While the alkaline hydrolysis has been shown to be effective in inactivating high titers of intrinsic factor blocking antibodies that may be present, the possibility that these antibodies are

not fully inactivated in a rare sample, especially samples with extremely high titers of these antibodies, can not be ruled out. When results obtained are in conflict with the clinical examination, patient medical history and other findings, the sample should be tested for intrinsic factor blocking antibodies. A sample pool selected for a high titer of intrinsic factor blocking antibodies could also be incorporated into the routine quality control of this assay to specifically monitor the inactivation of such antibodies during the pretreatment step.

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 1988;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 gel barriers or clot-promoting additives.)

Conversion Factor:
pg/mL \times 0.7378 \rightarrow pmol/L

Reportable Range: 150 – 1,000 pg/mL
(111 – 738 pmol/L)

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

Intraassay Precision: Statistics were calculated for samples from the results of 20 replicates in a single run. (See "Intraassay Precision" table.)

Interassay Precision: Statistics were calculated for samples assayed in at least

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 three vitamin B12 solutions (2,000, 4,500 and 7,500 pg/mL), were assayed. (See "Recovery" table for representative data.)

Specificity: The antibody is highly specific for vitamin B12. (See "Specificity" table.)

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 417 mg/dL has no effect on results, within the precision of the assay.

Lipemia: Presence of triglycerides in concentrations up to 4,000 mg/dL has no effect on results, within the precision of the assay.

Alternate Sample Type: Samples were collected using plain, heparinized, and Becton Dickinson SST vacutainer tubes. EDTA plasma is not recommended for use. By linear regression:

(Heparin) = 0.96 (Serum) + 6 pg/mL
r = 0.995

(SST) = 0.92 (Plain Tubes) + 46 pg/mL
r = 0.988

Means:
448 pg/mL (Heparin)
467 pg/mL (SST)
459 pg/mL (Serum)

Method Comparison: The assay was compared to DPC's IMMULITE Vitamin B12 on 153 samples (Concentration range: approximately 152 to 982 pg/mL. See graph.) By linear regression:

(IML 2000) = 0.91 (IML) – 16.4 pg/mL
r = 0.913

Means:
413 pg/mL (IMMULITE 2000)
471 pg/mL (IMMULITE)

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) Gräsbeck 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 anaemia. *Clin Lab Haematol* 1980;2:89-109. 12) Mollin DL, Ross GIM. Serum vitamin B12 concentrations in leukaemia and in some other haematological 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) Food and Drug Administration (FDA), Letters from the Bureau of Medical Devices (BMD) to manufacturers of Vitamin B12 radioassay kits. April 1980, January 1981. 16) 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. 17) Chanarin I. *The megaloblastic anaemias*. 2nd ed. Oxford: Blackwell Scientific, 1979. 18) 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. 19) 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 | 190 | 25 | 13% |
| 2 | 343 | 24 | 7.0% |
| 3 | 744 | 50 | 6.7% |

Interassay Precision (pg/mL)

| | Mean ¹ | SD ² | CV ³ |
|---|-------------------|-----------------|-----------------|
| 1 | 191 | 28 | 15% |
| 2 | 369 | 22 | 6.0% |
| 3 | 698 | 55 | 7.9% |

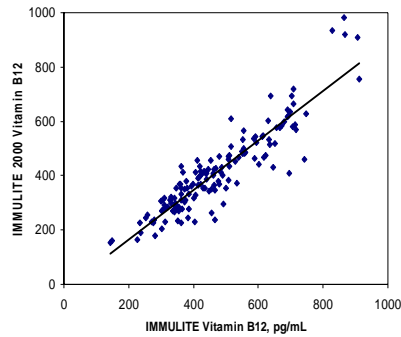
Specificity

| Compound ¹ | Amount Added ² | % Cross reactivity ³ |
|-----------------------|---------------------------|---------------------------------|
| Cobinamide | 50 µg/mL | ND |

ND: Not detectable.⁴

Recovery (pg/mL)

| | Solution ¹ | Observed ² | Expected ³ | %O/E ⁴ |
|---|-----------------------|-----------------------|-----------------------|-------------------|
| 1 | — | 252 | — | — |
| | A | 346 | 339 | 102% |
| | B | 471 | 464 | 102% |
| | C | 602 | 614 | 98% |
| 2 | — | 275 | — | — |
| | A | 445 | 361 | 123% |
| | B | 489 | 486 | 101% |
| | C | 700 | 636 | 110% |
| 3 | — | 330 | — | — |
| | A | 392 | 414 | 95% |
| | B | 493 | 539 | 92% |
| | C | 747 | 689 | 108% |
| 4 | — | 451 | — | — |
| | A | 548 | 529 | 104% |
| | B | 662 | 654 | 101% |
| | C | 820 | 804 | 102% |
| 5 | — | 475 | — | — |
| | A | 506 | 551 | 92% |
| | B | 653 | 676 | 97% |
| | C | 840 | 826 | 102% |

Method Comparison

$$(IML 2000) = 0.91 (IML) - 16.4 \text{ pg/mL}$$

$$r = 0.913$$

Linearity (pg/mL)

| | Dilution ¹ | Observed ² | Expected ³ | %O/E ⁴ |
|---|-----------------------|-----------------------|-----------------------|-------------------|
| 1 | 4 in 4 ⁵ | 530 | — | — |
| | 2 in 4 | 251 | 265 | 95% |
| | 1 in 4 | <150 | <150 | — |
| 2 | 4 in 4 | 565 | — | — |
| | 2 in 4 | 292 | 283 | 103% |
| | 1 in 4 | <150 | <150 | — |
| 3 | 4 in 4 | 583 | — | — |
| | 2 in 4 | 322 | 292 | 110% |
| | 1 in 4 | 150 | <150 | — |
| 4 | 4 in 4 | 594 | — | — |
| | 2 in 4 | 322 | 297 | 108% |
| | 1 in 4 | <150 | <150 | — |
| 5 | 4 in 4 | 610 | — | — |
| | 2 in 4 | 270 | 305 | 89% |
| | 1 in 4 | <150 | 153 | — |

Deutsch. Intraassay Precision: ¹Mittelwert, ²S (Standardabweichungen), 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. **Specificity:** ¹Verbindung, ²zugesetzte Menge, ³% Kreuzreaktivität, ⁴NN: Nicht nachweisbar. **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. **Specificity:** ¹Compuesto, ²Cantidad añadida, ³% Reacción cruzada, ⁴ND: no detectable. **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. **Specificity:** ¹Composé, ²ajouté, ³Réaction croisée %, ⁴ND: non détectable. **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. **Specificity:** ¹Composto, ²quantità aggiunta, ³Percentuale di Crossreattività, ⁴ND: non

determinabile. **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. **Specificity:** ¹Composto, ²Quantidade adicionada, ³Percentagem de reação cruzada, ⁴ND: não detectável. **Method Comparison:** Vitamin B12: Vitamina B12.

Deutsch

Vitamin B12

Anwendung: zur *in vitro* Diagnostik mit dem IMMULITE 2000 System - zur quantitativen Bestimmung von Vitamin B12 im Serum oder Heparin-Plasma. Hilfsmittel zur klinischen Diagnose und Therapie von Anämien.

Artikelnummern: **L2KVB2** (200 tests), **L2KVB6** (600 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 Differentialdiagnose 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

IMMULITE 2000 Vitamin B12 ist ein kompetitiver Festphasen Chemilumineszenz-Enzymimmunoassay unter Verwendung eines automatisierten alkalischen Denaturierungsschrittes.

Der IMMULITE 2000 Vitamin B12 beinhaltet einen automatische Probenvorbehandlungsschritt von Patientenserum oder Plasma. Die Probe wird zusammen mit Dithiothreitol (DTT) und Natriumhydroxid/Kaliumcyanid (NaOH/KCN) in einem Reaktionsröhrchen ohne Kugel vorbehandelt. Nach einer 30-minütigen Inkubation wird die vorbehandelte Probe in ein zweites

Reaktionsröhrchen überführt, das eine mit Vitamin B12 beschichtete Kugel und Intrinsicfaktor vom Schwein (HIF) enthält. Während der anschließenden 30-minütigen Inkubation konkurriert das während der Probenvorbehandlung freigesetzte endogene Vitamin B12 mit dem immobilisierten Vitamin B12 um die Bindung mit HIF. Während der letzten 30-minütigen Inkubation wird ein mit alkalischer Phosphatase-markierter anti-HIF Antikörper hinzugefügt. Dieser bindet an den HIF, der durch die Vitamin B12 beschichtete Kugel immobilisiert ist. Ungebundenes Enzymkonjugat wird durch zentrifugales Waschen entfernt. Nach Hinzufügen von Substrat wird das Verfahren entsprechend der im Benutzerhandbuch für typische Immunoassays gegebenen Beschreibung fortgesetzt.

Inkubationszyklen: 3 x 30 min. 2
Testpositionen pro Test: 1
Probenvorbehandlungsröhrchen; 1
Teströhrchen.

Zyklus 1: Alkalische Denaturierung von endogenen Bindungsproteinen.

Zyklus 2 und 3: Immunreaktion

Kombinierte Folsäure / Vitamin B12-Bestimmung: Um einen maximalen Testdurchsatz zu gewährleisten, sollten die Patientenproben für Folsäure und Vitamin B12 abwechselnd gefahren werden, wobei mit einer Folsäureprobe zu beginnen ist. Siehe die Angaben in der Betriebsanleitung, wie ein *Probenpanel* zu erstellen ist.

Probengewinnung

Anmerkung: Wenn Probe für Vitamin B12 und Folsäure analysiert werden soll, muß der Patient in einem Fastenzustand sein.¹⁷

Obwohl weder Bilirubin noch Hämolyse klinisch signifikante Auswirkungen auf die Vitamin B12 Werte haben, führt die Anwesenheit von Bilirubin zu einer Erhöhung der Folsäure-Werte. Außerdem kann Hämolyse auf eine inadäquate Behandlung der Probe vor ihrer Ankunft im Labor hindeuten, so dass die Ergebnisse mit Vorsicht interpretiert werden sollten.

Der Einsatz einer Ultrazentrifuge wird zur Klärung von lipämischen Proben empfohlen.

Da EDTA die Ergebnisse signifikant beeinflusst, sollte es nicht als Antikoagulanzen gewählt werden.

Die Zentrifugation der Serumproben vor dem völligen Abschluss der Gerinnung kann zu Fibringerinnseln führen. Um fehlerhaften Analysenergebnissen 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 2000 Vitamin B12 sind nicht mit allen möglichen Röhrchenvariationen ausgetestet worden. Details der getesteten Röhrchenarten sind dem Kapitel "Alternative Probenarten" zu entnehmen.

Erforderliche Menge: 75 µl Serum oder Heparin-Plasma

Lagerung: Probe bei -20°C lagern, wenn sie nicht innerhalb von 8 Stunden analysiert wird. Bei -20°C 6-8 Wochen lang haltbar.¹⁴ Eine direkte Einwirkung von Licht auf die Proben ist zu vermeiden!

Hinweise und Vorsichtsmaßnahmen

Zur *In-vitro*-Diagnostik.

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

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.

NaOH/KCN: Die Lösung enthält Cyanid. Es ist äußerste Vorsicht geboten. Jeder körperliche Kontakt mit diesem Reagenz ist zu vermeiden!.

Chemilumineszenz-Substrat:

Kontamination und direkte Sonneneinstrahlung vermeiden. Siehe Packungsbeilage:

Wasser: Destilliertes oder deionisiertes Wasser verwenden.

Im Lieferumfang enthalten

Die Bestandteile der Testpackung sind aufeinander abgestimmt. Die Aufkleber auf der Innenverpackung werden zur Testdurchführung benötigt.

Vitamin B12 Kugel-Container (L2VB12)

Der barcodierte Kugel-Container enthält 200 Kugeln, beschichtet mit einem Vitamin B12 Analog. Gekühlt (2–8°C) haltbar bis zum angegebenen Verfallsdatum.

L2KVB2: 1 Container.

L2KVB6: 3 Container.

Vitamin B12 "A" -Reagenzbehälter (L2VBA2)

Barcodiert. Enthält Gefäße (Bezeichnung "A"), mit jeweils 15 ml Dithiothreitol (DTT) in Pufferlösung und 15 ml NaOH/KCN (NHCN) in Pufferlösung (mit Konservierungsmittel). Bei 2–8°C haltbar bis zum angegebenen Verfallsdatum.

Nach dem Öffnen bei 2–8°C 30 Tage haltbar.

L2KVB2: 3 Behälter.

L2KVB6: 6 Behälter.

Vor Gebrauch den Aufkleber an der Perforation abreißen, ohne dabei die Barcodierung zu beschädigen. Die Folie von der Oberseite des Containers entfernen. Den Schiebedeckel nach unten in die Führung des Reagenziendeckels einrasten lassen.

Vitamin B12 "D" Reagenzbehälter (L2VBD2)

Barcodiert. Enthält Gefäße (Bezeichnung "D"), mit jeweils 11,5 ml alkalischer Phosphatase (Rinderkalbsdarm) konjugiert mit monoklonalen, gegen Intrinsic Factor vom Schwein gerichteten Antikörpern (Maus) in Pufferlösung (mit Konservierungsmittel) und 11,5 ml Vitamin B12-Bindeprotein (gereinigter Intrinsic Faktor vom Schwein) in Pufferlösung (mit Konservierungsmittel). Bei 2-8 °C bis zum Verfallsdatum haltbar.

L2KVB2: 1 Behälter.

L2KVB6: 3 Behälter.

Vor Gebrauch den Aufkleber an der Perforation abreißen, ohne dabei die Barcodierung zu beschädigen. Die Folie von der Oberseite des Containers entfernen. Den Schiebedeckel nach unten in die Führung des Reagenziendeckels einrasten lassen.

Vitamin B12-Kalibratoren (LVBL, LVBH)

Zwei Flaschen (niedrig und hoch) mit lyophilisiertem Vitamin B12 in einer humanen Proteinmatrix, mit Konservierungsmittel. Fläschchen mit je **4,0 ml** sterilem destilliertem Wasser rekonstituieren. Zum Mischen leicht schwenken oder umdrehen. Bei 2–8°C für 30 Tage nach der Rekonstitution, oder für 6 Monate (aliquotiert) bei –20°C haltbar.

L2KVB2: 2 Sets.

L2KVB6: 3 Sets.

Vor der Kalibrierung die entsprechenden Aufkleber (dem Kit beiliegend) auf die Röhrchen kleben, so daß die Barcodes vom Barcodereader des Systems gelesen werden können.

Separat erhältliche Testsystem-Komponenten

Vitamin B12/Folsäure Probenverdünner (L2FVZ)

Zum automatischen Verdünnen der Patientenproben Enthält 25 mL einer konzentrierten (gebrauchsfertig), Vitamin B12/Folsäure-freien humanen Proteinmatrix, mit Konservierungsmittel. Stabil bei 2–8°C für 30 Tage nach Öffnen, oder für 6 Monate (aliquotiert) bei –20°C.

Zum Einsatz des Verdünnungsreagenz (Diluents) werden Barcode Etiketten mitgeliefert. Vor Verwendung ein entsprechendes Etikett so auf ein

16x100 mm Teströhrchen kleben, dass es vom eingebauten Barcode Reader gelesen werden kann.

L2FVZ: 3 Etiketten

L2SUBM: Chemilumineszenz-Substratmodul

L2PWSM: Waschmodul

L2KPM: Reinigungsmodul

LRXT: (Wegwerf-) Reaktionsgefäße

L2ZT: 250 Teströhrchen (16 x 100 mm) für die Probenverdünnung

L2ZC: 250 Röhrchenverschlüsse für die Probenverdünnung

CON6: 3 Konzentrationen, Multikontrolle.

Ebenfalls benötigt

Destilliertes bzw. deionisiertes Wasser; Teströhrchen; Kontrollen.

Testdurchführung

Für eine optimale Funktion des Gerätes ist unbedingt zu beachten, dass die Wartungen, wie im IMMULITE 2000-Handbuch beschrieben, regelmäßig durchgeführt werden.

Hinweise zur Vorbereitung, täglichen Inbetriebnahme des Systems, der Kalibrierung sowie Verfahren zur Test- und Qualitätskontrolle entnehmen Sie bitte dem IMMULITE 2000-Handbuch.

Beachten Sie, dass zur Durchführung dieses Tests beide Reagenzbehälter (A [L2VBA2] und D [L2VBD2]) auf das Karussell geladen werden müssen.

Empfohlenes Kalibrationsintervall: 2 Wochen.

Proben zur Qualitätskontrolle: Kontrollen oder Poolseren mit Vitamin B12 in zumindest zwei Konzentrationen (niedrige und hohe) verwenden.

Referenzwerte

Serumproben von 147 nachweislich gesunden Männern und Frauen wurden mit dem IMMULITE 2000 Vitamin B12 Assay bestimmt. Die nichtparametrische Analyse ergab einen Median von 432 pg/ml (319 pmol/l) und einen zentralen 95% Bereich von

193 – 982 pg/ml (142 – 725 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.

Blockierende Antikörper spezifisch gegen Intrinsic Faktor findet man bei mehr als der Hälfte aller Patienten mit perniziöser Anämie. Um Vitamin B12 Spiegel in solchen Proben exakt zu bestimmen, ist es erforderlich diese Antikörper zu inaktivieren. Während man zeigen konnte, dass alkalische Hydrolyse bei der Inaktivierung hoher Titer Intrinsic Factor blockierender Antikörper effektiv eingesetzt werden kann, kann die Möglichkeit, dass diese Antikörper nicht vollständig inaktiviert werden, besonders in seltenen Proben mit extrem hohen Titern dieser Antikörper, nicht vollständig ausgeschlossen werden. Sollten Testergebnisse im Widerspruch zur klinischen Untersuchung, Krankengeschichte des Patienten oder anderen Daten stehen, so sollte eine solche Probe auf Intrinsic Faktor-blockierende Antikörper getestet werden. Ein Serumpool, speziell ausgewählt nach hohen Titern Intrinsic Factor blockierender Antikörper, kann ebenfalls in die Routine-Qualitätskontrolle dieses Assays miteingebunden werden, um spezifisch die Inaktivierung dieser Antikörper während des Vorbehandlungsschrittes zu überprüfen.

Heterophile Antikörper in Humansenen können mit Immunglobulinen aus den Assaykomponenten reagieren und Interferenzen innerhalb des in vitro Immunoassays verursachen. (Clin. Chem. 1988;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 einzelnen 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 in pg/ml angegeben. (Alle Daten wurden – sofern nicht anders angegeben – aus Serumproben in Röhrchen ohne Gelbarrieren oder gerinnungsfördernden Zusätzen ermittelt.)

Umrechnungsfaktor:

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

Messbereich: 150 – 1 000 pg/ml
(111 – 738 pmol/l)

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

Intraassay-Präzision: Die Bestimmung der intraassay-Präzision erfolgte in einem einzelnen Testansatz mit 20 Einzelmessungen (siehe Tabelle „Intraassay Precision“).

Interassay-Präzision: Die Bestimmung der interassay-Präzision erfolgte in 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 wurden mit drei unterschiedlichen Vitamin B12-Lösungen (2 000, 4 500 und 7 500 pg/ml) 1:19 versetzt. (Repräsentative Daten entnehmen Sie bitte der Tabelle „Recovery“.)

Spezifität: Der verwendete Antikörper ist hochspezifisch für Vitamin B12 (siehe Tabelle „Specificity“).

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 417 mg/dl keinen Einfluss auf die Ergebnisse, der größer als die Impräzision des Assays selbst ist.

Lipämie: Triglyceride hat in Konzentrationen bis zu 4 000 mg/dl keinen Einfluss auf die Ergebnisse, der größer als die Impräzision des Assays selbst ist.

Alternativer Probentyp: Die Blutentnahme muß in Serumröhrchen-, heparinisierte-, und Becton Dickinson SST[®] Vacutainer erfolgen. EDTA-Plasma ist nicht geeignet. Es wurde folgende lineare Regression ermittelt:

(Heparin) = 0,96 (Serum) + 6 pg/ml
r = 0,995

(SST) = 0,92 (einfachen Röhrchen) + 46 pg/ml
r = 0,988

Mittelwerte:

459 pg/ml (Serum)

467 pg/ml (SST)

448 pg/ml (Heparin)

Methodenvergleich: Der Assay wurde anhand von 153 Patientenproben mit dem IMMULITE Vitamin B12 Assay von DPC verglichen (Konzentrationsbereich: ca. 152 – 982 pg/ml, siehe Grafik). Durch lineare Regression:

(IML 2000) = 0,91 (IML) – 16,4 pg/ml
r = 0,913

Mittelwerte:

413 pg/ml (IMMULITE 2000)

471 pg/ml (IMMULITE)

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 2000 Vitamina B12

Utilidad del análisis: Para diagnóstico *in vitro* usado con el Analizador IMMULITE 2000, para la cuantificación de Vitamina B12 en suero o plasma heparinizado, como ayuda en el diagnóstico clínico y tratamiento de la anemia.

Referencia: **L2KVB2** (200 tests),
L2KVB6 (600 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

megaloblastica 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 factor 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 Test

IMMULITE 2000 Vitamina B12 es un ensayo de inmunoenzimología en fase sólida, competitivo y quimioluminiscente que conlleva un proceso de desnaturalización proteica.

IMMULITE 2000 realiza un ciclo de tratamiento de la muestra de suero o plasma del paciente con ditionitrito (DTT) y una solución de hidróxido de sodio/cianuro de potasio (NaOH/KCN) en un tubo de reacción que no contiene ninguna bola. Después de una incubación de 30 minutos, la muestra tratada es transferida a un segundo tubo de reacción que contiene una bola de poliestireno recubierta con Vitamina B12 y factor intrínseco porcino (HIF). Durante esta incubación de 30 minutos, la vitamina B12 se libera de las proteínas endógenas de unión debido al tratamiento de la muestra y compete con la vitamina B12 inmovilizada por la unión con el HIF. Entonces se introduce anti factor intrínseco porcino marcado con fosfatasa alcalina que se une a cualquier molécula de HIF que esté inmovilizada en la bola recubierta de B12 en la incubación final de 30 minutos. El conjugado de enzima no unida se elimina por lavado en la centrifugación. Se añade el sustrato y se continúa el procedimiento tal y como se describió en los inmunoensayos típicos en el Manual del Operador.

Ciclos de incubación: 3 x 30 minutos.
2 posiciones de análisis por ensayo. 1 posición para tratamiento de la muestra: 1 posición para la inmunoreacción.

Ciclo 1: Desnaturalización alcalina de las proteínas de unión endógenas.

Ciclo 2 & 3: Inmunoreacción.

Panel de Ácido fólico/Vitamina B12:

Para conseguir el máximo rendimiento del ensayo, deben ejecutarse alternativamente las muestras del paciente para ácido fólico y vitamina B12, comenzando con la muestra de ácido

fólico. Vea el Manual del Operador para crear el panel.

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.¹⁷

Aunque ni la bilirrubina ni la hemolisis 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 hemolisis puede indicar un tratamiento indebido de la muestra antes de su recepción en el laboratorio, por lo que los resultados deben interpretarse con cuidado.

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

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

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 2000 no ha sido analizado con todos los distintos tipos de tubos. Para obtener detalles sobre los tipos de tubos que se han analizado, consulte la sección de Tipos de Muestras Alternativas.

Volumen de Muestra: 75 µl de suero o en plasma heparinizado.

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.

Advertencias y precauciones

Para uso diagnóstico *in vitro*.

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

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 sódica, 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 explosivas, en las cañerías 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).

NaOH/KCN: La solución contiene cianuro. Evite cualquier contacto con la superficie corporal.

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 incluidas en la caja son necesarias para el ensayo.

Cartucho de bolas de Vitamina B12 (L2VB12)

Con códigos de barras. 200 bolas, recubiertas con análogo de vitamina B12. Estable a 2-8°C hasta la fecha de caducidad.

L2KVB2: 1 cartucho.
L2KVB6: 3 cartuchos.

Vial de reactivo "A" de Vitamina B12 (L2VBA2)

Con códigos de barras. Cuñas de reactivo (etiquetados como "A") que contienen cada una 15 ml de ditionitriol (DTT), en

solución tampón, y 15 ml de una solución de NaOH/KCN (NHCN) tamponada, con conservante. Antes de abrir, poseen una estabilidad a 2–8°C hasta la fecha de caducidad. Después de abrir, estables a 2–8°C por 30 días.

L2KVB2: 3 viales.

L2KVB6: 6 viales.

Antes de usar, desprecintar la parte superior de la etiqueta en la perforación, sin dañar el código de barras. Quitar el precinto del orificio del vial; encajar la cubierta deslizante en las rampas de la tapa del reactivo.

Vial de reactivo “D” de Vitamina B12 (L2VBD2)

Con códigos de barras. Cuñas (etiquetadas como “D”), que contienen cada un 11,5 ml de fosfatasa alcalina (de intestino de ternera) conjugada a un anticuerpo monoclonal murino anti-factor intrínseco de cerdo, en una solución tampón. 11,5 ml de proteína de unión a vitamina B12 (factor intrínseco purificado de cerdo), en solución tampón, con conservante. Estable a 2–8°C hasta la fecha de caducidad.

L2KVB2: 1 vial.

L2KVB6: 3 viales.

Antes de usar, desprecintar la parte superior de la etiqueta en la perforación, sin dañar el código de barras. Quitar el precinto del orificio del vial; encajar la cubierta deslizante en las rampas de la tapa del reactivo.

Ajustadores de Vitamina B12 (LVBL, LVBH)

Dos viales, Bajo y alto (bajo y alto), de Vitamina B12 liofilizada en una matriz de proteína humana, con conservante. Reconstituir cada vial añadiendo **4,0 ml** de agua destilada estéril. Mezcle por agitación o inversión suave. Estable a 2–8°C durante 30 días después de la reconstitución, o hasta 6 meses (alícuotados) a –20°C.

L2KVB2: 2 juegos.

L2KVB6: 3 juegos.

Antes de hacer un ajuste, colocar las etiquetas a las alícuotas apropiadas (suministradas con el kit) sobre tubos de ensayo, de forma tal que los códigos de barras puedan ser leídos por el lector.

Componentes del kit que se suministran por separado

Diluyente para muestras de Vitamina B12/Acido Fólico (L2FVZ)

Para la dilución de las muestras del paciente que van a analizarse. 25 ml de diluyente concentrado (listo para usar) en una matriz proteica humana libre de vitamina B12/Acido fólico con conservante. Estable a 2–8°C durante 30 días después de abrir, o hasta 6 meses (alícuotados) a –20°C.

Se suministran etiquetas con códigos de barras para usarse con este diluyente. Antes de uso, colocar la etiqueta con el código de barras en un tubo de ensayo de 16 x 100 mm, así los códigos de barras pueden ser identificados por el lector del instrumento.

L2FVZ: 3 etiquetas

L2SUBM: Substrato quimioluminiscente

L2PWSM: Lavado de sonda

L2KPM: Kit de limpieza de sonda

LRXT: Tubos de reacción (desechables)

L2ZT: 250 Tubos De Prueba Del Diluyente De la Muestra (16 x 100 mm)

L2ZC: 250 Taponos Del Tubo Del Diluyente De la Muestra

CON6: control multiparamétrico de tres niveles.

También necesarios

Agua destilada o desionizada, tubos de muestras, controles.

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 2000.

Consultar el Manual del operador de IMMULITE 2000 para: la preparación, instalación, ajuste, ensayo y procedimientos de control de calidad.

Tener en cuenta que hay que cargar los viales de reactivos A (L2VBA2) y D (L2VBD2) en el carrusel para ejecutar este ensayo.

Intervalo de ajuste recomendado: 2 semanas.

Muestras de Control de calidad: Usar controles o pools de suero con dos

niveles diferentes, como mínimo, de vitamina B12 (bajo y alto).

Valores esperados

Fueron procesadas muestras de suero de 147 voluntarios hombres y mujeres sanos con el ensayo de IMMULITE 2000 Vitamina B12. El análisis no paramétrico mostró una media de 432 pg/ml (319 pmol/l) y un rango central al 95% de:

193 – 982 pg/ml (142 – 725 pmol/l).

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

Limitaciones

El plasma EDTA no está recomendado para su uso.

Los anticuerpos bloqueantes específicos del factor intrínseco se encuentran presentes en más de la mitad de los pacientes con anemia perniciosa. Para poder medir con precisión los niveles de vitamina B12 en estas muestras es necesario inactivar estos anticuerpos. Aunque la hidrólisis alcalina ha demostrado su efectividad a la hora de inactivar los elevados títulos de anticuerpos bloqueantes del factor intrínseco que puedan estar presentes, no se puede olvidar la posibilidad de que estos anticuerpos no sean del todo inactivados en alguna muestra rara, especialmente en las muestras con títulos extremadamente elevados de estos anticuerpos. Cuando los resultados obtenidos estén en discordancia con los datos clínicos, la historia médica del paciente u otros datos, la muestra debe testarse para los anticuerpos bloqueantes del factor intrínseco. Se puede usar un pool de muestras seleccionadas con elevados títulos de anticuerpos bloqueantes del factor intrínseco como control de calidad del ensayo para seguir específicamente la inactivación de estos anticuerpos durante el paso de pretratamiento.

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 1988;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

Rango informable: 150 – 1 000 pg/ml (111 – 738 pmol/l)

Sensibilidad Analítica: 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 20 replicados en una sola tanda. (Véase la tabla "Intraassay Precision").

Precisión interensayo (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 tres soluciones de vitamina B12 (2 000, 4 500 y 7 500 pg/ml). (Ver la tabla "Recovery" para resultados representativos).

Especificidad: El anticuerpo es altamente específico para vitamina B12. (Véase la tabla "Specificity").

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 417 mg/dl, no tienen ningún efecto sobre los resultados en términos de precisión.

Lipemia: La presencia de triglicéridos en concentraciones hasta 4 000 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 en tubos Vacutainers sin anticoagulante, en tubos Vacutainers heparinizados y en tubos vacutainer SST® de Becton Dickinson. El plasma EDTA no está recomendado para su uso. Por regresión lineal:

(Heparina) = 0,96 (Suero) + 6 pg/ml
r = 0,995

(SST) = 0,92 (tubos simples) + 46 pg/ml
r = 0,988

Medias:
448 pg/ml (Heparina)
467 pg/ml (SST)
459 pg/ml (Suero)

Comparación de los métodos: El ensayo se ha comparado con el de Vitamina B12 IMMULITE de DPC en 153 muestras de pacientes. (Intervalo de concentración: aproximadamente 152 a 982 pg/ml. Véase el gráfico). Por regresión lineal:

(IML 2000) = 0,91 (IML) – 16,4 pg/ml
r = 0,913

Medias:
413 pg/ml (IMMULITE 2000)
471 pg/ml (IMMULITE)

Asistencia técnica

Contacte con su Distribuidor Nacional.

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

Français

IMMULITE 2000 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 2000 et constitue une aide au diagnostic clinique et au traitement de l'anémie.

Référence catalogue :
L2KVB2 (200 tests), **L2KVB6** (600 tests)

Code produit : **VB** Code couleur : **Violet**

Introduction

La vitamine B12 (Cobalamine) et l'acide folique sont essentiels à l'hématopoïèse.⁶ L'anémie mégalo-blastique 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 2000 Vitamine B12 est un immunodosage en phase solide par compétition utilisant une technologie de chimiluminescence enzymatique et comprenant une procédure automatisée de dénaturation alcaline.

L'IMMULITE 2000 réalise un seul cycle de traitement de l'échantillon clinique de sérum ou de plasma additionné de dithiothréitol (DTT) et d'une solution de soude/ cyanure de potassium (NaOH/ KCN), dans un tube à essai ne contenant aucune bille. Au terme de 30 minutes d'incubation, l'échantillon traité est transféré dans un second tube de réaction contenant une bille de polystyrène revêtue de vitamine B12 et un facteur intrinsèque de porc (FI). Lors des 30 minutes d'incubation suivantes, la vitamine B12 libérée par les protéines porteuses endogènes pendant le pré-traitement de l'échantillon entre en compétition avec la vitamine B12 immobilisée aux fins de fixation au FI de porc. L'anticorps anti FI de porc marqué à la phosphatase alcaline est ensuite introduit et se lie à n'importe

quel FI de porc qui est immobilisé sur la bille revêtue de vitamine B12, au cours des 30 dernières minutes d'incubation. Le conjugué enzymatique non-lié est éliminé par un lavage accompagné de centrifugation. Le substrat est ajouté et le protocole est poursuivi comme expliqué dans le manuel d'utilisation pour les immunodosages habituels.

Cycles d'incubation : 3 x 30 minutes.
2 emplacements par dosage : 1 cupule pour le traitement de l'échantillon ; 1 cupule pour la réaction immunologique.

Cycle 1 : dénaturation alcaline des protéines porteuses endogènes.

Cycles 2 & 3 : réaction immunologique.

Panel acide folique/ vitamine B12 : pour une meilleure cadence, passer les échantillons pour l'acide folique et la vitamine B12 alternativement, en commençant par un échantillon acide folique. Se reporter au manuel d'utilisation pour la création d'un panel.

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.¹⁷

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

Il est recommandé de clarifier les échantillons lipémiques par ultracentrifugation.

Comme l'EDTA a un effet significatif sur les résultats, il ne doit pas être utilisé comme anticoagulant.

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 2000 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 : 75 µl de sérum ou de plasma hépariné.

Conditions de 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.

Précautions d'emploi

Réservé à un usage diagnostique *in vitro*.

Réactifs : Conserver les réactifs à +2°C/+8°C. Éliminer les déchets conformément aux lois en vigueur.

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-HCV 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.

NaOH/ KCN : la solution contient du cyanure. Éviter tout contact avec la peau.

Substrat chimiluminescent : éviter les contaminations 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.

Cartouche de billes Vitamine B12 (L2VB12)

Avec code-barres. 200 billes revêtues d'un analogue de la vitamine B12. Stable à +2°C/+8°C jusqu'à la date de péremption.

L2KVB2: 1 cartouche.

L2KVB6: 3 cartouches.

Cartouche-Réactif « A » Vitamine B12 (L2VBA2)

Avec code-barre. Cartouches (étiquetée "A"), contenant chacune 15 ml de dithiothréitol (DTT) dans un tampon ; 15 ml de NaOH/ KCN (NHCN) dans un tampon, avec conservateur. Avant ouverture, stable à +2°C/+8°C jusqu'à la date d'expiration. *Après ouverture*, stable à +2°C/+8°C pendant 30 jours.

L2KVB2: 3 cartouches.

L2KVB6: 6 cartouches.

Avant l'emploi, retirer la partie supérieure de l'étiquette au niveau des perforations en ayant soin de ne pas endommager le code-barres. Retirer le film protecteur situé sur la partie supérieure de la cartouche-réactif ; insérer le couvercle coulissant entre les glissières sur le dessus de la cartouche-réactif.

Cartouche-Réactif « D » Vitamine B12 (L2VBD2)

Avec code-barre. Cartouches (étiquetées "D"), contenant 11,5 ml d'anticorps monoclonal murin anti-facteur intrinsèque de porc marqué à la phosphatase alcaline dans un tampon. 11,5 ml de protéine de liaison de la vitamine B12 (facteur intrinsèque de porc purifié) dans un tampon, avec conservateur. Stable à +2°C/+8°C jusqu'à la date de péremption.

L2KVB2: 1 cartouche.

L2KVB6: 3 cartouches.

Avant l'emploi, retirer la partie supérieure de l'étiquette au niveau des perforations

en ayant soin de ne pas endommager le code-barres. Retirer le film protecteur situé sur la partie supérieure de la cartouche-réactif ; insérer le couvercle coulissant entre les glissières sur le dessus de la cartouche-réactif.

Ajusteurs Vitamine B12 (LVBL, LVBH)

2 flacons « Haut » et « Bas » lyophilisés de vitamine B12 dans une matrice protéique humaine, avec conservateur. Reconstituer chaque flacon avec **4,0 ml** d'eau distillée ou désionisée. Mélanger doucement. Stable à +2°C/+8°C pendant 30 jours après reconstitution ou 6 mois (aliquoté) à -20°C.

L2KVB2: 2 jeux.

L2KVB6: 3 jeux.

Avant de procéder à un ajustement, placer les étiquettes correspondant à l'aliquot (fournies avec le coffret) sur des tubes en verre de sorte que les code-barres soient lisibles par le lecteur.

Composants du coffret fournis séparément

Diluant échantillon acide folique/ vitamine B12 (L2FVZ)

Pour la dilution à bord des échantillons de patients. 25 ml d'une matrice protéique humaine concentrée (prête à l'emploi), sans vitamine B12 ni acide folique avec conservateur. Stable à +2°C/+8°C pendant 30 jours après ouverture ou 6 mois (aliquoté) à -20 °C.

Les étiquettes code-barres sont fournies avec le Diluant. Avant utilisation, placer l'étiquette appropriée sur un tube de 16X100 mm de façon que le code-barre puisse être lu par le lecteur de l'appareil.

L2FVZ: 3 étiquettes

L2SUBM : Substrat chimiluminescent

L2PWSM : Solution de lavage

L2KPM : Coffret de décontamination de l'aiguille de prélèvement

LRXT : Godets réactionnels (jetables)

L2ZT: 250 Tubes À essai De Diluant échantillon (16 x 100 mm)

L2ZC: 250 Bouchons pour tubes de diluants

CON6 : Contrôle multiparamétrique à trois niveaux

Egalement requis
Eau distillée ou désionisée ; tubes ;
contrôles

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 IMMULITE 2000.

Se reporter au manuel d'utilisation de l'IMMULITE 2000 pour : la préparation, le démarrage du système, les ajustements, le dosage et les procédures de contrôle de qualité.

Noter que les deux cartouches de réactif A (L2VBA2) et D (L2VBD2) doivent être placées sur le carrousel pour réaliser ce dosage.

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 de référence

Des échantillons sériques provenant de 147 hommes et femmes apparemment en bonne santé ont été dosés avec le test IMMULITE 2000 Vitamine B12. L'analyse non paramétrique a donné une valeur médiane de 432 pg/ml (319 pmol/l) et un domaine centré à 95 % de

193 – 982 pg/ml (142 – 725 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 bloquants spécifiques du facteur intrinsèque sont présents chez plus de la moitié des patients atteints d'anémie pernicieuse. Pour calculer le taux exact de vitamine B12 dans de tels échantillons, il est nécessaire d'inactiver ces anticorps. Même si l'hydrolyse alcaline a démontré son efficacité dans l'inactivation des titres élevés des anticorps bloquants spécifiques du facteur intrinsèque, la possibilité que ces

anticorps ne soient pas totalement inactivés dans certains rares échantillons, spécialement des échantillons ayant des titres extrêmement élevés de ces anticorps, ne peut être exclue. Lorsque les résultats obtenus sont en contradiction avec l'examen clinique, l'histoire médicale du patient ou avec d'autres résultats, les anticorps bloquants spécifiques du facteur intrinsèque doivent être recherchés dans l'échantillon. Un pool d'échantillons sélectionnés pour leur titre élevé d'anticorps bloquants spécifiques du facteur intrinsèque peut être également intégré dans le contrôle de qualité de routine de ce dosage afin de surveiller spécifiquement l'inactivation de tels anticorps durant l'étape de prétraitement.

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 1988;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 rares 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 de ce test. Les résultats sont donnés en pg/ml. (En l'absence d'indication contraire, tous les résultats ont été obtenus avec des échantillons sériques prélevés sur tubes, sans gel ni activateur de la coagulation).

Facteur de conversion :
pg/ml \times 0,7378 \rightarrow pmol/l

Domaine de mesure : 150 – 1 000 pg/ml
(111 – 738 pmol/l)

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

Précision intra-essai : les valeurs ont été établies pour 4 échantillons à partir de 20 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 : des échantillons ont été dosés à différentes dilutions. (Voir le tableau « Linearity » pour des données représentatives.)

Récupération : des échantillons dosés ont été chargés dans une proportion de 1 à 19 avec trois solutions de vitamine B12 (2 000, 4 500 et 7 500 pg/ml). (Voir le tableau « Recovery » pour des données représentatives.)

Spécificité : l'anticorps utilisé est hautement spécifique de la vitamine B12. (Voir le tableau « Specificity ».)

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 417 mg/dl.

Lipémie : La présence de lipémie ne présente aucun effet sur les résultats ni sur la précision du dosage si la concentration ne dépasse pas 4 000 mg/dl.

Autres types d'échantillons: les échantillons ont prélevés sur tubes vacutainer secs et héparinés et sur tubes en plastique avec gel séparateur (SST[®]). L'utilisation du plasma EDTA est déconseillée. Par régression linéaire :

(Héparine) = 0,96 (Sérum) + 6 pg/ml
r = 0,995

(SST) = 0,92 (tubes ordinaires) + 46 pg/ml
r = 0,988

Moyennes:
448 pg/ml (Héparine)
467 pg/ml (SST)
459 pg/ml (Sérum)

Comparaison de méthode: Le test a été comparé au test IMMULITE Vitamine B12 de DPC sur 153 sérums de patients (dont

les concentrations allaient de 152 à 982 pg/ml. Voir le graphique.) Par régression linéaire :

(IML 2000) = 0,91 (IML) – 16,4 pg/ml
r = 0,913

Moyennes:

413 pg/ml (IMMULITE 2000)
471 pg/ml (IMMULITE)

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 2000 VITAMINA B12

Uso: Ad uso diagnostico *in vitro* con l'analizzatore IMMULITE — per la determinazione quantitativa della Vitamina B12 nel siero o nel plasma eparinizzato, quale ausilio nella diagnosi e nel trattamento dell'anemia.

Numero di Codice: **L2KVB2** (200 test),
L2KVB6 (600 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 nei 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 anormali.² Per questo motivo, livelli circolanti bassi di vitamina B12 possono presentarsi in carenza di vitamina B12 in cui il livello di

transcobalamina 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 transcobalamina 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 situazione.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 perniciosa, una condizione caratterizzata dall'assenza o quasi assenza del fattore intrinseco.⁶ Siccome circa i due terzi di tutti i pazienti affetti da anemia perniciosa 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 perniciosa. 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, malattie mieloproliferative (leucemia mielogena cronica come caso particolare) e l'uso di integratori multi-vitaminici.

Principio del Dosaggio

Il dosaggio IMMULITE 2000 Vitamina B12 è un dosaggio immunoenzimatico competitivo in fase solida ed in chemiluminescenza che comporta una procedura automatizzata di denaturazione alcalina.

L'IMMULITE 2000 compie un trattamento ad un ciclo del campione di siero o di plasma con ditiotreitolo (DTT) e con cianuro di potassio o idrossido di sodio (NaOH/KCN), in una provetta di reazione che non contiene la sferetta. Dopo

un'incubazione di 30 minuti il campione trattato viene trasferito in una seconda provetta di reazione contenente una sferetta di polistirene coattata con vitamina B12 e fattore intrinseco di suino (HIF). Durante questo ulteriore periodo di incubazione di 30 minuti, la vitamina B12 rilasciata dalle proteine leganti endogene durante il trattamento del campione compete con la vitamina B12 immobilizzata per il legame con HIF. Viene quindi introdotto il fattore intrinseco anti-suino marcato con fosfatasi alcalina in grado di legarsi a qualsiasi HIF immobilizzato sulla sferetta coattata con B12 nell'ultima incubazione di 30 minuti. Il coniugato enzimatico non legato viene rimosso mediante centrifugazione. Viene aggiunto il substrato e la procedura continua come descritto per gli altri immunodosaggi nel Manuale dell'Operatore.

Cicli d'incubazione: 3 x 30 minuti.
2 posizioni per dosaggio: 1 vassoio per il trattamento dei campioni; 1 vassoio di reazione.

Ciclo 1: Denaturazione alcalina delle proteine endogene leganti.

Ciclo 2 & 3: Immunoreazione.

Pannello dell'acido folico / Vitamina B12: Per ottenere la massima cadenza analitica, le analisi dei campioni per l'acido folico e la vitamina B12 devono essere eseguite alternativamente iniziando con il campione dell'acido folico. Vedi manuale dell'operatore per la creazione di un pannello.

Prelievo dei Campioni

Nota: Se il campione viene testato per la vitamina B12 e l'acido folico, il paziente deve essere a digiuno.¹⁷

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 dell'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.

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

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

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 2000 Vitamina B12 non è stato verificato con tutte le possibili variazioni di tipi di provette. Consultare la sezione riguardante i Campioni Alternativi per dettagli sulle provette testate.

Volume richiesto: si richiedono 75 µL di siero o plasma eparinizzato.

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

Avvertenze e Precauzioni

Ad uso diagnostico *in vitro*.

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

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

NaOH/KCN: La soluzione contiene cianuro. Evitare il contatto con il corpo.

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 unico set. Le etichette all'interno della confezione sono necessarie per eseguire i dosaggi.

Contenitore di sferette Vitamina B12 (L2VB12)

con codice a barre. 200 sferette coattate con l'analogo della vitamina B12. Stabile a 2–8°C fino alla data di scadenza.

L2KVB2: 1 confezione.

L2KVB6: 3 confezioni.

Porta Reagente Vitamina B12 "A" (L2VBA2)

Con codice a barre. Porta reagenti (etichettati "A"), ciascuno contenente 15 mL di ditiotreitolo (DTT) in un tampone. 15 mL di una soluzione di NaOH/KCN (NHCN) in un tampone, con conservanti. Prima dell'apertura è stabile a 2–8°C fino alla data di scadenza. Dopo l'apertura, è stabile a 2–8°C per 30 giorni.

L2KVB2: 3 porta reagenti.

L2KVB6: 6 porta reagenti.

Prima dell'utilizzo rimuovere la parte superiore dell'etichetta lungo la perforazione senza danneggiare il codice a barre. Togliere il foglio protettivo dalla parte superiore del flacone. Far scattare nella corretta posizione il coperchio scorrevole lungo le guide del coperchio del reagente.

Porta Reagente Vitamina B12 "D" (L2VBD2)

Con codice a barre. Porta campioni (etichettati "D"), contenenti 11,5 mL di fosfatasi alcalina (intestino di vitello) coniugata con un anticorpo monoclonale murino anti-fattore intrinseco di maiale, in un tampone. 11,5 mL di proteina legante la vitamina B12 (fattore intrinseco porcino purificato) in un tampone, con conservanti. Stabile a 2–8°C fino alla data di scadenza.

L2KVB2: 1 porta reagente.

L2KVB6: 3 porta reagenti.

Prima dell'utilizzo rimuovere la parte superiore dell'etichetta lungo la perforazione senza danneggiare il codice a barre. Togliere il foglio protettivo dalla parte superiore del flacone. Far scattare nella corretta posizione il coperchio scorrevole lungo le guide del coperchio del reagente.

Calibratori Vitamina B12 (LVBL, LVBH)

Due flaconi (uno Basso ed uno 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. Stabile a 2–8°C per 30 giorni dopo la ricostituzione, o per 6 mesi (aliquotato) a –20°C.

L2KVB2: 2 set.

L2KVB6: 3 set.

Prima di ricalibrare collocare le etichette giuste sulle provette delle aliquote (fornite col kit) cosicché i codici a barre possano essere registrati dal lettore.

Componenti del kit forniti separatamente

Diluyente della Vitamina B12/Acido Folico per campioni (L2FVZ)

Per la diluizione interna dei campioni dei pazienti. 25 mL di una matrice umana a base proteica (pronta all'uso) concentrata priva di vitamina B12/acido folico con conservanti. Stabile a 2–8°C per 30 giorni dopo l'apertura, o per 6 mesi (aliquotata) a –20°C.

Vengono fornite le provette da utilizzarsi con il diluente. Prima dell'utilizzo, collocare un'etichetta appropriata su una provetta 16 x 100 mm cosicché i codici a barre possano essere letti dal lettore interno

L2FVZ: 3 etichette

L2SUBM: Substrato Chemiluminescente

L2PWSM: Tampone di Lavaggio dell'Ago

L2KPM: Kit di Pulizia dell'Ago

LRXT: Tubi di Reazione (monouso)

L2ZT: 250 Provette (16 x 100 mm) per

Diluente del Campione

L2ZC: 250 Tappini per Provette per

Diluente del Campione

CON6: Controllo multi-costituito a tre livelli

Materiali richiesti
Acqua distillata o deionizzata; provette di vetro; controlli.

Prestazioni del Dosaggio

Attenzione: per prestazioni ottimali, è importante effettuare le procedure di manutenzione di routine cosiccome definite nel Manuale dell'Operatore IMMULITE 2000.

Consultare il Manuale d'Uso dello strumento IMMULITE 2000 per: preparazione, messa a punto, diluizioni, calibrazione, dosaggi e procedure di controllo di qualità.

E' importante notare che i due porta reagenti A (L2VBA2) e D (L2VBD2) devono essere caricati sul carosello per eseguire questo dosaggio.

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 147 volontari, uomini e donne in apparente buono stato di salute sono stati processati con il dosaggio IMMULITE 2000 Vitamina B12. L'analisi non parametrica ha prodotto un valore mediano di 432 pg/mL (319 pmol/L) ed un range centrale 95% di 193 – 982 pg/mL (142 – 725 pmol/L).

Considerare questi valori soltanto come *linee guida*. Ogni laboratorio dovrebbe stabilire il proprio range di riferimento.

Limiti

Non si consiglia di utilizzare plasma EDTA.

Gli anticorpi bloccanti specifici per il fattore intrinseco sono presenti in più della metà dei pazienti affetti da anemia perniciosa. Per misurare in maniera accurata i livelli di vitamina B12 in tali campioni è necessario inattivare tali anticorpi. Mentre l'idrolisi alcalina si è rivelata efficace nell'inattivazione di titoli elevati di anticorpi bloccanti il fattore intrinseco che potrebbero essere presenti, la possibilità che questi anticorpi non siano completamente inattivati in un campione

raro, specialmente in campioni con titoli molto elevati di questi anticorpi, non può essere esclusa. Quando i risultati ottenuti sono in contrasto con l'esame clinico, l'anamnesi del paziente ed altri test di laboratorio, il campione deve nuovamente essere testato per gli anticorpi bloccanti il fattore intrinseco. Un pool di campioni selezionati per il titolo elevato di anticorpi bloccanti il fattore intrinseco può essere inserito nella routine per il controllo di qualità di questo dosaggio per monitorare in maniera specifica l'inattivazione di tali anticorpi durante il pretrattamento.

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 1988;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 tavole 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 provette 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 Riferimento:
150 – 1 000 pg/mL (111 – 738 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 20 replicati in un'unica seduta (Vedi Tabella "Intraassay Precision").

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

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

Recupero: Sono stati dosati campioni 1:19 ai quali sono state aggiunte quattro soluzioni (2 000, 4 500 e 7 500 pg/mL) (Vedi Tabella "Recovery" per dati rappresentativi.)

Specificità: L'anticorpo è molto specifico per la Vitamina B12. (Vedi tabella "Specificity")

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 417 mg/dL non ha nessun effetto sui risultati entro il range di precisione del dosaggio.

Lipemia: La presenza di trigliceridi in concentrazioni fino a 4 000 mg/dL non ha nessun effetto sui risultati entro il range di precisione del dosaggio.

Tipo di campione alternativo: Sono stati dosati campioni prelevati in provette semplici, eparinizzate e Becton Dickinson vacutainer SST®. Non si consiglia di utilizzare plasma EDTA. Con regressione lineare:

(Eparina) = 0,96 (Siero) + 6 pg/mL
r = 0,995

(SST) = 0,92 (tubi semplici) + 46 pg/mL
r = 0,988

Valore Medio:
448 pg/mL (Eparina)
467 pg/mL (SST)
459 pg/mL (Siero)

Comparazione di metodi: Il dosaggio è stato comparato al dosaggio IMMULITE vitamina B12 della DPC in 153 campioni di siero dei pazienti. (Range di concentrazione: da 152 fino a 982 pg/mL. Vedi grafico.) Con regressione lineare:

(IML 2000) = 0,91 (IML) - 16,4 pg/mL
r = 0,913

Valore medio:
413 pg/mL (IMMULITE 2000)
471 pg/mL (IMMULITE)

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 da anemia, em conjunto com o Analisador IMMULITE 2000.

Números de catálogo:
L2KVB2 (200 testes),
L2KVB6 (600 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 circulantes 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 inactiva) fôr 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 inactiva 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 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) bem como o uso de suplementos multivitamínicos.

Princípio do procedimento

O kit de Vitamina B12 Immulite 2000 apresenta-se como um ensaio competitivo enzimático de fase -sólida, por quimioluminescência, que implica um procedimento automático de desnaturação alcalina.

O IMMULITE 2000 realiza um tratamento de amostra de ciclo único no soro ou plasma do paciente com ditioneitol (DTT) e uma solução de hidróxido de sódio/cianeto

de potássio (NãoH/KCN) num tubo de reacção sem esfera. Após uma incubação de 30 min, a amostra tratada é transferida para um segundo tubo de reacção com uma esfera de poliestireno revestida com vitamina B12 e factor intrínseco de porco (HIF). Durante os subsequentes 30 min de incubação, a vitamina B12 libertada das proteínas de ligação endógenas durante o tratamento da amostra compete com a vitamina B12 imobilizada por ligação com o HIF. Nos últimos 30 min de incubação, o anticorpo anti-HIF marcado com fosfatase alcalina é adicionado ligando-se a todo o HIF que esteja imobilizado na esfera revestida com B12. O conjugado de enzima não ligado é removido pela lavagem centrífuga. O substrato é adicionado e o procedimento continua como descrito para imunoenaios típicos no Manual do Operador.

Ciclos de incubação: 3 x 30 minutos. 2 posições de teste por ensaio: 1 cuvette de amostra de tratamento; 1 cuvette de imunoreacção.

Ciclo 1: Desnaturação alcalina das proteínas ligantes endógenas.

Ciclos 2 & 3: Imunoreacção

Painel de Acido Fólico / Vitamina B12:

Para alcançar a máxima rapidez de doseamento, as amostras de doentes para ácido fólico e vitamina B12 devem ser executadas alternadamente, começando por uma amostra de ácido fólico. Ver o Manual do Operador sobre como criar um painel.

Colheita

Nota: Na amostra analisada para vitamina B12 e ácido fólico, o doente deve estar em jejum.¹⁷

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.

Recomenda-se o uso de uma ultra centrífuga para clarear amostras lipémicas.

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

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 2000 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: 75 µL de soro ou plasma heparinizado.

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

Precauções

Para uso de diagnóstico in vitro.

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

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.

NãoH/KCN: Solução contém cianeto. Evite qualquer contacto corporais.

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

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.

Embalagem de pérolas de Vitamina B12 (L2VB12)

Com código de barras. Contém 200 esferas revestidas com análogo de vitamina B12. Estável até a data de validade a 2–8°C.

L2KVB2: 1 embalagem.

L2KVB6: 3 embalagens.

Embalagem de reagentes “A” de Vitamina B12 (L2VBA2)

Com código de barras. Embalagens rotuladas com “A” cada contendo 15 mL de ditiotreitól (DTT) tamponizado. Contém 15 mL de solução NaOH/KCN (NH₄CN) tamponizada, com conservante. Estável antes de abrir a 2–8°C até à data de expiração. Depois de abrir estável a 2–8°C por 30 dias.

L2KVB2: 3 embalagens.

L2KVB6: 6 embalagens.

Antes de utilizar, retire a parte superior da etiqueta na perfuração, sem danificar o código de barras. Remova o selo de alumínio do topo da embalagem, e encaixe a tampa deslizante nas rampas na tampa do reagente.

Embalagem de reagentes “D” de Vitamina B12 (L2VBD2)

Com código de barras. Embalagens rotuladas com “D” contendo, 11,5 mL de fosfatase alcalina (de intestino de vitela) conjugada a anti-factor intrínseco de porco monoclonal de rato tampoinizada. Contém 11,5 mL de proteína de ligação de vitamina B12 (factor intrínseco de

porco purificado) tamponizada, com conservante. Estável até a data de validade a 2–8 °C.

L2KVB2: 1 embalagem.

L2KVB6: 3 embalagens.

Antes de utilizar, retire a parte superior da etiqueta na perfuração, sem danificar o código de barras. Remova o selo de alumínio do topo da embalagem, e encaixe a tampa deslizante nas rampas na tampa do reagente.

Ajustes de Vitamina B12 (LVBL, LVBH)

Dois frascos (nível 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 por inversão ou movimentos completamente. Estável, após a reconstituição, durante 30 dias a 2–8°C, ou por 6 meses (aliquotado) a –20 °C.

L2KVB2: 2 conjuntos.

L2KVB6: 3 conjuntos.

Antes de realizar qualquer ajuste, coloque as etiquetas de alíquota apropriadas (fornecidas com o "kit") em tubos de amostra de forma que os códigos de barras possam ser lidos pelo dispositivo de leitura do aparelho.

Componentes do kit fornecidos separadamente

Diluyente de Amostra de Vitamina B12/ Acido fólico (L2FVZ)

Para a diluição no aparelho de amostras de doentes. 25 mL de concentrado, pronto a usar livre de vitamina B12/ acido fólico de origem humana numa matriz proteica, com conservante. Estável, após a abertura, durante 30 dias a 2–8°C, ou por 6 meses (aliquotado) a –20°C.

Etiquetas de código de barras são fornecidas para usar com o diluyente. Antes de usar, colocar a etiqueta apropriada num tubo de teste (16 x 100 mm) de modo a que o código de barras possa ser lido pelo dispositivo de leitura do aparelho.

L2FVZ: 3 etiquetas

L2SUBM: Substrato quimioluminescente

L2PWSM: Solução de lavagem

L2KPM: Kit de limpeza do pipetador

LRXT: Tubos de reacção (descartáveis)

L2ZT: 250 Tubos de diluyente da amostra

(16 x 100 mm)

L2ZC: 250 Tampas para tubos de diluyente da amostra

CON6: Controlo multiparamétrico de três níveis.

Também necessário:

Água destilada ou desionizada; tubos de amostra; controlos.

Procedimento de 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 2000.

Consulte o Manual do Operador de IMMULITE 2000 para para instruções sobre preparação, ajuste, doseamento e procedimentos de controlo de qualidade.

Repare que as Embalagens de Reagente A (L2VBA2) e D (L2VBD2) devem ser colocadas no carrossel dos reagentes para executar este doseamento.

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:

Amostras de soro de 147 adultos ,aparentemente saudáveis, homens e mulheres foram processados com o kit de Vitamina B12 do IMMULITE 2000. Estudos não parametrizados forneceram um valor médio de 432 pg/mL (319 pmol/L) e uma zona central de 95% de:

193 – 982 pg/mL (142 – 725 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.

Anticorpos bloqueantes específicos para factor intrínseco estão presentes em mais de metade de todos os pacientes com anemia perniciosa. Para se obterem

medidas exactas dos níveis de Vitamina B12 nestas amostras, é necessário inactivar estes anticorpos. Apesar da hidrólise alcalina ter mostrado ser efectiva na inactivação de títulos elevados de anticorpos bloqueantes de factor intrínseco, que possam estar presentes, a possibilidade destes anticorpos não serem totalmente inactivados em amostras raras, não pode ser excluída. Quando os resultados obtidos estiverem em conflito com o exame clínico, história clínica e outros elementos, a amostra deve ser testada para anticorpos bloqueantes do factor intrínseco. "Pools" de amostras seleccionadas por terem títulos elevados de anticorpos bloqueantes podem ser incorporadas no controlo de qualidade de rotina deste ensaio para monitorizar especificamente a inactivação destes anticorpos durante o pré-tratamento.

Os anticorpos heterófilos 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 1988;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 interacções 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:
pg/mL \times 0,7378 \rightarrow pmol/L

Zona de Trabalho: 150 – 1 000 pg/mL
(111 – 738 pmol/L).

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

Precisão Intra-ensaio (Entre ensaio):
Estatísticas foram calculadas para amostras dos resultados de 20 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 três soluções (2 000, 4 500, e 7 500 pg/mL) antes do doseamento. (Ver tabela de "Recovery" para dados representativos.)

Especificidade: O doseamento é específico para vitamina B12 (Ver tabela de "Specificity").

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 417 mg/dL não tem efeito em resultados, dentro da precisão do ensaio.

Lipémia: A presença de trigliceridos em concentrações até 4 000 mg/dL não tem efeito em resultados, dentro da precisão do ensaio.

Tipo de amostra alternativa: Amostras colhidas em tubos simples, heparinizados e SST[®] da Becton Dickinson de contenção a vácuo foram doseadas. O plasma EDTA não é recomendado para uso. Regressão linear:

(Heparina) = 0,96 (Soro) + 6 pg/mL
r = 0,995

(SST) = 0,92 (tubos simples) + 46 pg/mL
r = 0,988

Media:
448 pg/mL (Heparina)
467 pg/mL (SST)
459 pg/mL (Soro)

Comparação de Métodos:
O doseamento foi comparado à Vitamina B12 IMMULITE da DPC em 153 amostras

IMMULITE 2000 Vitamin B12 (PIL2KVB-22, 2006-04-18)

de soro. (Zona de trabalho:
aproximadamente 152 a 982 pg/mL. Vêr
gráfico.) Regressão linear:

(IML 2000) = 0,91 (IML) – 16,4 pg/mL
r = 0,913

Médias:

413 pg/mL (IMMULITE 2000)
471 pg/mL (IMMULITE)

Assistência Técnica:

Por favor contacte o seu Distribuidor
Nacional.

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

DPC®

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

2006-04-18

PIL2KVB – 22



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