



VITAMINA B12 (VB12 TEST SYSTEM)

Código de producto: 7675-300

Uso previsto: Determinación cuantitativa de la concentración total de vitamina B12 en suero o plasma humano mediante prueba inmunológica de quimioluminiscencia en microplaca.

RESUMEN Y EXPLICACIÓN DE LA PRUEBA:

La Vitamina B 12 es una de las nueve vitaminas hidrosolubles importantes en el funcionamiento saludable del cuerpo humano.

Los roles más importantes de la vitamina B12 están referidos a la formación de glóbulos rojos en la sangre, la formación de mielina alrededor de los nervios. Los síntomas relacionados a la falta de Vitamina B12 a veces son ambiguos. Una deficiencia puede notarse en meses o años dependiendo de las causas y de la salud de la persona.

Dos de las causas más comunes de la deficiencia de Vitamina B12 son la dieta y la edad. Porque muchas fuentes de vitamina B12 son procedentes de animales la falta de esta vitamina justamente comienza por lo hábitos alimenticios de la gente.

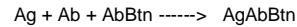
Al ingresar la vitamina B12 al organismo mediante la ingesta, la digestión se inicia con la saliva, luego la vitamina B12 se une a las proteínas de los alimentos que son liberados por los ácidos. Luego la B12 se une a Factor Intrínseco convirtiéndose en una sustancia suficientemente estable para viajar a través del tubo intestinal donde puede ser absorbida gracias a la asociación con el Factor Intrínseco (FI).

Existen dos pruebas útiles para distinguir entre deficiencias de Vit. B12 y Folato, estas pruebas son: metilmalonil CoA (MMA) y homocisteína (hcy); ambas deficiencias son representadas por síntomas similares aunque ambas muestran aumento de niveles de homocisteína, solamente la deficiencia de vit B12 causa un incremento en los niveles de metilmalonil CoA. Niveles altos de estos dos metabolitos en la sangre causan incrementos de estrés oxidativo a las células por lo tanto ocasionan apoptosis. En cambio las enfermedades vasculares resultan en la forma de arterioesclerosis, enfermedades coronarias y/o neurodegeneración (ex. Enfermedad de Parkinson)

PRINCIPIO

Ensayo inmunoenzimático de competencia (tipo 9)

Los reactivos esenciales requeridos para un inmunoensayo enzimático incluyen anticuerpos, conjugado enzima-antígeno y antígeno nativo. Mezclando el anticuerpo biotinilado, el conjugado enzima-antígeno y un suero que contiene el antígeno nativo, se produce una reacción de la competencia entre el antígeno nativo y el conjugado antígeno enzima para un número limitado de sitios de enlace. La interacción es ilustrada por la ecuación seguida:



Ab = anticuerpo biotinilado
Ag = Antígeno Nativo (cantidad variable)
AgAb = complejo inmune
Después de una corta incubación se agrega el conjugado enzimático, luego de lo cual hay una reacción de competencia entre el análogo de la enzima y el antígeno en la muestra por un número limitado de anticuerpos.



Ag = enzima-antígeno conjugado (cantidad constante)
AgAbBtn = Complejo Antígeno-Anticuerpo biotina
rAbB = Anticuerpo biotina no reaccionado en la primera incubación
k = constante de velocidad de la Asociación
ak = tasa constante de disociación
-Ak = k / k = constante de equilibrio

Se produce una reacción simultánea entre la biotina unida al anticuerpo y la estreptavidina inmovilizada en el pocillo. Esto ocasiona la separación del anticuerpo al momento de la decantación y los lavados.

AgAbBtn + EnzAgAbBtn + StreptavidinCW \rightarrow inmovilizados complejos
StreptavidinCW = estreptavidina inmovilizada en bien
Complejo inmovilizado = Complejo sándwich unido a la superficie sólida.

La actividad de la enzima en la fracción de anticuerpo unido es inversamente proporcional a la concentración de antígeno nativo. Al utilizar varios sueros de referencia de concentración conocida se genera una curva de dosis-respuesta en la cual es posible posteriormente medir la concentración de un suero desconocido.

REACTIVOS

Materiales Provistos:

- A. Suero Humano Vitamina B-12** 1.0 ml/vial A-F Seis(6) viales de suero referencia con vitamina-B12 en niveles de 0(A), 100(B), 200(C), 400(D), 1000(E) y 2000(F) pg/ml.. Almacenar de 2 – 8° C Se agregó preservante.
- B. Reactivo trazador Vitamina B-12** - 6.0 ml/fco Un (1) frasco conteniendo peroxidasa de rábano picante conjugado en una matriz de proteínas estabilizado con colorante rojo. Almacenar de 2 – 8° C
- C. Reactivo Biotina Vitamina B-12** - 6.0 ml/fco Un frasco conteniendo conjugado anti Vitamina B12 más biotina y anticuerpo de conejo. En buffer, colorante azul y preservante.
- D. Microplaca de 96 pocillos** de reacción cubiertos con estreptavidina y empacada en bolsa de aluminio con un agente desecante. Almacenar de 2 – 8° C
- E. Solución de lavado concentrado – 20 ml** Un (1) frasco conteniendo surfactante en buffer salino. Se agregó preservante. Almacenar de 2 – 8° C (ver sección Preparación de Reactivos)
- F. Reactivo señal A – 7.0 ml/vial** Un (1) frasco conteniendo luminol en buffer. Almacenar de 2 – 8° C (ver sección Preparación de Reactivos)
- G. Reactivo señal B – 7.0 ml/vial** Un (1) frasco conteniendo Peróxido de Hidrógeno (H2O2) en buffer. Almacenar de 2 – 8° C (ver sección Preparación de Reactivos)
- H. Agente de Liberación – 12 ml/fco** Un (1) frasco conteniendo una base fuerte hidróxido de sodio y potasio. Almacenar de 2 – 8° C (ver sección Preparación de Reactivos)
- I. Agente Estabilizante – 0.5 ml/fco** Un (1) frasco conteniendo dithiothreitol(DTT) Almacenar de 2 – 8° C (ver sección Preparación de Reactivos)
- J. Agente Neutralizador – 7.0 ml/fco** Un (1) frasco conteniendo buffer que reduce la extracción de la muestra. Almacenar de 2 – 8° C (ver sección Preparación de Reactivos)
- K. Inserto de instrucciones**

Nota 1: No usar los reactivos después de su fecha de expiración.

Nota 2: Los reactivos abiertos son estables por sesenta (60) días cuando se almacenan de 2 a 8° C

Nota 3: Los reactivos anteriormente descritos corresponde a una microplaca de 96 pocillos.

Materiales requeridos pero no Provistos:

- 1.- Pipeta capaz de dispensar 25 ul y 50 ul con precisión de 1.5 %.
- 2.- Dispensador de capacidad: 0.100 ml y a 0.350 ml con precisión de 1.5 %
- 3.- Dispensador de volumen ajustable (200 a 1000 uL)
- 4.- Lavador de microplacas o una pizeta (opcional).
- 5.- Luminómetro de microplacas.
- 6.- Tubos de ensayo para diluciones

- 7.- Papel absorbente para secar los pocillos de la microplacas.
- 8.- Cubierta plástica para tapar las microplacas durante las incubaciones.
- 9.- Aspirador al vacío (opcional) para los procesos de lavado.
- 10.- Reloj cronómetro.
- 11.- Materiales de control de calidad.

PRECAUCIONES:

Solo para uso diagnóstico in vitro, no es para uso interno o externo en humanos o animales.

Todos los productos que contienen suero humano se han encontrado no reactivos para antígeno de superficie de hepatitis B, VIH 1 y 2 y de HCV requeridas por la FDA. Puesto que ninguna prueba puede ofrecer completa seguridad ante la existencia de agentes infecciosos, todos los productos de suero humano deben ser tratados como potencialmente peligrosos y capaces de transmitir la enfermedad. Los buenos procedimientos de laboratorio para la manipulación de productos sanguíneos se pueden encontrar en el Centro de Control de Enfermedades / Instituto Nacional de Salud, "Bioseguridad en laboratorios microbiológicos y biomédicos," 2ª Edición, 1988, el HHS Publication No. (CDC) 88-8395.

RECOLECCION Y PREPARACION DE LAS MUESTRAS:

Las muestras de sangre, suero o plasma heparanizado se deben tomar siguiendo las precauciones habituales para la extracción de muestras de sangre por punción venosa. La sangre debe recogerse en un tubo tapa roja (con o sin aditivos gel) tubos al vacío que contengan heparina. Permitir que la sangre coagule para obtener el suero. Centrifugar la muestra para separar el suero o plasma de las células. Las muestras se pueden refrigerar en 2-8 ° C durante un periodo máximo de cinco (5) días. Si la muestra (s) no se puede probar en este plazo, la muestra (s) puede ser almacenado a temperaturas de -20 ° C durante un máximo de 30 días. Evitar la congelación y descongelación de las muestras.

CONTROL DE CALIDAD

Cada laboratorio debe tener controles en los niveles en el rango bajo, normal y alto para el seguimiento de los resultados del ensayo. Estos controles deben ser tratados como desconocidos y valores determinados en cada procedimiento de prueba realizada. Debe mantenerse los cuadros de resultados de control de calidad para hacer el seguimiento del funcionamiento de los reactivos suministrados. Los métodos estadísticos pertinentes deben ser empleados para determinar las tendencias. El laboratorio de manera individual debe establecer los límites aceptables de

rendimiento del ensayo. Además, la luminosidad máxima debe ser coherente con la experiencia pasada. Las desviaciones significativas del funcionamiento establecido pueden indicar cambios inadvertidos en condiciones experimentales o la degradación de los reactivos del kit. Reactivos frescos deben ser usados para determinar la razón de las variaciones.

PREPARACION DE LOS REACTIVOS:

1. Buffer de Lavado Diluir la solución de lavado concentrada, con agua destilada hasta un volumen de 1000 ml. Almacenar a temperatura ambiente 20-27 ° C.

2. Solución de trabajo Conservar a 2-8 ° C. Determinar la cantidad de reactivo necesario y preparar mezclando partes iguales de reactivo señal A y reactivo señal B en un recipiente limpio. Por ejemplo, añadir 1 ml de A y 1 ml de B para tener un total de 2 ml lo cual es suficiente para 2 tiras de 8 pozos (se debe preparar con un ligero exceso). Deseche la porción no utilizada si no se usa dentro de 36 horas después de la mezcla. Si se prevé la utilización completa de los reactivos entonces, verter el contenido del reactivo señal B en el frasco conteniendo el reactivo señal A..

PROCEDIMIENTO DE ENSAYO:

Antes de proceder con el ensayo llevar todos los reactivos, sueros de referencia y controles a temperatura ambiente (20 a + 27°C)

1. Marcar los micropocillos para cada suero de referencia, control y muestra de paciente a ser ensayada en duplicado.
NOTA: Cubrir los pocillos sin usar con el sellador de placas, sellar en la bolsa de plástico con desecante, y almacenar a 2-8 °C
2. Pipetear 0.050 ml (50 ul) del apropiado calibrador con extracto de Vit. B12, control o muestra en los pocillos asignados.
3. Agregar 0.050 ml (50 ul) de reactivo Biotina Vit. B12 a cada pocillo.
4. Mover suavemente la placa por 20 a 30 segundos para mezclar.
5. Cubrir e incubar 45 minutos a temperatura ambiente.
6. Agregar 0.050 ml (50 ul) de reactivo trazador Vit. B12 **AGREGAR DIRECTAMENTE DESDE ARRIBA LOS REACTIVOS EN LOS POCILLOS.**
7. Mover suavemente la placa por 20 a 30 segundos para mezclar.
8. Cubrir e incubar por 30 minutos a temperatura ambiente.
9. Descartar el contenido de las microplacas por decantación o aspiración. Si se decanta dar un golpecito y secar con papel absorbente.
10. Agregar 350 µl de buffer de lavado (ver preparación de reactivos) decantar (golpear y secar) o aspirar. Repetir 4 veces adicionales para un total de 5

lavados. Se puede usar un lavador manual o automático. Seguir las instrucciones del fabricante para el uso apropiado. Si se emplea una pizeta, llenar cada pocillo por inclinación del depósito (evitando formar burbujas) para dispensar la solución de lavado. Decantar la sol. De lavado y repetir el procedimiento 4 veces adicionales.

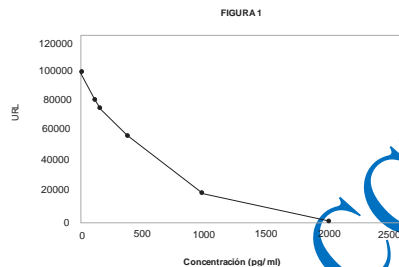
11. Agregar 0.100 ml (100 ul) de reactivo señal de trabajo a todos los pocillos (ver Preparación de reactivos). Siempre agregar los reactivos en el mismo orden para minimizar las diferencias en el tiempo de reacción de cada pocillo. **NO AGITAR LOS POCILLOS DESPUES DE AGREGAR ESTE REACTIVO**
12. Incubar a temperatura ambiente por 5 minuto.
13. Leer las unidades relativas de luz (RLU) en cada pocillo, por 0.2 – 1.0 segundos, usando un luminómetro de microplacas. Los resultados deberán ser leídos entre los 30 minutos después e agregar la solución de reactivo señal.

NOTA: Diluir las muestras cuyas concentraciones se esperan mayores a 2,000 pg/ml 1:5 y 1:10 con calibrador Vit. B12 "0" y re-analizar

CALCULO DE RESULTADOS:

Una curva dosis-respuesta se utiliza para determinar la concentración de Vit. B12 en muestras desconocidas.

1. Registre los RLU's obtenidos a partir de la lectura en luminómetro de microplacas como se indica en el Ejemplo 1.
2. Trace los RLU's para cada referencia duplicada del suero contra la concentración de Vit. B12 correspondiente en pg / ml en el papel milimetrado.
3. Dibuje la curva que mejor se ajuste a través de los puntos trazados.
4. Para determinar la concentración de Vit. B12 de una muestra desconocida, localizar el promedio de RLU's para cada desconocido en el eje vertical de la gráfica, encontrar el punto de intersección de la curva, y leer la concentración (en pg / ml) en el eje horizontal del gráfico (los duplicados de lo desconocido puede ser un promedio, como se indica). En el siguiente ejemplo, el promedio de RLU's (1,202) del desconocido intercepta la curva de calibración en (160 pg/ml) la concentración de Vit. B12 (ver figura 1).



PARAMETROS DE CONTROL DE CALIDAD

Para que los resultados del análisis sean considerados válidos los siguientes criterios deben cumplirse:

1. La absorbancia (OD) del calibrador 0 pg / ml debe ser ≥ 1.3 .
2. Cuatro de cada seis pozos de control de calidad deben estar dentro de los rangos establecidos.

EJEMPLO 1

Muestra ID	Pozo #	ULR (A)	Media ULR (B)	Valor (pg/ml)
Cal A	A1	102903	100000	0
	B1	97097		
Cal B	C1	84051	83689	100
	D1	83328		
Cal C	E1	75125	74866	200
	F1	74607		
Cal D	G1	25757	54706	400
	H1	56656		
Cal E	A2	17699	17304	1000
	B2	16910		
Cal F	C2	4602	4091	2000
	D2	3580		
Paciente	G2	41954	42160	601.3
	H2	42365		

Los datos de la tabla superior son solo ejemplo, no deben ser tomados como referencia.

ANALISIS DE RIESGO

A. Performance de la prueba

- 1 Es importante que el tiempo de reacción en cada pozo se mantenga constante para obtener resultados reproducibles.
- 2 El pipeteo de muestras no debe extenderse más allá de diez (10) minutos para evitar la deriva del análisis.
- 3 Muestras altamente lipémicas, hemolizadas o muy contaminadas no deben utilizarse.
- 4 Si se va a usar más de un (1) la placa, se recomienda

repetir la curva de dosis-respuesta.

- 5 La adición de reactivos de señal inicia una reacción cinética, por lo tanto los reactivos de señal se deben agregar en la misma secuencia para eliminar cualquier desviación de tiempo durante la reacción.
- 6 Los luminómetros leen verticalmente no topar el fondo de los pocillos.
- 7 Si no se retira la solución adecuadamente en la aspiración o la decantación (s) puede dar lugar a la réplica pobre y a resultados falsos.
- 8 Utilice los componentes del mismo lote. No mezcle los reactivos de diferentes lotes.
- 9 El pipeteado exacto y preciso, así como el tiempo exacto y la temperatura son esenciales al momento de procesar.
- 10 Se debe cumplir con todas las normas nacionales aplicables, reglamentos y leyes, que comprenden los procedimientos de laboratorio, y deben ser estrictamente seguidas para asegurar el cumplimiento y el uso adecuado del dispositivo.
- 11 Es importante tener calibrados todos los equipos por ejemplo, pipetas, lectores, lavadoras y / o los instrumentos automatizados utilizados con este dispositivo, así como deben garantizarse su mantenimiento preventivo de rutina.
- 12 Análisis de Riesgos, como exige el marcado CE IVD Directiva 98/79/CE para dispositivos de esta y otras hechas por Monobind, se puede solicitar a través de correo electrónico de Monobind@monobind.com.

B. Interpretación

- 1 El procedimiento de análisis así como la interpretación de los resultados deben ser realizados por personal capacitado.
- 2 Los resultados de laboratorio sólo son un aspecto para determinar la atención al paciente y no debe ser la única base para la terapia, particularmente si hay conflicto en los resultados con otros determinantes.
- 2 Para que los resultados de pruebas sean válidas, los controles y otros parámetros deben estar dentro de los rangos pre establecidos.
- 3 Si los kits de pruebas se alteran, por ejemplo, se mezclan partes de un kit con partes de otro se podrían producir resultados falsos. Si los resultados son mal interpretados, Monobind no tendrá ninguna responsabilidad.
- 4 Si se va a utilizar un software de computadora, para la interpretación de los resultados es imperativo que las lecturas de los calibradores estén dentro del 10% de margen con la concentración señalada.

RANGO DE VALORES ESPERADO

De acuerdo con intervalos de referencia establecidos para una población "normal" de adultos, de los rangos esperados para la Vit. B12 AccuLite™ CLIA se detallan en la Tabla 1.

TABLA 1
Valores esperados para la Vit. B12 CLIA

Población	Pg/ml	Pmol/L
Recien nacido	160-1300	118-858
Adulto	200-835	148-616
Mayor de 60	110-800	81-590

Es importante tener en cuenta que el establecimiento de una serie de valores esperados "normales" dependen de una multiplicidad de factores: la especificidad del método, la población analizada y la precisión del método en las manos del analista. Por estas razones cada laboratorio debe establecer sus propios valores normales usando el método con una población natural de la localidad en la que esté situado el laboratorio.

CARACTERISTICAS DE PERFORMANCE

A. Precisión:

Se realizaron ensayos de comparación internos y externos para la Vit. B12 AccuLite™ en tres diferentes niveles de sueros control. El número, los valores medios, desviación estándar y coeficiente de variación para cada uno de estos sueros de control se presentan en la Tabla 2 y Tabla 3.

TABLA 2

Prueba de precisión interno (pg/ml)

Muestra	N	X	S.D.	C.V.
Bajo	20	334.8	24.3	7.3%
Medio	20	484.9	17.6	3.6%
Alto	20	925.3	28.3	3.1%

TABLA 3

Prueba de precisión externo (ng/ml)

Muestra	N	X	S.D.	C.V.
Bajo	16	304.6	21.6	7.1%
Medio	16	462.4	62.4	13.5%
Alto	16	864.7	27.2	3.2%

* Medido en 10 experimentos por duplicado.

B. Sensibilidad

La prueba de vitamina B12 AccuLite CLIA tiene una sensibilidad de 6.5 pg / ml. La sensibilidad se determinó mediante la determinación de la variabilidad del suero de calibración 0 pg / ml y el uso de una 2σ (95% de certeza) para el cálculo de la dosis mínima.

C. Exactitud

La Vit. B12 AccuLite™ microplacas CLIA se comparó con un método de quimioluminiscencia. Las muestras biológicas de valor bajo, normal y alto de Vit. B12 que se usaron oscilaron desde 100 pg/ml hasta 1300 pg / ml. El número total de muestras fue de 65. La ecuación de regresión del cuadrado y el coeficiente de correlación se calcularon para esta prueba de Vit. B12 CLIA en comparación con el método de referencia. Los datos obtenidos se muestran en la Tabla 4.

TABLA 4

Análisis de regresión cuadrada

Método	Media	Coef Co.
Este método (Y)	543	0.97
Referencia (X)	586	

$$Y = 10 + 0.98 * (X)$$

Sólo pequeñas cantidades de sesgo entre este método y el método de referencia son indicados por la cercanía de los valores medios. La ecuación de regresión del último cuadro y el coeficiente de correlación indica el acuerdo excelente del método

D. Especificidad

El porcentaje de reactividad cruzada del anticuerpo de la Vit B12 con las sustancias seleccionadas, para la determinación, se evaluó mediante la adición de la sustancia que interfería a una matriz de suero en concentraciones variadas. La reactividad cruzada fue calculada derivando un cociente entre la dosis de la sustancia interfiere con la dosis de receptor de la Vit. B12 necesaria para desplazar a la misma cantidad de analógico etiquetados.

Sustancia Reacción Cruzada

Bilirubina	0.0003
Factor reumatoideo	0.0008
Cobinamida	< 0.0001
Lipemia	<0.0001
Hemoglobina	<0.0001

REFERENCIAS:

1. **Snow, C.F.**, M.D. Archives of Internal Medicine.1999, 159, 1289-1298.
2. **Gruber, K.** Chemical Society Reviews. DOI: 10.1039/cs15118e.
3. **Nijst, T.Q.** Journal of Neurology, Neurosurgery, and Psychiatry. 1990, 53, 951-954.
4. **Steele, T.J.** Clinician Reviews. 2010, 20(8), 16-19.

5. **Antony, A.C.** Journal of Clinical Nutrition.2003, 78, 3-6.
6. **Francis, M.F.** Biomacromolecules. 2005, 6, 2462-2467.
7. **Liu, Y.K.** Blood.1972, 39(3), 426-432.
8. **de Lau, L.M.L.,M.D.,Ph.D.** Neurology. 2006, 67, 315-318.
9. **Ubbink, J.B.** Clinical Chemistry. 1995, 41(7), 1033-1037.
10. **Butler, C.C.** Family Practice. 2006, 23(3), 279-285.
11. **Tanyalcin, T.** Acred Qual Assur. 2000, 5, 383-387
12. **Tietz.** Reference Information for the Clinical Laboratory. In Textbook of Clinical Chemistry, 3 Rd Ed. Burtis, C.A., Ashwood, R.A. W.B. Saunders: Philadelphia, 1999; 1831

Versión: 0 Fecha: 111111 ACA: 0383 Gato #: 7675-300



Monobind Inc
100 North Pointe Drive
Lake Forest CA 92630 USA

Tel 949-951-2665
Fax: 949-951-3539
Email: info@monobind.com
En la web: www.monobind.com

