

DUALCOUNT

SOLID PHASE NO BOIL ASSAY
For Vitamin B12 / Folic Acid

DPC®

Solid Phase No Boil Dualcount®

English

Intended Use: Solid Phase No Boil Dualcount is a radioassay designed for the simultaneous measurement of vitamin B12 in serum or plasma, and folic acid in serum, plasma or whole blood. The Solid Phase No Boil Vitamin B12 and Solid Phase No Boil Folic Acid kits are designed for single-analyte determinations of vitamin B12 and folic acid, respectively. All three kits are intended strictly for *in vitro* diagnostic use as aids in clinical diagnosis.



	$\mu\text{Ci} / \text{kBq}$		
	Dualcount kit	Vitamin B12 kit	Folic Acid kit
100 Tubes	KDSP1	KVSP1	KFSP1
^{57}Co Vitamin B12	2/74	2/74	—
^{125}I Folic Acid	6/222	—	6/222
200 Tubes	KDSP2	KVSP2	KFSP2
^{57}Co Vitamin B12	4/148	4/148	—
^{125}I Folic Acid	12/444	—	12/444
500 Tubes	KDSP5	KVSP5	KFSP5
^{57}Co Vitamin B12	10/370	10/370	—
^{125}I Folic Acid	30/1110	—	30/1110

Principle of the Procedure

1. Alkaline Denaturation of Endogenous Proteins

2. Competition for Purified Binder at pH 9.3: B12 analogs do not interfere, since the hog intrinsic factor binder is free of R protein. The folic acid binder has equal affinity for MTHF and PGA.

3. Solid Phase Separation

Total Incubation Time: 2 Hours.

Total counts:

^{125}I -folic acid: approximately 80,000 cpm at lodination.

^{57}Co -vitamin B12: approximately 25,000 cpm.

Warnings and Precautions

For *in vitro* diagnostic use.

Reagents: Store at 2–8°C in a refrigerator designated for incoming radioactive materials. Dispose of in accordance with applicable laws.

Do not use reagents beyond their expiration dates.

Some components supplied in this kit may contain human source material and/or other potentially hazardous ingredients which necessitate certain precautions.

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

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

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

A solution containing sodium hydroxide (NaOH) and potassium cyanide (KCN) is supplied with the kit. Extreme care must be observed to avoid all bodily contact with this reagent, since it contains cyanide and strong alkali.

Water: Use distilled or deionized water.

Radioactivity

A copy of any radioisotope license certificate (Specific or General) issued to a US customer must be on file with Diagnostic Products Corporation before kits or components containing radioactive material can be shipped. These radioactive materials may be acquired by any customer with the appropriate Specific license. Under a General license these radioactive materials may be acquired only by physicians, veterinarians in the practice of veterinary medicine, clinical laboratories and hospitals — and strictly for *in vitro* clinical or laboratory tests not

involving external or internal administration of the radioactive material or its radiation to human beings or other animals. Its acquisition, receipt, storage, use, transfer and disposal are all subject to the regulations and a (General or Specific) license of the U.S. Nuclear Regulatory Commission or a State with which the NRC has entered into an agreement for the exercise of regulatory control.

Handle radioactive materials according to the requirements of your General or Specific license. To minimize exposure to radiation, the user should adhere to guidelines set forth in the National Bureau of Standards publication on the *Safe Handling of Radioactive Materials* (Handbook No. 92, issued March 9, 1964) and in subsequent publications issued by State and Federal authorities.

Wipe up spills promptly and decontaminate affected surfaces. Avoid generation of aerosols. Dispose of solid radioactive waste according to license requirements. General licensees (holders of NRC Form 483) may dispose of solid radioactive waste as nonradioactive waste, after removing labeling. Specific licensees (NRC Form 313) should refer to Title 10, Code of Federal Regulations, Part 20. Licensees in Agreement States should refer to the appropriate regulations of their own state. General licensees may dispose of liquid radioactive waste of the type contained in this product through a laboratory sink drain. Licensees must remove or deface labels from empty containers of radioactive materials before disposal of solid waste. Specific licensees may dispose of small quantities of liquid radioactive waste of the type used in this product through a laboratory sink drain. Refer to the appropriate regulations applicable to your laboratory.

Materials Supplied: Initial Preparation

The two components — Vitamin B12/Folic Acid Binder (DSP1) and NaOH/KCN reagent (NHCN) — represent a matched set and are to be used exclusively in combination.

Vitamin B12/Folic Acid Binder and NaOH/KCN reagent supplied in this kit are

not interchangeable with other lots of the same components.

Vitamin B12/Folic Acid Binder (DSP1)

120 mL of a suspension of purified vitamin B12 and folic acid binders immobilized on microcrystalline cellulose particles, with preservative. Stable at 2–8°C for 30 days after opening. Color: orange.

KDSP1, KVSP1, KFSP1: 1 vial

KDSP2, KVSP2, KFSP2: 2 vials

KDSP5, KVSP5, KFSP5: 5 vials

This reagent must be thoroughly suspended before and during use; a magnetic stir bar may be introduced into the vial and stored there. The Binder should be kept in the original wide-mouth vial, which has been treated to prevent adsorption.

NaOH/KCN (NHCN)

15 mL of a solution containing sodium hydroxide (NaOH) and potassium cyanide (KCN), with preservative. Stable at 2–8°C for 30 days after opening. To avoid unnecessary exposure to the atmosphere, recap the bottle immediately after use; otherwise, absorption of CO₂ will gradually result in a change of pH. *Extreme care must be observed to avoid all bodily contact with this reagent.*

KDSP1, KVSP1, KFSP1: 1 vial

KDSP2, KVSP2, KFSP2: 1 vial

KDSP5, KVSP5, KFSP5: 2 vials

Caution! Contains cyanide and strong alkali.

⁵⁷Co Vitamin B12/¹²⁵I Folic Acid Master Tracer (DSP2)

Supplied only in the Dualcount kits.

110 mL of a ready-to-use solution of ⁵⁷Co-vitamin B12 and ¹²⁵I-folic acid. Stable at 2–8°C for 30 days after opening, or until the expiration date marked on the label.

Note: the Master Tracer contains *both* isotopes, whereas the tracers supplied in the single-analyte kits each contain only one isotope.

KDSP1: 1 vial

KDSP2: 2 vials

KDSP5: 5 vials

⁵⁷Co Vitamin B12 (VSP2)

Supplied only in the Vitamin B12 kits.

110 mL of a ready-to-use solution of ⁵⁷Co-vitamin B12. Stable at 2–8°C for 30 days

after opening, or until the expiration date marked on the label.

KVSP1: 1 vial
KVSP2: 2 vials
KVSP5: 5 vials

¹²⁵I Folic Acid (FSP2)

Supplied only in the Folic Acid kits.

110 mL of a ready-to-use solution of ¹²⁵I folic acid, with preservative. Stable at 2–8°C for 30 days after opening, or until the expiration date marked on the label.

KFSP1: 1 vial
KFSP2: 2 vials
KFSP5: 5 vials

Vitamin B12/Folic Acid Calibrators (DSP3–9)

Seven vials, labeled A through G, containing different levels of lyophilized vitamin B12 and folic acid in a protein matrix. Reconstitute the zero calibrator A with **6.0 mL** distilled or deionized water, and the remaining calibrators B through G with **3.0 mL** distilled or deionized water each. Stable at 2–8°C for 30 days after reconstitution, or for 2 months (aliquotted) at –20°C. Avoid excessive exposure to direct light.

KDSP1, KVSP1, KFSP1: 1 set
KDSP2, KVSP2, KFSP2: 1 set
KDSP5, KVSP5, KFSP5: 2 sets

The *lot-specific* values of the calibrators are tabulated in the Radioassay Procedure section. Note that the calibrators supplied with the Solid Phase No Boil Dualcount Kit are *not* interchangeable with those in other DPC kits for vitamin B12 and folic acid. Refer to the vial labels for exact values in appropriate units.

Dithiothreitol Solution (DTT1, 5DTT1)

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

KDSP1, KVSP1, KFSP1: 1 vial x 6 mL (DTT1)
KDSP2, KVSP2, KFSP2: 2 vials x 6 mL (DTT1)
KDSP5, KVSP5, KFSP5: 1 vial x 30 mL (5DTT1)

Anemia Control (ANC)

Lyophilized protein-based control with *lot-specific* vitamin B12 and folic acid concentrations in the deficient range. Reconstitute with **2.0 mL** distilled water.

Stable at 2–8°C for 7 days after reconstitution, or for 2 months (aliquotted) at –20°C. Avoid excessive exposure to direct light.

KDSP1, KVSP1, KFSP1: 1 vial
KDSP2, KVSP2, KFSP2: 1 vial
KDSP5, KVSP5, KFSP5: 1 vial

Materials Required But Not Provided

Gamma Counter: Must be able to discriminate ¹²⁵I from ⁵⁷Co with acceptably low spillover, for simultaneous determinations. A single-channel instrument, set for ⁵⁷Co or ¹²⁵I, is suitable for the single-analyte kits.

Centrifuge: Capable of at least 2000xg. A high-speed, refrigerated model is desirable but not essential. Good results can also be obtained with low-speed, table-top devices, providing the centrifugation time is suitably extended.

Vortex Mixer: The mixer should have the strength to create a vortex in the assay tubes after binder addition. Multiple-tube rack mixers have been found unsuitable for use.

Sterile Distilled Water: For use in the NSB tubes at step 8 of the Radioassay Procedure.

Plastic Containers, with Lids: For preparing the Working Solution.

12x75 mm tubes: Polypropylene tubes (available from DPC) are recommended, but glass and polystyrene tubes have also proved suitable.

Volumetric pipets, 6.0 mL and 3.0 mL: For reconstitution of the calibrators.

Distilled or deionized water: For reconstitution of the calibrators.

Controls: A control with lot-specific values in the deficient range is supplied. Additional materials are available from DPC: CON6 is a tri-level, human serum-based radioassay control containing vitamin B12 and folic acid as two of over 25 assayed constituents.

Micropipet, 200 µL: For sample addition. Disposable-tip pipets with an air interface which prevents the sample from coming into contact with the pipet itself are recommended. The use of positive-

displacement pipets should be avoided because of the risk of carryover.

Micropipet or Dispenser, 50 μ L: For adding the NaOH/KCN. A repeating dispenser has proved reliable and convenient for this reagent addition.

Micropipet or Dispenser, 1,000 μ L: For adding the Working Solution and Vitamin B12/Folic Acid Binder. A repeating dispenser has proved reliable and convenient for these reagent additions.

37°C Waterbath: Do *not* use an oven or a heat block.

Magnetic Stirrer and Stir Bar: For suspending the Vitamin B12/Folic Acid Binder just before and during the addition of this reagent.

Decanting Rack: Foam (or metal) rack capable of holding tubes firmly for simultaneous decanting and draining. Foam racks are available from DPC.

Logit-log graph paper — available from DPC (catalog number: ZP797)

Ascorbic Acid: Required only for whole blood and red cell folic acid determinations. A 1% solution *must be prepared fresh*, on a daily basis. The ascorbic acid crystals should be protected from moisture so that they remain free-flowing, instead of becoming caked from excessive humidity. (Sodium ascorbate is *not* a suitable alternative.)

Foil: Or other means for protecting the hemolysates from light.

Specimen Handling

For folic acid determinations, patient must be in a fasting state.⁴⁰

Sample Type: For vitamin B12 and folic acid determinations, fresh or fresh-frozen serum, heparinized plasma or EDTA plasma may be used. There is no clinically significant interference from the anticoagulants tested.

For whole blood and red cell folic acid determinations, use fresh heparinized or EDTA whole blood. The patient's hematocrit must be known in order to translate whole blood into red cell folic acid results, which are expressed as nanograms per milliliter (ng/mL) of packed red blood cells. Moreover, to calculate the red cell folic acid result exactly, the

patient's serum folic acid level must also be known.

Blood collection tubes from different manufacturers may yield differing values, depending on materials and additives, including gel or physical barriers, clot activators and/or anticoagulants. Solid Phase No Boil Dualcount has not been tested with all possible variations of tube types. Consult the section on Alternate Sample Types for details on tubes that have been tested.

Volume Required: 200 μ L serum, plasma or hemolysate.

Storage and Stability:

Serum or Heparinized Plasma: Storage under suitable conditions is critical for reliable folic acid results. If the sample will *not* be assayed within 8 hours, aliquot and freeze at -20°C : stable for 6–8 weeks.³⁸ Thaw only once (at ambient temperature). Avoid excessive exposure of samples to direct light.

Anti-Folate Drugs: As indicated in the Specificity section, the folate binding protein in the Solid Phase No Boil kit crossreacts to some extent with the "anti-folate" drug methotrexate (MTX), a compound used in the chemotherapy of cancer. Since high-dose infusions of methotrexate may result in circulating levels of 45,000 ng/mL initially and levels in the order of 2,000 ng/mL forty-eight hours later, the kit should *not* be used for folic acid measurements on patients currently receiving the drug. Moreover, great caution must be exercised when interpreting folic acid levels on patients who have recently undergone therapy with methotrexate or any other drug with a similar structure.

Hemolysis: Spuriously elevated serum folic acid results will be obtained to the degree that the sample is hemolyzed, since this vitamin is present in erythrocytes at concentrations many times higher than in plasma. Vitamin B12 results, on the other hand, as measured by the Solid Phase No Boil procedure, are not affected by hemolysis.

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

High Patient Samples: Patient specimens with vitamin B12 or folic acid

concentrations greater than those of the highest calibrator should be diluted with the zero calibrator and reassayed. Exceptionally high vitamin B12 concentrations — as high as 20,000 pg/mL — may be encountered in a few patients with chronic myelogenous leukemia (CML).^{5,35} Since a carryover of even one microliter from such a sample would cause a spurious increase of 100 pg/mL in the next assay tube, standard precautions should be taken: assaying samples in duplicate, changing pipet tips between samples and avoiding the use of positive-displacement micropipets.

Preparation of Hemolysates: This is required only for folic acid determinations on whole blood. Lyse the cells in freshly obtained heparinized or EDTA whole blood by preparing a 1-in-21 dilution of the sample (fully suspended) in freshly prepared 1% ascorbic acid solution; for example, mix **100 µL** of sample with **2.0 mL** of this solution, then vortex. It is important to use ascorbic acid, rather than sodium ascorbate, and to prepare the 1% solution fresh, on a daily basis.³³

The hemolysate may be assayed immediately; no incubation is required. If not assayed immediately, the hemolysate may be stored at room temperature (15–28°C) in the dark for up to 90 minutes. Hemolysates may be stored at 2–8°C for up to 3 hours, or frozen at –20°C for 2 weeks.^{40,41} Protect from light. Note that the radioassay procedure will not yield meaningful vitamin B12 results for red cells or whole blood, since vitamin B12 is destroyed by ascorbic acid.

Radioassay Procedure

All components must be at room temperature (15–28°C) before use.

- 1 Label eighteen tubes in duplicate: T (total counts), NSB (nonspecific binding), A (maximum binding) and B through G. Label additional tubes, also in duplicate, for controls and patient samples.

Vitamin B12

Calibrator	Approximate pg/mL	Approximate pmol/L
A	0	0
B	50	37
C	100	74
D	300	221
E	600	443
F	1,200	885
G	2,400	1,771

Folic Acid

Calibrator	Approximate ng/mL	Approximate nmol/L
A	0	0
B	0.5	1.1
C	1	2.3
D	3	6.8
E	6	13.6
F	12	27.2
G	24	54.5

- 2 Add **200 µL** of the zero calibrator A into the NSB and A tubes, and **200 µL** of the remaining calibrators B through G into correspondingly labeled tubes. Pipet **200 µL** of each control, serum or plasma sample and hemolysate into the tubes prepared. **Pipet directly to the bottom.**

Patient samples expected to contain concentrations greater than the highest calibrator should be diluted in the zero calibrator before assay.

- 3 **Preparation of the Working Solution:** Prepare the Working Solution *no more than 30 minutes before use*. The amount of each component depends on the number of tubes to be assayed. The volumes required, in *milliliters per assay tube*, are tabulated below. Be sure to multiply these volumes by a number slightly greater than the number of tubes to be assayed. (The components are supplied in volumes sufficient for making up the Working Solution in approximately a 10% excess.)

	Milliliters Per Tube
Dithiothreitol	0.05
Tracer	1.0

- 4** Add **1,000 µL** of freshly prepared Working Solution to all tubes. Vortex.

A repeating dispenser is recommended for the 1,000 µL addition here and at step 8 below. Set the T tubes aside for counting at step 12; they require no further processing.

- 5** Incubate for **30 minutes** at room temperature (15–28°C).

The incubation may be extended up to 45 minutes at room temperature.

- 6** Add **50 µL** of NaOH/KCN to all tubes. Vortex.

Use extreme caution in handling this reagent. A repeating dispenser is recommended for this reagent addition. The tubes should now be blue.

- 7** Incubate for 30 minutes at 37°C.

The incubation may be extended up to *at most* 45 minutes at 37°C. (Longer incubations will result in lower vitamin B12 recoveries.)

- 8** Add **1,000 µL** of Vitamin B12/Folic Acid Binder to all tubes *except the NSB tubes*. To the NSB tubes, add **1,000 µL** of sterile distilled water. **Vortex vigorously.**

The tubes should be vortexed *individually* until a vortex appears in the tube. Multiple-tube rack mixers have been found to be inadequate.

The Binder must be kept *well suspended* while being dispensed: mechanical mixing on a magnetic stirrer is recommended. All tubes should now be purple, except for the T and NSB tubes. Just as much of the Binder as is needed for the assay may be poured off into a glass (not plastic!) beaker, equipped with a stir bar, but the remainder should be stored in the original, silanized vial.

- 9** Incubate for **60 minutes** at room temperature (15–28°C).

- 10** Centrifuge for **at least 15 minutes** at 2000xg or higher.

Higher accelerations are acceptable, but glass or polystyrene tubes may break at higher speeds. Longer centrifugation may be necessary with low-speed, table-top centrifuges.

- 11** Decant the supernatants simultaneously, using a rack, and retain the precipitates for counting.

Thorough, uniform decanting, with removal of all visible moisture, will greatly enhance precision. Using a foam decanting rack, decant the contents of all tubes (except the T tubes) and allow them to drain inverted for 5 minutes. Then tap the tubes lightly to remove all residual droplets.

- 12** Count the precipitate for **1 minute** in a gamma counter.

Note that the precipitate contains the bound fraction, not the free.

Calculation and Quality Control

Serum Samples: To obtain vitamin B12 or folic acid concentrations from a logit-log representation of the calibration curve, first calculate for each pair of tubes the average NSB-corrected counts per minute:

Net Counts = (Average CPM) minus (Average **NSB** CPM)

Then determine the binding of each pair of tubes as a percent of maximum binding (MB), with the NSB-corrected counts of the A tubes taken as 100%:

Percent Bound = (Net Counts / Net **MB** Counts) × 100

The calculation can be simplified by omitting the correction for nonspecific binding; samples within range of the calibrators yield virtually the same results when Percent Bound is calculated directly from Average CPM.

Using logit-log graph paper, plot Percent Bound on the vertical (probability) axis against Concentration on the horizontal (logarithmic) axis for each of the nonzero calibrators, and draw a straight line approximating the path of these points. Results for the unknowns may then be read from the line by interpolation.

Data Reduction: It is good practice to construct a graph of the calibration curve

as a visual check on the appropriateness of the transformation used, even where the calculation of results is handled by computer. See further Davis SE et al. Radioimmunoassay data processing with a small programmable calculator. J Immunoassay 1980;1:15-25; and Dudley RA, et al. Guidelines for immunoassay data reduction. Clin Chem 1985;31:1264-71.

Hemolysates: First calculate the result *R* in nanograms per milliliter of hemolysate, using the folic acid calibration curve. Then multiply by the dilution factor 21 to obtain the whole blood folic acid concentration, in ng/mL. For an approximate measure of the packed red cell concentration, again in ng/mL, multiply the whole blood folic acid concentration by $100/H$, where *H* is the hematocrit *in percent*:

$$\text{Red Cell Folic Acid} \approx 21R \times (100 / H)$$

Strictly speaking, the serum folic acid contribution should be subtracted from the whole blood folic acid concentration before multiplying by $100/H$. Using the patient's serum folic acid level *S*, the exact equation is:

$$\text{Red Cell Folic Acid} = (21R - [S \times ((100 - H) / 100)]) \times (100 / H)$$

The term in the square brackets is, however, in most cases so small compared to the term $21R$ that it may be justifiably neglected.

Controls: Use the control supplied with the kit, and chart results from day to day as described in Westgard JO, et al. A multi-rule chart for quality control. Clin Chem 1981;27:493-501. Repeat samples are a valuable additional tool for monitoring interassay precision.

Q. C. Parameters: We recommend keeping track of these performance measures:

T = Total Counts (as counts per minute)

$\%NSB = 100 \times (\text{Average NSB Counts} / \text{Total Counts})$

$\%MB = 100 \times (\text{Net Counts} / \text{Total Counts})$

And the 20, 50 and 80 percent "intercepts," where

20% = Concentration at 20 Percent Bound, etc.

Centrifugation: Use the formulas below to calculate the acceleration of your centrifuge at a given speed, or the speed

(in revolutions per minute) required to achieve the desired *g* force.

$$g \text{ force} = 28.38 \times (\text{rpm} / 1,000)^2 \times \text{radius [inches]}$$

$$\text{rpm} = 187.7 \times \sqrt{(g \text{ force} / \text{radius [inches]})}$$

or

$$g \text{ force} = 11.18 \times (\text{rpm} / 1,000)^2 \times \text{radius [cm]}$$

$$\text{rpm} = 299.07 \times \sqrt{(g \text{ force} / \text{radius [cm]})}$$

Acid: For illustration only, not for calculating results from another run. Because the calibrator values are *lot-specific*, concentrations listed in the right-most column may not match the values of the calibrators supplied in your shipment. (See "Example Run, Vitamin B12" and "Example Run, Folic Acid" tables.)

Expected Values

Reference Range Study

Fresh serum samples from a total of one hundred healthy individuals were assayed for vitamin B12 and folic acid by the DPC Solid Phase No Boil Dualcount kit. The kit was also used for folic acid determinations on whole blood samples from eighty-eight healthy individuals. The reference groups consisted primarily of laboratory personnel, both men and women, in apparent good health. In each case, the reference range was determined nonparametrically as the central region encompassing 95% of the observations. The reference ranges for the Solid Phase No Boil Dualcount kit suggested by this study are tabulated below.

Serum Vitamin B12:	200 – 950 pg/mL	150 – 700 pmol/L
Serum Folic Acid:	3.0 – 17 ng/mL	7 – 39 nmol/L
Whole Blood Folic Acid:	80 – 320 ng/mL	180 – 725 nmol/L
Red Cell Folic Acid:	175 – 700 ng/mL	395 – 1,585 nmol/L

The folic acid reference ranges were confirmed by further studies at two locations on a total of 162 individuals. Note that results near the lower limit of normal — e.g. red cell folic acid results in the 100 to 200 ng/mL range — should be interpreted with caution, in the light of other clinical and laboratory data. Also,

serum folic acid results should be interpreted in the light of *red cell* determinations.

The reference ranges tabulated above were obtained in the United States. Studies performed in Sweden and Norway suggest reference ranges of 100–350 ng/mL and 130–350 ng/mL, respectively, for red cell folic acid. Consider these limits as guidelines only. Each laboratory should establish its own reference ranges.

Vitamin B12: There is no overlap between the 200–950 pg/mL vitamin B12 range for healthy individuals and the absolute range encountered for the confirmed vitamin B12-deficient samples. (See the "Expected Values: Comparative Discrimination Plot" in Tables and Graphs section.) 200 pg/mL may thus be taken as the lower limit of normal for vitamin B12 values measured by the Solid Phase No Boil kit. Note that values less than 200 pg/mL and greater than 124 pg/mL — the highest Solid Phase No Boil value observed for the vitamin B12-deficient samples — should be treated as statistically subnormal; further investigation may be warranted in such cases.

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

Confirmed Vitamin B12-Deficient Samples

DPC has studied over one hundred vitamin B12-deficient samples confirmed as vitamin B12-deficient by independent clinical and hematological criteria.¹⁴ Two reference methods were used: a microbiological method based on *Lactobacillus leichmannii* and DPC's Charcoal Boil Dualcount kit, a radioassay based on heat denaturation, charcoal separation and purified intrinsic factor. On most, but not all of the samples, vitamin B12 values by all three assay methods were available. These clinical results are displayed in a comparative discrimination plot showing the vitamin B12-deficient range for all three methods side by side, and the extent of overlap between normals and deficient for the two

radioassays. (See the "Expected Values: Comparative Discrimination Plot" in the Tables and Graphs section.)

Performance Data

See Tables and Graphs for data representative of the Solid Phase No Boil Dualcount kit's performance. Vitamin B12 results are expressed in pg/mL. Folic Acid results are expressed in ng/mL. Except as noted, all results were generated on serum or on heparinized whole blood.

Vitamin B12 Conversion Factor:

pg/mL $\times$ 0.7378 $\rightarrow$ pmol/L

Folic Acid Conversion Factor:

ng/mL $\times$ 2.266 $\rightarrow$ nmol/L

Calibration Range:

Vitamin B12:
approximately 50 – 2,400 pg/mL
The calibrator values are *lot-specific*.

Folic Acid:
approximately 0.5 – 24 ng/mL.
The calibrator values are *lot-specific*.

Analytical Sensitivity:

Vitamin B12: 34 pg/mL.

Folic Acid: 0.3 ng/mL.

Intraassay Precision (Within-Run):

Statistics were calculated for samples from the results of twenty pairs of tubes in a single assay. (See "Intraassay Precision" tables.)

Interassay Precision (Run-to-Run):

Statistics were calculated from the results of pairs of tubes in eighteen different assays for 14 samples. (See "Interassay Precision" tables.)

Cumulative Interassay Precision:

Cumulative interassay statistics were generated for nine controls over the course of four months. For each control, one pair of tubes was processed in each of approximately 100 assays. The statistics reflect a number of lot changes and the benchwork of several technicians. (See "Cumulative Interassay Precision" tables.)

End-of-Run Effect: Pairs of tubes were spaced throughout an assay involving over 350 tubes. Using a repeating pipet, addition of the Vitamin B12/Folic Acid Binder was completed in eight minutes. The results indicate no position effect due

to delays in the addition of reagents, even in assays of this magnitude.

Specificity

Binder Purity: Two experiments were performed to demonstrate the purity of the intrinsic factor (IF) binder employed in the Solid Phase No Boil Vitamin B12 radioassay.

- Overnight incubation of the Vitamin B12/Folic Acid Binder with serum containing antibodies specific for intrinsic factor resulted in complete destruction of this reagent's ability to bind vitamin B12. Had R protein been present, it would have retained at least some of its vitamin B12-binding capacity.
- Substitution of the Vitamin B12/Folic Acid Binder in a radioassay system based on heat denaturation and coated charcoal, and operating at an assay pH of approximately 2, again produced complete inactivation of the Binder. Had it contained R protein, it would have retained at least some of its activity under these acidic conditions.

Crossreactivity: The specificity of the purified intrinsic factor binder was assessed by assaying a cobinamide preparation. The results show that, even in concentrations as high as 50,000,000 pg/mL, cobinamide causes virtually no reduction in binding of the radiolabeled vitamin B12, i.e. it yields an apparent vitamin B12 concentration at the detection limit; crossreactivity with cobinamide is therefore less than 0.0001%. (See "Specificity 1" table.)

Also studied was the crossreaction between methotrexate (MTX), an antifolate drug, and the folate-binding protein employed in the Solid Phase No Boil kit. The percent crossreactivity, even though numerically small, is clinically significant, since methotrexate is often administered in extremely high doses. Accordingly, folic acid measurements are contraindicated in patients who are undergoing, or who have recently undergone, therapy with this or any structurally related antifolate drug. (See "Specificity 2" table.)

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

Recovery: Six spiking solutions were made using the zero calibrator as diluent. Three solutions (A, B and C) were made to represent 10,000, 20,000 and 30,000 pg/mL of vitamin B12. The other three (D, E and F) were made to represent 60, 120 and 180 ng/mL of folic acid. A 50 µL aliquot of each solution was spiked into 950 µL aliquots of six patient samples, for a spiking ratio of 1-in-20, leaving the matrix of the sample relatively intact. Values tabulated represent recovery of the spiking solution only: the contribution of the serum sample has been subtracted out. Numbers in parentheses are the concentrations of the original unspiked serum samples. (See "Recovery" tables.)

Protein Effect: To determine the effects of variations in protein content on the Solid Phase No Boil procedure, two patient serum samples were spiked with varying amounts of human serum albumin (HSA) and normal human IgG. All samples, spiked and unspiked, were then processed in a single assay. The results show that even large variations in protein content produce only small variations in the observed result. We may conclude that there is no clinically significant protein effect in the Solid Phase No Boil Dualcount system.

Alternate Sample Type: Samples from healthy individuals were collected simultaneously into plain, heparinized and EDTA tubes, then assayed by the Solid Phase No Boil Dualcount procedure. The results indicate that there is no clinically significant interference from the anticoagulants tested. (See "Alternate Sample Type" table.)

Patient Blanks: To verify that DPC's Solid Phase No Boil Dualcount does not suffer from nonspecific binding problems of the kind described in the literature,^{6,24,27,35} an assay was performed which included a calibration curve, calibrator blanks (Binder omitted) and two sets of patient blank tubes. From one set of the patient blank tubes, Solid Phase Binder was simply omitted during the course of the assay. The other set was assayed substituting for the Binder a "Cellulose Blank" reagent: a suspension of cellulose particles identical

to the Solid Phase Binder but for the absence of purified intrinsic factor and folate binding protein. (For purposes of kit evaluation, cellulose blank reagent may be obtained on request from DPC.)

The results indicate that (a) omission of the binder is a suitable alternative to the use of cellulose blank reagent, and (b) nonspecific binding is *uniformly low* for both patient samples and calibrators in the Solid Phase No Boil Dualcount system. Hence a single set of NSB tubes — zero calibrator tubes with binder omitted — suffices for the routine determination of nonspecific binding. Indeed, the NSB tubes may be omitted altogether: calculations show that correction for nonspecific binding can be neglected without any significant effect on results for samples within range of the calibrators. (See "Patient Blanks" tables.)

The Denaturation Step

To test the effectiveness of the 37°C alkaline denaturation step in the Solid Phase No Boil Dualcount system, independent studies were performed with the kit on samples from patients with chronic myelogenous leukemia (CML) and other myeloproliferative disorders, and on pernicious anemia (PA) samples which had been tested for the presence of anti-intrinsic factor blocking antibodies.

CML Samples: In an experiment with the Solid Phase No Boil kit, charcoal precipitation was used to assess nonspecific binding in patient blank tubes at the end of the second incubation. The results showed virtually complete precipitation of the tracer in all tubes; the behavior of CML patient blank tubes in this experiment was similar to that of blanks generated with healthy patient samples. (The two CML samples had vitamin B12 levels on the order of 3,000 and 5,000 pg/mL.) This experiment shows that the 37°C alkaline denaturation step employed in the Solid Phase No Boil system effectively inactivates even the high levels of vitamin B12-binding protein sometimes found in CML patients; for if endogenous carrier protein had escaped denaturation, it would have bound to the tracer, causing a significant amount of radioactivity to remain in the supernatant after charcoal precipitation.

PA Samples: Blocking antibodies specific for intrinsic factor are present in more than half of all patients with pernicious anemia. Fourteen PA samples, seven of them positive for the presence of such antibodies, were assayed both by the Solid Phase No Boil kit and the Charcoal Boil Dualcount kit.⁸ The results show that the 37°C alkaline denaturation step in the Solid Phase No Boil kit is as effective as a boiling step in denaturing anti-intrinsic factor antibodies which would otherwise cause spuriously elevated (false normal) results in many cases of PA.

As further confirmation, four antibody-positive and four antibody-negative PA samples were each subjected to the 37°C alkaline denaturation procedure of the Solid Phase No Boil kit and to a control procedure involving substitution of water for the sodium hydroxide.⁸ Antibody-positive samples subjected to the control procedure retained their ability to block the activity of intrinsic factor, whereas antibody-positive samples subjected to the kit's alkaline denaturation procedure did not: the latter showed behavior indistinguishable from that of the antibody-negative samples, indicating that the kit's "no boil" denaturation step had effectively inactivated the anti-intrinsic factor antibodies present in the positive samples. Note that while the experiments reported here involved many samples with extremely high antibody titers, they cannot rule out the possibility that antibodies in a rare sample with a still higher titer might not be fully denatured by the "no boil" approach. Where such a doubt exists, the "no boil" result can be confirmed by reassaying the sample by the alternate "boil" procedure.

Effect of Incubation Time on

Hemolysates: Blood samples were collected from four individuals into heparinized and EDTA tubes. Hemolysates were prepared by incubating aliquots of each sample with the 1% ascorbic acid solution for increasing lengths of time (0 to 90 minutes in the dark at room temperature (15–28°C) prior to assay. The table shows no significant difference in red cell folic acid results for lysis times ranging from zero to 90 minutes. Accordingly, hemolysates may be assayed immediately following the ascorbic acid dilution step. The table also

shows that results are not influenced by the choice of anticoagulant: either heparinized or EDTA whole blood may be used. (See "Effect of Incubation Time on Hemolysates" table.)

Method Comparison for B12: The assay was compared to DPC's IMMULITE Vitamin B12 assay on 98 patient serum samples. (Concentration range: approximately 128 to 1,037 pg/mL. See Method Comparison graph.) By linear regression:

(SPNB) = 0.98 (IML) – 5.3 pg/mL
r = 0.982

Means:

371 pg/mL (Solid Phase No Boil)
385 pg/mL (IMMULITE – LKVB)

Method Comparison for Folic Acid: The assay was compared to DPC's IMMULITE Folic Acid assay on 71 patient serum samples. (Concentration range: approximately 1.4 to 20 ng/mL. See Method Comparison graph.) By linear regression:

(SPNB) = 0.92 (IML) + 0.71 ng/mL
r = 0.985

Means:

6.2 ng/mL (Solid Phase No Boil)
5.9 ng/mL (IMMULITE – LKFO)

References

1) Allen RH. Clinical role and current status of serum cobalamin (Vitamin B12) assays. *Ligand Quarterly* 1981 Fall;4(3):37-44, 67. 2) Allen RH. Quantitative testing for vitamin B12. *United States Patent* 4,188,189. 1982 Feb 12. 3) Allen RH. Personal communication. 4) Beck WS. More on the vitamin B12 problem. *Ligand Quarterly* 1979 Spring;2(12):10. 5) Chanarin I. *The megaloblastic anaemias*. 2nd ed. Oxford: Blackwell Scientific, 1979. 6) Chen I-W, et al. Clinical significance of serum vitamin B12 measured by radioassay using pure intrinsic factor. *J Nucl Med* 1981;22:447-51. 7) Chen I-W, et al. Semi-automated system for simultaneous assays of serum vitamin B12 and folic acid in serum evaluated. *Clin Chem* 1982;28:2161-5. See also *J Clin Chem Clin Biochem* 1981;19:635. 8) Chen I-W. Personal communication. 9) Cohen KL, Donaldson RM. Unreliability of radiodilution assays as screening tests for cobalamin (vitamin B12) deficiency. *J Am Med Assoc* 1980;244:1942-5. 10) Colman N. Technological factors affecting the use of radioassays in the assessment of nutritional anemias. *Ligand Quarterly* 1981 Fall;4(3):31-6, 67. 11) Conrad ME, et al. Iron, folic acid and vitamin B12. In: Fairbanks VF, editor. *Current hematology*. Vol 1. New York: John Wiley, 1981:

123-90. 12) Cooper BA, Whitehead VM. Evidence that some patients with pernicious anemia are not recognized by radiodilution assay for cobalamin in serum. *New Engl J Med* 1978;299:816-8. See further: editorial by Donaldson RM, *ibid*, 827-8. 13) Cooper BA, et al. Vitamin B12 assay: an evaluation of radiodilution assay using cobinamide to increase specificity. In: Zagalak B, Friedrich W, editors. *Vitamin B12*. Berlin: Walter de Gruyter, 1979: 649-54. See also *Clin Chem* 1979;25(6):abstract no. 369. 14) DPC, Data on file. 15) Food and Drug Administration (FDA), Letters from the Bureau of Medical Devices (BMD) to manufacturers of vitamin B12 radioassay kits (Apr 1980, Jan 1981). 16) Gilbert RB, Mailhot EA. Cobalamin radioassays. *J Am Med Assoc* 1981;246:734-5. 17) Herbert V. The nutritional anemias. *Hosp Pract* 1980 Mar;15(3):65-9, 73-6, 81-3, 87-9. 18) Introduction to folate by radioassay. *Mini-Seminar* 1 no 4. Los Angeles: DPC, 1980. 19) Kolhouse JF, et al. Cobalamin analogues are present in human plasma and can mask cobalamin deficiency because current radioisotope dilution assays are not specific for true cobalamin. *New Engl J Med* 1978;299:785-92. 20) Kondo H, et al. Presence and formation of cobalamin analogues in multivitamin-mineral pills. *J Clin Invest* 1982;70:889-98. 21) Kubasik NP, Ricotta M, Sine HE. Commercially supplied binders for plasma cobalamin (vitamin B12) analysis compared to microbiological assay. *Clin Chem* 1980;26:598-600. 22) Laso F, et al. Intr clinique du dosage de l'acide folique par radio-essai. *Schweiz Med Wochenschr* 1978;108:1393-8. 23) Lee-Own V, et al. Formation of a vitamin B12-serum complex on heating at alkaline pH. *Clin Chim Acta* 1979;93:239-44. 24) LeFebvre RJ, Virji AS, Mertens BF. Erroneously low results due to high nonspecific binding encountered with a radioassay kit that measures "true" serum vitamin B12. *Am J Clin Pathol* 1980;74:209-13. 25) Linnell JC. The value of radioisotopic assays for "serum B12" in the diagnosis of cobalamin deficiency disorders. *Clin Lab Haematol* 1981;3:99-106. 26) Magnus EM, et al. Folate and vitamin B12 (cobalamin) blood levels in elderly persons in geriatric homes. *Scand J Haematol* 1982;28:360-6. 27) Mertens BF. CAP/ASCP presentation. March 1980. Reported in: Byrne M. Caution advised on B12 kits: lower values may not be "truer." *Clin Chem News* 1980 Apr;6(4):1, 5. 28) Mitchell C, et al. Chloral hydrate interferes with radioassay of vitamin B12. *Clin Chem* 1981;27:1480-1. 29) Mollin DL, et al. The serum vitamin B12 level: its assay and significance. *Clinics in Haematol* 1976;5(3):521-46. 30) Mollin DL, Ross GIM. The pathophysiology of vitamin B12 deficiency in the megaloblastic anaemias. In: Heinrich HC, editor. *Vitamin B12 and intrinsic factor*. Stuttgart: Enke, 1961: 413. 31) Nash BJ, Lim-Yin YW. A discrepancy between plasma and serum values for vitamin B12 and folate. *Med Lab Sci* 1979;36:297-8. 32) National Committee for Clinical Laboratory Standards (NCCLS).

Guidelines for evaluating a B12 (cobalamin) assay. (Villanova, PA: NCCLS proposed standard PLSA-12, March 1979). Revised as "NCCLS recommendations with respect to vitamin B12 assays" – presented to the Food and Drug Administration (FDA) panel, 9 July 1979. 33) Netteland B, Bakke OM. Inadequate sample preparation as a source of error in determination of erythrocyte folate by competitive binding radioassay. Clin Chem 1977;23:1505-6. See further: letters by Gutcho S. and by Bakke OM, *ibid*, 1978;24:388-9. 34) R-proteins. Mini-Seminar 2 no. 1. Los Angeles: DPC, 1980. 35) Zucker RM, Podell E, Allen RH. Multiple problems with current no-boil assays for serum cobalamin. Ligand Quarterly 1981 Fall;4(3):52-8. See further: letters by Ziering S, et al, and by Zucker RM, et al, *ibid*, 60-3, and by Allen RH, *ibid*, 1982 Spring;5(1):48-9. 36) El Shami AS, et al. More on vitamin B12 results as measured with boil and no boil kits. Clin Chem 1983;29:2115-6. 37) Carmel R, Sinow RM, Karnaze DS. Atypical cobalamin deficiency: subtle biochemical evidence of deficiency is commonly demonstrable in patients without megaloblastic anemia and is often associated with protein-bound cobalamin malabsorption. J Lab Clin Med 1987;109:454-63. 38) Karnaze DS, Carmel R. Low serum cobalamin levels in primary degenerative dementia: do some patients harbor atypical cobalamin states? Arch Int Med 1987;147:429-31. 39) Tietz NW, editor. Clinical guide to laboratory tests. 3rd ed. Philadelphia: WB Saunders, 1995:246, 636. 40) Burtis CA, Ashwood ER, editors. Tietz textbook of clinical chemistry. 2nd ed. Philadelphia: WB Saunders, 1994:2056. 41) Kubasik NP, Graham M, Sine HE. Storage and stability of folate and vitamin B-12 in plasma and blood samples. Clinica Chimica Acta 1979;95:147-149.

Technical Assistance

In the United States, contact DPC's Technical Services department.
Tel: 800.372.1782, 310.645.8200
Fax: 310.645.9999. To place an order:
Tel: 800.372.1782. Fax: 800.234.4372.
Outside the United States, contact your National Distributor.

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

Tables and Graphs

Example Run, Vitamin B12 (pg/mL)

Tube ¹	Duplicate CPM ²	Average CPM ³	Net CPM ⁴	Percent Bound ⁵	Approx. B12 pg/mL ⁶
T ⁷	22,379 22,214	22,297			
NSB ⁸	112 151	132	0		
A (MB) ⁹	9,312 9,698	9,505	9,373	100%	0
B	8,377 8,341	8,359	8,227	88%	50
C	7,735 7,446	7,591	7,459	80%	100
D	5,748 6,449	6,099	5,967	64%	300
E	4,223 4,152	4,188	4,056	43%	600
F	2,832 2,743	2,788	2,656	28%	1,200
G	1,736 1,757	1,747	1,615	17%	2,400
Unknowns ¹⁰					
X1	7,007 6,985	6,996	6,864	73%	161
X2	4,622 4,629	4,626	4,494	48%	510
X3	3,239 3,239	3,239	3,107	33%	983

Quality Control Parameters:¹¹

T⁷ = 22,297 cpm
%NSB⁸ = 0.59%
%MB⁹ = 42%
20% Intercept¹² = 2,029 pg/mL
50% Intercept = 468 pg/mL
80% Intercept = 108 pg/mL

Example Run, Folic Acid (ng/mL)

Tube ¹	Duplicate CPM ²	Average CPM ³	Net CPM ⁴	Percent Bound ⁵	Approx Folic Acid ng/mL ⁶
T ⁷	68,548 68,625	68,587			
NSB ⁸	279 442	361	0		
A (MB) ⁹	30,232 30,553	30,393	30,032	100%	0
B	25,506 25,907	25,707	25,346	84%	0.5
C	22,556 22,109	22,333	21,972	73%	1.0
D	14,711 14,624	14,668	14,307	48%	3.0
E	9,929 9,551	9,740	9,379	31%	6.0
F	6,606 6,196	6,401	6,040	20%	12
G	3,818 3,894	3,856	3,495	12%	24
Unknowns ¹⁰					
X1	19,129 18,897	19,013	18,652	62%	1.7
X2	11,273 11,309	11,291	10,930	36%	4.9
X3	5,817 5,957	5,887	5,526	18%	13

Quality Control Parameters:¹¹

T⁷ = 68,587 cpm

%NSB⁸ = 0.53%

%MB⁹ = 44%

20% Intercept¹² = 12 ng/mL

50% Intercept = 2.8 ng/mL

80% Intercept = 0.66 ng/mL

Intraassay Precision

Vitamin B12	Mean ¹ pg/mL	SD ²	CV ³
1	211	14	6.6%
2	240	12	5.0%
3	300	13	4.3%
4	522	30	5.7%
5	823	22	2.7%
6	927	18	1.9%

Folic Acid	Mean ¹ ng/mL	SD ²	CV ³
1	2.3	0.12	5.2%
2	2.5	0.09	3.6%
3	5.4	0.23	4.3%
4	5.4	0.33	6.1%
5	11.9	0.29	2.4%
6	13.0	0.33	2.5%

Interassay Precision

Vitamin B12	Mean ¹ pg/mL	SD ²	CV ³
Patients ⁴			
1	222	20	8.9%
2	258	23	5.4%
3	323	25	7.8%
4	439	29	6.5%
5	541	29	5.4%
6	762	29	3.9%
7	805	37	4.6%
8	971	40	4.1%
Controls ⁵			
1	201	19	9.2%
2	242	19	8.0%
3	309	23	7.4%
4	527	33	6.3%
5	835	36	4.3%
6	904	27	3.0%

Folic Acid	Mean ¹ ng/mL	SD ²	CV ³
Patients⁴			
1	2.4	0.18	7.5%
2	3.3	0.26	7.9%
3	3.6	0.24	6.6%
4	4.5	0.24	5.3%
5	4.8	0.37	7.7%
6	4.9	0.22	4.5%
7	6.2	0.27	4.4%
8	9.4	0.44	4.7%
Controls⁵			
1	2.4	0.16	6.7%
2	2.5	0.18	7.2%
3	5.5	0.25	4.6%
4	5.5	0.29	5.3%
5	12.1	0.47	3.9%
6	12.3	0.72	5.8%

Cumulative Interassay Precision

Vitamin B12	Mean ¹ pg/mL	SD ²	CV ³
1	190	21	11.1%
2	221	20	9.0%
3	233	28	12.0%
4	319	29	9.1%
5	365	25	6.8%
6	506	35	6.9%
7	823	43	5.2%
8	858	40	4.7%
9	924	43	5.2%

Folic Acid	Mean ¹ ng/mL	SD ²	CV ³
1	1.9	0.28	15.0%
2	2.3	0.22	9.6%
3	2.4	0.22	9.3%
4	5.1	0.45	8.9%
5	5.3	0.38	7.2%
6	5.6	0.39	7.0%
7	11.5	0.59	5.1%
8	12.0	0.66	5.5%
9	12.2	0.71	5.8%

Specificity 1

Cobinamide ¹	%B/B ₀ ²	Apparent Vitamin B12 Conc. ³	% Cross- reactivity ⁴
50,000 ng/mL	93%	34 pg/mL	0.0001%

Specificity 2

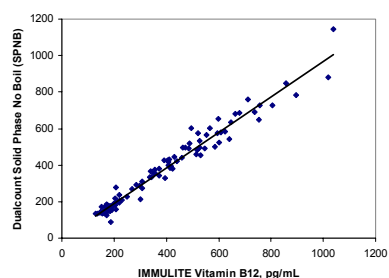
Methotrexate ¹	%B/B ₀ ²	Apparent Folic Acid Conc. ³	% Cross- reactivity ⁴
100 ng/mL	55.6%	3.7 ng/mL	3.7%

Linearity

Vitamin B12 (pg/mL)

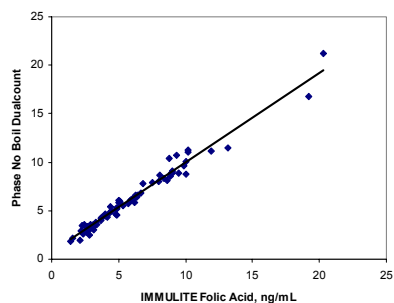
	Dilution ¹	Observed ²	Corrected ³
1	4 in 4 ⁴	1,359	1,359
	3 in 4	992	1,323
	2 in 4	623	1,246
	1 in 4	279	1,116
	Mean (CV) ⁵ :		1,261 (8.6%)
2	4 in 4	1,935	1,935
	3 in 4	1,424	1,899
	2 in 4	952	1,904
	1 in 4	472	1,888
	Mean (CV):		1,907 (1.0%)
3	4 in 4	3,399	3,399
	3 in 4	2,640	3,520
	2 in 4	1,843	3,686
	1 in 4	890	3,560
	Mean (CV):		3,541 (3.3%)

Method Comparison (Vitamin B12)



(SPNB) = 0.98 (IML) – 5.3 pg/mL
 $r = 0.982$

Method Comparison (Folic Acid)



(SPNB) = 0.92 (IML) + 0.71 ng/mL
 $r = 0.985$

Linearity

Folic Acid (ng/mL)

	Dilution ¹	Observed ²	Corrected ³
1	4 in 4 ⁴	7.0	7.0
	3 in 4	5.4	7.2
	2 in 4	3.7	7.4
	1 in 4	2.1	8.4
Mean (CV) ⁵ :		7.5 (8.3%)	
2	4 in 4	8.8	8.8
	3 in 4	6.3	8.4
	2 in 4	4.4	8.8
	1 in 4	2.5	10.0
Mean (CV):		9.0 (7.7%)	
3	4 in 4	10.1	10.1
	3 in 4	7.9	10.5
	2 in 4	5.4	10.8
	1 in 4	2.8	11.2
Mean (CV):		10.7 (4.4%)	

Recovery

Vitamin B12 (pg/mL)

Amount added: ¹	500	1,000	1,500
Sample ²	A	B	C
1 (400)	494	926	1,419
2 (444)	457	966	1,408
3 (521)	448	975	1,464
4 (561)	481	914	1,416
5 (569)	481	947	1,413
6 (598)	520	921	1,389
Mean ± SD: ³	480 ± 26	942 ± 25	1,418 ± 25
% Recovery: ⁴	96 ± 5%	94 ± 3%	95 ± 2%

Folic Acid (ng/mL)

Amount added: ¹	3	6	9
Sample ²	D	E	F
1 (2.2)	3.0	6.3	9.1
2 (2.9)	3.5	6.3	9.6
3 (3.0)	3.3	6.2	9.8
4 (4.1)	3.3	6.2	9.6
5 (4.2)	3.1	5.8	8.9
6 (5.8)	2.9	6.0	9.5
Mean ± SD: ³	3.2 ± 0.22	6.1 ± 0.20	9.4 ± 0.34
% Recovery: ⁴	107 ± 7%	102 ± 3%	104 ± 4%

Alternate Sample Type

Analyte ¹	x	y	Slope ²	Inter-cept ³	r	n
Vitamin B12	Serum ⁴	Heparin ⁵	1.09	−34	.991	29
Vitamin B12	Serum	EDTA	0.97	−7	.985	29
Folic Acid	Serum	Heparin	0.98	+ 0.1	.994	30
Folic Acid	Serum	EDTA	0.97	+ 0.2	.993	30
RBC Folate	Heparin	EDTA	0.97	+ 8	.994	30

Patient Blanks

	Patient Blanks ¹	
	Vitamin B12	Folic Acid
Binder Omitted ²	1.13 ± 0.34%	1.64 ± 0.19%
Cellulose Blanks ³	1.14 ± 0.04%	1.19 ± 0.11%
Mean ± SD; Percent of Total Counts ⁴		
	Binder Omitted ²	
	Vitamin B12	Folic Acid
Calibrators ⁵	0.97 ± 0.05%	1.01 ± 0.01%
Patients ⁶	1.13 ± 0.34%	1.64 ± 0.19%
Mean ± SD; Percent of Total Counts ⁴		

Effect of Incubation Time on Hemolysates

	0 min	15 min	30 min	60 min	90 min
Heparin ¹					
1	314	316	308	318	335
2	175	172	184	173	175
3	178	180	184	172	185
4	133	135	130	131	131
Mean: ²	200	201	202	199	207
EDTA					
1	294	306	312	329	312
2	180	165	176	171	174
3	177	176	180	192	178
4	132	132	127	135	129
Mean:	196	195	199	207	198

Deutsch. Example Run, Vitamin B12:

¹Röhrchen, ²Duplikat CPM, ³Mittelwert CPM, ⁴Netto CPM, ⁵Prozent Bindung, ⁶Ca. Vitamin B12, pg/mL, ⁷Total, ⁸%NSB, ⁹%MB, ¹⁰Unbekannt, ¹¹Qualitätskontrollparameter, ¹²20% Intercept. **Example Run, Folic Acid:** ¹Röhrchen, ²Duplikat CPM, ³Mittelwert CPM, ⁴Netto CPM, ⁵Prozent Bindung, ⁶Ca. Folsäure, ng/mL, ⁷Total, ⁸%NSB, ⁹%MB, ¹⁰Unbekannt, ¹¹Qualitätskontrollparameter, ¹²20% Intercept.

Intraassay Precision & Cumulative

Interassay Precision: ¹Mittelwert, ²SD (Standardabweichung), ³CV (Variationskoeffizient). **Interassay Precision:** ¹Mittelwert, ²SD (Standardabweichung), ³CV (Variationskoeffizient), ⁴Patienten, ⁵Kontrollen. **Linearity:** ¹Verdünnung, ²Beobachtet (B), ³Korrigiert, ⁴8 in 8, ⁵Mittelwert (Variationskoeffizient). **Recovery:** ¹Zugegebene Menge, ²Probe, ³Mittelwert ± SD, ⁴% Wiederfindung. **Specificity 1:** ¹Cobinamid, ²%B/B₀, ³ersichtliche Vitamin B12 Konzentration, ⁴% Kreuzreaktivität. **Specificity 1:** ¹Methotrexat, ²%B/B₀, ³ersichtliche Folsäure Konzentration, ⁴% Kreuzreaktivität. **Alternate Sample Type:** ¹Analyt, ²Steigung, ³y-Achsenabschnitt, ⁴Serum, ⁵Heparin. **Patient Blanks:** ¹Patienten Blank, ²Binder weggelassen, ³Zellulose Blank, ⁴Mittelwert ± SD; Prozent der Total Counts, ⁵Standards, ⁶Patienten. **Effect of Incubation Time on Hemolysates:** ¹Heparin, ²Mittelwert.

Español. Example Run, Vitamin B12: ¹Tubo, ²Duplicado CPM, ³Media CPM, ⁴CPM Netas, ⁵Porcentaje de unión, ⁶Vitamina B12, aprox., pg/mL, ⁷Total, ⁸%NSB, ⁹%MB, ¹⁰No conocidos, ¹¹Parámetros del control de calidad, ¹²Corte al 20%. **Example Run, Folic Acid:** ¹Tubo, ²Duplicado CPM, ³Media CPM, ⁴CPM Netas, ⁵Porcentaje de unión, ⁶Ácido fólico, aprox.,

ng/mL, ⁷Total, ⁸%NSB, ⁹%MB, ¹⁰No conocidos, ¹¹Parámetros del control de calidad, ¹²Corte al 20%. **Intraassay Precision & Cumulative Interassay Precision:** ¹Media, ²DS, ³CV. **Interassay Precision:** ¹Media, ²DS, ³CV, ⁴Pacientes, ⁵Controles. **Linearity:** ¹Dilución, ²Observado (O), ³Corregido, ⁴8 en 8, ⁵Media (CV). **Recovery:** ¹Cantidad añadida, ²Muestra, ³Media ± SD, ⁴% de recuperación. **Specificity 1:** ¹Cobinamida, ²%B/B₀, ³Concentración aparente de vitamina B12, ⁴% Reacción cruzada. **Specificity 1:** ¹Metotrexato, ²%B/B₀, ³Concentración aparente de ácido fólico, ⁴% Reacción cruzada. **Alternate Sample Type:** ¹Analito, ²Pendiente, ³Interceptar, ⁴Suero, ⁵Heparina. **Patient Blanks:** ¹Blancos de pacientes, ²Ligante omitido, ³Blancos de celulosa, ⁴Media ± SD; Porcentaje de cuentas totales, ⁵Calibradores, ⁶Pacientes. **Effect of Incubation Time on Hemolysates:** ¹Heparina, ²Media.

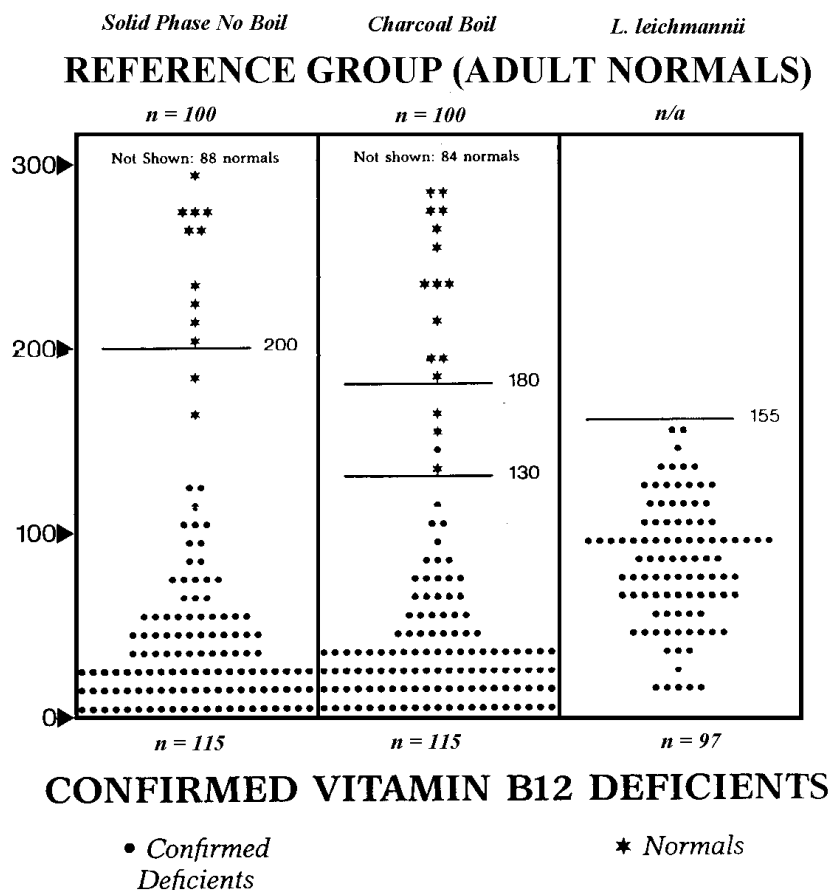
Français. Example Run, Vitamin B12: ¹Tube, ²Duplicate CPM, ³CPM moyen, CPM corrigé, ⁵Pourcentage lié, ⁶Approx. Vitamin B12, pg/mL, ⁷Total, ⁸%NSB, ⁹%MB, ¹⁰Patients, ¹¹Paramètres Contrôle de Qualité, ¹²20% Intercept. **Example Run, Folic Acid:** ¹Tube, ²Duplicate CPM, ³CPM moyen, CPM corrigé, ⁵Pourcentage lié, ⁶Approx. Folates ng/mL, ⁷Total, ⁸%LNS, ⁹%LM, ¹⁰Patients, ¹¹Paramètres Contrôle de Qualité, ¹²20% Intercept. **Intraassay Precision & Cumulative Interassay Precision:** ¹Moyenne, ²SD, ³CV. **Interassay Precision:** ¹Moyenne, ²SD, ³CV, ⁴Patients, ⁵Contrôles. **Linearity:** ¹Dilution, ²Observé (O), ³Corrigés, ⁴8 dans 8, ⁵Moyenne (CV). **Recovery:** ¹Quantité ajoutée, ²Echantillon, ³Moyenne ± SD, ⁴% Récupération. **Specificity 1:** ¹Cobinamide, ²%B/B₀, ³Concentration apparente en vit. B12, ⁴Réaction croisée%. **Specificity 1:** ¹Méthotrexate, ²%B/B₀, ³Concentration apparente en folates, ⁴Réaction croisée%. **Alternate Sample Type:** ¹Analyte, ²Pente, ³Intercept, ⁴Sérum, ⁵Héparine. **Patient Blanks:** ¹Blancs de patients, ²Sans Liant, ³Blanc de Cellulose, ⁴Moyenne ± SD; Pourcent d'activité totale, ⁵Standards, ⁶Patients. **Effect of Incubation Time on Hemolysates:** ¹Héparine, ²Moyenne.

Italiano. Example Run, Vitamin B12: ¹Provetta, ²CPM in duplicato, ³CPM Medio, ⁴CPM Netti, ⁵Percentuale di Legato, ⁶Appross. Vitamina B12, pg/mL, ⁷Totale, ⁸%NSB, ⁹%MB, ¹⁰Non noti, ¹¹Parametri per il Controllo di Qualità, ¹²Intercetta al 20%. **Example Run, Folic Acid:** ¹Provetta, ²CPM in duplicato, ³CPM Medio, ⁴CPM Netti, ⁵Percentuale di Legato, ⁶Appross. Acido Folico, ng/mL, ⁷Totale, ⁸%NSB, ⁹%MB, ¹⁰Non noti, ¹¹Parametri per il Controllo di Qualità, ¹²Intercetta al 20%. **Intraassay Precision & Cumulative Interassay Precision:** ¹Media, ²SD (Deviazione Standard), ³CV (Coefficiente di Variazione). **Interassay Precision:** ¹Media, ²SD (Deviazione Standard), ³CV (Coefficiente di Variazione), ⁴Pazienti, ⁵Controlli. **Linearity:** ¹Diluizione, ²Osservato (O), ³Corretti, ⁴8 in 8,

⁵Media (Deviazione Standard). **Recovery:** ¹Quantità aggiunta, ²Campione, ³Media ± SD, ⁴% Recupero. **Specificity 1:** ¹Cobinamide, ²%B/B₀, ³Concentrazione apparente di Vitamina B12, ⁴Percentuale di Crossreattività. **Specificity 1:** ¹Metotrexato, ²%B/B₀, ³Concentrazione apparente di Acido Folico, ⁴Percentuale di Crossreattività. **Alternate Sample Type:** ¹Analita, ²Slope, ³Intercetta, ⁴Siero, ⁵Eparina. **Patient Blanks:** ¹Bianchi Pazienti, ²Legante Omesso, ³Bianchi Cellulosa, ⁴Media ± SD; Percentuale di Conte Totali, ⁵Calibratori ⁶Pazienti. **Effect of Incubation Time on Hemolysates:** ¹Eparina, ²Media.

Português. Example Run B12: ¹Proveta, ²CPM em duplicado, ³Média CPM, ⁴CPM corrigida, ⁵Percentagem de Ligação, ⁶Aprox. Vitamina B12, pg/mL, ⁷Total, ⁸%NSB, ⁹%MB, ¹⁰Desconhecido, ¹¹Parâmetros do controlo de qualidade, ¹²20% Intercepção. **Example Run, Folic Acid:** ¹Proveta, ²CPM em duplicado, ³CPM Médio, ⁴CPM líquido, ⁵Percentagem de Ligação, ⁶Aprox. Ácido fólico, ng/mL, ⁷Total, ⁸%NSB, ⁹%MB, ¹⁰Desconhecido, ¹¹Parâmetros do controlo de qualidade, ¹²20% Intercepção. **Intraassay Precision & Cumulative Interassay Precision:** ¹Média, ²Desvio padrão, ³Coefficiente de variação. **Interassay Precision:** ¹Média, ²Desvio padrão, ³Coefficiente de variação, ⁴Pacientes, ⁵Controlos. **Linearity:** ¹Diluição, ²Observado (O), ³Corrigido, ⁴8 em 8, ⁵Média (Coefficiente de variação). **Recovery:** ¹Quantidade adicionada, ²Amostra, ³Média ± SD, ⁴% de Recuperação. **Specificity 1:** ¹Cobinamida, ²%B/B₀, ³Concentração aparente de Vitamina B12, ⁴Percentagem de reacção cruzada. **Specificity 1:** ¹Metotrexato, ²%B/B₀, ³Concentração aparente de Ácido fólico, ⁴Percentagem de reacção cruzada. **Alternate Sample Type:** ¹Componente analítico, ²Curva, ³Intercepção, ⁴Soro, ⁵Heparina. **Patient Blanks:** ¹Provetas em branco de pacientes, ²Proteína de ligação omitida, ³Provetas de celulose em branco, ⁴Média ± SD; Percentagem da contagem total, ⁵Calibradores, ⁶Pacientes. **Effect of Incubation Time on Hemolysates:** ¹Heparina, ²Média.

Expected Values: Comparative Discrimination Plot



Deutsch. Solid Phase No Boil: Solid Phase No Boil. Charcoal Boil: Charcoal Boil. Reference Group (Adult Normals): Referenz Gruppe (Normale Erwachsene). Not shown: Nicht gezeigt. Normals: Normale. Confirmed Vitamin B12 Deficients: bestätigter Vitamin B12 Mangel.

Español. Solid Phase No Boil: Fase sólida sin ebullición. Charcoal Boil: Ebullición en Carbono. Reference Group (Adult Normals): Grupo referencia (adultos normales). Not shown: No mostrados. Normals: Normales. Confirmed Vitamin B12 Deficients: Deficiencia confirmada de Vitamina B12.

Français. Solid Phase No Boil: Phase solide sans ébullition. Charcoal Boil: Charbon avec ébullition. Reference Group (Adult Normals): Groupe de référence (Adultes Normaux). Not shown: Non montré. Normals: Normaux. Confirmed Vitamin B12 Deficients: Déficiences confirmées en Vitamine B12.

Italiano. Solid Phase No Boil: Fase Solida Senza Bollitura. Charcoal Boil: Bollitura con Carbone Vegetale. Reference Group (Adult Normals): Gruppo di Riferimento (Adulti Normali). Not shown: Non descritto. Normals: Normali. Confirmed Vitamin B12 Deficients: Campioni con Carenze di Vitamina B12 confermate.

Português. Solid Phase No Boil: Fase Sólida sem Ebulição. Charcoal Boil: Ebulição em Carvão. Reference Group (Adult Normals): Grupo de Referência (Níveis normais, adultos). Not shown: Não ilustrados. Normals: Níveis normais. Confirmed Vitamin B12 Deficients: Deficientes em Vitamina B12 confirmados.

Deutsch

Dualcount Solid Phase "No Boil" für Vitamin B12 und Folsäure

Anwendung: Dualcount Solid Phase (Festphasen) "No Boil" (ohne Hitzedenaturierung) ist ein Radioassay zur simultanen Bestimmung von Vitamin B12 im Serum oder Plasma und Folsäure in Serum, Plasma oder Vollblut. Die Solid Phase „No Boil“ Vitamin B12 und Solid Phase „No Boil“ Folsäure Testbestecke sind für Einzel-Analyt Bestimmungen von Vitamin B12 und Folsäure bestimmt. Alle 3 Testbestecke sind ausschließlich in der In-Vitro-Diagnostik im Zusammenhang mit der klinischen Diagnose einzusetzen.



	$\mu\text{Ci} / \text{kBq}$		
	Dualcount kit	Vitamin B12 kit	Folsäure kit
100 Röhrchen	KDSP1	KVSP1	KFSP1
^{57}Co Vitamin B12	2/74	2/74	—
^{125}I Folsäure	6/222	—	6/222
200 Röhrchen	KDSP2	KVSP2	KFSP2
^{57}Co Vitamin B12	4/148	4/148	—
^{125}I Folsäure	12/444	—	12/444
500 Röhrchen	KDSP5	KVSP5	KFSP5
^{57}Co Vitamin B12	10/370	10/370	—
^{125}I Folsäure	30/1110	—	30/1110

Methodik

1. Alkalische Denaturierung endogener Proteine

2. Konkurrenz um den aufgereinigten Binder bei pH 9,3:

B12 Analoge verursachen keine Störungen, da der Intrinsic Faktor Binder (Schwein) frei von Protein R ist. Der Folsäure Binder hat die gleiche Affinität zu MTHF und PGA.

3. Festphasen Trennung

Testdauer: 2 Stunden.

Totalaktivität:

^{125}I -Folsäure: ca. 80 000 cpm zum Markierungszeitpunkt

^{57}Co -Vitamin B12: ca. 25 000 cpm.

Hinweise und Vorsichtsmaßnahmen

Zur *In-vitro*-Diagnostik.

Reagenzien: Die Packung mit den Reagenzien sollte bei 2–8°C in einem Kühlschrank gelagert werden, der für radioaktives Material ausgewiesen ist. Die Entsorgung muss nach den jeweils gültigen Gesetzen erfolgen.

Die Reagenzien dürfen nur bis zum Verfallsdatum verwendet werden.

Einige Komponenten des Testbestecks können Material humanen Ursprungs und/oder in anderer Weise gefährliche Inhaltsstoffe enthalten, die es unbedingt notwendig machen die folgenden Vorsichtsmaßnahmen einzuhalten.

Die generell geltenden Vorsichtsmaßnahmen sind einzuhalten und alle Komponenten als potenziell infektiös zu behandeln. Alle aus menschlichem Blut gewonnenen Materialien wurden auf Syphilis, Antikörper gegen HIV-1 und HIV-2, Hepatitis-B-Oberflächenantigen und Hepatitis-C-Antikörper untersucht und negativ befundet.

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

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

Eine Lösung, die Natriumhydroxid (NaOH) und Kaliumcyanid (KCN) enthält, ist im Testbesteck enthalten. Es müssen höchste Vorsichtsmaßnahmen eingehalten werden, um den körperlichen Kontakt mit diesem Reagenz zu vermeiden, da es Cyanid enthält und stark alkalisch ist.

Wasser: Destilliertes bzw. deionisiertes Wasser benutzen.

Radioaktivität

Der Umgang mit radioaktivem Material ist in Deutschland genehmigungspflichtig.

Deshalb muss der DPC eine Kopie der aktuellen gültigen Umgangsgenehmigung des Kunden vorliegen, bevor radioaktive Reagenzien versendet werden dürfen. Die Strahlenschutzverordnung ist zu beachten.

Das radioaktive Material ist gemäß der jeweiligen Umgangsgenehmigung zu handhaben.

Die Strahlenexposition ist zu minimieren. Spritzer sind sofort aufzuwischen und die betroffene Oberfläche zu dekontaminieren. Aerosolbildung ist zu vermeiden. Flüssiger und fester radioaktiver Abfall sind unter Beachtung der gültigen Richtlinien zu entsorgen.

Bestandteile der Testpackung: Vorbereitung

Die beiden Komponenten — Vitamin B12/Folsäure Binder (DSP1) und NaOH/KCN Reagenz (NHCN) — stellen ein zusammengehöriges Set dar und sollten nur in Kombination verwendet werden.

Die in diesem Testbesteck enthaltenen Vitamin B12/Folsäure Binder (DSP1) und NaOH/KCN Reagenzien sind nicht mit gleichen Komponenten anderen Chargen austauschbar.

Vitamin B12/Folsäure Binder (DSP1)

120 ml einer Suspension von aufgereinigtem Vitamin B12 und Folsäure Binder, fest aufgebracht auf mikrokristallinen Zellulose-Partikeln, mit Konservierungsmittel. Bei 2–8°C bis 30 Tage nach dem Öffnen haltbar.

Farbe: Orange.

KDSP1, KVSP1, KFSP1: 1 Flasche
KDSP2, KVSP2, KFSP2: 2 Flaschen
KDSP5, KVSP5, KFSP5: 5 Flaschen

Dieses Reagenz muss vor und während der Anwendung sorgfältig gelöst sein, ein magnetischer Rührstab kann in der Flasche gelagert werden. Der Binder sollte in der Weithalsflasche verbleiben, da diese zum Schutz gegen Ablagerungen behandelt wurde.

NaOH/KCN (NHCN)

15 ml einer Lösung von Natriumhydroxid (NaOH) und Kaliumcyanid (KCN), mit Konservierungsmittel. Bei 2–8°C bis 30 Tage nach dem Öffnen haltbar. Um eine

unnötige Belastung der Atmosphäre zu vermeiden, Flasche nach Gebrauch sofort verschließen; ansonsten wird die Absorption von CO₂ in einer allmählichen Änderung des pH-Wertes resultieren. *Es müssen höchste Vorsichtsmaßnahmen eingehalten werden, um den körperlichen Kontakt mit diesem Reagenz zu vermeiden.*

KDSP1, KVSP1, KFSP1: 1 Flasche
KDSP2, KVSP2, KFSP2: 1 Flasche
KDSP5, KVSP5, KFSP5: 2 Flaschen

Achtung! Enthält Cyanid und starke Basen.

⁵⁷Co Vitamin B12/¹²⁵I Folsäure Master Tracer (DSP2)

Nur im Dualcount Testbesteck enthalten.

110 ml gebrauchsfertige Lösung mit ⁵⁷Co-Vitamin B12 und ¹²⁵I-Folsäure. Bei 2–8°C für 30 Tage nach dem Öffnen oder bis zum Verfallsdatum auf dem Etikett haltbar.

Achtung: Der Master Tracer enthält *beide* Isotope, während die Tracer im Einzel-Analyt Testbesteck jeweils nur ein Isotop enthalten.

KDSP1: 1 Flasche
KDSP2: 2 Flaschen
KDSP5: 5 Flaschen

⁵⁷Co Vitamin B12 (VSP2)

Nur im Vitamin B12 Testbesteck mitgeliefert.

110 ml gebrauchsfertige Lösung mit ⁵⁷Co-Vitamin B12. Bei 2–8°C für 30 Tage nach dem Öffnen oder bis zum Verfallsdatum auf dem Etikett haltbar.

KVSP1: 1 Flasche
KVSP2: 2 Flaschen
KVSP5: 5 Flaschen

¹²⁵I Folsäure (FSP2)

Nur im Folsäure Testbesteck mitgeliefert.

110 ml gebrauchsfertige Lösung mit ¹²⁵I Folsäure, mit Konservierungsmittel. Bei 2–8°C für 30 Tage nach dem Öffnen oder bis zum Verfallsdatum auf dem Etikett haltbar.

KFSP1: 1 Flasche
KFSP2: 2 Flaschen
KFSP5: 5 Flaschen

Vitamin B12/Folsäure Standards (DSP3–9)

7 Flaschen, A – G, mit verschiedenen Konzentrationen an lyophilisiertem Vitamin B12 und Folsäure in einer. Den 0-

Standard A mit **6,0 ml** destilliertem oder deionisiertem Wasser rekonstituieren, die restlichen Standards B – G mit **3,0 ml** destilliertem oder deionisiertem Wasser rekonstituieren. Bei 2–8°C für 30 Tage nach der Rekonstitution oder für 2 Monate (aliquotiert) bei –20°C haltbar. Vor direkter Sonneneinstrahlung schützen.

KDSP1, KVSP1, KFSP1: 1 Set
KDSP2, KVSP2, KFSP2: 1 Set
KDSP5, KVSP5, KFSP5: 2 Sets

Die *chargen-spezifischen* Werte der Standards sind in dem Abschnitt „Durchführung Radioassay“ tabellarisch dargestellt. Bitte beachten Sie, dass die im Dualcount Solid Phase „No Boil“

Testbesteck mitgelieferten Standards *nicht* mit denen aus anderen DPC

Testbestecken für Vitamin B12 und Folsäure austauschbar sind. Die exakten Werte und Einheiten können den Etiketten auf den Flaschen entnommen werden.

Dithiothreitol Lösung (DTT1, 5DTT1)

Eine Lösung von Dithiothreitol. Bei 2–8°C bis 30 Tage nach dem Öffnen haltbar.

KDSP1, KVSP1, KFSP1: 1 Flasche x 6 ml (DTT1)
KDSP2, KVSP2, KFSP2: 2 Flaschen x 6 ml (DTT1)
KDSP5, KVSP5, KFSP5: 1 Flasche x 30 ml (5DTT1)

Anämie Kontrolle (ANC)

Lyophilisierte Kontrolle auf Proteinbasis mit *chargen-spezifischen* Vitamin B12 und Folsäure Konzentrationen im Bereich von Mangelzuständen. Mit **2,0 ml** destilliertem Wasser rekonstituieren. Bei 2–8°C für 7 Tage nach der Rekonstitution oder für 2 Monate (aliquotiert) bei –20°C haltbar. Vor direkter Sonneneinstrahlung schützen.

KDSP1, KVSP1, KFSP1: 1 Flasche
KDSP2, KVSP2, KFSP2: 1 Flasche
KDSP5, KVSP5, KFSP5: 1 Flasche

Erforderliche Laborgeräte und Hilfsmittel

Gamma Counter: Muss zur simultanen Messung von ¹²⁵I und ⁵⁷Co mit akzeptabel geringem „Spillover“ geeignet sein. Einkanal-Geräte für ⁵⁷Co oder ¹²⁵I sind für die Einzel-Analyt Testbestecke geeignet.

Zentrifuge: Geeignet für mindestens 2000xg. Eine Hochgeschwindigkeits-Kühlzentrifuge ist wünschenswert, aber

nicht notwendig. Gute Ergebnisse können ebenso mit einer Tischzentrifuge geringerer Geschwindigkeit erhalten werden, wenn die Zentrifugationszeit entsprechend verlängert wird.

Wirbelmischer: Der Mixer sollte stark genug sein, nach Zugabe des Binders einen Wirbel in den Röhrchen zu erzeugen. Schüttler für Röhrchenständer erwiesen sich als ungeeignet für diese Anwendung.

Steriles destilliertes Wasser: Zur Verwendung in den NSB-Röhrchen im Schritt 8 der Durchführung des Radioassay.

Plastikgefäß, mit Deckel: Zur Herstellung der Arbeitslösung.

12x75 mm Röhrchen: Polypropylen Röhrchen (erhältlich bei DPC) werden empfohlen, aber auch Glas- und Polystyrolröhrchen sind geeignet.

Volumetrische Pipetten 6,0 ml und 3,0 ml: Zur Rekonstitution der Standards.

Destilliertes oder deionisiertem Wasser: Zur Rekonstitution der Standards.

Kontrollen: Eine Kontrolle mit chargen-spezifischen Werten im Bereich eines Mangelzustands ist enthalten. Zusätzliches Kontrollmaterial ist bei DPC erhältlich: CON6 ist eine Radioassay Kontrolle auf Humanserum-Basis, die neben Vitamin B12 und Folsäure über 25 weitere Analyte in 3 Konzentrationsbereichen enthält.

Mikropipette, 200 µl: Zur Zugabe der Proben. Pipetten mit Einwegspitzen und Luftpolster, welches vor einem Kontakt zwischen Probe und der Pipette selbst schützt, werden empfohlen. Die Benutzung von Verdrängungspipetten sollte wegen des Risikos der Verschleppung vermieden werden.

Mikropipette oder Dispenser, 50 µl: Zur Zugabe von NaOH/KCN. Dispenser haben sich für die Reagenzzugabe als verlässlich und bequem erwiesen.

Mikropipette oder Dispenser, 1 000 µl: Zur Zugabe der Arbeitslösung und des Vitamin B12/Folsäure Binders. Dispenser haben sich für die Reagenzzugabe als verlässlich und bequem erwiesen.

37°C Wasserbad: Ofen oder Heizblock dürfen nicht verwendet werden.

Magnetrührer und Rührstab: Um Vitamin B12/Folsäure Binder vor und während der Zugabe dieses Reagenz in Suspension zu halten.

Dekantierständer: Kunststoff- (oder Metall-) Ständer mit festem Halt für Röhrchen, sodass ein gleichzeitiges Dekantieren und Abfließen möglich ist. Kunststoffständer sind bei der DPC erhältlich.

Logit-Log-Papier – erhältlich bei DPC (Artikelnummer: ZP797)

Ascorbinsäure: Wird nur bei Folsäurebestimmungen aus Vollblut oder aus Erythrozyten benötigt. Eine 1%ige Lösung *muss täglich frisch hergestellt* werden. Die Ascorbinsäurekristalle sollten vor Feuchtigkeit geschützt werden, sodass sie streufähig bleiben, anstatt aufgrund der Luftfeuchtigkeit zu verkleben. Natrium-Ascorbat ist keine geeignete Alternative.)

Folie: Oder andere Mittel zum Schutz des Hämolysates vor Licht.

Probenhandhabung

Zur Bestimmung der Folsäure muss der Patient nüchtern sein.⁴⁰

Probentyp: Zur Bestimmung von Vitamin B12 oder Folsäure kann frisches oder frisch eingefrorenes Serum, Heparin-Plasma oder EDTA-Plasma genutzt werden. Es sind keine klinisch signifikanten Störungen durch Antikoagulantien nachgewiesen worden.

Für Folsäure Bestimmungen aus dem Vollblut oder aus Erythrozyten sollte Heparin- oder EDTA-Vollblut verwendet werden. Der Hämatokrit des Patienten sollte bekannt sein, um Ergebnisse aus dem Vollblut auf Erythrozyten zu übertragen, ausgedrückt in ng/ml gepackter Erythrozyten. Darüber hinaus muss zur exakten Berechnung der Erythrozyten-Folsäure der Folsäurespiegel im Patientenserum bekannt sein.

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

Phase "No Boil" sind nicht mit allen möglichen Röhrchenvariationen ausgetestet worden. Details der getesteten Röhrchenarten sind dem Kapitel "Alternative Probenarten" zu entnehmen.

Erforderliches Volumen: 200 µl Serum, Plasma oder Hämolysat.

Lagerung und Stabilität:

Serum oder Heparin Plasma: Die Lagerung unter angebrachten Bedingungen ist entscheidend für die Verlässlichkeit der Folsäure Ergebnisse. Wird die Probe *nicht* innerhalb von 8 Stunden untersucht, sollte sie portioniert und bei –20°C eingefroren werden: stabil für 6–8 Wochen.³⁸ Nur einmal auftauen (bei Raumtemperatur). Die Proben nicht übermäßig direktem Licht aussetzen.

Anti-Folsäure Medikamente: Wie im Abschnitt Spezifität dargestellt, gibt es im Solid Phase „No Boil“ Testbesteck im gewissen Ausmaß Kreuzreaktionen zwischen dem Folat Bindeprotein und dem Folsäureantagonisten Methotrexat (MTX), das in der Chemotherapie eingesetzt wird. Da Hochdosis-Infusionen von Methotrexat zu Beginn in Konzentrationen von bis zu 45 000 ng/ml und in der Regel nach 48 Stunden noch immer in Höhe von 2 000 ng/ml vorliegen, sollte das Testbesteck nicht für Folsäure Bestimmungen bei Patienten, die dieses Medikament erhalten, benutzt werden. Dementsprechend sollten die Folsäure Spiegel bei solchen Patienten, die kürzlich mit Methotrexat oder mit strukturell ähnlichen Medikamenten therapiert wurden, mit Vorsicht interpretiert werden.

Hämolyse: Falsch erhöhte Folsäure Ergebnisse im Serum werden mit zunehmender Hämolyse erwartet, da dieses Vitamin in Erythrozyten in vielfach höheren Konzentrationen vorliegt als im Plasma. Andererseits bleiben Vitamin B12 Ergebnisse, gemessen mit dem Solid Phase „No Boil“ Verfahren, von Hämolyse unbeeinflusst.

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

Hohe Werte in Patientenproben: Patientenproben mit Vitamin B12 oder Folsäure Konzentrationen höher als der

höchste Standard sollten mit dem 0-Standard verdünnt und wieder bestimmt werden. Außergewöhnlich hohe Vitamin B12 Konzentrationen – mindestens 20 000 ng/ml – treten bei einigen Patienten mit chronisch myeloischer Leukämie (CML) auf.^{5,35} Da bereits die Verschleppung nur eines µl einer solchen Probe zu einem falschem Anstieg von 100 pg/ml im nächsten Röhrchen führt, sollten Standard-Vorsichtsmaßnahmen eingehalten werden: Doppelbestimmungen, Wechsel der Pipettenspitzen zwischen den Proben und Vermeidung der Benutzung von Verdrängungspipetten.

Herstellung der Hämolsate: Diese Prozedur ist nur für die Folsäure-Bestimmungen im Vollblut erforderlich. Die Zellen des frischen EDTA- oder Heparin-Vollbluts durch Herstellung einer 1 in 21 Verdünnung der voll suspendierten Probe mit einer frischen 1% igen Ascorbinsäure-Lösung lysieren, z.B. durch Mischen von **100 µl** Probe mit **2,0 ml** 1% iger Ascorbinsäurelösung, gut durchmischen. Es ist wichtig, Ascorbinsäure zu verwenden (nicht Natriumascorbat) und eine 1% ige Lösung täglich frisch anzusetzen.³³

Die Hämolsate können sofort gemessen werden, es ist keine Inkubation erforderlich. Werden sie nicht sofort gemessen, können die Hämolsate im Dunkeln bei Raumtemperatur (15–28°C) für bis zu 90 Min. gelagert werden. Hämolsate können bei 2–8°C bis zu 3 Stunden und bei –20°C für 2 Wochen gelagert werden.^{40,41} Die Hämolsate sind vor Licht zu schützen. Es ist zu beachten, dass mit dem Radioassayverfahren keine aussagefähigen Ergebnisse für Vitamin B12 im Vollblut oder in den Erythrozyten erzielt werden können, weil Vitamin B12 durch die Ascorbinsäure zerstört wird.

Radioassay Testdurchführung

Alle Testkomponenten vor Testbeginn auf Raumtemperatur (15–28°C) bringen.

- 1** Jeweils zwei Röhrchen mit T (Totalaktivität), NSB (Unspezifische Bindung), A (Maximale Bindung) und B bis G beschriften. Jeweils 2 Röhrchen pro Patient und Kontrolle beschriften.

Vitamin B12

Standard	Ca. pg/ml	Ca. pmol/L
A	0	0
B	50	37
C	100	74
D	300	221
E	600	443
F	1 200	885
G	2 400	1 771

Folsäure

Standard	Ca. ng/ml	Ca. nmol/L
A	0	0
B	0,5	1,1
C	1	2,3
D	3	6,8
E	6	1,6
F	12	2,2
G	24	54,5

- 2** Jeweils **200 µl** des 0-Standards A in die NSB und A Röhrchen und jeweils **200 µl** der restlichen Standards in die entsprechend beschrifteten Röhrchen pipettieren. Jeweils **200 µl** von jeder Patienten- oder Plasmaprobe, Kontrolle und Hämolsat in die vorbereiteten Röhrchen pipettieren. **Direkt auf den Boden des Röhrchens pipettieren.**

Patientenproben (Serum oder Plasma), in denen Konzentrationen oberhalb des höchsten Standards erwartet werden, sind vor dem Einsatz in den Test mit dem 0-Standard zu verdünnen.
- 3 Vorbereitung der Arbeitslösung:** Die Vorbereitung der Arbeitslösung sollte nicht früher als 30 Minuten vor Gebrauch erfolgen. Die Menge jeder Komponente ist abhängig von der Anzahl der Röhrchen im Ansatz. Die benötigten Volumina, in ml, sind unten tabellarisch aufgeführt. Zur Sicherheit sollten diese Volumina mit einer etwas größeren Anzahl, als der zu untersuchenden Röhrchen, multipliziert werden. (Die Komponenten werden in Volumina

geliefert, die ausreichen, um die Arbeitslösung in einem 10%igem Überschuss herzustellen).

ml pro Röhrchen	
Dithiothreitol	0,05
Tracer	1,0

- 4 **1 000 µl** frisch zubereitete Arbeitslösung in alle Röhrchen hinzufügen. Mischen.

Für diese Zugabe und für die im Schritt 8 wird die Verwendung eines Dispensers empfohlen. Die T-Röhrchen bis zur Messung (siehe Schritt 12) beiseite stellen; sie bedürfen keiner weiteren Behandlung.
- 5 Für **30 Minuten** bei Raumtemperatur (15–28°C) inkubieren.

Die Inkubation kann auf bis zu 45 Minuten bei Raumtemperatur verlängert werden.
- 6 **50 µl** NaOH/KCN in alle Röhrchen hinzufügen. Mischen.

Dieses Reagenz ist mit äußerster Vorsicht zu behandeln. Für diese Zugabe wird ein Dispenser empfohlen. Der Inhalt der Röhrchen sollte sich nun blau färben.
- 7 Für 30 Minuten bei 37°C inkubieren.

Die Inkubation kann auf bis zu 45 Minuten bei 37°C verlängert werden. (Verlängerte Inkubationen ergeben eine geringere Vitamin B12 Wiederfindung.)
- 8 **1 000 µl** Vitamin B12/Folsäure Binder in alle Röhrchen, außer in die NSB Röhrchen hinzufügen. In die NSB Röhrchen **1 000 µl** steriles, destilliertes Wasser hinzufügen. **Kräftig mischen.**

Die Röhrchen sollten einzeln gemischt werden, bis ein Wirbel in dem Röhrchen erscheint. Schüttler für Röhrchenständer erwiesen sich als ungeeignet für diese Anwendung.

Der Binder muss während der Zugabe gut durchmischt bleiben: das Mischen auf einem Magnetrührer wird empfohlen. Nun sollte sich der Röhrcheninhalt purpurrot gefärbt haben, außer bei den T- und NSB-

Röhrchen. Nur soviel Binder wie für das Verfahren benötigt sollte in ein Glas-Becherglas (kein Kunststoff!) mit einem magnetischen Rührstäbchen gegossen werden, der verbleibende Rest sollte in der originalen, silikonisierten Flasche verbleiben.

- 9 Für **60 Minuten** bei Raumtemperatur (15–28°C) inkubieren.
- 10 Für **mindestens 15 Minuten** bei 2000xg oder höher zentrifugieren.

Auch höhere Beschleunigungen sind akzeptabel, Glas- oder Polystyrol-Röhrchen könnten aber zerbrechen. Eine längere Zentrifugation kann bei Tischzentrifugen notwendig sein.
- 11 Mit Hilfe eines Dekantierständers alle Röhrchen gleichzeitig dekantieren oder absaugen, das Präzipitat zur Messung aufbewahren.

Vollständiges Entfernen der Flüssigkeit verbessert die Präzision deutlich. Mit Hilfe eines Dekantierständers alle Röhrchen (außer die T-Röhrchen) dekantieren oder absaugen und 5 Minuten umgedreht stehen lassen. Anschließend werden die Röhrchen kräftig auf dem Fließpapier ausgeklopft, um alle restlichen Tröpfchen zu entfernen.
- 12 Das Präzipitat für **1 Minute** in einem Gamma Counter messen.

Es ist zu beachten, dass das Präzipitat die gebundene und nicht die freie Fraktion enthält.

Berechnung und Qualitätskontrolle

Serumproben: Um die Konzentrationen von Vitamin B12 oder Folsäure aus der Logit-Log Darstellung der Standardkurve abzulesen, werden zunächst der Mittelwert der zwei Röhrchen, bereinigt um den Mittelwert der NSB Counts pro Minute (cpm), berechnet:

Netto Counts = (Mittelwert CPM) minus (Mittelwert **NSB** CPM)

Anschließend wird die Bindung jedes Röhrchenpaars als Prozent der Maximalbindung (MB, B0) bestimmt. Hierzu werden die mittleren CPM des A-

Standards korrigiert um die mittlere NSB als 100% gesetzt:

Prozentbindung = (Netto Counts / Netto MB Counts) × 100

Die Berechnung kann durch Weglassen der Korrektur um die NSB vereinfacht werden. Für Proben innerhalb des Standardbereichs werden nahezu identische Konzentrationen berechnet, wenn B/B0 direkt aus den CPM ermittelt wird.

Die so ermittelten B/B0 aller Standards außer des 0-Standards werden auf der y-Achse auf Logit-Log Papier gegen die Konzentration auf der x-Achse (logarithmisch) aufgetragen. Die Punkte werden mit bestmöglicher Annäherung durch eine gerade Linie verbunden. Die Ergebnisse der unbekannten Proben können dann durch Interpolation an der Kurve abgelesen werden.

Datenberechnung: Es ist gute Laborpraxis eine Grafik der Standardkurve darzustellen, auch wenn die eigentliche Berechnung durch einen Computer erfolgt, um visuell zu prüfen, ob für die Standardkurve die geeignete Transformation verwendet wurde. Weiteres dazu: Davis SE et al. Radioimmunoassay data processing with a small programmable calculator. J Immunoassay 1980;1:15-25; and Dudley RA, et al. Guidelines for immunoassay data reduction. Clin Chem 1985;31:1264-71.

Hämolysate: Zunächst erfolgt die Berechnung des Ergebnis R in ng/ml des Hämolysates, unter Verwendung der Folsäure Standardkurve. Durch Multiplikation mit dem Verdünnungsfaktor 21 wird die Folsäure Konzentration im Vollblut erhalten (ng/ml). Für eine Näherungsbestimmung der gepackten Erythrozyten Konzentration (ng/ml) erfolgt die Multiplikation der Folsäure Konzentration im Vollblut mit $100/H$, wobei H den Hämatokrit in % darstellt:

$$\text{Erythrozyten Folsäure} \approx 21R \times (100 / H)$$

Genau genommen sollte die Folsäure Verteilung im Serum von der Folsäure Konzentration im Vollblut subtrahiert werden, bevor die Multiplikation mit $100/H$ erfolgt. Verwendung des Folsäure Spiegel S im Patientenserum führt zur exakten Gleichung:

$$\text{Erythrozyten Folsäure} = (21R - [S \times ((100 - H) / 100)]) \times (100 / H)$$

Der Term in den rechteckigen Klammern ist, wie auch immer, in den meisten Fällen im Vergleich zu $21R$ so gering, dass er zu vernachlässigen ist.

Kontrollen: Verwendung der mitgelieferten Proben im Testbesteck und tägliches Aufzeichnen der Ergebnisse wie beschrieben in Westgard JO, et al. A multi-rule chart for quality control. Clin Chem 1981;27:493-501. Die wiederholte Messung von Proben kann bei der Beurteilung der Interassay Präzision hilfreich sein.

Qualitätskontrollparameter: Es wird weiterhin empfohlen, folgende Parameter der Berechnung zu protokollieren:

T = Totalaktivität (als Counts pro Minute)

%NSB = $100 \times (\text{Mittelwert NSB Counts} / \text{Total Counts})$

%MB = $100 \times (\text{Netto Counts} / \text{Total Counts})$

und die 20, 50 und 80 Prozent "intercepts," wobei

20% = Konzentration bei 20 Prozent Bindung, etc.

Zentrifugation: Die Beschleunigung der verwendeten Zentrifuge mit bekannter Geschwindigkeit (in Umdrehungen/Minute) wird nach der unten stehenden Formel berechnet oder benötigt, um die gewünschte Kraft g zu erzielen.

$$g = 28,38 \times (U/\text{min} / 1\,000)^2 \times \text{Radius [Zoll]}$$

$$U/\text{min} = 187,7 \times \sqrt{(g / \text{Radius [Zoll]})}$$

oder

$$g = 11,18 \times (U/\text{min} / 1\,000)^2 \times \text{Radius [cm]}$$

$$U/\text{min} = 299,07 \times \sqrt{(g / \text{Radius [cm]})}$$

Folsäure: Dieses Beispiel dient nur zur Veranschaulichung und ist nicht dazu geeignet Werte aus einem anderen Testansatz damit zu ermitteln. Aufgrund der *Chargenabhängigkeit* der Standardkonzentrationen müssen die in der rechten Spalte der Tabelle gelisteten Konzentrationen nicht mit den Konzentrationen in Ihrer Lieferung übereinstimmen. (Siehe Tabellen "Example Run, Vitamin B12" und "Example Run, Folic Acid".)

Referenzwerte

Referenzbereich Studie

Vitamin B12 und Folsäure aus frischen Serumproben von 100 Gesunden wurden mit dem Dualcount Solid Phase „No Boil“ Testbesteck von DPC bestimmt. Das Testbesteck wurde ebenfalls zur Bestimmung der Folsäure im Vollblut von 88 Gesunden benutzt. Die Referenzgruppe bestand vorwiegend aus Laborpersonal, Frauen und Männer, in offensichtlich gesunder Verfassung. In jedem Fall wurde der Referenzbereich nicht-parametrisch als zentraler 95% Bereich der Beobachtungen bestimmt. Die Referenzbereiche des Solid Phase „No Boil“ Dualcount Testbestecks, die sich aus dieser Studie ergeben, sind nachfolgend tabellarisch dargestellt.

Serum Vitamin B12:	200 – 950 pg/ml	150 – 700 pmol/L
Serum Folsäure:	3,0 – 17 ng/ml	7 – 39 nmol/l
Vollblut Folsäure:	80 – 320 ng/ml	180 – 725 nmol/l
Erythrozyten Folsäure	175 – 700 ng/ml	395 – 1 585 nmol/l

Die Referenzbereiche der Folsäure wurden durch weitere Studien mit 162 Personen an zwei anderen Orten bestätigt. Es ist zu beachten, dass Ergebnisse an der unteren Grenze des Normalbereichs, z.B. Folsäure Ergebnisse aus Erythrozyten im Bereich von 100 bis 200 ng/ml, mit Vorsicht und dem klinischen/labormedizinischen Hintergrund zu betrachten sind. Ebenso sollten Ergebnisse der Folsäure im Serum vor dem Hintergrund der Erythrozyten Bestimmung interpretiert werden.

Die oben in der Tabelle dargestellten Referenzbereiche wurden in den USA erstellt. In Schweden und Norwegen durchgeführte Studien lassen auf einen Referenzbereich von 100–350 ng/ml bzw. 130–350 ng/ml schließen, entsprechendes für die Erythrozyten Folsäure. Diese Grenzwerte sind *lediglich als Richtlinien* aufzufassen. Jedes Labor sollte seine eigenen Referenzbereiche etablieren.

Vitamin B12: Es gibt keine Überschneidung zwischen dem 200–950 pg/ml Vitamin B12 Bereich Gesunder

und dem absoluten Bereich für bestätigte Vitamin B12-Mangel Proben. (Siehe "Expected Values: Comparative Discrimination Plot" im Abschnitt Tabellen und Diagramme) 200 pg/ml kann daher als untere Grenze normaler Vitamin B12 Werte, gemessen mit dem Dualcount Solid Phase „No Boil“ Testbesteck, angenommen werden. Es ist zu beachten, dass Werte unter 200 pg/ml und über 124 pg/ml, dem höchsten im Solid Phase „No Boil“ beobachteten Wert in Vitamin B12-Mangel Proben, als statistisch subnormal behandelt werden, weitere Untersuchungen sind in solchen Fällen gerechtfertigt.

Allgemeine Gründe für hohe Vitamin B12 Spiegel schließen Erkrankungen der Leber, Myeloproliferative Erkrankungen (Chronische Myeloische Leukämie als Sonderfall) und die Einnahme von Multivitamin-Präparaten mit ein.

Bestätigte Vitamin B12-Mangel Proben

DPC führte eine Studie mit über hundert Vitamin B12-Mangel Proben durch, deren Vitamin B12-Mangel durch unabhängige klinische und hämatologische Kriterien bestätigt wurde.¹⁴ Es wurden 2 Referenzmethoden benutzt: eine mikrobiologische, basierend auf *Lactobacillus leichmannii* und DPC's Dualcount Aktivkohle Boil Testbesteck, ein Radioassay basierend auf Hitzedenaturierung, Aktivkohle-Separation und gereinigtem Intrinsic Faktor. Aus den meisten, aber nicht aus allen Proben, konnten Vitamin B12 Werte durch die drei Testverfahren gewonnen werden. Diese klinischen Ergebnisse sind in einem vergleichenden Diagramm dargestellt. Sie zeigen den Vitamin B12-Mangel Bereich aller 3 Methoden nebeneinander und das Ausmaß der Überlappung zwischen Normal- und Mangelzustand der beiden Radioassays. (Siehe "Expected Values: Comparative Discrimination Plot" im Abschnitt Tabellen und Diagramme)

Leistungsdaten

Im folgenden Abschnitt werden Daten gezeigt, die für die Leistung des Dualcount Solid Phase „No Boil“ Testbestecks repräsentativ sind. Die Vitamin B12 Ergebnisse sind in pg/ml angegeben. Die Folsäure Ergebnisse sind

in ng/ml angegeben. Wenn nicht anders angegeben, wurden alle Ergebnisse aus Serum oder Heparinblut gewonnen.

Vitamin B12 Umrechnungsfaktor:
pg/ml $\times$ 0,7378 $\rightarrow$ pmol/l

Folsäure Umrechnungsfaktor:
ng/ml $\times$ 2,266 $\rightarrow$ nmol/l

Messbereich:

Vitamin B12: ca. 50 – 2 400 pg/ml
Die Standards haben chargen-spezifische Werte.

Folsäure: ca. 0,5 – 24 ng/ml.
Die Standards haben chargen-spezifische Werte.

Analytische Sensitivität:

Vitamin B12: 34 pg/ml.

Folsäure: 0,3 ng/ml.

Intraassay-Präzision: Statistische Berechnung der Ergebnisse von Proben, die in 20 Röhrchenpaaren in einem Ansatz gemessen wurden. (Siehe Tabelle "Intraassay Precision".)

Interassay-Präzision: Statistische Berechnung der Ergebnisse von 14 Proben, die in 18 verschiedenen Testansätzen in Doppelbestimmung gemessen wurden. (Siehe Tabelle "Interassay Precision".)

Gesamt Interassay Präzision: Gesamt Assay Statistiken wurden für 9 Kontrollen über einen Zeitraum von vier Monaten gewonnen. Für jede Kontrolle wurde ein Röhrchenpaar in ca. 100 Ansätzen untersucht. Die Statistiken spiegeln einige Chargenänderungen und Arbeitsplätze verschiedener MTA's wider. (Siehe Tabelle "Cumulative Interassay Precision".)

"End of Run" Effekt: Röhrchenpaare wurden in einem Assay mit über 350 Röhrchen an mehreren Stellen platziert. Die Zugabe von Vitamin B12/Folsäure Binder erfolgte innerhalb von 8 Minuten. Die Ergebnisse zeigen keine Positionierungseffekte aufgrund der verspäteten Zugabe der Reagenzien, auch nicht in Ansätzen dieser Größe.

Spezifität

Binder Reinheit: Es wurden zwei Experimente durchgeführt, um die Reinheit des Intrinsic Faktor (IF) Binders

aus dem Solid Phase "No Boil" Vitamin B12 Radioassays zu demonstrieren.

- Eine Inkubation des Vitamin B12/Folsäure Binders über Nacht mit Serum, das spezifische Antikörper gegen den Intrinsic Faktor enthielt, resultierte in der kompletten Unfähigkeit des Reagenz Vitamin B12 zu binden. Wäre Protein R anwesend gewesen, wäre zumindest ein Teil der Vitamin B12 Bindungskapazität erhalten geblieben.
- Ersatz des Vitamin B12/Folsäure Binders in einem Radioassay System basierend auf Hitze-denaturierung, beschichteter Aktivkohle und Durchführung des Ansatzes bei einem pH von ca. 2, verursachte wieder eine komplette Inaktivierung des Binders. Wäre Protein R anwesend gewesen, wäre zumindest ein Teil der Aktivität unter diesen sauren Bedingungen erhalten geblieben.

Kreuzreaktivität: Die Spezifität des Intrinsic Faktor Binders wurde beurteilt, indem ein Ansatz einer Cobinamid Präparation untersucht wurde. Die Ergebnisse zeigen, dass auch Konzentrationen in einer Höhe von 50 000 000 pg/ml praktisch keine Reduktion der Bindung des radioaktiv-markierten Vitamin B12 verursacht, d.h. es ergaben sich scheinbare Vitamin B12 Konzentrationen am Rande der Nachweisgrenze; daher ist die Kreuzreaktivität mit Cobinamid unter 0,0001% (Siehe Tabelle "Specificity 1".)

Ebenso wurde die Kreuzreaktivität zwischen dem Folsäureantagonisten Methotrexat (MTX) und dem Folsäure-bindendem Protein aus dem Solid Phase „No Boil“ Testbesteck untersucht. Der Prozentsatz der Kreuzreaktivität, auch wenn noch so gering, ist klinisch relevant, da Methotrexat oft hochdosiert verordnet wird. Dementsprechend sind Folsäure Bestimmungen bei Patienten kontraindiziert, welche sich gerade, oder vor kurzem einer Behandlung mit diesem oder einem strukturell ähnlichen Anti-Folsäure Medikament unterzogen haben. (Siehe Tabelle "Specificity 2".)

Linearität: Proben wurden in verschiedenen Verdünnungen getestet. (Siehe Tabelle "Linearity".)

Wiederfindung: 6 Lösungen wurden mit dem 0-Standard als Verdünnungsmittel hergestellt. Drei Lösungen (A, B und C) enthielten 10 000, 20 000 und 30 000 pg/ml Vitamin B12. Die anderen drei (D, E und F) enthielten 60, 120 und 180 ng/ml Folsäure. Eine 50 µl Portion jeder Lösung wurde 950 µl Portionen von 6 Patientenproben zugesetzt, um 1:20 verdünnte Lösungen mit einer relativ intakten Probenmatrix zu erhalten. Die in der Tabelle dargestellten Werte stellen nur die Wiederfindung der versetzten Lösungen dar: der Beitrag der Patientenprobe wurde herausgerechnet. Die Zahlen in Klammern sind die Konzentrationen der originalen, nativen Serumproben. (Siehe Tabelle "Recovery".)

Protein Einfluss: Zur Bestimmung der Effekte durch Veränderung des Proteingehaltes auf Solid Phase „No Boil“ Verfahren, wurden zwei Patientenproben mit verschiedenen Mengen humanem Serum-Albumin (HSA) und humanem IgG versetzt. Alle Proben, versetzte und nicht versetzte, wurden in einem einzelnen Ansatz untersucht. Die Ergebnisse zeigen, dass selbst große Veränderungen des Proteingehaltes nur geringe Veränderungen der Ergebnisse erzeugen. Daraus kann man folgern, dass im Dualcount Solid Phase „No Boil“ System kein signifikanter Proteineinfluss besteht.

Alternativer Probentyp: Um den Einfluss von Antikoagulantien zu überprüfen, wurde Gesundes Blut in Röhrchen ohne Zusatz, Heparinröhrchen und EDTA-Röhrchen entnommen. Alle Proben wurden im Dualcount Solid Phase „No Boil“ Verfahren gemessen. Die Ergebnisse zeigen, dass von den getesteten Antikoagulantien kein klinisch signifikanter Einfluss ausgeht. (Siehe Tabelle "Alternativer Probentyp".)

Patienten Blank: Um nachzuweisen, dass der Dualcount Solid Phase „No Boil“ nicht unter den in der Literatur beschriebenen unspezifischen Bindungen leidet,^{6,24,27,35} wurde ein Ansatz durchgeführt, welcher eine Standardkurve, Standard Blanks (ohne Binder) und zwei Sätze Röhrchen mit Patienten-Blanks einschloss. In einem Satz der Röhrchen mit Patienten-Blanks wurde einfach der Festphasen Binder während der Bestimmung weggelassen. Bei dem anderen Satz wurde der Binder durch ein

„Zellulose-Blank“-Reagenz ersetzt: eine Mischung aus Zellulosepartikeln, identisch zu denen des Festphasen Binders, aber ohne gereinigten Intrinsic Faktor und Folsäure-bindendes Protein (Zur Evaluation des Testbesteckes kann das Zellulose Blank-Reagenz auf Anfrage von der DPC bezogen werden.)

Die Ergebnisse zeigen, dass (a) das Weglassen des Binders eine geeignete Alternative zum Zellulose Blank-Reagenz ist und (b) dass unspezifische Bindungen in Patientenproben und in den Standards beim Dualcount Solid Phase „No Boil“ System einheitlich gering sind. Daher reicht ein einziger Satz NSB-Röhrchen - 0-Standard ohne Binder – für Routinebestimmungen der unspezifischen Bindung. Tatsächlich kann auf die NSB-Röhrchen ganz verzichtet werden: Berechnungen zeigen, dass die Korrektur um die nichtspezifischen Bindungen vernachlässigt werden kann, ohne einen signifikanten Einfluss auf Ergebnisse von Proben innerhalb der Bereiche der Standards zu haben. (Siehe Tabelle: "Patient Blanks".)

Der Denaturierungsschritt:

Um die Effektivität des alkalischen Denaturierungsschritts bei 37°C im Dualcount Solid Phase „No Boil“ System zu testen, wurden unabhängige Studien mit dem Testbesteck an Patientenproben mit chronisch myeloischer Leukämie (CML) und myeloproliferativen Störungen, und an Patientenproben mit perniziöser Anämie (PA), welche auf die Anwesenheit von anti-Intrinsic Faktor blockierenden Antikörpern untersucht wurden, durchgeführt.

CML Proben: In einem Experiment mit dem Dualcount Solid Phase „No Boil“ Testbesteck wurde eine Aktivkohle-Präzipitation genutzt, um die unspezifischen Bindungen in Röhrchen der Patienten-Blanks am Ende der 2. Inkubation zu beurteilen. Die Ergebnisse zeigen eine praktisch komplette Präzipitation der Tracer in allen Röhrchen, das Verhalten der CML-Patienten Blanks in diesem Experiment war ähnlich den Ergebnissen der Blanks der Gesunden. (Die beiden CML Proben hatten Vitamin B12 Spiegel in der Größenordnung von 3 000 und 5 000 pg/ml.) Dieses Experiment zeigt, dass der alkalische

Denaturierungsschritt des Solid Phase „No Boil“ Systems bei 37°C auch hohe Spiegel des Vitamin B12-bindenden Proteins, wie manchmal bei CML-Patienten gefunden, effektiv inaktiviert; sollten endogene Transportproteine der Denaturierung entgangen sein, würden sie an den Tracer binden und eine verbleibende, signifikante Menge an Radioaktivität im Überstand nach der Aktivkohle-Präzipitation verursachen.

PA Proben: Intrinsic Faktor spezifische, blockierende Antikörper sind in mehr als der Hälfte der Patienten mit perniziöser Anämie vorhanden. 14 PA Proben, davon 7 positiv bzgl. der Anwesenheit dieser Antikörper, wurden mit dem Solid Phase „No Boil“ Testbesteck und dem Dualcount Aktivkohle „Boil“ Testbesteck bestimmt.⁸ Die Ergebnisse zeigen, dass der alkalische Denaturierungsschritt des Solid Phase „No Boil“ Testbestecks bei 37°C genauso effektiv ist, wie der „Koch“-Schritt bei der Denaturierung von Anti-Intrinsic Faktor Antikörpern, die sonst in vielen Fällen von PA falsch erhöhte (falsch normale) Ergebnisse verursachen.

Als eine weitere Bestätigung wurden 4 Antikörper-positive und 4 Antikörper-negative PA Proben der alkalischen Denaturierung bei 37°C und einem Kontrollverfahren, bei dem Wassers durch NaOH ersetzt wurde, unterzogen.⁸ Antikörper-positive Proben, die dem Kontrollverfahren unterzogen wurden, behielten ihre Fähigkeit den Intrinsic Faktor zu blockieren, während Antikörper-positive Proben, die der alkalischen Denaturierung des Testbestecks unterzogen wurden, dies nicht taten: das später vorgestellte Verhalten unterschied sich nicht von den Antikörper-negativen Proben. Dies zeigt, dass der „No Boil“ Denaturierungsschritt des Testbestecks, die in den Antikörper-positiven Proben vorhandenen, Anti-Intrinsic Faktor Antikörper effektiv inaktiviert. Es ist zu beachten, dass in den hier berichteten Experimenten viele Proben mit extrem hohen Antikörpertitern eingesetzt wurden. Dies schließt aber nicht aus, dass in selteneren Fällen die Möglichkeit noch höherer Titer besteht, die in der „No Boil“-Methode nicht vollständig denaturiert werden. Sollte ein solcher Zweifel bestehen, kann das „No Boil“-Ergebnis mit

einem alternativen „Koch“-Verfahren bestätigt werden.

Einfluss der Inkubationszeit auf die Hämolsate: Blutproben von 4 Personen wurden in Röhrchen ohne Zusatz, Heparinröhrchen und EDTA-Röhrchen entnommen. Die Hämolsate wurden vor der Bestimmung mit 1%iger Ascorbinsäure-Lösung über Zeiträume von 0–90 Minute) in Dunkelheit und bei Raumtemperatur (15–28°C) inkubiert. Die Tabelle zeigt für Lyse-Zeiten von 0–90 Minuten keine signifikanten Unterschiede bei den Erythrozyten-Folsäure Ergebnissen. Entsprechend sollten Hämolsate direkt nach dem Ascorbinsäure-Verdünnungsschritt bestimmt werden. Die Tabelle zeigt auch, dass die Ergebnisse nicht von der Wahl des Antikoagulanzen abhängen: es kann Heparin- oder EDTA-Vollblut verwendet werden (Siehe Tabelle "Effect of Incubation Time on Hemolysates".)

Methodenvergleich für B12: Der Assay wurde mit dem DPC IMMULTE Vitamin B12 Assay anhand von 98 Patientenseren verglichen. (Konzentrationsbereich: ca. 128 – 1 037 pg/ml. Siehe Grafik „Method Comparison“.) Berechnung der linearen Regression:

$$(SPNB) = 0,98 (IML) - 5,3 \text{ pg/ml}$$

$$r = 0,982$$

Mittelwerte:
371 pg/ml (Solid Phase No Boil)
385 pg/ml (IMMULITE – LKVB)

Methodenvergleich für Folsäure: Der Assay wurde mit dem DPC IMMULITE Folsäure Assay anhand von 71 Patientenseren verglichen. (Konzentrationsbereich: ca. 1,4 – 20 ng/ml. Siehe Grafik „Method Comparison“.) Berechnung der linearen Regression:

$$(SPNB) = 0,92 (IML) + 0,71 \text{ ng/ml}$$

$$r = 0,985$$

Mittelwerte:
6,2 ng/ml (Solid Phase No Boil)
5,9 ng/ml (IMMULITE – LKFO)

Anwendungsberatung

Bei Rückfragen wenden Sie sich bitte an Ihre DPC Niederlassung.

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

Español

Solid Phase No Boil Dualcount

Utilidad del análisis: El análisis Solid Phase No Boil Dualcount es un radioensayo diseñado para la medición simultánea de vitamina B12 en suero o plasma, y ácido fólico en suero, plasma o sangre entera. Los kits Solid Phase No Boil Vitamina B12 y Solid Phase No Boil Ácido Fólico están diseñados para realizar determinaciones de un sólo analito, vitamina B12 y ácido fólico, respectivamente. El uso de los tres kits es estrictamente para diagnóstico *in vitro*, como una ayuda en el diagnóstico clínico.



	µCi / kBq		
	Kit Dualcount	Kit Vitamina B12	Kit Ácido Fólico
100 tubos	KDSP1	KVSP1	KFSP1
⁵⁷ Co Vitamina B12	2/74	2/74	—
¹²⁵ I Ácido Fólico	6/222	—	6/222
200 tubos	KDSP2	KVSP2	KFSP2
⁵⁷ Co Vitamina B12	4/148	4/148	—
¹²⁵ I Ácido Fólico	12/444	—	12/444
500 tubos	KDSP5	KVSP5	KFSP5
⁵⁷ Co Vitamina B12	10/370	10/370	—
¹²⁵ I Ácido Fólico	30/1110	—	30/1110

Principio del análisis

1. Desnaturalización alcalina de proteínas endógenas

2. Competencia por el ligante

purificado a pH 9,3: Los análogos de la B12 no interfieren ya que el ligante para el factor intrínscio porcino carece de proteína R. El ligante del ácido fólico tiene la misma afinidad por MTHF y PGA.

3. Separación en fase sólida

Tiempo total de incubación: 2 horas.

Cuentas totales:

¹²⁵I-ácido fólico: aproximadamente 80 000 cpm.

⁵⁷Co Vitamina B12: aproximadamente 25 000 cpm.

Advertencias y precauciones

Para uso diagnóstico *in vitro*.

Reactivos: Almacenar a 2–8°C en una cámara preparada para almacenar material radioactivo. Desechar de acuerdo a la legislación en vigor.

No usar los reactivos después de su fecha de caducidad.

Algunos componentes suministrados en el kit pueden contener material de origen humano y/o otros componentes potencialmente peligrosos que necesiten ciertas precauciones.

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

Se ha usado Azida sódica, en concentraciones menores de 0,1 g/dl, como conservante. Para su eliminación, lavar con grandes cantidades de agua para evitar la constitución de residuos de azidas metálicas, potencialmente explosivas, en las cañerías de cobre y plomo.

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

El kit viene con una solución que contiene hidróxido de sodio (NaOH) y cianuro de potasio (KCN). Se debe tener mucho cuidado de evitar todo contacto físico con este reactivo, ya que contiene cianuro y un álcali potente.

Agua: Usar agua destilada o desionizada.

Radioactividad

Una copia de cualquier certificado de licencia de radioisótopos (específico o general) emitido a la aduana de los EE.UU. se registrará en los ficheros de Diagnostic Products Corporation antes de que se puedan enviar kits o componentes conteniendo material radioactivo. Estos materiales radioactivos pueden adquirirse por cualquier cliente con la licencia

específica apropiada. Con una licencia general, estos materiales radioactivos pueden adquirirse solo por médicos, veterinarios en la práctica de la medicina veterinaria, laboratorios clínicos y hospitales — y estrictamente para la clínica *in vitro* o tests de laboratorio que no conlleven la administración interna o externa de material radioactivo o su radiación a humanos u otros animales. Su adquisición, recepción, almacenaje, uso, transferencia y desecho están regulados y se expedirá una licencia (general o específica) de la Comisión Nuclear de EE.UU. o de un Estado con el NRC para su consiguiente control.

Manejar los materiales radioactivos de acuerdo a los requerimientos de su licencia general o específica. Para minimizar la exposición a la radiación, el usuario debe adherirse al cuarto conjunto de guías publicadas por el National Bureau of Standards con el nombre *Safe Handling of Radioactive Materials* (Handbook No. 92, issued March 9, 1964) y en las consiguientes publicaciones de las autoridades Federales o Estatales.

Limpiar y descontaminar rápidamente las superficies afectadas. Evitar la generación de aerosoles. Eliminar los residuos sólidos radioactivos de acuerdo con los requerimientos de su licencia. Licencias generales (NRC Form 483) pueden eliminar sus residuos sólidos radioactivos como residuos no radioactivos, después de retirar las etiquetas. Licencias específicas (NRC Form 313) se deben referir al Título 10, Código de Regulaciones Federales, Parte 20. Las licencias en Estados Asociados deben referirse a las normativas de su correspondiente Estado. Licencias generales pueden eliminar sus residuos líquidos radioactivos contenidos en este tipo de productos como cualquier otro material líquido, quitando las etiquetas de los contenedores y procesándolos como residuos sólidos. Licencias específicas pueden eliminar pequeñas cantidades de residuos líquidos radioactivos contenidos en este tipo de productos como cualquier otro material líquido. Refiérase a la normativa aplicable a su laboratorio.

Materiales Suministrados: Preparación Inicial

Los dos componentes — el ligante para Vitamina B12/Ácido Fólico (DSP1) y el reactivo NaOH/KCN (NHCN) — representan un conjunto y deben usarse exclusivamente en combinación.

El ligante para Vitamina B12/Ácido Fólico y el reactivo NaOH/KCN que se suministran en este kit *no* son intercambiables con otros lotes de los mismos componentes.

Ligante para Vitamina B12/Ácido Fólico (DSP1)

120 ml de una suspensión de ligantes para vitamina B12 y ácido fólico, purificados e inmovilizados en partículas de celulosa microcristalina, con conservante. Estable a 2–8°C durante 30 días después de su apertura. Color: naranja.

KDSP1, KVSP1, KFSP1: 1 vial
KDSP2, KVSP2, KFSP2: 2 viales
KDSP5, KVSP5, KFSP5: 5 viales

Este reactivo debe suspenderse completamente antes y durante su uso; se puede introducir una barra magnética de agitación en el vial y dejarla allí. El ligante deberá guardarse en el vial original de boca ancha, el cual ha sido tratado para evitar la adsorción.

NaOH/KCN (NHCN)

15 ml de una solución que contiene hidróxido de sodio (NaOH) y cianuro de potasio (KCN), con conservante. Estable a 2–8°C durante 30 días después de su apertura. Para evitar la exposición innecesaria al aire, volver a tapar el frasco inmediatamente después de usar; de lo contrario, la adsorción de CO₂ gradualmente producirá un cambio del pH. *Se debe tener extremo cuidado de evitar todo contacto físico con este reactivo.*

KDSP1, KVSP1, KFSP1: 1 vial
KDSP2, KVSP2, KFSP2: 1 vial
KDSP5, KVSP5, KFSP5: 2 viales

¡Cuidado! Contiene cianuro y un álcali potente.

Trazador principal de ⁵⁷Co Vitamina B12/¹²⁵I Ácido Fólico (DSP2)

Sólo provisto en los kits Dualcount.

110 ml de una solución lista para usar de ^{57}Co -vitamina B12 y ^{125}I -ácido fólico. Estable a 2–8°C durante 30 días después de abrir, o hasta la fecha de caducidad marcada en la etiqueta.
Nota: El trazador principal contiene *ambos* isótopos, mientras que los trazadores provistos en los kits de un sólo analito sólo contienen un isótopo.
KDSP1: 1 vial
KDSP2: 2 viales
KDSP5: 5 viales

^{57}Co Vitamina B12 (VSP2)
Sólo provisto en los kits de Vitamina B12.

110 ml de una solución lista para usar de ^{57}Co -vitamina B12. Estable a 2–8°C durante 30 días después de abrir, o hasta la fecha de caducidad marcada en la etiqueta.
KVSP1: 1 vial
KVSP2: 2 viales
KVSP5: 5 viales

^{125}I Ácido Fólico (FSP2)
Sólo provisto en los kits de Ácido Fólico.

110 ml de una solución lista para usar de ^{125}I ácido fólico, con conservante. Estable a 2–8°C durante 30 días después de abrir, o hasta la fecha de caducidad marcada en la etiqueta.
KFSP1: 1 vial
KFSP2: 2 viales
KFSP5: 5 viales

Calibradores de Vitamina B12/Ácido Fólico (DSP3–9)
 Siete viales, marcados A – G, con distintos niveles de vitamina B12 y ácido fólico, liofilizados en una matriz de proteínas. Reconstituir el calibrador cero A con **6,0 ml** de agua destilada o desionizada, y reconstituir cada uno de los calibradores restantes, B – G, con **3,0 ml** de agua destilada o desionizada. Estable a 2–8°C durante 30 días después de su reconstitución, o 2 meses (alícuotado) a –20°C. Evitar la exposición excesiva a la luz directa.
KDSP1, KVSP1, KFSP1: 1 juego
KDSP2, KVSP2, KFSP2: 1 juego
KDSP5, KVSP5, KFSP5: 2 juegos

Los valores *lote-específicos* de los calibradores se tabulan en la sección Procedimiento del Radioensayo. Note que los calibradores suministrados con el Kit Solid Phase No Boil Dualcount *no* son

intercambiables con aquellos de otros kits para vitamina B12 y ácido fólico de DPC. Para conocer los valores exactos en las unidades correctas, consulte las etiquetas de los viales.

Solución ditiotreitól (DTT1, 5DTT1)
 Solución de ditiotreitól. Estable a 2–8°C durante 30 días después de su apertura.
KDSP1, KVSP1, KFSP1: 1 vial × 6 ml (DTT1)
KDSP2, KVSP2, KFSP2: 2 viales × 6 ml (DTT1)
KDSP5, KVSP5, KFSP5: 1 vial × 30 ml (5DTT1)

Control de anemia (ANC)
 Control basado en proteínas liofilizadas con concentraciones *lote-específicas* de vitamina B12 y ácido fólico, en el rango deficiente. Reconstituir con **2,0 ml** de agua destilada. Estable a 2–8°C durante 7 días después de su reconstitución, o 2 meses (alícuotado) a –20°C. Evitar la exposición excesiva a la luz directa.
KDSP1, KVSP1, KFSP1: 1 vial
KDSP2, KVSP2, KFSP2: 1 vial
KDSP5, KVSP5, KFSP5: 1 vial

Materiales Requeridos pero no suministrados

Contador Gama: Debe ser capaz de discriminar entre ^{125}I y ^{57}Co para determinaciones simultáneas, con un derrame aceptablemente bajo. Para los kits de un solo analito, es aceptable utilizar un equipo de un solo canal, ajustado para ^{57}Co o ^{125}I .

Centrífuga: Debe ser capaz de producir por lo menos 2 000 xg. El uso de un modelo refrigerado de alta velocidad es conveniente pero no esencial. También se pueden obtener buenos resultados con los equipos de mesa de baja velocidad, siempre que el tiempo de centrifugación se prolongue adecuadamente.

Mezclador Vortex: El mezclador deberá tener la potencia suficiente para crear un vórtice en los tubos de ensayo después de añadir el ligante. Se ha encontrado que no es adecuado el uso de mezcladores de racks de muchos tubos.

Agua destilada estéril: Para usar en los tubos NSB en el paso 8 del Procedimiento del Radioensayo.

Recipientes de plástico con tapas: Para preparar la Solución de Trabajo.

Tubos de 12 x 75 mm: Se recomienda el uso de tubos de polipropileno (disponibles en DPC), pero también son adecuados los tubos de vidrio y de poliestireno.

Pipetas volumétricas de 6,0 ml y 3,0 ml: Para reconstituir los calibradores.

Agua destilada o desionizada: Para reconstituir los calibradores.

Controles: Se suministra un control con valores lote-específicos en el rango deficiente. Los materiales adicionales pueden obtenerse de DPC: CON6 es un control del radioensayo basado en suero humano y de tres niveles, el cual contiene vitamina B12 y ácido fólico como dos de más de 25 constituyentes analizados.

Micropipeta de 200 µl: Para añadir la muestra. Se recomienda el uso de pipetas con puntas desechables y una interfase de aire, la cual evita que la muestra entre en contacto directo con la pipeta. Se deberá evitar el uso de pipetas de desplazamiento positivo debido al riesgo de contaminación por arrastre.

Micropipeta o dispensador de 50 µl: Para añadir NaOH/KCN. Se ha probado que los dispensadores de repetición son confiables y convenientes para añadir este reactivo.

Micropipeta o dispensador de 1 000 µl: Para añadir la Solución de Trabajo y el ligante para Vitamina B12/Ácido Fólico. Se ha probado que los dispensadores de repetición son confiables y convenientes para añadir estos reactivos.

Baño de agua a 37°C: No usar una estufa o un bloque calefactor.

Agitador magnético y barra de agitación: Para suspender el ligante para Vitamina B12/Ácido Fólico justo antes y durante la adición de este reactivo.

Rack de decantación: Rack de espuma (o metal) capaz de sostener firmemente los tubos para la decantación y el drenado simultáneos. Los racks de espuma pueden obtenerse de DPC.

Papel gráfico Logit-log – disponible en DPC (Referencia: ZP797)

Ácido ascórbico: Sólo se requiere para las determinaciones de ácido fólico en sangre entera y glóbulos rojos. La

solución 1% *debe prepararse fresca* diariamente. Los cristales de ácido ascórbico se deben proteger de la humedad para que floten libremente y no se aterronen por la humedad excesiva. (El ascorbato de sodio *no* es una alternativa adecuada).

Papel de aluminio: U otro medio para proteger los hemolizados de la luz.

Manipulación de la muestra

Para las determinaciones de ácido fólico, el paciente debe estar en ayunas.⁴⁰

Tipo de muestra: Para las determinaciones de vitamina B12 y ácido fólico, se puede usar suero fresco o congelado fresco, plasma heparinizado o plasma con EDTA. No hay una interferencia clínicamente significativa debido a los anticoagulantes analizados.

Para las determinaciones de ácido fólico en sangre entera y glóbulos rojos, usar sangre entera heparinizada fresca o con EDTA. Se debe conocer el hematocrito del paciente para traducir los resultados de ácido fólico de sangre entera a glóbulos rojos, los cuales se expresan como nanogramos por mililitro (ng/ml) de glóbulos rojos concentrados. Es más, para calcular exactamente el resultado de ácido fólico en los glóbulos rojos, también se debe conocer el nivel de ácido fólico en el suero del paciente.

Los tubos para recoger sangre de distintos fabricantes pueden producir valores diferentes, dependiendo del material del tubo y de los aditivos, incluyendo barreras de gel o barreras físicas, activadores de la coagulación y/o anticoagulantes. El Solid Phase No Boil Dualcount no ha sido analizado con todos los distintos tipos de tubos. Para obtener detalles sobre los tipos tubos que se han analizado, consulte la sección de Tipos de Muestras Alternativos.

Volumen requerido: 200 µl de suero, plasma o hemolizado.

Almacenamiento y estabilidad:

Suero o plasma heparinizado: Para que los resultados de ácido fólico sean confiables es crítico que el almacenamiento se haga bajo condiciones adecuadas. Si la muestra *no* va a ser analizada dentro de 8 horas,

alicuotar y congelar a -20°C : estable durante 6–8 semanas.³⁸ Descongelar sólo una vez (a temperatura ambiente). Evitar la exposición excesiva de las muestras a la luz directa.

Fármacos anti-folato: Como se indicó en la sección de Especificidad, la proteína que se une al folato en el kit Solid Phase No Boil reacciona en forma cruzada, en cierto grado, con el fármaco “anti-folato” metotrexato (MTX), un compuesto utilizado en la quimioterapia del cáncer. Debido a que infusiones de altas dosis de metotrexato pueden resultar en niveles circulantes iniciales de 45 000 ng/ml, y de 2 000 ng/ml cuarenta y ocho horas después, *no* se deberá usar el kit para medir ácido fólico en los pacientes que estén recibiendo este fármaco. Por otra parte, se deberá tener mucho cuidado al interpretar los niveles de ácido fólico en los pacientes que recientemente hayan sido tratados con metotrexato o con cualquier otro fármaco que tenga una estructura similar.

Hemólisis: Dependiendo del grado de hemólisis de la muestra, se obtendrán resultados de ácido fólico sérico falsamente elevados, ya que esta vitamina está presente en los eritrocitos a concentraciones mucho mayores que en el plasma. Por otra parte, los resultados de vitamina B12 medidos por el procedimiento Solid Phase No Boil no son afectados por la hemólisis.

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

Muestras de pacientes con alta concentración: Las muestras de los pacientes que tengan concentraciones de vitamina B12 o ácido fólico mayores que la del calibrador más alto deberán diluirse con el calibrador cero y volverse a analizar. En algunos pocos pacientes con leucemia mielógena crónica (CML) se pueden encontrar concentraciones de vitamina B12 excepcionalmente altas como de 20 000 pg/ml.^{5,35} Debido a que un arrastre de incluso un microlitro de una muestra tal causaría un incremento falso de 100 pg/ml en el tubo de ensayo siguiente, se deberá tomar las precauciones normales: analizar las muestras por duplicado, cambiar las puntas de las pipetas entre muestras y

evitar el uso de micropipetas con desplazamiento positivo.

Preparación de los hemolizados: sólo es requerido para las determinaciones de ácido fólico en sangre total. Lisar las células en sangre total heparinizada o en EDTA recién obtenidas mediante la preparación de una dilución 1 en 21 de la muestra (totalmente resuspendidas) en una solución de ácido ascórbico al 1% recién preparada; por ejemplo, mezclar **100 µl** de muestra con **2,0 ml** de esta solución, agitar. Es importante utilizar ácido ascórbico en lugar de ascorbato sódico, y preparar la solución al 1% fresca, de forma diaria.³³

El hemolizado puede ser analizado inmediatamente; no se requiere incubación. Si no se analiza de forma inmediata, el hemolizado puede ser almacenado a temperatura ambiente ($15\text{--}28^{\circ}\text{C}$) en la oscuridad hasta 90 minutos. Los hemolizados pueden guardarse a $2\text{--}8^{\circ}\text{C}$ por un máximo de 3 horas, o congelados a -20°C por 2 semanas.^{40,41} Proteger de la luz. Tener en cuenta que el procedimiento de radioensayo no dará ningún resultado de vitamina B12 significativo para las células rojas o sangre entera, ya que la vitamina B12 es destruida por el ácido ascórbico.

Procedimiento del Radioensayo

Todos los componentes deben llevarse a temperatura ambiente ($15\text{--}28^{\circ}\text{C}$) antes de su uso.

- 1 Marcar dieciocho tubos por duplicado: T (cuentas totales), NSB (unión inespecífica), A (unión máxima) y B a G. Marcar tubos adicionales, también por duplicado, para los controles y las muestras de los pacientes.

Vitamina B12

Calibrador	Aproximar pg/ml	Aproximar pmol/l
A	0	0
B	50	37
C	100	74
D	300	221
E	600	443
F	1 200	885
G	2 400	1 771

Ácido fólico

Calibrador	Aproximar ng/ml	Aproximar nmol/l
A	0	0
B	0,5	1,1
C	1	2,3
D	3	6,8
E	6	13,6
F	12	27,2
G	24	54,5

- 2** Añadir **200 µl** del calibrador cero A en los tubos NSB y A, y **200 µl** de cada uno de los calibradores B–G en tubos correspondientemente marcados. Pipetear **200 µl** de cada control, de la muestra de suero o plasma y del hemolizado en los tubos preparados. **Pipetear directamente en el fondo del tubo.**

Las muestras de los pacientes que se espera que contengan concentraciones mayores que la concentración del calibrador más alto deberán diluirse en el calibrador cero antes del análisis.

- 3 Preparación de la Solución de Trabajo:** Preparar la Solución de Trabajo *no más de 30 minutos antes de usar*. La cantidad de cada componente depende del número de tubos que se va a analizar. Los volúmenes requeridos, en *mililitros por tubo de ensayo*, se tabulan a continuación. Asegurarse de multiplicar estos volúmenes por un número un poco mayor que el número de tubos que se va a analizar. (Los componentes se suministran en

volúmenes suficientes para preparar la Solución de Trabajo con aproximadamente un 10% de exceso).

Mililitros por tubo	
Ditiotritol	0,05
Trazador	1,0

- 4** Añadir **1 000 µl** de Solución de Trabajo recién preparada a todos los tubos. Mezclar en el Vortex.

Para añadir los 1 000 µl en este paso y en el paso 8, se recomienda usar un dispensador de repetición. Dejar los tubos T a un lado para su conteo (paso 12); no requieren más procesamiento posterior.

- 5** Incubar durante **30 minutos** a temperatura ambiente (15–28°C).

La incubación se puede extender hasta 45 minutos a temperatura ambiente.

- 6** Añadir **50 µl** de NaOH/KCN a todos los tubos. Mezclar en el Vortex.

Tener mucho cuidado al manipular este reactivo. Para añadir este reactivo se recomienda usar un dispensador de repetición. Ahora los tubos deberán estar de color azul.

- 7** Incubar durante **30 minutos a 37°C**.

La incubación puede extenderse hasta un *máximo* de 45 minutos a 37°C. (Una incubación más larga resultará en recuperaciones bajas de vitamina B12).

- 8** Añadir **1 000 µl** del ligante para Vitamina B12/Ácido Fólico a todos los tubos *excepto a los tubos NSB*. A los tubos NSB, añadir **1 000 µl** de agua destilada estéril. **Mezclar en el Vortex vigorosamente.**

Se deberá mezclar los tubos en el Vortex *individualmente*, hasta que se forme un vórtice en el tubo. Se ha encontrado que no es adecuado el uso de mezcladores de racks para muchos tubos.

El ligante debe mantenerse *bien suspendido* mientras se lo está dispensando: se recomienda el

mezclado mecánico con un agitador magnético. Ahora todos los tubos deberán estar de color violeta, excepto por los tubos T y NSB. Se puede colocar la cantidad de ligante que se necesite para el ensayo en un vaso de precipitado de vidrio (¡no de plástico!) con una barra de agitación, pero el resto del ligante deberá guardarse en el vial siliconado original.

- 9 Incubar durante **60 minutos** a temperatura ambiente (15–28°C).
- 10 Centrifugar durante **por lo menos 15 minutos** a 2000 xg o a una aceleración mayor.

Se pueden usar aceleraciones mayores pero los tubos de vidrio o poliestireno se pueden romper a velocidades mayores. Con centrífugas de mesa de baja velocidad puede ser necesario prolongar el tiempo de la centrifugación.

- 11 Decantar los sobrenadantes simultáneamente, usando un rack, y retener los precipitados para el conteo.

La decantación completa y uniforme, con la remoción de toda la humedad visible mejorará mucho la precisión. Usando un rack de decantación de espuma, decantar los contenidos de todos los tubos (excepto los tubos T), y permitir que drenen invertidos durante 5 minutos. Luego, golpear los tubos suavemente sobre papel absorbente para remover todas las gotas residuales.

- 12 Contar el precipitado durante **1 minuto** en un contador gama.

Note que el precipitado contiene la fracción unida, no la libre.

Cálculo y Control de Calidad

Muestras de suero: Para obtener las concentraciones de vitamina B12 o ácido fólico a partir de una representación logit-log de la curva de calibración, calcular primero la media de las cuentas NSB corregidas por minuto para cada pareja de tubos.

Cuentas netas = (Media CPM) menos (Media **NSB** CPM)

Entonces, determinar la unión de cada pareja de tubos como un porcentaje de la unión máxima (MB), tomando las cuentas corregidas con el NSB de los tubos A como 100%:

Porcentaje de Unión = (Cuentas netas / Cuentas **MB** netas) × 100

El cálculo se puede simplificar omitiendo la corrección para la unión inespecífica; las muestras que se encuentran dentro del rango de los calibradores dan prácticamente los mismos resultados cuando el Porcentaje de Unión se calcula directamente de la Media CPM.

Usando papel gráfico logit-log, representar el porcentaje de unión en el eje vertical frente a la concentración en el eje horizontal (logarítmico) para cada calibrador no cero y dibujar la línea que pase por esos puntos aproximadamente. Los resultados de las muestras pueden ser leídos en la curva por interpolación.

Reducción de datos: Es una buena práctica crear un gráfico de la curva de calibración para poder controlar visualmente si la transformación usada es adecuada, incluso cuando el cálculo de los resultados se realiza por ordenador. Consultar Davis SE et al. Radioimmunoassay data processing with a small programmable calculator. J Immunoassay 1980;1:15-25; and Dudley RA, et al. Guidelines for immunoassay data reduction. Clin Chem 1985;31:1264-71.

Hemolizados: Primero, calcular el resultado *R* en nanogramos por mililitro de hemolizado, usando la curva de calibración de ácido fólico. Luego, multiplicar por el factor de dilución 21 para obtener la concentración de ácido fólico en sangre entera, en ng/ml. Para obtener una medida aproximada de la concentración de glóbulos rojos concentrados en ng/ml, multiplicar la concentración de ácido fólico en sangre entera por *100/H*, donde *H* es el hematocrito *en porcentaje*.

Ácido fólico en glóbulos rojos ≈ 21*R* × (100 / *H*)

En rigor, la contribución del ácido fólico sérico se debe restar a la concentración del ácido fólico en sangre entera antes de multiplicar por *100/H*. Usando el nivel de

ácido fólico sérico *S* del paciente, la ecuación exacta es:

$$\text{Ácido fólico en glóbulos rojos} = (21R - [S \times ((100 - H) / 100)]) \times (100 / H)$$

No obstante, en la mayoría de los casos el término entre corchetes es tan pequeño en comparación con el término *21R*, que se lo puede omitir.

Controles: Usar el control provisto con el kit, y tabular los resultados diariamente como se describe en Westgard JO, et al. A multi-rule chart for quality control. Clin Chem 1981;27:493-501. Las muestras repetidas son una herramienta de valor adicional para controlar la precisión interensayo.

Parámetros de control de calidad: Recomendamos mantener un registro de estos parámetros de rendimiento:

T = Cuentas totales (como cuentas por minuto)

$$\%NSB = 100 \times (\text{Media cuentas NSB} / \text{cuentas totales})$$

$$\%MB = 100 \times (\text{Cuentas netas} / \text{Cuentas totales})$$

Y los cortes 20, 50 y 80 por ciento, donde

20% = Concentración al 20 por ciento de unión, etc.

Centrifugación: Usar las fórmulas que se dan a continuación para calcular la aceleración de su centrífuga a una velocidad dada, o la velocidad (en revoluciones por minuto) requerida para lograr la fuerza *g* deseada.

$$\text{Fuerza } g = 28,38 \times (\text{rpm} / 1\,000)^2 \times \text{radio [pulgadas]}$$

$$\text{rpm} = 187,7 \times \sqrt{(\text{fuerza } g / \text{radio [pulgadas]})}$$

o

$$\text{Fuerza } g = 11,18 \times (\text{rpm} / 1\,000)^2 \times \text{radio [cm]}$$

$$\text{rpm} = 299,07 \times \sqrt{(\text{fuerza } g / \text{radio [cm]})}$$

Tandas ejemplo – Vitamina B12 / Ácido Fólico: Sólo como ilustración, no se puede utilizar para calcular resultados. Al ser los valores de los calibradores *lote-específicos*, las concentraciones expresadas en la columna derecha no pueden coincidir con los valores de los calibradores suministrados en su envío. (Ver las tablas "Example Run, Vitamin B12" y "Example Run, Folic Acid").

Valores esperados

Estudio del intervalo de referencia

Se realizaron determinaciones de vitamina B12 y ácido fólico en muestras de suero fresco de un total de cien individuos sanos mediante el kit Solid Phase No Boil Dualcount de DPC. El kit también se utilizó para realizar determinaciones de ácido fólico en muestras de sangre entera de ochenta y ocho individuos sanos. Los grupos de referencia consistieron principalmente del personal del laboratorio, hombres y mujeres, en aparente buen estado de salud. En cada caso, el intervalo de referencia se determinó en forma no paramétrica con la región central abarcando el 95% de las observaciones. Los intervalos de referencia para el kit Solid Phase No Boil Dualcount sugeridos por este estudio se tabulan a continuación.

Vitamina B12 sérica	200 – 950 pg/ml	150 – 700 pmol/l
Ácido fólico sérico	3,0 – 17 ng/ml	7 – 39 nmol/l
Ácido fólico en sangre entera	80 – 320 ng/ml	180 – 725 nmol/l
Ácido fólico en glóbulos rojos	175 – 700 ng/ml	395 – 1 585 nmol/l

Los intervalos de referencia para el ácido fólico fueron confirmados por otros estudios realizados en dos laboratorios, en un total de 162 individuos. Note que los resultados cercanos al límite inferior del valor normal —por ejemplo, resultados de ácido fólico en glóbulos rojos en el intervalo 100 a 200 ng/ml— se deben interpretar con precaución a la luz de otros datos clínicos y de laboratorio. Además, los resultados de ácido fólico *sérico* se deberán interpretar en vista de las determinaciones en los *glóbulos rojos*.

Los intervalos de referencia tabulados anteriormente se obtuvieron en los Estados Unidos. Estudios realizados en Suecia y Noruega sugieren intervalos de referencia de 100–350 ng/ml y 130–350 ng/ml, respectivamente, para ácido fólico en glóbulos rojos. Estos límites han de considerarse *sólo como una guía*. Cada laboratorio deberá establecer sus propios intervalos de referencia.

Vitamina B12: No hay una superposición entre el intervalo de 200–950 pg/ml de vitamina B12 para los individuos sanos y el intervalo absoluto encontrado para las muestras confirmadas como deficientes en vitamina B12. (Ver "Expected Values: Comparative Discrimination Plot" en la sección de Tablas y Gráficos). Por lo tanto, se puede tomar a 200 pg/ml como el límite inferior del normal para los valores de vitamina B12 medidos por el kit Solid Phase No Boil. Note que los valores menores de 200 pg/ml y mayores de 124 pg/ml —el mayor valor de Solid Phase No Boil observado para las muestras deficientes en vitamina B12— se deberán tratar como estadísticamente subnormales; tales casos pueden merecer que se continúen investigando.

Las causas comunes de niveles altos de vitamina B12 incluyen la enfermedad hepática, la enfermedad mieloproliferativa (con leucemia mielógena crónica como un caso especial) y el uso de suplementos multivitamínicos.

Muestras deficientes en vitamina B12 confirmadas

DPC ha estudiado más de cien muestras deficientes en vitamina B12, las cuales fueron confirmadas como deficientes en vitamina B12 por criterios clínicos y hematológicos independientes.¹⁴ Se utilizaron dos métodos de referencia: un método microbiológico basado en el *Lactobacillus leichmannii* y el kit Charcoal Boil Dualcount de DPC, un radioensayo que se basa en la desnaturalización por calor, la separación por carbón y un factor intrínscopo purificado. En la mayoría de las muestras, pero no en todas, se obtuvieron valores de vitamina B12 por los tres métodos. Estos resultados clínicos se muestran en una representación de discriminación comparativa que indica, lado a lado, el intervalo deficiente en vitamina B12 para los tres métodos, y el grado de superposición entre los valores normales y los deficientes para los dos radioensayos. (Ver "Expected Values: Comparative Discrimination Plot" en la sección de Tablas y Gráficos.)

Características analíticas

Para obtener datos representativos del rendimiento del kit Solid Phase No Boil Dualcount, ver la sección Tablas y

Gráficos. Vitamina B12 Los resultados se expresan en pg/ml. Ácido fólico Los resultados se expresan en pg/ml. Excepto cuando se especifique, todos los resultados se generaron en suero o en sangre entera heparinizada.

Factor de conversión para la vitamina B12: pg/ml $\times$ 0,7378 $\rightarrow$ pmol/l

Factor de conversión para el ácido fólico: pg/ml $\times$ 2,266 $\rightarrow$ nmol/l

Intervalo de calibración:

Vitamina B12:
aproximadamente 50 – 2 400 pg/ml
Los valores de los calibradores son *lote-específicos*.

Ácido fólico:
aproximadamente 0,5 – 24 ng/ml.
Los valores de los calibradores son *lote-específicos*.

Sensibilidad analítica:

Vitamina B12: 34 pg/ml.

Ácido fólico: 0,3 ng/ml.

Precisión intraensayo (dentro de una tanda): Las estadísticas se calcularon para las muestras a partir de los resultados de veinte pares de tubos en una tanda de análisis. (Ver las tablas "Intraassay Precision").

Precisión entre ensayos (de una tanda a otra): Las estadísticas se calcularon a partir de los resultados de pares de tubos en dieciocho análisis diferentes para 14 muestras. (Ver las tablas "Interassay Precision").

Precisión acumulativa entre ensayos: Las estadísticas acumulativas entre ensayos se generaron para nueve controles durante cuatro meses. Para cada control, se procesó un par de tubos en aproximadamente 100 ensayos. Las estadísticas reflejan varios cambios de lote y el trabajo de varios técnicos. (Ver las tablas "Cumulative Interassay Precision".)

Efecto deriva: Pares de tubos fueron espaciados a lo largo de un ensayo de más de 350 tubos. Usando una pipeta de repetición, la adición del ligante para Vitamina B12/Ácido Fólico se completó en ocho minutos. Los resultados indican que no hay un efecto creado por la posición de los tubos debido al tiempo demorado en

añadir los reactivos, aun en ensayos de esta magnitud.

Especificidad

Pureza del ligante: Se realizaron dos experimentos para demostrar la pureza del ligante para el factor intrínscico (IF) utilizado en el radioensayo Solid Phase No Boil Vitamina B12.

- La incubación durante la noche del ligante para Vitamina B12/Ácido Fólico con suero conteniendo anticuerpos específicos para el factor intrínscico resultó en la completa destrucción de la capacidad de este reactivo para unirse a la vitamina B12. Si la proteína R hubiese estado presente, esta hubiese retenido por lo menos parte de su capacidad para unirse a la vitamina B12.
- La sustitución del ligante para Vitamina B12/Ácido Fólico en un sistema de radioensayo basado en la desnaturalización por calor y en carbón recubierto, y operando a un pH del análisis de aproximadamente 2, nuevamente produjo la total inactivación del ligante. Si hubiese contenido proteína R, hubiese retenido por lo menos parte de su actividad bajo estas condiciones acídicas.

Reactividad cruzada: Se evaluó la especificidad del ligante para el factor intrínscico purificado analizando una preparación de cobinamida. Los resultados muestran que, incluso a concentraciones tan altas como 50 000 000 pg/ml, la cobinamida prácticamente no causa ninguna reducción en la unión de la vitamina B12 marcada radiactivamente, es decir, produce una concentración aparente de vitamina B12 en el límite de detección; por lo tanto, la reactividad cruzada con la cobinamida es menor de 0,0001%. (Ver la tabla de "Specificity 1").

También se estudió la reactividad cruzada entre el metotrexato (MTX), un fármaco antifolato, y la proteína que se une al folato usada en el kit Solid Phase No Boil. El porcentaje de reactividad cruzada, si bien es numéricamente pequeño, es clínicamente significativo, ya que el metotrexato generalmente se administra en dosis extremadamente altas. Por

consecuente, las mediciones de ácido fólico están contraindicadas en los pacientes que reciben actualmente, o recientemente recibieron, tratamiento con este fármaco o con cualquier otro fármaco antifolato estructuralmente relacionado. (Ver la tabla de "Specificity 2").

Linealidad: Las muestras fueron analizadas con varias diluciones. (Para datos representativos, ver las tablas de "Linearity").

Recuperación: Se prepararon seis soluciones cargadas usando el calibrador cero como diluyente. Tres de las soluciones (A, B y C) se prepararon para representar 10 000, 20 000 y 30 000 pg/ml de vitamina B12. Las otras tres (D, E y F) se prepararon para representar 60, 120 y 180 ng/ml de ácido fólico. Se añadió una alícuota de 50 µl de cada solución cargada a alícuotas de 950 µl de muestras de seis pacientes, para crear una relación de carga de 1 en 20, dejando la matriz de la muestra relativamente intacta. Los valores tabulados representan la recuperación de la solución cargada solamente: la contribución de la muestra de suero ha sido deducida. Los números entre paréntesis son las concentraciones de las muestras de suero originales no cargadas. (Ver las tablas de "Recovery").

Efecto de las proteínas: Para determinar los efectos de las variaciones del contenido proteico sobre el procedimiento Solid Phase No Boil, dos muestras de suero de pacientes fueron cargadas con distintas cantidades de albúmina de suero humano (HSA) e IgG humana normal. Luego, todas las muestras, cargadas y no cargadas, se procesaron en un único ensayo. Los resultados muestran que incluso grandes variaciones en el contenido proteico sólo produce variaciones pequeñas en el resultado observado. Podemos concluir que no existe un efecto proteico clínicamente significativo en el sistema Solid Phase No Boil Dualcount.

Tipo de Muestra Alternativa: Se recogieron muestras de individuos sanos simultáneamente en tubos no tratados, heparinizados y con EDTA, y luego se analizaron con el procedimiento Solid Phase No Boil Dualcount,. Los resultados indican que no hay una interferencia

clínicamente significativa debido a los anticoagulantes analizados. (Ver la tabla "Alternate Sample Type")

Blancos de pacientes: Para verificar que el procedimiento Solid Phase No Boil Dualcount de DPC no tiene problemas de unión inespecífica del tipo descrito en la literatura,^{6,24,27,35} se realizó un ensayo que incluyó una curva de calibración, blancos calibradores (se omitió el ligante) y dos juegos de tubos blancos de pacientes. De uno de los juegos blancos de pacientes, se omitió el ligante Solid Phase a lo largo del ensayo. El otro juego se analizó sustituyendo el ligante con un "Blanco de Celulosa: una suspensión de partículas de celulosa idéntica al ligante Solid Phase, excepto por la ausencia del factor intrínseco purificado y la proteína que se une al folato. (Para evaluar el kit, el blanco de celulosa puede obtenerse bajo pedido de DPC).

Los resultados indican que (a) la omisión del ligante es una alternativa adecuada al uso del blanco de celulosa, y (b) la unión inespecífica es *uniformemente baja* tanto para las muestras de los pacientes como para los calibradores en el sistema Solid Phase No Boil Dualcount. Por lo tanto, un sólo juego de tubos NSB —tubos de calibrador cero con omisión de ligante— es suficiente para la determinación de rutina de la unión inespecífica. De hecho, se puede omitir totalmente los tubos NSB: los cálculos indican que la corrección para la unión inespecífica puede ser omitida sin ningún efecto significativo sobre los resultados para las muestras que se encuentran dentro del rango de los calibradores. (Ver las tablas de "Patient Blanks").

El paso de desnaturalización

Para probar la efectividad del paso de desnaturalización alcalina a 37°C en el sistema Solid Phase No Boil Dualcount, se realizaron estudios independientes con el kit en muestras de pacientes con leucemia mielógena crónica (CML) y con otros trastornos mieloproliferativos, y en muestras de pacientes con anemia perniciosa (PA), en las cuales se había analizado la presencia de anticuerpos bloqueantes anti-factor intrínseco.

Muestras CML: En un experimento con el kit Solid Phase No Boil, se utilizó precipitación en carbón para evaluar la

unión inespecífica en tubos blancos de pacientes al final de la segunda incubación. Los resultados mostraron una precipitación prácticamente completa del trazador en todos los tubos; el comportamiento de los tubos blancos de pacientes con CML en este experimento fue similar al de los blancos generados con muestras de pacientes sanos. (Las dos muestras con CML tenían niveles de vitamina B12 del orden de los 3 000 y 5 000 pg/ml). Este experimento muestra que el paso de desnaturalización alcalina a 37°C utilizado en el sistema Solid Phase No Boil, inactiva eficazmente la proteína de unión a la vitamina B12, incluso a los niveles altos que a veces se encuentran en los pacientes con CML; porque si la proteína transportadora endógena hubiese escapado la desnaturalización, se hubiese unido al trazador haciendo que una cantidad significativa de radioactividad quedara en el sobrenadante después de la precipitación en carbón.

Muestras PA: Más de la mitad de todos los pacientes con anemia perniciosa tienen anticuerpos bloqueantes específicos para el factor intrínseco. Se analizaron catorce muestras con PA, siete de ellas positivas para dichos anticuerpos, tanto con el kit Solid Phase No Boil y con el kit Charcoal Boil Dualcount.⁸ Los resultados muestran que el paso de desnaturalización alcalina a 37°C del kit Solid Phase No Boil es tan eficaz como un paso de ebullición para desnaturalizar los anticuerpos anti-factor intrínseco, los cuales de otra manera causarían resultados falsamente elevados (falso normal) en muchos casos de PA.

Como confirmación adicional, se sometieron cuatro muestras con PA positivas para los anticuerpos y cuatro muestras PA negativas para los anticuerpos al procedimiento de desnaturalización alcalina a 37°C del kit Solid Phase No Boil y a un procedimiento de control, en el cual se sustituye el hidróxido de sodio con agua.⁸ Las muestras positivas para los anticuerpos que se sometieron al procedimiento control retuvieron su capacidad para bloquear la actividad del factor intrínseco, mientras que las muestras positivas para los anticuerpos que se sometieron al procedimiento de desnaturalización

alcalina del kit no la retuvieron: estas últimas mostraron un comportamiento que fue indistinguible del de las muestras negativas para los anticuerpos, indicando que el paso de desnaturalización "sin hervor" del kit había inactivado eficazmente a los anticuerpos anti-factor intrínseco presentes en las muestras positivas. Note que mientras los experimentos informados aquí involucraron muchas muestras con títulos de anticuerpos extremadamente altos, no pueden descartar la posibilidad de que los anticuerpos en una muestra rara con un título aún más alto podría no ser totalmente desnaturalizada por el método "sin hervor". Cuando exista tal duda, el resultado "sin hervor" puede confirmarse volviendo a analizar la muestra por un procedimiento alternativo "con hervor".

Efecto del tiempo de incubación sobre los hemolizados: Se recogieron muestras de sangre de cuatro individuos en tubos heparinizados y con EDTA. Los hemolizados se prepararon incubando alícuotas de cada muestra con una solución 1% de ácido ascórbico, durante periodos de tiempo crecientes (de 0 a 90 minutos en la oscuridad a temperatura ambiente (15–28°C), antes del ensayo. La tabla muestra que no hay una diferencia significativa en los resultados de ácido fólico en glóbulos rojos para los tiempos de lisis que van de cero a 90 minutos. Por consiguiente, los hemolizados se pueden analizar inmediatamente después del paso de dilución con ácido ascórbico. La tabla también muestra que los resultados no se ven influenciados por la elección del anticoagulante: se puede utilizar sangre entera heparinizada o con EDTA. (Ver la tabla "Effect of Incubation Time on Hemolysates".)

Comparación del método para B12: El ensayo se comparó con el ensayo IMMULITE Vitamina B12 de DPC en 98 muestras de suero de pacientes. (Intervalo de concentración: aproximadamente 128 a 1 307 pg/ml. Ver el gráfico de Method Comparison). Por regresión lineal:

$$(SPNB) = 0,98 (IML) - 5,3 \text{ pg/ml}$$

$$r = 0,982$$

Medias:
371 pg/ml (Solid Phase No Boil)
385 pg/ml (IMMULITE – LKVB)

Comparación del método para ácido fólico: El ensayo se comparó con el ensayo IMMULITE Ácido Fólico de DPC en 71 muestras de suero de pacientes. (Intervalo de concentración: aproximadamente 1,4 a 20 ng/ml. Ver el gráfico de Method Comparison). Por regresión lineal:

$$(SPNB) = 0,92 (IML) + 0,71 \text{ ng/ml}$$

$$r = 0,985$$

Medias:
6,2 ng/ml (Solid Phase No Boil)
5,9 ng/ml (IMMULITE – LKFO)

Asistencia técnica

Póngase en contacto con el distribuidor nacional.

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

Français

Solid Phase No Boil Dualcount

Domaine d'utilisation: La technique Solid Phase No Boil Dualcount est un radiodosage permettant de doser simultanément la vitamine B12 et l'acide folique dans le plasma, sérum et sang total (pour les folates érythrocytaires); Le coffret Solid Phase No Boil Vitamin B12 et le coffret Solid Phase No Boil Folic Acid sont destinés à la détermination simple de la vitamine B12 et de l'acide folique respectivement. Ces trois coffrets sont strictement réservés à un usage *in vitro* comme aide à un diagnostic clinique.

	µCi / kBq		
	Coffret Dualcount	Coffret Vitamine B12	Coffret Acide Folique
100 Tubes	KDSP1	KVSP1	KFSP1
⁵⁷ Co Vitamine B12	2/74	2/74	—
¹²⁵ I Acide Folique	6/222	—	6/222
200 Tubes	KDSP2	KVSP2	KFSP2
⁵⁷ Co Vitamine B12	4/148	4/148	—
¹²⁵ I Acide Folique	12/444	—	12/444
500 Tubes	KDSP5	KVSP5	KFSP5
⁵⁷ Co Vitamine B12	10/370	10/370	—
¹²⁵ I Acide Folique	30/1110	—	30/1110

Principe du test

1. Dénaturation Alcaline des Protéines Endogènes

2. Compétition vis-à-vis du ligand purifié à pH 9.3: les analogues de la vitamine B12 n'interfèrent pas dans la réaction car le ligand, facteur intrinsèque purifié de porc, est exempt de protéine R. Le ligand de l'acide folique, la bêta lactoglobuline purifiée, a une affinité équivalente pour la MTHF (tétra hydrofolate de méthyle), forme prédominante de l'acide folique et le PGA (acide pteroyl glutamique) forme stable utilisée pour les standards du coffret.

3. Séparation en phase solide

Temps d'incubation totale : 2 heures.

Activité totale en début de marquage :

Acide folique marquée à l'iode 125: environ 80 000 cpm.

Vitamine B12 marquée au Cobalt 57: environ 25 000 cpm.

Précautions d'emploi

Réservé à un usage diagnostique *in vitro*.

Réactifs : Conserver à +2/+8°C dans un réfrigérateur autorisé à recevoir du matériel radioactif. Éliminer les déchets conformément aux lois en vigueur.

Ne pas utiliser les réactifs au delà de leur date d'expiration.

Certains composants fournis avec ce coffret peuvent contenir des agents humains et/ou d'autres éléments potentiellement infectieux qui nécessitent certaines précautions.

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

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

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

Une solution contenant de la soude caustique (NaOH) et du cyanure de potassium (KCN) est fournie avec ce coffret: tout contact avec le corps doit être évité avec ce réactif contenant à la fois des alcalis très forts et du cyanure.

Eau : utiliser de l'eau distillée ou désionisée.

Radioactivité

Règles de base de protection contre les rayonnements ionisants et précautions d'emploi.

Ce produit radioactif ne peut être reçu, acheté, détenu ou utilisé que par des personnes autorisées à cette fin et dans des laboratoires dotés de cette autorisation. Cette solution ne peut en

aucun cas être administrée à l'homme ou aux animaux. Respecter impérativement les dates de péremption indiquées sur l'emballage extérieur et sur les étiquettes des différents réactifs du coffret. Tous les réactifs, dont les tubes revêtus d'anticorps, doivent être conservés à + 4/+ 8° C dans leur conditionnement d'origine avant d'être utilisés. L'achat, la possession, l'utilisation et l'échange de matières radioactives sont soumis aux

réglementations en vigueur dans le pays de l'utilisateur. Les règles de base de protection contre les rayonnements ionisants doivent être respectées selon des procédures en vigueur. Ne pas pipeter des solutions radioactives avec la bouche. Eviter le contact direct avec la peau ou les muqueuses de tout produit radioactif en utilisant des blouses et gants de protection. Toute manipulation de matières radioactives se fera dans un local ad hoc éloigné de tout passage. Les produits radioactifs seront stockés dans leur conditionnement d'origine dans un local approprié. Un cahier de réception et de stockage de produits radioactifs sera tenu à jour. Le matériel de laboratoire et la verrerie qui ont été contaminés doivent être éliminés au fur et à mesure afin d'éviter une contamination croisée de plusieurs isotopes. Chaque contamination

ou perte de substance radioactive devra être réglée selon les procédures établies. Toute mise aux déchets de matière radioactive se fera en accord avec les réglementations en vigueur. Ne pas manger, ni boire, ni fumer, ni appliquer des cosmétiques dans les laboratoires où des produits radioactifs sont utilisés. Les réactifs radioactifs ne peuvent être vendus qu'à des personnes habilitées à manipuler des substances radioactives.

Matériel Fourni : Préparation Initiale

Les deux composants du coffret –réactif de liaison B12/Acide folique (DSP1) et la solution NaOH/KCN (NHCN) sont adaptés l'un à l'autre et ne doivent être utilisés que combinés ensembles à partir d'un seul lot de coffret; ils ne sont pas interchangeables avec d'autres lots de ces mêmes réactifs.

Réactif de liaison, phase solide Vitamine B12/Acide folique (DSP1)

120 ml d'une suspension du réactif de liaison fixé sur des particules de cellulose microcristalline, avec conservateur. Stable à +2/+8°C pendant 30 jours après ouverture. Couleur: orange.

KDSP1, KVSP1, KFSP1: 1 flacon

KDSP2, KVSP2, KFSP2: 2 flacons

KDSP5, KVSP5, KFSP5: 5 flacons

Ce réactif doit être vigoureusement remis en suspension avant et pendant son utilisation ; un barreau magnétique sera introduit à sa première utilisation, dans le flacon et laissé jusqu'à épuisement du réactif. Ne pas transférer ce réactif de liaison en dehors de son flacon d'origine qui a été traité pour éviter toute adsorption.

Solution NaOH/KCN (NHCN)

15 ml d'une solution contenant de la soude (NaOH) et du cyanure de potassium(KCN), avec conservateur. Stable à +2/+8°C pendant 30 jours après ouverture. Eviter une exposition prolongée avec l'air ambiant (refermer immédiatement après usage) amenant une fixation du CO₂ de l'air avec modification de pH. *Attention : tout contact direct avec cette solution doit être évité.*

KDSP1, KVSP1, KFSP1: 1 flacon

KDSP2, KVSP2, KFSP2: 1 flacon

KDSP5, KVSP5, KFSP5: 2 flacons

Attention : corrosif et cyanure

Traceur double marquage (DSP2) (seulement dans les coffrets Dualcount).

110 ml du traceur prêt à l'emploi. Acide folique marquée à l'iode 125, Vitamine B12 marquée au Cobalt 57. Stable à +2/+8°C pendant 30 jours après ouverture, ou jusqu'à la date d'expiration notée sur le flacon. *NB:* Le traceur double marquage contient les deux isotopes tandis que les traceurs des coffrets Vitamine B12 et Acide Folique ne contiennent qu'un isotope.

KDSP1: 1 flacon

KDSP2: 2 flacons

KDSP5: 5 flacons

⁵⁷Co Vitamine B12 (VSP2)

Seulement dans les coffrets Vitamine B12.

110 ml du traceur prêt à l'emploi d'Vit. B12 marqué au cobalt 57. Stable à +2/+8°C pendant 30 jours après ouverture, ou jusqu'à la date d'expiration notée sur le flacon.

KVSP1: 1 flacon

KVSP2: 2 flacons

KVSP5: 5 flacons

¹²⁵I Acide folique (FSP2)

Seulement dans les coffrets Acide folique.

110 ml du traceur prêt à l'emploi d'acide folique marqué à l'iode 125, avec conservateur. Stable à +2/+8°C pendant 30 jours après ouverture, ou jusqu'à la date d'expiration notée sur le flacon.

KFSP1: 1 flacon

KFSP2: 2 flacons

KFSP5: 5 flacons

Standards Vitamine B12/Acide Folique (DSP3-9)

7 flacons A à G contenant différentes concentrations de vitamine B12 et acide folique, lyophilisés en matrice protéine. Reconstituer le standard zéro A avec **6,0 ml** d'eau distillée ou désionisée, les autres standards B à G avec **3,0 ml**, chacun. Stable à +2/ +8 °C pendant 30 jours après reconstitution, ou 2 mois (aliquoté) à -20°C. Eviter une exposition à la lumière directe.

KDSP1, KVSP1, KFSP1: 1 jeu
KDSP2, KVSP2, KFSP2: 1 jeu
KDSP5, KVSP5, KFSP5: 2 jeux

Se reporter aux valeurs indiquées sur les flacons pour obtenir les concentrations spécifiques à chaque lot de ces standards. Les standards du coffret Dualcount ne sont pas interchangeables avec les standards contenus dans les coffrets spécifiques Vit.B12/Acide Folique.

Solution de Dithiothreitol (DTT1, 5DTT1)

Solution de dithiothreitol. Stable à +2/+8°C pendant 30 jours après ouverture.

KDSP1, KVSP1, KFSP1: 1 flacon x 6 ml (DTT1)

KDSP2, KVSP2, KFSP2: 2 flacons x 6 ml (DTT1)

KDSP5, KVSP5, KFSP5: 1 flacon x 30 ml (5DTT1)

Contrôle d'anémie (ANC)

Contrôle à matrice protéique, lyophilisé contenant des concentrations de vitamine B12 et acide folique dans le domaine des carences. Reconstituer avec **2,0 ml** d'eau distillée. Stable à +2/ +8 °C pendant 7 jours après reconstitution, ou 2 mois (aliquoté) à -20 °C. Eviter une exposition à la lumière directe.

KDSP1, KVSP1, KFSP1: 1 flacon

KDSP2, KVSP2, KFSP2: 1 flacon

KDSP5, KVSP5, KFSP5: 1 flacon

Matériel requis mais non fourni

Un compteur gamma: doit être capable de discriminer correctement les canaux ¹²⁵I et ⁵⁷Co avec une faible interférence lors de la mesure des deux isotopes simultanée (dualcount). Un instrument à simple canal réglé pour ⁵⁷Co ou ¹²⁵I, est suffisant pour l'analyse séparée des deux paramètres.

Une Centrifugeuse: Capable d'au moins 2 000xg. Une centrifugeuse à grande vitesse et réfrigérée est conseillée mais non obligatoire. Des résultats acceptables sont aussi obtenus avec des centrifugeuses de paillasse à des vitesses inférieures, sous condition d'allonger le temps de centrifugation .

Un agitateur de type Vortex : l'agitateur doit être capable de créer un tourbillon dans les tubes à essai après l'addition du liant. Les agitations sur portoirs ont été

considérées comme insuffisantes et non adaptées.

Eau distillée: à utiliser pour l'étape 8, pour les tubes liaison non spécifique (LNS).

Des récipients plastique avec couvercle, pour la préparation de la solution active.

Tubes 12x75 mm: Tubes secs en polypropylène– à utiliser pour les tubes LNS, disponibles chez DPC (il est possible d'utiliser des tubes de verre ou polystyrène

Pipettes volumétriques: 6 ml et 3 ml. Pour la reconstitution des standards.

Eau distillée ou désionisée: pour la reconstitution des standards.

Contrôles: en plus du contrôle anémie fourni avec le coffret, un contrôle immunodosage, à base de sérum humain, à trois niveaux de concentration, contenant de la vitamine B12 et acide folique (parmi plus de 25 constituants dosables), est disponible chez DPC (Référence catalogue : CON6).

Micropipette 200 µl : Pour l'addition d'échantillons. Des pipettes à pointe jetable avec tampon d'air entre l'échantillon et la pipette sont recommandées, des pipettes à déplacement positif sont à éviter pour des risques de contamination.

Micropipette ou multipette 50 µl: pour l'addition du réactif NaOH/KCN. Un distributeur répétitif convient pour cette addition de réactif.

Micropipette ou multipette 1 000 µl: Pour l'ajout de la solution active et du liant Vit. B12/Folates, un distributeur répétitif est recommandé.

Bain-marie : pouvant maintenir une température d'incubation de 37 °C. Ni étuve, ni bloc chauffant ne sont adaptés à cet usage.

Un agitateur magnétique et un barreau aimanté pour mettre en suspension le réactif de liaison phase solide.

Un portoir de décantation – disponible chez DPC

Papier graphe Logit-log – disponibles chez DPC (Référence catalogue : ZP797)

Solution d'Acide Ascorbique: seulement pour la détermination de l'acide folique dans le sang total et érythrocytes. Une solution à 1% doit être préparée extemporanément. Protéger les cristaux d'acide ascorbique de l'humidité. L'ascorbate de sodium ne peut pas remplacer l'acide ascorbique dans cet usage.

Du papier d'aluminium (ou autre) pour protéger les hémolysats de la lumière.

Traitement des échantillons

Pour le dosage d'acide folique, le patient doit être à jeun.⁴⁰

Type d'échantillon: Pour les dosages de la vitamine B12 et de l'acide folique, on peut utiliser soit du sérum, soit du plasma (héparine ou EDTA). Il n'y a pas d'interférence cliniquement significative des anti coagulants testés.

Pour le dosage de l'acide folique dans les globules rouges et le sang total, le prélèvement doit être fait sur héparine ou EDTA. Déterminer l'hématocrite du patient afin de calculer les concentrations pour sang total (exprimés en ng/ml de globules rouges compactés). Il est nécessaire également de connaître les résultats du dosage de l'acide folique dans le sérum. Se conformer aux consignes de sécurité concernant la manipulation des échantillons sanguins.

Des tubes pour prélèvements sanguins provenant de fabricants différents peuvent donner des résultats différents, selon les matériaux et additifs utilisés, y compris gels ou barrières physiques, activateurs de la coagulation et/ou anticoagulants. Le coffret Solid Phase No Boil Dualcount n'a pas été testé sur tous les types de tubes possibles. Veuillez consulter le chapitre intitulé Autres Types d'Échantillons pour plus de renseignements sur les tubes qui ont été évalués.

Volume nécessaire : 200 µl de sérum, plasma ou hémolysat.

Conservation et stabilité:

Sérum ou plasma hépariné: le mode de conservation est important pour la fiabilité des résultats d'acide folique ; Si l'échantillon ne peut être dosé sous 8 heures, aliquoter et congeler à -20°C, avec une stabilité pour 6 à 8 semaines.³⁸

Décongeler une seule fois, à température ambiante, éviter une exposition à la lumière directe.

Médicaments Anti-Folate : Comme il est indiqué dans le paragraphe "spécificité", la bêta lactoglobuline, utilisée comme ligand de l'acide folique dans la trousse double marquage, présente dans une certaine mesure des réactions croisées avec le méthotrexate (MTX), médicament "anti-folate", utilisé dans la chimiothérapie du cancer. Etant donné que des perfusions à haute dose de méthotrexate peuvent conduire à des concentrations sanguines de 45 000 ng/ml et jusqu'à 2 000 ng/ml après 48 heures, le dosage ne doit pas être effectué chez des patients sous méthotrexate. De plus, les résultats obtenus chez des patients qui ont subi une thérapie au méthotrexate ou à tout autre médicament ayant une structure comparable doivent être interprétés avec prudence.

Hémolyse : Des résultats faussement élevés peuvent être trouvés pour l'acide folique en fonction du degré d'hémolyse de l'échantillon, car cette vitamine se trouve dans les érythrocytes à des concentrations beaucoup plus élevées que dans le plasma. Par contre, les résultats obtenus pour la vitamine B12, avec la technique phase solide sans ébullition, ne sont pas influencés par l'hémolyse.

Lipémie : Il est recommandé de clarifier les échantillons hyperlipémiques par ultracentrifugation.

Echantillons sériques de concentrations élevées : Ces échantillons doivent être dilués dans le standard zéro avant le dosage. Des concentrations en vitamine B12 exceptionnellement élevées (de l'ordre de 20 000 pg/ml) peuvent se rencontrer chez quelques patients atteints de leucémies myéloïdes chroniques.^{5,35} La contamination par seulement un microlitre d'un tel échantillon pouvant causer une fausse augmentation de 100pg/ml dans le prochain tube, des précautions doivent être prises, en faisant le dosage en double, en changeant les pointes entre deux échantillons et en évitant l'usage de pipette à déplacement positif.

Préparation des hémolysats : n'est requise que pour la détermination de

l'acide folique dans le sang total. Lyser les cellules dans du sang total hépariné ou EDTA fraîchement prélevé en préparant une dilution au 1/21 de l'échantillon (totalement en suspension) dans une solution d'acide ascorbique à 1% fraîchement préparée ; par exemple, mélanger **100 µl** d'échantillon avec **2,0 ml** de cette solution et vortexer ensuite. Il est important d'utiliser de l'acide ascorbique, plutôt que de l'ascorbate de sodium, et de préparer la solution à 1 % pour la journée.³³

L'hémolysat peut être dosé immédiatement ; aucune incubation n'est requise. S'il n'est pas dosé immédiatement, l'hémolysat peut être conservé à température ambiante (+15–28°C) dans le noir jusqu'à 90 minutes. L'hémolysat peut être conservé à +2–8°C pendant 3 heures ou congelé à –20°C pendant 2 semaines.^{40,41} Protéger de la lumière. Noter que la procédure de radioimmunodosage n'apportera pas de résultats cohérents pour la vitamine B12 dans les globules rouges ou le sang total puisque la vitamine B12 est détruite par l'acide ascorbique.

Protocole de dosage

Tous les composants doivent être à température ambiante avant leur utilisation (15–28°C).

- 1 Etiqueter 18 tubes en duplicate: T (activité totale), LNS (liaison non spécifique), A (Liaison Maximale B0) et de B à G. Etiqueter les tubes supplémentaires, également en duplicate, pour les échantillons de patients et les contrôles.

Vitamine B12

Standard	Env. pg/ml	Env. pmol/l
A	0	0
B	50	37
C	100	74
D	300	221
E	600	443
F	1 200	885
G	2 400	1 771

Acide Folique

Standard	Env. ng/ml	Env. nmol/l
A	0	0
B	0,5	1,1
C	1	2,3
D	3	6,8
E	6	13,6
F	12	27,2
G	24	54,5

- 2 Pipeter **200 µl** du standard A dans les tubes LNS et A (B0) et de chaque standard B à G, et **200 µl** des sérums de contrôle et échantillons de patients, (sérum, plasma, hémolysat) dans les tubes respectifs préparés. **Pipeter directement au fond du tube.**

Les échantillons de patients suspectés de contenir des concentrations supérieures au standard le plus élevé doivent être dilués avec le standard zéro avant le dosage.

- 3 **Préparation de la solution active :** Préparer cette solution dans les 30 minutes avant son utilisation et en quantités nécessaires selon le nombre de tubes à doser. Consulter le tableau ci-dessous pour les volumes en ml, prévoir 10% en excès. Multiplier avec un léger surnombre de tubes par rapport au nombre de tubes réel de la série. (Les réactifs sont fournis en excès d'environ 10%.)

Millilitres par tube	
Dithiothreitol	0,05
Traceur	1,0

- 4 Ajouter **1 000 µl** de la solution active, fraîchement préparée à tous les tubes. Agiter au vortex.

Une multipipette est recommandée pour cette étape, et pour l'étape 8. Les tubes T peuvent être mis de côté jusqu'au comptage (étape 12); ils n'ont pas d'autre traitement.

- 5 Incuber **30 minutes** à température ambiante (15–28°C).

Ce temps d'incubation peut être prolongé jusqu'à 45 minutes.

- 6 Ajouter **50 µl** de solution NaOH/KCN à tous les tubes. Homogénéiser au Vortex.

Manipuler ce réactif avec précaution. Une multipipette est recommandée pour cette étape. Tous les tubes doivent être bleus.

- 7 Incuber 30 minutes à 37°C.

Cette incubation peut être prolongée au maximum à 45 minutes à 37°C. (Au-delà, on peut s'attendre à des résultats diminués en vitamine B12.)

- 8 Ajouter **1 000 µl** du réactif de liaison à tous les tubes sauf les tubes LNS (remplacer pour les tubes LNS par **1 000 µl** d'eau distillée). **Agiter vigoureusement au Vortex.**

Les tubes doivent être passés *individuellement* au vortex avec formation de tourbillon, les multivortex se sont révélés inadaptés pour cette étape.

Le réactif de liaison doit bien être maintenu en suspension pendant sa distribution par le barreau aimanté. Tous les tubes doivent être de couleur pourpre (sauf les tubes T et LNS). Un volume légèrement supérieur au volume nécessaire peut être transféré dans un récipient en verre (pas de plastique) avec le barreau aimanté, mais le reste de réactif doit être conservé dans son flacon d'origine.

- 9 Incuber **60 minutes** à température ambiante (15–28°C).

- 10 Centrifuger **au moins 15 minutes** à 2000xg ou plus.

Des accélérations supérieures sont possibles, mais avec le risque de bris des tubes de verre ou polystyrène. Pour les centrifugeuses de paillasse, allonger le temps de centrifugation.

- 11 Décanter tous les surnageants en même temps avec un portoir de decantation et conserver les culots pour le comptage.

Éliminer toute trace d'humidité pour améliorer la précision du dosage. À l'aide d'un portoir de decantation, décanter ou aspirer le contenu de tous les tubes (excepté les tubes T) et

laisser les tubes retournés pendant 5 minutes. Puis appliquer les légèrement sur du papier absorbant afin d'éliminer les gouttelettes résiduelles.

- 12 Compter le précipité **1 minute** sur un compteur gamma permettant la mesure de l'iode 125 et cobalt 57.

Noter que le précipité correspond à la fraction liée (pas la libre).

Calcul et Contrôle de Qualité

Echantillons sériques: Afin d'obtenir des résultats en concentrations de vitamine B12 et acide folique à partir d'une représentation logit-log de la courbe de calibration, calculer pour chaque doublet de tubes les coups corrigés:

CPM corrigés = (Moyenne cpm) moins (Moyenne cpm LNS)

Puis déterminer pour chaque doublet la capacité de liaison en pourcentage de liaison maximale (B0), corrigée des cpm dus au LNS des tubes A tubes considérés à 100%:

% liaison = (cpm corrigés / cpm corrigés LM) × 100

Les échantillons dans la gamme de calibration donnent des résultats pratiquement identiques quand la capacité de liaison est calculée directement à partir de la moyenne des CPM. : sans correction de LNS.

En utilisant un papier logit-log, on porte en ordonnée les pourcentages de liaison en fonction des concentrations des calibrateurs qui ne sont pas à zéro, en abscisse. On trace une ligne droite passant approximativement par ces points. Les concentrations des échantillons inconnus sont déterminées par interpolation sur la courbe standard.

Il est bon de vérifier les doublets et de construire une représentation graphique de la courbe de calibration (même si celle-ci est faite par ordinateur) avec les différentes valeurs de façon à visualiser le meilleur tracé et c'est une façon de détecter les points déviants. Se reporter à Davis SE et al. Radioimmunoassay data processing with a small programmable calculator. J Immunoassay 1980;1:15-25; and Dudley RA, et al. Guidelines for

immunoassay data reduction. Clin Chem 1985;31:1264-71.

Hémolysats : Calculer d'abord le résultat R d'acide folique en ng/ml d'hémolysat en utilisant la courbe standard d'acide folique. Multiplier ensuite par le facteur de dilution 21, afin d'obtenir la concentration en acide folique dans le sang total (ng/ml). Pour déterminer la concentration approximative dans les globules rouges (ng/ml), multiplier la concentration d'acide folique dans le sang total par le facteur : 100 / H, (H = Hématocrite en pourcentage).

Acide folique dans les globules rouges $\approx$
 $21R \times (100 / H)$

La valeur sérique d'acide folique - S peut être soustraite de la concentration en acide folique du sang total. L'équation exacte devient :

Acide folique dans les globules rouges =
 $(21R - [S \times ((100 - H) / 100)]) \times (100 / H)$

La valeur entre parenthèses ($S \times 100 - H$) / 100 peut être négligée par rapport au terme 21 R, dans la plupart des cas.

Contrôles: Utiliser le contrôle fourni avec le coffret. Nous recommandons également de noter jour après jour les résultats des contrôles – comme décrit par exemple dans Westgard JO, et al. A multi-rule chart for quality control. Clin Chem 1981;27:493-501. Noter qu'un redosage d'échantillon peut être précieux pour suivre la précision inter essai, et que les doublets de tubes contrôle peuvent être espacés de façon à vérifier l'absence de dérive significative.

Contrôle qualité : Nous recommandons aussi de suivre les paramètres suivants :

T = Activité totale (cpm)

%LNS = $100 \times$ (Moyenne des cpm du LNS / cpm Totaux)

%LM = $100 \times$ (cpm corrigés / cpm totaux)

Et les intercepts à 20, 50 et 80 % avec

20% = Concentration à 20% de liaison, etc.

Centrifugation: Utiliser la formule suivante pour calculer l'accélération de votre centrifugeuse à une vitesse donnée ou la vitesse (en nombre de tours par minute = tpm) requise pour obtenir la force de gravité g désirée :

$\text{force g} = 28,38 \times (\text{tpm} / 1\,000)^2 \times \text{rayon [pouces]}$

$\text{tpm} = 187,7 \times \sqrt{(\text{force g} / \text{rayon [pouces]})}$

ou

$\text{force g} = 11,18 \times (\text{tpm} / 1\,000)^2 \times \text{rayon [cm]}$

$\text{tpm} = 299,07 \times \sqrt{(\text{force g} / \text{rayon [cm]})}$

Exemple de calculs – Vitamine B12 /

Acide Folique : A titre d'exemple uniquement, et non pour calculer des résultats provenant d'une autre série. Comme les valeurs des calibrateurs sont *lot-dépendantes*, les concentrations indiquées peuvent être différentes de celles de vos livraisons. (Se reporter aux tableaux "Example Run, Vitamin B12" and "Example Run, Folic Acid".)

Valeurs de référence

Des échantillons sériques frais provenant d'un total d'une centaine d'individus normaux ont été dosés en vitamine B12 et en acide folique par la technique double marquage. DPC Solid Phase No Boil Dualcount. La trousse a été également utilisée pour le dosage de l'acide folique sur des échantillons de sang total provenant de 88 hommes et femmes en bonne santé (le groupe de référence comportait essentiellement du personnel de laboratoire en apparence bonne santé – hommes et femmes). Les valeurs de référence ont été déterminées de façon non paramétrique (englobant 95 % des observations). Les valeurs de référence trouvées pour la technique double marquage figurent ci-dessous.

Sérum Vitamine B12:	200 – 950 pg/ml	150 – 700 pmol/l
Sérum Acide Folique:	3.0 – 17 ng/ml	7 – 39 nmol/l
Sang total Acide folique:	80 – 320 ng/ml	180 – 725 nmol/l
Acide Folique érythrocytaire	175 – 700 ng/ml	395 – 1 585 nmol/l

Les valeurs de référence d'acide folique ont été confirmées par deux autres études sur un total de 162 individus. Il faut remarquer que les résultats proches de la limite inférieure du domaine de référence (résultats en acide folique obtenus pour le globule rouge, entre 100 et 200 ng/ml) doivent être interprétés avec prudence, en tenant compte d'autres données cliniques et analytiques. De même, les résultats obtenus pour l'acide folique dans le sérum

doivent être interprétés en tenant compte des dosages effectués sur le globule rouge.

Les valeurs de référence présentées ci-dessus ont été obtenues aux USA. Elles sont données à titre indicatif. Il est important pour chaque laboratoire d'établir ses propres valeurs normales. Celles-ci pouvant varier d'un pays à l'autre. Pour l'acide folique dans le globule rouge, les valeurs trouvées en Suède et en Norvège sont respectivement de 100 – 350 ng/ml et 130 – 350 ng/ml. Utiliser ces valeurs à *titre indicatif uniquement*. Chaque laboratoire devra établir ses propres valeurs de référence.

Vitamine B12: Il n'y a pas de chevauchement entre le domaine des valeurs de référence (200 à 950 pg/ml) et le domaine des carences en vitamine B12 établi à partir des résultats de la totalité des 115 cas étudiés (cf. graphique "Expected Values: Comparative Discrimination Plot" in Tables and Graphs). La valeur 200 pg/ml peut être prise comme limite inférieure de normalité. Les valeurs inférieures à 200 pg/ml et supérieures à 124 pg/ml (valeur la plus élevée observée pour les sérums carencés en vitamine B12), doivent être considérées comme statistiquement subnormales. Il est justifié de procéder à d'autres investigations dans ce dernier cas.

Les causes fréquentes d'élévation de la concentration en vitamine B12 sont les affections hépatiques, une pathologie myéloproliférative (particulièrement dans le cas de leucémie myélogène chronique) et une consommation excessive de compléments vitaminés.

Echantillons carencés en Vitamine B12-

DPC a étudié plus d'une centaine d'échantillons déficitants en vitamine B12. Deux méthodes de référence ont été utilisées : une méthode microbiologique "lactobacillus leichmannii" et la trousse double marquage avec dénaturation à la chaleur, séparation sur charbon et utilisation du facteur intrinsèque purifié. Le radiodosage "charbon ébullition" a été comparé avec la technique microbiologique. Les valeurs de vitamine B12 obtenues selon les trois méthodes

sont présentées dans la paragraphe "Expected Values: Comparative Discrimination Plot": zones de déficience en vitamine B12 pour les trois méthodes et étendue du chevauchement entre les normaux et les déficitants en vitamine B12.

Performances du test

Consulter les tableaux et graphiques pour obtenir les données représentatives des performances de ce test. Les résultats sont donnés en pg/ml pour la Vitamine B12, pour l'Acide Folique, les résultats sont donnés en ng/ml. Sauf contre-indication, tous les résultats proviennent de sérums et sang totaux héparinés.

Vitamine B12 Facteur de conversion :
 $\text{pg/ml} \times 0,7378 \rightarrow \text{pmol/l}$

Acide Folique Facteur de conversion :
 $\text{ng/ml} \times 2,266 \rightarrow \text{nmol/l}$

Intervalle de linéarité :

Vitamine B12:
approx. 50 – 2 400 pg/ml
Les valeurs des standards sont spécifiques du lot de réactifs.

Acide Folique:
approx. 0,5 – 24 ng/ml.
Les valeurs des standards sont spécifiques du lot de réactifs

Sensibilité analytique :

Vitamine B12: 34 pg/ml.

Acide Folique: 0,3 ng/ml.

Précision intra-dosage (au sein d'une même série) : Les résultats ont été calculés pour chacun des 6 échantillons à partir des résultats de 20 tubes en une même série. (Voir le tableau « Intraassay Precision ».)

Précision inter-dosage (entre plusieurs séries) : Les résultats ont été calculés pour chacun de 14 échantillons à partir des résultats de 18 séries en duplicate. (Voir le tableau « Interassay Precision ».)

Précision inter-dosage cumulée:
Résultats générés à partir de 9 contrôles suivis 4 mois, pour chaque contrôle, un doublet sur environ 100 dosages avec des lots différents de réactifs et des techniciens. (Voir les tableaux "Cumulative Interassay Precision".)

Effet de la position des tubes : Des tubes en double ont été répartis à

différents endroits dans une série de dosages allant jusqu'à 350 tubes. En utilisant une multipette (type Eppendorf) l'addition du réactif de liaison phase solide est effectuée en 8 minutes. Les résultats montrent qu'il n'y a aucune dérive des résultats, même pour une grande série de dosages.

Spécificité

Pureté du réactif de liaison: Deux essais sont effectués afin de démontrer la "pureté" du facteur intrinsèque utilisé comme réactif de liaison dans le radiodosage Solid Phase No Boil Dualcount

- Une incubation d'une nuit du réactif de liaison en phase solide avec du sérum contenant des anticorps spécifiques du facteur intrinsèque entraîne la perte totale de sa capacité de liaison avec la vitamine B12. La présence de la protéine R lui aurait permis de conserver une certaine capacité de liaison avec la vitamine B12.
- Une substitution de la phase solide avec un radiodosage associant la dénaturation à la chaleur et un charbon coaté à un pH 2 entraîne une inactivation complète du réactif de liaison. La présence de la protéine R aurait préservé une partie de la capacité de liaison en milieu acide.

Réactions croisées: La spécificité du réactif de liaison (facteur intrinsèque) a été vérifiée par le dosage de la vitamine B12 en présence de cobinamide. Les résultats montrent que des concentrations élevées (de l'ordre de 50 000 000 pg/ml) n'entraînent aucune diminution de liaison du réactif avec la vitamine B12 marquée. Le pourcentage de réaction croisée avec le cobinamide est < 0,0001%. (Voir la section "Specificity 1".)

La réaction croisée entre le méthotrèxate (MTX, un médicament anti-folate) et la bêta lactoglobuline utilisée dans la phase solide, a également été étudiée. Le pourcentage de réactivité croisée, bien que quantitativement faible, est cliniquement significatif, car le méthotrèxate (MTX) est souvent administré à des doses extrêmement élevées. En conséquence, les dosages d'acide folique sont contre-indiqués chez des patients dont le traitement comporte

un médicament anti-folate ou ayant une structure comparable. (Voir le tableau "Specificity 2".)

Test de dilution : Des échantillons ont été dosés à différentes concentrations. (Se reporter aux tableaux "Linearity" pour des données représentatives.)

Test de récupération : 6 solutions ont été préparées à partir du standard zéro utilisé comme diluant. 3 solutions A, B et C ont été préparées à des concentrations respectives de 10 000, 20 000 et 30 000 pg/ml en vitamine B12. Les 3 autres solutions D, E et F ont des concentrations respectives de 60, 120 et 180 ng/ml en acide folique. 50 µl de chaque solution sont ajoutés à 950 µl d'échantillons de patient, soit un rapport de surcharge de 1 pour 20, qui ne modifie pas la matrice sérique. Les valeurs tabulées représentent seulement le taux de récupération de la solution de surcharge, la contribution de l'échantillon sérique a déjà été soustraite. Les chiffres entre parenthèses, indiquent la concentration originales de ces sérums. (Voir le tableau "Recovery".)

Influence du taux de protéines:

différentes protéines, sérum albumine humaine, SAH et IgG humaines normales, sont ajoutées à plusieurs concentrations dans deux sérums de patients. Les échantillons avec ou sans ajout d'albumine, de globuline et de protéines totales, sont dosés dans une même série. Les résultats montrent que même de grandes variations en protéines n'entraînent que de faibles variations dans les résultats. On peut conclure qu'il n'y a pas d'effet significatif des protéines dans la technique Solid Phase No Boil double marquage.

Autres types d'échantillons: Afin de déterminer le rôle éventuel des anticoagulants sur la technique, le sang de volontaires a été recueilli sur tubes vacutainers secs, héparinés et avec EDTA. Tous les échantillons ont été dosés avec la technique Solid Phase No Boil Dualcount, les résultats indiquent l'absence d'interférences significatives des anticoagulants testés. (Voir le tableau "Alternate Sample Type".)

LNS : Liaison non spécifique: Afin de vérifier l'absence d'effet de LNS sur la technique Solid Phase No Boil Dualcount,

un dosage a été effectué comprenant une courbe standard, des blancs de standards (sans réactif de liaison) et deux séries de tubes de blancs de patients. Dans une série de LNS- patients, le réactif de liaison n'a pas été ajouté ; dans l'autre série, il a été remplacé par un réactif "blanc cellulose" suspension de particules de cellulose identique au réactif de liaison phase solide, mais sans facteur intrinsèque et bêta lactoglobuline. NB : Le réactif "blanc cellulose" peut être obtenu sur demande.

Les résultats montrent que : a) Le tube LNS sans addition du réactif liant, donne un comptage équivalent à un "vrai" LNS effectué avec un "blanc cellulose". b) Le LNS est uniformément bas aussi bien pour les échantillons de patients que pour les standards. Par conséquent, un blanc individuel de patient n'est pas nécessaire. (Se reporter au tableau "Patient Blanks".)

Etape de dénaturation : Afin de déterminer l'efficacité de la dénaturation alcaline à 37 °C de la méthode, des dosages ont été effectués sur des patients atteints de leucémies myéloïdes chroniques (LMC) et autres troubles myéloprolifératifs et des échantillons de patients souffrant d'anémie pernicieuse (AP), dont la présence d'anticorps inhibiteurs anti-facteur intrinsèque a été décelée.

Echantillons de LMC: Dans un essai utilisant la trousse phase solide sans ébullition, une précipitation avec le charbon a été effectuée à la fin de la seconde incubation afin d'évaluer la liaison non spécifique dans les tubes LNS. La LNS des échantillons normaux est comparable à celle des échantillons LMC. Les deux séries d'échantillons LMC ont des concentrations en vitamine B12 de l'ordre de 3 000 à 5 000 pg/ml. Ceci montre que l'étape de dénaturation alcaline à 37 °C utilisée dans la méthode phase solide sans ébullition est efficace pour inactiver les protéines de liaison dont le taux est élevé dans les échantillons LMC. Dans le cas où la protéine de liaison n'est pas dénaturée, celle-ci se lie au traceur, une quantité de radioactivité non négligeable reste alors dans le surnageant après précipitation par le charbon.

Echantillons AP: Les anticorps, anti-facteur intrinsèque, sont présents chez

plus de la moitié des patients souffrant d'anémie pernicieuse. 14 échantillons plasmatiques (AP) sont dosés par la méthode double marquage (charbon + ébullition). Chez 7 d'entre eux, la présence d'anticorps est détectée. Les résultats montrent qu'une étape de dénaturation alcaline à 37 °C pour la trousse Solid Phase No Boil Dualcount est aussi efficace qu'une étape d'ébullition, pour dénaturer les anticorps anti-facteur intrinsèque. Dans le cas contraire, les résultats seraient faussement élevés (faux positifs) dans de nombreux cas d'anémie pernicieuse.

Pour confirmation de ces résultats, 4 échantillons sériques AP (anticorps positifs) et 4 échantillons AP (anticorps négatifs) ont été soumis à la dénaturation alcaline à 37 °C de la trousse Solid Phase No Boil Dualcount et à un protocole de contrôle impliquant une substitution de l'eau par la soude. Les échantillons anticorps positifs perdent leur capacité d'inhiber l'activité du facteur intrinsèque après l'étape de dénaturation. Cependant, pour un échantillon ayant un titre en anticorps très élevé, on ne peut pas exclure le cas où la dénaturation ne serait pas totale. Si un tel doute existe pour un patient, l'échantillon peut être dosé avec l'alternative comportant une mise à ébullition.

Effet du temps d'incubation sur les hémolysats: Les échantillons de 4 individus sont recueillis sur des tubes héparinés et sur EDTA. Des hémolysats sont préparés en incubant l'aliquote dans une solution d'acide ascorbique à 1%, à l'obscurité et température ambiante, le temps d'incubation varie de 0 à 90 minutes. Les résultats ne sont pas influencés par des temps de lyse variant de 0 à 90 minutes., aussi les hémolysats seront dosés immédiatement après dilution avec la solution d'acide ascorbique. Le tableau montre aussi l'absence d'influence de l'anticoagulant, héparine ou EDTA pour les sangs totaux. (Se reporter au tableau "Effect of Incubation Time on Hemolysates".)

Comparaison de méthodes: La technique Solid Phase No Boil Dualcount Vitamine B12 a été comparée sur 98 échantillons sériques avec le dosage DPC IMMULITE Vitamine B12 pour des

concentrations allant de 127 à 1 037 pg/ml. Par régression linéaire :

(SPNB) = 0,98 (IML) – 5,3 pg/ml
r = 0,982

Moyennes :
371 pg/ml (Solid Phase No Boil)
385 pg/ml (IMMULITE – LKVB)

La technique Solid Phase No Boil Dualcount Acide Folique a été comparée sur 71 échantillons sériques avec le dosage DPC IMMULITE Acide Folique pour des concentrations allant de 1,4 à 20 ng/ml. Par régression linéaire :

(SPNB) = 0,92 (IML) + 0,71 ng/ml
r = 0,985

Moyennes :
6,2 ng/ml (Solid Phase No Boil)
5,9 ng/ml (IMMULITE – LKFO)

Assistance technique

Contactez votre distributeur national. En France distribué par DPC France 90 bd National 92257 La Garenne-Colombes.

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

Italiano

Dualcount Fase Solida Senza Bollitura

Uso: Dualcount Fase Solida Senza Bollitura è un radioimmunosaggio per la determinazione simultanea della vitamina B12 nel siero e nel plasma, e dell'acido folico nel siero, plasma o sangue intero. I kit Vitamina B12 in Fase Solida Senza Bollitura e il kit Acido Folico in Fase Solida Senza Bollitura servono alla determinazione rispettivamente della Vitamina B12 e dell'Acido Folico. Tutti e tre i kit sono a solo uso diagnostico *in vitro* quale ausilio nella diagnosi clinica.



	µCi / kBq		
	Dualcount kit	Kit Vitamina B12	Kit Acido Folico
100 Provette	KDSP1	KVSP1	KFSP1
⁵⁷ Co Vitamina B12	2/74	2/74	—
¹²⁵ I Acido Folico	6/222	—	6/222
200 Provette	KDSP2	KVSP2	KFSP2
⁵⁷ Co Vitamina B12	4/148	4/148	—
¹²⁵ I Acido Folico	12/444	—	12/444
500 Provette	KDSP5	KVSP5	KFSP5
⁵⁷ Co Vitamina B12	10/370	10/370	—
¹²⁵ I Acido Folico	30/1110	—	30/1110

Principio del Dosaggio

1. Denaturazione Alcalina delle Proteine Endogene

2. Competizione per il Legante Purificato a pH 9,3: Gli analoghi della B12 non interferiscono, poiché il fattore intrinseco di suino è privo di proteina R. Il legante l'acido folico ha un'eguale affinità per l'MTHF e per il PGA.

3. Separazione della Fase Solida

Tempo Totale di Incubazione: 2 ore.

Conte Totali:

Acido Folico marcato con I¹²⁵: circa 80 000 cpm a iodinazione.

Vitamina B12 marcata con Co⁵⁷: circa 25 000 cpm.

Avvertenze e Precauzioni

Ad uso diagnostico *in vitro*.

Reagenti: Conservare a 2–8°C in un frigorifero appositamente destinato al materiale radioattivo. Eliminare secondo le normative di legge vigenti.

Non utilizzare reagenti oltre la data di scadenza.

Alcuni componenti forniti in questo kit possono contenere materiale di origine umana e/o altri ingredienti potenzialmente pericolosi che necessitano di precauzioni di utilizzo.

Seguire le precauzioni universali, e manipolare tutti i componenti come se potessero trasmettere agenti infettivi. Sono stati dosati i materiali di origine umana e sono stati trovati non reattivi per la Sifilide; per gli Anticorpi anti-HIV 1 e 2;

per l'Antigene di Superficie dell'Epatite B; e per gli Anticorpi Anti-Epatite C.

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

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

Una soluzione contenente idrossido di sodio (NaOH) e cianuro di potassio (KCN) fornita nel kit. Occorre fare estrema attenzione ad evitare il contatto con questo reagente, poiché contiene cianuro e forti alcali.

Acqua: Utilizzare solo acqua distillata o deionizzata.

Radioattività

Una copia di tutti i certificati di Autorizzazione per radioisotopi (Specifico o Generico) rilasciata ad un cliente americano deve essere conservata in file presso la Diagnostic Products Corporation prima che i kit o i componenti contenenti materiale radioattivo possano essere spediti. Questi materiali radioattivi possono essere acquisiti da qualsivoglia cliente in possesso dell'Autorizzazione Specifica. Con l'Autorizzazione Generica questi materiali radioattivi possono essere acquistati solo da medici, veterinari che esercitano la professione, laboratori clinici ed ospedalieri – e solo per l'esecuzione di test clinici o di laboratorio in vitro che non implicano somministrazione interna o esterna del materiale radioattivo o delle sue radiazioni alle persone o animali. La sua acquisizione, ricevimento, conservazione, utilizzo, trasferimento ed eliminazione sono soggette a regolamentazioni e ad Autorizzazione (Generica o Specifica) della Commissione Statunitense per il Nucleare o dello Stato con il quale l'NRC abbia stipulato un accordo per l'esercizio del controllo regolatorio.

Manipolare i materiali radioattivi secondo quanto previsto dall'Autorizzazione Generica o Specifica. Per minimizzare l'esposizione alle radiazioni, l'utilizzatore

deve attenersi alle linee guida stabilite dal National Bureau of Standards publication su *"Safe Handling of Radioactive Materials"* "Norme per una corretta manipolazione dei Materiali Radioattivi". (Guida N° 92, pubblicata il 9 Marzo 1964) e successive edizioni pubblicate dallo Stato e dalle Autorità Federali.

Assorbire immediatamente le fuoriuscite e decontaminare le superfici contaminate. Evitare la formazione di aerosol. Eliminare i rifiuti solidi radioattivi secondo quanto previsto dall'Autorizzazione. Le licenze generiche (possessori di NRC Form 483) possono eliminare i rifiuti radioattivi solidi come non radioattivi, dopo aver rimosso l'etichetta. I detentori di autorizzazioni specifiche (NRC Form 313) devono fare riferimento al Titolo 10, Codice delle Regolamentazioni Federali Parte 20. I detentori di Autorizzazioni negli Stati che hanno stipulato un accordo con l'NRC dovrebbero far riferimento alle regolamentazioni idonee dei loro stati. I detentori di Autorizzazioni Generali possono eliminare i rifiuti radioattivi liquidi del tipo contenuto in questo prodotto attraverso il lavello del laboratorio. I detentori di autorizzazione devono eliminare o rendere illeggibili le etichette dei contenitori vuoti di materiali radioattivi prima di eliminare i rifiuti solidi. I detentori di autorizzazioni specifiche possono eliminare piccoli quantitativi di rifiuti radioattivi liquidi del tipo utilizzato in questo prodotto attraverso il lavello del laboratorio. Fare riferimento alle regolamentazioni appropriate applicabili al Vostro laboratorio.

Materiali Forniti:

Preparazione Iniziale

I due componenti – Vitamina B12/Legante l'Acido Folico (DSP1) ed il reagente NaOH/KCN (NHCN) – rappresentano un set misto e devono essere utilizzati esclusivamente in combinazione.

La Vitamina B12/Legante l'Acido Folico ed il reagente NaOH/KCN forniti nel kit non sono interscambiabili con altri lotti degli stessi componenti.

Vitamina B12/Legante l'Acido Folico (DSP1)

120 mL di una sospensione di vitamina B12 purificata e di leganti l'acido folico adesi a particelle di cellulosa microcristalline, con conservanti. Stabili a 2-8°C per 30 giorni dopo l'apertura. Colore: arancio.

KDSP1, KVSP1, KFSP1: 1 flacone
KDSP2, KVSP2, KFSP2: 2 flaconi
KDSP5, KVSP5, KFSP5: 5 flaconi

Questo reagente deve essere completamente sospeso prima e durante l'utilizzo; può essere introdotto nel flacone un agitatore magnetico ed ivi conservato. Il Legante deve essere conservato nel flacone originario che è stato trattato per evitare l'assorbimento.

NaOH/KCN (NHCH)

15 mL di una soluzione contenente idrossido di sodio (NaOH) e cianuro di potassio (KCN), con conservanti. Stabili a 2-8°C per 30 giorni dopo l'apertura. Per evitare un'esposizione non necessaria all'atmosfera, chiudere il flacone immediatamente dopo l'utilizzo; altrimenti l'assorbimento della CO₂ provocherà gradualmente un cambiamento nel pH. *Occorre prestare un'estrema attenzione ad evitare il contatto con questo reagente.*

KDSP1, KVSP1, KFSP1: 1 flacone
KDSP2, KVSP2, KFSP2: 1 flacone
KDSP5, KVSP5, KFSP5: 2 flaconi

Attenzione! Contiene cianuro e forti alcali.

Vitamina B12 marcata con Co⁵⁷ e Tracciante Master dell'Acido Folico marcato con I¹²⁵ (DSP2)

Forniti solo nei kit Dualcount.

110 mL di una soluzione pronta all'uso di Vitamina B12 marcata con Co⁵⁷ e Acido Folico marcato con I¹²⁵. Stabile a 2-8°C per 30 giorni dopo l'apertura, o fino alla data di scadenza indicata sull'etichetta. Attenzione: il Tracciante Master contiene entrambi gli isotopi, mentre i traccianti forniti nei singoli analiti contengono ciascuno solo un isotopo.

KDSP1: 1 flacone
KDSP2: 2 flaconi
KDSP5: 5 flaconi

Vitamina B12 marcata con Co⁵⁷ (VSP2)

Forniti solo nei kit Vitamina B12.

110 mL di una soluzione pronta all'uso di Vitamina B12 marcata con Co⁵⁷. Stabile a 2-8°C per 30 giorni dopo l'apertura o fino alla data di scadenza indicata sull'etichetta.

KVSP1: 1 flacone
KVSP2: 2 flaconi
KVSP5: 5 flaconi

Acid Folico marcato con I¹²⁵ (FSP2)

Fornito solo nei kit Acido Folico.

110 mL di una soluzione pronta all'uso di acido Folico marcato con I¹²⁵, con conservanti. Stabile a 2-8°C per 30 giorni dopo l'apertura o fino alla data di scadenza indicata sull'etichetta.

KFSP1: 1 flacone
KFSP2: 2 flaconi
KFSP5: 5 flaconi

Calibratori Vitamina B12/Acido Folico (DSP3-9)

Sette flaconi, etichettata dalla A alla G, contenenti diversi livelli di vitamina B12 ed Acido Folico liofili in una matrice proteica. Ricostituire il calibratore zero A con **6,0 mL** di acqua distillata o demonizzata, ed i rimanenti calibratori dalla B alla G ciascuno con **3,0 mL** di acqua distillata o demonizzata. Stabile a 2-8°C per 30 giorni dopo la ricostituzione, o per 2 mesi (aliquotato) a -20°C. Evitare un'esposizione eccessiva alla luce diretta.
KDSP1, KVSP1, KFSP1: 1 set
KDSP2, KVSP2, KFSP2: 1 set
KDSP5, KVSP5, KFSP5: 2 set

I valori lotto specifici dei calibratori sono tabulati nella sezione Procedura del Radiodosaggio. Attenzione che i calibratori forniti con il Kit Dualcount Fase Solida Senza Bollitura non sono interscambiabili con quelli di altri kit DPC per la vitamina B12 e l'acido folico. Fare riferimento alle etichette dei flaconi per i valori esatti nelle unità appropriate.

Soluzione di Ditiotreitolo (DTT1, 5DTT1)

Una soluzione di ditiotreitolo. Stabile a 2-8°C per 30 giorni dopo l'apertura.

KDSP1, KVSP1, KFSP1: 1 flacone x 6 mL (DTT1)
KDSP2, KVSP2, KFSP2: 2 flaconi x 6 mL (DTT1)
KDSP5, KVSP5, KFSP5: 1 flacone x 30 mL (5DTT1)

Controllo Anemia (ANC)

Controllo basato su proteine liofile con concentrazioni di Vitamina B12 ed Acido folico *lotto-specifiche* nel range carente. Ricostituire con **2,0 mL** di acqua distillata. Stabile a 2–8°C per 7 giorni dopo la ricostituzione, o per 2 mesi (aliquotato) a –20°C. Evitare un'esposizione eccessiva alla luce diretta.

KDSP1, KVSP1, KFSP1: 1 flacone

KDSP2, KVSP2, KFSP2: 1 flacone

KDSP5, KVSP5, KFSP5: 1 flacone

Materiali Richiesti Ma Non Forniti

Gamma Counter: Deve essere in grado di discriminare lo Iodio¹²⁵ dal Cobalto⁵⁷ con fuoriuscite accettabilmente basse, per determinazioni simultanee. E' accettabile per i kit ad analita singolo uno strumento a canale unico, settato per lo Iodio¹²⁵ o per il Cobalto.⁵⁷

Centrifuga: Capace di almeno 2 000xg. Un modello refrigerato ad elevata velocità è consigliato, ma non essenziale. Si possono ottenere buoni risultati con dispositivi da banco a bassa velocità a patto che il tempo di centrifugazione venga conformemente esteso.

Vortex Mixer: Il mixer deve avere la forza di creare un vortice nelle provette dopo l'aggiunta del legante. I mixer a rack multiplo non devono essere utilizzati.

Acqua Sterile Distillata: Da utilizzarsi nelle provette NSB al punto 8 del Radiodosaggio.

Contenitori di Plastica, con coperchi: Per la preparazione della Soluzione di Lavoro.

Provette da 12x75 mm: si consiglia l'utilizzo di provette di polipropilene (disponibili da DPC), possono essere utilizzate anche provette di vetro e di polistirene.

Pipette Volumetriche da 6,0 mL e 3,0 mL: per la ricostituzione dei calibratori.

Acqua distillata o deionizzata: per la ricostituzione dei calibratori.

Controlli: Viene fornito un controllo con valori lotto specifici nel range carente. Ulteriore materiale è disponibile da DPC: CON6 è un controllo a tre livelli per radiodosaggi basato su siero umano e

contenente vitamina B12 ed acido folico tra gli altri 25 costituenti dosati.

Micropipette da 200 µL: per l'aggiunta del campione. Si consigliano puntali monouso con una interfaccia ad aria che eviti al campione di venire a contatto con la pipetta stessa. L'utilizzo di pipette a dislocazione positiva deve essere evitato a causa del rischio che si verifichi il carryover.

Micropipette o Dispensatore da 50 µL: per l'aggiunta di NaOH/KCN. L'utilizzo di un dispensatore a ripetizione si è rivelato affidabile e conveniente per l'aggiunta di questo reagente.

Micropipetta o Dispensatore da 1 000 µL: Per l'aggiunta della Soluzione di Lavoro e del Legante la Vitamina B12/Acido Folico. L'utilizzo di un dispensatore a ripetizione si è rivelato affidabile e conveniente per l'aggiunta di questi reagenti

Bagnetto ad Acqua a 37°C: Non utilizzare un forno o una piastra riscaldata.

Agitatore Magnetico e Barra Agitatrice: Per la sospensione del Legante la Vitamina B12/Acido Folico prima e durante l'aggiunta di questo reagente.

Rack per la Decantazione: Foam o rack (metallico) in grado di contenere le provette per la fase simultanea di decantazione ed asciugatura. Foam sono disponibili da DPC.

Carta per grafici logit-log — disponibile da DPC (Codice: ZP797)

Acido Ascorbico: Richiesto solo per le determinazioni dell'acido folico nel sangue intero e nei globuli rossi. Occorre *preparare una soluzione all'1% fresca*, su base giornaliera. I cristalli di acido ascorbico devono essere protetti dall'umidità in modo che rimangano liberi di muoversi invece di rimanere incollati per eccessiva umidità. (L'Ascorbato di Sodio *non* costituisce una valida alternativa).

Foglio: O altre modalità di protezione per proteggere gli emolisati dalla luce.

Manipolazione dei Campioni

Per le determinazioni dell'acido folico i pazienti devono essere a digiuno.⁴⁰

Tipologia del Campione: Per le determinazioni della Vitamina B12 e

dell'Acido Folico, occorre utilizzare siero fresco o appena congelato, sangue intero, eparinizzato o EDTA. Non esistono interferenze cliniche significative da parte degli anticoagulanti testati.

L'ematocrito del paziente deve essere noto per tradurre i risultati del sangue intero in globuli rossi, che sono espressi in nanogrammi per millilitro di globuli rossi impaccati (ng/mL). Inoltre, per calcolare esattamente il risultato dell'acido folico nei globuli rossi, il livello di acido folico nel siero deve essere altrettanto noto.

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

Volume Richiesto: 200 µL di siero, plasma o emolizzato.

Conservazione e Stabilità:

Siero o Plasma Eparinizzato: La conservazione in condizioni idonee è critica per risultati affidabili di acido folico. Se il campione non viene dosato entro 8 ore, aliquotare e congelare a -20°C: stabile per 6-8 settimane.³⁸ Scongelerare solo una volta (a temperatura ambiente). Evitare l'eccessiva esposizione dei campioni alla luce diretta.

Farmaci Anti-Folati : come indicato nella sezione Specificità, la proteina legante i folati nel kit Fase Solida Senza Bollitura crossreagisce in qualche modo con il farmaco "anti-folati" metotrexato (MTX), un composto utilizzato in chemioterapia. Poiché infusioni di dosi elevate di metotrexato possono provocare inizialmente livelli di 45 000 ng/mL nel circolo e livelli dell'ordine dei 2 000 ng/mL 48 ore dopo, il kit non deve essere utilizzato per le determinazioni dell'acido folico in pazienti sottoposti a chemioterapia con il sopramenzionato farmaco. Inoltre, occorre fare molta attenzione nell'interpretazione dei risultati in pazienti recentemente sottoposti a terapia con metotrexato o con farmaci a struttura simile.

Emolisi: Risultati falsamente elevati di acido folico sierico possono essere ottenuti se il campione è emolizzato, poiché questa vitamina è presente negli eritrociti a concentrazioni molto più elevate che nel plasma. I risultati della Vitamina B12, d'altra parte, cosiccome misurati dal Dosaggio Fase Solida Senza Bollitura non vengono intaccati dall'emolisi.

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

Campioni Elevati: Campioni con concentrazioni di Vitamina B12 o Acido Folico superiori a quelle del calibratore più elevato devono essere diluiti con il calibratore zero e ridosati. Eccezionalmente concentrazioni elevate di vitamina B12 – dell'ordine di 20 000 pg/mL – possono riscontrarsi in pochi pazienti con leucemia mieloide cronica (CML).^{5,35} Poiché un carryover di anche un solo microlitro di tale campione provocherebbe un aumento falso di 100 pg/mL nella provetta successiva, debbono essere adottate delle precauzioni standard: dosare i campioni in duplicato, cambiare i puntali tra un campione e l'altro ed evitare l'utilizzo di micropipette a dislocazione positiva.

Preparazione di Emolizzati: è una procedura richiesta solo per la determinazione dell'acido folico sul sangue totale. Lisare le cellule in sangue eparinizzato appena ottenuto, o EDTA intero, preparando una diluizione 1 su 21 del campione (completamente sospeso) in una soluzione di acido ascorbico all'1%, appena preparata; ad esempio mischiare **100 µL** di campione con **2,0 mL** di questa soluzione, quindi agitare. È importante usare acido ascorbico piuttosto che ascorbato di sodio e preparare quotidianamente l'1% di soluzione fresca.³³

L'emolizzato può essere dosato subito; non è richiesta incubazione. Se l'emolizzato non è dosato subito, può essere conservato a temperatura ambiente (15-28°C), al buio, sino a 90 minuti. Gli emolizzati possono essere conservati a 2-8°C fino a 3 ore, o congelati a -20°C per 2 settimane.^{40,41} Difenderli dalla luce solare. Attenzione: dato che la vitamina B12 è distrutta dall'acido ascorbico, la procedura di radiodosaggio non produrrà

risultati significativi relativi alla vitamina B12 per i globuli rossi o il sangue totale.

Procedura del Dosaggio

Tutti i componenti devono essere a temperatura ambiente (15–28°C) prima dell'utilizzo.

- 1 Etichettare diciotto provette in duplicato: T (conte totali), NSB (legame non specifico), A (legame massimo) e dalla B alla G. Etichettare altre provette, anch'esse in duplicato, per i controlli ed i campioni.

Vitamina B12

Calibratori	Circa pg/mL	Circa pmol/L
A	0	0
B	50	37
C	100	74
D	300	221
E	600	443
F	1 200	885
G	2 400	1 771

Acido Folico

Calibratori	Circa ng/mL	Circa nmol/L
A	0	0
B	0,5	1,1
C	1	2,3
D	3	6,8
E	6	13,6
F	12	27,2
G	24	54,5

- 2 Aggiungere **200 µL** del calibratore zero A nelle provette NSB ed A, e **200 µL** dei rimanenti calibratori dalla B alla G nelle provette etichettate in maniera corrispondente. Dispensare **200 µL** di ciascun controllo, siero o campione di plasma ed emolisato nelle provette preparate. **Pipettare direttamente al fondo.**

Campioni con concentrazioni attese superiori al calibratore più elevato devono essere diluiti nel calibratore zero prima del dosaggio.

3 Preparazione della Soluzione di Lavoro

Lavoro: Preparare la Soluzione di Lavoro *non prima di 30 minuti dall'utilizzo*. Il quantitativo di ciascun componente dipende dal numero di provette da dosare. I volumi richiesti, in millilitri per provette, sono tabulati di seguito. Assicurarsi di moltiplicare questi volumi per un numero leggermente superiore al numero di provette dosate. (I componenti sono forniti in volumi sufficienti per preparare la Soluzione di Lavoro con circa un 10% in eccesso).

Millilitri per provetta	
Ditiotreitolio	0,05
Tracciante	1,0

- 4 Aggiungere **1 000 µL** di Soluzione di Lavoro appena preparata a tutte le provette. Vortexare.

Si consiglia l'uso di un dispensatore a ripetizione per l'aggiunta di 1 000 µL qui ed al punto 8 successivo. Mettere da parte le provette T per la conta (al punto 12); non sono necessari ulteriori passaggi.

- 5 Incubare per **30 minuti** a temperatura ambiente (15–28°C).

L'incubazione può essere estesa fino a 45 minuti a temperatura ambiente.

- 6 Aggiungere **50 µL** di NaOH/KCN a tutte le provette. Vortexare.

Fare estrema attenzione nella manipolazione dei reagenti. Si consiglia un dispensatore a ripetizione per l'aggiunta dei reagenti. Le provette devono essere blu.

- 7 Incubare per 30 minuti a 37°C.

L'incubazione può essere estesa fino a 45 minuti a 37°C. (Incubazioni più lunghe possono provocare recuperi inferiori della vitamina B12).

- 8 Aggiungere **1 000 µL** di Legante la Vitamina B12/Acido Folico a tutte le provette *eccetto* quelle NSB. Alle provette NSB, aggiungere **1 000 µL** di acqua sterile distillata. **Vortexare energicamente.**

Le provette devono essere vortexate *individualmente* finché un vortice non

comparire all'interno della provetta stessa. Possono essere utilizzati mixer a rack multiplo.

Il Legante deve essere mantenuto *ben sospeso* mentre viene dispensato: Si consiglia di mescolare meccanicamente su agitatore magnetico. Tutte le provette devono essere diventate di colore porpora, eccetto le provette T ed NSB. Il Legante necessario può essere versato in una beuta di vetro (non di plastica!), fornita di una barra agitatrice, ma il rimanente deve essere conservato nel flacone originario silianizzato.

- 9** Incubare per **60 minuti** a temperatura ambiente (15–28°C).

- 10** Centrifugare **almeno 15 minuti** a 2000xg o oltre.

Accelerazioni superiori sono accettabili, ma le provette di vetro o di polistirene possono rompersi a velocità superiori. Tempi di centrifugazione superiori possono essere necessari con centrifughe a velocità inferiore.

- 11** Decantare i supernatanti simultaneamente, utilizzando un rack, e conservare i precipitati per le conte.

La precisione può essere aumentata molto effettuando una decantazione completa ed uniforme, rimuovendo ogni traccia di umidità. Utilizzando foam, decantare il contenuto di tutte le provette (eccetto quelle T) e fare in modo che asciughino capovolte per 5 minuti. Quindi, scuotere le provette leggermente per eliminare tutta l'umidità residua.

- 12** Contare il precipitato per **1 minuto** in un gamma counter.

Attenzione che il precipitato contiene la frazione legata e non quella libera.

Calcolo e Controllo di Qualità

Campioni di Siero: Per calcolare le concentrazioni di vitamina B12 o acido folico da una rappresentazione logit-log della curva di calibrazione, calcolare per ciascuna coppia di provette le conte medie al minuto corrette con NSB

Conte Nette = (Media dei CPM) Meno (Media CPM **NSB**)

Quindi determinare il legame di ogni coppia di provette come percentuale del legame massimo (MB), con le conte corrette-NSB delle provette A prese al 100%:

Percentuale di Legato = (Conte Nette / Conte Nette **MB**) × 100

Il calcolo può essere semplificato omettendo la correzione per il legame non specifico; campioni entro il range dei calibratori producono virtualmente gli stessi risultati quando la Percentuale di Legato viene calcolata direttamente dai CPM Medi.

Utilizzando la carta logit-log, tracciare la Percentuale di Legato sull'asse verticale (probabilità) verso la Concentrazione sull'asse orizzontale (logaritmica) per ciascuno dei calibratori non zero e tracciare una linea retta approssimativamente lungo il tracciato di questi punti. I risultati per i campioni non noti possono essere letti dalla retta attraverso interpolazione.

Calcolo dei Dati: E' buona norma costruire un grafico della curva di calibrazione come verifica visiva dell'appropriatezza della trasformazione utilizzata, anche quando il calcolo dei risultati viene gestito dal computer. Vedi Davis SE et al. Radioimmunoassay data processing with a small programmable calculator. J Immunoassay 1980;1:15-25; and Dudley RA, et al. Guidelines for immunoassay data reduction. Clin Chem 1985;31:1264-71.

Emolisati: calcolare inizialmente il risultato R in nanogrammi per millilitro di emolisato, utilizzando la curva di calibrazione dell'acido folico. Quindi moltiplicare per il fattore di diluizione 21 per ottenere la concentrazione di acido folico nel sangue intero in ng/mL. Per la misura approssimativa della concentrazione di globuli rossi impaccati, anch'essa in ng/mL, moltiplicare la concentrazione di acido folico nel sangue intero per $100/H$, dove H è l'ematocrito in percentuale:

Acido Folico nei Globuli Rossi $\approx 21R \times (100 / H)$

Parlando in senso stretto, la concentrazione di acido folico nel siero deve essere sottratta dalla concentrazione di acido folico nel sangue intero prima di moltiplicare per 100/H. Utilizzando il livello S dell'acido folico nel siero del paziente, l'equazione esatta è:

$$\text{Acido Folico nei Globuli Rossi} = (21R - [S \times ((100 - H) / 100)]) \times (100 / H)$$

Il termine in parentesi rotonde è, tuttavia, nella maggior parte dei casi così piccolo comparato al termine 21R che viene tralasciato.

Controlli: Utilizzare il controllo fornito nel kit, e tracciare i risultati di giorno in giorno come descritto in Westgard JO, et al. A multi-rule chart for quality control. Clin Chem 1981;27:493-501. "Repeat samples are a valuable additional tool for monitoring interassay precision".

Parametri di Q.C.: Consigliamo di conservare traccia delle prestazioni:

T = Conte Totali (conte al minuto)

%NSB = $100 \times (\text{Conte NSB Medie} / \text{Conte Totali})$

%MB = $100 \times (\text{Conte Nette} / \text{Conte Totali})$

E le "intercette" al 20, 50 ed 80%, dove 20% = Concentrazione al 20% di Legato ecc.

Centrifugazione: Utilizzare le formule di seguito riportate per calcolare l'accelerazione della vostra centrifuga ad una data velocità, o la velocità (in rivoluzioni al minuto) richiesta per raggiungere la velocità g desiderata.

forza g = $28,38 \times (\text{rpm} / 1\,000)^2 \times \text{raggio [pollici]}$

rpm = $187,7 \times \sqrt{(\text{forza g} / \text{raggio [pollici]})}$

o

forza g = $11,18 \times (\text{rpm} / 1\,000)^2 \times \text{raggio [cm]}$

rpm = $299,07 \times \sqrt{(\text{forza g} / \text{raggio [cm]})}$

Sedute Esemplificative – Vitamina B12 / Acido Folico: a solo scopo illustrativo e non per calcolare i risultati di un'altra seduta. I valori dei calibratori sono *lotto-specifici*, le concentrazioni elencate nella colonna più a destra possono non essere in linea con i valori dei calibratori forniti nel kit. (Vedi tabelle "Example Run, Vitamin B12" e "Example Run, Folic Acid".)

Valori Attesi

Studio sui Range di Riferimento

Sono stati dosati campioni freschi di siero da un totale di 100 individui sani per la vitamina B12 e l'acido folico con il kit DPC Dualcount Fase Solida Senza Bollitura. Il kit è stato anche utilizzato per le determinazioni di acido folico nei campioni di sangue intero di 88 individui sani. I gruppi di riferimento erano composti principalmente da personale di laboratorio, sia uomini che donne, in apparente buono stato di salute. In ciascun caso, il range di riferimento è stato determinato non parametricamente come regione centrale al di sopra del 95% delle osservazioni. I range di riferimento per il kit Dualcount Fase Solida Senza Bollitura in questo studio sono tabulati di seguito:

Vitamina B12 nel siero	200 – 950 pg/mL	150 – 700 pmol/L
Acido Folico nel siero:	3,0 – 17 ng/mL	7 – 39 nmol/L
Acido Folico nel Sangue Intero:	80 – 320 ng/mL	180 – 725 nmol/L
Acido Folico nei Globuli Rossi:	175 – 700 ng/mL	395 – 1 585 nmol/L

I range di riferimento dell'acido folico sono stati confermati da altri studi presso due centri su un totale di 162 individui. Attenzione che i risultati prossimi al limite inferiore di normalità – i.e. risultati dell'acido folico nei globuli rossi all'interno del range da 100 a 200 ng/mL – devono essere interpretati con cautela, alla luce di altri dati clinici e di laboratorio. I risultati dell'acido folico nel *siero* devono essere interpretati alla luce delle determinazioni dei *globuli rossi*.

I range di riferimento descritti nella tabella soprastante sono stati ottenuti negli Stati Uniti. Studi effettuati in Svezia e Norvegia suggeriscono range di riferimento di 100–350 ng/mL e 130–350 ng/mL, rispettivamente per l'acido folico nei globuli rossi. Considerare questi limiti *soltanto come linee guida*. Ogni laboratorio dovrebbe stabilire i propri range di riferimento.

Vitamina B12: Non vi è sovrapposizione tra il range di 200–950 pg/mL vitamina B12 per individui sani ed il range assoluto

incontrato per campioni con carenza di vitamina B12. (Vedi "Expected Values: Comparative Discrimination Plot" nella sezione Tabelle e Grafici). Il valore di 200 pg/mL può quindi essere preso come limite inferiore di normalità per i valori di vitamina B12 misurati con il kit Fase Solida Senza Bollitura. Attenzione che i valori inferiori a 200 pg/mL e superiori a 124 pg/mL – valore più alto osservato per i campioni carenti in vitamina B12 devono essere trattati come statisticamente al di sotto della normalità; in tali casi occorre effettuare ulteriori indagini.

Cause comuni di livelli elevati di vitamina B12 comprendono patologie del fegato, patologie mieloproliferative (la leucemia mieloide cronica costituisce un caso particolare) e l'utilizzo di integratori multivitaminici.

Campioni con carenze confermate di Vitamina B12

DPC ha studiato oltre 100 campioni con carenze confermate di Vitamina B12 anche da criteri clinici ed ematologici indipendenti.¹⁴ Sono stati utilizzati metodi di riferimento: un metodo microbiologico basato sul *Lactobacillus leichmannii* e sul dosaggio DPC Dualcount Carbone Vegetale con Bollitura, un radioimmunosaggio basato su denaturazione con calore, separazione del carbone vegetale e fattore intrinseco purificato. Sulla maggior parte, ma non su tutti i campioni i valori di vitamina B12 con tutti e tre i dosaggi erano disponibili. I risultati clinici sono forniti in un grafico della discriminazione comparativa che mostra il range carente della vitamina B12 per tutti i tre metodi uno accanto all'altro e la sovrapposizione tra valori normali e carenti nei due radiodosaggi. (Vedi "Expected Values: Comparative Discrimination Plot" nella sezione Tabelle e Grafici).

Prestazioni del Dosaggio

Vedi Tabelle e Grafici per dati rappresentativi delle prestazioni del Dosaggio Dualcount Vitamina B12 Fase Solida Senza Bollitura. I risultati sono espressi in pg/mL. Acido Folico i risultati sono espressi in ng/mL. Ad eccezione di quanto descritto, tutti i risultati sono stati generati su siero o su sangue intero eparinizzato.

Fattore di Conversione per la Vitamina B12:

pg/mL $\times$ 0,7378 $\rightarrow$ pmol/L

Fattore di Conversione per l'Acido Folico:

ng/mL $\times$ 2,266 $\rightarrow$ nmol/L

Range di calibrazione:

Vitamina B12: Circa 50 – 2 400 pg/mL
I valori dei calibratori sono *lotto-specifici*.

Acido Folico: Circa 0,5 – 24 ng/mL.
I valori dei calibratori sono *lotto-specifici*.

Sensibilità analitica:

Vitamina B12: 34 pg/mL.

Acido Folico: 0,3 ng/mL.

Precisione Intra-Dosaggio (All'interno della stessa seduta): Sono state calcolate statistiche per i campioni dai risultati di 20 coppie di provette in un unico dosaggio. (Vedi tabelle "Intraassay Precision".)

Precisione Inter-Dosaggio (Da una seduta all'altra): Sono state calcolate statistiche per i campioni dai risultati di provette in 18 dosaggi diversi su 14 campioni. (Vedi tabelle "Interassay Precision".)

Precisione Cumulativa Inter-Dosaggio: Sono state generate Statistiche cumulative interdosaggio per nove controlli nel corso di quattro mesi. Per ciascun controllo, sono state processate una coppia di provette in circa 100 dosaggi. Le statistiche riflettono un cambiamento relativo al numero di lotto ed al lavoro dei tecnici. (Vedi tabelle "Cumulative Interassay Precision".)

Effetto Fine-Seduta: Coppie di provette sono state spaziate per un totale di 350 provette. Utilizzando una pipetta a ripetizione, l'aggiunta del Legante la Vitamina B12/Acido Folico è stata completata in otto minuti. I risultati indicano nessun effetto della posizione dovuto a ritardi nell'aggiunta dei reagenti, anche in dosaggi di questa grandezza.

Specificità

Purezza del Legante: Sono stati effettuati due esperimenti per dimostrare la purezza del legante il fattore intrinseco (IF) utilizzato nel radiodosaggio Vitamina B12 Fase Solida Senza Bollitura.

- L'incubazione overnight del Legante la Vitamina B12/Acido Folico con siero contenente anticorpi specifici per il fattore intrinseco ha prodotto la distruzione completa della capacità di questo reagente di legare la Vitamina B12. Se la proteina R fosse stata presente avrebbe conservato almeno un po' della propria capacità di legare la Vitamina B12.
- La sostituzione del Legante la Vitamina B12/Acido Folico in un sistema di radiodosaggi basata su denaturazione con calore e carbone vegetale coattato, operante ad un pH del dosaggio di circa 2, ha prodotto anche in questo caso una completa inattivazione del Legante. Se la proteina R fosse stata presente avrebbe conservato almeno un po' della propria attività in queste condizioni di acidità.

Crossreattività: la specificità del legante il fattore intrinseco purificato è stata determinata dosando una preparazione di cobinamide. I risultati mostrano che, anche a concentrazioni di 50 000 000 pg/mL, la cobamide non provoca virtualmente nessuna riduzione nella capacità legante della vitamina B12 radiomarcata, i.e. produce una concentrazione apparente di vitamina B12 al limite di rilevazione; la crossreattività con la cobinamide è quindi inferiore a 0,0001%. (Vedi tabella "Specificity 1").

E' stata anche studiata la crossreattività tra il metotrexato (MTX) un farmaco anti-folati e la proteina legante i folati utilizzati nel kit Fase Solida Senza Bollitura. La percentuale di crossreattività, anche se numericamente piccola, è clinicamente significativa, poiché il metotrexato è spesso somministrato a dosi estremamente elevate. Per questo motivo le determinazioni di acido folico sono controindicate in pazienti che fanno uso o che hanno fatto uso di questo o di altri farmaci strutturalmente simili ed anti folati. (Vedi tabella "Specificity 2").

Linearità: I campioni sono stati dosati a varie diluizioni. (Vedi tabelle "Linearity" per dati rappresentativi).

Recupero: Sono state preparate sei soluzioni diluite utilizzando il calibratore zero come diluente. Sono state preparate tre soluzioni (A, B e C) di 10 000, 20 000 e

30 000 pg/mL di Vitamina B12. Le altre tre (D, E ed F) sono state preparate per rappresentare 60, 120 e 180 ng/mL di acido folico. Un'aliquota da 50 µL di ciascuna soluzione è stata aggiunta ad aliquote da 950 µL di sei campioni con una diluizione di 1:20 lasciando la matrice del campione relativamente intatta. I valori tabulati rappresentano il recupero solo della soluzione diluita: il contributo del campione di siero è stato sottratto. I numeri in parentesi sono le concentrazioni dei campioni di siero originari non diluiti (Vedi tabelle "Recovery")

Effetto delle Proteine: Per determinare gli effetti delle variazioni nel contenuto proteico del dosaggio Fase Solida Senza Bollitura, due campioni di siero sono stati diluiti con vari quantitativi di albumina sierica umana (HSA) ed IgG umane normali. Tutti i campioni, diluiti e non diluiti, sono stati quindi processati in un unico dosaggio. I risultati mostrano che anche ampie variazioni nel contenuto proteico producono solo piccole variazioni nei risultati osservati. Possiamo concludere che non è presente nessun effetto proteico clinicamente significativo sul Sistema Dualcount Fase Solida Senza Bollitura.

Tipo di Campione Alternativo: sono stati prelevati simultaneamente campioni da individui sani in provette semplici, eparinizzate ed EDTA, quindi dosati con il dosaggio Fase Solida Senza Bollitura. I risultati indicano che non vi è nessuna interferenza clinicamente significativa da parte degli anticoagulanti testati. (Vedi tabella "Kind of Alternate Sample")

Bianchi Paziente: Per verificare che il Dosaggio DPC Fase Solida Senza Bollitura non abbia problemi relativi al legame non specifico del tipo descritto in letteratura,^{6,24,27,35} è stato effettuato un dosaggio che includeva una curva di calibrazione, i bianchi calibratore (Legante omesso) e due set di provette di bianchi pazienti. Da un set di provette bianco paziente, il Legante la Fase Solida è stato semplicemente omesso durante il dosaggio. L'altro set è stato dosato sostituendo un reagente "Bianco Cellulosa" al Legante: una sospensione di particelle di cellulosa identiche al Legante la Fase Solida, ma prive di fattore intrinseco purificato e di proteina legante i folati. (Per la valutazione del kit, il

reagente bianco cellulosa può essere ottenuto su richiesta da DPC).

I risultati indicano che (a) l'omissione del legante è un'ideale alternativa all'uso del reagente bianco cellulosa e (b) il legame non specifico è *uniformemente basso* sia per campioni e calibratori nel sistema Dualcount Fase Solida Senza Bollitura. Quindi, un singolo set di provette NSB – le provette del calibratore zero senza legante – è sufficiente per la determinazione routinaria del legame non specifico. In conclusione, le provette NSB possono essere omesse: i calcoli mostrano che le correzioni per il legame non specifico possono essere trascurate senza nessun effetto significativo sui risultati per campioni entro il range dei calibratori. (Vedi tabelle "Patient Blanks").

La Denaturazione

Per verificare l'efficacia della denaturazione nel sistema Dualcount Fase Solida Senza Bollitura, sono stati effettuati studi indipendenti con il kit su campioni di pazienti con leucemia cronica mieloide (CML) ed altri con disturbi mieloproliferativi e su campioni di Anemia Perniciosa (PA) che sono stati testati per la presenza di anticorpi bloccanti anti-fattore intrinseco.

Campioni CML: in un esperimento con il kit Fase Solida Senza Bollitura, la precipitazione del carbone vegetale è stata utilizzata per verificare il legame non specifico nelle provette bianche del paziente alla fine della seconda incubazione. I risultati hanno dimostrato una precipitazione virtualmente completa del tracciante in tutte le provette; Il comportamento delle provette bianche dei pazienti CML, in questo esperimento, era simile a quello dei bianchi generati da campioni di altri pazienti sani. (I due campioni CML avevano livelli di Vitamina B12 da 3 000 a 5 000 pg/mL). Questo esperimento dimostra che la denaturazione alcalina a 37°C utilizzata nel Sistema Fase Solida Senza Bollitura inattiva in maniera efficace anche livelli elevati di proteine leganti la vitamina B12 che viene riscontrata in alcuni pazienti CML; poiché se la proteina carrier endogena non fosse stata intercettata dalla denaturazione, si sarebbe legata al tracciante facendo in modo che un significativo quantitativo di radioattività

rimanesse nel supernatante dopo precipitazione del carbone attivo.

Campioni PA: Gli anticorpi specifici bloccanti il fattore intrinseco sono presenti in più della metà di tutti i pazienti affetti da anemia perniciosa. Quattordici campioni PA, sette dei quali positivi per la presenza di tali anticorpi, sono stati dosati con il kit Fase Solida Senza Bollitura e con il Kit Dualcount Carbone Vegetale con Bollitura.⁸ I risultati mostrano che la denaturazione alcalina a 37°C nel kit Fase Solida Senza Bollitura è efficace quanto la bollitura nella denaturazione degli anticorpi anti-fattore intrinseco che diversamente potrebbero causare risultati falsamente normali in molti casi di PA.

Quale ulteriore conferma, Quattro campioni positivi e negativi agli anticorpi PA sono stati sottoposti a denaturazione alcalina a 37°C con il kit Fase Solida Senza Bollitura ed un controllo che ha comportato la sostituzione dell'acqua con idrossido di sodio.⁸ I campioni positivi agli anticorpi soggetti alla procedura di controllo hanno mantenuto la loro capacità di bloccare l'attività del fattore intrinseco, mentre campioni positivi agli anticorpi soggetti a denaturazione alcalina non presentavano questo comportamento: questi ultimi presentavano un comportamento non distinguibile da quello dei campioni negativi, indicando che la denaturazione del kit "senza bollitura" aveva effettivamente inattivato gli anticorpi anti-fattore intrinseco presenti nei campioni positivi. Attenzione che mentre gli esperimenti qui riportati riguardavano molti campioni con titoli anticorpali estremamente elevati, non si può escludere la possibilità che gli anticorpi in un campione raro con un titolo ancora elevato possano non essere completamente denaturati con la tecnica "senza bollitura". Dove esiste questo dubbio, il risultato della procedura "senza bollitura" può essere confermato ridosando il campione con la procedura alterativa "con bollitura".

Effetto dei Tempi di Incubazione sugli Emolisati

Emolisati: Sono stati prelevati campioni di sangue da Quattro individui in provette eparinizzate ed EDTA. Gli emolisati sono stati preparati incubando aliquote per ciascuno dei campioni con 1% di soluzione di acido ascorbico per aumentare i tempi (da 0 a 90 minuti al

buio a temperatura ambiente (15–28°C) prima del dosaggio. La tabella non presenta nessuna differenza significativa nei risultati dell'acido folico nei globuli rossi per tempi di lisi da zero a 90 minuti. In maniera analoga, gli emolizzati possono essere dosati immediatamente dopo la fase di diluizione con acido ascorbico. La tabella mostra che i risultati non sono influenzati dalla scelta dell'anticoagulante: possono essere utilizzati sia campioni di sangue intero che EDTA. (Vedi tabella "Effect of Incubation Time on Hemolysates")

Comparazione di Metodi per la Vitamina B12: il dosaggio è stato comparato al dosaggio DPC IMMULITE Vitamina B12 su 98 campioni di siero (range di concentrazione: circa da 128 a 1 037 pg/mL. Vedi grafico "Method Comparison". Mediante regressione lineare:

(SPNB) = 0,98 (IML) – 5,3 pg/mL
r = 0,982

Valore medio:
371 pg/mL (Solid Phase No Boil)
385 pg/mL (IMMULITE – LKVB)

Comparazione di Metodi per l'Acido Folico: Il dosaggio è stato comparato al dosaggio DPC IMMULITE Acido Folico su 71 campioni di siero (Range di concentrazione: circa da 1,4 a 20 ng/mL. Vedi grafico "Method Comparison".) Mediante regressione lineare:

(SPNB) = 0,92 (IML) + 0,71 ng/mL
r = 0,985

Valore Medio:
6,2 ng/mL (Solid Phase No Boil)
5,9 ng/mL (IMMULITE – LKFO)

Assistenza Tecnica

All'Estero: Contattare il Proprio Distributore Nazionale.

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

Português

Sistema de Contagem Dupla em Fase Sólida sem Ebulição (Solid Phase No Boil Dualcount)

Utilização: O Sistema de Contagem Dupla em Fase Sólida sem Ebulição (Solid Phase No Boil Dualcount) é um radioensaio concebido para a medição simultânea das concentrações de vitamina B12 no soro ou no plasma, e do ácido fólico no soro, plasma ou sangue total. Os kits de concentração da Vitamina B12 em Fase Sólida sem Ebulição (Solid Phase No Boil) e do Ácido Fólico em Fase Sólida sem Ebulição (Solid Phase No Boil) foram concebidos para a determinação dos elementos analíticos simples da vitamina B12 e do ácido fólico, respectivamente. Todos os três kits destinam-se exclusivamente a utilização em diagnóstico *in vitro* como auxiliares de diagnóstico clínico.

	µCi / kBq		
	Kit de Contagem Dupla	Kit de Vitamina B12	Kit de Ácido Fólico
			
100 tubos de ensaio	KDSP1	KVSP1	KFSP1
Co-Vitamina B12 ⁵⁷	2/74	2/74	—
Ácido fólico ¹²⁵ I	6/222	—	6/222
200 tubos de ensaio	KDSP2	KVSP2	KFSP2
Co Vitamina B12 ⁵⁷	4/148	4/148	—
Ácido fólico ¹²⁵ I	12/444	—	12/444
500 tubos de ensaio	KDSP5	KVSP5	KFSP5
Co Vitamina B12 ⁵⁷	10/370	10/370	—
Ácido fólico ¹²⁵ I	30/1110	—	30/1110

Princípio do Processo

1. Desnaturação alcalina das proteínas endógenas

2. Competição pelo Agente de ligação a um pH de 9,3: Os análogos da vitamina B12 não causam interferência, uma vez que o agente de ligação do factor intrínseco do porco não tem proteína R. O agente de ligação do ácido fólico tem igual afinidade para o MTHF e o PGA.

Solid Phase No Boil Dualcount (PIKDSP-5, 2005-09-21)

3. Separação da Fase Sólida

Tempo de Incubação: 2 horas.

Contagens totais:

Ácido fólico ^{125}I : aproximadamente 80 000 cpm no ponto de iodinação.
Co-vitamina B12⁵⁷: aproximadamente 25 000 cpm.

Avisos e Precauções

Para utilização em diagnóstico *in vitro*.

Reagentes: Conservar a 2–8°C num frigorífico destinado para materiais radioactivos. Eliminar de acordo com as leis aplicáveis.

Não utilize reagentes com prazo de validade expirado.

Alguns componentes fornecidos com este dispositivo podem conter matéria de origem humana e/ou outros ingredientes potencialmente perigosos que necessitem de determinadas precauções.

Observar as precauções universalmente seguidas e manusear todos os materiais como sendo potencialmente capazes de transmitir doenças infecciosas. As matérias-primas obtidas de soro humano foram testadas, revelando resultados negativos para a sífilis, para anticorpos do vírus da imunodeficiência humana (HIV) 1 e 2, para o antígeno de superfície da hepatite B (HBsAg) e para os anticorpos do vírus da hepatite C.

Foi adicionada azida de sódio como conservante. Para evitar acumulações de azidas metálicas explosivas em canalizações de cobre e chumbo, os reagentes devem ser eliminados no esgoto apenas se estiverem diluídos e forem lavados com grandes quantidades de água.

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

Juntamente com o kit, é fornecida uma solução que contém hidróxido de sódio (NaOH) e cianeto de potássio (KCN). Proceder com extremo cuidado para evitar qualquer contacto do corpo com este reagente, visto ele conter cianeto e álcalis fortes.

Água: Utilizar água destilada ou desionizada.

Radioactividade

Uma cópia da licença de uso de produtos radioactivos (específica ou genérica) emitida para o cliente norte-americano, deve estar em poder da DPC antes do envio de kits ou componentes contendo material radioactivo. Estes materiais radioactivos podem ser adquiridos por qualquer cliente que possua a necessária licença específica. Com uma licença genérica estes produtos radioactivos só podem ser adquiridos por médicos, médicos veterinários na prática de medicina veterinária, laboratórios clínicos e hospitais — e exclusivamente para uso clínico *in vitro* ou testes laboratoriais não envolvendo administração externa ou interna do material radioactivo ou da sua radiação para o ser humano ou outros animais. A sua aquisição, receita, armazenamento uso, transporte e eliminação estão sujeitas aos regulamentos e a uma licença da Comissão de Regulação Nuclear dos EUA (NRC) ou do Estado com o qual a NRC tenha um acordo relativo ao exercício do controlo regulamentar.

Tratar os materiais radioactivos de acordo com a regulamentação da sua licença, específica ou genérica. De modo a minimizar a exposição à radiação, o utilizador deve seguir as instruções da publicação do Departamento Nacional de Normas sobre a *Utilização segura de materiais radioactivos* (Livro No. 92, publicado em Março de 1964) e publicações seguintes do Estado e Autoridades Federais.

Limpar os derrames prontamente e descontaminar as superfícies afectadas. Evitar os aerossóis. Eliminar os lixos radioactivos de acordo com a regulamentação da licença. Os titulares de licenças genéricas (titulares da licença NRC 483) podem eliminar os lixos sólidos radioactivos como lixo não radioactivo depois de remover os rótulos. Licenças Específicas (Licença NRC 313) devem ter em conta o Capítulo 10, secção 20, do Código de Regulamentações Federais. Cada Estado deve referir a legislação em vigor aprovada para o seu território. Os titulares de licenças genéricas podem eliminar os lixos radioactivos líquidos do

tipo deste produto num esgoto de laboratório. Os titulares de licenças devem remover os rótulos dos frascos vazios de materiais radioactivos antes de os eliminar como resíduos sólidos. Os titulares de licenças específicas podem eliminar pequenas quantidades de lixo radioactivo líquido do tipo utilizado neste produto no esgoto normal do laboratório. Ter em atenção as regulamentações em vigor para o seu laboratório.

Materiais fornecidos: Preparação inicial

Os dois componentes — Agente de ligação da Vitamina B12/Ácido fólico (DSP1) e o reagente NaOH/KCN (NHCN) — representam um conjunto conjugado e devem ser usados exclusivamente em combinação.

O agente de ligação da Vitamina B12/Ácido fólico e o reagente NaOH/KCN fornecidos neste kit *não* são intercambiáveis com outros lotes dos mesmos componentes.

Agente de ligação do Ácido fólico/Vitamina B12 (DSP1)

120 mL de uma suspensão de agentes de ligação de ácido fólico e de vitamina B12 purificada imobilizada em partículas de celulose microcristalina, com conservante. Estável a 2–8°C durante 30 dias depois de aberto. Cor: laranja.

KDSP1, KVSP1, KFSP1: 1 frasco
KDSP2, KVSP2, KFSP2: 2 frascos
KDSP5, KVSP5, KFSP5: 5 frascos

Este reagente tem que ser mantido suspenso antes e durante o seu uso; pode-se introduzir e manter no frasco uma barra de agitação magnética. O agente de ligação deve ser mantido no frasco original de bocal largo, que foi tratado para impedir a absorção.

NaOH/KCN (NHCN)

15 ml de uma solução que contém hidróxido de sódio (NaOH) e cianeto de potássio (KCN), com conservante. Estável a 2–8°C durante 30 dias depois de aberto. Para evitar uma exposição desnecessária à atmosfera, voltar a fechar o frasco com a tampa imediatamente após o uso do produto; de contrário a absorção de CO₂ resultará gradualmente na alteração do pH. *Proceder com extremo cuidado a fim*

de evitar qualquer contacto do corpo com este reagente.

KDSP1, KVSP1, KFSP1: 1 frasco
KDSP2, KVSP2, KFSP2: 1 frasco
KDSP5, KVSP5, KFSP5: 2 frascos

Cuidado! Contém cianeto e álcalis fortes.

Traçador matriz da Co-Vitamina

B12⁵⁷/Ácido fólico ¹²⁵I (DSP2)

Fornecido apenas nos kits de Contagem Dupla.

110 mL de uma solução pronta a usar de Co-vitamina B12⁵⁷ e de ácido fólico ¹²⁵I. Estável a 2–8°C, durante 30 dias após a abertura, ou até à expiração do prazo de validade indicado no rótulo.

Nota: O Traçador matriz contém *ambos* os isótopos, enquanto que os traçadores fornecidos nos kits das substâncias a analisar simples contém apenas um isótopo cada.

KDSP1: 1 frasco
KDSP2: 2 frascos
KDSP5: 5 frascos

Co-Vitamina B12⁵⁷ (VSP2)

Fornecida apenas nos kits de Vitamina B12.

110 mL de uma solução pronta a usar de Co-vitamina B12⁵⁷. Estável a 2–8°C durante 30 dias depois de abrir, ou até à expiração do prazo de validade indicado no rótulo.

KVSP1: 1 frasco
KVSP2: 2 frascos
KVSP5: 5 frascos

Ácido fólico ¹²⁵I (FSP2)

Fornecido apenas nos kits de Ácido Fólico.

110 mL de uma solução de ácido fólico ¹²⁵I pronto a usar, com conservante. Estável a 2–8°C durante 30 dias após a abertura da embalagem, ou até à expiração do prazo de validade indicado no rótulo.

KFSP1: 1 frasco
KFSP2: 2 frascos
KFSP5: 5 frascos

Calibradores da Vitamina B12/Ácido fólico (DSP3–9)

Sete frascos, rotulados de A a G, contendo diferentes níveis de vitamina B12 liofilizada e ácido fólico numa matriz de proteína. Reconstituir o calibrador A regulado a zero com **6,0 mL** de água

destilada ou desionizada, e os restantes calibradores, de B a G, com **3,0 mL** de água destilada ou desionizada cada um. Estável a 2–8°C durante 30 dias após a reconstituição, ou durante 2 meses (aliquotados) a –20°C. Evitar uma exposição excessiva à luz directa.

KDSP1, KVSP1, KFSP1: 1 conjunto
KDSP2, KVSP2, KFSP2: 1 conjunto
KDSP5, KVSP5, KFSP5: 2 conjuntos

Os valores *específicos de lote* dos calibradores estão discriminados nas tabelas da secção Procedimento do Radioensaio. Notar que os calibradores fornecidos com o Kit de Contagem Dupla em Fase Sólida sem Ebulição (Solid Phase No Boil Dualcount) não são intercambiáveis com os pertencentes a outros kits da DPC para concentração da vitamina B12 e do ácido fólico. Ler os rótulos dos frascos para ver os valores exactos nas unidades apropriadas.

Solução de ditiotreitol (DTT1, 5DTT1)

Solução de ditiotreitol. Estável a 2–8°C durante 30 dias após a abertura da embalagem.

KDSP1, KVSP1, KFSP1: 1 frasco x 6 mL (DTT1)

KDSP2, KVSP2, KFSP2: 2 frascos x 6 mL (DTT1)

KDSP5, KVSP5, KFSP5: 1 frasco x 30 mL (5DTT1)

Controlo da anemia (ANC)

Controlo liofilizado à base de proteínas com concentrações de vitamina B12 e ácido fólico *específicas de lote* no intervalo de valores deficiente. Reconstituir com **2,0 mL** de água destilada. Estável a 2–8°C durante 7 dias após a reconstituição, ou durante 2 meses (aliquotados) a –20°C. Evitar uma exposição excessiva à luz directa.

KDSP1, KVSP1, KFSP1: 1 frasco

KDSP2, KVSP2, KFSP2: 1 frasco

KDSP5, KVSP5, KFSP5: 1 frasco

Materiais necessários mas não fornecidos

Contador gama: Deve ter capacidade para discriminar Co^{57} de ^{125}I com uma taxa de derramamento aceitavelmente baixa, para efectuar determinações simultâneas. Um instrumento de canal único, regulado para ^{57}Co ou ^{125}I , é adequado para os kits de componentes analíticos simples.

Centrifugadora: É capaz de atingir pelo menos 2000xg. Um modelo refrigerado de alta velocidade é desejável, mas não essencial. Podem também ser obtidos bons resultados com aparelhos de tampo de mesa de baixa velocidade, desde que o tempo de centrifugação seja devidamente prolongado.

Misturador Vortex: O misturador deve ter a força suficiente para produzir um turbilhão (vórtice) nos tubos de ensaio após a adição de proteína de ligação. O emprego de misturadores de grades para múltiplos tubos de ensaio tem sido considerado inadequado.

Água destilada esterilizada: Para uso em tubos NSB para a etapa 8 do Radioimunoensaio.

Recipientes plásticos com tampas:

Para preparar a Solução de Trabalho.

Tubos de ensaio de 12x75 mm:

Recomenda-se os tubos de polipropileno (distribuídos pela DPC), mas os tubos de ensaio de vidro e de poliestireno também têm demonstrado ser adequados.

Pipetas volumétricas de 6,0 mL e 3,0 mL:

Para reconstituição dos calibradores.

Água destilada ou desionizada: Para a reconstituição dos calibradores.

Controlos: É fornecido um controlo com valores específicos do lote no intervalo deficiente. Outros materiais são distribuídos pela DPC: CON6 é um controlo de radioimunoensaio de três níveis, à base de soro humano, que contém vitamina B12 e ácido fólico como dois de mais de 25 elementos constituintes testados.

Minipipeta, 200 µL: Para adição de amostras. Recomenda-se as pipetas de ponta descartável com uma interface pneumática que impede que a amostra entre em contacto com a própria pipeta. É aconselhável evitar o uso de pipetas de deslocamento positivo devido ao risco de vazamento.

Minipipeta ou distribuidor, 50 µL: Para acrescentar NaOH/KCN. Um distribuidor de repetição tem demonstrado ser fiável e prático para esta adição de reagente.

Minipipeta ou distribuidor, 1 000 µL:

Para adicionar a Solução de Trabalho e o agente de ligação da Vitamina B12/Ácido

fólico. Um distribuidor de repetição tem demonstrado ser fiável e prático para estas adições de reagente.

Banho de água a 37°C: Não utilizar um fogão ou uma placa de aquecimento.

Agitador magnético e barra agitadora: Para suspender o agente de ligação da Vitamina B12/Ácido fólico imediatamente antes e durante a adição deste reagente.

Tabuleiro de decantação: Tabuleiro de espuma (ou metal) capaz de conter firmemente os tubos para decantação e drenagem simultâneas. Os tabuleiros de espuma são distribuídos pela DPC.

Papel milimétrico Logit-log – distribuído pela DPC (Número de catálogo: ZP797)

Ácido ascórbico: Necessário apenas para as determinações de ácido fólico no sangue total e nos glóbulos vermelhos. A solução a 1% *deve ser preparada de fresco*, diariamente. Os cristais de ácido ascórbico devem ser protegidos contra a humidade, para que possam fluir livremente, sem formar uma massa, devido ao excesso de humidade. (o ascorbato de sódio *não* é uma alternativa adequada).

Folha de alumínio: ou outros meios para proteger os hemolizados contra a luz directa.

Manuseamento dos espécimes

Para as determinações da concentração do ácido fólico, o doente deve encontrar-se em jejum.⁴⁰

Tipo de amostra: Para as determinações da concentração da vitamina B12 e do ácido fólico, devem ser usados soro fresco ou congelado, plasma heparinizado ou com EDTA. Não se verificou nenhuma interferência clinicamente significativa dos anticoagulantes testados.

Para as determinações da concentração do ácido fólico no sangue total e nos glóbulos vermelhos, usar sangue total fresco heparinizado ou com EDTA. O hematócrito do paciente deve ser conhecido, a fim de se poder traduzir o sangue total em resultados das concentrações do ácido fólico nos glóbulos vermelhos, que são expressos em nanogramas por mililitro (ng/ml) de glóbulos vermelhos. Além disso, para se calcular com exactidão a concentração de

ácido fólico nos glóbulos vermelhos, o nível de ácido fólico no soro do paciente também tem que ser conhecido.

Os tubos para colheita sanguínea de diferentes fabricantes, podem originar diferentes valores, dependendo dos materiais e aditivos, incluindo gel ou barreiras físicas, activadores do coágulo e/ou anti coagulantes. Dupla em Fase Sólida sem Ebulição não foram ainda testados com todas as possíveis variações originadas pelos tipos de tubos. Consultar a secção Tipos de Amostras Alternativas para obter detalhes sobre os tubos que foram testados.

Volume de Amostra: 200 µL de soro, plasma ou hemolizado.

Conservação e estabilidade:

Soro ou plasma heparinizado: A conservação em condições adequadas é essencial para a obtenção de resultados fiáveis do nível de ácido fólico. Se a amostra *não* for testada dentro de 8 horas, dividir em alíquotas e congelar a -20°C: estável durante 6–8 semanas.³⁸ Descongelar apenas uma vez (a temperatura ambiente). Evitar uma exposição excessiva das amostras à luz directa.

Fármacos anti-folato: Conforme referido na secção Especificidade, a proteína de ligação do folato contida no kit do sistema em Fase Sólida sem Ebulição (Solid Phase No Boil) interreage até certo ponto com o fármaco "anti-folato" metotrexato (MTX), um composto utilizado na quimioterapia do cancro. Uma vez que as doses elevadas das infusões de metotrexato podem resultar em níveis circulantes de 45 000 ng/mL inicialmente e níveis da ordem dos 2 000 ng/mL quarenta e oito horas mais tarde, o kit *não* deve ser usado para a medição da concentração de ácido fólico em pacientes que estejam a tomar o fármaco. Além disso, deve ser tomado todo o cuidado ao interpretar-se os níveis de ácido fólico em pacientes que tenham sido recentemente submetidos a terapia com metotrexato ou qualquer outro medicamento com uma estrutura semelhante.

Hemólise: Serão obtidos resultados falsamente elevados dos níveis de ácido fólico no soro, dependentes do grau em

que a amostra está hemolizada, uma vez que esta vitamina está presente em eritrócitos a concentrações várias vezes superiores às do plasma. Os resultados da concentração de vitamina B12, por outro lado, conforme medidos pelo processo Solid Phase No Boil, não são afectados pela hemólise.

Lipemia: Recomenda-se o uso de um ultracentrifugador para clarear amostras lipémicas.

Amostras de pacientes com altas concentrações: Os espécimes de pacientes com concentrações de vitamina B12 ou ácido fólico superiores às do calibrador mais alto devem ser diluídas com o calibrador zero e reanalisadas. Concentrações excepcionalmente altas de vitamina B12 – até 20 000 pg/mL – podem ser encontradas num pequeno número de pacientes com leucemia mieloide crónica (*chronic myelogenous leukemia*) (CML).^{5,35} Uma vez que um vazamento de mesmo um microlitro de tal amostra poderia causar um aumento falso de 100 pg/ml no tubo de ensaio, deverão ser tomadas as precauções normais: testar as amostras em duplicado, mudar as pontas das pipetas entre testes de amostras e evitar o uso de minipipetas de deslocamento positivo.

Reparação de hemolisados: só requerido para as determinações de ácido fólico no sangue total, lisar as células em sangue total fresco heparinizado ou com EDTA, preparando uma diluição de 1:21 (bem homogenizada) em solução fresca de ácido ascórbico a 1%; por exp. misturar **100 µL** de amostra com **2,0 mL** desta solução e vortexar. É importante usar ácido ascórbico em vez de ascorbato de sódio e prepara a solução a 1%, fresca, diariamente.³³

O hemolisado pode ser ensaiado imediatamente; não é necessário incubação. Se não ensaiado imediatamente pode ser armazenado à temperatura ambiente (15-28°C) no escuro, até 90 minutos. Os hemolisados podem ser conservados a 2-8°C até 3 horas, ou congelados a -20°C durante 2 semanas.^{40,41} Proteger da luz. Ter em atenção que no processo de radioimunoensaio não se obterão valores significativos de Vitamina B12 nos glóbulos vermelhos ou sangue total dado

que a Vitamina B12 é destruída pelo ácido ascórbico.

Processo de radioimunoensaio

Todos os componentes devem estar à temperatura ambiente (15-28°C) antes de serem utilizados.

- 1 Rotular dezoito tubos de ensaio em duplicado: T (contagens totais), NSB (Ligação Não Específica) (*Non Specific Binder*), A (ligação máxima) e B a G. Rotular outros tubos de ensaio, também em duplicado, para os controlos e as amostras dos pacientes.

Vitamina B12

Calibrador	pg/mL Aproximada	pmol/L aproximada
A	0	0
B	50	37
C	100	74
D	300	221
E	600	443
F	1 200	885
G	2 400	1 771

Ácido fólico

Calibrador	ng/mL Aproximada	nmol/L aproximada
A	0	0
B	0,5	1,1
C	1	2,3
D	3	6,8
E	6	13,6
F	12	27,2
G	24	54,5

- 2 Acrescentar **200 µL** do calibrador regulado a zero A nos tubos de ensaio NSB e A, e **200 µL** dos restantes calibradores B até G nos tubos de ensaio rotulados com a letra correspondente. Deitar com uma pipeta **200 µL** de cada amostra de controlo, soro ou plasma e hemolizado nos tubos preparados. **Deixar cair as gotas directamente para o fundo dos tubos.**

As amostras de pacientes que se espera conter concentrações superiores ao calibrador mais elevado devem ser diluídas no calibrador regulado a zero antes do teste.

3 Preparação da Solução de Trabalho

Trabalho: Preparar a Solução de Trabalho no máximo 30 minutos antes de a utilizar. A quantidade de cada componente depende do número de tubos a serem ensaiados. Os volumes necessários, em *mililitros por tubo de ensaio*, estão tabulados abaixo. É preciso multiplicar estes volumes por um número ligeiramente superior do que o número de tubos a serem ensaiados. (Os componentes são fornecidos em quantidades suficientes para produzir a Solução de Trabalho com um excesso de aproximadamente 10%).

	Mililitros por tubo de ensaio
Ditiotreitol	0,05
Traçador	1,0

- 4 Acrescentar **1 000 µL** de Solução de Trabalho preparada de fresco em todos os tubos. Misturar no Vortex.

É recomendado um distribuidor de repetição para o volume de 1 000 µL adicionado, aqui e na etapa 8 abaixo. Reservar os tubos de ensaio T para as contagens (no passo 12); não é necessário processamento adicional.

- 5 Deixar incubar durante **30 minutos** à temperatura ambiente (15–28°C).

A incubação pode ser prolongada até 45 minutos à temperatura ambiente.

- 6 Adicionar **50 µL** de NaOH/KCN em todos os tubos de ensaio. Misturar no Vortex.

Usar de extremo cuidado ao manipular este reagente. É recomendado um distribuidor de repetição para a adição deste reagente. Os tubos devem apresentar-se agora azuis.

- 7 Deixar incubar durante **30 minutos a 37°C**.

A incubação deve ser prolongada até no máximo 45 minutos a 37°C.

(incubações mais prolongadas resultarão em volumes menores recolhidos de vitamina B12).

- 8 Adicionar **1 000 µL** de agente de ligação da Vitamina B12/Ácido fólico em todos os tubos de ensaio *excepto nos tubos NSB*. Nos tubos NSB, acrescentar **1 000 µL** de água destilada esterilizada. **Misturar vigorosamente no Vortex.**

Os tubos devem ser misturados no Vortex *individualmente* até aparecer um redemoinho em cada tubo. Verificou-se que os misturadores de múltiplas bandejas são inadequados.

O agente de ligação deve ser mantido *bem suspenso* enquanto estiver a ser distribuído: é recomendada a mistura num agitador magnético. Todos os tubos devem agora apresentar-se de cor púrpura, *excepto* os tubos de ensaio T e NSB. Pode ser deitada a quantidade de agente de ligação necessário para o ensaio num tubo de ensaio de vidro (não plástico) equipado com a barra agitadora, mas o restante deve ser conservado no frasco original, silanizado.

- 9 Deixar incubar durante **60 minutos** à temperatura ambiente (15–28°C).

- 10 Centrifugar durante **pelo menos 15 minutos** a 2000xg ou mais.

Graus de aceleração mais altos são aceitáveis, mas os tubos de vidro ou de polistireno podem partir-se a velocidades superiores. A centrifugação poderá ter que ser mais prolongada com centrifugadoras de tampo de mesa de baixa velocidade.

- 11 Decantar os supernadantes simultaneamente, usando uma bandeja, e reter os precipitados para contagem.

Uma decantação completa e uniforme, com remoção de toda a humidade visível, melhora grandemente a precisão. Com um tabuleiro de decantação de espuma decantar o conteúdo de todos os tubos de ensaio (*excepto* os tubos T) e deixá-los drenar invertidos durante 5 minutos. Em seguida dar umas batidas ligeiras nos tubos para remover todas as gotas residuais.

- 12 Contar o precipitado durante
1 minuto num contador gama.

Notar que o precipitado contém a
fracção ligada, não a livre.

Cálculo e controlo de qualidade

Amostras de soro: Para obter concentrações de vitamina B12 ou ácido fólico a partir de uma representação logit-log da curva de calibração, primeiro calcular em cada par de tubos de ensaio as contagens dos tubos NSB por minuto corrigidas:

Contagens reais = (Média CPM) minutos (Média NSB CPM)

A seguir, determinar a ligação de cada par de tubos de ensaio como percentagem de ligação máxima (MB), com as contagens corrigidas por NSB dos tubos A tidos como 100%:

Percentagem de Ligação = (Contagens reais / Contagens **MB** reais) × 100

O cálculo pode ser simplificado omitindo-se a correcção para a ligação não específica; as amostras que se situem dentro do intervalo dos calibradores produzem praticamente os mesmos resultados quando a Percentagem Ligada (*Percent Bound*) é calculada directamente a partir da Média da CPM.

Usando um papel milimétrico logit-log, representar a Percentagem de Ligação no eixo vertical (probabilidade) contra a Concentração no eixo horizontal (logarítmico) para cada um dos calibradores diferentes de zero, e representar uma linha recta em função da trajectória destes pontos. Resultados de amostras desconhecidas podem então ser lidos nessa recta por interpolação.

Redução dos valores: É uma boa prática construir um gráfico da curva de calibração com um verificador visual da adequação da transformação utilizada, mesmo nos casos em que o cálculo dos resultados é feito pelo computador. Ver Davis SE et al. Radioimmunoassay data processing with small programmable calculator. J Immunoassay 1980;1:15-25; e Dudley RA, et al. Guidelines for immunoassay data reduction. Clin Chem 1985;31:1264-71.

Hemolizados: Primeiro calcular o resultado *R* em nanogramas por mililitro de hemolizado, empregando a curva de calibração do ácido fólico. Em seguida, multiplicar pelo factor de diluição 21 para obter a concentração de ácido fólico no sangue total, em ng/ml. Para obter uma medida aproximada da concentração de glóbulos vermelhos, sempre em ng/ml, multiplicar a concentração de ácido fólico no sangue total por $100/H$, em sendo *H* o hematócrito *em percentagem*:

Ácido fólico nos glóbulos vermelhos ≈
 $21R \times (100 / H)$

Estritamente falando, a contribuição do ácido fólico no soro deveria ser subtraída da concentração do ácido fólico no sangue total antes de se multiplicar por $100/H$. Se for empregue o nível *S* de ácido fólico no soro do paciente, a equação exacta é:

Ácido fólico nos glóbulos vermelhos =
 $(21R - [S \times ((100 - H) / 100)]) \times (100 / H)$

O termo entre chavetas é, contudo, na maioria dos casos, tão pequeno em comparação com o termo $21R$ que pode ser justificadamente ignorado.

Controlos: Usar o controlo fornecido no kit, e registar os resultados dia após dia conforme descrito em Westgard JO, et al. A multi-rule chart for quality control. Clin Chem 1981;27:493-501. A repetição das amostras é mais um instrumento valioso para monitorizar a precisão dos inter-ensaios.

Parâmetros de controlo de qualidade: Recomendamos a monitorização das seguintes medidas relacionadas com o desempenho:

T = Contagens Totais (como contagens por minuto)

$\%NSB = 100 \times (\text{Média Contagens NSB} / \text{Contagens Totais})$

$\%MB = 100 \times (\text{Contagens reais} / \text{Contagens Totais})$

E os 20, 50 e 80 por cento "intercep", onde

20% = Concentração a 20 por cento de Ligação, etc.

Centrifugação: Usar as fórmulas abaixo para calcular o grau de aceleração da centrífugadora que estiver a ser utilizada a uma dada velocidade, ou a velocidade

(em rotações por minuto) necessária para atingir a força g desejada.

$\text{força g} = 28,38 \times (\text{rpm} / 1\,000)^2 \times \text{raio [em polegadas]}$

$\text{rpm} = 187,7 \times \sqrt{(\text{força g} / \text{raio [polegadas]})}$

ou

$\text{força g} = 11,18 \times (\text{rpm} / 1\,000)^2 \times \text{raio [em cm]}$

$\text{rpm} = 299,07 \times \sqrt{(\text{força g} / \text{raio [cm]})}$

Exemplos de Ciclos – Vitamina B12 /

Ácido fólico: Apenas para ilustração, não para calcular resultados de outro ensaio. Porque os valores dos calibradores são *específicos do lote*, as concentrações listadas na coluna mais à direita podem não corresponder aos valores dos calibradores fornecidos com o dispositivo fornecido na sua encomenda. (Ver as Tabelas "Exemplo de ciclo, Vitamina B12" e "Exemplo de ciclo, Ácido fólico").

Valores de Referência

Estudo dos intervalos de referência

Amostras de soro frescas de um total de cem indivíduos saudáveis foram testadas para determinação das concentrações de vitamina B12 e de ácido fólico com o kit de Contagem Dupla em Fase Sólida sem Ebulição (Solid Phase No Boil Dualcount) da DPC. O kit foi também utilizado para determinação das concentrações de ácido fólico nas amostras de sangue total de oitenta e oito indivíduos saudáveis. Os grupos de referência consistiram principalmente em pessoal de laboratório, tanto do sexo masculino como feminino, aparentando uma boa saúde. Em cada caso, o intervalo de referência foi determinado não parametricamente, como a região central, que compreendia 95% das observações. Os intervalos de referência relativos ao kit do processo de Contagem Dupla em Fase Sólida sem Ebulição (Solid Phase No Boil Dualcount) sugeridos por este estudo estão catalogados abaixo.

Vitamina B12 no soro:	200 – 950 pg/mL	150 – 700 pmol/L
Ácido fólico no soro:	3,0 – 17 ng/mL	7 – 39 nmol/L
Ácido fólico no sangue total:	80 – 320 ng/mL	180 – 725 nmol/L
Ácido fólico nos glóbulos vermelhos:	175 – 700 ng/mL	395 – 1 585 nmol/L

Os intervalos de referência do ácido fólico foram confirmados por estudos posteriores em dois locais, num total de 162 indivíduos. Notar que os resultados se aproximam do limite mais baixo dos resultados normais — por ex., os resultados do ácido fólico nos glóbulos vermelhos no intervalo de 100 a 200 ng/mL — devem ser interpretados com cuidado, à luz de outros dados clínicos e laboratoriais. Além disso, os resultados do ácido fólico no soro devem ser interpretados à luz das determinações de *glóbulos vermelhos*.

Os intervalos de referência catalogados acima foram obtidos nos Estados Unidos. Estudos realizados na Suécia e na Noruega sugerem intervalos de referência de 100–350 ng/mL e 130–350 ng/mL, respectivamente, de ácido fólico nos glóbulos vermelhos. Considerar estes limites *apenas como directrizes*. Cada laboratório deve estabelecer os seus próprios valores de referência.

Vitamina B12: Não há qualquer sobreposição entre o intervalo da Vitamina B12, 200–950 pg/mL relativo a indivíduos saudáveis e o intervalo absoluto encontrado nas amostras de deficiência de vitamina B12 confirmada. (Ver "Valores esperados: Traçado de discriminação comparativa" na secção de Tabelas e Gráficos). 200 pg/mL pode, assim, ser tomado como o limite inferior do valor normal; para os valores da vitamina B12 medidos com o kit do sistema Fase Sólida sem Ebulição (Solid Phase No Boil). Notar que nos valores inferiores a 200 pg/mL e superiores a 124 pg/mL — o valor mais elevado da Fase Sólida sem Ebulição (Solid Phase No Boil) observado nas amostras de deficiência em vitamina B12 — devem ser tratadas como subnormais estatisticamente; uma investigação

posterior poderá ser justificada em tais casos.

Causas comuns de níveis elevados de vitamina B12 em casos de insuficiência hepática, doença mieloproliferadora (com leucemia mielógena crónica como um caso especial) e o uso de suplementos multivitamínicos.

Amostras de deficiência em vitamina B12 confirmada

A DPC esteve mais de cem amostras de deficiência em vitamina B12 confirmadas como revelando deficiência em vitamina B12 por critérios clínicos e hematológicos independentes.¹⁴ Foram utilizados dois métodos de referência: um método microbiológico baseado no *Lactobacillus leichmannii* e no kit do processo de Contagem Dupla com Ebulição em Carvão (Charcoal Boil Dualcount) da DCP, um radioimunoensaio baseado na desnaturação térmica, na separação do carvão e no factor intrínseco purificado. Na maioria das amostras, mas não em todas, foram divulgados os valores da vitamina B12 registados com todos os três métodos de ensaio. Estes resultados clínicos estão representados num traçado de discriminação comparativa que mostra o intervalo de deficiência em vitamina B12 em relação a todos os três métodos lado a lado, e a extensão de sobreposição entre os valores normais e os deficientes relativos aos dois radioensaios. (Ver "Valores esperados: Traçado de discriminação comparativa" na secção de Tabelas e Gráficos).

Características do Ensaio

Ver em Tabelas e Gráficos os dados representativos do desempenho do kit do Contagem Dupla em Fase Sólida sem Ebulição (Solid Phase No Boil Dualcount). Os resultados da vitamina B12 são apresentados em pg/mL. Os resultados do ácido fólico são apresentados em ng/mL. Excepto nos casos referidos, todos os resultados foram gerados em soro ou em sangue total heparinizado.

Factor de conversão da vitamina B12:
pg/mL x 0,7378 → pmol/L

Factor de conversão do ácido fólico:
ng/mL x 2,266 → nmol/L

Intervalo de Calibração:

Vitamina B12:
aproximadamente 50 – 2 400 pg/mL
Os valores do calibrador são *específicos do lote*.

Ácido fólico:
aproximadamente 0,5 – 24 ng/mL.
Os valores do calibrador são *específicos do lote*.

Sensibilidade analítica:

Vitamina B12: 34 pg/mL.

Ácido fólico: 0,3 ng/mL.

Precisão inter-ensaios (no mesmo ciclo):

As estatísticas foram calculadas a partir das amostras dos resultados de vinte pares de tubos num único ensaio. (Ver as tabelas "Intraassay Precision").

Precisão inter-ensaios (ciclo a ciclo):

Foram calculadas as estatísticas dos resultados de pares de tubos em dezoito ensaios diferentes relativos a 14 amostras. (Ver as tabelas "Precisão inter-ensaios").

Precisão inter-ensaios cumulativa: As estatísticas relativas aos ensaios intercalados cumulativos foram geradas por nove controlos no decorrer de quatro meses. Para cada controlo, foi processado um par de tubos em cada um de aproximadamente 100 ensaios. As estatísticas mostram um determinado número de mudanças de lote e de medidas de referência de vários técnicos. (Ver as tabelas "Precisão inter-ensaios cumulativa")

Efeito fim-de-ciclo: Pares de tubos foram espaçados no decorrer de um ensaio em que foram usados mais de 350 tubos de ensaio. Com uma pipeta de repetição, a adição da proteína de ligação da Vitamina B12/Ácido fólico foi completada em oito minutos. Os resultados não indicam nenhum efeito de posição devido a retardamentos na adição de reagentes, mesmo nos ensaios desta extensão.

Especificidade

Pureza da proteína de ligação: Foram realizadas duas experiências para demonstrar a pureza da proteína de ligação do factor intrínseco (IF) empregue no radioensaio da Vitamina B12 com o sistema de Fase Sólida sem Ebulição (Solid Phase No Boil).

- A incubação de um dia para o outro da proteína de ligação da Vitamina B12/Ácido fólico com soro contendo anticorpos específicos para o factor intrínseco resultou na completa destruição da capacidade deste reagente de ligar a vitamina B12. Se a proteína R tivesse estado presente, teria retido pelo menos alguma da sua capacidade de ligar a vitamina B12.
- A substituição da proteína de ligação da Vitamina B12/Ácido fólico num sistema de radioensaio com desnaturação térmica e carvão revestido, e operando-se a um pH de teste de aproximadamente 2, de novo, produziu uma inactivação completa da proteína de ligação. Se tivesse contido a proteína R, teria retido pelo menos alguma da sua actividade nestas condições de acidez.

Reactividade cruzada: A especificidade do agente de ligação do factor intrínseco purificado foi avaliado testando-se uma preparação de cobinamida. Os resultados mostram que, mesmo em concentrações de 50 000 000 pg/mL, a cobinamida não causa praticamente nenhuma redução na ligação da vitamina B12, isto é, produz uma aparente concentração de vitamina B12 ao nível do limite de detecção; a reactividade cruzada com a cobinamida é, portanto, inferior a 0,0001%. (Ver a tabela "Especificidade 1").

Foi igualmente estudada a reacção cruzada entre o metotrexato (MTX), um fármaco antifolato, e o agente de ligação do folato empregue no ensaio do kit do sistema de Fase Sólida sem Ebulição (Solid Phase No Boil). A percentagem de reactividade cruzada, embora numericamente pequena, é clinicamente significativa, uma vez que o metotrexato é frequentemente administrado em doses extremamente altas. Do mesmo modo, as medições de ácido fólico são contraindicadas em pacientes que estejam a ser submetidos a terapia ou que foram submetidos a terapia recentemente, com este fármaco ou com qualquer outro folato estruturalmente relacionado. (Ver a tabela "Especificidade 2").

Linearidade: As amostras foram doseadas sob várias diluições. (Ver os dados representativos nas tabelas "Linearidade").

Recuperação: Foram produzidas seis soluções fortalecidas utilizando-se o calibrador regulado a zero como diluente. Foram produzidas três soluções (A, B e C) para representar 10 000, 20 000 e 30 000 pg/mL de vitamina B12. As outras três (D, E e F) foram produzidas para representar 60, 120 e 180 ng/mL de ácido fólico. Uma alíquota de 50 µL de cada solução foi acrescentada em 950 µL de alíquotas de seis amostras de pacientes, para uma relação de fortalecimento de 1-em-20, deixando a matriz da amostra relativamente intacta. Os valores obtidos representam apenas os valores da solução fortificante recuperada: a contribuição da amostra de soro foi subtraída. Os números em parênteses são as concentrações das amostras de soro originais não fortificadas (Ver as tabelas "Recuperação").

Efeito das proteínas: Para determinar os efeitos das variações no conteúdo das proteínas no processo Fase Sólida sem Ebulição (Solid Phase No Boil), duas amostras de soro de pacientes foram fortificadas com diversas quantidades de albumina de soro humano (*human serum albumin*) (HSA) e IgG humano normal. Todas as amostras, com e sem determinação de picos, foram processadas num único ensaio. Os resultados mostram que mesmo variações consideráveis no conteúdo das proteínas produzem apenas pequenas variações no resultado observado. Podemos concluir que não é produzido um efeito proteico clinicamente significativo com o sistema Contagem Dupla em Fase Sólida sem Ebulição (Solid Phase No Boil Dualcount).

Tipo de amostra alternativa: Foram recolhidas amostras de indivíduos saudáveis simultaneamente, em tubos de ensaio simples, heparinizados e com EDTA, que depois foram ensaiadas com o processo de Contagem Dupla em Fase Sólida sem Ebulição (Solid Phase No Boil Dualcount). Os resultados indicam que não se verifica nenhuma interferência significativa dos anticoagulantes testados. (Ver a tabela "Tipo de amostra alteranativa").

Tubos em branco de pacientes: Para verificar se o processo Contagem Dupla em Fase Sólida sem Ebulição (Solid Phase No Boil Dualcount) da DPC não sofre de problemas de ligação não

específicos do tipo descrito na literatura existente,^{6,24,27,35} foi realizado um ensaio que incluiu a curva de calibração, os calibradores em branco (agente de ligação omitido) e dois conjuntos de tubos em branco de pacientes. Num dos conjuntos de tubos em branco de pacientes, a Ligação de Fase Sólida foi simplesmente omitida no decorrer do ensaio. O outro conjunto foi testado substituindo o agente de ligação por um reagente de "Celulose em Branco": uma suspensão de partículas de celulose idênticas às do agente de Ligação de Fase Sólida, mas com a ausência do factor intrínseco purificado e da proteína de ligação do folato. (Para fins de avaliação do kit, o reagente de solução do tubo em branco pode ser obtido mediante pedido à DPC.)

Os resultados indicam que (a) a omissão do agente de ligação é uma alternativa adequada ao uso do reagente de celulose em branco, e (b) a ligação não específica é *uniformemente baixa* tanto para as amostras de pacientes como para os calibradores do sistema Contagem Dupla em Fase Sólida sem Ebulição (Solid Phase No Boil Dualcount). Por isso, um único conjunto de tubos NSB — tubos de calibrador regulado a zero com a ligação omitida— é suficiente para a determinação de rotina de uma ligação não específica. Na realidade, os tubos NSB podem ser inteiramente omitidos: os cálculos mostram que a correlação para a ligação não específica pode ser ignorada sem qualquer efeito significativo sobre os resultados das amostras dentro do intervalo dos calibradores. (Ver as tabelas "Tubos em brancos dos pacientes").

A etapa de desnaturação

Para testar a eficácia da etapa de desnaturação alcalina a 37°C no sistema de Contagem Dupla em Fase Sólida sem Ebulição (Solid Phase No Boil Dualcount), foram realizados estudos independentes com o kit em amostras de pacientes com leucemia mielógena crónica (*chronic myelogenous leukemia*) (CML) e outros distúrbios de mieloproliferação, e de pacientes com anemia perniciosa (*anemia perniciosa*) (AP) que tinham sido testados para detecção da presença de anticorpos bloqueadores anti-factor intrínseco.

Amostras CML: Numa experiência com o kit do sistema de Fase Sólida sem Ebulição (Solid Phase No Boil), foi utilizada a precipitação do carvão para avaliar a ligação não específica nos tubos em branco dos pacientes no final da segunda incubação. Os resultados mostraram praticamente uma precipitação completa do traçador em todos os tubos; o comportamento dos tubos em branco dos pacientes nesta experiência foi semelhante ao dos tubos em branco gerados com amostras saudáveis de pacientes da CML. (As duas amostras da CML apresentaram níveis de vitamina B12 I da ordem de 3 000 e 5 000 pg/mL). Esta experiência mostra que uma etapa de desnaturação alcalina a 37°C aplicada no sistema Fase Sólida sem Ebulição (Solid Phase No Boil) inactiva eficazmente, mesmo os altos níveis da proteína de ligação da vitamina B12 por vezes encontrados nos pacientes CML; isso porque se a proteína transportadora endógena tivesse escapado à desnaturação, ter-se-ia ligado ao traçador, fazendo com que uma quantidade significativa de radioactividade permanecesse no supernadante após a precipitação do carvão.

Amostras de AP: Os anticorpos bloqueadores específicos do factor intrínseco estão presentes em mais de metade de todos os pacientes com anemia perniciosa. Quatorze amostras de AP, sete das quais positivas quanto à presença de tais anticorpos, foram testadas tanto pelo sistema do kit em Fase Sólida sem Ebulição (Solid Phase No Boil) como pelo do kit de Contagem Dupla com Ebulição em Carvão (Charcoal Boil Dualcount).⁸ Os resultados mostram que a etapa de desnaturação alcalina a 37°C com o sistema do kit Solid Phase No Boil é tão eficaz como uma etapa de ebulição em anticorpos desnaturadores anti-factor intrínseco que, de outro modo, causariam resultados elevados falsos (falsos normais) em muitos casos de AP.

Como confirmação suplementar, quatro amostras de AP anticorpo-positivas e quatro anticorpo-negativas foram, cada uma delas sujeitas a um processo de desnaturação alcalina a 37°C do sistema do kit Fase Sólida Sem Ebulição e a um processo de controlo com a substituição da água pelo hidróxido de sódio.⁸ As

amostras anticorpo-positivas sujeitas ao processo de controlo mantiveram a sua capacidade de bloquear a actividade do factor intrínseco, enquanto que as amostras anticorpo-positivas sujeitas ao processo de desnaturação alcalina do kit não o fazem: o último apresentou um comportamento indistinto do das amostras anticorpo-negativas, indicando que a etapa de desnaturação sem ebulição ("no boil") inactivou eficazmente os anticorpos do anti-factor intrínseco presentes nas amostras positivas. Notar que, embora as experiências aqui relatadas tenham envolvido muitas amostras com graus de anticorpos extremamente elevados, não podem excluir a possibilidade de anticorpos numa amostra rara com um grau ainda mais elevado poder não ter sido inteiramente desnaturado pelo método "sem ebulição". Quando exista alguma dúvida, o resultado do processo "sem ebulição" pode ser confirmado retestando-se a amostra com o processo de "ebulição" alternativo.

Efeito do tempo de incubação sobre os hemolizados (Effect of Incubation Time on Hemolysates):

Foram recolhidas amostras de sangue de quatro indivíduos, em tubos de ensaio heparinizados e com EDTA. Os hemolizados foram preparados incubando-se alíquotas de cada amostra com a solução de ácido ascórbico a 1% durante períodos de duração gradualmente mais longos (de 0 a 90 minutos no escuro, à temperatura ambiente (15–28°C), antes do ensaio. A tabela não mostra quaisquer diferenças significativas nos resultados de ácido fólico nos glóbulos vermelhos em períodos de lise de zero a 90 minutos. Do mesmo modo, os hemolizados podem ser testados imediatamente a seguir à etapa de diluição do ácido ascórbico. A tabela mostra também que os resultados não são influenciados pela escolha do anticoagulante: pode ser usado sangue total heparinizado ou com EDTA. (Ver a tabela com o título "Efeito do tempo de incubação nos hemolizados".)

Comparação de métodos para a concentração da vitamina B12: O ensaio foi comparado ao ensaio de concentração da Vitamina B12 IMMULITE da DCP com amostras de soro de 98 pacientes. (Gama de concentração: aproximadamente 128 a 1 037 pg/mL. Ver

o gráfico "Comparação de métodos").
Regressão linear:

(SPNB) = 0,98 (IML) – 5,3 pg/mL
r = 0,982

Médias:

371 pg/mL (Solid Phase No Boil)
385 pg/mL (IMMULITE – LKVB)

Comparação de Métodos para o ácido fólico: O ensaio foi comparado ao ensaio de concentração de ácido fólico IMMULITE da DCP em amostras de soro de 71 pacientes. (Gama de concentração: aproximadamente 1,4 a 20 ng/mL. Ver o gráfico "Comparação de métodos")
Regressão linear:

(SPNB) = 0,92 (IML) + 0,71 ng/mL
r = 0,985

Médias:

6,2 ng/mL (Solid Phase No Boil)
5,9 ng/mL (IMMULITE – LKFO)

Assistência Técnica

Por favor contacte o seu Distribuidor Nacional.

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



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

2005-09-21

PIKDSP – 5



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