

ID-Vit[®] Vitamin B₁₂

Mikrobiologisches Verfahren zur Bestimmung des Gesamtgehalts von Vitamin B₁₂ in Serum mittels einer Lactobacillus delbrueckii subsp. lactis-beschichteten Mikrotiterplatte
Zur Verwendung in Human- und Veterinärmedizin und zu Forschungszwecken

Microbiological test kit for the determination of vitamin B₁₂ in serum using a Lactobacillus delbrueckii subsp. lactis coated microtitre plate
For use in human and veterinary medicine and in research

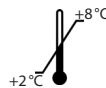
Gültig ab / Valid from 2023-01-26

REF KIF012

REF KIF012.2

Σ 96

Σ 2x 96



IVD



Immundiagnostik AG, Stubenwald-Allee 8a, 64625 Bensheim, Germany

Tel.: +49 6251 70190-0

Fax: +49 6251 70190-363

e.mail: info@immundiagnostik.com

www.immundiagnostik.com

Inhalt

1. VERWENDUNGSZWECK	2
2. EINLEITUNG	2
3. TESTPRINZIP	3
4. INHALT DER TESTPACKUNG	4
5. ERFORDERLICHE LABORGERÄTE UND HILFSMITTEL	4
6. LAGERUNG UND VORBEREITUNG DER REAGENZIEN	5
6.1 Wasser	5
6.2 Herstellung des Stabilisierungsreagens	5
6.3 Herstellung der Kontrollen	5
6.4 Herstellung der Standardkurve	6
6.5 Herstellung des sterilen Assay-Mediums	6
6.6 Mikrotiterplatte	7
7. LAGERUNG UND VORBEREITUNG DER PROBEN	7
7.1 Probenvorbehandlung	7
7.2 Probenverdünnung	7
8. TESTDURCHFÜHRUNG	8
8.1 Testvorbereitungen	8
8.2 Testansatz	8
8.3 Messung	8
9. AUSWERTUNG DER ERGEBNISSE	9
9.1 Berechnung	9
9.2 Qualitätskontrolle	9
10. EINSCHRÄNKUNGEN	10
11. TESTCHARAKTERISTIKA	10
11.1 Präzision und Reproduzierbarkeit	10
11.2 Wiederfindung	10
12. VORSICHTSMASSNAHMEN	11
13. ALLGEMEINE HINWEISE ZUM TEST	12
14. LITERATUR	13

1. VERWENDUNGSZWECK

Der ID-Vit® Vitamin B₁₂-Mikrotiterplattentest ist ein mikrobiologisches Verfahren zur Bestimmung des Gesamtgehaltes an freiem Vitamin B₁₂ in Serum. Alle benötigten Reagenzien und der Standard sind im Test enthalten. Mit dem Test können 96 Bestimmungen inklusive der Standards durchgeführt werden. Für die Auswertung ist ein ELISA-Reader notwendig. Zur Verwendung in Human- und Veterinärmedizin und zu Forschungszwecken. Nur zur *In-vitro*-Diagnostik.

2. EINLEITUNG

Vitamin B₁₂ (Cobalamin), Sammelbegriff für eine Reihe unterschiedlich substituierter Corrinoiden mit Cobalt als Zentralatom, liegt in der Nahrung in freier Form und an Proteine gebunden vor. Die proteingebundene Form wird im Magen enzymatisch freigesetzt und lagert sich an den Intrinsic-Factor an, der von Parietalzellen der Magenschleimhautzellen produziert wird. Im Ileum wird der Cobalamin-Intrinsic-Factor-Komplex an Magenschleimhautzellen gebunden und so in die Zellen aufgenommen. Bei hohen Dosen findet zusätzlich eine Diffusion des Komplexes statt. Innerhalb der Zellen wird Vitamin B₁₂ an das Protein Transcobalamin II gebunden. Dieses dient in der Zirkulation als Transportprotein für Vitamin B₁₂.

Als Coenzym ist Vitamin B₁₂ an Stoffwechselvorgängen beteiligt, die bei der Blutbildung, der Entwicklung des Nervensystems sowie bei der Regeneration der Schleimhäute eine Rolle spielen. Es besteht außerdem ein direkter Zusammenhang mit der Folsäurebildung, da Methylcobalamin an der Übertragung von Methylgruppen zur Synthese von Methionin aus Homocystein beteiligt ist.

Vitamin-B₁₂-Mangel

Ein Vitamin B₁₂-Mangel ist selten ernährungsbedingt, meist entsteht er durch Resorptionsstörungen im Darm oder mangelnde Bildung des Intrinsic-Factors. Da es bei älteren Menschen zu Resorptionsverlusten bis zu 50% kommen kann, wird hier eine höhere Zufuhr als normal empfohlen. Auch schwangeren Frauen, die sich lactovegetarisch ernähren, wird eine erhöhte Zufuhr empfohlen, da bei ihnen die Vitamin-B₁₂-Speicher in der Leber aufgebraucht sein können.

Die klassische Vitamin-B₁₂-Mangelercheinung ist die perniziöse Anämie, die sich in den Anfängen u. a. durch Müdigkeit, Herzklopfen, Hautblässe oder auch eine Gelbsucht bemerkbar macht.

Indikationen für eine Vitamin-B₁₂-Bestimmung

- Megaloblastäre (perniziöse) Anämie
- Hyperhomocysteinämie (Dialysepatienten, ältere Menschen)
- Homocysteinurie
- Periphere Neuropathie
- Patienten mit CED, Gastritis, Gastrektomie oder Glutenunverträglichkeit bzw. Darmresorptionsstörungen
- Pankreasinsuffizienz
- Thrombosepatienten
- Alkoholismus
- Chronische Leber- und Nierenerkrankungen
- Nahrungsbedingter Mangel (vegane Vegetarier)
- Schwangerschaft und Stillzeit

3. TESTPRINZIP

Das Serum wird mit einem Puffergemisch vorbehandelt und verdünnt in die Kavitäten einer Mikrotiterplatte gegeben, die mit *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *lactis* beschichtet sind. Nach Zugabe von Vitamin B₁₂ als Standard oder als in einer Serumprobe enthaltenes Vitamin wächst der Keim solange, bis das Vitamin aufgebraucht ist. Die Inkubation erfolgt bei **37 °C** für **48 h**. Das Wachstum des *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *lactis* wird als Trübung bei 610–630 nm (alternativ bei 540–550 nm) im ELISA-Reader gemessen und mit einer Standard-Konzentrationsreihe verglichen. Die Menge des Vitamins B₁₂ ist dabei direkt proportional der Trübung.

4. INHALT DER TESTPACKUNG

Art.-Nr.	Bezeichnung	Kit-Komponenten	Menge	
			KIF012	KIF012.2
KIF012	PLATE	Mikrotiterplatte, beschichtet mit <i>Lactobacillus delbrueckii</i> subsp. <i>lactis</i>	1 x	2 x
	SOL	Probenvorbereitungspuffer	7 x 5 ml	14 x 5 ml
	STAB	Stabilisierungsreagenz; lyophilisiert	7x	14x
	DIL	Wasser	4 x 30 ml	5 x 30 ml
	ASYMED	Vitamin-B ₁₂ -Assay-Medium	4x	4x
	STD	Vitamin-B ₁₂ -Standard; lyophilisiert.	4x	3 x
	FOL	Abklebefolie	1 x ganze 3 x halbe	3 x ganze
	FRA	Ersatzrahmen zum Umstecken der Mikrotiterstreifen	1 x	1 x
	CTRL1	Vitamin-B ₁₂ -Kontrolle 1; lyophilisiert	4x	3 x
	CTRL2	Vitamin-B ₁₂ -Kontrolle 2; lyophilisiert	4x	3 x

5. ERFORDERLICHE LABORGERÄTE UND HILFSMITTEL

- Inkubator mit dunkler Inkubationskammer, 37 °C
- Wasserbad (90 °C–100 °C)
- optional für Probenvorbereitung: Thermoblock (95 °C)
- ELISA-Reader 610–630 nm (540–550 nm)
- Präzisionspipetten und Pipettenspitzen für den Einmalgebrauch mit variablen Volumina von 20–1 000 µl
- Pipette 5 bzw. 10 ml
- 1,5–2 ml-Reaktionsgefäße, steril
- 0,2 µm-Polyethersulfon (PES)-Sterilfilter und Einwegspritze (10 ml)
- 15 ml-Zentrifugenröhrchen, steril (z. B. Falcons)
- Biozentrifuge (10 000 g)

6. LAGERUNG UND VORBEREITUNG DER REAGENZIEN

- Den Testkit und die Reagenzien bei 2–8 °C lagern.
- Angesetzte Reagenzien unmittelbar verwenden und nach Testansatz verwerfen.
- Bitte achten Sie bei mehrfachem Einsatz des Kits darauf, dass die Reagenzien wie in der Vorschrift beschrieben gelagert und nur die für den jeweiligen Ansatz benötigten Reagenzienmengen frisch angesetzt werden. Der Kit kann so bis zu 4x je nach Probenaufkommen bis zum angegebenen Haltbarkeitsdatum verwendet werden.

6.1 Wasser

- Wasser [DIL] (für Medium [ASYMED], Standard [STD] und Kontrollen [CTRL1, CTRL2])
- Deckel nach oben drücken, nach hinten bis zum Glasrand abziehen und dann durch Drehen den gesamten Verschluss entfernen.

6.2 Herstellung des Stabilisierungsreagenz

- 4 ml Probenvorbereitungspuffer [SOL] in Fläschchen mit lyophilisiertem Stabilisierungsreagenz [STAB] überführen und mittels Vortex-Wirbelmischer homogenisieren.
- Das Stabilisierungsreagenz kann nicht aufbewahrt werden.

6.3 Herstellung der Kontrollen

- Die lyophilisierten Kontrollen [CTRL1, CTRL2] sind mit je 300 µl Wasser [DIL] aus dem Testkit zu resuspendieren und mittels Vortex-Wirbelmischer zu homogenisieren.
- Die Kontrollen werden nach der Rekonstitution wie eine Probe behandelt.
- Die Konzentration der Kontrollen ändert sich von Charge zu Charge und ist der Produktspezifikation zu entnehmen.

6.4. Herstellung der Standardkurve

- Für die Herstellung des für die Standardkurve benötigten Standardkonzentrats ist der lyophilisierte Standard [STD] mit x ml (x = genaues Volumen bitte dem beiliegenden Quality Control Protocol entnehmen) Wasser [DIL] aus dem Testkit zu resuspendieren und mittels Vortex-Wirbelmischer zu homogenisieren.
- In 6 sterilen Reaktionsgefäßen (Fassungsvermögen 1,5–2 ml) wird mit dem Standardkonzentrat und Wasser [DIL] eine Standardkurve nach folgendem Schema hergestellt:

Vitamin B ₁₂ [ng/l]	Wasser [DIL] [µl]	+	Standard- konzentrat [µl]	=	Gesamtvolumen [µl]
Blank: 0	700	+	0	=	700
Standard 1: 6	700	+	50	=	750
Standard 2: 18	400	+	100	=	500
Standard 3: 27	350	+	150	=	500
Standard 4: 36	300	+	200	=	500
Standard 5: 54	200	+	300	=	500

6.5 Herstellung des sterilen Assay-Mediums

- Das sterile Assay-Medium muss vor jedem Test frisch hergestellt werden.
- Trockenmittelbeutel aus dem Fläschchen mit einer Pinzette abschütteln, herausnehmen und verwerfen.
- Zum Assay-Medium [ASYMED] 10 ml Wasser [DIL] zugeben, das Fläschchen gut verschließen und schütteln. Die Menge ist ausreichend für 6 Mikrotiterstreifen.
- Mediumflasche im Wasserbad bei 90–100°C für 5 min erhitzen; währenddessen mindestens 2 mal gut schütteln. Es ist darauf zu achten, dass dabei die Mediumflasche immer fest verschlossen ist.
- Mediumflasche schnell (2–8°C für 10 min) auf unter 30°C abkühlen.
- Medium mit Einwegspritze (10 ml) und dem 0,2-µm-PES-Filter in ein steriles Zentrifugenröhrchen (15 ml, z. B. Falcon) sterilfiltrieren.
- Das so hergestellte sterile Assay-Medium wird im Test verwendet.

6.6 Mikrotiterplatte [PLATE]

- Die Mikrotiterplatte [PLATE] ist in der Aluminiumverpackung mit dem Trockenmittelbeutel bei 2–8 °C zu lagern.
- Die Mikrotiterplatte [PLATE] muss vor Feuchtigkeit und Kontamination geschützt sein.
- Es ist darauf zu achten, dass die Aluminiumverpackung nicht beschädigt wird.
- Die Aluminiumverpackung nach dem Öffnen wieder sorgfältig verschließen.
- Nur die benötigten Mikrotiterstreifen unmittelbar vor Gebrauch entnehmen, um Kontaminationen zu vermeiden.

7. LAGERUNG UND VORBEREITUNG DER PROBEN

- Als Probe eignet sich Serum.
- Die Haltbarkeit der Probe beträgt bei 2–8 °C im Dunkeln 1 Tag. Zur längeren Lagerung sollte die Probe bei -20 °C aufbewahrt werden.
- Hämolytische Proben beeinflussen das Testergebnis und sollten nicht verwendet werden. Lipämische Proben sollten vor dem Einsatz im Test bei 13 000 g zentrifugiert werden, um ein möglichst fettfreies Serum zu erhalten.
- Proben sollten vor dem Einsatz zentrifugiert werden (mind. 5 min bei 10 000 g). Den resultierenden Überstand im Test einsetzen.

7.1 Probenvorbehandlung

75 µl Serum/Kontrolle mit 300 µl des vorbereiteten Stabilisierungsreagenz versetzen (Verhältnis 1:5), mischen, bei 95 °C 30 min erhitzen, schnell abkühlen (2–8 °C für 10 min) und 10 min zentrifugieren (10 000 g).

7.2 Probenverdünnung

Vom Überstand des vorbehandelten Serums/der vorbehandelten Kontrolle 100 µl abnehmen, 400 µl Wasser [DIL] zugeben und mischen. Die Probenvorbehandlung und -verdünnung entsprechen insgesamt einer 1:25-Verdünnung (= Probenverdünnungsfaktor).

8. TESTDURCHFÜHRUNG

8.1 Testvorbereitungen

Entnehmen Sie die benötigten Reagenzien und Materialien für den durchzuführenden Test und legen Sie den restlichen Testkit zurück in den Kühlschrank. Bringen Sie die benötigten Reagenzien auf Raumtemperatur.

8.2 Testansatz

- Benötigte Mikrotiterstreifen entnehmen und in den Ersatzrahmen [FRA] stecken.
- 150 µl steriles Assay-Medium in die Kavitäten geben.
- Je 150 µl der hergestellten Standardkurve, vorbereiteten Proben und Kontrollen in die jeweiligen Kavitäten pipettieren. Pipettenspitzen jeweils mit der Standard-, Proben- bzw. Kontroll-Lösung vorspülen.
- Sorgfältig die befüllten Kavitäten mit der im Kit enthaltenen Klebefolie [FOL] abkleben. Wichtig: die Kavitäten müssen durch Andrücken mit der Hand luftdicht verschlossen werden!
- Bei 37 °C für 48 h im Brutschrank inkubieren.

8.3 Messung

- Klebefolie [FOL] nochmals mit der Hand fest andrücken
- Mikrotiterplatte [PLATE] über Kopf drehen, auf eine Tischoberfläche legen und Keime gut aufschütteln
- Mikrotiterplatte [PLATE] wieder zurückdrehen und die Abklebefolie [FOL] vorsichtig abziehen. Mit einer Hand dabei die Streifen fest im Rahmen halten (Folie ist stark klebend!).
- Eventuell vorhandene Bläschen an der Oberfläche der Messlösung in den Kavitäten zerstören, z. B. mit Hilfe einer Pipettenspitze oder einer Nadel
- Trübung im ELISA-Reader bei E 610–630 nm messen (alternativ bei E 540–550 nm)

Hinweise

- Nach 48 h Inkubation kann die Mikrotiterplatte [PLATE] auch für max. 48 h im Kühlschrank aufbewahrt werden, um danach die Trübung zu messen.
- Um Zeitverluste durch Feiertage oder Wochenende zu vermeiden, kann die Mikrotiterplatte [PLATE] auch noch nach bis zu 60 h Inkubation ausgewertet werden.

9. AUSWERTUNG DER ERGEBNISSE

Wir empfehlen für die Auswertung die 4-Parameter-Funktion. Der Probenverdünnungsfaktor muss bei der Auswertung berücksichtigt werden.

Der Blank sollte eine optische Dichte < Standard 1 haben. Er dient als optische Kontrolle zum Ausschluss von Kontaminationen und wird nicht in der Berechnung berücksichtigt.

9.1 Berechnung

Vitamin B₁₂ in ng/l = Wert aus Standardkurve × Probenverdünnungsfaktor (25)

Referenzbereich für Humanserum

Anhand einer laborinternen Studie mit Serumproben von augenscheinlich Gesunden (n = 62) wurden die folgenden Werte ermittelt:

Vitamin B₁₂:

200–830 ng/l (≙ 147,2–626,5 pmol/l)

Anmerkung

Bei einem Probenverdünnungsfaktor von 25 ist ein Bereich von 150–1350 ng/l Vitamin B₁₂ abgedeckt.

Wir empfehlen jedem Labor, einen eigenen Referenzbereich zu etablieren, da Referenzbereiche stark von der Auswahl des Probandenkollektivs abhängig sind. Die Angabe des Referenzbereichs für Vitamin B₁₂ dient lediglich der Orientierung und kann von anderen publizierten Daten abweichen.

9.2 Qualitätskontrolle

Die Extinktion des höchsten Standards muss > 0,6 sein.

Die Ergebnisse der Kontrollen müssen auf Richtigkeit überprüft werden. Liegen eine oder mehrere Kontrollen oder der höchste Standard außerhalb des angegebenen Bereiches, kann Immundiagnostik AG die Richtigkeit der Messergebnisse nicht gewährleisten.

10. EINSCHRÄNKUNGEN

Vollblut, EDTA- sowie Heparin-Plasma können nicht im Test eingesetzt werden.

11. TESTCHARAKTERISTIKA

Die nachfolgenden Testcharakteristika wurden mit Humanserum erhoben.

11.1 Präzision und Reproduzierbarkeit

Intra-Assay (n = 21)

	Vitamin B ₁₂ [ng/l]	VK [%]
Probe	294	5,38

Inter-Assay (n = 3)

	Vitamin B ₁₂ [ng/l]	VK [%]
Probe	285	8,0

11.2 Wiederfindung

Proben von 3 Patienten wurden mit Vitamin B₁₂ gespiked und analysiert. Die Mittelwerte sind im Folgenden dargestellt.

Probe (n=5)	Mittelwert Originalprobe [ng/l]	Spike [ng/l]	Vitamin B ₁₂ erwartet [ng/l]	Vitamin B ₁₂ gemessen [ng/l]	Wiederfindungsrate [%]
A	566,58	187,5	754,08	726,36	85
		375,0	941,58	908,21	91
Wiederfindungsrate gesamt [%]					88

Probe (n=5)	Mittelwert der Originalprobe [ng/l]	Spike [ng/l]	Vitamin B ₁₂ erwartet [ng/l]	Vitamin B ₁₂ gemessen [ng/l]	Wiederfindungsrate [%]
B	481,3	187,5	668,8	681,45	107
		375,0	856,3	929,50	120
Wiederfindungsrate gesamt [%]					114

Probe (n=5)	Mittelwert der Originalprobe [ng/l]	Spike [ng/l]	Vitamin B ₁₂ erwartet [ng/l]	Vitamin B ₁₂ gemessen [ng/l]	Wiederfindungsrate [%]
C	526,44	187,5	713,94	762,23	126
		375,0	901,44	845,02	85
Wiederfindungsrate gesamt [%]					105

12. VORSICHTSMASSNAHMEN

- Es handelt sich um einen mikrobiologischen Test, daher sollten alle Maßnahmen, soweit möglich, für ein steriles Arbeiten getroffen werden (bevorzugt unter Sterilbank bzw. PCR-Hood arbeiten, sterile Arbeitsgeräte verwenden).
- Die GLP (Good Laboratory Practice)-Regeln sind bei der Testdurchführung einzuhalten.
- Die Wasserqualität ist von großer Bedeutung für den Testablauf. Nur das im Testkit enthaltene Wasser [DIL] verwenden.
- Bei den Sterilfiltern muss es sich um Polyethersulfon-Sterilfilter handeln.
- Bei jeder Testdurchführung muss eine Standardkurve mitgeführt werden.
- Die Kontrollen sollten bei jedem Ansatz mitgemessen werden.
- Es wird die Messung in Doppelwerten empfohlen.

- Ergibt die höhere Verdünnung einen höheren Messwert, können Hemmstoffe wie Antibiotika vorliegen.
- Als Vorsichtsmaßnahme wird empfohlen, das verwendete Humanmaterial stets als potenziell infektiös zu betrachten.
- Während der Testdurchführung Handschuhe tragen.
- Gebrauchte Mikrotiterplattenstreifen sowie andere mit Patientenproben in Kontakt gekommene Materialien als potenziell infektiös behandeln und entsprechend entsorgen.












13. ALLGEMEINE HINWEISE ZUM TEST

- Dieser Kit wurde nach der IVD-Richtlinie 98/79/EG hergestellt und in den Verkehr gebracht.
- Sämtliche in der Testpackung enthaltene Reagenzien dürfen ausschließlich zur *in-vitro*-Diagnostik eingesetzt werden.
- *ID-Vit*® ist eine Marke der Immundiagnostik AG.
- Die Reagenzien sollten nach Ablauf des Verfallsdatums nicht mehr verwendet werden (Verfallsdatum siehe Testpackung).
- Einzelkomponenten mit unterschiedlichen Lot-Nummern aus verschiedenen Testpackungen sollten nicht gemischt oder ausgetauscht werden.
- Für die Qualitätskontrolle sind die dafür erstellten Richtlinien für medizinische Laboratorien zu beachten.
- Die Testcharakteristika wie Inkubationszeiten, Inkubationstemperaturen und Pipettiervolumina der verschiedenen Komponenten wurden vom Hersteller festgelegt. Nicht mit dem Hersteller abgesprochene Veränderungen in der Testdurchführung können die Resultate beeinflussen. Die Firma Immundiagnostik AG übernimmt für die hierdurch entstandenen Schäden und Folgeschäden keine Haftung.
- Bei Gewährleistungsansprüchen ist das beanstandete Material mit schriftlicher Erklärung innerhalb von 14 Tagen zum Hersteller, der Immundiagnostik AG, zurückzusenden.
- Qualitätskontrollen sollten immer mitgemessen werden.
- Die Bestimmung ist immer nach der dem Kit beigefügten Arbeitsanleitung durchzuführen.

14. LITERATUR

1. Strohecker R, Henning H (1963) Vitamin-Bestimmungen. Hrsg. E. Merck AG, Darmstadt. *Verlag Chemie*, Weinheim
2. Kräutler, B., 2005. Vitamin B12: chemistry and biochemistry. *Biochemical Society transactions*, **33**, pp.806–810.
3. Obeid, R. & Herrmann, W., 2006. Mechanisms of homocysteine neurotoxicity in neurodegenerative diseases with special reference to dementia. *FEBS letters*, **580**(13), pp.2994–3005.
4. Partearroyo, T. et al., 2013. Vitamin B12 and Folic Acid Imbalance Modifies NK Cytotoxicity, Lymphocytes B and Lymphoproliferation in Aged Rats. *Nutrients*, **5**(12), pp.4836–4848.
5. Schwarz, J. et al., 2014. The influence of a whole food vegan diet with Nori algae and wild mushrooms on selected blood parameters. *Clinical laboratory*, **60**(12), pp.2039–2050.
6. Schwarz, J. et al., 2015. Biochemical Identification of Vitamin B12 Deficiency in a Medical Office. *Clinical laboratory*, **61**(7), pp.687–692.

Verwendete Symbole:

	Temperaturbegrenzung		Bestellnummer
	In-Vitro-Diagnostikum		Zu verwenden mit
	Hersteller		Inhalt ausreichend für <n> Prüfungen
	Chargenbezeichnung		Verwendbar bis
	Achtung		Gebrauchsanweisung beachten
	Spezifikationsdatenblatt beachten		

ID-Vit[®] vitamin B₁₂

Microbiological test kit for the determination of vitamin B₁₂ in serum using a Lactobacillus delbrueckii subsp. lactis coated microtitre plate

For use in human and veterinary medicine and in research

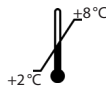
Valid from 2023-01-26

REF KIF012

REF KIF012.2

Σ 96

Σ 2 x 96



Immundiagnostik AG, Stubenwald-Allee 8a, 64625 Bensheim, Germany

Tel.: +49 6251 70190-0

Fax: + 49 6251 70190-363

e.mail: info@immundiagnostik.com

www.immundiagnostik.com

Table of Contents

1. INTENDED USE	16
2. INTRODUCTION	16
3. PRINCIPLE OF THE TEST	17
4. MATERIAL SUPPLIED	18
5. MATERIAL REQUIRED BUT NOT SUPPLIED	18
6. STORAGE AND PREPARATION OF REAGENTS	19
6.1 <i>Water</i>	19
6.2 <i>Preparation of the stabilisation reagent</i>	19
6.3 <i>Preparation of the controls</i>	19
6.4 <i>Preparation of the standard curve</i>	20
6.5 <i>Preparation of the sterile assay medium</i>	20
6.6 <i>Microtiter plate</i>	21
7. STORAGE AND PREPARATION OF SAMPLES	21
7.1 <i>Sample pretreatment</i>	21
7.2 <i>Sample dilution</i>	21
8. ASSAY PROCEDURE	22
8.1 <i>Test preparations</i>	22
8.2 <i>Test procedure</i>	22
8.3 <i>Measurement</i>	22
9. EVALUATION OF RESULTS	23
9.1 <i>Calculation</i>	23
9.2 <i>Quality control</i>	23
10. LIMITATIONS	24
11. PERFORMANCE CHARACTERISTICS	24
11.1 <i>Precision and reproducibility</i>	24
11.2 <i>Recovery</i>	24
12. PRECAUTIONS	25
13. GENERAL NOTES ON THE TEST	26
14. REFERENCES	27

1. INTENDED USE

ID-Vit® Vitamin B₁₂ is a microtiter plate test kit based on a microbiological method which measures the total vitamin B₁₂ content in serum. The test kit contains the standard and all reagents required to perform the test. It is sufficient for 96 determinations including standard curves. An ELISA reader is required for the evaluation of the results. For use in human and veterinary medicine and in research. For *in vitro* diagnostic use only.

2. INTRODUCTION

Vitamin B₁₂ (cobalamin), a collective term for a group of various substituted corrinoids with cobalt as the central atom, is found free and also protein-bound in food. The protein-bound form is degraded by pancreatic protease, releasing free B₁₂ which binds to intrinsic factor, a protein secreted by gastric parietal cells of the stomach mucosa. The cobalamin-intrinsic factor complex is bound to mucous membrane cells of the stomach in the ileum and absorbed by the cells. In the case of high doses, a diffusion of the complex also takes place. Vitamin B₁₂ is bound to the protein transcobalamin II (TC-II) within the cells. TC-II serves as a transport protein for vitamin B₁₂ in the circulation system.

Vitamin B₁₂ is involved as a co-enzyme in metabolic processes and plays an important role in the formation of the blood, the development of the nervous system and the regeneration of the mucous membranes. In addition, there is a direct relationship to the formation of folic acid because methylcobalamin is involved in the transfer of methyl groups for the synthesis of methionin from homocystein.

Vitamin B₁₂ deficiency

Vitamin B₁₂ deficiency is rarely caused by dietary factors. In most cases, it results from a resorption disorder of the intestines or defective development of intrinsic factor. Since vitamin B₁₂ resorption can be reduced up to 50% in the elderly, an increased supplement is recommended. Pregnant women with a lacto-vegetarian diet are also recommended to increase their intake because their vitamin B₁₂ stores in the liver could be exhausted.

The classical vitamin B₁₂ deficiency disease is pernicious anemia. In the early stages of the disease, vitamin B₁₂ deficiency symptoms are manifested as weariness, palpitations, pallor or jaundice.

Indications for vitamin B₁₂ determination

- Megaloblastic (pernicious) anemia
- Hyperhomocysteinaemia (patients on dialysis, old people)
- Homocysteinuria
- Peripheral neuropathy
- Patients with CED, gastritis, gastrectomy, gluten intolerance or intestinal re-sorption disorders
- Pancreatic insufficiency
- Patients with thrombosis
- Alcoholism
- Chronic liver and kidney disease
- Vitamin B₁₂ deficiency from diet (vegan vegetarians)
- Pregnancy and lactation

3. PRINCIPLE OF THE TEST

The serum samples are pre-treated and diluted with a buffer mixture, and then transferred into the wells of a microtiter plate coated with *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *lactis*. The addition of vitamin B₁₂ in either standards or samples gives a vitamin B₁₂-dependent growth response until vitamin B₁₂ is consumed. After incubation at **37°C** for **48 h**, the growth of *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *lactis* is measured turbidimetrically at 610–630 nm (alternatively at 540–550 nm) in an ELISA reader and a standard curve is generated from the dilution series. The amount of vitamin B₁₂ is directly proportional to the turbidity.

4. MATERIAL SUPPLIED

Cat. No.	Label	Kit components	Quantity	
			KIF012	KIF012.2
KIF012	PLATE	<i>Lactobacillus delbrueckii</i> subsp. <i>lactis</i> -precoated microtiter plate	1 plate	2 plate
	SOL	Sample preparation buffer	7 x 5 ml	14 x 5 ml
	STAB	Stabilizer; lyophilised	7 x	14 x
	DIL	Water	4 x 30 ml	5 x 30 ml
	ASYMED	Vitamin B ₁₂ assay medium	4 x	4 x
	STD	Vitamin B ₁₂ standard; lyophilised	4 x	3 x
	FOL	Adhesive cover foil	1 x whole 3 x half	3 x whole
	FRA	Replacement holder for 96 well plates	1 x	1 x
	CTRL1	Vitamin B ₁₂ control 1; lyophilised	4 x	3 x
CTRL2	Vitamin B ₁₂ control 2; lyophilised	4 x	3 x	

5. MATERIAL REQUIRED BUT NOT SUPPLIED

- Incubator with a dark incubation chamber, 37 °C
- Water bath (90 °C–100 °C)
- optional for sample preparation: thermoblock (95 °C)
- ELISA reader 610–630 nm (540–550 nm)
- Calibrated precision pipettors and 20–1 000 µl tips
- Pipettes of 5 and 10 ml
- 1.5–2 ml reaction vials, sterile
- 0.2 µm sterile polyethersulfone (PES) filter with a sterile disposable syringe
- 15 ml centrifuge tubes, sterile (e.g. Falcon tubes)
- Biocentrifuge (10 000 g)

6. STORAGE AND PREPARATION OF REAGENTS

- Store test kit and reagents at 2–8 °C.
- Prepare reagents freshly and use them immediately after preparation. Discard remaining unused reagents and waste in accordance with country, federal, state, and local regulations.
- To run the assay more than once, ensure that reagents are stored at the conditions stated on the label. Prepare only the appropriate amount necessary for each run. The kit can be used up to 4 times within the expiry date stated on the label.

6.1 Water

- Water [DIL] (for medium [ASYMED], standard [STD] and controls [CTRL1, CTRL2])
- Push the cap up and pull it back to the rim of the glass, then twist the whole cap off.

6.2 Preparation of the stabilisation reagent

- Add 4 ml sample preparation buffer [SOL] to a vial of lyophilised stabilisation reagent [STAB], then homogenise using a vortex.
- Stabilisation reagent cannot be stored.

6.3 Preparation of the controls

- The lyophilised controls [CTRL1, CTRL2] have to be resuspended with each 300 µl water [DIL] from the test kit, then homogenise using a vortex.
- After reconstitution, the controls are treated like samples.
- The concentration of the controls changes from lot to lot and is stated in the product specification.

6.4 Preparation of the standard curve

- For the preparation of the standard curve, standard concentrate is needed. To prepare standard concentrate, resuspend the lyophilised standard [STD] with x ml (x = please see the enclosed quality control protocol for the volume needed) water [DIL] supplied with the test kit, then homogenise using a vortex.
- In 6 sterile reaction tubes (1.5–2 ml volume), prepare a standard curve from standard concentrate and water [DIL] following the scheme depicted in the table below:

Vitamin B ₁₂ [ng/l]	Water [DIL] [µl]	+	Standard concentrate [µl]	=	Total volume [µl]
Blank: 0	700	+	0	=	700
Standard 1: 6	700	+	50	=	750
Standard 2: 18	400	+	100	=	500
Standard 3: 27	350	+	150	=	500
Standard 4: 36	300	+	200	=	500
Standard 5: 54	200	+	300	=	500

6.5 Preparation of the sterile assay medium

- Fresh sterile assay medium has to be prepared each time before performing a test.
- Remove lyophilised assay medium from the desiccant bag in the assay medium bottle by taking the bag with a forceps and shaking it whilst still inside the bottle. Then remove the clean desiccant bag and discard it.
- Add 10 ml water [DIL] to the assay medium bottle [ASYMED], close the bottle firmly and shake it. This amount is sufficient for 6 microtiter stripes.
- Heat the medium bottle in a water bath at 90–100 °C for 5 min, shake well at least 2 times during this incubation time. Take care that the medium bottle is always firmly closed.
- Quickly cool the medium bottle to < 30 °C (at 2–8 °C for 10 min).
- Filter the medium using a disposable syringe (10 ml) and the 0,2 µm PES filter into a sterile centrifuge tube (15 ml, e.g. Falcon).
- After this preparation, the assay medium can be used in the test.

6.6 Microtiter plate [PLATE]

- Store the microtiter plate [PLATE] in the aluminium packaging containing the desiccant bag at 2–8 °C.
- The microtiter plate [PLATE] has to be protected from humidity and contamination.
- Take care that the aluminium packaging is not damaged.
- Carefully close the aluminium packaging after opening.
- Take only the microtiter stripes needed directly before usage to avoid contamination

7. STORAGE AND PREPARATION OF SAMPLES

- Use serum for analysis.
- Samples are stable at 2–8 °C for one day in the dark. For longer storage, samples should be frozen and kept at -20 °C.
- Hemolytic samples may give erroneous results and should not be used for analysis. Lipemic samples should be centrifuged at 13 000 *g* before assaying to obtain fat free serum as far as possible.
- Samples should be centrifuged (at least 5 min at 10 000 *g*) prior to measurement. Use the resulting supernatant in the test.

7.1 Sample pretreatment

Add 75 µl serum/control to 300 µl of prepared stabilising solution (ratio 1:5), mix, heat to 95 °C for 30 min and then cool quickly (10 min at 2–8 °C). Afterwards, centrifuge for 10 min at 10 000 *g*.

7.2 Sample dilution

Take 100 µl from the supernatant of the prepared serum/control, add 400 µl water [DIL] and mix. The sample treatment and dilution result in a total dilution of 1:25 (= sample dilution factor).

8. ASSAY PROCEDURE

8.1 Test preparations

Take as many microtiter strips as needed from kit. Return unused strips and any unused test kit component to the original packaging, and put in the refrigerator. Bring all necessary reagents to room temperature.

8.2 Test procedure

- Take as many microtiter strips as needed from the kit and put them in the second microtiter strip holder [FRA].
- Put 150 µl sterile assay medium into the cavities.
- Add each 150 µl of the prepared standard curve, samples and controls into the respective cavities. Pre-rinse each pipet tip with standard, control or sample solution, respectively.
- Carefully seal the plate with adhesive cover foil [FOL]. Important: the cavities must be made airtight by pressing the foil down with the hand!
- Keep at 37 °C for 48 h in an incubator.

8.3 Measurement

- Press the adhesive cover foil [FOL] firmly down again with the hand.
- Upturn the microtiter plate [PLATE], put it onto a tabletop and shake the microbes well.
- Turn the microtiter plate [PLATE] over again and carefully remove the adhesive cover foil [FOL]. During this, fix the strips in the frame with your hand because the foil is highly adhesive.
- Remove air bubbles in the cavities using a pipet tip or a needle.
- Read turbidity in an ELISA reader at E 610–630 nm (alternatively at 540–550 nm).

Please note

- After 48 h incubation time, the microtiter plate [PLATE] may be stored for a maximum of 48 h in the refrigerator before measuring the turbidity.
- To prevent time-loss through public holidays or weekends, the microtiter plate [PLATE] may also be measured after 60 h incubation.

9. EVALUATION OF RESULTS

We recommend to use the 4 parameter algorithm to calculate the results. The sample dilution factor has to be considered for data evaluation.

The blank should have an optical density < standard 1. It serves as optical control to exclude contaminations and is not included in the calculation of results.

9.1 Calculation

Vitamin B₁₂ in ng/l = value from the standard curve × sample dilution factor (25)

Reference value for human serum

Based on studies of matrix samples of apparently healthy persons (n = 83) the following values were estimated.

Vitamin B₁₂:

200–830 ng/l (≅ 147.2–626.5 pmol/l)

Please note

A concentration range of 150–1 350 ng/l vitamin B₁₂ is covered at a sample dilution of 1:25.

We recommend each laboratory to develop its own normal range as normal ranges strongly depend on the choice of the patient collective. The values mentioned above are only for orientation and can deviate from other published data.

9.2 Quality control

The extinction of the highest standard has to be > 0.6.

Results, generated from the analysis of control samples, should be evaluated for acceptability. The results for the samples may not be valid if within the same assay one or more values of the quality control sample or the highest standard are outside the acceptable limits.

10. LIMITATIONS

Whole blood, EDTA plasma, and heparin plasma cannot be used in the assay.

11. PERFORMANCE CHARACTERISTICS

The following performance characteristics have been collected using human serum samples.

11.1 Precision and reproducibility

Intraassay (n = 21)

	Vitamin B ₁₂ [ng/l]	CV [%]
Sample	294	5.38

Interassay (n = 3)

	Vitamin B ₁₂ [ng/l]	CV [%]
Sample	285	8.0

11.2 Recovery

Samples from 3 patients were spiked with vitamin B₁₂ and analysed. The mean values are shown below.

Sample (n=5)	Mean value original sample [ng/l]	Spike [ng/l]	Vitamin B ₁₂ expected [ng/l]	Vitamin B ₁₂ measured [ng/l]	Recovery Rate [%]
A	566.58	187.5	754.08	726.36	85
		375.0	941.58	908.21	91
Recovery rate in total [%]					88

Sample (n=5)	Mean value measured in original sample [ng/l]	Spike [ng/l]	Vitamin B ₁₂ expected [ng/l]	Vitamin B ₁₂ measured [ng/l]	Recovery Rate [%]
B	481.3	187.5	668.8	681.45	107
		375.0	856.3	929.50	120
Recovery rate in total [%]					114

Sample (n=5)	Mean value measured in original sample [ng/l]	Spike [ng/l]	Vitamin B ₁₂ expected [ng/l]	Vitamin B ₁₂ measured [ng/l]	Recovery Rate [%]
C	526.44	187.5	713.94	762.23	126
		375.0	901.44	845.02	85
Recovery rate in total [%]					105

12. PRECAUTIONS

- As the test is based on a microbiological method, the general guidelines for sterile work should be observed as far as possible, (preferably work in a sterile bench / PCR hood, use of sterile instruments or equipment).
- GLP (Good Laboratory Practice) guidelines have to be observed.
- Water quality is extremely important for the test. Only the water delivered with the test kit [DIL] should be used.
- For sterile filtration, only a sterile polyethersulfone filter must be used.
- It is essential to run a standard curve for each separate assay.
- Controls should be measured with each assay.
- We recommend measurements in duplicate.
- If a higher dilution results in a higher measured value, inhibitors like antibiotics might be present.

- Wear gloves during the test.
- Avoid foaming when mixing reagents.
- Used microtiter stripes [PLATE] and materials that have been in contact with patient's samples should be handled and disposed as potentially infectious.
- As a precaution, it is recommended that the human material used is always considered potentially infectious.












13. GENERAL NOTES ON THE TEST

- This assay was produced and distributed according to the IVD guidelines of 98/79/EC.
- All reagents in the kit package are for *in vitro* diagnostic use only.
- ID-Vit® is a trademark of Immundiagnostik AG.
- Reagents should not be used beyond the expiration date stated on the kit label.
- Do not interchange different lot numbers of any kit component within the same assay.
- The guidelines for medical laboratories should be followed.
- Incubation time, incubation temperature and pipetting volumes of the components are defined by the producer. Any variation of the test procedure, which is not coordinated with the producer, may influence the results of the test. Immundiagnostik AG can therefore not be held responsible for any damage resulting from incorrect use.
- Warranty claims and complaints regarding deficiencies must be logged within 14 days after receipt of the product. The product should be sent to Immundiagnostik AG along with a written complaint.
- Control samples should be analysed with each run.
- The assay should always be performed according to the enclosed manual.
- Serious incidents are to be reported to Immundiagnostik AG and the national regulatory authorities.

14. REFERENCES

1. Strohecker R, Henning H (1963) Vitamin-Bestimmungen. Hrsg. E. Merck AG, Darmstadt. *Verlag Chemie*, Weinheim
2. Kräutler, B., 2005. Vitamin B12: chemistry and biochemistry. *Biochemical Society transactions*, **33**, pp.806–810.
3. Obeid, R. & Herrmann, W., 2006. Mechanisms of homocysteine neurotoxicity in neurodegenerative diseases with special reference to dementia. *FEBS letters*, **580**(13), pp.2994–3005.
4. Partearroyo, T. et al., 2013. Vitamin B12 and Folic Acid Imbalance Modifies NK Cytotoxicity, Lymphocytes B and Lymphoproliferation in Aged Rats. *Nutrients*, **5**(12), pp.4836–4848.
5. Schwarz, J. et al., 2014. The influence of a whole food vegan diet with Nori algae and wild mushrooms on selected blood parameters. *Clinical laboratory*, **60**(12), pp.2039–2050.
6. Schwarz, J. et al., 2015. Biochemical Identification of Vitamin B12 Deficiency in a Medical Office. *Clinical laboratory*, **61**(7), pp.687–692.

Used symbols:

	Temperature limitation		Catalogue number
	In Vitro Diagnostic Medical Device		To be used with
	Manufacturer		Contains sufficient for <n> tests
	Lot number		Use by
	Attention		Consult instructions for use
	Consult specification data sheet		

Immundiagnostik AG

Stubenwald-Allee 8a
64625 Bensheim, Germany

Tel.: +49 6251 70190-0

Fax: +49 6251 70190-363

info@immundiagnostik.com

www.immundiagnostik.com

