

IMMULITE®

Folic Acid

For use on the IMMULITE®
and IMMULITE® 1000 systems

DPC®

IMMULITE®/IMMULITE® 1000 Folic Acid

English

Intended Use: For *in vitro* diagnostic use with the IMMULITE and IMMULITE 1000 Analyzers — for the quantitative measurement of folic acid in serum, heparinized plasma or ascorbic acid-treated whole blood, as an aid in clinical diagnosis and treatment of anemia.

Catalog Number: **LKFO1** (100 tests), **LKFO5** (500 tests)

Test Code: **FOL** Color: **Orange**

CDC Analyte Identifier Code: 1907
CDC Test System Identifier Code: 10159
CLIA Complexity Category: High

Summary and Explanation

Folic acid (folate) and vitamin B₁₂ are nutrients essential to hematopoiesis.¹ Megaloblastic anemia is almost always due to lack of one of these two vitamins.¹ Circulating folate levels are usually normal or elevated in vitamin B₁₂ deficiency, but red cell folate levels are frequently low in this condition.²

Folate deficiency is commonly encountered as a result of dietary deficiency (as in alcoholism) or increased demand for this vitamin (as in pregnancy).^{1,3} Unlike vitamin B₁₂, folate is a heat-labile vitamin susceptible to loss by prolonged cooking. Accordingly, the prevalence of folate deficiency exhibits major demographic variations, apparently reflecting differences in dietary and culinary habits.⁴

Circulating folate levels, being strongly influenced by recent intake, are unreliable as an index to tissue stores.^{2,5,6} Thus, folate levels measured in serum or plasma may be normal in the face of folate deficiency. Conversely, circulating levels may be low long before tissue stores have been exhausted.^{2,6} Accordingly, it is important to measure red cell folate levels whenever serum or plasma levels are measured.^{5,7,8}

Principle of the Procedure

Competitive Immunoassay.

IMMULITE Folic Acid is a boil, competitive, liquid-phase, ligand-labeled, protein binding chemiluminescent assay with *in situ* immobilization, and with an anti-ligand detection system. The solid phase, a polystyrene bead enclosed within an IMMULITE Test Unit, is coated with a murine monoclonal antibody specific for folic acid binding protein.

After the sample preparation procedure, the patient sample, ligand-labeled folic acid analog and folic acid binding protein are simultaneously introduced into the Test Unit, and incubated for approximately 30 minutes at 37°C with intermittent agitation. During this time, folic acid in the sample competes with the ligand-labeled folic acid analog for a limited amount of folic acid binding protein, and the folic acid binding protein is captured by the antibody on the bead. (Unbound analog is then removed by a centrifugal wash.)

Incubation Cycles: 2 × 30 minutes.

Specimen Collection

Patient must be in a fasting state.¹⁰

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.

EDTA plasma should not be used as a sample type.

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

Hemolyzed serum samples are inappropriate for analysis.

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

anticoagulant therapy, may require increased clotting time.

Blood collection tubes from different manufacturers may yield differing values, depending on materials and additives, including gel or physical barriers, clot activators and/or anticoagulants. IMMULITE/IMMULITE 1000 Folic Acid has not been tested with all possible variations of tube types. Consult the section on Alternate Sample Types for details on tubes that have been tested.

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

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.¹³ Thaw only once (at ambient temperature). Avoid excessive exposure of samples to direct light.

Warnings and Precautions

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

For *in vitro* diagnostic use.

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

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

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

Chloramphenicol, at concentrations less than 0.1 g/dL has been added as a

preservative. Chloramphenicol is known to cause cancer; this disclosure is required by the state of California.

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

Water: Use distilled or deionized water.

Materials Supplied

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

Folic Acid Test Units (LFO1)

Each barcode-labeled unit contains one bead coated with murine monoclonal anti-folic acid binding protein antibody. Stable at 2–8°C until expiration date.

LKFO1: 100 units. **LKFO5:** 500 units.

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

Folic Acid Reagent Wedges (LFOA, LFOB)

With barcodes. **LFOA:** one wedge (7.5 mL) containing folic acid binding protein, with preservative. **LFOB:** one wedge (7.5 mL) containing alkaline phosphatase (bovine calf intestine) conjugated to anti-ligand in buffer, with preservative. Store capped and refrigerated: stable at 2–8°C until expiration date. Recommended usage is within 30 days after opening when stored as indicated.

LKFO1: 1 set. **LKFO5:** 5 sets.

Folic Acid Adjustors (LFOL, LFOH)

Two vials (Low and High) of lyophilized folic acid in a human protein-based matrix, with preservative. Reconstitute each vial with **3.0 mL** distilled or deionized water. Let stand for 30 minutes. Mix by gentle swirling or inversion until the lyophilized material is fully dissolved. Stable at 2–8°C for 30 days after reconstitution, or for 6 months (aliquotted) at -20°C.

LKFO1: 1 set. **LKFO5:** 2 sets.

Note: The Adjustors need to be boiled like patient samples (see Sample Pretreatment section).

Ligand-Labeled Folate (LLLF)
5 mL of ligand-labeled folate in buffered human protein-based solution, with preservative. Store refrigerated: stable at 2–8°C for 30 days after opening.
LKFO1: 1 vial **LKFO5:** 5 vials

Borate-KCN Buffer Solution (LBCN)
125 mL of Borate-KCN Buffer Solution, with preservative. Store refrigerated: stable at 2–8°C for 30 days after opening.

Caution! Contains cyanide. *Extreme care must be taken to avoid all bodily contact with this reagent.*
LKFO1: 1 vial **LKFO5:** 5 vials

Dithiothreitol Solution (LDTT)
3 mL of dithiothreitol solution. Store refrigerated: stable at 2–8°C for 30 days after opening.
LKFO1: 1 vial **LKFO5:** 5 vials

Kit Components Supplied Separately

Folic Acid Sample Diluent (LFOZ)
For the manual dilution of patient samples. 25 mL of human protein-based matrix. Stable at 2–8°C for 30 days after opening, or for 6 months (aliquotted) at –20°C.

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.)

LSUBX: Chemiluminescent Substrate
LPWS2: Probe Wash Module
LKPM : Probe Cleaning Kit
LCHx-y: Sample Cup Holders (barcoded)
LSCP: Sample Cups (disposable)
LSCC: Sample Cup Caps (optional)

CON6: Tri-level, multi-constituent control

Also Required

Plain 12×75 mm polypropylene tubes, with loose-fitting caps — available from DPC.

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

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

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

Covered boiling waterbath (100°C).

Sample transfer pipets, distilled or deionized water, controls.

Preparation of Hemolysates

This is required only for folic acid determinations on whole blood. Collect the sample; determine and record the hematocrit. Lyse the cells in freshly obtained EDTA or heparinized 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 mL of this solution. Vortex and let stand for 90 minutes at room temperature (15–28°C) in the dark.¹⁰ Hemolysates may be stored at 2–8°C for up to 3 hours, or frozen at –20°C for 2 weeks.^{10,11} It is important to use ascorbic acid, rather than sodium ascorbate, and to prepare the 1% solution fresh, on a daily basis.⁹

Preparation of Working Solution

Note: *Samples being tested for both vitamin B12 and folic acid should be pretreated with the Working Solution described below.*

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

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

Important: The Working Solution should be prepared on a daily basis. If not used immediately, it should be refrigerated at 2–8°C for a period of not more than 24 hours.

Sample Pretreatment

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

For patient samples expected to have folic acid levels greater than the upper limit of the assay's calibration range, dilute the serum, plasma, or hemolysate with Folic Acid Sample Diluent.
2. Add **1,000 µL** of the Working Solution to all tubes. Vortex.
3. Loosely cap all tubes and place them in a covered, boiling waterbath (100°C) for **15 – 20 minutes**.
4. Remove the tubes from the boiling waterbath, and cool them in an ambient waterbath for **5 minutes**.
5. Pipet at least **350 µL** of the treated sample to an IMMULITE Sample Cup.

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

Assay Procedure

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

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

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

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

After Sample Pretreatment, process the *treated* sample according to the usual assay procedure. (Sample cup must contain at least 250 µL more than the total volume required.)

Each Sample cup holder containing pretreated sample can be followed by up to *four* test units.

Recommended Adjustment Interval:
2 weeks.

Quality Control Samples: Use controls or sample pools with at least two levels (low and high) of folic Acid.

Calculations

Whole Blood and Red Cell Results

First calculate the result *R* in nanograms per milliliter of hemolysate. 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.

Expected Values

Because folic acid levels are strongly influenced by diet and dietary supplementation, population-based reference limits can show marked demographic differences. In the United States, for example, fortification of enriched grain products, as required by the Food and Drug Administration since 1996, has led to an estimated doubling of the mean plasma folate level among subjects not using vitamin supplements,¹⁴ and a decrease in the prevalence of low folate levels, i.e. levels below 3 ng/mL (7 nmol/L).¹⁴ Fortification programs can be expected to have a similar impact on whole blood and red cell folate levels, which are better measures of tissue stores.

Based on its relationship to DPC's Solid Phase No Boil Dualcount (see Method Comparison), the assay can be expected to have the following reference limits. Note: the Dualcount normal range study was performed in the US prior to the FDA fortification requirements.

Serum Folic Acid	3 – 17 ng/mL (6 – 39 nmol/L)
Whole Blood Folic Acid	43 – 295 ng/mL (97 – 668 nmol/L)
Red Cell Folic Acid	93 – 641 ng/mL (212 – 1,453 nmol/L)

Studies using DPC's Solid Phase No Boil assay were conducted on 100 healthy individuals for serum folic acid and on 88 healthy individuals for red cell folic acid. The groups consisted of primarily laboratory personnel, both men and women, in apparent good health. The study was conducted in the United States.

Each laboratory should establish its own reference ranges.

Limitations

The folate binding protein employed in the Reagent Wedge crossreacts to some extent with the "anti-folate" drug methotrexate (MTX), a compound used in the chemotherapy of cancer. (See Specificity section.) 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 48 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.

Folic acid results near the lower limit of normal should be interpreted with caution.¹⁰

Heterophilic antibodies in human serum can react with the immunoglobulins included in the assay components causing interference with *in vitro* immunoassays. [See Boscato LM, Stuart MC. Heterophilic antibodies: a problem for all immunoassays. Clin Chem 1988;34:27-33.] Samples from patients routinely exposed to animals or animal serum

products can demonstrate this type of interference potentially causing an anomalous result. These reagents have been formulated to minimize the risk of interference; however, potential interactions between rare sera and test components can occur. For diagnostic purposes, the results obtained from this assay should always be used in combination with the clinical examination, patient medical history, and other findings.

Performance Data

See Tables and Graphs for data *representative* of the assay's performance. Results are expressed in ng/mL. To convert from ng/mL to S.I. units, nanomoles per liter (nmol/L), multiply by 2.266:

Conversion Factor:
ng/mL × 2.266 → nmol/L

Calibration Range: 0.5 – 24 ng/mL
(1.1 – 54 nmol/L).

Analytical Sensitivity: 0.3 ng/mL
(0.7 nmol/L).

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

Interassay Precision (Run-to-Run):
Statistics were calculated for samples assayed in 20 different runs. (See "Interassay Precision" table.)

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

Recovery: Samples spiked 1 to 19 with three folic acid solutions (42, 137 and 211 ng/mL) were assayed. (See "Recovery" table for representative data.)

Specificity: The binding protein used in the IMMULITE Folic Acid procedure is highly specific for folic acid, with low crossreactivity to substances, other than methotrexate, which may be present in patient samples.

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

Alternate Sample Type: Samples collected from 19 individuals (into plain and heparinized vacutainer tubes) were

assayed by the IMMULITE Folic Acid procedure.

(Heparin) = 0.98 (Serum) + 0.26 ng/mL
 $r = 0.99$

Means:
6.8 ng/mL (Serum)
7.0 ng/mL (Heparin)

Because the anticoagulant EDTA has a significant effect on results, EDTA plasma should not be used in the assay as an alternative to serum or heparinized plasma.

EDTA whole blood may be used for the determination of whole blood and red cell folic acid.

Method Comparison (Serum Samples):

The IMMULITE Folic Acid procedure was compared to DPC's Dualcount[®] Solid Phase No Boil (SPNB) assay on 71 patient serum samples. (Concentration range: approximately 1.4 to 20.3 ng/mL. See graph.) By linear regression:

(IML) = 1.05 (SPNB) – 0.57 ng/mL
 $r = 0.985$

Means:
5.9 ng/mL (IMMULITE)
6.2 ng/mL (SPNB)

Method Comparison (Hemolysates):

The IMMULITE Folic Acid procedure was compared to DPC's Dualcount[®] Solid Phase No Boil assay on 45 patient hemolysates. (Concentration range: approximately 156 to 973 ng/mL. See graph.) By linear regression:

(IML) = 1.05 (SPNB) – 41 ng/mL
 $r = 0.985$

Means:
345 ng/mL (IMMULITE)
369 ng/mL (SPNB)

References

1) Herbert V. The nutritional anemias. *Hosp Pract* 1980 Mar;15(3):65-83,87-9. 2) Lindenbaum J. Status of laboratory testing in the diagnosis of megaloblastic anemia. *Blood* 1983;61:624-7. 3) Colman N. The radioisotopic investigation of anemia. *Ligand Quarterly* 1981 Fall;4(3):24-30. 4) Grasbeck R. Biochemistry and clinical chemistry of vitamin B12 transport and the related diseases. *Clin Biochem* 1984;17:99-107. 5) Cooper BA. Folic Acid: its metabolism and utilization. *Clin Biochem* 1984;17:95-8. 6) McNeely MDD. Folic Acid assay. In: Kaplan LA, Pesce AJ, editors. *Clinical Chemistry*. St. Louis: CV Mosby, 1984: 1402-6. 7) Allen RH. Clinical role and current status of serum cobalamin (vitamin B12) assays. *Ligand*

Quarterly 1981 Fall;4(3):37-44,67. 8) Chen I-W, et al. B12. In: Kaplan LA, Pesce AJ, editors. *Clinical Chemistry*. St. Louis: CV Mosby, 1984: 1396-1400. 9) 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. 10) Burtis CA, Ashwood ER, editors. *Tietz textbook of clinical chemistry*. 2nd ed. Philadelphia: WB Saunders, 1994:2056. 11) 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. 12) National Committee for Clinical Laboratory Standards, Procedures for the collection of diagnostic blood specimens by venipuncture, 4th ed, NCCLS Document H3-A4, 1998. 13) Tietz NW, editor. *Clinical guide to laboratory tests*. 3rd ed. Philadelphia: WB Saunders, 1995:246. 14) Jacques PF, Selhub J, Bostom AG, et al. The effect of folic acid fortification on plasma folate and total homocysteine concentrations. *New Engl J Med* 1999;340:1449-54.

Technical Assistance

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

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

Tables and Graphs

Intraassay Precision (ng/mL)

	Mean ¹	SD ²	CV ³
1	2.1	0.19	9.0%
2	5.2	0.22	4.2%
3	13	0.67	5.2%

Interassay Precision (ng/mL)

	Mean ¹	SD ²	CV ³
1	1.8	0.16	8.9%
2	5.3	0.21	4.0%
3	13	0.96	7.4%

Linearity (ng/mL)

	Dilution ¹	Observed ²	Expected ³	%O/E ⁴
1	8 in 8 ⁵	12	—	—
	4 in 8	5.8	6.2	94%
	2 in 8	2.9	3.1	94%
	1 in 8	1.5	1.6	94%
2	8 in 8	17	—	—
	4 in 8	8.0	8.6	93%
	2 in 8	3.9	4.3	91%
	1 in 8	2.1	2.1	100%
3	8 in 8	14	—	—
	4 in 8	7.5	7.1	106%
	2 in 8	3.8	3.5	109%
	1 in 8	2.0	1.8	111%

Recovery (ng/mL)

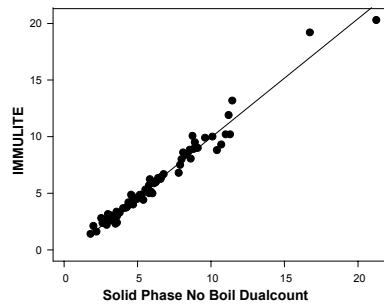
	Spiking Solution ¹	Observed ²	Expected ³	%O/E ⁴
1	—	3.8	—	—
	A	6.2	5.7	109%
	B	9.6	10	96%
	C	16	14	114%
2	—	6.3	—	—
	A	9.3	8.1	115%
	B	13	13	100%
	C	17	17	100%
3	—	10	—	—
	A	12	12	100%
	B	19	16	119%
	C	23	20	115%

Specificity

Compound ¹	ng/mL Added ²	Apparent ng/mL ³	% Cross-reactivity ⁴
Methotrexate	100	3.4	3.4%

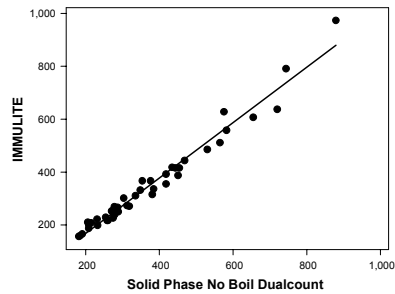
ND: not detectable.⁵

Method Comparison (Serum Samples)



(IML) = 1.05 (SPNB) – 0.57 ng/mL
r = 0.985

Method Comparison (Hemolysates)



(IML) = 1.05 (SPNB) – 41 ng/mL
r = 0.985

Deutsch. Intraassay Precision: ¹Mittelwert, ²S (Standardabweichung), ³CV (Variationskoeffizient). **Interassay Precision:** ¹Mittelwert, ²S (Standardabweichung), ³CV (Variationskoeffizient). **Linearity:** ¹Verdünnung, ²Beobachtet (B), ³Erwartet (E), ⁴% B/E, ⁵8 in 8. **Recovery:** ¹Probe, ²Beobachtet (B), ³Erwartet (E), ⁴% B/E. **Specificity:** ¹Verbindung, ²zugesetzte Menge, ³Ausgewiesene Konzentration, ⁴% Kreuzreaktivität, ⁵NN: Nicht nachweisbar. **Method Comparison:** Folic Acid: Folsäure.

Español. Intraassay Precision: ¹Media, ²DS, ³CV. **Interassay Precision:** ¹Media, ²DS, ³CV. **Linearity:** ¹Dilución, ²Observado (O), ³Esperado (E), ⁴%O/E, ⁵8 en 8. **Recovery:** ¹Solución, ²Observado (O), ³Esperado (E), ⁴%O/E. **Specificity:** ¹Compuesto, ²Cantidad añadida, ³Concentración aparente, ⁴% Reacción cruzada, ⁵ND: no detectable. **Method Comparison:** Folic Acid: Acido Fólico.

Français. Intraassay Precision: ¹Moyenne, ²SD, ³CV. **Interassay Precision:** ¹Moyenne,

²SD, ³CV. **Linearity:** ¹Dilution, ²Observé (O), ³Attenué (A), ⁴%O/A, ⁵8 dans 8. **Recovery:** ¹Solution, ²Observé (O), ³Attenué (A), ⁴%O/A. **Specificity:** ¹Composé, ²ajouté, ³Concentration apparente, ⁴Réaction croisée%. ⁵ND: non détectable. **Method Comparison:** Folic Acid: Acide Folique.

Italiano. Intraassay Precision: ¹Media, ²SD (Deviazione Standard), ³CV (Coefficiente di Variazione). **Interassay Precision:** ¹Media, ²SD (Deviazione Standard), ³CV (Coefficiente di Variazione). **Linearity:** ¹Diluizione, ²Osservato (O), ³Atteso (A), ⁴%O/A, ⁵8 in 8. **Recovery:** ¹Soluzione, ²Osservato (O), ³Atteso (A), ⁴%O/A. **Specificity:** ¹Composto, ²quantità aggiunta, ³Concentrazione apparente, ⁴Percentuale di Crossreattività, ⁵ND: non determinabile. **Method Comparison:** Folic Acid: Acido Folico.

Português. Intraassay Precision: ¹Média, ²Desvio padrão, ³Coefficiente de variação. **Interassay Precision:** ¹Média, ²Desvio padrão, ³Coefficiente de variação. **Linearity:** ¹Diluição, ²Observado (O), ³Esperado (E), ⁴%O/E, ⁵8 em 8. **Recovery:** ¹Solução, ²Observado (O), ³Esperado (E), ⁴%O/E. **Specificity:** ¹Composto, ²Quantidade adicionada, ³Apparent Concentration, ⁴Percentagem de reacção cruzada, ⁵ND: não detectável. **Method Comparison:** Folic Acid: Ácido Fólico.

Deutsch

Folsäure IMMULITE

Anwendung: Zur in vitro Diagnostik unter Verwendung des IMMULITE und IMMULITE 1000 Systems - zur quantitativen Bestimmung von Folsäure im Serum, Heparin-Plasma oder Vollblut, als Hilfestellung zur klinischen Diagnose und Therapie von Anämien.

Artikelnummern: **LKFO1** (100 tests), **LKFO5** (500 tests)

Testcode: **FOL** Farbe: **orange**

Klinische Relevanz

Folsäure und Vitamin B12 sind essentielle Faktoren der Hämatopoese.¹ Eine megaloblastäre Anämie ist in fast allen Fällen auf den Mangel eines dieser beiden Vitamine zurückzuführen. Dabei sind bei Vitamin B12-Mangel die zirkulierenden Serumspiegel der Folsäure meist normal oder erhöht, wogegen die Erythrozyten-Folsäure meist erniedrigte Spiegel zeigt.²

Folsäuremangel kann als Ergebnis eines diätetischen Mangels (z.B. Alkoholismus)

oder durch einen erhöhten Bedarf dieses Vitamins (z.B. Schwangerschaft) auftreten.^{1,3} Im Gegensatz zum Vitamin B12 ist Folsäure ein hitze-labiles Vitamin, das bei der Nahrungszubereitung durch zu langes Kochen zerstört wird. Dementsprechend unterliegt die Prävalenz eines Folsäure-Mangels im wesentlichen demographischen und ernährungsbedingten Einflüssen.⁴

Da die zirkulierenden Folsäurespiegel von der aktuellen Zufuhr dieses Vitamins abhängig sind, sind sie als Index für die Gewebespeicher ungeeignet.^{2,5,6} Daher können die Folsäurespiegel im Serum oder Plasma bei Folsäuremangel normal sein. Umgekehrt können die zirkulierenden Folsäurespiegel schon lange erniedrigt sein, bevor die Speicher erschöpft sind.^{2,6} Daher ist es wichtig, immer gemeinsam mit den Folsäure-Spiegeln im Serum oder Plasma die Erythrozyten-Folsäure zu messen.^{5,7,8}

Methodik

Kompetitiver Immunoassay.

Der Folsäure IMMULITE Test ist ein Ligand-markierter, kompetitiver Protein-Bindungs-Chemilumineszenz-Immunoassay mit in situ Immobilisation und einem Antiligand-Detektionssystem. Als Festphase wird eine mit spezifischen monoklonalen anti-Folsäure-Bindungsprotein-Antikörpern (Maus) beschichtete Polystyrol-Kugel verwendet, welche Bestandteil des IMMULITE Testeinheits ist.

Nach der Probenvorbereitung werden die Patientenprobe, das ligandenmarkierte Folsäure-Analogon und das Folsäure-bindende Protein gleichzeitig in das Testeinheit hinzugefügt und inkubieren für ca. 30 Minuten bei 37°C, wobei sie periodisch durchmischt werden. Während dieser Zeit konkurriert die Folsäure aus den Proben mit dem ligandmarkierten Folsäure-Analogon um eine begrenzte Anzahl an Bindungsstellen am Folsäure-Bindungsprotein. Das Folsäure-Bindungsprotein wird durch den Antikörper auf der Festphase gebunden. (Ungebundene Komponenten werden anschließend mittels einer speziellen Zentrifugal-Waschtechnik entfernt).

Inkubationszyklen: 2 × 30 Minuten.

Probengewinnung

Der Patient muss nüchtern sein.¹⁰

Für die Bestimmung der Folsäure im Vollblut oder in den Erythrozyten frisches Heparin- oder EDTA-Vollblut verwenden. Der Hämatokrit der Patienten muss bekannt sein, um die Ergebnisse der Vollblut-Folsäure in Erythrozyten-Werte umzurechnen, die dann in Nanogramm pro Milliliter (ng/ml) Erythrozytenkonzentrat dargestellt werden. Um die Erythrozyten-Folsäure genau zu berechnen zu können, muss der Folsäure-Spiegel im Serum bekannt sein.

EDTA-Plasma ist als Probenart nicht geeignet.

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

Die Verwendung von hämolysierten Serumproben ist nicht empfehlenswert.

Die Zentrifugation der Serumproben vor dem völligen Abschluss der Gerinnung kann zu Fibringerinnseln führen. Um fehlerhaften Analyseergebnissen infolge von Gerinnseln vorzubeugen, ist sicherzustellen, dass die Gerinnung vor der Zentrifugation der Proben vollständig abgeschlossen ist. Insbesondere Proben von Patienten unter Antikoagulantien-therapie können eine verlängerte Gerinnungszeit aufweisen.

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

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

Erforderliche Menge: 200 µl Probe - Serum, Plasma oder Hämolyat - wird für die Probenvorbehandlung benötigt. Für eine Einfachbestimmung werden 100 µl der *vorbehandelten* Probe eingesetzt. Das Probenröhrchen muss aber mindestens 250 µl mehr an vorbehandelter Probe enthalten als für die entsprechende Anzahl an Bestimmungen selbst benötigt wird, da

ein bestimmtes Überschussvolumen für die Folsäure-Bestimmungen gebraucht wird.

Lagerung und Stabilität:

Serum oder Heparin-Plasma: Die Proben können maximal 8 Stunden bei 2–8°C (Kühlschrank) aufbewahrt werden. Für eine längere Aufbewahrung (6–8 Wochen) sollten die Proben aliquotiert und bei –20°C tiefgefroren werden.¹³ Es ist nur ein einmaliges Einfrieren und Auftauen möglich. Folsäure ist stark lichtempfindlich, daher ist eine direkte Einwirkung von Licht auf die Proben zu vermeiden.

Hinweise und Vorsichtsmaßnahmen

der Borat-KCN-Pufferlösung ist Zyanid enthalten. Es ist äußerste Vorsicht geboten, dass jeder körperliche Kontakt mit diesem Reagenz vermieden wird.

Zur *In-vitro*-Diagnostik.

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

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

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

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

Chemilumineszenz-Substrat:

Kontamination und direkte Sonneneinstrahlung vermeiden. Siehe Packungsbeilage.

Wasser: Destilliertes oder deionisiertes Wasser verwenden.

Im Lieferumfang enthalten

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

Folsäure Testeinheiten (LFO1)

Jede mit Barcode-Etikette versehene Einheit enthält eine mit monoklonalem, gegen folsäurebindendes Protein gerichtetem Mausantikörper beschichtete Kugel. Bei 2–8°C bis zum Verfallsdatum haltbar.

LKFO1: 100 Testeinheiten.

LKFO5: 500 Testeinheiten.

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

Folsäure Reagenzbehälter (LFOA, LFOB)

Mit Barcode. **LFOA:** ein Behälter (7,5 ml) folsäurebindendes Protein, mit Konservierungsmittel. **LFOB:** ein Behälter (7,5 ml) mit alkalischer Phosphatase (Rinderkalbsdarm) konjugiertes Anti-Ligand in Pufferlösung (mit Konservierungsmittel). Verschluss und gekühlt aufbewahren: Bei 2–8°C bis zum Verfallsdatum haltbar. Bei entsprechender Lagerung beträgt die empfohlene Verbrauchsfrist nach dem Öffnen 30 Tage. **LKFO1:** 1 Set. **LKFO5:** 5 Sets.

Folsäure Kalibratoren (LFOL, LFOH)

Zwei Fläschchen (niedrig und hoch) mit lyophilisierter Folsäure in einer Human proteinbasierten Matrix (mit Konservierungsmittel). Fläschchen mit je **3,0 ml** destilliertem oder deionisiertem Wasser rekonstituieren. 30 min. stehen lassen. Zum Mischen leicht schwenken oder umdrehen, bis das lyophilisierte Material vollständig aufgelöst ist. Nach Rekonstituierung 30 Tage bei 2–8°C, sonst 6 Monate (portioniert) bei –20 °C haltbar.

LKFO1: 1 Set. **LKFO5:** 2 Sets.

Hinweis: Die Kalibratoren müssen wie die Patientenproben vorbehandelt werden. (Siehe Kapitel "Probenvorbehandlung").

Ligand-markierte Folsäure (LLLF)

5 ml Ligand-markierte Folsäure in einer gepufferten humanen Protein-Lösung, (mit Konservierungsmittel). 30 Tage nach dem Öffnen bei 2–8°C haltbar.

LKFO1: 1 Fläschchen

LKFO5: 5 Fläschchen

Borat/KCN-Puffer (LBCN)

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

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

LKFO1: 1 Fläschchen

LKFO5: 5 Fläschchen

Dithiothreitol-Lösung (LDTT)

3 ml Dithiothreitol-Lösung. Gekühlt bei 2–8°C lagern: Nach dem Öffnen 30 Tage haltbar.

LKFO1: 1 Fläschchen

LKFO5: 5 Fläschchen

Separat erhältliche Testsystem-Komponenten

Folsäure Probenverdünner (LFOZ)

Zum manuellen Verdünnen der Patientenproben. Enthält 25 ml einer humanen Protein-Matrix. 30 Tage nach dem Öffnen bei 2–8°C haltbar oder 6 Monate bei –20°C (portioniert).

Ascorbinsäure

Nur für Folsäure-Bestimmungen im Vollblut erforderlich. Die benötigte 1%-ige Ascorbinsäure-Lösung muss vor Gebrauch täglich frisch hergestellt werden. Die dazu verwendete Ascorbinsäure muss frei von Feuchtigkeit sein, Natriumascorbat kann nicht verwendet werden.

LSUBX: Chemilumineszenz-Substrat

LPWS2: Pipettenwaschlösung

LKPM: Pipettenreinigungsset

LCHx-y: Halterungen für die Probenröhrchen (mit Barcodierung)

LSCP: Probenröhrchen (Einwegartikel)

LSCC: Verschlüsse für die Probenröhrchen (optional)

CON6: Multikomponentenkontrolle in drei Konzentrationen.

Ebenfalls benötigt werden:

Einfache Polypropylen-Röhrchen (12×75 mm) mit losen Verschlüssen – können von DPC bestellt werden.

Mikropipetten: 200 und 1000 µl. Für das Zupipettieren von 1,0 ml Reagens eignet sich eine automatische Dispensor-Pipette vom Typ Nichiryo.

Plastikbehälter mit Deckel (zum Vorbereiten der Arbeitslösung).

Alufolie oder anderer Lichtschutz für die Hämolysate.

Geschlossenes kochendes Wasserbad (100°C).

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

Vorbereitung der Hämolysate

Nur für die Folsäure-Bestimmungen im Vollblut erforderlich. Vollblut entnehmen und Hämatokrit bestimmen. Die Zellen des frischen EDTA- oder Heparin-Vollbluts durch Herstellung einer 1 in 21 Verdünnung der suspendierten Probe mit einer frischen 1%igen Ascorbinsäure-Lösung lysieren. Z.B. durch Mischen von 100 µl Probe mit 2 ml dieser Lösung. Gut mischen und 90 Minuten bei Raumtemperatur (15–28°C) an einem dunklen Ort stehen lassen.¹⁰ Die Hämolysate können bei 2–8°C bis zu 3 Stunden oder tiefgefroren bei –20°C für 2 Wochen gelagert werden.^{10,11} Es ist wichtig, Ascorbinsäure zu verwenden (nicht Natriumascorbat) und eine 1%ige Lösung täglich frisch anzusetzen.⁹

Vorbereitung der Arbeitslösung

Hinweis: Proben, bei denen sowohl Vitamin B12 als auch Folsäure bestimmt werden soll, müssen mit der Arbeitslösung wie unten beschrieben vorbehandelt werden.

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

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

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

Probenvorbehandlung

1. **200 µl** der Kalibratoren, Kontrollen, Serum- bzw. Plasmaproben und der Hämolysate in Polypropylenröhrchen pipettieren.
Sollte der Folsäure-Spiegel der Patientenproben über dem Messbereich liegen, müssen die Proben mit dem Folsäure-Diluenten verdünnt werden.
2. Jeweils **1.000 µl** der frisch hergestellten Arbeitslösung zu allen Röhrchen pipettieren und gut mischen.
3. Alle Röhrchen mit lose sitzenden Stopfen verschließen und **15–20 Minuten** bei 100°C im kochenden Wasserbad erhitzen.
4. Die Röhrchen **5 Minuten** in einem zweiten, unbeheizten Wasserbad auf Raumtemperatur abkühlen.
5. Mindestens **350 µl** der so vorbehandelten Proben in die jeweiligen IMMULITE-Proberöhrchen pipettieren.

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

Testdurchführung

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

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

Verdünnungen, Kalibrierung, Testdurchführung und Qualitätskontrollen.

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

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

Nachdem die Proben vorbehandelt wurde, sind die *behandelten* Proben im normalen Testverfahren zu verarbeiten. (Inhalt der Probenträger muss mindestens 250 µl über der erforderlichen Gesamtmenge liegen.)

Hinter jedem Probenträger können bis zu 4 Testeinheiten nachfolgen.

Empfohlenes Kalibrationsintervall:
2 Wochen.

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

Berechnungen

Berechnungen der Folsäurekonzentrationen im Vollblut und in den Erythrozyten

Das in ng/ml für das Hämolysat ermittelte Resultat (R) ergibt durch Multiplikation mit dem Verdünnungsfaktor 21 das Ergebnis in ng/ml Vollblut. Für die ungefähre Bestimmung der Erythrozyten-Konzentration in ng/ml muss die Folsäure-Konzentration im Vollblut mit $100/H$ multipliziert werden, wobei H den Hämatokrit in Prozent darstellt:

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

Genaugenommen wäre die Folsäure-Konzentration im Serum von der Folsäure-Konzentration im Vollblut abzuziehen, bevor das Resultat mit $100/H$ multipliziert wird. Auf Basis des Folsäurewertes S für den Patienten lautet die genaue Gleichung:

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

Der Ausdruck in den eckigen Klammern ist jedoch in den meisten Fällen verglichen zum Ausdruck „ $21R$ “ so klein, dass er nicht berücksichtigt werden muss.

Referenzwerte

Da die Folsäure-Spiegel sehr stark von der Ernährung oder Nahrungsmittel-zusätzen abhängig sind, können lokal evaluierte Referenzwerte deutliche Differenzen zeigen. In den USA erfolgt nach Vorgaben der FDA seit 1996 ein Folsäurezusatz zu verschiedenen Getreideprodukten. Diese Vorgehensweise hat dazu geführt, dass Personen mit dieser Ernährung einen doppelt so hohen Plasmafolsäure-Spiegel haben im Vergleich zu Personen, die Lebensmittel ohne Vitaminzusätze verzehren. Die Prävalenz erniedrigter Folsäurespiegel mit <3 ng/ml (7 nmol/l) nahm deutlich ab. Es ist davon auszugehen, dass Programme mit einer Folsäure-Anreicherung von Lebensmitteln den gleichen Effekt auf die Erythrozyten- und Vollblut-Folsäure haben. Die Bestimmung der Erythrozyten- oder Vollblut-Folsäure ist ein besseres Maß für die im Gewebe gespeicherte Folsäure als die Folsäurebestimmung im Plasma.

Basierend auf der Korrelation zum *No Boil Dualcount* Festphasen-Assay von DPC (siehe "Method Comparison") wurden folgende Referenzwerte ermittelt. (Hinweis: Die Referenzwertstudie für die IMMULITE Folsäure erfolgte in den USA nach den Richtlinien der FDA.) den USA nach den Richtlinien der FDA.)

Serum-Folsäure	3 – 17 ng/ml (6 – 39 nmol/l)
Vollblut-Folsäure	43 – 295 ng/ml (97 – 668 nmol/l)
Erythrozyten-Folsäure	93 – 641 ng/ml (212 – 1 453 nmol/l)

Mit dem *No Boil Dualcount* Festphasen-Assay von DPC wurden bei 100 gesunden Probanden die Serum-Folsäure und bei 88 gesunden Individuen die Erythrozyten-Folsäure bestimmt. Die Gruppen setzte sich primär aus männlichen und weiblichen Labormitarbeitern zusammen. Die Studie wurde in den USA durchgeführt.

Jedes Labor sollte seine eigenen Referenzbereiche etablieren.

Grenzen der Methode

Eine zu beachtende Kreuzreaktivität besteht zur Methotrexat (MTX), das in der

Chemotherapie von Karzinomen eingesetzt wird. (Siehe Tabelle "Specificity"). Da nach Beginn der Methotrexat-Infusion hohe Initialspiegel von bis zu 45 000 ng/ml bzw. von ca. 2 000 ng/ml 48 Stunden nach Infusion üblich sind, kann bei Patienten unter MTX-Therapie oder Therapie mit Medikamenten mit ähnlicher Struktur dieser Test zur Folsäurebestimmung nicht eingesetzt werden. Außerdem müssen die Folsäure-Ergebnisse auch bei Patienten, die kürzlich einer Therapie mit Methotrexat oder einer ähnlichen Substanz unterzogen wurden sehr vorsichtig interpretiert werden.

Folsäurekonzentrationen an der unteren Grenze des Referenzbereiches sind mit Vorsicht zu interpretieren.¹⁰

Heterophile Antikörper in Humansenen können mit Immunglobulinen aus den Assaykomponenten reagieren und Interferenzerscheinungen innerhalb des in vitro Immunoassays verursachen. (Clin. Chem. 1988;34:27-33) Proben von Patienten, die häufig mit Tier- bzw. Tierserumprodukten zu tun haben, können die erwähnten Interferenzen verursachen und zu anomalen Resultaten führen. Die verwendeten Reagenzien sind so konzipiert, dass das Risiko einer Interferenz mit den zu messenden Proben minimiert ist. Dennoch können potentiell Interaktionen zwischen seltenen Seren und den Testkomponenten auftreten. Zu diagnostischen Zwecken sollten die mit dem Assay erhaltenen Ergebnisse immer in Kombination mit der klinischen Untersuchung, der Patientenanamnese und anderen Befunden gesehen werden.

Leistungsdaten

Siehe Tabellen und Grafiken mit *repräsentativen* Daten für den Assay. Die Ergebnisse sind als ng/ml. Um die Werte von ng/ml in die S.I.-Einheit Nanomol pro Liter (nmol/l) umzurechnen, muss mit 2,266 multipliziert werden.

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

Messbereich: 0,5 – 24 ng/ml
(1,1 – 54 nmol/l).

Analytische Sensitivität: 0,3 ng/ml
(0,7 nmol/l).

Präzision im einzelnen Testansatz

(intraassay): Statistik aus einem einzelnen Testansatz mit 20 Einzelmessungen (siehe Tabelle „Intraassay Precision“).

Präzision zwischen Testansätzen

(interassay): Statistik aus 20 verschiedenen Testansätzen (siehe Tabelle „Interassay Precision“).

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

Wiederfindung: Die getesteten Proben waren mit drei Folsäure-Lösungen (42, 137 und 211 ng/ml) 1:19 versetzt. (Repräsentative Daten entnehmen Sie bitte der Tabelle „Recovery“.)

Spezifität: Der im Assay verwendete Antikörper ist hochspezifisch für Folsäure mit sehr niedriger Kreuzreaktivität zu anderen, evtl. im Serum vorliegenden Substanzen.

Alternative Probenarten: Proben von 19 Probanden wurden in Röhrchen ohne Additiva und in Heparin-Röhrchen gesammelt und mit dem IMMULITE Folsäure Assay bestimmt.

(Heparin) = 0,98 (Serum) + 0,26 ng/ml
r = 0,99

Mittelwerte:
6,8 ng/ml (Serum)
7,0 ng/ml (Heparin)

Da EDTA-Plasma die Werte beeinflusst, sollte es nicht als alternative Probenart zum Serum oder Heparin-Plasma eingesetzt werden.

EDTA-Vollblut kann für die Bestimmungen der Vollblut- und Erythrozyten-Folsäure eingesetzt werden.

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

Methodenvergleich (Serumproben): Der IMMULITE Folsäure Assay wurde mit dem Dualcount[®] Solid Phase No Boil Assay (SPNB) von DPC anhand von 71 Serum-Patientenproben verglichen. (Konzentrationsbereich ca. 1,4–20,3 ng/ml. Siehe Grafik.) Berechnung der linearen Regression:

(IML) = 1,05 (SPNB) – 0,57 ng/ml
r = 0,985

Mittelwerte:
5,9 ng/ml (IMMULITE)
6,2 ng/ml (SPNB)

Methodenvergleich (Hämolytate): Der IMMULITE Folsäure Assay wurde mit dem Dualcount® Solid Phase No Boil Assay von DPC anhand von 45 Hämolytate-Patientenproben verglichen. (Konzentrationsbereich ca. 156–973 ng/ml. Siehe Grafik.) Berechnung der linearen Regression:

(IML) = 1,05 (SPNB) – 41 ng/ml
r = 0,985

Mittelwerte:
345 ng/ml (IMMULITE)
369 ng/ml (SPNB)

Anwendungsberatung

Bei Rückfragen wenden Sie sich bitte an Ihre DPC Niederlassung.

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

Español

Acido Fólico

Utilidad del análisis: Para el diagnóstico in vitro con los analizadores IMMULITE e IMMULITE 1000 — para la medición cuantitativa del ácido fólico en suero, plasma heparinizado o sangre entera tratada con ácido ascórbico, como ayuda en el diagnóstico clínico y tratamiento de la anemia.

Referencia: **LKFO1** (100 tests),
LKFO5 (500 tests)
Código del Test: **FOL**
Código de Color: **Naranja**

Resumen y Explicación del Test

El ácido fólico (folato) y la vitamina B12 son nutrientes esenciales para la hematopoyesis.¹ La anemia megaloblástica se debe generalmente a la falta de una de estas dos vitaminas.¹ Los niveles circulantes de folato, en la deficiencia de vitamina B12, son generalmente normales o elevados, mientras que los niveles de folato

intraeritrocitario son frecuentemente bajos.²

La deficiencia de folato se debe generalmente a una deficiencia alimentaria (como en el alcoholismo) o a una sobredemanda de esta vitamina (como en el embarazo).^{1,3} Al contrario que la vitamina B12, el folato es una vitamina lábil al calor susceptible de perderse en una cocción prolongada. Por ello, la deficiencia de folato exhibe una variación demográfica que refleja las diferencias en el tipo de dieta y en los hábitos culinarios.⁴

Los niveles de folato circulante, susceptibles a la ingesta reciente, no pueden utilizarse como indicadores de las reservas tisulares.^{2,5,6} Por ello, los niveles de folato determinados en suero o plasma pueden ser normales en el caso de deficiencia de folato. Consecuentemente, los niveles circulantes serán bajos una vez que se hayan agotado las reservas tisulares.^{2,6} Por ello, se importante medir el folato intraeritrocitario conjuntamente con el folato sérico o plasmático.^{5,7,8}

Principio del análisis

Inmunoensayo competitivo.

IMMULITE Acido fólico es un ensayo competitivo quimioluminiscente en fase líquida que requiere cocción. El ensayo contiene ligando marcado, proteína de unión inmovilizada in situ y un sistema de detección por antiligando. La fase sólida, una bola de poliestireno encerrada dentro de la Unidad de Reacción del IMMULITE, está recubierta con un anticuerpo monoclonal murino específico para la proteína transportadora de ácido fólico.

Después del procedimiento de preparación de la muestra, la muestra del paciente, el análogo de ácido fólico marcado con ligando y la proteína transportadora de ácido fólico, se introducen simultáneamente en la Unidad de Reacción que contiene una bola de poliestireno recubierta con un análogo del Acido fólico y se incuban durante aproximadamente 30 minutos a 37°C con agitación intermitente. Durante la incubación, el Acido fólico presente en la muestra compete con el análogo del ácido fólico marcado con ligando por una cantidad limitada de la proteína transportadora de ácido fólico, siendo la

misma capturada por el anticuerpo que recubre la bola de poliestireno (el análogo no ligado es eliminado entonces por un lavado con centrifugación).

Ciclos de incubación: 2 × 30 minutos.

Recogida de la muestra

El paciente debe estar en ayunas.¹⁰

Para las determinaciones de ácido fólico intraeritrocitario, utilizar sangre total heparinizada o con EDTA. Debe conocerse el hematocrito del paciente para transformar los resultados de sangre total a intraeritrocitario, que se expresan en nanogramos por mililitro (ng/ml).

Además, para calcular exactamente los resultados intraeritrocitario, debe saberse también el nivel de ácido fólico sérico.

El plasma con EDTA no debería ser usado como muestra.

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

No se recomienda el uso de muestras de suero hemolizadas.

La centrifugación de las muestras de suero antes de que se forme el coágulo puede ocasionar la presencia de fibrina. Para evitar resultados erróneos debidos a la presencia de fibrina, asegurarse de que se ha formado el coágulo completamente antes de centrifugar las muestras.

Algunas muestras, particularmente aquellas de pacientes sometidos a terapia anticoagulante, pueden requerir mayor tiempo de coagulación.

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

Volumen requerido: Una única determinación requiere 100 µl de la muestra tratada pero se necesitan 200 µl de la muestra (suero, o plasma hemolizado) para el pretratamiento. La

copa de muestra debería contener al menos 250 µl más que el volumen total de muestra requerido para todas las determinaciones de ácido fólico a ser realizados en la muestra.

Conservación y estabilidad

Suero o plasma heparinizado: Su conservación bajo condiciones óptimas es crítico para la calidad de los resultados de fólico. Si la muestra no va a ser analizada en 8 horas, alicuotar y congelar a -20°: estable entre 6-8 semanas.¹³

Descongelar sólo una vez (a temperatura ambiente). Evitar la exposición excesiva de las muestras a luz directa.

Advertencias y precauciones

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

Para uso diagnóstico *in vitro*.

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

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

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

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

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

Agua: Use agua destilada o desionizada.

Materiales suministrados

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

Unidades de análisis de Acido fólico (LFO1)

Cada unidad etiquetada con código de barras contiene una bola recubierta de anticuerpos monoclonales murinos anticuerpo murino monoclonal anti-proteína de unión a folato. Estable a 2–8°C hasta la fecha de caducidad.

LKFO1: 100 unidades.

LKFO5: 500 unidades.

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

Viales de reactivos de Acido fólico (LFOA, LFOB)

Con códigos de barras. **LFOA:** un vial (7,5 ml) que contiene proteína de unión del ácido fólico, con conservante. **LFOB:** un vial (7,5 ml) que contiene fosfatasa alcalina (de intestino de ternera) conjugada con anti-ligando en tampón, con conservante. Guardar tapado y refrigerado: estable a 2–8°C hasta la fecha de caducidad. Se recomienda utilizarlo antes de que pasen 30 días después de abrirlo cuando se guarda según lo indicado.

LKFO1: 1 juego. **LKFO5:** 5 juegos.

Ajustadores de Acido fólico (LFOL, LFOH)

Dos viales (bajo y alto) de Acido fólico liofilizada en una matriz de proteína humana, con conservante. Reconstituir cada vial con **3,0 ml** de agua destilada o desionizada. Deje reposar durante 30 minutos. Mezcle por agitación o inversión suave hasta que se haya disuelto completamente el material liofilizado. Estable a 2–8°C durante 30 días después de la reconstitución o hasta 6 meses (alícuotados) a –20°C.

LKFO1: 1 juego.

LKFO5: 2 juegos.

Nota: Los Ajustadores deben someterse al mismo paso de desnaturalización por

calor que las muestras de los pacientes (Consulte la sección "Pretratamiento de la Muestra").

Folato marcado con ligando (LLL)

5 ml de folato marcado con ligando en una solución tamponada de proteína humana, con conservante. Mantener refrigerado: es estable a 2–8°C durante 30 días tras la apertura.

LKFO1: 1 vial.

LKFO5: 5 viales.

Solución Tampón Borato-KCN (LBCN)

125 ml de Solución Tampón Borato-KCN, con conservante. Mantener refrigerado: es estable a 2–8°C durante 30 días tras la apertura.

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

LKFO1: 1 vial.

LKFO5: 5 viales.

Solución de Ditiotritol (LDTT)

3 ml Solución de Ditiotritol. Mantener refrigerado: es estable a 2–8°C durante 30 días tras la apertura.

LKFO1: 1 vial.

LKFO5: 5 viales.

Componentes del kit que se suministran por separado

Diluyente de muestra de Acido fólico (LFOZ)

Para la dilución manual de las muestras de los pacientes. 25 ml de diluyente proteico sérico humano, con conservante. Estable a 2–8°C durante 30 días después de abrise o estable a –20°C durante 6 meses.

Ácido Ascórbico

Sólo se requiere para la determinación de ácido fólico intraeritrocitario. Debe prepararse una solución 1% *fresca* diariamente. Los cristales de ácido ascórbico deberán protegerse de la humedad para que no se endurezcan y sigan fluyendo libremente. (El ascorbato sódico *no* es una alternativa apropiada).

LSUBX: Sustrato quimioluminiscente

LPWS2: Lavado de sonda

LKPM: Kit de limpieza de sonda

LCHx-y: Soportes de recipientes de

muestras (con códigos de barras)

LSCP: Recipientes de muestras (desechables)

LSCC: Tapas para los recipientes de muestras (opcionales)

CON6: control multiconstituyente de tres niveles.

También necesarios

Tubos de polipropileno de 12x75 mm con tapones — disponibles de DPC.

Micropipetas: de 200 y 1 000 µl. Para la adición de 1 ml de reactivo, puede usarse un dispensador repetitivo confiable tipo Nichiryo.

Recipiente plástico con tapa (para preparar la Solución de Trabajo).

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

Baño de agua hirviendo cubierto (100°C).

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

Preparación de los Hemolizados

Sólo se requiere para las determinaciones de ácido fólico en sangre total. Recoger la muestra; determinar y anotar el hematocrito. Lisar las células de la sangre entera obtenida con heparina o EDTA preparando una dilución 1-en-21 de la muestra (completamente suspendida) en una solución de ácido ascórbico al 1% recién preparada; por ejemplo mezclar 100 µl de la muestra con 2 ml de esta solución. Agitar y dejar durante 90 minutos a temperatura ambiente (15–28°C) en la oscuridad. Los hemolizados pueden almacenarse entre 2–8°C hasta 3 horas, o congelados a –20°C durante al menos 2 semanas. Es muy importante usar ácido ascórbico en vez de ascorbato sódico, y preparar el día de su uso la solución al 1% fresca.

Preparación de la Solución de Trabajo

Note: Las a muestras de vitamina B12 y ácido fólico deben ser pretratadas con la Solución de Trabajo que a continuación se detalla.

La cantidad de cada componente depende del número de test que se vayan a realizar. Los volúmenes requeridos, en microlitros por test, están en la tabla

siguiente. Asegúrese de multiplicar este número por un número superior al de test a procesar (Los componentes se suministran con una cantidad suficiente para que sobre un 20% de la cantidad necesaria para preparar la solución de trabajo para todo el kit)

	µl/ensayo
Solución tampón de Borato-KCN	1 000
Folato marcado con ligando	20
Solución ditiotritol	20

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

Pretratamiento de la Muestra

1. Pipetear **200 µl** de cada ajustador, control o muestra de paciente, en los tubos preparados.
Diluir previamente con Diluyente de Muestras de Acido fólico IMMULITE, las muestras de las que se esperen altas concentraciones.
2. Añadir **1 000 µl** de Solución de Trabajo a todos los tubos. Agitar con Vórtex.
3. Tapar los tubos y colocarlos en un baño de agua hirviendo (100°C) durante **15–20 minutos**.
4. Retirar del baño y enfriar en un baño de agua a temperatura ambiente durante **5 minutos**.
5. Pipetear como mínimo **350 µl** de la muestra en una Copa de Muestra IMMULITE.

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

Ensayo

Aviso: para obtener el funcionamiento óptimo, es importante realizar todos los procedimientos del mantenimiento general según lo definido en el manual del

operador de IMMULITE o IMMULITE 1000.

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

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

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

Después del tratamiento previo de la muestra, procese la muestra *tratada* según el procedimiento de ensayo habitual. (El recipiente de la muestra debe contener, como mínimo, 250 µl más que el volumen total requerido).

Cada soporte de recipientes de muestras puede acompañarse de cuatro unidades de reacción como máximo.

Intervalo de ajuste recomendado:
2 semanas.

Muestras de Control de calidad: Use controles o pools de muestras con dos niveles diferentes, como mínimo, de Ácido fólico (bajo y alto).

Cálculos

Resultados de ácido fólico intraeritrocitario

Calcular primero el resultado R en nanogramos por ml de hemolizado. Multiplicar por el factor de dilución 21 para obtener la concentración en sangre total de ácido fólico, en ng/ml. Para una medición aproximada de la concentración del fólico intraeritrocitario, también en ng/ml, multiplicar lo anterior por 100/H, en donde H es el hematocrito en%:

Acido fólico intraeritrocitario ≈
 $21R \times (100 / H)$

Estrictamente, la concentración en suero de ácido fólico, debería sustraerse de la concentración en sangre total, antes de multiplicar por 100/H. Usando el nivel de ácido fólico en el suero del paciente S, la ecuación exacta es:

Acido fólico intraeritrocitario =
 $21R - [S \times (100 - H) / 100] \times (100 / H)$

Lo incluido entre corchetes es en la mayoría de los casos, tan pequeño en comparación al término 21R, que puede ser despreciado.

Valores esperados

Debido a que los niveles de ácido fólico están fuertemente influenciados por la dieta y los suplementos alimenticios, los límites de referencia que se basan en la población pueden mostrar marcadas diferencias demográficas. En los Estados Unidos por ejemplo, fortificar los productos de cereales enriquecidos, como desde 1996 lo requiere la Administración de Alimentos y Drogas, ha llevado a una duplicación estimada del nivel promedio de folato en plasma entre las personas que no usan suplementos de vitaminas,¹⁴ y a una disminución en la preponderancia de niveles bajos de folato, es decir, niveles menores de 3 ng/ml (7 nmol/l).¹⁴ Es de esperar que los programas de fortificación tengan un impacto similar sobre los niveles de folato en la sangre total y en los eritrocitos, los cuales dan una mejor medida de la acumulación en los tejidos.

Basado en su relación con el ensayo de Dualcount Sin Cocción en Fase Sólida de DPC (ver Comparación con otros Métodos), se puede esperar que el ensayo tenga los siguientes límites de referencia. Nota: el estudio del rango normal de Dualcount fue realizado en los EE.UU. antes de que la FDA estableciera sus requisitos de fortificación.

Acido fólico en suero	3 – 17 ng/ml (6 – 39 nmol/l)
Acido fólico en sangre total	43 – 295 ng/ml (97 – 668 nmol/l)
Acido fólico intraeritrocitario	93 – 641 ng/ml (212 – 1 453 nmol/l)

Se han realizado estudios en estados Unidos utilizando el ensayo de Dualcount Solid Fase No Boil de DPC en 100 individuos sanos para determinar fólico sérico y en 88 individuos sanos para determinar fólico intraeritrocitario.

Cada laboratorio deberá establecer sus propios intervalos de referencia.

Limitaciones

La proteína que se une al folato, utilizada en el Vial de Reactivo, tiene una cierta reacción cruzada con la droga "anti-folato" metotrexato (MTX), un compuesto usado en la quimioterapia del cáncer. (Ver la sección de "Specificity"). Debido a que altas dosis de metotrexato pueden resultar en niveles circulantes iniciales de 45 000 ng/ml y niveles de 2 000 ng/ml 48 horas más tarde, no deberá usarse el kit para medir ácido fólico en los pacientes que actualmente estén recibiendo esta droga. Es más, deberá tenerse mucho cuidado al interpretar los niveles de ácido fólico en los pacientes que recientemente hayan sido tratados con metotrexato o con cualquier otra droga con una estructura similar.

Los resultados de ácido fólico cercanos al límite inferior del normal deberán interpretarse con cuidado.¹⁰

Los anticuerpos heterofílicos en el suero humano pueden reaccionar con las inmunoglobulinas de los componentes del ensayo provocando interferencias con los inmunoanálisis in vitro. [Ver Boscato LM, Stuart MC. Heterophilic antibodies: a problem for all immunoassays. Clin Chem 1988;34:27-33.] Las muestras de los pacientes que frecuentemente están expuestos a animales o a productos séricos animales pueden presentar este tipo de interferencia que potencialmente ocasione un resultado anómalo. Estos reactivos han sido formulados para minimizar el riesgo de interferencia, no obstante, pueden darse interacciones anómalas entre sueros conflictivos y los componentes del ensayo. Con fines de diagnóstico, los resultados obtenidos con este ensayo siempre deben ser usados en combinación con el examen clínico, la historia médica del paciente y cualquier otro dato clínico relevante.

Características analíticas

Para ver resultados *representativos* de las cualidades del ensayo, consulte las tablas y los gráficos. Los resultados se expresan en ng/ml. Para convertir ng/ml a Unidades S.I., nanomoles/l (nmol/l), multiplicar por 2,266:

Factor de Conversión:
ng/ml x 2,266 → nmol/l

Intervalo de calibración: 0,5 a 24 ng/ml (1,1 a 54 nmol/l).

Sensibilidad: 0,3 ng/ml (0,7 nmol/l)

Precisión intraensayo (dentro de una tanda): Se han calculado datos estadísticos para las muestras analizadas a partir de los resultados de 20 replicados en una sola tanda. (Véase la tabla "Intraassay Precision").

Precisión entre ensayos (de una tanda a otra): Se han calculado datos estadísticos para las muestras analizadas en 20 tomas distintas. (Véase la tabla de "Interassay Precision").

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

Recuperación: Se han analizado las muestras cargadas 1 a 19 con tres soluciones (42, 137 y 211 ng/ml) de Ácido fólico. (Ver la tabla "Recovery" para resultados representativos).

Especificidad: La proteína transportadora usada en el procedimiento IMMULITE Ácido Fólico es muy específica para el ácido fólico y exhibe baja reactividad cruzada con otras sustancias aparte de metotrexato que pudieran estar presentes en las muestras de los pacientes.

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

Tipo alternativo de muestra: Muestras de 19 voluntarios en tubos secos y tubos heparinizados se analizaron con el procedimiento IMMULITE Ácido fólico:

(Heparina) = 0,98 (Suero) + 0,26 ng/ml
r = 0,99

Medias:
6,8 ng/ml (Suero)
7,0 ng/ml (Heparina)

Se ha demostrado que el EDTA tiene efecto significativo sobre los resultados, no debiéndose utilizar plasma con EDTA como alternativa a suero o plasma heparinado.

Se puede utilizar sangre total con EDTA para la deteminación de ácido fólico intraeritrocitario y en sangre total.

Comparación de los métodos (Suero):
El procedimiento de IMMULITE Ácido

fólico se comparó con Dualcount Solid Phase No Boil (SPNB) de DPC sobre 71 muestras de pacientes (Intervalo de concentración: aproximadamente 1,4 a 20,3 ng/ml. Véase el gráfico). Por regresión lineal:

(IMMULITE) = 1,05 (SPNB) – 0,57 ng/ml
r = 0,985

Medias:
5,9 ng/ml (IMMULITE)
6,2 ng/ml (SPNB)

Comparación de los métodos (Hemolizados): Se comparó el procedimiento de IMMULITE Ácido Fólico con el ensayo Dualcount® Solid Fase No Boil de DPC en 45 hemolizados de pacientes. (Intervalo de concentración: aproximadamente de 156 a 973 ng/ml. Véase el gráfico). Por regresión lineal:

(IML) = 1,05 (SPNB) – 41 ng/ml
r = 0,985

Medias:
345 ng/ml (IMMULITE)
369 ng/ml (SPNB)

Asistencia técnica

Contacte con su Distribuidor Nacional.

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

Français

IMMULITE Acide Folique

Domaine d'utilisation : dosage quantitatif de l'acide folique dans le sérum, le plasma hépariné ou sang total traité par acide ascorbique. Ce test est réservé à un usage diagnostique in vitro avec les analyseurs IMMULITE et IMMULITE 1000 et constitue une aide au diagnostic clinique et au traitement de l'anémie.

Référence catalogue : **LKFO1** (100 tests), **LKFO5** (500 tests)
Code produit : **FOL**
Code couleur: **Orange**

Introduction

L'acide folique et la vitamine B12 sont des substances nutritives essentielles pour l'hématopoïèse.¹ L'anémie mégaloblastique est presque toujours due

à l'absence de l'une de ces deux vitamines.¹ Les taux d'acide folique circulants sont habituellement normaux ou élevés lors d'une carence en vitamine B12, alors que dans ce contexte les taux de folates érythrocytaires sont souvent bas.²

Un déficit en acide folique résulte couramment d'une carence alimentaire (comme dans l'alcoolisme) ou d'un besoin accru de cette vitamine (comme lors de la grossesse).^{1,3} Contrairement à la vitamine B12, l'acide folique est une vitamine labile à la température susceptible d'être détruite lors de la cuisson prolongée des aliments. Ceci explique que la prévalence de la carence en acide folique montre de grandes variations démographiques, reflétant clairement des différences dans les régimes alimentaires et les habitudes culinaires.⁴

Les taux circulants d'acide folique, étant fortement influencés par une ingestion récente, ne sont pas un indicateur fiable des réserves tissulaires.^{2,5,6} Ainsi, les taux d'acide folique mesurés dans le sérum ou le plasma peuvent être normaux lors d'une carence en acide folique.^{2,6} A l'inverse des taux circulants abaissés peuvent être obtenus bien avant l'élimination des réserves tissulaires. Il est ainsi important de déterminer les taux de folate dans les globules rouges même si les dosages sériques ou plasmatiques ont été réalisés.^{5,7,8}

Principe du test

Immunodosage par compétition.

La trousse IMMULITE Acide Folique est un test en chimiluminescence utilisant un principe de compétition en phase liquide avec un ligand marqué et une immobilisation *in situ* avec une protéine porteuse. La révélation s'effectue au moyen d'un anti-ligand marqué par de la phosphatase alcaline. Les échantillons à doser doivent subir une ébullition préalable. La phase solide, une bille de polystyrène contenue dans l'Unité-Test IMMULITE, est revêtue d'un anticorps monoclonal de souris spécifique de la protéine porteuse de l'acide folique.

Après une étape de préparation, l'échantillon du patient ainsi que l'analogue de l'acide folique marqué par un ligand et la protéine porteuse de l'acide

folique sont introduits simultanément dans l'Unité-Test et incubés durant 30 minutes à +37°C sous agitation. Pendant cette incubation, l'acide folique de l'échantillon rentre en compétition avec l'analogue d'acide folique marqué par le ligand vis à vis d'une quantité limitée de protéine porteuse de l'acide folique. Cette protéine porteuse est capturée par l'anticorps fixé à la surface de la bille. (L'analogue en excès est éliminé par un lavage utilisant le principe de la centrifugation axiale). Un anti-ligand marqué à la phosphatase alcaline (conjugué enzymatique) est ensuite ajouté et l'Unité-Test est incubée pour 30 mn supplémentaire à + 37°C. L'excès de conjugué enzymatique est éliminé par centrifugation axiale.

Cycles d'incubation : 2 × 30 minutes.

Recueil des échantillons

Le patient doit être à jeun.¹⁰

Pour le sang total et les dosages érythrocytaires, utiliser du sang total frais hépariné ou EDTA. L'hématocrite du patient devra être connu afin de transcrire les résultats obtenus dans le sang total en résultats d'acide folique érythrocytaire (exprimé en ng/ml). De plus afin d'avoir un résultat érythrocytaire précis, il est important de connaître également le taux sérique d'acide folique du patient.

Ne pas utiliser le plasma EDTA comme prélèvement plasmatique.

Il est recommandé de clarifier les échantillons hyperlipémiques par ultracentrifugation.

Les sérums hémolysés ne conviennent pas au dosage.

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

Des tubes pour prélèvements sanguins provenant de fabricants différents peuvent donner des résultats différents, selon les matériaux et additifs utilisés, y compris gels ou barrières physiques, activateurs

de la coagulation et/ou anticoagulants. Le coffret IMMULITE/IMMULITE 1000 acide folique 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, de plasma ou d'hémolysat sont nécessaires pour l'étape de prétraitement. Un dosage en simple nécessite 100 µl d'échantillon traité. (L'unité-échantillon doit contenir au moins 250 µl de plus que le volume total nécessaire pour le nombre de détermination d'acide folique.)

Conditions de conservation

Sérum ou plasma hépariné: de bonnes conditions de conservation sont indispensables à l'obtention de résultats fiables. Si le sérum n'est pas dosé dans les 8 heures, aliquoter et congeler à -20°C : stable 6 à 8 semaines.¹³ Ne décongeler qu'une fois (à température ambiante). Eviter l'exposition prolongée des échantillons à la lumière directe.

Précautions d'emploi

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

Réservé à un usage diagnostique *in vitro*.

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

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

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

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

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

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

Matériel fourni

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

Tests unitaires Acide Folique (LFO1)

Chaque unité à code-barre contient une bille revêtue d'un anticorps monoclonal murin dirigé contre la protéine porteuse de l'acide folique. Stables à +2°C/+8°C jusqu'à la date de péremption

LKFO1: 100 unités.

LKFO5: 500 unités.

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

Cartouches de réactif Acide Folique (LFOA, LFOB)

Avec code-barre. **LFOA** : un flacon (7,5 ml) de protéine porteuse de l'acide folique avec conservateur. **LFOB** : un flacon (7,5 ml) d'anti-ligand marqué à la phosphatase alcaline (intestins de veau) dans un tampon avec conservateur. Conserver bouchés et réfrigérés : stables à +2°C/+8°C jusqu'à la date de péremption. A utiliser de préférence dans les 30 jours qui suivent l'ouverture, si les recommandations de stockage sont respectées.

LKFO1: 1 jeu. **LKFO5**: 5 jeux.

Ajusteurs Acide Folique (LFOL, LFOH)

2 flacons d'ajusteurs (« bas » et « haut ») contenant de l'acide folique lyophilisé dans une matrice protéique humaine, avec conservateur. Reconstituer chaque flacon avec **3,0 ml** d'eau distillée ou désionisée. Laisser reposer pendant 30 minutes. Mélanger doucement jusqu'à

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

LKFO1: 1 jeu. **LKFO5**: 2 jeux.

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

Folate marqué par un ligand (LLLF)

5 ml d'acide folique marqué par un ligand dans une solution tampon à base de protéines humaines, avec conservateur. Stable à +2°C/+8°C pendant 30 jours après ouverture.

LKFO1: 1 flacon **LKFO5**: 5 flacons

Solution tampon Borate - Cyanure de Potassium (LBCN)

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

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

LKFO1: 1 flacon **LKFO5**: 5 flacons

Solution de Dithiothreitol (LDTT)

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

LKFO1: 1 flacon **LKFO5**: 5 flacons

Composants du coffret fournis séparément

Diluant Acide folique (LFOZ)

Pour la dilution manuelle des échantillons de patients. 25 ml d'une matrice protéique humaine. Stable à +2°C/+8°C pendant 30 jours ou 6 mois (aliquoté) à -20°C.

Acide ascorbique

Nécessaire seulement pour le dosage de l'acide folique dans le sang total et dans les globules rouges. Disposer d'une solution à 1% fraîchement préparée à chaque utilisation. Les cristaux d'acide ascorbique doivent être conservés à l'abri de l'humidité. L'ascorbate de sodium ne peut pas remplacer l'acide ascorbique.

LSUBX : Substrat chimiluminescent

LPWSM : Solution de lavage

LKPM : Coffret de décontamination de l'aiguille de prélèvement

LCHx-y : Supports pour unités échantillons (avec code-barre)
LSCP : unités échantillons (à usage unique)
LSCC : Bouchons pour unités échantillons (optionnel)

CON6 : Contrôle multiparamétrique à trois niveaux.

Egalement requis

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

Micropipettes : 200 et 1 000 µl.

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

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

Bain-marie bouillant couvert (100°C).

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

Préparation des hémolysats

A réaliser uniquement pour les dosages d'acide folique dans le sang total. Récupérer l'échantillon. Déterminer et conserver l'hématocrite. Lysér les cellules d'un sang total frais recueilli sur EDTA ou héparine en diluant l'échantillon au 1/21 dans une solution d'acide ascorbique à 1% fraîchement préparée. (Ex : mélanger 100 µl d'échantillon avec 2 ml de cette solution). Vortexer et laisser 90 mn à température ambiante (+15°C/+28°C) à l'obscurité.¹⁰ L'hémolysat peut être conservé jusqu'à 3 heures à + 2°C/+ 8°C ou congelé deux semaines à -20°C.^{10,11} Il est important d'utiliser plutôt de l'acide ascorbique que de l'ascorbate de sodium et de préparer une solution fraîche à 1% journalièrement.⁹

Préparation de la solution de travail

Note : Les échantillons qui vont être testés à la fois en Acide Folique et Vitamine B12 doivent être prétraités avec la solution de travail décrite ci-dessous.

La quantité de chacun des composants dépend du nombre de tests à réaliser. Les volumes nécessaires, en microlitres par test, sont décrits ci-dessous. S'assurer de multiplier ces volumes par un facteur légèrement supérieur au nombre

d'analyses à réaliser. (Les différents réactifs sont fournis avec un excès d'environ 20%).

	µl/test
Sol. borate/tampon KCN	1 000
Folate marqué par un ligand	20
Solution de dithiothréitol	20

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

Préparation des échantillons

1. Pipeter **200 µl** de chaque ajusteur, contrôle et échantillon de patient – sérum, plasma ou hémolysat - dans des tubes préalablement préparés.

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

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

Les échantillons ainsi préparés, sérum ou sang total, sont stables à température ambiante (+15°C/+28°C) ou à +2°C/+8°C pendant une heure avant la réalisation du dosage. Attention : les différents *contrôles commercialisés* peuvent présenter une stabilité après traitement *variable*.

Protocole de dosage

Noter que pour des performances optimales, il est important de réaliser toutes les procédures de maintenance de routine selon les instructions du Manuel

d'Utilisation de l'IMMULITE ou de l'IMMULITE 1000.

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

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

Noter que les deux cartouches de réactif A et B doivent être placées sur le carrousel pour réaliser ce dosage.

Après l'étape de prétraitement, doser l'échantillon prétraité avec la procédure habituelle. (L'unité-échantillon doit contenir au moins 250 µl de plus que le volume total nécessaire.)

Chaque unité-échantillon contenant l'échantillon prétraité peut être suivie par jusqu'à 4 unités-tests.

Intervalle d'ajustement recommandé :
2 semaines.

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

Calculs

Résultats pour le sang total et les globules rouges.

Calculer d'abord le résultat R en nanogrammes par millilitre (ng/ml) d'hémolysat. Puis multiplier par le facteur de dilution 21 afin d'obtenir la concentration en acide folique dans le sang total (en ng/ml). Pour déterminer la concentration approximative dans les globules rouges (en ng/ml), multiplier la concentration d'acide folique dans le sang total par le facteur 100/H (H : hématocrite en pourcentage).

Concentration d'acide folique dans les globules rouges $\approx 21 R \times (100 / H)$

Pour plus de précision la concentration sérique d'acide folique doit être soustraite de la concentration en acide folique du sang total avant de multiplier par (100/H). En utilisant la valeur S pour la concentration d'acide folique sérique l'équation devient :

Concentration d'acide folique érythrocytaire = $21R - [S \times (100 - H) / 100] \times (100 / H)$

La valeur entre parenthèses peut généralement être négligée par rapport au terme 21 R dans la plupart des cas.

Valeurs de référence

Du fait que les taux circulants d'acide folique sont fortement influencés par les régimes alimentaires, les valeurs de références peuvent être différentes en fonction des populations démographiques étudiées. Aux Etats-Unis par exemple, l'enrichissement des produits en céréales, recommandé par la Food and Drug Administration depuis 1996, a conduit à un doublement des valeurs moyennes chez des sujets ne prenant pas de suppléments vitaminés et donc à une diminution des taux bas en acide folique, c'est à dire inférieurs à 3 ng/ml (7 nmol/l).¹⁴ Ce programme d'enrichissement peut avoir un impact similaire sur les taux d'acide folique dans le sang total et les globules rouges, qui sont des meilleurs marqueurs des réserves.

Basé sur ces considérations, le test, Solid Phase No Boil Dualcount de DPC (voir méthode de comparaison), donne les valeurs de référence suivantes : Noter que les études faites pour déterminer le domaine normal du test Dualcount, ont été menées aux U.S avant les recommandations de la FDA.

Acide folique sérique	3 – 17 ng/ml (6 – 39 nmol/l)
Acide folique dans le sang total	43 – 295 ng/ml (97 – 668 nmol/l)
Acide folique dans les globules rouges	93 – 641 ng/ml (212 – 1 453 nmol/l)

100 individus en bonne santé ont été testés avec la trousse Solid Phase No Boil de DPC pour le dosage de l'acide folique sérique et 88 patients en bonne santé pour le dosage de l'acide folique dans les globules rouges. Ces deux groupes étaient constitués de personnel de laboratoire, hommes et femmes, apparemment en bonne santé. Ces valeurs normales ont été établies aux USA.

Chaque laboratoire devra établir ses propres valeurs de référence.

Limites

La protéine porteuse de l'acide folique utilisée dans le flacon réactif réagit avec un médicament "anti-folate", le méthotrexate (MTX), utilisé lors de chimiothérapies anti-cancéreuses. Des injections de fortes doses de MTX peuvent conduire à des taux circulants d'environ 45 000 ng/ml initialement et de 2 000 ng/ml après 48 heures. La trousse IMMULITE Acide folique ne doit donc pas être utilisée pour des patients suivants de tels traitements. De plus, tous les résultats d'acide folique obtenus chez des patients ayant reçus récemment un traitement au MTX ou tout autre médicament de structure similaire doivent être analysés avec précaution.

Les résultats d'acide folique proche de la limite basse des valeurs normales doivent être interprétés avec précaution.¹⁰

Les anticorps hétérophiles du sérum humain peuvent réagir avec les immunoglobulines faisant partie des composants du coffret et interférer avec les immunodosages in vitro. [Voir Boscato LM, Stuart MC. Heterophilic antibodies: a problem for all immunoassays. Clin Chem 1988;34:27-33.] Les échantillons provenant de patients fréquemment exposés aux animaux ou aux produits sériques d'origine animale peuvent présenter ce type d'interférence pouvant potentiellement donner un résultat anormal. Ces réactifs ont été mis au point afin de minimiser le risque d'interférence, cependant des interactions potentielles entre des sérums très exceptionnels et les composants du test peuvent se produire. Dans un but diagnostique, les résultats obtenus avec ce dosage doivent toujours être utilisés en association avec un examen clinique, l'histoire médicale du patient et d'autres résultats.

Performances du test

Consulter les tableaux et graphiques pour obtenir les données *représentatives* des performances de ce test. Les résultats sont donnés en ng/ml. Pour effectuer la conversion de ng/ml au S.I. d'unités nanomoles par litre (nmol/l), multiplier par 2,266 :

Facteur de conversion :

ng/ml × 2,266 → nmol/l.

Domaine de mesure : 0,5 – 24 ng/ml

(1,1 – 54 nmol/l).

Sensibilité analytique : 0,3 ng/ml

(0,7 nmol/l).

Précision intra-dosage (au sein d'une même série) : les statistiques ont été réalisées sur les résultats de 20 replicates d'échantillons dosés au cours d'une même série. (Voir le tableau « Intraassay Precision ».)

Précision inter-dosage (entre plusieurs séries) : les statistiques ont été réalisées sur des échantillons dosés dans 20 séries différentes (Voir le tableau « Interassay Precision ».)

Test de dilution : des échantillons ont été dosés à différentes concentrations. (Voir le tableau « Linearity » pour des données représentatives.)

Récupération : les échantillons testés ont été chargés dans un rapport de 1 à 19 avec trois solutions d'acide folique (42, 137 et 211 ng/ml). (Voir le tableau « Recovery » pour des données représentatives.)

Spécificité : La protéine porteuse utilisée dans la trousse IMMULITE Acide folique est hautement spécifique de l'acide folique et présente une faible réactivité croisée avec d'autres substances, autres que le méthotrexate qui pourraient être présents dans l'échantillon du patient.

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

Utilisation de différents types d'échantillons : des échantillons prélevés chez 19 individus sur tubes vacutainer secs et héparinés ont été testés avec le dosage IMMULITE Acide folique.

(Héparine) = 0,98 (Sérum) + 0,26 ng/ml
r = 0,99

Moyennes :

6,8 ng/ml (Sérum)

7,0 ng/ml (Héparine)

L'anticoagulant EDTA a un effet significatif sur les résultats, pour cette raison, le plasma EDTA ne doit pas être utilisé avec ce test comme alternative au sérum ou au plasma hépariné.

Du sang total sous EDTA doit être utilisé pour la détermination de l'Acide Folique dans le sang total ou les érythrocytes.

Comparaison de méthode (Sérums): Le test IMMULITE Acide Folique a été comparé au test DPC Dualcount Solide Phase No Boil (SPNB) sur 71 échantillons de patients (dont les concentrations allaient de 1,4 à 20,3 ng/ml. Voir graphique). Par régression linéaire :

(IML) = 1,05 (SPNB) – 0,57 ng/ml
r = 0,985

Moyennes :
5,9 ng/ml (IMMULITE)
6,2 ng/ml (SPNB)

Comparaison de méthode (Hémolysats)

Le test IMMULITE Acide Folique a été comparé au test DPC Dualcount Solide Phase No Boil (SPNB) sur 45 hémolysats (dont les concentrations allaient de 156 à 973 ng/ml. Voir graphique). Par régression linéaire :

(IML) = 1,05 (SPNB) – 41 ng/ml
r = 0,985

Moyennes :
345 ng/ml (IMMULITE)
369 ng/ml (SPNB)

Assistance technique

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

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

Italiano

Acido Folico

Uso: Per prove diagnostiche in vitro con gli Analizzatori IMMULITE ed IMMULITE 1000 — per la misurazione quantitativa dell'acido folico nel siero, nel plasma eparinizzato, o nel sangue intero trattato con acido ascorbico, e quale ausilio nella diagnosi clinica e nella terapia dell'anemia.

Codice: **LKFO1** (100 test), **LKFO5** (500 test)

Codice del Test: **FOL** Colore: **Arancione**

Riassunto e Spiegazione del Test

L'acido folico (folato) e la vitamina B₁₂ sono sostanze nutrienti essenziali per l'ematopoiesi.¹ L'anemia megaloblastica è quasi sempre dovuta alla mancanza di una di queste due vitamine.¹ Di solito i livelli circolanti di folati sono normali o elevati nella carenza di vitamina B₁₂, ma frequentemente i livelli di folati nei globuli rossi si presentano bassi.²

La mancanza di folati si riscontra normalmente quale conseguenza di carenze nella dieta (come nell'alcolismo) o in casi in cui si abbia una maggiore richiesta di questa vitamina (come durante la gravidanza).^{1,3} Diversamente dalla vitamina B₁₂, il folato è una vitamina labile al calore, suscettibile alla cottura prolungata dei cibi. Per questo motivo, la mancanza di folato è indice di variazioni demografiche, rispecchiando apparentemente differenze nelle abitudini dietarie e culinarie.⁴

I livelli circolanti di folato, essendo fortemente influenzati dall'assunzione di cibo, non sono attendibili come indice di conservazione nei tessuti.^{2,5,6} Per questo motivo, i livelli di folato misurati nel siero e nel plasma possono essere normali anche quando è presente una carenza dello stesso. D'altro canto, i livelli circolanti possono essere bassi molto prima che i residui nei tessuti siano scomparsi.^{2,6} Per questo motivo, è importante misurare i livelli di folato anche nei globuli rossi quando li si misura nel siero e nel plasma.^{5,7,8}

Principio del Dosaggio

Immunoprova competitiva.

L'Acido Folico IMMULITE è un dosaggio in chemiluminescenza con legame proteico che prevede una bollitura. Si tratta di un dosaggio competitivo in fase liquida, marcato con ligando con immobilizzazione *in situ* e con un sistema di rilevazione dell'anti-ligando. La fase solida, una sferetta di polistirene contenuta all'interno della Test Unit IMMULITE, è coattata con un anticorpo monoclonale murino specifico per la proteina legante l'acido folico.

Dopo la procedura di preparazione del campione, lo stesso, l'analogo dell'acido

folico marcato con ligando, e la proteina legante l'acido folico sono introdotti simultaneamente nella Test Unit, e incubati approssimativamente 30 minuti a 37°C in agitazione intermittente. Durante questo periodo, l'acido folico presente nel campione compete con l'analogo dell'acido folico marcato con ligando per un quantitativo limitato di proteina legante l'acido folico la quale viene catturata da un anticorpo presente sulla sferetta. (L'analogo non legato viene eliminato attraverso centrifugazione).

Cicli d'incubazione: 2 × 30 minuti.

Prelievo dei Campioni

Il paziente deve essere a digiuno.¹⁰

Per le determinazioni di acido folico nel sangue intero e nei globuli rossi, utilizzare sangue fresco intero eparinizzato o EDTA. E' necessario conoscere l'ematocrito del paziente per tradurre i risultati di acido folico del sangue intero in risultati nei globuli rossi, che sono espressi in nanogrammi per millilitro (ng/mL) di globuli rossi impaccati. Inoltre, per calcolare in maniera precisa i risultati dell'acido folico nei globuli rossi, è necessario conoscere anche il livello di acido folico nel siero.

I campioni di plasma EDTA non devono essere utilizzati.

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

Non utilizzare campioni di siero emolizzati.

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

Provette per il prelievo di sangue di produttori diversi possono dare valori differenti, a seconda dei materiali e degli additivi usati, incluso gel o barriere fisiche, attivatori di coaguli e/o anticoagulanti. L'IMMULITE/IMMULITE 1000 Acido Folico 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 campione — siero, plasma, o emolisato sono necessari, per la fase di pretrattamento del campione. Una singola determinazione utilizza 100 µL di campione *trattato*; il porta campioni deve contenere almeno 250 µL più di campione trattato del volume totale richiesto per le determinazioni di acido folico da effettuare.

Conservazione e stabilità

Siero o Plasma Eparinizzato: La conservazione in condizioni idonee è critica per risultati attendibili di acido folico. Se il campione *non* viene analizzato entro 8 ore, aliquotare e congelare a -20°C: stabile per 6-8 settimane.¹³ Scongellare una sola volta (a temperatura ambiente). Evitare l'esposizione eccessiva alla luce solare diretta.

Avvertenze e Precauzioni

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

Ad uso diagnostico *in vitro*.

Reagenti: Conservare a 2-8°C. Scartare in conformità alle leggi applicabili.

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

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

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

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

Acqua: Utilizzare acqua distillata o deionizzata.

Materiali Forniti

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

Test Unit Acido Folico (LFO1)

Ogni unità con codice a barre contiene una sferetta coattata con un anticorpo monoclonale murino anti proteina legante l'acido folico. Stabile a 2–8°C fino alla data di scadenza.

LKFO1: 100 unit. **LKFO5:** 500 unit.

Le buste delle unità di prova devono essere a temperatura ambiente prima di aprire. Aprire tagliando lungo il bordo superiore, lasciando intatto la chiusura ermetica. Risigillare le buste per proteggere contro umidità.

Porta Reagente Acido Folico (LFOA, LFOB)

Con codice a barre. **LFOA:** una porta (7,5 mL) contenente proteina legante l'acido folico, con conservanti. **LFOB:** una porta (7,5 mL) contenente fosfatasi alcalina (intestino di vitello) coniugata con anti-ligando in un tampone, con conservanti. Conservare chiuso nel frigorifero: stabile a 2–8°C fino alla data di scadenza. Si consiglia di utilizzare il prodotto entro 30 giorni dall'apertura se conservato nella maniera indicata.

LKFO1: 1 set. **LKFO5:** 5 set.

Calibratori Acido Folico (LFOL, LFOH)

Due fiale (bassa ed alta) di acido folico liofilo in una matrice umana a base proteica, con conservanti. Ricostituire ogni flacone con **3,0 mL** di acqua distillata o deionizzata. Lasciar riposare per 30 minuti. Mescolare agitando delicatamente o capovolgendo la miscela finché il materiale liofilo sia completamente dissolto. Stabile a 2–8°C per 30 giorni dopo la ricostituzione, o per 6 mesi (aliquotato) a –20°C.

LKFO1: 1 set. **LKFO5:** 2 set.

Nota: I calibratori devono essere bolliti come i campioni dei pazienti (vedere la sezione Pretrattamento dei campioni).

Folato Marcato con Ligando (LLLF)

5 mL di folato marcato con ligando in una soluzione tamponata a base di proteina umana. Stabile a 2–8°C per 30 giorni dopo l'apertura.

LKFO1: 1 flacone **LKFO5:** 5 flaconi

Soluzione/Tampone di Borato-KCN (LBCN)

125 mL di soluzione/tampone di Borato-KCN, con conservanti. Stabile a 2–8°C per 30 giorni dopo l'apertura.

Attenzione! Contiene cianuro! E' necessario fare molta attenzione al fine di evitare il contatto con questo reagente.

LKFO1: 1 flacone **LKFO5:** 5 flaconi

Soluzione di Ditiotreitolo (LDTT)

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

LKFO1: 1 flacone **LKFO5:** 5 flaconi

Componenti del Kit Forniti Separatamente

Diluyente dell'Acido Folico (LFOZ)

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

Acido Ascorbico

L'acido ascorbico è richiesto soltanto per le determinazioni del livello di acido folico nel sangue intero e nei globuli rossi. Occorre preparare una soluzione all'1% *fresca*, ogni giorno. I cristalli di acido ascorbico dovrebbero essere protetti dall'umidità in modo che non formino dei conglomerati (l'ascorbato di sodio *non* rappresenta una valida alternativa).

LSUBX: Substrato Chemiluminescente

LPWS2: Tampone di lavaggio dell'Ago

LKPM: Kit di Pulizia dell'Ago

LCHx-y: Tubi Porta Campioni (con codice a barre)

LSCP: Porta Campioni (monouso)

LSCC: Coperchi per Porta Campioni (opzionali)

CON6: 3 livelli, controllo multicomposto

Materiali Richiesti

Tubi di polipropilene 12×75 mm, con tappi non ermetici – disponibili presso la DPC.

Micropipette: 200 e 1 000 µL.

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

Foglio di alluminio – o altro per proteggere l'emolisato dalla luce.

Bagnetto termostato coperto (100°C).

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

Preparazione degli Emolisati

E' richiesta soltanto per le determinazioni di acido folico nel sangue intero. Prelevare il campione; determinare e registrare l'ematocrito. Lisare le cellule in sangue EDTA o eparinizzato fresco preparando una diluizione 1:21 del campione (completamente sospeso) in una soluzione fresca di acido ascorbico all'1%; per esempio, mescolare 100 µL di campione con 2 mL di questa soluzione. Vortexare e lasciare riposare per 90 min. a temperatura ambiente (15–28°C) al buio.¹⁰ Gli emolisati possono essere conservati a 2–8°C fino a 3 ore, o congelati a –20°C per 2 settimane.^{10,11} E' importante utilizzare l'acido ascorbico invece dell'ascorbato di sodio e preparare la soluzione all'1% fresca, ogni giorno.⁹

Preparazione della Soluzione di Lavoro

Nota: I campioni dosati sia per la vitamina B12 che per l'acido folico devono essere pretrattati con la soluzione di lavoro descritta di seguito.

La quantità di ogni componente dipende dal numero di dosaggi da eseguire. I volumi richiesti, in microlitri per dosaggio, sono tabulati di seguito. Assicurarsi di moltiplicare questi volumi per un numero maggiore del numero di dosaggi da eseguire. (I componenti sono forniti in volumi sufficienti per la preparazione della soluzione di lavoro con un eccesso di circa il 20%).

	µL/test
Soluzione/Tampone Borato-KCN	1 000
Folato marcato con ligando	20
Soluzione di Ditiotreitolo	20

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

Pretrattamento del Campione

1. Dispensare **200 µL** di ogni Calibratore, Controllo o Campione del Paziente – siero, plasma, o emolisato – nelle provette preparate.

Per i campioni che presentino livelli di acido folico maggiori del limite superiore del range di calibrazione del dosaggio, diluire il siero, il plasma o l'emolisato con il Diluente dell'acido folico.

2. Aggiungere **1 000 µL** di Soluzione di Lavoro a tutte le provette. Vortexare.
3. Mettere il tappo a tutte le provette e metterle in un bagnetto termostato di acqua coperto e bollente (100°C) per **15 – 20 minuti**.
4. Rimuovere le provette dal bagnetto termostato e raffreddarle in un bagno di acqua a temperatura ambiente per **5 minuti**.
5. Dispensare almeno **350 µL** di campione trattato in un porta campioni IMMULITE.

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

Procedura del Dosaggio

Attenzione: per avere prestazioni ottimali, è importante effettuare le procedure di manutenzione di routine cosiccome definito nel Manuale dell'Operatore IMMULITE o IMMULITE 1000.

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

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

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

Dopo il pretrattamento del campione, analizzare il campione *trattato* secondo la normale procedura prevista dal dosaggio. (Il porta campioni deve contenere almeno 250 µL più del volume totale richiesto).

Ogni tubo porta campioni contenente il campione pretrattato può essere fatto seguire da quattro test unit al massimo.

Intervallo di Calibrazione Consigliato: 2 settimane.

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

Calcoli

Risultati nel Sangue Intero e nei Globuli Rossi

Calcolare prima il risultato R in nanogrammi per millilitro dell'emolisato, poi moltiplicare per il fattore di diluizione 21 per ottenere la concentrazione di acido folico nel sangue intero, in ng/mL. Per una misurazione approssimativa della concentrazione nei globuli rossi, di nuovo in ng/mL, moltiplicare la concentrazione di acido folico nel sangue intero per $100/H$, dove H è l'ematocrito in percentuale:

Concentrazione di acido folico nei globuli rossi $\approx 21R \times (100 / H)$

L'acido folico nel siero dovrebbe essere sottratto dalla concentrazione di acido folico nel sangue intero prima di moltiplicare per $100/H$. Utilizzando il livello di acido folico nel siero del paziente S , l'equazione esatta è:

Concentrazione di acido folico nei globuli rossi =
 $21R - [S \times (100 - H) / 100] \times (100 / H)$

In molti casi però il termine nelle parentesi quadre è così basso paragonato al termine $21R$ che potrebbe essere anche tralasciato.

Valori Attesi

Poiché i livelli di acido folico sono molto influenzati dalla dieta e dagli integratori alimentari, i range di riferimento basati sulla popolazione possono mostrare marcate differenze demografiche. Negli Stati Uniti ad esempio, l'aggiunta di vitamine ai farinacei, cosiccome richiesto dal Food and Drug Administration dal 1996, ha portato ad una stima doppia della media del livello di folati nel plasma tra soggetti che non facevano uso di integratori alimentari,¹⁴ ed un decremento nella prevalenza di livelli bassi di folati, ad es.: livelli inferiori a 3 ng/mL (7 nmol/L).¹⁴ Ci si attende che programmi di

integrazione alimentare abbiano un impatto simile sul sangue intero e sui livelli di globuli rossi, che costituiscono stime più attendibili delle riserve presenti nei tessuti.

Sulla base del suo rapporto con il kit Solid Phase No Boil Dualcount della DPC (vedi Confronto di Metodi), ci si attende che il dosaggio abbia i seguenti range di riferimento. Nota: Lo studio sul range di normalità del dosaggio Dualcount è stato effettuato negli Stati Uniti prima che l'FDA introducesse il programma di aggiunta di vitamine ai farinacei.

Acido folico nel siero	3 – 17 ng/mL (6 – 39 nmol/L)
Acido folico nel sangue intero	43 – 295 ng/mL (97 – 668 nmol/L)
Acido folico nei globuli rossi	93 – 641 ng/mL (212 – 1 453 nmol/L)

Sono stati condotti studi sull'acido folico nel siero utilizzando il dosaggio della DPC in fase solida senza ebollizione: rispettivamente su 100 individui sani per l'acido folico nel siero e su 88 individui sani per l'acido folico nei globuli rossi. I gruppi sono stati composti principalmente da personale del laboratorio, sia uomini che donne, apparentemente in buona salute. Gli studi di riferimento sono stati condotti negli Stati Uniti.

Ogni laboratorio dovrebbe stabilire i propri range di riferimento.

Limiti

La proteina che lega il folato impiegata nel porta reagenti crossreagisce con il metotrexato (MTX), un farmaco "anti-folato" utilizzato nel trattamento chemioterapico del cancro. (Vedi la sezione Specificity). Siccome le infusioni di metotrexato a dosi elevate possono causare iniziali livelli circolanti di 45 000 ng/mL e livelli dell'ordine di circa 2 000 ng/mL 48 ore dopo, il kit non dovrebbe essere utilizzato per la misurazione dell'acido folico in pazienti cui viene somministrato il farmaco. Inoltre, è necessario essere molto prudenti nell'interpretazione dei livelli di acido folico in pazienti che sono stati recentemente sottoposti a terapia con metotrexato o con un altro farmaco a struttura simile.

E' necessario essere prudenti anche nell'interpretazione dei risultati di acido

folico prossimi al limite inferiore del range di normalità.¹⁰

Gli anticorpi eterofili presenti nel siero umano possono reagire con le immunoglobuline presenti nelle componenti del dosaggio provocando un'interferenza con i dosaggi in vitro. [Vedi Boscato LM, Stuart MC. Heterophilic antibodies: a problem for all immunoassays. Clin Chem 1988;34:27-33.] Campioni di pazienti routinariamente esposti agli animali o a prodotti derivati da siero di animali possono presentare questo tipo di interferenza causa potenziale di risultati anomali. Questi reagenti sono stati formulati per minimizzare il rischio di interferenze, tuttavia, possono verificarsi interazioni potenziali tra sieri rari e componenti del test. A scopo diagnostico, i risultati ottenuti con questo dosaggio devono sempre essere utilizzati unitamente all'esame clinico, all'anamnesi del paziente e ad altre indagini di laboratorio.

Prestazioni del Dosaggio

Vedere le tabelle e le grafiche per i dati *rappresentativi* delle prestazioni della prova. I risultati sono espressi in ng/mL. Per convertire i valori da ng/mL a unità S.I., nanomoli per litro (nmol/L), moltiplicare per 2,266:

Fattore di Conversione:

ng/mL × 2,266 → nmol/L

Range di Calibrazione: 0,5 – 24 ng/mL (1,13 – 54 nmol/L).

Sensibilità Analitica: 0,3 ng/mL (0,7 nmol/L).

Precisione intradosaggio (in una stessa seduta): Sono state calcolate statistiche per campioni dai risultati di 20 ripetizioni in un' unica seduta (Vedere la tabella "Intraassay Precision").

Precisione interprove (Da un'esecuzione all'altra): Sono state calcolate statistiche per campioni dai risultati di 20 esecuzioni diverse (Vedere la tabella "Interassay Precision").

Linearità: I campioni sono stati provati sotto varie diluzioni (Vedere la tabella "Linearity" per i dati rappresentativi).

Recupero: Sono stati analizzati i campioni etichettati da 1 a 19 con tre soluzioni di acido folico (42, 137 e 211 ng/mL).

(Vedere la tabella "Recovery" per i dati rappresentativi).

Specificità: La proteina legante utilizzata nel dosaggio dell'acido folico IMMULITE è altamente specifica, con bassa crossreattività vs.sostanze, diverse dal metotrexato, che possono essere presenti nei campioni dei pazienti.

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

Tipo di Campione Alternativo: Campioni prelevati da 19 individui (in provette semplici ed eparinizzate) sono stati analizzati mediante il dosaggio IMMULITE per l'acido folico.

(Eparinizzato) = 0,98 (Siero) + 0,26 ng/mL
r = 0,99

Valore Medio:
6,8 ng/mL (Siero)
7,0 ng/mL (Eparinizzato)

Siccome l'anticoagulante EDTA ha un effetto significativo sui risultati, il plasma EDTA non dovrebbe essere utilizzato nel dosaggio come alternativa al siero o al plasma eparinizzato.

Possono essere utilizzati campioni di sangue intero EDTA per la determinazione dell'acido folico nel sangue intero e nei globuli rossi.

Comparazione di Metodi (Campioni di siero):

Il dosaggio IMMULITE Acido Folico è stato comparato al dosaggio Dualcount Solid Phase No Boil (SPNB) della DPC in 71 campioni di siero. (Gamma di concentrazione: da 1,4 fino a 20,3 ng/mL. Vedere la grafica.) Mediante regressione lineare:

(IML) = 1,05 (SPNB) – 0,57 ng/mL
r = 0,985

Valore medio:
5,9 ng/mL (IMMULITE)
6,2 ng/mL (SPNB)

Comparazione di Metodi (Emolisati): Il dosaggio IMMULITE Acido Folico è stato comparato al dosaggio DPC Dualcount Solid Phase No Boil (SPNB) in 45 campioni emolisati. (Gamma di concentrazione: circa da 156 a 973 ng/mL. Vedere la grafica.) Mediante regressione lineare:

(IMMULITE) = 1,05 (SPNB) – 41 ng/mL
r = 0,985

Valore Medio:
345 ng/mL (IMMULITE)
369 ng/mL (SPNB)

Assistenza Tecnica

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

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

Português

Ácido Fólico

Utilização: Para o doseamento quantitativo *in vitro* de ácido fólico no soro, plasma heparinizado ou sangue total completo tratado com ácido ascórbico, no auxílio do diagnóstico clínico e tratamento de anemia, em conjunto com o Analisador IMMULITE e IMMULITE 1000.

Números de catálogo: **LKFO1** (100 testes), **LKFO5** (500 testes)

Código do teste: **FOL**

Cor: **Laranja**

Sumário e explicação do teste

O ácido fólico (folato) e a vitamina B₁₂ são nutrientes essenciais para a hematopoiese.¹ A anemia megaloblástica é quase sempre causada pela ausência de uma destas duas vitaminas.¹ Níveis de folato circulante são geralmente normais ou elevados na deficiência de vitamina B₁₂, mas os níveis de folato nas hemácias são frequentemente baixos nesta condição.²

A deficiência de folato é normalmente observada em consequência de uma dieta deficiente (como no caso de alcoolismo) ou carência crescente desta vitamina (como na gravidez).^{1,3} Ao contrário da vitamina B₁₂, o folato é uma vitamina afectada pelo calor, susceptível a perda de acção se os alimentos forem cozinhados tempo demais. Consequentemente, a prevalência de deficiência de folato apresenta importantes variações demográficas, reflectindo aparentemente diferenças em hábitos culinários e de dieta.⁴

Os níveis de folato circulante, por serem fortemente influenciados pela ingestão recente de alimentos, não são fiáveis como índice de armazenamento nos tecidos.^{2,5,6} Desta forma, os níveis de folato medidos em soro ou plasma podem ser normais mesmo em face de deficiência de folato. Inversamente, os níveis circulantes podem estar baixos muito antes do depósito em tecido ter sido esgotado.^{2,6} Consequentemente, é também importante medir os níveis de folato nas hemácias sempre que níveis de soro ou plasma forem medidos.^{5,7,8}

Princípio do Procedimento

Imunoensaio competitivo.

O Ácido Fólico IMMULITE é um método com fervura, competitivo, em fase líquida, marcado com ligando, quimioluminescente com proteína de ligação imobilizada *in situ* com um sistema de detecção anti-ligando. A fase sólida, esfera de poliestireno inserida numa Unidade de Teste, está revestida com um anticorpo monoclonal murino específico para a proteína ligante de ácido fólico.

Após o procedimento de preparação da amostra, a amostra, o análogo de ácido fólico marcado com análogo e a proteína de ligação do ácido fólico são simultaneamente introduzidos na Unidade de Teste, e incubados aproximadamente 30 minutos a 37°C com agitação intermitente. Durante este tempo, o ácido fólico nas amostras compete com o análogo de ácido fólico marcado com ligando para uma quantidade limitada de proteína de ligação do ácido fólico, a qual é capturada pelo anticorpo na esfera. (O análogo não ligado é então removido por lavagem centrífuga.)

Ciclos de incubação: 2 × 30 minutos.

Colheita

O doente deve estar em jejum.¹⁰

Para determinações de ácido fólico no sangue total e em hemácias, use sangue total fresco heparinizado ou com EDTA. O hematócrito do doente deve ser conhecido para traduzir o sangue total em resultados de ácido fólico nas hemácias, que são expressos em nanogramas por mililitro (ng/mL) de hemácias tamponizadas. Além disso, para calcular

exactamente o resultado de ácido fólico nas hemácias, o nível de ácido fólico no soro do doente também deve ser conhecido.

O plasma com EDTA não deve ser usado como um tipo de amostra.

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

As amostras de soro hemolizadas são impróprias para análise.

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

Os tubos para colheita sanguínea de diferentes fabricantes, podem originar diferentes valores, dependendo dos materiais e aditivos, incluindo gel ou barreiras físicas, activadores do coágulo e/ou anti coagulantes.

IMMULITE/IMMULITE 1000 Ácido Fólico 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 amostra — soro, plasma ou hemolisado — são necessários para a etapa de pré-tratamento da amostra. Uma única determinação usa 100 µL da amostra *tratada*: a cuvete de amostra deve conter um mínimo de 250 µL de amostra tratada além do volume total de amostra para o número de determinações de ácido fólico a serem realizadas.

Estabilidade

Soro ou plasma heparinizado : A estabilidade sob condições adequadas é um factor crítico para garantir resultados fiáveis de ácido fólico. Caso a amostra *não* seja doseada em 8 horas, separar por alíquotas e congelar a -20°C: estável 6–8 semanas.¹³ Descongele apenas uma vez (à temperatura ambiente). Evite exposição excessiva das amostras à luz directa.

Precauções

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

Para uso de diagnóstico *in vitro*.

Reagentes: Manter a 2–8°C. Elimine de acordo com as leis aplicáveis.

Manipule com as devidas precauções todos os materiais capazes de transmitir doenças infecciosas. As matérias primas, obtidas de soro humano, foram testadas, revelando resultados negativos para a sífilis, para os 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.

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

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

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

Água: Use água destilada ou deionizada.

Materiais Fornecidos

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

Unidades de Teste de Ácido Fólico (LFO1)

Cada unidade identificada com código de barras contém uma pérola revestida com anticorpo de proteína de ligação monoclonal de rato, anti-ácido fólico. Estável até a data de validade a 2–8°C.

LKFO1: 100 unidades.

LKFO5: 500 unidades.

Antes de abrir as saquetas com Unidades de Teste, deixe que estas atinjam a temperatura ambiente. Corte as saquetas pela borda superior, mantendo o fecho

intacto. Feche novamente as saquetas para proteger contra a humidade.

Embalagens de Reagente de Ácido Fólico (LFOA, LFOB)

Com código de barras. **LFOA**: uma embalagem (7,5 mL) com proteína de ligação de ácido fólico, com conservante. **LFOB**: uma embalagem (7,5 mL) com fosfatase alcalina (de intestino de vitela) conjugado com anti-ligante tamponizado, com conservante. Armazene tapado e refrigerado: Estável até à data de validade a 2–8°C. Recomenda-se a utilização até 30 dias após aberto quando armazenado de acordo com as indicações.

LKFO1: 1 conjunto. **LKFO5**: 5 conjuntos.

Ajustes Ácido Fólico (LFOL, LFOH)

Dois fracos (nível alto e baixo) de ácido fólico liofilizado numa matriz baseada em proteína humana, com conservante.

Reconstitua cada frasco com **3,0 mL** de água destilada ou desionizada. Deixe repousar durante 30 minutos. Misture por inversão ou movimentos lentos até o material liofilizado dissolver completamente. Estável, após a reconstituição, durante 30 dias a 2–8°C, ou por 6 meses (aliquotado) a –20°C.

LKFO1: 1 conjunto. **LKFO5**: 2 conjuntos.

Nota: Os Ajustes devem ser fervidos como as amostras de doentes (veja a secção de Pré-tratamento de Amostras).

Folato marcado com ligante (LLLFF)

5 mL de folato marcado com ligante em solução baseada em proteína humana tamponizada, com conservante. Estável por 30 dias a 2–8°C.

LKFO1: 1 frasco **LKFO5**: 5 frascos

Solução Tamponizada de Borato-KCN (LBCN)

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

Atenção! Contém cianeto. *Extremo cuidado deve ser praticado para evitar qualquer contacto corporal com este reagente.*

LKFO1: 1 frasco **LKFO5**: 5 frascos

Solução Ditiotreitól (LDTT)

3 mL de solução de ditiotreitól. Estável por 30 dias a 2–8°C.

LKFO1: 1 frasco **LKFO5**: 5 frascos

Componentes do kit fornecidos separadamente

Diluyente de amostra para Ácido Fólico (LFOZ)

Para a diluição manual de amostras de doentes. 25 mL de matriz humana baseada em proteína, com conservante. Estável, após a abertura, durante 30 dias a 2–8°C, ou por 6 meses (aliquotado) a –20°C.

Ácido ascórbico

Necessário apenas para determinações de ácido fólico em hemácias e sangue total. Uma solução de 1% deve ser preparada fresco e diariamente. Os cristais de ácido ascórbico devem ser protegidos contra a humidade de modo a permanecerem livres, para evitar de se unirem em blocos devido à humidade excessiva. (Ascorbato de sódio *não* é uma alternativa adequada.)

LSUBX: Substrato quimioluminescente

LPWS2: Solução de lavagem

LKPM: Kit de limpeza do pipetador

LCHx-y: Suportes de Cuvetes de

Amostra (com código de barras)

LSCP: Cuvetes de Amostra (descartáveis)

LSCC: Tampa de Cuvetes de Amostra (opcional)

CON6: Controlo multiparamétrico de três níveis.

Também necessário :

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

Micropipetas: 200 µL e 1 000 µL.

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

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

Banho-maria a ferver coberto (100°C).

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

Preparação dos Hemolisados

Este procedimento é necessário apenas para determinações de ácido fólico no sangue total. Recolha a amostra; determine e registe o hematócrito. Alise as células em sangue total EDTA ou heparinizado obtido fresco, preparando

uma diluição de 1 para 21 da amostra (em suspensão completa) numa solução de 1% de ácido ascórbico, preparada de fresco; por exemplo, misture 100 µL da amostra com 2 mL desta solução. Vortex e deixe repousar por 90 minutos à temperatura ambiente (15–28°C) no escuro.¹⁰ Hemolisados podem ser armazenados a 2–8°C por até 3 horas, ou congelados a –20°C por 2 semanas.^{10,11} É importante usar ácido ascórbico, em vez de ascorbato de sódio, e preparar a solução de 1% de fresco, diariamente.⁹

Preparação da Solução de Trabalho

Nota: As amostras a serem testadas tanto para vitamina B12 como para ácido fólico devem ser pré-tratadas com a Solução de Trabalho descrita a seguir.

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

	µL/teste
Solução Tamponizada de Borato-KCN	1 000
Folato marcado com Ligante	20
Solução de Ditiotreitól	20

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

Pré-tratamento de Amostra

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

Para amostras de doentes, onde se esperam níveis de ácido fólico acima do limite superior de calibração do doseamento, dilua o soro, plasma, ou hemolisado com o Diluente de Amostra de Ácido fólico.

2. Adicione **1 000 µL** da Solução de Trabalho a todos os tubos. Vortex.
3. Tape, sem apertar, todos os tubos e coloque-os em banho-maria, de água a ferver, com tampa (100°C) por **15 – 20 minutos**.
4. Remova os tubos do banho-maria a ferver, e deixe-os esfriar num banho-maria à temperatura ambiente por **5 minutos**.
5. Retire pelo menos **350 µL** da amostra tratada numa cuvete de amostra IMMULITE.

As amostras tratadas, tanto de soro como de sangue total, são estáveis à temperatura ambiente (15–28°C) ou refrigeradas a 2–8°C por 1 hora antes do doseamento. Note que *controles* comercialmente disponíveis, podem apresentar estabilidade *variável* após o tratamento.

Procedimento de doseamento

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

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

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

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

Após o Pré-tratamento da Amostra, processe a amostra *tratada* de acordo com o procedimento usual de doseamento. (Cuvete de amostra deve conter pelo menos 250 µL a mais que o volume total exigido.)

Cada suporte de cuvete contendo amostra pré-tratada pode ser seguida de 4 unidades de teste.

Intervalo entre ajustes aconselhável: 2 semanas.

Amostras de controlo de qualidade: utilize controlos ou "pools" com, pelo

menos, dois níveis (alto e baixo) de ácido fólico.

Cálculos

Resultados de Hemácias e Sangue Total

Primeiro calcule o resultado *R* em nanogramas por mililitro do hemolisado. Depois, multiplique pelo factor de diluição 21 para obter a concentração de ácido fólico no sangue total, em ng/mL. Para uma medição aproximada da concentração de hemácias tamponizadas, (novamente em ng/ml), multiplique a concentração de ácido fólico no sangue total por $100/H$, onde *H* é o hematócrito em percentagem:

$$\text{Ácido fólico de hemácia} \approx 21R \times (100 / H)$$

Estritamente falando, a contribuição de ácido fólico no soro deve ser subtraída da concentração de ácido fólico no sangue total antes de multiplicar por $100/H$. Usando o nível *S* de ácido fólico no soro do doente, a equação exacta é:

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

O termo entre parêntesis rectos é, na maioria dos casos, tão pequeno em relação ao termo $21R$ que pode ser justificadamente ignorado.

Valores de Referência

Dado que os níveis de ácido fólico são fortemente influenciados pelo tipo de dieta alimentar e suplementos, os limites de referência baseados na população podem apresentar diferenças demográficas significativas. Nos Estados Unidos, por exemplo, a fortificação de produtos de cereais enriquecidos, requerida pela Food and Drug Administration (Administração dos Alimentos e das Drogas) desde 1996, levou a que os níveis médios dos valores de folato no plasma subissem sensivelmente para o dobro em indivíduos que não utilizam suplementos de vitaminas,¹⁴ e uma diminuição na prevalência de níveis baixos de folatos, i.e. níveis inferiores a 3 ng/mL (7 nmol/L).¹⁴ É de prever que programas de fortificação tenham um impacto semelhante nos níveis em sangue total e de folato em hemácias, que são

considerados como melhores medidas de armazenamento em tecido.

Com base na sua relação com o doseamento de Fase Sólida sem fervura Dualcount da DPC (veja Comparação de Métodos), prevê-se que o doseamento tenha os seguintes limites de referência. Note: O estudo de valores normais da Dualcount foi levado a cabo nos Estados Unidos antes dos requerimentos de fortificação terem sido postos em vigor pela FDA (Food and Drug Administration).

Ácido fólico em soro	3 – 17 ng/mL (6 – 39 nmol/L)
Ácido fólico em sangue total	43 – 295 ng/mL (97 – 668 nmol/L)
Ácido fólico em hemácias	93 – 641 ng/mL (212 – 1 453 nmol/L)

Estudos utilizando o Kit de Fase Sólida sem fervura da DPC foram conduzidos em 100 indivíduos saudáveis, para ácido fólico em soro, e 88 indivíduos saudáveis para ácido fólico em hemácias. Os grupos consistiam principalmente em funcionários de laboratório, tanto homens como mulheres, aparentemente saudáveis. Os estudos de intervalo de referência foram realizados nos Estados Unidos.

Cada laboratório deve estabelecer os seus próprios valores de referência.

Limitações

A proteína de ligação de folato empregue na embalagem de reagente apresenta uma certa reactividade cruzada ao medicamento "anti-folato" metotrexato (MTX), um composto utilizado na quimioterapia para o tratamento de cancro. (Veja a secção de Especificidade.) Já que infusões de altas doses de metotrexato podem resultar em níveis circulantes de 45 000 ng/mL inicialmente e níveis na ordem de 2 000 ng/mL, 48 horas depois, assim, o kit não deve ser usado para medições de ácido fólico em doentes a receber este medicamento. Além disso, deve ter-se extremo cuidado ao interpretar níveis de ácido fólico em doentes que se submeteram recentemente à terapia com metotrexato ou qualquer outro medicamento com estrutura semelhante.

Os resultados de Ácido fólico próximos do limite inferior devem ser interpretados com cuidado.¹⁰

Os anticorpos heterófilos no soro humano podem reagir com as imunoglobulinas presentes no ensaio, causando interferência com os imunoenaios in vitro. [Ver Boscatto LM, Stuart MC. Heterophilic antibodies: a problem for all immunoassays. Clin Chem 1988;34:27-33.] Amostras de doentes expostas em rotina a produtos ou soros de animais podem demonstrar este tipo de interferência, potencial causador de resultados anómalos. Estes reagentes foram formulados para minimizar o risco de interferência, contudo podem ocorrer potenciais interações entre soros (raros) e componentes do teste. Para fins de diagnóstico, os resultados obtidos neste ensaio devem ser sempre analisados em combinação com o exame clínico, história de medicação do doente e outros achados que possam correlacionar.

Características do Ensaio

Consulte Tabelas e Gráficos para dados *representativos* do desempenho do doseamento. Os resultados são apresentados em ng/mL. Para converter de ng/ml para unidades do S.I., nanomoles por litro (nmol/L), multiplicar por 2,266:

Factor de conversão:
ng/mL × 2,266 → nmol/L

Calibração: 0,5 – 24 ng/mL
(1,1 – 54 nmol/L).

Sensibilidade Analítica: 0,3 ng/mL
(0,7 nmol/L).

Precisão Intra-ensaio (Entre ensaios):
Cálculos estatísticos foram efectuados para os resultados de 20 réplicas num único ensaio. (Consulte a tabela "Intraassay Precision" (Precisão Intra-ensaio))

Precisão Inter-ensaio (Ensaio a ensaio): Cálculos estatísticos foram efectuados para os resultados para 20 réplicas. (Consulte a tabela "Interassay Precision" (Precisão Inter-ensaio).)

Linearidade: As amostras foram doseadas sob várias diluições. (Consulte a tabela "Linearity" para dados representativos.)

Recuperação: As amostras foram adicionadas na relação de 1 para 19 com três soluções de Ácido Fólico (42, 137 e 211 ng/mL) antes do doseamento. (Ver tabela de "Recovery" para dados representativos.)

Especificidade: A proteína de ligação usada no procedimento de Ácido fólico IMMULITE é específica para ácido fólico, com baixa reactividade cruzada com outras substâncias, além do metotrexato, que pode estar presente em amostras de doentes.

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

Tipo de amostras alternativas:
Amostras colhidas de 19 indivíduos (em tubos de contenção a vácuo heparinizados e simples) foram doseadas pelo procedimento de Ácido Fólico IMMULITE.

(Heparinizado) = 0,98 (Soro) + 0,26 ng/mL
r = 0,99

Médias:
6,8 ng/mL (Soro)
7,0 ng/mL (Heparinizado)

Como o anticoagulante EDTA apresenta um efeito significativo nos resultados, plasma com EDTA não deve ser usado no doseamento como uma alternativa a soro ou plasma heparinizado.

O sangue total com EDTA pode ser usado para a determinação de ácido fólico nos glóbulos vermelhos, no sangue total.

Comparação de Métodos (Amostras de Soro): O procedimento de Ácido fólico IMMULITE foi comparado ao doseamento de Fase Sólida sem fervura Dualcount (SPNB) da DPC em 71 amostras de soros. (Zona de trabalho: aproximadamente 1,4 a 20,3 ng/mL. Consulte o gráfico.) Regressão linear:

(IML) = 1,05 (SPNB) – 0,57 ng/mL
r = 0,985

Médias:
5,9 ng/mL (IMMULITE)
6,2 ng/mL (SPNB)

Comparação de Métodos (Hemolisados): O procedimento de Ácido fólico IMMULITE foi comparado ao doseamento de Fase Sólida sem fervura Dualcount (SPNB) da DPC em 45 amostras de hemolisados. (Valores de

concentração. approx. 156 a 973 ng/mL.
Consulte o gráfico.) Regressão linear:

(IMMULITE) = 1,05 (SPNB) – 41 ng/mL
 $r = 0,985$

Médias:

345 ng/mL (IMMULITE)

369 ng/mL (SPNB)

Assistência Técnica:

Por favor contacte o seu Distribuidor Nacional.

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

DPC[®]

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

2005-09-20

PILKFO – 6



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