

Dimension® EXL™ integrated chemistry system

LOCI® Module

Dimension® EXL™ 200, Dimension® EXL™ with LM Systems

Flex® reagent cartridge

VB12

See shaded sections: Updated information from 2019-05 version.

Issue Date 2020-08

LOCI Vitamin B12

Intended Use: The VB12 method is an *in vitro* diagnostic test for the quantitative measurement of vitamin B12 (B12) in human serum and plasma on the Dimension® EXL™ with LM integrated chemistry system. Measurements of vitamin B12 may be used in the diagnosis of vitamin B12 deficiency.

Summary: Vitamin B12, or cobalamin, is an essential vitamin with a molecular mass of 1355 Da that is found in a variety of foods such as fish, shellfish, meats and dairy products. Intrinsic factor (IF), transcobalamin II (TCII) and haptocorrin (HC) are binding proteins necessary for the assimilation, transport and delivery of B12 to the blood and body tissues. Vitamin B12 is primarily stored in the liver and released on demand. The body uses B12 very efficiently, reabsorbing B12 from the small intestine and returning it to the liver so little is excreted and nutritional deficiency is extremely rare.¹ Vitamin B12 is necessary for DNA synthesis, normal red blood cell maturation and myelin sheath formation and maintenance. It is a coenzyme in the conversion of methylmalonic acid to succinic acid and in the synthesis of methionine.¹

Vitamin B12 deficiency is one of the causes of megaloblastic anemia, a disease in which red blood cells are larger than normal and the ratio of nucleus size to cell cytoplasm is increased. Since folic acid deficiency can also cause megaloblastic anemia, measurement of serum B12 levels is an important part of the differential diagnosis.¹ Vitamin B12 deficiency also causes macrocytic anemias which are characterized by abnormal red blood cell maturation and early release from the bone marrow. Pernicious anemia is a macrocytic anemia. In this disease, an absence of IF prevents normal absorption of B12. In both megaloblastic anemia caused by B12 deficiency and pernicious anemia, treatment with B12 is the therapeutic course.¹

Vitamin B12 deficiency can also lead to abnormal neurologic and psychiatric symptoms such as ataxia, muscle weakness, dementia, psychosis and mood disturbances.² Many patients show neurological changes without developing macrocytic anemia. Populations at risk for B12 deficiency include strict vegetarians, the elderly and populations with increased B12 requirements associated with pregnancy, thyrotoxicosis, hemolytic anemia, hemorrhage, malignancy and liver or kidney disease.² Early diagnosis of B12 deficiency is crucial because of the latent nature of this disorder and the risk of irreversible neurological damage. Recent studies suggest that in addition to serum B12 levels, folic acid, methylmalonic acid and homocysteine should be measured to improve the specificity of the diagnosis.^{3,4,5} Elevated B12 levels are seen in hematological disorders (chronic myelogenous leukemia, promyelocytic leukemia, polycythemia vera) and in liver disorders (acute hepatitis, cirrhosis, hepatocellular carcinoma).^{2,6}

Principles of Procedure: The vitamin B12 method is a homogeneous, competitive chemiluminescent immunoassay based on LOCI® technology. LOCI® reagents include two synthetic bead reagents and biotinylated intrinsic factor (IF). The first bead reagent (Chemibead) is coated with a B12 derivative and contains a chemiluminescent dye. The second bead reagent (Sensibead) is coated with streptavidin and contains photosensitive dye. The patient sample is pretreated with sodium hydroxide (NaOH) and dithioerythritol (DTE) to release the serum B12 from its carrier proteins. Potassium cyanide (KCN) is added to convert all the forms of B12 into a single, cyanocobalamin form, and dicyanocobinamide is added to keep the B12 from rebinding with the carrier proteins. After the sample pretreatment, the biotinylated IF and Chemibead reagents are added sequentially to the reaction vessel. Vitamin B12 from the sample competes with the B12 Chemibead for a limited amount of biotinylated IF. Sensibead reagent is then added and binds to the biotin to form bead pair immunocomplexes. Illumination of the complex at 680 nm generates single oxygen from the Sensibeads which diffuses to the Chemibeads triggering a chemiluminescent reaction. The resulting signal is measured at 612 nm and is an inverse function of the concentration of vitamin B12 in the sample.^{7,8}

Reagents

Wells ^a	Form	Ingredient	Concentration ^b	Source
1	Liquid	VB12 Sensibead reagent	360 µg/mL	Recombinant <i>E. coli</i>
2	Liquid	VB12 Chemibead reagent	200 µg/mL	
3	Empty			
4	Liquid	Biotinylated IF	3 ng/mL	porcine
		Dicyanocobinimide	60 ng/mL	
5	Tablet	Dithioerythritol (DTE)	12.5 mg/mL	
6	Liquid	Sodium Hydroxide (NaOH)	0.75 N	
		Potassium Cyanide (KCN)	3 mM	
7 – 8	Empty			

a. Wells are numbered consecutively from the wide end of the cartridge.

b. Nominal value per well in a cartridge.

Risk and Safety



H290, H314, H317
P280, P301 + P310 + P331, P303 + P361 + P353 + P310,
P305 + P351 + P338, P390, P501

Danger!

May be corrosive to metals. Causes severe skin burns and eye damage. May cause an allergic skin reaction.



Wear protective gloves/protective clothing/eye protection/face protection. IF SWALLOWED: Immediately call a POISON CENTER or doctor/physician. Do NOT induce vomiting. IF ON SKIN (or hair): Remove/Take off immediately all contaminated clothing. Rinse skin with water/shower. Immediately call a POISON CENTER or doctor/physician. IF IN EYES: Rinse cautiously with water for several minutes. Remove contact lenses, if present and easy to do. Continue rinsing. Absorb spillage to prevent material damage. Dispose of contents and container in accordance with all local, regional, and national regulations.

Contains: Sodium hydroxide; 5-chloro-2-methyl-3(2H)-isothiazolone mixture with 2-methyl-3(2H)-isothiazolone

Safety data sheets (MSDS/SDS) available on siemens.com/healthcare

Precautions:

Used reaction vessels contain human body fluids; handle with appropriate care to avoid skin contact or ingestion. Reaction vessels are designed for single use only.

For *in vitro* diagnostic use.

Reagent Preparation: Hydrating, diluting and mixing are automatically performed by the Dimension® EXL™ system.

Store at: 2 – 8 °C

Expiration: Refer to carton for expiration date of individual unopened reagent cartridges. Sealed wells on the instrument are stable for 30 days.

Open Well Stability: 3 days for wells 1 – 2 and 4 – 6

Specimen Collection and Handling

Recommended specimen types: serum and plasma (lithium or sodium heparin, and EDTA).

Samples and controls stabilized with azide cannot be used.

Samples are stable at room temperature for up to 24 hours. Samples may be stored refrigerated at 2 – 8 °C for up to 48 hours. If testing is delayed beyond 48 hours, samples should be frozen at -20 °C or colder. Mix thoroughly after thawing. Avoid repeated freezing and thawing.⁹

Protect samples from light. Avoid using hemolyzed samples.⁹

Follow the instructions provided with your specimen collection device for use and processing.¹⁰

Complete clot formation should take place before centrifugation. Serum or plasma should be physically separated from cells as soon as possible with a maximum limit of two hours from the time of collection. Specimens should be free of particulate matter.¹¹

The purpose of specimen handling and storage information is to provide guidance to users; however, users may validate their own procedures for handling and storing patient samples.

Procedure**Materials Provided**

LOCI VB12 Flex® reagent cartridge, Cat. No. RF642

Materials Required But Not Provided

LOCI ANEMIA Calibrator, Cat. No. RC640

Reaction Vessels, Cat. No. RXV1

Reagent Probe Cleaner, Cat. No. RD702

Sample Probe Cleaner, Cat. No. RD703

Quality Control Materials

Test Steps

Sampling, reagent delivery, mixing, and processing are automatically performed by the Dimension® EXL™ System. For details of this processing, refer to your Dimension® EXL™ Operator's Guide.

Test Conditions

Sample Volume (delivered to the vessel)	12 µL
Extractant Reagent Volume	15 µL
DTE	12 µL
Biotinylated IF/Neutralizer Reagent Volume	50 µL
Chemibead Reagent Volume	15 µL
Sensibead Reagent Volume	50 µL
Temperature	37 °C
Reaction time	32 minutes
Wavelength	Illumination 680 nm, emission 612 nm
Type of measurement	Chemiluminescence

Calibration

Calibration Material LOCI ANEMIA Calibrator, Cat. No. RC640

Calibration Scheme Level 1, n = 5
Levels 2 – 5, n = 3

Units pg/mL [pmol/L]^c
(pg/mL x 0.7378) = [pmol/L]

Typical Calibration Levels
Level 1: 45 pg/mL [33 pmol/L]
Level 2: 200 pg/mL [148 pmol/L]
Level 3: 500 pg/mL [369 pmol/L]
Level 4: 1000 pg/mL [738 pmol/L]
Level 5: 2100 pg/mL [1549 pmol/L]

Calibration Frequency Every 21 days for any one lot

- A new calibration is required:
- For each new lot of Flex® reagent cartridges
 - After major maintenance or service, if indicated by quality control results
 - As indicated in laboratory quality control procedures
 - When required by government regulations

c. Système International d'Unités [SI units] are in brackets.

Quality Control

Follow government regulations or accreditation requirements for quality control frequency. At least once each day of use, analyze two levels of a Quality Control (QC) material with known vitamin B12 concentrations. Follow your laboratory internal QC procedures if the results obtained are outside acceptable limits.

Results: The instrument automatically calculates the concentration of vitamin B12 in pg/mL [pmol/L] using the calculation scheme described in the Dimension® EXL™ Operator's Guide.

Results of this test should always be interpreted in conjunction with the patient's medical history, clinical presentation and other findings.

Analytical Measurement Range (AMR): 80 – 2000 pg/mL [59 – 1476 pmol/L]

This is the range of analyte values that can be measured directly from the specimen without any dilution or pretreatment that is not part of the usual analytical process and is equivalent to the assay range.

- Samples with results in excess of 2000 pg/mL [1476 pmol/L] are reported as "Above Assay Range" and should be repeated on dilution.

Manual Dilution: Dilute with Reagent grade water to obtain results within the analytical measurement range. Recommended dilution factor = 3. Enter dilution factor on the instrument. Re-assay. Resulting readout is corrected for dilution.

Autodilution (AD): The autodilute sample volume is 4 µL (dilution factor = 3) for serum/plasma. Refer to your Dimension® system manual.

- Samples with results less than 80 pg/mL [59 pmol/L] should be reported as "less than 80 pg/mL [59 pmol/L]."

Limitations of Procedure

The instrument reporting system contains flags and comments to provide the user with information regarding instrument processing errors, instrument status information and potential errors in vitamin B12 results. Refer to your Dimension® EXL™ Operator's Guide for the meaning of report flags and comments. Any report containing flags and/or comments should be addressed according to your laboratory's procedure manual.

Patient samples may contain heterophilic antibodies that could react in immunoassays to give falsely elevated or depressed results. This assay has been designed to minimize interference from heterophilic antibodies. Nevertheless, complete elimination of this interference from all patient specimens cannot be guaranteed. A test result that is inconsistent with the clinical picture and patient history should be interpreted with caution.^{12,13}

Intrinsic Factor blocking antibodies are present in approximately half of pernicious anemia patients.¹⁴ There is a low frequency possibility that these antibodies may not be completely inactivated during the reaction pretreatment step. If test results are in conflict with the clinical diagnosis, the sample can be tested for intrinsic factor blocking antibodies.

United States Federal law restricts this device to sale by or on the order of a physician or other practitioner licensed by the laws of the state in which he practices, to use or order the use of this device.

Interfering Substances

The VB12 method was evaluated for interference according to CLSI/NCCLS EP7-A2.¹⁵ Bias is the difference in the results between the control sample (without the interferent) and the test sample (contains the interferent) expressed in percent. Bias exceeding 10% is considered interference.

Dextran 40 at 6 g/dL [1500 µmol/L] decreases VB12 results by -14.9% at 200 pg/mL [148 pmol/L] and by -11.8% at 1000 pg/mL [738 pmol/L].

Hemoglobin at 500 mg/dL [0.31 mmol/L] increases VB12 results by 15.2% at 200 pg/mL [148 pmol/L] and less than 10% at 1000 pg/mL [738 pmol/L].

Analyte Concentration	Biotin Test Level (ng/mL)				
	50	100	250	500	1200
	% Bias				
200 pg/ml	1.3	5.9	46	126.1	Above AMR
1000 pg/ml	N/A	2.3	12.4	40.4	Below AMR

• Specimens that contain biotin at a concentration of 100 ng/mL demonstrate a less than or equal to 10% change in results. Biotin concentrations greater than this may lead to falsely elevated results for patient samples.

• The recommended adult daily dietary intake for biotin is 30 µg/day. Over the counter dietary supplements promoted for use in hair, skin and nail health may contain 5–100 mg of biotin, with recommendations to take multiple pills per day. Pharmacokinetic studies in healthy adults have shown that, in subjects ingesting 5 mg, 10 mg, and 20 mg of biotin, serum concentrations of biotin can reach up to 73 ng/mL, 141 ng/mL, and 355 ng/mL, respectively.¹⁶ Subjects who take up to 300 mg of biotin per day may have plasma biotin levels as high as 1160 ng/mL.¹⁷

Expected Values:

Region	Range	
	pg/mL	pmol/L
US	193 – 986	142 – 727
Europe	182 – 625	134 – 461

To evaluate differences that may be observed with respect to population and dietary status, each laboratory should establish its own expected values for vitamin B12 as performed on the Dimension® EXL™ system. The values shown in the table above were confirmed using a transference protocol from earlier studies performed using samples from a population of apparently healthy adults obtained in the United States and Germany.

A system malfunction may exist if the acceptable SD maximum is exceeded

VB12 concentration	Acceptable SD Maximum
200 pg/mL [148 pmol/L]	42 pg/mL [31 pmol/L]
1000 pg/mL [738 pmol/L]	104 pg/mL [77 pmol/L]

Specific Performance Characteristics

The following data was collected on the Dimension® EXL™ system and represents typical performance.

Material	Mean pg/mL [pmol/L]	Standard Deviation (%CV)	
		Repeatability	Within-Lab
Precision ^{18,d}			
Bio-Rad Liquichek™ Immunoassay Control			
Level 1	290 [214]	13.2 [9.7] (4.6)	15.0 [11.1] (5.2)
Level 2	498 [367]	11.7 [8.6] (2.3)	18.2 [13.5] (3.7)
Level 3	645 [476]	15.9 [11.7] (2.5)	21.5 [15.9] (3.3)
Serum Pool 1	180 [133]	10.1 [7.4] (5.6)	11.6 [8.6] (6.5)
Plasma Pool (Lithium heparin)	467 [345]	13.1 [9.7] (2.8)	15.8 [11.7] (3.4)
Serum Pool 2	978 [722]	24.9 [18.4] (2.5)	27.7 [20.4] (2.8)
Serum Pool 3	1733 [1279]	27.4 [20.2] (1.6)	35.2 [26.0] (2.0)

d. CLSI/NCCLS EP5-A2 was used. During each day of testing, two separate runs, with two test samples, for each test material, were analyzed for 20 days.

Liquichek™ is a trademark of Bio-Rad Laboratories, Irvine, CA 92618 USA

Comparative Method	Slope	95% CI	Method Comparison ¹⁹ Regression Statistics ^e		Correlation Coefficient	n
			Intercept pg/mL [pmol/L]	95% CI pg/mL [pmol/L]		
Dimension Vista VB12	1.03	1.02 – 1.04	-6.4 [-4.7]	-12.9 – 0.4 [-9.5 – 0.3]	0.997	166 ^f

e. CLSI/NCCLS EP9-A2 was used. The method used to fit the linear regression line was Passing-Bablok

f. The range of vitamin B12 values in the method comparison study was 60 – 1966 pg/mL [44 – 1451 pmol/L]. Correlation coefficient was calculated from least squares regression.

Serum and Plasma Equivalence

Comparison testing results on the Dimension® EXL™ system for serum separator tubes (SST), lithium heparin plasma, sodium heparin and EDTA plasma versus serum from a plain red top tube is provided.

Comparative specimen	Slope	Intercept pg/mL [pmol/L]	n
Lithium heparin plasma	1.00	-4.33 [-3.19]	78
Sodium heparin plasma	1.02	-10.73 [-7.92]	78
EDTA plasma	1.00	-7.26 [-5.36]	78
SST serum	1.01	-2.31 [-1.70]	78

Specificity

Hemolysis, Icterus and Lipemia (HIL) interference

The VB12 method was evaluated for interference according to CLSI/NCCLS EP7-A2.¹⁵ Bias is the difference in the results between the control sample (without the interferent) and the test sample (contains the interferent) expressed in percent. Bias exceeding 10% is considered interference.

Substance Tested	Substance Concentration	Vitamin B12 pg/mL [pmol/L]	Bias* %
Hemoglobin (hemolysate)	500 mg/dL [0.31 mmol/L]	200 [148]	15
		1000 [738]	<10
		200 [148]	10
Bilirubin (unconjugated)	300 mg/dL [0.19 mmol/L]	200 [148]	<10
	60 mg/dL [1026 µmol/L]	1000 [738]	<10
Bilirubin (conjugated)	20 mg/dL [342 µmol/L]	200 [148]	<10
		1000 [738]	<10
Lipemia (Intralipid®)	3000 mg/dL [33.9 mmol/L]	200 [148]	<10
		1000 [738]	<10

Intralipid® is a registered trademark of Fresenius Kabi AG, Bad Homburg, Germany.

* Analyte results should not be corrected based on this bias.

Non-Interfering Substances

The following substances do not interfere with the VB12 method when present in serum at the concentrations indicated. Inaccuracies (biases) due to these substances do not exceed 10% at vitamin B12 concentrations of approximately 200 pg/mL [148 pmol/L] and 1000 pg/mL [738 pmol/L].

Substance	Test Concentration	SI Units
Acetaminophen	20 mg/dL	1324 µmol/L
Amikacin	8.0 mg/dL	137 µmol/L
Ampicillin	5.3 mg/dL	152 µmol/L
Ascorbic Acid	6 mg/dL	342 µmol/L
Caffeine	6 mg/dL	308 µmol/L
Carbamazepine	3 mg/dL	127 µmol/L
Chloramphenicol	5.0 mg/dL	155 µmol/L
Chlordiazepoxide	1 mg/dL	33.3 µmol/L
Chlorpromazine	0.2 mg/dL	6.27 µmol/L
Cholesterol	503 mg/dL	13 mmol/L
Cimetidine	2 mg/dL	79.2 µmol/L
Creatinine	30 mg/dL	2.7 mmol/L
Diazepam	0.51 mg/dL	18 µmol/L
Digoxin	6.1 ng/mL	7.8 nmol/L
Erythromycin	6 mg/dL	81.6 µmol/L
Ethanol	400 mg/dL	86.8 mmol/L
Ethosuximide	25 mg/dL	1770 µmol/L
Furosemide	6 mg/dL	181 µmol/L
Gentamicin	1 mg/dL	21 µmol/L
Heparin	3 U/mL	3000 U/L
Ibuprofen	50 mg/dL	2425 µmol/L

Immunoglobulin G	5 g/dL	50 g/L
Lidocaine	1.2 mg/dL	51.2 µmol/L
Lithium	2.2 mg/dL	3.2 mmol/L
Nicotine	0.1 mg/dL	6.2 µmol/L
Penicillin G	25 U/mL	25,000 U/L
Pentobarbital	8 mg/dL	354 µmol/L
Phenobarbital	10 mg/dL	431 µmol/L
Phenytoin	5 mg/dL	198 µmol/L
Primidone	4 mg/dL	183 µmol/L
Propoxyphene	0.16 mg/dL	4.91 µmol/L
Protein: Albumin	6 g/dL	60 g/L
Protein: Total	12 g/dL	120 g/L
Rheumatoid Factor	500 IU/mL	500,000 IU/L
Salicylic Acid	60 mg/dL	4.34 mmol/L
Theophylline	4 mg/dL	222 µmol/L
Triglycerides	3000 mg/dL	33.9 mmol/L
Urea	500 mg/dL	83.3 mmol/L
Uric Acid	20 mg/dL	1.2 mmol/L
Valproic Acid	50 mg/dL	3467 µmol/L
Vancomycin	10 mg/dL	69 µmol/L

Cross Reactivity

Cobinamide at a concentration of 200 ng/mL [192 nmol/L] was evaluated and found to have insignificant cross reactivity with the VB12 assay when present in serum containing approximately 200 pg/mL [148 pmol/L] of vitamin B12.

The percent cross reactivity was calculated as follows:

$$\% \text{ Cross-reactivity} = \frac{[\text{measured VB12}] - [\text{control VB12}]}{[\text{compound}]} \times 100$$

Recovery

Known amounts of vitamin B12 were added to 2 human serum, 2 SST, 2 lithium heparin, 2 sodium heparin and 2 EDTA plasma samples with baseline B12 value between 136 – 197 pg/mL [100 – 145 pmol/L]. The sample concentrations were measured and the percent recovery ranged from 92.0% to 108.9% with a mean recovery of 99.8%.

$$\% \text{ Recovery} = \frac{[\text{Value obtained}] - [\text{Baseline}]}{[\text{Amount Added}]} \times 100$$

Accuracy to WHO Standard 03/178

A study was performed to evaluate the accuracy of the VB12 assay using the World Health Organization Vitamin B12 International Standard 03/178 using two Flex® reagent lots on two instruments. The assay demonstrated a 2.1% difference from the target value of 480 pg/mL [354 pmol/L].

Limit of Detection and Limit of Blank^g

The Limit of Detection (LoD) for VB12 is 50 pg/mL [37 pmol/L], determined consistent with CLSI guideline EP17-A²⁰ and with proportions of false positives (α) less than 5% and false negatives (β) less than 5%; based on 168 determinations, with 5 blank and 9 low level samples. The Limit of Blank (LoB) is 30 pg/mL [22 pmol/L].

g. LoD is the lowest concentration of analyte that can be detected reliably. LoB is the highest concentration that is likely to be observed for a blank sample.

Limit of Quantitation

The Limit of Quantitation (LoQ) for VB12 is 80 pg/mL [59 pmol/L], determined consistent with CLSI Guideline EP17-A and an inter-assay imprecision of <20% Coefficient of Variation (CV).

Symbols Key: See adjacent panel.

Bibliography: See adjacent panel.

Dimension®, Dimension Vista®, LOCI® and Flex® are trademarks of Siemens Healthcare Diagnostics.

© 2014 Siemens Healthcare Diagnostics

All rights reserved.



Siehe schraffierte Abschnitte: Aktualisierte Informationen gegenüber der Version 2019-05.

Ausgabedatum 2020-08

LOCI Vitamin B12

Verwendungszweck: Der VB12-Test ist ein *In-vitro*-Diagnostikum zur quantitativen Bestimmung von Vitamin B12 (B12) in Humanserum und -plasma auf dem integrierten chemischen Dimension® EXL™-System mit LOCI-Modul. Messungen des Vitamin-B12-Werts können zur Feststellung eines Vitamin-B12-Mangels verwendet werden.

Zusammenfassung: Vitamin B12, auch als Cobalamin bezeichnet, ist ein essenzielles Vitamin mit einem Molekulargewicht von 1355 Da, das in zahlreichen Nahrungsmitteln wie Fisch, Schalentieren, Fleisch und Molkeerzeugnissen vorkommt. Die für Assimilation, Transport und Abgabe von B12 an Blut und Gewebe erforderlichen Bindeproteine sind Intrinsic Factor (IF), Transcobalamin II (TCII) und Haptocorrin (HC). Vitamin B12 wird hauptsächlich in der Leber gespeichert und bei Bedarf freigesetzt. Der Körper nutzt B12 äußerst effektiv: Vitamin B12 wird aus dem Dünndarm reabsorbiert und wieder in die Leber zurücktransportiert, sodass nur geringe Mengen ausgeschieden werden, und ein Nährstoffmangel ist äußerst selten.¹ Vitamin B12 ist für die DNA-Synthese, für die normale Reifung der Erythrozyten sowie für die Bildung und Aufrechterhaltung der Myelinscheide erforderlich. Es dient bei der Umwandlung von Methylmalonsäure in Succinsäure sowie bei der Methioninsynthese als Coenzym.¹

Ein Vitamin-B12-Mangel ist eine der Ursachen der Megaloblastenanämie, einer Erkrankung, bei der die Erythrozyten ungewöhnlich groß sind und das Kern-Zytoplasma-Verhältnis erhöht ist. Nachdem auch ein Folsäuremangel eine Megaloblastenanämie hervorrufen kann, ist die Messung des Serum-B12-Werts ein wichtiger Bestandteil der Differenzialdiagnose.¹ Ein Vitamin-B12-Mangel verursacht zudem makrozytäre Anämien, die durch eine abnorme Reifung der Erythrozyten und deren frühzeitige Freisetzung aus dem Knochenmark gekennzeichnet ist. Die perniziöse Anämie ist eine makrozytäre Anämie. Bei dieser Erkrankung verhindert ein Mangel an IF die normale B12-Resorption. Sowohl eine durch einen B12-Mangel bedingte Anämie als auch eine perniziöse Anämie wird mit Vitamin B12 therapiert.¹

Ein Vitamin-B12-Mangel kann der Grund für neurologische und psychiatrische Störungen wie Ataxie, Muskelschwäche, Demenz, Psychosen und Stimmungsschwankungen sein.² Viele Patienten zeigen neurologische Veränderungen, ohne dass eine makrozytische Anämie entsteht. Risikogruppen für einen B12-Mangel sind strikte Vegetarier, ältere Menschen und Personen mit erhöhtem B12-Bedarf wie Schwangere, Patienten mit Thyreotoxikose, hämolytischer Anämie, Hämorrhagien, Malignitäten und Leber- bzw. Nierenerkrankungen.³ Aufgrund der latenten Natur dieser Erkrankung und des Risikos irreversibler neurologischer Schäden ist die frühe Diagnostik eines B12-Mangels von entscheidender Wichtigkeit. Kürzlich durchgeführte Studien haben ergeben, dass im Interesse der diagnostischen Spezifität über die Bestimmung der Serum-B12-Spiegel hinaus auch Folsäure, Methylmalonsäure und Homocystein bestimmt werden sollten.^{3, 4, 5}

Erhöhte B12-Spiegel werden bei hämatologischen Krankheiten (chronische myelogene Leukämie, promyelozytische Leukämie, Polyzythämie vera) und Lebererkrankungen (akute Hepatitis, Zirrhose, hepatozelluläres Karzinom) berichtet.^{2, 6}

Grundlagen des Verfahrens: Die Vitamin B12-Methode ist ein homogener kompetitiver Chemilumineszenz-Immunoassay auf Basis der LOCI®-Technologie. Bei den LOCI®-Reagenzien handelt es sich um zwei synthetische Reagenzien (Kügelchen) und einen biotinylierten Intrinsic Factor (IF). Beim ersten Reagenz (Chemibead) sind die Kügelchen mit einem B12-Derivat beschichtet und enthalten einen Chemilumineszenzfarbstoff. Die Kügelchen des zweiten Reagenz (Sensibead) sind mit Streptavidin beschichtet und enthalten einen Photosensibilisator-Farbstoff. Die Patientenprobe wird mit Natriumhydroxid (NaOH) und Dithioerythritol (DTE) vorbehandelt, um das B12 im Serum von seinen Trägerproteinen abzuspalten. Zyankali (KCN) wird zugesetzt, um alle Formen von B12 in eine einzige Form, Cyanocobalamin, umzuwandeln, und die erneute Bindung von B12 an seine Trägerproteine wird durch Zugabe von Dicyanocobinamid verhindert. Nach Vorbehandlung der Probe werden nacheinander der biotinylierte IF und die Chemibead-Reagenzien in das Reaktionsgefäß gegeben. Das Vitamin B12 aus der Probe konkurriert mit dem B12-Chemibead um eine begrenzte Menge an biotinyliertem IF. Anschließend wird Sensibead-Reagenz hinzugefügt, das sich an das Biotin bindet und Bead-Pair-Immunkomplexe bildet. Bei einer Belichtung des Komplexes mit 680 nm erzeugen die Sensibeads Singulett-Sauerstoff, der in die Chemibeads diffundiert und eine Chemilumineszenzreaktion auslöst. Das hierdurch entstehende Signal ist bei 612 nm messbar und der Vitamin-B12-Konzentration in der Probe direkt proportional.^{7, 8}

Reagenzien				
Zellen ^a	Form	Inhaltsstoff	Konzentration ^b	Ursprung
1	Flüssig	VB12-Sensibead-Reagenz	360 µg/ml	Rekombinante <i>E. coli</i>
2	Flüssig	VB12-Chemibead-Reagenz	200 µg/ml	
3	Leer			
4	Flüssig	Biotinylierter IF	3 ng/ml	Schwein
		Dicyanocobinamid	60 ng/ml	
5	Tablette	Dithioerythritol (DTE)	12.5 mg/ml	
6	Flüssig	Natriumhydroxid (NaOH)	0.75 N	
		Zyankali (KCN)	3 mM	
7 – 8	Leer			

a. Die Zellen sind vom breiten Ende der Kassette aus durchgehend nummeriert.
b. Nominalwert pro Zelle in einer Kassette.

Gefahrenhinweise und Sicherheitssätze



H290, H314, H317
P280, P301 + P310 + P331, P303 + P361 + P353 + P310,
P305 + P351 + P338, P390, P501

Gefahr!

Kann gegenüber Metallen korrosiv sein. Verursacht schwere Verätzungen der Haut und schwere Augenschäden. Kann allergische Hautreaktionen verursachen.

Schutzhandschuhe/Schutzkleidung/Augenschutz/Gesichtsschutz tragen. BEI VERSCHLUCKEN: Sofort GIFTINFORMATIONSZENTRUM oder Arzt anrufen. KEIN Erbrechen herbeiführen. BEI KONTAKT MIT DER HAUT (oder dem Haar): Alle beschmutzten, getränkten Kleidungsstücke sofort ausziehen. Haut mit Wasser abwaschen/duschen. Sofort GIFTINFORMATIONSZENTRUM oder Arzt anrufen. BEI KONTAKT MIT DEN AUGEN: Einige Minuten lang behutsam mit Wasser spülen. Vorhandene Kontaktlinsen nach Möglichkeit entfernen. Weiter spülen. Verschüttete Mengen aufnehmen, um Materialschäden zu vermeiden. Inhalt und Behälter sind in Übereinstimmung mit den gesetzlichen Bestimmungen zu entsorgen.

Enthält: Natriumhydroxid; 5-chloro-2-methyl-3(2h)-isothiazolonone mixture with 2-methyl-3(2h)-isothiazolonone

Sicherheitsdatenblätter (MSDS/SDS) verfügbar auf siemens.com/healthcare

Vorsichtsmaßnahmen:

Gebrauchte Reaktionsgefäße enthalten menschliche Körperflüssigkeiten; mit entsprechender Vorsicht handhaben und Hautkontakt oder Verschlucken vermeiden. Die Reaktionsgefäße sind nur für den einmaligen Gebrauch vorgesehen.

In-vitro-Diagnostikum.

Reagenzvorbereitung: Auflösung, Verdünnung und Mischung werden vom Dimension® EXL™-System automatisch durchgeführt.

Aufbewahrung bei: 2 – 8 °C.

Verfalldatum: Verfalldatum einzelner ungeöffneter Reagenzkassetten siehe Umkarton. Verschlossene Zellen sind im Gerät 30 Tage lang stabil.

Stabilität geöffneter Zellen: 3 Tage für Zellen 1 – 2 und 4 – 6

Probenentnahme und -handhabung

Empfohlene Probenotypen: Serum und Plasma (Lithium- oder Natriumheparin, EDTA).

Mit Azid stabilisierte Proben und Kontrollsubstanzen können nicht verwendet werden.

Die Proben sind bei Raumtemperatur bis zu 24 Stunden lang stabil. Proben können gekühlt bei 2 – 8 °C bis zu 48 Stunden lang aufbewahrt werden. Können die Tests nicht innerhalb von 48 Stunden durchgeführt werden, die Proben bei mindestens -20 °C einfrieren. Nach dem Auftauen gründlich mischen. Wiederholtes Einfrieren und Auftauen vermeiden.⁹

Proben vor Licht schützen. Hämolytierte Proben nicht verwenden.⁹

Anweisungen zur Verwendung der Probenentnahmevorrichtung und zur Probenverarbeitung beachten.¹⁰

Vor dem Zentrifugieren sollte die vollständige Gerinnung abgewartet werden. Serum oder Plasma müssen so bald wie möglich bzw. spätestens zwei Stunden nach der Entnahme von den Zellen getrennt werden. Die Proben müssen partikelfrei sein.¹¹

Die Hinweise zur Handhabung und Aufbewahrung von Proben dienen als Hilfestellung. Die Anwender können mögliche Verfahren zur Handhabung und Aufbewahrung von Patientenproben auch selbst validieren.

Verfahren

Mitgelieferte Materialien

LOCI VB12 Flex®-Reagenzkassette, Art.-Nr. RF642

Erforderliche, aber nicht mitgelieferte Materialien

LOCI ANEMIA-Kalibrator, Art.-Nr. RC640

Reaktionsgefäße, Art.-Nr. RXV1

Reagenznadelreinigungslösung, Art.-Nr. RD702

Probenadelreinigungslösung, Art.-Nr. RD703

Qualitätskontrollmaterialien

Testschritte

Probenentnahme, Reagenzzugabe, Mischung und Bearbeitung werden vom Dimension® EXL™-System automatisch durchgeführt. Genaue Angaben zu diesen Vorgängen entnehmen Sie bitte dem Dimension® EXL™-Bedienungshandbuch.

Testbedingungen

Probenvolumen (in das Gefäß abgegeben)	12 µl
Volumen Extraktionsreagenz	15 µl
DTE	12 µl
Volumen biotinyliertes IF/Neutralisator-Reagenz	50 µl
Volumen Chemibead-Reagenz	15 µl
Volumen Sensibead-Reagenz	50 µl
Temperatur	37 °C
Reaktionszeit	32 Minuten
Wellenlänge	680 nm Belichtung, 612 nm Emission
Messverfahren	Chemilumineszenz

Kalibration

Kalibrationsmaterial	LOCI ANEMIA-Kalibrator, Art.-Nr. RC640
Kalibrationschema	Level 1, n = 5 Levels 2 – 5, n = 3
Einheiten	pg/ml [pmol/l] ^c (pg/ml x 0.7378) = [pmol/l]
Typische Kalibrator-Level	Level 1: 45 pg/ml [33 pmol/l] Level 2: 200 pg/ml [148 pmol/l] Level 3: 500 pg/ml [369 pmol/l] Level 4: 1000 pg/ml [738 pmol/l] Level 5: 2100 pg/ml [1549 pmol/l]

Kalibrationshäufigkeit	Alle 21 Tage mit derselben Charge
Eine neue Kalibration ist erforderlich:	<ul style="list-style-type: none"> Für jede neue Charge von Flex®-Reagenzkassetten Nach größeren Wartungs- oder Servicemaßnahmen, falls die Ergebnisse der Qualitätskontrolle dies nahelegen Nach Maßgabe der Qualitätskontrollverfahren des Labors Nach Maßgabe behördlicher Vorschriften

c. SI-Einheiten sind in Klammern angegeben.

Qualitätskontrolle

Halten Sie die behördlichen Vorschriften oder Akkreditierungsanforderungen für die Häufigkeit von Qualitätskontrollen ein. In der Praxis sollten mindestens einmal täglich zwei Konzentrationsstufen eines Qualitätskontroll (QK-)materials mit bekannten Vitamin-B12-Konzentrationen analysiert werden. Bei Ergebnissen außerhalb der akzeptablen Grenzwerte nach laborinternen QK-Vorschriften vorgehen.

Ergebnisse: Das Gerät berechnet anhand des im Dimension® EXL™-Bedienungshandbuch dargestellten Berechnungsschemas automatisch die Vitamin-B12-Konzentration in pg/ml [pmol/l].

Ergebnisse dieses Tests sollten stets in Verbindung mit der Vorgeschichte des Patienten, dem klinischen Bild und anderen Untersuchungsergebnissen interpretiert werden.

Analytischer Messbereich: 80 – 2000 pg/ml [59 – 1476 pmol/l]

Dies ist der Bereich von Analysewerten, der ohne vorherige Verdünnung oder Vorbehandlung, die nicht Teil des üblichen Analysevorgangs ist, in der Probe direkt ermittelt werden kann, und entspricht dem Messbereich.

- Für Proben mit Ergebnissen über 2000 pg/ml [1476 pmol/l] wird „Oberhalb Messbereich“ ausgegeben. Sie sollten verdünnt und erneut analysiert werden.

Manuelle Verdünnung: Um Ergebnisse innerhalb des Messbereichs zu erhalten, muss die Probe mit Wasser von Reagenzqualität verdünnt werden. Empfohlener Verdünnungsfaktor = 3. Geben Sie den Verdünnungsfaktor ein, und wiederholen Sie den Test. Im Ergebnisausdruck wird die Verdünnung berücksichtigt.

Automatische Verdünnung (AD): Das automatische Verdünnungsprobenvolumen beträgt 4 µl für Serum/Plasma (Verdünnungsfaktor = 3). Siehe Dimension®-Systemhandbuch.

- Proben mit Ergebnissen unter 80 pg/ml [59 pmol/l] sollten als „weniger als 80 pg/ml [59 pmol/l]“ angegeben werden.

Grenzen des Verfahrens

Das integrierte Meldesystem des Geräts informiert den Nutzer durch Fehlercodes und Hinweise über Bearbeitungsfehler des Geräts, den Gerätestatus und mögliche Fehler bei den Ergebnissen der Vitamin-B12-Tests. Informationen zur Bedeutung der Fehlercodes und Hinweise finden Sie im Bedienungshandbuch des Dimension® EXL™-Systems. Berichte mit Fehlercodes und/oder Hinweisen sollten gemäß den Verfahren Ihres Labors verarbeitet werden.

Patientenproben können heterophile Antikörper enthalten, die in Immunoassays zu falsch erhöhten oder niedrigen Ergebnissen führen können. Dieser Test wurde so entwickelt, dass die Interferenz durch heterophile Antikörper minimal ist. Dennoch kann diese Art von Interferenz nicht bei allen Patientenproben vollständig ausgeschlossen werden. Ein vom klinischen Bild und der Vorgeschichte des Patienten abweichendes Testergebnis sollte deshalb mit Vorsicht interpretiert werden.^{12,13}

IF-blockierende Antikörper (Intrinsic Factor) sind bei etwa der Hälfte aller Patienten mit perniziöser Anämie vorhanden.¹⁴ In seltenen Fällen werden diese Antikörper während der Reaktionsvorbehandlung nicht vollständig deaktiviert. Falls die Testergebnisse der klinischen Diagnose widersprechen, kann die Probe auf IF-blockierende Antikörper getestet werden.

Gemäß geltenden Bundesgesetzen der USA ist der Verkauf dieses Produkts nur auf ärztliche Anweisung oder an einen anderen, durch die Gesetze seines Bundesstaates zugelassenen, Praktiker zur Verwendung oder zur Verschreibung der Verwendung gestattet.

Störsubstanzen

Die VB12-Methode wurde nach CLSI/NCCLS EP7-A2 auf mögliche Interferenz evaluiert.¹⁵ Die Abweichung berechnet sich aus dem Ergebnisunterschied in Prozent zwischen der Kontrollprobe (ohne Störsubstanz) und der Testprobe (mit Störsubstanz). Eine Abweichung von mehr als 10 % wird als Interferenz bezeichnet.

Dextran 40 von 6 g/dl [1500 µmol/l] führt zu einer Senkung der VB12-Ergebnisse um -14.9 % bei 200 pg/ml [148 pmol/l] und -11.8 % bei 1000 pg/ml [738 pmol/l].

Hämoglobin von 500 mg/dl [0.31 mmol/l] erhöht die Ergebnisse für VB12 um 15.2 % bei 200 pg/ml [148 pmol/l] und weniger als 10 % bei 1000 pg/ml [738 pmol/l].

Analyt-Konzentration	Biotin-Teststufe (ng/ml)				
	50	100	250	500	1200
	% Abweichung				
200 pg/ml	1.3	5.9	46	126.1	Über AMR
1000 pg/ml	N/A	2.3	12.4	40.4	Über AMR

• Proben, die Biotin in einer Konzentration von 100 ng/ml enthalten, zeigen eine Veränderung der Ergebnisse von kleiner oder gleich 10 %. Höhere Biotinkonzentrationen können zu falsch erhöhten Ergebnissen für Patientenproben führen.

• Der empfohlene Referenzwert für die Aufnahme von Biotin für Erwachsene beträgt 30 µg/Tag. Rezeptfreie Nahrungsergänzungsmittel, die für gesunde Haare, Haut und Nägel vermarktet werden, können 5–100 mg Biotin enthalten, wobei eine Einnahmeempfehlung von mehreren Tabletten pro Tag besteht. Pharmakokinetische Studien mit gesunden Erwachsenen haben gezeigt, dass die Einnahme von 5 mg, 10 mg und 20 mg zu Biotin-Serumkonzentrationen von bis zu 73 ng/ml, 141 ng/ml und 355 ng/ml führen kann.¹⁶ Studienteilnehmer, die bis zu 300 mg Biotin pro Tag einnehmen, können einen Biotin-Plasmaspiegel von 1160 ng/ml erreichen.¹⁷

Erwartete Werte:

Region	Bereich	
	pg/ml	pmol/l
USA	193 – 986	142 – 727
Europa	182 – 625	134 – 461

Zur Auswertung der Unterschiede hinsichtlich der Population und des Ernährungsstatus sollte jedes Labor eigene erwartete Werte für Vitamin B12 bei Verwendung des Dimension® EXL™-Systems aufstellen. Die in der Tabelle oben angezeigten Werte wurden durch ein Übertragungsprotokoll früherer Studien bestätigt, bei denen Proben von offensichtlich gesunden Erwachsenen aus den USA und Deutschland verwendet wurden.

Wird die maximal akzeptable SA überschritten, kann es sich um eine Fehlfunktion des Systems handeln

VB12-Konzentration	Maximal akzeptable SA
200 pg/ml [148 pmol/l]	42 pg/ml [31 pmol/l]
1000 pg/ml [738 pmol/l]	104 pg/ml [77 pmol/l]

Spezifische Leistungsdaten

Die folgenden Daten wurden mit dem Dimension® EXL™-System gewonnen und stellen seine typische Leistung dar.

Material	Mittelwert pg/ml [pmol/l]	Standardabweichung (% VK)	
		Wiederholbarkeit	Innerhalb des Labors
Bio-Rad Liquechek™-Immunoassay-Kontrolle			
Level 1	290 [214]	13.2 [9.7] (4.6)	15.0 [11.1] (5.2)
Level 2	498 [367]	11.7 [8.6] (2.3)	18.2 [13.5] (3.7)
Level 3	645 [476]	15.9 [11.7] (2.5)	21.5 [15.9] (3.3)
Serumpool 1	180 [133]	10.1 [7.4] (5.6)	11.6 [8.6] (6.5)
Plasmapool (Lithium-Heparin)	467 [345]	13.1 [9.7] (2.8)	15.8 [11.7] (3.4)
Serumpool 2	978 [722]	24.9 [18.4] (2.5)	27.7 [20.4] (2.8)
Serumpool 3	1733 [1279]	27.4 [20.2] (1.6)	35.2 [26.0] (2.0)

d. Zugrunde gelegt wurde CLSI/NCCLS EP5-A2. 20 Tage lang wurden an jedem Testtag zwei separate Durchläufe mit zwei Testproben für jedes Testmaterial analysiert.

Liquechek™ ist ein Warenzeichen von Bio-Rad Laboratories, Irvine, CA 92618, USA.

Vergleichsmethode	Steigung	Achsenabschnitt pg/ml [pmol/l]		95%-KI pg/ml [pmol/l]	Korrelationskoeffizient	n
		95%-KI	pmol/l			
Dimension Vista VB12	1.03	1.02 – 1.04	-6.4 [-4.7]	[-12.9 – 0.4] [-9.5 – 0.3]	0.997	166 ^e

e. Es wurde CLSI/NCCLS EP9-A2 verwendet. Die lineare Regressionslinie wurde mit einer Analyse nach Passing und Bablok angepasst.

f. In der Methodenvergleichsstudie lagen die Werte für Vitamin-B12-Werte zwischen 60 – 1966 pg/ml [44 – 1451 pmol/l]. Der Korrelationskoeffizient wurde nach der Kleinste-Quadrate-Regressionsmethode berechnet.

Gleichwertigkeit von Serum und Plasma

Vergleichende Testergebnisse für Serum-Trennröhrchen (SST), Lithiumheparinplasma, Natriumheparin- und EDTA-Plasma mit dem Serum eines Greiner Serumröhrchens (rote Kappe) werden bereitgestellt.

Vergleichsprobe	Steigung	Achsenabschnitt pg/ml [pmol/l]	n
Lithiumheparin-Plasma	1.00	-4.33 [-3.19]	78
Natriumheparin-Plasma	1.02	-10.73 [-7.92]	78
EDTA-Plasma	1.00	-7.26 [-5.36]	78
SST-Serum	1.01	-2.31 [-1.70]	78

Spezifität

Interferenz durch Hämolyse, Ikterus und Lipämie (HIL)

Die VB12-Methode wurde nach CLSI/NCCLS EP7-A2 auf mögliche Interferenz evaluiert.¹⁵ Die Abweichung berechnet sich aus dem Ergebnisunterschied in Prozent zwischen der Kontrollprobe (ohne Störsubstanz) und der Testprobe (mit Störsubstanz). Eine Abweichung von mehr als 10 % wird als Interferenz bezeichnet.

Getestete Substanz	Substanzkonzentration	Vitamin B12 pg/ml [pmol/l]	Abweichung* in %
Hämoglobin (Hämolyt)	Hämoglobin (Monomer) 500 mg/dl [0.31 mmol/l]	200 [148] 1000 [738]	15 < 10
	300 mg/dl [0.19 mmol/l]	200 [148]	10
Bilirubin (unkonjugiert)	60 mg/dl [1026 µmol/l]	200 [148] 1000 [738]	< 10 < 10
	20 mg/dl [342 µmol/l]	200 [148] 1000 [738]	< 10 < 10
Lipämie (Intralipid®)	3000 mg/dl [33.9 mmol/l]	200 [148] 1000 [738]	< 10 < 10

Intralipid® ist ein eingetragenes Warenzeichen von Fresenius Kabi AG, Bad Homburg, Deutschland.

*Analysewerte dürfen nicht anhand dieser Abweichung korrigiert werden.

Nicht störende Substanzen

Die folgenden Substanzen haben keinen Einfluss auf VB12-Testergebnisse, wenn sie in den genannten Konzentrationen im Serum vorhanden sind. Ungenauigkeiten (Abweichungen) aufgrund dieser Substanzen überschreiten bei Vitamin-B12-Konzentrationen von circa 200 pg/ml [148 pmol/l] und 1000 pg/ml [738 pmol/l] nicht 10 %.

Substanz	Testkonzentration	SI-Einheiten
Acetaminophen	20 mg/dl	1324 µmol/l
Amikacin	8.0 mg/dl	137 µmol/l
Ampicillin	5.3 mg/dl	152 µmol/l
Ascorbinsäure	6 mg/dl	342 µmol/l
Koffein	6 mg/dl	308 µmol/l
Carbamazepin	3 mg/dl	127 µmol/l
Chloramphenicol	5.0 mg/dl	155 µmol/l
Chlordiazepoxid	1 mg/dl	33.3 µmol/l
Chlorpromazin	0.2 mg/dl	6.27 µmol/l
Cholesterin	503 mg/dl	13 mmol/l
Cimetidin	2 mg/dl	79.2 µmol/l
Kreatinin	30 mg/dl	2.7 mmol/l
Diazepam	0.51 mg/dl	18 µmol/l
Digoxin	6.1 ng/ml	7.8 nmol/l
Erythromycin	6 mg/dl	81.6 µmol/l
Ethanol	400 mg/dl	86.8 mmol/l
Ethosuximid	25 mg/dl	1770 µmol/l
Furosemid	6 mg/dl	181 µmol/l
Gentamicin	1 mg/dl	21 µmol/l
Heparin	3 U/ml	3000 U/l
Ibuprofen	50 mg/dl	2425 µmol/l
Immunglobulin G	5 g/dl	50 g/l
Lidocain	1.2 mg/dl	51.2 µmol/l
Lithium	2.2 mg/dl	3.2 mmol/l
Nikotin	0.1 mg/dl	6.2 µmol/l
Penicillin G	25 U/ml	25000 U/l
Pentobarbital	8 mg/dl	354 µmol/l
Phenobarbital	10 mg/dl	431 µmol/l
Phenytoin	5 mg/dl	198 µmol/l
Primidon	4 mg/dl	183 µmol/l
Propoxyphen	0.16 mg/dl	4.91 µmol/l
Protein: Albumin	6 g/dl	60 g/l
Protein: Gesamt	12 g/dl	120 g/l
Rheumafaktor	500 IU/ml	500,000 IU/l
Salicylsäure	60 mg/dl	4.34 mmol/l
Theophyllin	4 mg/dl	222 µmol/l
Triglyceride	3000 mg/dl	33.9 mmol/l
Harnstoff	500 mg/dl	83.3 mmol/l
Harnsäure	20 mg/dl	1.2 mmol/l
Valproinsäure	50 mg/dl	3467 µmol/l
Vancomycin	10 mg/dl	69 µmol/l

Kreuzreaktivität

Cobinamid in einer Konzentration von 200 ng/ml [192 nmol/l] wurde evaluiert, und es wurde eine insignifikante Kreuzreaktivität mit dem VB12-Test bei Serum mit circa 200 pg/ml [148 pmol/l] Vitamin B12 festgestellt.

Die Kreuzreaktivität in Prozent wurde folgendermaßen berechnet:

$$\% \text{ Kreuzreaktivität} = \frac{[\text{gemessenes VB12}] - [\text{Kontroll-VB12}]}{[\text{Substanz}]} \times 100$$

Wiederfindung

Bekannte Mengen an Vitamin B12 wurden jeweils 2 Proben von Humanserum, SST, Lithiumheparin, Natriumheparin und EDTA-Plasma mit B12-Ausgangskonzentrationen zwischen 136 – 197 pg/ml [100 – 145 pmol/l] zugesetzt. Die Probenkonzentrationen wurden gemessen und der Bereich der prozentualen Wiederfindung lag bei 92.0 % bis 108.9 %, der Wiederfindungs-Mittelwert betrug 99.8 %.

$$\% \text{ Wiederfindung} = \frac{[\text{Gemessener Wert}] - [\text{Basiswert}]}{[\text{Hinzugefügte Menge}]} \times 100$$

Genauigkeit nach WHO-Norm 03/178

Es wurde eine Studie durchgeführt, in der die Genauigkeit des VB12-Tests gemäß der internationalen Vitamin B12-Norm 03/178 der Weltgesundheitsorganisation (WHO) anhand von zwei Flex®-Reagenzchargen auf zwei Geräten evaluiert wurde. Der Test zeigte eine Abweichung von 2.1 % zum Zielwert von 480 pg/ml [354 pmol/l].

Nachweisgrenze und Erfassungsgrenze^g

Die Nachweisgrenze für VB12 wurde anhand der CLSI-Richtlinie EP17-A²⁰ berechnet und beträgt 50 pg/ml [37 pmol/l] mit einem Anteil an falsch positiven (α) bzw. falsch negativen (β) Ergebnissen von jeweils unter 5 %; basierend auf 168 Bestimmungen mit 5 Leerproben und 9 Proben mit bekannt niedrigen Konzentrationen. Die Erfassungsgrenze liegt bei 30 pg/ml [22 pmol/l].

g. Die Nachweisgrenze ist die niedrigste Analytkonzentration, die zuverlässig ermittelt werden kann. Die Erfassungsgrenze ist die höchste Konzentration, die in einer Leerprobe beobachtet werden kann.

Bestimmungsgrenze

Die Bestimmungsgrenze für VB12 wurde anhand der CLSI-Richtlinie EP17-A mit Ungenauigkeit zwischen Tests von < 20 % Variationskoeffizient (VK) ermittelt und beträgt 80 pg/ml [59 pmol/l].

Symbolschlüssel: Siehe Verzeichnis im Anhang.

Literatur: Siehe Verzeichnis im Anhang.

Dimension®, Dimension Vista®, LOCI® und Flex® sind Warenzeichen von Siemens Healthcare Diagnostics.

© 2014 Siemens Healthcare Diagnostics
Alle Rechte vorbehalten.

Voir les sections ombrées : Informations mises à jour à partir de la version 2019-05.

Date d'édition 2020-08

Vitamine B12 LOCI

Utilisation : La méthode VB12 est un test diagnostic *in vitro* pour la mesure quantitative de la vitamine B12 (B12) dans le sérum et le plasma humains dans le système de chimie intégré Dimension® EXL™. Les mesures de la vitamine B12 peuvent être utilisées dans le diagnostic d'un déficit de vitamine B12.

Résumé : La vitamine B12, ou cobalamine, est une vitamine essentielle dont la masse moléculaire est de 1355 Da et qui se trouve dans de nombreux aliments tels que le poisson, les crustacés, la viande et les produits laitiers. Le facteur intrinsèque (FI), la transcobalamine II (TCII) et l'haptocorrine (HC) sont des protéines liantes nécessaires à l'assimilation, au transport et à la distribution de la vitamine B12 dans le sang et les tissus. La vitamine B12 est principalement stockée dans le foie et libérée à la demande. Le corps utilise la vitamine B12 de manière très efficace, réabsorbant la B12 de l'intestin grêle et la transportant jusqu'au foie, de sorte que peu de B12 soit excrétée et qu'un déficit nutritionnel soit extrêmement rare.¹ La vitamine B12 est indispensable à la synthèse de l'ADN, à la maturation normale des globules rouges et à la formation et au maintien de la gaine de myéline. Il s'agit d'une coenzyme dans la conversion de l'acide méthylmalonique en acide succinique et dans la synthèse de la méthionine.¹

Le déficit en vitamine B12 est une des causes de l'anémie mégalo-blastique, maladie dans laquelle les globules rouges sont plus gros que la normale et où le rapport entre la taille du noyau et le cytoplasme de la cellule est augmenté. Comme un déficit d'acide folique peut également entraîner une anémie mégalo-blastique, la mesure des niveaux de B12 du sérum est un élément important du diagnostic différentiel.¹ Un déficit en vitamine B12 entraîne également des anémies macrocytiques qui sont caractérisées par une maturation anormale des globules rouges et une libération précoce de la moelle osseuse. L'anémie pernicieuse est une anémie macrocytique. Dans cette maladie, une absence de FI empêche l'absorption normale de la vitamine B12. L'anémie mégalo-blastique causée par un déficit en vitamine B12 et l'anémie pernicieuse sont toutes les deux traitées par une cure de vitamine B12.¹

Un déficit en vitamine B12 peut également engendrer des symptômes neurologiques et psychiatriques anormaux tels que l'ataxie, une faiblesse musculaire, la démence, la psychose et des troubles de l'humeur.² De nombreux patients présentent des changements neurologiques sans développer d'anémie macrocytique. Les populations à risque de déficit en vitamine B12 sont les végétariens stricts, les personnes âgées et les personnes ayant un besoin accru de vitamine B12 en raison d'une grossesse, d'une thyrotoxicose, d'une anémie hémolytique, d'une hémorragie, d'une malignité, d'une maladie du foie ou des reins.³ Le diagnostic précoce du déficit en vitamine B12 est essentiel en raison de la nature latente de ce trouble et du risque de dommage neurologique irréversible. Des études récentes suggèrent qu'en plus des niveaux de vitamine B12 dans le sérum, il faut mesurer l'acide folique, l'acide méthylmalonique et l'homocystéine pour augmenter la précision du diagnostic.^{3,4,5}

Des niveaux de vitamine B12 élevés sont relevés en présence de troubles hématologiques (leucémie myélogène chronique, leucémie promyélocytaire, érythémie) et du foie (hépatite aiguë, cirrhose, carcinome hépatocellulaire).^{2,6}

Principes de la méthode : La méthode B12 est un immunodosage homogène, chimioluminescent compétitif, qui se fonde sur la technologie LOCI®. Les réactifs LOCI® comprennent deux réactifs synthétiques sur billes ainsi qu'un facteur intrinsèque (FI) biotinylé. Le premier réactif sur billes (Chemibeats) est recouvert d'un dérivé de la vitamine B12 et contient un colorant chimioluminescent. Le second réactif sur billes (Sensibeats) est recouvert de streptavidine et il contient un colorant photosensible. L'échantillon du patient est prétraité avec de l'hydroxyde de sodium (NaOH) et du dithioérythritol (DTE) pour libérer la vitamine B12 du sérum de ses protéines porteuses. Du cyanure de potassium (KCN) est ajouté pour convertir toutes les formes de la vitamine B12 en une seule forme de cyanocobalamine et du dicyanocobinamide est ajouté pour empêcher la vitamine B12 de se lier de nouveau avec les protéines porteuses. Après le pré-traitement, le FI biotinylé et les réactifs chemibeat sont ajoutés consécutivement au récipient de réaction. La vitamine B12 de l'échantillon entre en concurrence avec celle du chemibeat pour un nombre limité de FI biotinylés. Les réactifs Sensibeats sont alors ajoutés et se lient à la biotine pour former des immunocomplexes de paires de billes. L'illumination du complexe à 680 nm génère de l'oxygène singulet à partir des Sensibeats, qui diffuse dans les Chemibeats, déclenchant une réaction de chimioluminescence. Le signal qui en résulte est mesuré à 612 nm et est une fonction inverse de la concentration de vitamine B12 dans l'échantillon.^{7,8}

Réactifs				
Puits ^a	Forme	Composant	Concentration ^b	Origine
1	Liquide	Réactif Sensibeats VB12	360 µg/ml	<i>E. coli</i> recombinant
2	Liquide	Réactif Chemibeat VB12	200 µg/ml	
3	Vide			
4	Liquide	FI biotinylé	3 ng/ml	porc
		Dicyanocobinamide	60 ng/ml	
5	Comprimé	Dithioérythritol (DTE)	12.5 mg/ml	
6	Liquide	Hydroxyde de sodium (NaOH)	0.75 N	
		Cyanure de potassium (KCN)	3 mM	
7 – 8	Vide			

a. Les puits sont numérotés consécutivement, depuis l'extrémité la plus large de la cartouche.

b. Valeur nominale par puits dans une cartouche.

Risque et sécurité



H290, H314, H317
P280, P301 + P310 + P331, P303 + P361 + P353 + P310,
P305 + P351 + P338, P390, P501



Danger

Peut être corrosif pour les métaux. Provoque des brûlures de la peau et des lésions oculaires graves. Peut provoquer une allergie cutanée.

Porter des gants de protection/des vêtements de protection/un équipement de protection des yeux/du visage. EN CAS D'INGESTION: appeler immédiatement un CENTRE ANTIPOISON ou un médecin. NE PAS faire vomir. EN CAS DE CONTACT AVEC LA PEAU (ou les cheveux): enlever immédiatement les vêtements contaminés. Rincer la peau à l'eau/se doucher. Appeler immédiatement un CENTRE ANTIPOISON ou un médecin. EN CAS DE CONTACT AVEC LES YEUX: rincer avec précaution à l'eau pendant plusieurs minutes. Enlever les lentilles de contact si la victime en porte et si elles peuvent être facilement enlevées. Continuer à rincer. Absorber toute substance répandue pour éviter qu'elle attaque les matériaux environnants. Éliminer les contenus et les contenants conformément à toutes les réglementations locales, régionales et nationales.

Contient : Hydroxyde de sodium; 5-chloro-2-méthyl-3(2h)-isothiazolone mixture with 2-méthyl-3(2h)-isothiazolone

Les fiches de sécurité sont disponibles sur siemens.com/healthcare

Précautions :

Après utilisation, les récipients de réaction contiennent des liquides biologiques humains. Les manipuler avec soin pour éviter tout risque de contact avec la peau ou d'ingestion. Les récipients sont à usage unique. Pour diagnostic *in vitro*.

Préparation des réactifs : Le système Dimension® EXL™ effectue automatiquement l'hydratation, la dilution et le mélange.

Conservation : 2 et 8 °C

Expiration : Voir la date d'expiration indiquée sur l'emballage de chaque cartouche de réactifs non ouverte. Les puits fermés sont stables sur l'instrument pendant 30 jours.

Stabilité des puits ouverts : 3 jours pour les puits 1 – 2 et 4 – 6

Prélèvement et manipulation des échantillons

Types d'échantillons recommandés : sérum et plasma (héparine-sodium, héparine-lithium et EDTA).

Il n'est pas possible d'utiliser des échantillons et des contrôles stabilisés à l'aide d'azide.

Les échantillons sont stables à température ambiante pendant maximum 24 heures. Les échantillons peuvent être conservés au réfrigérateur entre 2 et 8 °C jusqu'à 48 heures. Si le test a lieu après plus de 48 heures, les échantillons doivent être congelés au moins à -20 °C. Bien mélanger après décongélation. Ne pas congeler et décongeler l'échantillon plusieurs fois.⁹

Protéger les échantillons de la lumière. Ne pas utiliser d'échantillons hémolysés.⁹

Suivre les instructions d'utilisation et de traitement fournies avec le dispositif de prélèvement des échantillons.¹⁰

Une coagulation complète doit avoir lieu avant la centrifugation. Le sérum ou le plasma doit être physiquement séparé des cellules aussitôt que possible, au maximum deux heures après le prélèvement. Les échantillons doivent être dépourvus de particules.¹¹

Les informations relatives à la manipulation et au stockage des échantillons visent à guider les utilisateurs ; ces derniers peuvent toutefois valider leurs propres procédures en matière de manipulation et de stockage des échantillons de patients.

Procédure

Matériel fourni

Cartouche de réactifs LOCI VB12 Flex®, Réf. catalogue RF642

Matériel requis mais non fourni

Calibrateur LOCI ANEMIA, Réf. catalogue RC640

Récipients de réaction, Réf. catalogue RXV1

Nettoyant pour sonde de réactifs, Réf. catalogue RD702

Nettoyant pour sonde échantillon, Réf. catalogue RD703

Matériel de contrôle de qualité

Étapes du test

L'échantillonnage, la distribution des réactifs, le mélange et le traitement sont automatiquement réalisés par le système Dimension® EXL™. Pour les détails du traitement, voir le guide de l'opérateur du système Dimension® EXL™.

Conditions du test

Volume d'échantillon (distribué dans le récipient)	12 µl
Volume de réactif extracteur	15 µl
DTE	12 µl
Volume de réactif FI biotinylé/neutraliseur	50 µl
Volume de réactif Chemibeat	15 µl
Volume de réactif Sensibeat	50 µl
Température	37 °C
Temps de réaction	32 minutes
Longueur d'onde	Illumination 680 nm, émission 612 nm
Type de mesure	Chimioluminescence

Calibration

Matériel de calibration	Calibrateur LOCI ANEMIA, Réf. catalogue RC640
Schéma de calibration	Niveau 1, n = 5 Niveaux 2 – 5, n = 3
Unités	pg/ml [pmol/l] ^c (pg/ml x 0.7378) = [pmol/l]
Niveaux de calibration types	Niveau 1 : 45 pg/ml [33 pmol/l] Niveau 2 : 200 pg/ml [148 pmol/l] Niveau 3 : 500 pg/ml [369 pmol/l] Niveau 4 : 1000 pg/ml [738 pmol/l] Niveau 5 : 2100 pg/ml [1549 pmol/l]
Fréquence de calibration	Tous les 21 jours pour chaque lot
Une nouvelle calibration est requise :	<ul style="list-style-type: none"> Pour chaque nouveau lot de cartouches de réactif Flex® Après une maintenance ou une réparation majeure, en fonction des résultats du contrôle de qualité Comme indiqué dans les procédures de contrôle de qualité du laboratoire Selon les réglementations nationales en vigueur.

c. Les unités SI [Système International d'Unités] sont indiquées entre crochets.

Contrôle de qualité

Se conformer aux réglementations ou exigences d'accréditation réglementaires pour la fréquence de passage du contrôle de qualité. Analyser au moins une fois par jour d'utilisation, deux niveaux d'un matériel de contrôle de qualité (QC), aux concentrations connues de vitamine B12. Si les résultats obtenus ne sont pas compris dans les limites acceptables, suivre les procédures de contrôle de qualité internes du laboratoire.

Résultats : L'instrument calcule automatiquement la concentration de vitamine B12 en pg/ml [pmol/l] suivant le protocole de calcul expliqué dans le manuel d'utilisation du système Dimension® EXL™.

Les résultats de ce test doivent toujours être interprétés en rapport avec les antécédents médicaux du patient, les signes cliniques et autres constatations.

Domaine de mesure analytique (AMR) : 80 – 2000 pg/ml [59 – 1476 pmol/l]

Il s'agit du domaine des valeurs d'analyte pouvant être mesurées directement dans l'échantillon sans dilution ni traitement préalable, en dehors de la méthode d'analyse usuelle. Ce domaine est équivalent au domaine de mesure.

- Les échantillons dont les résultats sont supérieurs à 2000 ng/ml [1476 nmol/l] sont signalés comme « supérieurs au domaine de mesure » et doivent être répétés à la dilution.
Dilution manuelle : Diluer dans de l'eau de qualité réactif pour obtenir des résultats compris dans le domaine de mesure analytique. Facteur de dilution recommandé = 3. Saisir le facteur de dilution sur l'instrument. Nouvel essai. Le résultat lu tient compte de la dilution.
Dilution automatique (DA) : Le volume d'échantillon pour une autodilution est 4 µl (facteur de dilution = 3) pour le sérum et le plasma. Se reporter au manuel du système Dimension®.
- Les échantillons dont les résultats sont inférieurs à 80 pg/ml [59 pmol/l] doivent apparaître comme « inférieurs à 80 pg/ml [59 pmol/l] ».

Limites de la procédure

Le système de rapport de l'instrument comprend des indicateurs et des commentaires qui fournissent à l'opérateur des informations concernant les erreurs de traitement de l'instrument, les informations d'état de l'instrument et les erreurs potentielles dans les résultats relatifs à la vitamine B12. Pour connaître la signification de ces indicateurs et commentaires, voir le manuel de l'opérateur du système Dimension® EXL™. Les rapports contenant des indicateurs et/ou des commentaires doivent être traités conformément au manuel des procédures du laboratoire.

Les échantillons de patients peuvent contenir des anticorps hétérophiles susceptibles de réagir dans les immunodosages et de produire des résultats faussement élevés ou bas. Ce dosage a été conçu pour limiter l'interférence des anticorps hétérophiles. Toutefois, il est impossible de garantir l'élimination complète de ces interférences dans tous les échantillons de patients. Un résultat de test qui n'est pas cohérent avec le tableau clinique et les antécédents du patient doit être interprété avec prudence.^{12,13}

Des anticorps bloquant les facteurs intrinsèques sont présents chez approximativement la moitié des patients atteints d'anémie pernicieuse.¹⁴ Il y a une faible possibilité que ces anticorps ne soient pas complètement inactivés durant l'étape de pré-traitement de réaction. Si les résultats des tests contredisent le diagnostic clinique, l'échantillon peut être testé pour les anticorps bloquant les facteurs intrinsèques.

Selon la loi fédérale des États-Unis, la vente de ce dispositif ne peut être faite que par ou à la demande d'un médecin ou un autre praticien licencié selon les lois de l'État dans lequel il pratique et il ne peut être utilisé que par lui ou sur son ordre.

Substances interférentes

Les interférences générées par la méthode VB12 ont été évaluées d'après le document CLSI/NCCLS EP7-A2.¹⁵ Le biais est la différence de résultats entre l'échantillon de contrôle (sans l'interférent) et l'échantillon de test (avec l'interférent) exprimée en pourcentage. Un biais supérieur à 10 % est considéré comme une interférence.

Le Dextran 40 à 6 g/dl [1500 µmol/l] diminue les résultats relatifs à la vitamine B12 de -14.9 % à 200 pg/ml [148 pmol/l] et -11.8 % à 1000 pg/ml [738 pmol/l].

L'hémoglobine à 500 mg/dl [0.31 mmol/l] augmente les résultats relatifs à la vitamine B12 de 15.2 % à 200 pg/ml [148 pmol/l] et moins de 10 % à 1000 pg/ml [738 pmol/l].

Concentration d'analyte	Niveau de test de biotine (ng/ml)				
	50	100	250	500	1200
	% Biais				
200 pg/ml	1.3	5.9	46	126.1	Supérieur à l'AMR
1000 pg/ml	N/A	2.3	12.4	40.4	Supérieur à l'AMR

• Les échantillons qui contiennent de la biotine à une concentration de 100 ng/ml démontrent une variation des résultats inférieure ou égale à 10 %. Les concentrations de biotine supérieures peuvent provoquer des résultats faussement élevés sur les échantillons de patients.

• La consommation de biotine alimentaire quotidienne recommandée chez l'adulte est de 30 µg/jour. Les suppléments alimentaires en vente libre conseillés pour améliorer la santé des cheveux, de la peau et des ongles peuvent contenir 5 à 100 mg de biotine, et il est recommandé de prendre plusieurs comprimés par jour. Des études pharmacocinétiques réalisées sur des adultes en bonne santé ont démontré que, chez les sujets qui ingèrent des doses de 5 mg, 10 mg et 20 mg de biotine, les concentrations de biotine sérique peuvent atteindre 73 ng/ml, 141 ng/ml et 355 ng/ml, respectivement.¹⁶ Chez les sujets qui prennent jusqu'à 300 mg de biotine par jour, les niveaux de biotine plasmatique peuvent atteindre 1160 ng/ml.¹⁷

Valeurs attendues :

Région	Domaine	
	pg/ml	pmol/l
US	193 – 986	142 – 727
Europe	182 – 625	134 – 461

Pour évaluer les différences qui peuvent être observées concernant la population et le statut alimentaire, chaque laboratoire devrait établir ses propres valeurs attendues pour la vitamine B12, comme réalisé dans le système Dimension® EXL™. Les valeurs indiquées dans le tableau ci-dessus ont été confirmées à l'aide d'un protocole de passage à partir d'études précédentes à l'aide d'échantillons d'une population d'adultes apparemment en bonne santé obtenus aux États-Unis et en Allemagne.

Un dysfonctionnement du système peut survenir si l'écart type maximum acceptable est dépassé.

Concentration de vitamine B12	ET maximum acceptable
200 pg/ml [148 pmol/l]	42 pg/ml [31 pmol/l]
1000 pg/ml [738 pmol/l]	104 pg/ml [77 pmol/l]

Caractéristiques spécifiques de performance

Les données suivantes ont été collectées à l'aide du système Dimension® EXL™ et représentent la performance typique.

Matériel	Moyenne pg/ml [pmol/l]	Précision ^{18,d}	
		Répétabilité	Écart type (CV %) Intra-laboratoire
Contrôle d'immunodosage Bio-Rad Liquichek™			
Niveau 1	290 [214]	13.2 [9.7] (4.6)	15.0 [11.1] (5.2)
Niveau 2	498 [367]	11.7 [8.6] (2.3)	18.2 [13.5] (3.7)
Niveau 3	645 [476]	15.9 [11.7] (2.5)	21.5 [15.9] (3.3)
Pool de sérum 1	180 [133]	10.1 [7.4] (5.6)	11.6 [8.6] (6.5)
Pool de plasma (héparine de lithium)	467 [345]	13.1 [9.7] (2.8)	15.8 [11.7] (3.4)
Pool de sérum 2	978 [722]	24.9 [18.4] (2.5)	27.7 [20.4] (2.8)
Pool de sérum 3	1733 [1279]	27.4 [20.2] (1.6)	35.2 [26.0] (2.0)

d. Le document EP5-A2 du CLSI/NCCLS a été utilisé. Chaque jour de test, deux séries distinctes, avec deux échantillons pour chaque matériel de test, ont été analysées pendant 20 jours. Liquichek™ est une marque commerciale de Bio-Rad Laboratories, Irvine, CA 92618 États-Unis.

Méthode comparative	Pente	IC à 95 %	Comparaison de méthode ¹⁹ Statistiques de régression*		Coefficient de corrélation	n
			Ordonnée à l'origine pg/ml [pmol/l]	IC à 95 % pg/ml [pmol/l]		
Dimension Vista VB12	1.03	1.02 – 1.04	-6.4 [-4.7]	-12.9 – 0.4 [-9.5 – 0.3]	0.997	166 ^e

e. Le document EP9-A2 du CLSI/NCCLS a été utilisé. La droite de régression linéaire a été ajustée à l'aide de la méthode de Passing-Bablok.

f. La plage des valeurs de vitamine B12 dans l'étude de la comparaison de méthode était comprise entre 60 – 1966 pg/ml [44 – 1451 pmol/l]. Le coefficient de corrélation était calculé d'après la régression des moindres carrés.

Équivalence sérum et plasma

Une comparaison des résultats des tests sur le système Dimension® EXL™ pour les tubes de séparation sérique (TSS), les échantillons plasmatiques d'héparine-lithium, d'héparine-sodium et d'EDTA par rapport aux échantillons sériques dans un tube à bouchon rouge est présentée ci-dessous.

Échantillon comparatif	Pente	Ordonnée à l'origine pg/ml [pmol/l]	n
Plasma héparine de lithium	1.00	-4.33 [-3.19]	78
Plasma héparine de sodium	1.02	-10.73 [-7.92]	78
Plasma EDTA	1.00	-7.26 [-5.36]	78
SST de sérum	1.01	-2.31 [-1.70]	78

Spécificité

Interférence HIL (hémolyse, ictère, lipémie)

Les interférences générées par la méthode VB12 ont été évaluées d'après le document CLSI/NCCLS EP7-A2.¹⁵ Le biais est la différence de résultats entre l'échantillon de contrôle (sans l'interférent) et l'échantillon de test (avec l'interférent) exprimée en pourcentage. Un biais supérieur à 10 % est considéré comme une interférence.

Substance testée	Concentration des substances	Vitamine B12 pg/ml [pmol/l]	% de biais*
Hémoglobine (hémolysat)	Hémoglobine (monomère) 500 mg/dl [0.31 mmol/l]	200 [148] 1000 [738]	15 < 10
	300 mg/dl [0.19 mmol/l]	200 [148]	10
	60 mg/dl [1026 µmol/l]	200 [148] 1000 [738]	< 10 < 10
Bilirubine (non conjuguée)	20 mg/dl [342 µmol/l]	200 [148]	< 10
Bilirubine (conjuguée)	3000 mg/dl [33.9 mmol/l]	200 [148] 1000 [738]	< 10 < 10
Lipémie (Intralipid®)		200 [148] 1000 [738]	< 10 < 10

Intralipid® est une marque déposée de Fresenius Kabi AG, Bad Homburg, Allemagne.

*Les résultats de l'analyte ne doivent pas être corrigés en fonction du biais.

Substances non interférentes

Les substances suivantes n'interfèrent pas avec la méthode VB12 lorsqu'elles sont présentes dans le sérum aux concentrations indiquées. Les imprécisions (biais) dues à ces substances ne dépassent pas 10 % à une concentration de vitamine B12 d'environ 200 pg/ml [148 pmol/l] et 1000 pg/ml [738 pmol/l].

Substance	Concentration du test	Unités SI
Acétaminophène	20 mg/dl	1324 µmol/l
Amikacine	8.0 mg/dl	137 µmol/l
Ampicilline	5.3 mg/dl	152 µmol/l
Acide ascorbique	6 mg/dl	342 µmol/l
Caféine	6 mg/dl	308 µmol/l
Carbamazépine	3 mg/dl	127 µmol/l
Chloramphénicol	5.0 mg/dl	155 µmol/l
Chlordiazépoxide	1 mg/dl	33.3 µmol/l
Chlorpromazine	0.2 mg/dl	6.27 µmol/l
Cholestérol	503 mg/dl	13 mmol/l
Cimétidine	2 mg/dl	79.2 µmol/l
Créatinine	30 mg/dl	2.7 mmol/l
Diazépam	0.51 mg/dl	18 µmol/l
Digoxine	6.1 ng/ml	7.8 nmol/l
Érythromycine	6 mg/dl	81.6 µmol/l
Éthanol	400 mg/dl	86.8 mmol/l
Éthosuximide	25 mg/dl	1770 µmol/l
Furosémide	6 mg/dl	181 µmol/l
Gentamicine	1 mg/dl	21 µmol/l
Héparine	3 U/ml	3000 U/l
Ibuprofène	50 mg/dl	2425 µmol/l
Immunoglobuline G	5 g/dl	50 g/l
Lidocaïne	1.2 mg/dl	51.2 µmol/l
Lithium	2.2 mg/dl	3.2 mmol/l
Nicotine	0.1 mg/dl	6.2 µmol/l
Pénicilline G	25 U/ml	25000 U/l
Pentobarbital	8 mg/dl	354 µmol/l
Phénobarbital	10 mg/dl	431 µmol/l
Phénytoïne	5 mg/dl	198 µmol/l
Primidone	4 mg/dl	183 µmol/l
Propoxyphène	0.16 mg/dl	4.91 µmol/l
Protéine : Albumine	6 g/dl	60 g/l
Protéine : Total	12 g/dl	120 g/l
Facteur rhumatoïde	500 IU/ml	500,000 IU/l
Acide salicylique	60 mg/dl	4.34 mmol/l
Théophylline	4 mg/dl	222 µmol/l
Triglycérides	3000 mg/dl	33.9 mmol/l
Urée	500 mg/dl	83.3 mmol/l
Acide urique	20 mg/dl	1.2 mmol/l
Acide valproïque	50 mg/dl	3467 µmol/l
Vancomycine	10 mg/dl	69 µmol/l

Réactivité croisée

Le cobinamide à une concentration de 200 ng/ml [192 nmol/l] a été évalué et une réactivité croisée insignifiante avec le dosage VB12 a été constatée en présence de sérum comprenant environ 200 pg/ml [148 pmol/l] de vitamine B12.

Le pourcentage d'une réactivité croisée a été calculé comme suit :

$$\% \text{ de réactivité croisée} = \frac{[\text{VB12 mesurée}] - [\text{VB12 de contrôle}]}{[\text{composé}]} \times 100$$

Récupération

Des quantités connues de vitamine B12 ont été ajoutées à 2 échantillons de sérum humain, 2 SST, 2 échantillon plasmatiques d'héparine-lithium, 2 d'héparine-sodium et 2 d'EDTA avec des valeurs de base pour la vitamine B12 comprises entre 136 – 197 pg/ml [100 – 145 pmol/l]. Les concentrations des échantillons ont été mesurées et le pourcentage de récupération était compris entre 92.0 % et 108.9 % avec une récupération moyenne de 99.8 %.

$$\% \text{ Récupération} : \frac{[\text{Valeur obtenue}] - [\text{Valeur de référence}]}{[\text{Quantité ajoutée}]} \times 100$$

Exactitude selon la norme de l'OMS 03/178

Une étude a été réalisée pour évaluer l'exactitude du dosage VB12 grâce au standard international de l'OMS 03/178 pour la vitamine B12 à l'aide de deux lots de réactifs Flex® sur deux instruments. Le dosage a montré une différence de 2.1 % par rapport à la valeur cible de 480 pg/ml [354 pmol/l].

Limite de détection et limite du blanc^g

La limite de détection (LDD), pour VB12, est de 50 pg/ml [37 pmol/l], déterminée conformément au document EP17-A du CLSI²⁰ et avec une proportion de faux positifs (α) inférieure à 5 % et de faux négatifs (β) inférieure à 5 % ; sur la base de 168 déterminations, avec 5 échantillons blancs et 9 échantillons bas. La limite de blanc (LDB) est de 30 pg/ml [22 pmol/l].

g. La LDD est la plus faible concentration d'analyte pouvant être détectée de façon fiable. La LDB est la concentration la plus élevée susceptible d'être observée dans un échantillon blanc.

Limite de quantification

La limite de quantification (LDQ) pour la VB12 est de 80 pg/ml [59 pmol/l], déterminée conformément à la directive EP17-A du document CLSI et une imprécision inter-dosage < 20 % du coefficient de variation (CV).

Explication des symboles : Voir le tableau ci-contre.

Bibliographie : Voir le tableau ci-contre.

Dimension®, Dimension Vista®, LOCI® et Flex® sont des marques commerciales de Siemens Healthcare Diagnostics.

© 2014 Siemens Healthcare Diagnostics

Tous droits réservés.

Vedere le sezioni ombreggiate: informazioni aggiornate dalla versione 2019-05.

Data di edizione 2020-08

Vitamina B12 LOCI

Uso previsto: il metodo VB12 è un test diagnostico *in vitro* per la determinazione quantitativa della vitamina B12 (B12) nel siero e nel plasma umani sul sistema di chimica integrato Dimension® EXL™ con LM. Le misurazioni di vitamina B12 possono essere utilizzate nella diagnosi della carenza di vitamina B12.

Riassunto: la vitamina B12, o cobalamina, è una vitamina essenziale con massa molecolare di 1355 Da che si trova in una varietà di cibi quali pesce, crostacei, carni e derivati del latte. Il fattore intrinseco (IF), la transcobalamina II (TCII) e l'aptocorrina (HC) sono le proteine leganti necessarie per l'assimilazione, il trasporto e il rilascio della B12 nel sangue e nei tessuti corporei. La vitamina B12 viene conservata principalmente nel fegato e rilasciata all'occorrenza. L'organismo utilizza la B12 in maniera molto efficiente, riassorbendo la B12 dall'intestino tenue e restituendola al fegato in modo tale che ne viene escretata una minima quantità e le carenze nutrizionali sono estremamente rare.¹ La vitamina B12 è necessaria per la sintesi del DNA, per la normale maturazione dei globuli rossi e per la formazione e la manutenzione della guaina mielinica. Rappresenta inoltre un coenzima nella conversione dell'acido metilmalonico in acido succinico e nella sintesi della metionina.¹

La carenza di vitamina B12 rappresenta una delle cause dell'anemia megaloblastica, una patologia in cui gli eritrociti sono più grandi del normale, con aumentato rapporto tra dimensioni del nucleo e citoplasma cellulare. Dal momento che la carenza di acido folico può anche causare anemia megaloblastica, la misurazione dei livelli sierici di B12 è una parte importante della diagnosi differenziale.¹ Anche la carenza di vitamina B12 causa anemie macrocitarie caratterizzate da maturazione dei globuli rossi anormale e rilascio anticipato dal midollo osseo. L'anemia perniziosa è un'anemia macrocitaria. In questa patologia, l'assenza di IF impedisce il normale assorbimento della B12. Sia nell'anemia megaloblastica da carenza di B12 sia nell'anemia perniziosa, il trattamento con B12 rappresenta la terapia d'elezione.¹

La carenza di vitamina B12 può anche portare allo sviluppo di sintomi neurologici e psichiatrici quali atassia, debolezza, demenza, psicosi e sbalzi d'umore.² Molti pazienti mostrano alterazioni neurologiche senza sviluppare anemia macrocitaria. Le popolazioni a rischio di carenza di B12 comprendono i vegetariani stretti, gli anziani e le categorie con aumentato fabbisogno di B12 associato a gravidanza, tireotossicosi, anemia emolitica, emorragia, patologie maligne e nefropatie/epatopatie.² La diagnosi precoce di carenza di B12 è di importanza cruciale a causa della natura latente di questa condizione e del rischio di danni neurologici irreversibili. Studi recenti suggeriscono che, per aumentare la specificità della diagnosi, oltre ai livelli sierici di B12, andrebbero determinati acido folico, acido metilmalonico e omocisteina.^{3,4,5}

Livelli elevati di B12 vengono osservati nei disordini ematologici (leucemia mielogena cronica, leucemia promielocitica, policitemia vera) e in quelli epatici (epatite acuta, cirrosi, carcinoma epatocellulare).^{2,6}

Principi del metodo: il metodo vitamina B12 è un dosaggio immunoenzimatico omogeneo, chemiluminescente competitivo basato su tecnologia LOCI®. I reagenti LOCI® includono due reagenti sintetici in microsfera e un fattore intrinseco (IF) biotinilato. Il primo reagente in microsfera (Chemibead) è rivestito con un derivato della B12 e contiene un colorante chemiluminescente. Il secondo reagente in microsfera (Sensibead) è rivestito con streptavidina e contiene un colorante fotosensibile. Il campione del paziente viene pretrattato con idrossido di sodio (NaOH) e ditioeritritolo (DTE) per ottenere il distacco della B12 sierica dalle sue proteine carrier. Viene aggiunto cianuro di potassio (KCN) per convertire tutte le forme di B12 in una singola forma di cianocobalamina e quindi viene aggiunta dicianocobinamide per impedire eventuali nuovi legami della B12 con le proteine carrier. Dopo il pre-trattamento del campione, alla provetta di reazione vengono aggiunti in sequenza l'IF biotinilato e i reagenti Chemibead. La vitamina B12 presente nel campione compete con la B12 Chemibead per una limitata quantità di IF biotinilato. Viene quindi aggiunto un reagente Sensibead che si lega alla biotina formando immunocomplessi di microsfera accoppiate. L'illuminazione del complesso a 680 nm genera ossigeno singoletto dai Sensibead che si diffonde ai Chemibead attivando una reazione chemiluminescente. Il segnale risultante viene misurato a 612 nm e rappresenta una funzione inversa della concentrazione di vitamina B12 nel campione.^{7,8}

Reagenti	Pozzetti ^a	Forma	Componente	Concentrazione ^b	Origine
	1	Liquida	Reagente Sensibead VB12	360 µg/ml	<i>E. coli</i> ricombinante
	2	Liquida	Reagente Chemibead VB12	200 µg/ml	
	3	Vuoto			
	4	Liquida	IF biotinilato	3 ng/ml	suina
			Dicianocobinamide	60 ng/ml	
	5	Compresa	Ditioeritritolo (DTE)	12,5 mg/ml	
	6	Liquida	Idrossido di sodio (NaOH)	0,75 N	
			Cianuro di potassio (KCN)	3 mM	
	7 - 8	Vuoto			

a. I pozzetti sono numerati in sequenza a partire dall'estremità larga della cartuccia.
b. Valore nominale per pozzetto in una cartuccia.

Rischio e sicurezza



H290, H314, H317
P280, P301 + P310 + P331, P303 + P361 + P353 + P310,
P305 + P351 + P338, P390, P501

Pericolo!

Può essere corrosivo per i metalli. Provoca gravi ustioni cutanee e gravi lesioni oculari. Può provocare una reazione allergica cutanea.

Indossare guanti/indumenti protettivi/Proteggere gli occhi/il viso. IN CASO DI INGESTIONE: contattare immediatamente un CENTRO ANTIVELENI o un medico. NON provocare il vomito. IN CASO DI CONTATTO CON LA PELLE (o con i capelli): togliersi di dosso immediatamente tutti gli indumenti contaminati. Sciacquare la pelle/fare una doccia. Contattare immediatamente un CENTRO ANTIVELENI o un medico. IN CASO DI CONTATTO CON GLI OCCHI: sciacquare accuratamente per parecchi minuti. Togliere le eventuali lenti a contatto se è agevole farlo. Continuare a sciacquare. Assorbire la fuoriuscita per evitare danni materiali. Smaltire il prodotto e il contenitore in conformità con tutte le disposizioni locali, regionali e nazionali.

Contiene: Idrossido di sodio; 5-chloro-2-methyl-3(2h)-isothiazolone mixture with 2-methyl-3(2h)-isothiazolone

Le schede di sicurezza sono disponibili sul sito siemens.com/healthcare

Precauzioni:

I recipienti di reazione utilizzati contengono liquidi di derivazione umana; maneggiare con cura per evitarne il contatto con la pelle o l'ingestione. I recipienti di reazione sono esclusivamente monouso.

Per uso diagnostico *in vitro*.

Preparazione del reagente: il sistema Dimension® EXL™ effettua automaticamente l'idratazione, la diluizione e la miscelazione.

Conservare a: 2 - 8 °C

Scadenza: per la data di scadenza delle singole cartucce reagenti ancora chiuse, fare riferimento alla confezione. I pozzetti sigillati sullo strumento sono stabili per 30 giorni.

Stabilità pozzetto aperto: 3 giorni per i pozzetti 1 - 2 e 4 - 6

Raccolta e manipolazione dei campioni

Tipi di campioni consigliati: siero e plasma (litio o sodio eparina ed EDTA).

Non è possibile utilizzare campioni e controlli stabilizzati con azide.

I campioni sono stabili a temperatura ambiente per un massimo di 24 ore. È possibile refrigerare i campioni a 2 - 8 °C fino a 48 ore. Qualora il test venisse ritardato di oltre 48 ore, i campioni devono essere congelati almeno a -20 °C. Miscelare bene dopo lo scongelamento. Evitare congelamenti e scongelamenti ripetuti.⁹

Proteggere i campioni dalla luce. Evitare l'uso di campioni emolizzati.⁹

Per l'uso del dispositivo di raccolta dei campioni e l'analisi, seguire le istruzioni fornite con il dispositivo.¹⁰

La formazione completa del coagulo deve avvenire prima della centrifugazione. Siero o plasma devono essere separati fisicamente dalle cellule nel più breve tempo possibile, con un limite massimo di due ore dal prelievo. I campioni devono essere privi di materiale corpuscolato.¹¹

Le informazioni di manipolazione e conservazione dei campioni vengono fornite a scopo di guida per l'utente; tuttavia, l'utente può validare le proprie procedure di manipolazione e conservazione dei campioni dei pazienti.

Procedura

Materiali forniti

Cartuccia reagente LOCI VB12 Flex®, Num. cat. RF642

Materiali necessari ma non forniti

Calibratore LOCI ANEMIA, Num. cat. RC640

Provette di reazione, Num. cat. RXV1

Soluzione di pulizia per la sonda reagenti, Num. cat. RD702

Soluzione di pulizia per la sonda campioni, Num. cat. RD703

Materiali di controllo qualità

Fasi del test

Il sistema Dimension® EXL™ effettua automaticamente il campionamento, l'erogazione del reagente, la miscelazione e il processo di analisi. Per ulteriori informazioni, fare riferimento alla Guida per l'operatore del sistema Dimension® EXL™.

Condizioni del test

Volume di campione (erogato nella provetta)	12 µl
Volume di reagente estraente	15 µl
DTE	12 µl
Volume di reagente IF/neutralizzante biotinilato	50 µl
Volume di reagente Chemibead	15 µl
Volume di reagente Sensibead	50 µl
Temperatura	37 °C
Tempo di reazione	32 minuti
Lunghezza d'onda	Illuminazione 680 nm, emissione 612 nm
Tipo di misurazione	Chemiluminescenza

Calibrazione

Materiale di calibrazione	Calibratore LOCI ANEMIA, Num. cat. RC640
Schema di calibrazione	Livello 1, n = 5 Livelli 2 – 5, n = 3
Unità	pg/ml [pmol/l] ^c (pg/ml x 0.7378) = [pmol/l]
Livelli di calibrazione tipici	Livello 1: 45 pg/ml [33 pmol/l] Livello 2: 200 pg/ml [148 pmol/l] Livello 3: 500 pg/ml [369 pmol/l] Livello 4: 1000 pg/ml [738 pmol/l] Livello 5: 2100 pg/ml [1549 pmol/l]
Frequenza di calibrazione	Ogni 21 giorni per ciascun lotto
Occorre effettuare una nuova calibrazione:	<ul style="list-style-type: none"> Per ogni nuovo lotto di cartucce reagenti Flex® In seguito a manutenzione o riparazione importanti, se indicato dai risultati del controllo qualità Se indicato nelle procedure del controllo qualità del laboratorio Quando richiesto in base alle normative in vigore

c. Le unità SI (Système International d'Unités) sono tra parentesi.

Controllo qualità

Per la frequenza dei controlli qualità seguire le normative in vigore o i requisiti di accreditamento. Almeno una volta per ogni giorno di utilizzo, analizzare due livelli di un materiale di controllo qualità con concentrazioni note di vitamina B12. Seguire le procedure di controllo qualità interne del laboratorio se i risultati ottenuti non rientrano nei limiti accettabili.

Risultati: lo strumento calcola automaticamente la concentrazione di Vitamina B12 in pg/ml [pmol/l], utilizzando lo schema di calcolo descritto nella Guida per l'operatore del sistema Dimension® EXL™.

I risultati di questo test devono essere sempre interpretati alla luce della anamnesi del paziente, della presentazione clinica e valutando contestualmente l'esito di altri accertamenti.

Intervallo di misura analitica (AMR): 80 – 2000 pg/ml [59 – 1476 pmol/l]

È l'intervallo dei valori di analita che è possibile misurare direttamente dal campione senza alcuna diluizione o pretrattamento che non sia parte integrante del processo di analisi abituale ed è equivalente all'intervallo di misura.

- I campioni con risultati superiori a 2000 pg/ml [1476 pmol/l] devono essere refertati come "Superiore all'intervallo di misura" e quindi diluiti e rianalizzati.
Diluizione manuale: utilizzare acqua tipo reagente per ottenere risultati compresi nell'intervallo di misura analitica. Fattore di diluizione raccomandato = 3. Immergere nello strumento il fattore di diluizione. Ri-analisi. La lettura che ne risulta è quella corretta per la diluizione.
Autodiluizione (AD): il volume del campione di autodiluizione è di 4 µl (fattore di diluizione = 3) per siero/plasma. Consultare il manuale del sistema Dimension®.
- I campioni con risultati inferiori a 80 pg/ml [59 pmol/l] devono essere refertati come "inferiori a 80 pg/ml [59 pmol/l]".

Limiti della procedura

Il sistema di refertazione dello strumento prevede avvisi e commenti per fornire all'utente le informazioni sugli eventuali errori di analisi dello strumento, le informazioni sullo stato dello strumento e i potenziali errori nei risultati della vitamina B12. Per il significato di avvisi e commenti nei referti fare riferimento alla Guida per l'operatore di Dimension® EXL™. I referti contenenti avvisi e/o commenti devono essere conservati per il follow-up e gestiti attenendosi al manuale di procedura del laboratorio.

È possibile che i campioni prelevati dai pazienti contengano anticorpi eterofili in grado di reagire negli immunodosaggi producendo risultati errati per eccesso o per difetto. Questo test è stato configurato per ridurre al minimo l'interferenza da anticorpi eterofili. Ciononostante, la completa eliminazione di questa interferenza da tutti i campioni dei pazienti non può essere garantita. Il risultato di un test in contrasto con il quadro clinico e l'anamnesi del paziente deve essere interpretato con cautela.^{12,13}

Anticorpi bloccanti del fattore intrinseco sono presenti in circa la metà dei pazienti con anemia perniciosa.¹⁴ Vi è una possibilità a bassa frequenza che questi anticorpi possano non essere completamente inattivati durante la fase di pretrattamento della reazione. Se i risultati del test sono in conflitto con la diagnosi clinica, il campione può essere testato per gli anticorpi bloccanti del fattore intrinseco.

La legge federale degli Stati Uniti consente la vendita e l'uso di questo dispositivo esclusivamente a medici o di altro professionista abilitato dalle leggi dello Stato in cui esercita, o dietro prescrizione medica.

Sostanze interferenti

Il metodo VB12 è stato valutato per le interferenze in conformità con CLSI/NCCLS EP7-A2.¹⁵ Il bias o imprecisione sistemica è la differenza tra il campione di controllo (senza sostanza interferente) e il campione di test (con sostanza interferente), espressa in percentuale. Un bias superiore al 10% è considerato un'interferenza.

Il destrano 40 a 6 g/dl [1500 µmol/l] riduce i risultati della VB12 del -14.9% a 200 pg/ml [148 pmol/l] e del -11.8% a 1000 pg/ml [738 pmol/l].

L'emoglobina a 500 mg/dl [0.31 mmol/l] aumenta i risultati della VB12 del 15.2% a 200 pg/ml [148 pmol/l] e li riduce a meno del 10% a 1000 pg/ml [738 pmol/l].

Concentrazione di analita	Livello di test biotina (ng/ml)				
	50	100	250	500	1200
	Bias %				
200 pg/ml	1.3	5.9	46	126.1	Superiore all'AMR
1000 pg/ml	N/A	2.3	12.4	40.4	Superiore all'AMR

• I campioni che contengono biotina a una concentrazione di 100 ng/ml dimostrano una variazione nei risultati inferiore o pari al 10%. Concentrazioni di biotina superiori a questa potrebbero portare a risultati falsamente elevati nei campioni dei pazienti.

• L'assunzione giornaliera raccomandata di un adulto di biotina è 30 µg/die. Gli integratori alimentari da banco promossi per la salute dei capelli, della pelle e delle unghie possono contenere 5–100 mg di biotina, con raccomandazioni relative all'assunzione di più compresse al giorno. Studi di farmacocinetica su adulti sani hanno dimostrato che, nei soggetti che assumono 5 mg, 10 mg e 20 mg di biotina, le concentrazioni sieriche di biotina possono raggiungere rispettivamente fino a 73 ng/ml, 141 ng/ml e 355 ng/ml.¹⁶ I soggetti che assumono fino a 300 mg di biotina al giorno possono presentare livelli plasmatici di biotina fino a 1160 ng/ml.¹⁷

Valori attesi:

Regione	Intervallo	
	pg/ml	pmol/l
USA	193 – 986	142 – 727
Europa	182 – 625	134 – 461

Per valutare le differenze che possono essere osservate in relazione alla popolazione e lo stato della dieta, ogni laboratorio dovrebbe stabilire i propri valori attesi per la vitamina B12 come analizzata sul sistema Dimension® EXL™. I valori riportati in tabella sono stati confermati mediante un protocollo di trasferimento da studi precedenti condotti utilizzando campioni da una popolazione di adulti apparentemente sani ottenuti negli Stati Uniti e in Germania.

Il superamento della deviazione standard (SD) massima accettabile può essere dovuto a un malfunzionamento del sistema.

Concentrazione di VB12	SD massima accettabile
200 pg/ml [148 pmol/l]	42 pg/ml [31 pmol/l]
1000 pg/ml [738 pmol/l]	104 pg/ml [77 pmol/l]

Caratteristiche specifiche di prestazione

I seguenti dati sono stati raccolti sul sistema Dimension® EXL™ e rappresentano le prestazioni tipiche.

Materiale	Precisione ^{18,d}		
	Media	Deviazione standard (% CV)	
	pg/ml [pmol/l]	Ripetibilità	Intra-laboratorio
Controllo Immunoassay Bio-Rad Liquechek™			
Livello 1	290 [214]	13.2 [9.7] (4.6)	15.0 [11.1] (5.2)
Livello 2	498 [367]	11.7 [8.6] (2.3)	18.2 [13.5] (3.7)
Livello 3	645 [476]	15.9 [11.7] (2.5)	21.5 [15.9] (3.3)
Pool di siero 1	180 [133]	10.1 [7.4] (5.6)	11.6 [8.6] (6.5)
Pool plasma (litio eparina)	467 [345]	13.1 [9.7] (2.8)	15.8 [11.7] (3.4)
Pool di siero 2	978 [722]	24.9 [18.4] (2.5)	27.7 [20.4] (2.8)
Pool di siero 3	1733 [1279]	27.4 [20.2] (1.6)	35.2 [26.0] (2.0)

d. Sono state utilizzate le linee guida del CLSI/NCCLS EP5-A2. Durante ogni giorno di test, per 20 giorni sono state eseguite due analisi separate, con due campioni di test, per ogni materiale di test. Liquechek™ è un marchio di Bio-Rad Laboratories, Irvine, CA 92618 USA

Confronto dei metodi¹⁹

Metodo comparativo	Pendenza	Statistiche di regressione ^e			Coefficiente di correlazione	n
		95% CI	Intercetta pg/ml [pmol/l]	95% CI pg/ml [pmol/l]		
Dimension Vista VB12	1.03	1.02 – 1.04	-6.4 [-4.7]	-12.9 – 0.4 [-9.5 – 0.3]	0.997	166 ^f

e. Sono state utilizzate le linee guida del CLSI/NCCLS EP9-A2. Per l'adattamento della linea di regressione lineare è stato utilizzato il metodo Passing-Bablok.

f. L'intervallo dei valori di vitamina B12 nello studio di confronto dei metodi è stato 60 – 1966 pg/ml [44 – 1451 pmol/l]. Il coefficiente di correlazione è stato calcolato dalla regressione dei minimi quadrati.

Equivalenza di siero e plasma

I risultati dei test di confronto eseguiti sul sistema Dimension® EXL™ per provette di separazione del siero (SST), plasma litio eparina, sodio eparina e EDTA rispetto ai campioni di siero da una provetta con tappo rosso normale:

Campione comparativo	Pendenza	Intercetta pg/ml [pmol/l]	n
Plasma litio eparina	1.00	-4.33 [-3.19]	78
Plasma sodio eparina	1.02	-10.73 [-7.92]	78
Plasma EDTA	1.00	-7.26 [-5.36]	78
Siero SST	1.01	-2.31 [-1.70]	78

Specificità

Interferenza da emolisi, ittero, lipemia (HIL)

Il metodo VB12 è stato valutato per le interferenze in conformità con CLSI/NCCLS EP7-A2.¹⁵ Il bias o imprecisione sistemica è la differenza tra il campione di controllo (senza sostanza interferente) e il campione di test (con sostanza interferente), espressa in percentuale. Un bias superiore al 10% è considerato un'interferenza.

Sostanza analizzata	Concentrazione della sostanza	Vitamina B12 pg/ml [pmol/l]	% bias*
Emoglobina (emolisato)	Emoglobina (monomero)	200 [148]	15
	500 mg/dl [0.31 mmol/l]	1000 [738]	< 10
	300 mg/dl [0.19 mmol/l]	200 [148]	10
Bilirubina (non coniugata)	60 mg/dl [1026 µmol/l]	200 [148]	< 10
	1000 [738]	1000 [738]	< 10
Bilirubina (coniugata)	20 mg/dl [342 µmol/l]	200 [148]	< 10
	1000 [738]	1000 [738]	< 10
Lipemia (Intralipid®)	3000 mg/dl [33.9 mmol/l]	200 [148]	< 10
	1000 [738]	1000 [738]	< 10

Intralipid® è un marchio registrato di Fresenius Kabi AG, Bad Homburg, Germania.

*I risultati dell'analita non devono essere corretti in base a questo bias.

Sostanze non interferenti

Le seguenti sostanze non interferiscono con il metodo VB12, se presenti nel siero nelle concentrazioni indicate. Le imprecisioni sistematiche (bias) dovute a queste sostanze non superano il 10% a concentrazioni di vitamina B12 pari a 200 pg/ml [148 pmol/l] e 1000 pg/ml [738 pmol/l].

Sostanza	Concentrazione del test	Unità SI
Acetaminofene	20 mg/dl	1324 µmol/l
Amikacina	8.0 mg/dl	137 µmol/l
Ampicillina	5.3 mg/dl	152 µmol/l
Acido ascorbico	6 mg/dl	342 µmol/l
Caffeina	6 mg/dl	308 µmol/l
Carbamazepina	3 mg/dl	127 µmol/l
Cloramfenicolo	5.0 mg/dl	155 µmol/l
Clordiazepossido	1 mg/dl	33.3 µmol/l
Clorpromazina	0.2 mg/dl	6.27 µmol/l
Colesterolo	503 mg/dl	13 mmol/l
Cimetidina	2 mg/dl	79.2 µmol/l
Creatinina	30 mg/dl	2.7 mmol/l
Diazepam	0.51 mg/dl	18 µmol/l
Digossina	6.1 ng/ml	7.8 nmol/l
Eritromicina	6 mg/dl	81.6 µmol/l
Etanolo	400 mg/dl	86.8 mmol/l
Etosuccimide	25 mg/dl	1770 µmol/l
Furosemide	6 mg/dl	181 µmol/l
Gentamicina	1 mg/dl	21 µmol/l
Eparina	3 U/ml	3000 U/l
Ibuprofene	50 mg/dl	2425 µmol/l
Immunoglobulina G	5 g/dl	50 g/l
Lidocaina	1.2 mg/dl	51.2 µmol/l
Litio	2.2 mg/dl	3.2 mmol/l
Nicotina	0.1 mg/dl	6.2 µmol/l
Penicillina G	25 U/ml	25000 U/l
Pentobarbitale	8 mg/dl	354 µmol/l
Fenobarbitale	10 mg/dl	431 µmol/l
Fenitoina	5 mg/dl	198 µmol/l
Primidone	4 mg/dl	183 µmol/l
Propossifene	0.16 mg/dl	4.91 µmol/l
Proteine: Albumina	6 g/dl	60 g/l
Proteine: Totale	12 g/dl	120 g/l
Fattore reumatoide	500 IU/ml	500,000 IU/l
Acido salicilico	60 mg/dl	4.34 mmol/l
Teofillina	4 mg/dl	222 µmol/l
Trigliceridi	3000 mg/dl	33.9 mmol/l
Urea	500 mg/dl	83.3 mmol/l
Acido urico	20 mg/dl	1.2 mmol/l
Acido valproico	50 mg/dl	3467 µmol/l
Vancomicina	10 mg/dl	69 µmol/l

Cross-reattività

È stata valutata la cobinamide ad una concentrazione di 200 ng/ml [192 nmol/l] ed è stata rilevata una cross-reattività insignificante con l'analisi di VB12 quando presente nel siero contenente circa 200 pg/ml [148 pmol/l] di vitamina B12.

La percentuale di cross-reattività è stata calcolata come segue:

$$\% \text{ di cross-reattività} = \frac{[\text{VB12 misurata}] - [\text{VB12 di controllo}]}{[\text{composto}]} \times 100$$

Recupero

Quantità note di vitamina B12 sono state aggiunte a 2 campioni di siero umano e 2 campioni SST, 2 campioni di plasma litio eparina, 2 di sodio eparina e 2 EDTA con valore di B12 al basale tra 136 e 197 pg/ml [100 – 145 pmol/l]. Alla misurazione delle concentrazioni nel campione il recupero percentuale variava dal 92.0% al 108.9% con un recupero medio del 99.8%.

$$\% \text{ Recupero} = \frac{[\text{Valore ottenuto}] - [\text{Basale}]}{[\text{Quantità aggiunta}]} \times 100$$

Accuratezza secondo norme WHO 03/178

Uno studio è stato condotto per valutare l'accuratezza del dosaggio VB12 utilizzando la norma internazionale dell'Organizzazione Mondiale della Sanità 03/178 per la vitamina B12 con due lotti di reagenti Flex® su due strumenti. Il test ha dimostrato una differenza di 2.1% dal valore di riferimento di 480 pg/ml [354 pmol/l].

Limite di rilevazione e limite del bianco®

Il limite di rilevazione (LoD) per VB12 è di 50 pg/ml [37 pmol/l], determinato conformemente alle linee guida EP17-A del CLSI® con proporzioni di falsi positivi (α) inferiori al 5% e falsi negativi (β) inferiori al 5%, e basato su 168 determinazioni, con 5 bianco campione e 9 campioni con livelli bassi. Il limite del bianco (LoB) è di 30 pg/ml [22 pmol/l].

g. Il LoD è la concentrazione minima di analita che è possibile rilevare in modo affidabile. Il LoB è la concentrazione massima che è possibile osservare per un bianco campione.

Limite di quantificazione

Il limite di quantificazione (LoQ) per VB12 è 80 pg/ml [59 pmol/L], valutato conforme alla linea guida EP17-A del CLSI e con un'imprecisione inter-analisi del < 20% del coefficiente di variazione (CV).

Interpretazione simboli: vedere la sezione aggiunta.

Bibliografia: vedere la sezione aggiunta.

Dimension®, Dimension Vista®, LOCI® e Flex® sono marchi di Siemens Healthcare Diagnostics.

© 2014 Siemens Healthcare Diagnostics

Tutti i diritti riservati.

Consulte las secciones sombreadas: Información actualizada desde la versión de 2019-05.

Fecha de la edición 2020-08

LOCI Vitamina B12

Uso previsto: El método VB12 es una prueba de diagnóstico *in vitro* para la determinación cuantitativa de la vitamina B12 (B12) en el suero y el plasma humanos en el sistema integrado de química Dimension® EXL™ con LM. Las mediciones de vitamina B12 se pueden utilizar en el diagnóstico de la carencia de vitamina B12.

Resumen: La vitamina B12, o cobalamina, es una vitamina esencial con una masa molecular de 1355 Da que se encuentra en varios alimentos como el pescado, el marisco, la carne y los productos lácteos. El factor intrínseco (IF), la transcobalamina II (TCII) y la haptocorrina (HC) son proteínas fijadoras necesarias para la asimilación, el transporte y el suministro de B12 a la sangre y los tejidos corporales. La vitamina B12 se almacena principalmente en el hígado y se libera según sea necesario. El cuerpo utiliza la vitamina B12 con una gran eficiencia, reabsorbiéndola del intestino delgado y devolviéndola al hígado de manera que una pequeña cantidad se excrete y su carencia nutritiva sea extremadamente poco frecuente.¹ La vitamina B12 es necesaria para la síntesis del ADN, la maduración normal de los glóbulos rojos y la formación y el mantenimiento de las vainas de mielina. Es una coenzima en la conversión del ácido metilmalónico en ácido succínico y la síntesis de la metionina.¹

La carencia de vitamina B12 es una de las causas de la anemia megaloblástica, una enfermedad en la que el tamaño de los glóbulos rojos es mayor de lo normal y aumenta la proporción del tamaño del núcleo respecto al citoplasma celular. Como la carencia de ácido fólico también puede causar anemia megaloblástica, la medida de los niveles de B12 en suero es una parte importante del diagnóstico diferencial.¹ La carencia de vitamina B12 también provoca anemias macrocíticas caracterizadas por la maduración anormal de los glóbulos rojos y su temprana liberación de la médula ósea. La anemia perniciososa es una anemia macrocítica. En esta enfermedad, la carencia de IF impide la absorción normal de B12. Tanto en la anemia megaloblástica causada por la carencia de B12 como en la anemia perniciososa, el tratamiento terapéutico consiste en administrar B12.¹

La carencia de vitamina B12 también puede producir síntomas psiquiátricos y neurológicos anormales como ataxia, debilidad muscular, demencia, psicosis y trastornos del ánimo.² Muchos pacientes muestran cambios neurológicos sin desarrollar anemia macrocítica. Las poblaciones en riesgo de carencia de B12 incluyen a los vegetarianos estrictos, los ancianos y las personas con mayores necesidades de B12 asociadas al embarazo, el hipertiroidismo, la anemia hemolítica, la hemorragia, los tumores malignos, la nefropatía y la hepatopatía.² El diagnóstico temprano de la carencia de B12 es fundamental, debido a la naturaleza latente de esta enfermedad y al riesgo de daños neurológicos irreversibles. Los estudios recientes sugieren que, además de los niveles de B12 en suero, también deben medirse el ácido fólico, el ácido metilmalónico y la homocisteína para mejorar la especificidad del diagnóstico.^{3, 4, 5}

Se observan niveles elevados de B12 en los trastornos hematológicos (leucemia mielógena crónica, leucemia promielocítica, policitemia vera) y en las enfermedades del hígado (hepatitis aguda, cirrosis, carcinoma hepatocelular).^{2, 6}

Principios del procedimiento: El método de vitamina B12 es un inmunoensayo quimioluminiscente competitivo y homogéneo basado en la tecnología LOCI®. Los reactivos LOCI® incluyen dos reactivos sintéticos en forma de microesferas y un factor intrínseco (IF) biotinilado. El primer reactivo en forma de microesferas (Chemibead) está recubierto con un derivado de B12 y contiene un tinte quimioluminiscente. El segundo reactivo en forma de microesferas (Sensibead) está recubierto con estreptavidina y contiene un colorante fotosensible. La muestra del paciente se trata previamente con hidróxido de sodio (NaOH) y ditioeritritol (DTE) para liberar la B12 en suero de las proteínas transportadoras. Se añade cianuro de potasio (KCN) para convertir todas las formas de B12 en una única forma de cianocobalamina y se añade dicianocobinamida para evitar que la B12 vuelva a unirse a las proteínas transportadoras. Tras el tratamiento previo de la muestra, se añaden secuencialmente el IF biotinilado y los reactivos de Chemibeads al cubilete de reacción. La vitamina B12 de la muestra compete con la Chemibead B12 por una cantidad limitada de IF biotinilado. A continuación, se añade el reactivo Sensibead y se une a la biotina para formar inmunocomplejos de pares de microesferas. La iluminación del complejo a 680 nm genera oxígeno singulete de las Sensibeads que se difunde a las Chemibeads desencadenando una reacción quimioluminiscente. La señal resultante se mide a 612 nm y es una función inversa de la concentración de vitamina B12 en la muestra.^{7, 8}

Reactivos				
Pocillos ^a	Forma	Ingrediente	Concentración ^b	Origen
1	Líquido	Reactivo VB12 Sensibead	360 µg/mL	<i>E. coli</i> recombinante
2	Líquido	Reactivo VB12 Chemibead	200 µg/mL	
3	Vacios			
4	Líquido	IF biotinilado	3 ng/mL	Porcina
		Dicianocobinamida	60 ng/mL	
5	Comprimido	Ditioeritritol (DTE)	12.5 mg/mL	
6	Líquido	Hidróxido de sodio (NaOH)	0.75 N	
		Cianuro de potasio (KCN)	3 mM	
7 – 8	Vacios			

a. Los pocillos están numerados consecutivamente desde el extremo ancho del cartucho.
b. Valor nominal por pocillo en un cartucho.

Riesgos y seguridad



H290, H314, H317
P280, P301 + P310 + P331, P303 + P361 + P353 + P310,
P305 + P351 + P338, P390, P501

iPeligro!

Puede ser corrosivo para los metales. Provoca quemaduras graves en la piel y lesiones oculares graves. Puede provocar una reacción alérgica en la piel.

Llevar guantes/prendas/gafas/máscara de protección. EN CASO DE INGESTIÓN: Llamar inmediatamente a un CENTRO DE INFORMACIÓN TOXICOLÓGICA o a un médico. NO provocar el vómito. EN CASO DE CONTACTO CON LA PIEL (o el pelo): Quitarse inmediatamente las prendas contaminadas. Aclararse la piel con agua o ducharse. Llamar inmediatamente a un CENTRO DE INFORMACIÓN TOXICOLÓGICA o a un médico. EN CASO DE CONTACTO CON LOS OJOS: Aclarar cuidadosamente con agua durante varios minutos. Quitar las lentes de contacto, si lleva y resulta fácil. Seguir aclarando. Absorber el vertido para que no dañe otros materiales. Eliminar el contenido y el recipiente de acuerdo con las normativas locales, regionales y nacionales.

Contiene: Hidróxido de sodio; 5-chloro-2-methyl-3(2h)-isothiazolone mixture with 2-methyl-3(2h)-isothiazolone

Las fichas de datos de seguridad (MSDS/SDS) están disponibles en siemens.com/healthcare

Precauciones:

Los cubiletes de reacción usados contienen fluidos corporales de origen humano; manipular con el cuidado apropiado para evitar el contacto con la piel o la ingestión. Los cubiletes de reacción han sido diseñados para un único uso.

Para uso diagnóstico *in vitro*.

Preparación del reactivo: El sistema Dimension® EXL™ realiza automáticamente la hidratación, la dilución y la mezcla.

Conservar a: 2 – 8 °C.

Caducidad: Consulte en el envase la fecha de caducidad de los cartuchos de reactivos individuales sin abrir. En el instrumento, los pocillos sellados son estables durante 30 días.

Estabilidad de los pocillos abiertos: 3 días para los pocillos 1 – 2 y 4 – 6

Recogida de muestras y manipulación:

Tipos de muestras recomendadas: suero y plasma (heparina de litio o sodio, y EDTA).

No pueden utilizarse muestras y controles estabilizados con azida.

Las muestras son estables a temperatura ambiente durante un máximo de 24 horas. Las muestras pueden almacenarse refrigeradas a una temperatura de 2 – 8 °C durante un máximo de 48 horas. Si las pruebas se retrasan más de 48 horas, las muestras deberán congelarse a una temperatura de -20 °C o inferior. Mézclelas muy bien tras la descongelación. Evite congelar y descongelar las muestras varias veces.⁹

Proteja las muestras de la luz. Evite utilizar muestras hemolizadas.⁹

Siga las instrucciones de uso y procesamiento suministradas con el dispositivo de recogida de muestras.¹⁰

Antes de la centrifugación, debe producirse la formación completa del coágulo. El suero o el plasma deben separarse físicamente de las células lo antes posible, con un límite máximo de dos horas desde el momento de la obtención de la muestra. Las muestras deben estar libres de partículas.¹¹

La información sobre la manipulación y el almacenamiento de las muestras se proporciona con fines orientativos; sin embargo, los usuarios pueden validar sus propios procedimientos de manipulación y almacenamiento de muestras de pacientes.

Procedimiento

Materiales suministrados

Cartucho de reactivos LOCI VB12 Flex®, ref. RF642

Materiales necesarios pero no suministrados

Calibrador LOCI ANEMIA, ref. RC640
Cubiletes de reacción, ref. RXV1
Limpiador de probeta de reactivo, ref. RD702
Limpiador de sonda de muestras, ref. RD703
Materiales de control de calidad

Proceso del análisis

El sistema Dimension® EXL™ realiza de forma automática el muestreo, la dispensación de reactivos, la mezcla y el procesamiento. Para más detalles sobre este proceso, consulte el Manual del usuario del sistema Dimension® EXL™.

Condiciones del análisis

Volumen de la muestra (dispensado en el cubilete)	12 µL
Volumen de reactivo de extracción	15 µL
DTE	12 µL
Volumen de reactivo neutralizante/IF biotinilado	50 µL
Volumen de reactivo Chemibead	15 µL
Volumen de reactivo Sensibead	50 µL
Temperatura	37 °C
Tiempo de reacción	32 minutos
Longitud de onda	Iluminación 680 nm, emisión 612 nm
Tipo de medición	Quimioluminiscencia

Calibración

Material de calibración	Calibrador LOCI ANEMIA, ref. RC640
Esquema de calibración	Nivel 1, n = 5 Niveles 2 – 5, n = 3
Unidades	pg/mL [pmol/L] ^c (pg/mL x 0.7378) = [pmol/L]
Niveles habituales de calibración	Nivel 1: 45 pg/mL [33 pmol/L] Nivel 2: 200 pg/mL [148 pmol/L] Nivel 3: 500 pg/mL [369 pmol/L] Nivel 4: 1000 pg/mL [738 pmol/L] Nivel 5: 2100 pg/mL [1549 pmol/L]
Frecuencia de calibración	Cada 21 días para cualquier lote
Se requiere una nueva calibración:	<ul style="list-style-type: none"> Para cada lote nuevo de cartuchos de reactivos Flex® Después de la realización de importantes tareas de mantenimiento o servicio, si los resultados de control de calidad así lo indican. Tal como se indica en los procedimientos de control de calidad del laboratorio. Cuando es obligatorio según las reglamentaciones gubernamentales.

c. Las unidades del Sistema Internacional de Unidades [unidades SI] se indican entre corchetes.

Control de calidad

Siga las reglamentaciones gubernamentales o los requisitos de acreditación relativos a la frecuencia de control de calidad. Al menos una vez por día de uso, analice dos niveles de un material de control de calidad (CC) con concentraciones conocidas de vitamina B12. Siga los procedimientos internos de CC de su laboratorio si los resultados obtenidos no se encuentran dentro de los límites aceptables.

Resultados: El instrumento calcula automáticamente la concentración de vitamina B12 en pg/mL [pmol/L] utilizando el esquema de cálculo descrito en el Manual del usuario del sistema Dimension® EXL™.

Los resultados de esta prueba deberán interpretarse siempre de acuerdo con la historia clínica del paciente, la sintomatología clínica y otras observaciones.

Rango de medición analítico (AMR): 80 – 2000 pg/mL [59 – 1476 pmol/L]

Se trata del intervalo de valores de analito que puede medirse directamente de la muestra sin requerir dilución ni tratamiento previo y que no es parte del proceso analítico habitual; es equivalente al intervalo del ensayo.

- Las muestras con resultados que superen los 2000 pg/mL [1476 pmol/L] se indican como "Superior al intervalo del ensayo" y se deben volver a analizar realizando una dilución.
Dilución manual: Diluya con agua de grado reactivo para obtener resultados dentro del rango de medición analítico. Factor de dilución recomendado = 3. Introduzca el factor de dilución en el instrumento. Repita el análisis. La lectura resultante se corregirá en función de la dilución.

Autodilución (AD): El volumen de muestra para autodilución es de 4 µL (factor de dilución = 3) para suero/plasma. Consulte el Manual del sistema Dimension®.

- Las muestras con resultados inferiores a 80 pg/mL [59 pmol/L] deben registrarse como "inferiores a 80 pg/mL [59 pmol/L]".

Limitaciones del procedimiento

El sistema de informes del instrumento contiene avisos y comentarios que proporcionan al usuario información sobre los errores de procesamiento del instrumento, sobre el estado del instrumento y sobre errores potenciales en los resultados de vitamina B12. Consulte el Manual del usuario del sistema Dimension® EXL™ para conocer el significado de los avisos y los comentarios de los informes. Cualquier informe que contenga avisos y/o comentarios se debe tratar siguiendo el manual de procedimiento de su laboratorio.

Las muestras de los pacientes pueden contener anticuerpos heterófilos que podrían reaccionar en los inmunoensayos y dar resultados falsamente elevados o reducidos. Este análisis se ha diseñado para reducir al mínimo la interferencia causada por anticuerpos heterófilos. Sin embargo, no es posible garantizar la completa eliminación de esta interferencia de todas las muestras de pacientes. Si el resultado de una prueba se contradice con el cuadro clínico y la historia del paciente, deberá interpretarse con precaución.^{12,13}

Los anticuerpos de bloqueo del factor intrínseco están presentes en aproximadamente la mitad de los pacientes con anemia perniciosa.¹⁴ Existe la posibilidad, poco frecuente, de que estos anticuerpos no puedan desactivarse completamente durante el paso de pretratamiento de la reacción. Si los resultados del análisis contradicen el diagnóstico clínico, puede analizarse la muestra para ver si contiene anticuerpos de bloqueo del factor intrínseco.

La legislación federal de Estados Unidos restringe la venta de este dispositivo a facultativos o a cualquier otro profesional autorizado por las leyes del estado en el que desarrolla su actividad profesional para utilizar u ordenar el uso de este dispositivo.

Sustancias que causan interferencia

Se evaluó la presencia de sustancias de interferencia en el método VB12 según la directriz EP7-A2 del CLSI/NCCLS.¹⁵ La deriva es la diferencia de resultados entre la muestra de control (sin el interferente) y la muestra analizada (que contiene el interferente) expresada en porcentaje. Se considera interferencia una deriva superior al 10%.

El dextrano 40 a 6 g/dL [1500 µmol/L] disminuye los resultados de VB12 en un -14.9% a 200 pg/mL [148 pmol/L] y un -11.8% a 1000 pg/mL [738 pmol/L].

La hemoglobina a 500 mg/dL [0.31 mmol/L] aumenta los resultados de VB12 en un 15.2% a 200 pg/mL [148 pmol/L] y disminuye los resultados en menos de un 10% a 1000 pg/mL [738 pmol/L].

Concentración de analitos	Nivel de análisis de biotina (ng/mL)				
	50	100	250	500	1200
	% Deriva				
200 pg/mL	1.3	5.9	46	126.1	Por encima de AMR
1000 pg/mL	N/A	2.3	12.4	40.4	Por encima de AMR

• Las muestras que contienen biotina en una concentración de 100 ng/mL han demostrado un cambio igual o inferior al 10% en los resultados. Las concentraciones de biotina superiores a esta pueden producir resultados falsamente elevados en las muestras de los pacientes.

• La ingesta alimenticia de biotina recomendada en adultos es de 30 µg/día. Los suplementos alimentarios sin receta que se anuncian para mejorar el estado del cabello, la piel y las uñas pueden contener 5–100 mg de biotina, y lo que se recomienda es tomar varias píldoras al día. En estudios farmacocinéticos en adultos sanos se ha observado que, en individuos que toman 5 mg, 10 mg y 20 mg de biotina, las concentraciones en suero de biotina pueden alcanzar hasta 73 ng/mL, 141 ng/mL y 355 ng/mL, respectivamente.¹⁶ Los individuos que toman hasta 300 mg de biotina al día pueden presentar unos niveles de biotina en plasma de hasta 1160 ng/mL.¹⁷

Valores esperados:

Región	Rango	
	pg/mL	pmol/L
EE. UU.	193 – 986	142 – 727
Europa	182 – 625	134 – 461

Para evaluar las diferencias que se pueden observar con respecto a la población y la dieta, cada laboratorio debe establecer sus propios valores esperados para la vitamina B12 según se realiza en el sistema Dimension® EXL™. Los valores indicados en la tabla anterior se confirmaron mediante un protocolo de transferencia de estudios anteriores realizados con una población de adultos aparentemente sanos de los Estados Unidos y Alemania.

Es posible que el sistema no funcione correctamente si se excede la DE máxima aceptable.

Concentración de VB12	DE máxima aceptable
200 pg/mL [148 pmol/L]	42 pg/mL [31 pmol/L]
1000 pg/mL [738 pmol/L]	104 pg/mL [77 pmol/L]

Características específicas de funcionamiento

Los siguientes datos se registraron en un sistema Dimension® EXL™ y representan su rendimiento habitual.

Material	Precisión ^{18,d}		
	Medía	Desviación estándar (%CV)	
	pg/mL [pmol/L]	Repetibilidad	Intralaboratorio
Control de inmunoensayo Bio-Rad Liquechek™			
Nivel 1	290 [214]	13.2 [9.7] (4.6)	15.0 [11.1] (5.2)
Nivel 2	498 [367]	11.7 [8.6] (2.3)	18.2 [13.5] (3.7)
Nivel 3	645 [476]	15.9 [11.7] (2.5)	21.5 [15.9] (3.3)
Mezcla de sueros 1	180 [133]	10.1 [7.4] (5.6)	11.6 [8.6] (6.5)
Mezcla de plasmas (heparina de litio)	467 [345]	13.1 [9.7] (2.8)	15.8 [11.7] (3.4)
Mezcla de sueros 2	978 [722]	24.9 [18.4] (2.5)	27.7 [20.4] (2.8)
Mezcla de sueros 3	1733 [1279]	27.4 [20.2] (1.6)	35.2 [26.0] (2.0)

d. Se utilizó la directriz EP5-A2 del CLSI/NCCLS. Durante 20 días se analizaron cada día dos ensayos independientes, con dos muestras de análisis para cada material de análisis. Liquechek™ es una marca comercial de Bio-Rad Laboratories, Irvine, CA 92618, EE. UU.

Método comparativo	Comparación de métodos ¹⁹ Estadística de Regresión ^a					
	Pendiente	IC 95%	Intersección pg/mL [pmol/L]	IC 95% pg/mL [pmol/L]	Coefficiente de correlación	n
Dimension Vista VB12	1.03	1.02 – 1.04	-6.4 [-4.7]	-12.9 – 0.4 [-9.5 – 0.3]	0.997	166 ^f

e. Se utilizó la directriz EP9-A2 del CLSI/NCCLS. El método utilizado para ajustar la línea de regresión lineal fue el análisis de Passing Bablok.

f. El rango de valores de vitamina B12 en el estudio de comparación de métodos fue de 60 – 1966 pg/mL [44 – 1451 pmol/L]. El coeficiente de correlación se calculó mediante una regresión por mínimos cuadrados normal.

Equivalencia de suero y plasma

Se muestran los resultados de los análisis de comparación en el sistema Dimension® EXL™ de los tubos separadores de suero (SST), de las muestras de plasma con heparina de litio, heparina de sodio y EDTA frente a las muestras de suero de un tubo normal con tapón rojo.

Muestra comparativa	Pendiente	Intersección pg/mL [pmol/L]	n
Plasma con heparina de litio	1.00	-4.33 [-3.19]	78
Plasma con heparina de sodio	1.02	-10.73 [-7.92]	78
Plasma con EDTA	1.00	-7.26 [-5.36]	78
Tubos separadores de suero (SST)	1.01	-2.31 [-1.70]	78

Especificidad

Interferencia de hemólisis, ictericia y lipemia (HIL)

Se evaluó la presencia de sustancias de interferencia en el método VB12 según la directriz EP7-A2 del CLSI/NCCLS.¹⁵ La deriva es la diferencia de resultados entre la muestra de control (sin el interferente) y la muestra analizada (que contiene el interferente) expresada en porcentaje. Se considera interferencia una deriva superior al 10%.

Sustancia analizada	Concentración de la sustancia	Vitamina B12 pg/mL [pmol/L]	Deriva* %
Hemoglobina (hemolizado)	Hemoglobina (monómero) 500 mg/dL [0.31 mmol/L]	200 [148] 1000 [738]	15 < 10
	300 mg/dL [0.19 mmol/L]	200 [148]	10
Bilirrubina (no conjugada)	60 mg/dL [1026 µmol/L]	200 [148] 1000 [738]	< 10 < 10
	20 mg/dL [342 µmol/L]	200 [148] 1000 [738]	< 10 < 10
Lipemia (Intralipid®)	3000 mg/dL [33.9 mmol/L]	200 [148] 1000 [738]	< 10 < 10

Intralipid® es una marca registrada de Fresenius Kabi AG, Bad Homburg, Alemania.

*Los resultados del análisis no deben corregirse en función de esta deriva.

Sustancias que no causan interferencia

Las siguientes sustancias no interfieren con el método de VB12 si están presentes en el suero en las concentraciones indicadas. Las inexactitudes (derivas) debidas a estas sustancias son inferiores al 10% para concentraciones de vitamina B12 de aproximadamente 200 pg/mL [148 pmol/L] y 1000 pg/mL [738 pmol/L].

Sustancia	Concentración de la muestra	Unidades (SI)
Acetaminofeno	20 mg/dL	1324 µmol/L
Amicacina	8.0 mg/dL	137 µmol/L
Ampicilina	5.3 mg/dL	152 µmol/L
Ácido ascórbico	6 mg/dL	342 µmol/L
Cafeína	6 mg/dL	308 µmol/L
Carbamazepina	3 mg/dL	127 µmol/L
Cloranfenicol	5.0 mg/dL	155 µmol/L
Clordiazepóxido	1 mg/dL	33.3 µmol/L
Clorpromazina	0.2 mg/dL	6.27 µmol/L
Colesterol	503 mg/dL	13 mmol/L
Cimetidina	2 mg/dL	79.2 µmol/L
Creatinina	30 mg/dL	2.7 mmol/L
Diazepam	0.51 mg/dL	18 µmol/L
Digoxina	6.1 ng/mL	7.8 nmol/L
Eritromicina	6 mg/dL	81.6 µmol/L
Etanol	400 mg/dL	86.8 mmol/L
Etosuximida	25 mg/dL	1770 µmol/L
Furosemida	6 mg/dL	181 µmol/L
Gentamicina	1 mg/dL	21 µmol/L
Heparina	3 U/mL	3000 U/L
Ibuprofeno	50 mg/dL	2425 µmol/L
Inmunoglobulina G	5 g/dL	50 g/L
Lidocaína	1.2 mg/dL	51.2 µmol/L
Litio	2.2 mg/dL	3.2 mmol/L
Nicotina	0.1 mg/dL	6.2 µmol/L
Penicilina G	25 U/mL	25000 U/L
Pentobarbital	8 mg/dL	354 µmol/L
Fenobarbital	10 mg/dL	431 µmol/L
Fenitoína	5 mg/dL	198 µmol/L
Primidona	4 mg/dL	183 µmol/L
Propoxifeno	0.16 mg/dL	4.91 µmol/L
Proteína: Albúmina	6 g/dL	60 g/L
Proteína: Total	12 g/dL	120 g/L
Factor reumatoide	500 IU/mL	500,000 IU/L
Ácido salicílico	60 mg/dL	4.34 mmol/L
Teofilina	4 mg/dL	222 µmol/L
Triglicéridos	3000 mg/dL	33.9 mmol/L
Urea	500 mg/dL	83.3 mmol/L
Ácido úrico	20 mg/dL	1.2 mmol/L
Ácido valproico	50 mg/dL	3467 µmol/L
Vancomicina	10 mg/dL	69 µmol/L

Reactividad cruzada

Se evaluó cobinamida a una concentración de 200 ng/mL [192 nmol/L] y se determinó que la reactividad cruzada con el método VB12 es insignificante cuando está presente en suero que contiene aproximadamente 200 pg/mL [148 pmol/L] de vitamina B12.

El porcentaje de reactividad cruzada se calculó de la forma siguiente:

$$\% \text{ de reactividad cruzada} = \frac{[\text{VB12 medida}] - [\text{control VB12}]}{[\text{compuesto}]} \times 100$$

Recuperación

Se añadieron cantidades conocidas de vitamina B12 a 2 muestras de suero humano, 2 tubos separadores de suero (SST), 2 de heparina de litio, 2 de heparina de sodio y 2 de plasma con EDTA con un valor basal de B12 comprendido entre 136 – 197 pg/mL [100 – 145 pmol/L]. Se midieron las concentraciones de las muestras y el porcentaje de recuperación oscilaba entre el 92.0% y el 108.9% con una recuperación media del 99.8%.

$$\% \text{ de recuperación} = \frac{[\text{Valor obtenido}] - [\text{Basal}]}{[\text{Cantidad añadida}]} \times 100$$

Exactitud según el estándar de la OMS 03/178

Se llevó a cabo un estudio para evaluar la exactitud del método VB12 con el Estándar Internacional de vitamina B12 03/178 de la Organización Mundial de la Salud, utilizando dos lotes de reactivos Flex® en dos instrumentos. El método mostró una diferencia del 2.1% con respecto al valor objetivo de 480 pg/mL (354 pmol/L).

Límite de detección y límite del blanco®

El límite de detección (LoD) para VB12 es de 50 pg/mL [37 pmol/L], determinado de acuerdo con la directriz EP17-A del CLSI²⁰ y con proporciones de falsos positivos (α) inferiores al 5% y falsos negativos (β) inferiores al 5%; basado en 168 determinaciones, con 5 muestras en blanco y 9 muestras de bajo nivel. El límite del blanco (LoB) es 30 pg/mL [22 pmol/L].

g. El LoD es la concentración mínima de analito que se puede detectar de manera fiable. El LoB es la concentración más alta que es probable que se observe para una muestra en blanco.

Límite de cuantificación

El límite de cuantificación (LoQ) para VB12 es 80 pg/mL [59 pmol/L] determinado de acuerdo con la directriz EP17-A del CLSI y una imprecisión entre ensayos de < 20% el coeficiente de variación (CV).

Clave de los símbolos: Véase el panel adyacente.

Bibliografía: Véase el panel adyacente.

Dimension®, Dimension Vista®, LOCI® y Flex® son marcas comerciales de Siemens Healthcare Diagnostics.

© 2014 Siemens Healthcare Diagnostics

Reservados todos los derechos.

Bibliography/Literatur/Bibliographie/Bibliografia/Bibliografía

1. Shenkin A, Baines M, Fell G S et al. Vitamins and Trace Elements. Tietz Textbook of Clinical Chemistry and Molecular Diagnostics, Fourth Edition, 2006; 1100-1105.
2. Tietz Clinical Guide to Laboratory Tests. Fourth Edition 2006; 1124-1127.
3. Snow CF. *Laboratory Diagnosis of Vitamin B12 and Folate Deficiency*. Arch Intern Med. 1999; 159:1289-1298.
4. Ward PCJ. *Modern Approaches to the Investigation of Vitamin B12 Deficiency*. Clin Lab Med. 2002; 22:435-445.
5. Klee GG. *Cobalamin and Folate Evaluation: Measurement of Methylmalonic Acid and Homocysteine vs Vitamin B12 and Folate*. Clin Chem. 2000;46: 1277-1283.
6. Ermens AAM, Vlasveld LT, Lindemans J. *Significance of Elevated Cobalamin (Vitamin B12) Levels in Blood*. Clin Biochem. 2003; 36:585-590.
7. Ullman EF, Kirakossian H, Switchenko AC, Ishkanian J, et al., *Luminescent oxygen channeling assay (LOCI®): sensitive, broadly applicable homogeneous immunoassay method*. Clin Chem. 1996; 42:9:1518-1526.
8. Ullman EF, Kirakossian H, Sharat S, Ping Wu Z, Irvin BR, et al. *Luminescent oxygen channeling immunoassay: Measurement of particle binding kinetics by chemiluminescence*. Proc.Natl.Acad.Sci. USA, 1994; 91:5426-5430.
9. Tietz Clinical Guide to Laboratory Tests. Fourth Edition. Alan H. B. Wu editor, 2006; 410-413, 1124-1127.
10. Clinical and Laboratory Standards Institute/NCCLS. *Tubes and Additives for Venous Blood Specimen Collection; Approved Standard—Fifth Edition*. CLSI/NCCLS document H1-A5 [ISBN 1-56238-519-4]. CLSI, 940 West Valley Road, Suite 1400, Wayne, PA 19087-1898 USA, 2003.
11. Clinical and Laboratory Standards Institute/NCCLS. *Procedures for the Handling and Processing of Blood Specimens; Approved Guideline—Third Edition*. CLSI/NCCLS document H18-A3 [ISBN 1-56238-555-0]. CLSI, 940 West Valley Road, Suite 1400, Wayne, PA 19087-1898 USA, 2004.
12. Kricka LJ. *Human anti-animal antibody interference in immunological assays*. Clin Chem. 1999;45: 7:942-956.
13. Vaidya HC, Beatty BG. Eliminating interference from heterophilic antibodies in a two-site immunoassay for creatine kinase MB by using F(ab)2 conjugate and polyclonal mouse IgG. Clin Chem 1992; 38: 1737-1742.
14. Klee GG. Cobalamin and Folate Evaluation: Measurement of Methylmalonic Acid and Homocysteine vs Vitamin B12 and Folate. Clin. Chem. 2000; 46:8(B), 1277-1283.
15. Clinical and Laboratory Standards Institute/NCCLS. *Interference Testing in Clinical Chemistry; Approved Guideline—Second Edition*. CLSI/NCCLS document EP7-A2 [ISBN 1-56238-584-4]. CLSI, 940 West Valley Road, Suite 1400, Wayne, PA 19087-1898 USA, 2005.
16. Grimsey P, Frey N, Bendig G, et al. Population pharmacokinetics of exogenous biotin and the relationship between biotin serum levels and in vitro immunoassay interference. Int. J. Pharmacokinet. 2017;2(4):247-256.
17. Piketty ML, Prie D, Sedel F, et al. High-dose biotin therapy leading to false biochemical endocrine profiles: validation of a simple method to overcome biotin interference. Clin Chem Lab Med. 2017;55(6):817-825
18. Clinical and Laboratory Standards Institute/NCCLS. *Protocols for Determination of Limits of Detection and Limits of Quantitation; Approved Guideline*. CLSI/NCCLS document EP17-A (ISBN 1-56238-551-8). CLSI, 940 West Valley Road, Suite 1400, Wayne, PA 19087-1898,USA 2004.
19. Clinical and Laboratory Standards Institute/NCCLS. *Method Comparison and Bias Estimation Using Patient Samples; Approved Guideline—Second Edition*. CLSI/NCCLS document EP9-A2 [ISBN 1-56238-472-4]. CLSI, 940 West Valley Road, Suite 1400, Wayne, PA 19087-1898 USA, 2002.
20. Clinical and Laboratory Standards Institute/NCCLS. *Protocols for Determination of Limits of Detection and Limits of Quantitation; Approved Guideline*. CLSI/NCCLS document EP17-A (ISBN 1-56238-551-8). CLSI, 940 West Valley Road, Suite 1400, Wayne, PA 19087-1898,USA 2004.

Symbols Key Symbolschlüssel Explication des Symboles Interpretazione simboli Clave de los Símbolos

	Do not reuse / Nicht zur Wiederverwendung / Ne pas réutiliser / Non riutilizzare / No reutilizar
	Use By / Verwendbar bis / Utiliser jusque / Utilizzare entro / Fecha de caducidad
	Batch Code / Chargenbezeichnung / Code du lot / Codice del lotto / Código de lote
	Catalogue Number / Bestellnummer / Référence du catalogue / Numero di catalogo / Número de catálogo
	Caution, consult accompanying documents / Achtung, Begleitdokumente beachten / Attention voir notice d'instructions / Attenzione, vedere le istruzioni per l'uso / Atención, ver instrucciones de uso
	Manufacturer / Hersteller / Fabricant / Fabbricante / Fabricante
	Authorized Representative in the European Community / Bevollmächtigter in der Europäischen Gemeinschaft / Mandataire dans la Communauté européenne / Mandatario nella Comunità Europea / Representante autorizado en la Comunidad Europea
	Contains sufficient for <n> tests / Inhalt ausreichend für <n> Tests / Contenu suffisant pour "n" tests / Contenuto sufficiente per "n" saggi / Contenido suficiente para <n> ensayos
	In Vitro Diagnostic Medical Device / In-Vitro-Diagnostikum / Dispositif médical de diagnostic in vitro / Dispositivo medico-diagnostico in vitro / Producto sanitario para diagnóstico in vitro
	Temperature Limitation / Temperaturbegrenzung / Limites de température / Limiti di temperatura / Limite de temperatura
	Consult Instructions for Use / Gebrauchsanweisung beachten / Consulter les instructions d'utilisation / Consultare le istruzioni per l'uso / Consulte las instrucciones de uso
	Non-sterile / Nicht steril / Non stérile / Non sterile / No estéril
	CE Mark / CE Zeichen / Marquage CE / Marchio CE / Marca CE
	Contents / Inhalt / Contenu / Contenuto / Contenido
	Reconstitution Volume / Rekonstitutionsvolumen / Volume de reconstitution / Volume di ricostituzione / Volumen de reconstitución
	Level / Konzentration / Niveau / Livello / Nivel

2014-10_ERGS

Siemens Healthcare Diagnostics Inc.
500 GBC Drive
Newark, DE 19714 USA

Global Siemens
Headquarters
Siemens AG
Wittelsbacherplatz 2
80333 Muenchen
Germany

Global Siemens
Healthcare Headquarters
Siemens AG
Healthcare Sector
Henkestrasse 127
91052 Erlangen
Germany
Phone: +49 9131 84-0
siemens.com/healthcare

Global Division
Siemens Healthcare
Diagnostics Inc.
511 Benedict Avenue
Tarrytown, NY 10591
USA
siemens.com/healthcare

