

Arbeitsanleitung / Manual

ID-Vit[®] Vitamin B₁₂

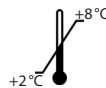
Mikrobiologisches Verfahren zur Bestimmung des Gesamtgehalts von Vitamin B₁₂ in Serum mittels einer Lactobacillus delbrueckii subsp. lactis-beschichteten Mikrotiterplatte
Zur Verwendung in Human- und Veterinärmedizin und zu Forschungszwecken

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

Gültig ab / Valid from 2024-10-08

REF KIF012

Σ 96



IVD

CE

REF KIF012.2

Σ 2x 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

Sicherheitshinweise

Der Assay ist ausschließlich nach der dem Kit beigefügten Arbeitsanleitung durchzuführen. Wichtige Sicherheitshinweise zu diesem Produkt sind dem Kapitel HINWEISE UND VORSICHTSMASSNAHMEN zu entnehmen.

Inhalt

1. ZWECKBESTIMMUNG	2
2. EINLEITUNG	2
3. TESTPRINZIP	3
4. INHALT DER TESTPACKUNG	4
5. ERFORDERLICHE LABORGERÄTE UND HILFSMITTEL	4
6. HINWEISE UND VORSICHTSMASSNAHMEN	5
7. LAGERUNG UND VORBEREITUNG DER PROBEN	5
7.1 Wasser	5
7.2 Herstellung des sterilen Assay-Mediums	6
7.3 Herstellung der Kontrollen	6
7.4 Herstellung der Standardkurve	6
7.5 Mikrotiterplatte (PLATE)	7
8. PROBENLAGERUNG UND -VORBEREITUNG	7
8.1 Kontrollverdünnung	7
8.2 Probenvorbehandlung	7
8.3 Probenverdünnung	7
9. TESTDURCHFÜHRUNG	8
9.1 Testvorbereitungen	8
9.2 Testansatz	8
9.3 Messung	8
10. AUSWERTUNG DER ERGEBNISSE	9
10.1 Berechnung	9
10.2 Qualitätskontrolle	9
11. EINSCHRÄNKUNGEN	10
12. TESTCHARAKTERISTIKA	10
12.1 Präzision und Reproduzierbarkeit	10
12.2 Wiederfindung	10
13. ALLGEMEINE HINWEISE ZUM TEST	11
14. ENTSORGUNG	12
15. LITERATUR	12
16. SYMBOLE	13

1. ZWECKBESTIMMUNG

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. 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), ein Sammelbegriff für eine Reihe unterschiedlich substituierter Corrinnoide 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 Magenmucosa produziert wird. Im distalen Ileum wird der Cobalamin-Intrinsic-Factor-Komplex an spezielle Rezeptoren gebunden und so in die Darmschleimhautzellen aufgenommen. Bei hohen Dosen findet zusätzlich eine Diffusion von freiem Vitamin B₁₂ statt. Innerhalb der Zellen wird Vitamin B₁₂ vom Intrinsic-Factor freigesetzt und an das Protein Transcobalamin II gebunden. Dieses dient in der Zirkulation als Transportprotein für Vitamin B₁₂.

Als Coenzym ist Vitamin B₁₂ an Stoffwechselfvorgängen beteiligt, die bei der Blutbildung, der Entwicklung des Nervensystems sowie bei der Regeneration der Schleimhäute eine Rolle spielen. Zusätzlich zur Folsäure benötigt der Körper auch Vitamin B₁₂ als essentiellen Cofaktor, um Homocystein abzubauen.

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 lacto-vegetarisch 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 einen Ikterus 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 (Veganer)
- 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 **46–50 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 an Vitamin B₁₂ ist dabei direkt proportional der Trübung.

4. INHALT DER TESTPACKUNG

Art.-Nr.	Bezeichnung	Kit-Komponenten	Menge	
			KIF012	KIF012.2
KIF000.30	DIL	Wasser	4 x 30 ml	5 x 30 ml
KIF012/ KIF012.2	PLATE	Mikrotiterplatte, beschichtet mit <i>Lactobacillus delbrueckii</i> subsp. <i>lactis</i>	1 x	2 x
	SOL	Probenvorbereitungspuffer	6 x 5 ml	12 x 5 ml
	ASYMED	Vitamin-B ₁₂ -Assay-Medium	4 x	4 x
	STD	Vitamin-B ₁₂ -Standard; lyophilisiert.	4 x	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	4 x	3 x
	CTRL2	Vitamin-B ₁₂ -Kontrolle 2; lyophilisiert	4 x	3 x

5. ERFORDERLICHE LABORGERÄTE UND HILFSMITTEL

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

6. HINWEISE UND VORSICHTSMASSNAHMEN

- Es handelt sich um einen mikrobiologischen Test. Kontaminationen führen zu falschen Ergebnissen.
- 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.
- Bei jedem Ansatz sind Kontrollen mitzumessen.
- Es wird die Messung in Doppelwerten empfohlen.
- Die Reagenzien dürfen nach Ablauf des Haltbarkeitsdatums nicht mehr verwendet werden.
- Gebrauchte Mikrotiterplattenstreifen sowie andere mit Patientenproben in Kontakt gekommene Materialien sind als potenziell infektiös zu behandeln und entsprechend zu entsorgen.
- Als Vorsichtsmaßnahme wird empfohlen, das verwendete Humanmaterial immer als potentiell infektiös zu betrachten.

7. LAGERUNG UND VORBEREITUNG DER PROBEN

- 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 3x (KIF012.2) bzw. 4x (KIF012) je nach Probenaufkommen bis zum angegebenen Haltbarkeitsdatum verwendet werden.

7.1 Wasser

- Wasser (**DIL**) für Medium (**ASYMED**), Standard (**STD**), Kontrollen (**CTRL1**, **CTRL2**) und Verdünnungen.

7.2 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 gut vortexen. Die Menge ist ausreichend für 6 Mikrostreifen.
- Medium mit Einwegspritze (10 ml) und dem 0,2-µm-PES-Filter in ein Zentrifugenröhrchen (15 ml, z. B. Falcon) sterilfiltrieren.

7.3 Herstellung der Kontrollen

- Die lyophilisierten Kontrollen (**CTRL1**, **CTRL2**) sind mit je **300 µl** Wasser (**DIL**) aus dem Testkit zu resuspendieren und mittels Vortex-Mixer zu homogenisieren.
- Die Konzentration der Kontrollen ändert sich von Charge zu Charge und ist der Produktspezifikation zu entnehmen.

7.4 Herstellung der Standardkurve

- Für die Herstellung des für die Standardkurve benötigten Standardkonzentrats ist der lyophilisierte Standard (**STD**) mit x ml Wasser (**DIL**) (x = siehe Quality Control Protocol) aus dem Testkit zu resuspendieren und mittels Vortex-Mixer 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	+	0	=	700
Standard 1:	6	+	50	=	750
Standard 2:	18	+	100	=	500
Standard 3:	27	+	150	=	500
Standard 4:	36	+	200	=	500
Standard 5:	54	+	300	=	500

7.5 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

8. PROBENLAGERUNG UND -VORBEREITUNG

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

8.1 Kontrollverdünnung

20 µl Kontrolle mit 480 µl Wasser (**DIL**) versetzen und mischen. Dies entspricht einer 1:25-Verdünnung (= Probenverdünnungsfaktor).

8.2 Probenvorbehandlung

75 µl Serum mit 300 µl Probenvorbereitungspuffer (**SOL**) versetzen (Verhältnis 1:5), mischen, bei 95 °C für 30 min erhitzen, anschließend 10 min bei 2–8 °C kühlstellen und dann 10 min zentrifugieren (10 000 g).

8.3 Probenverdünnung

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

9. TESTDURCHFÜHRUNG

9.1 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.

9.2 Testansatz

- Benötigte Mikrotiterstreifen entnehmen und in den Ersatzrahmen (**FRA**) stecken.
- 150 µl steriles Assay-Medium in jede Kavität geben.
- Je 150 µl der hergestellten Standardverdünnungen (Blank, Standard 1–5), vorbereiteten Proben und Kontrollen in die jeweiligen Kavitäten pipettieren. Pipettenspitzen jeweils mit der Standard-, Proben- bzw. Kontroll-Lösung vor-spülen.
- 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 **46–50 h** im Brutschrank inkubieren.

9.3 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 nach hinten 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 **46–50 h** Inkubation kann die Mikrotiterplatte (**PLATE**) auch für max. 48 h im Kühlschrank aufbewahrt werden, um danach die Trübung zu messen.

10. AUSWERTUNG DER ERGEBNISSE

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

Der Blank dient als optische Kontrolle zum Ausschluss von Kontaminationen und wird nicht in der Berechnung berücksichtigt. Die optische Dichte muss < Standard 1 haben. Ist dies nicht der Fall, muss die Analyse erneut durchgeführt werden.

10.1 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.

10.2 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.

11. EINSCHRÄNKUNGEN

Nur Serum kann im Test eingesetzt werden.

12. TESTCHARAKTERISTIKA

Die nachfolgenden Testcharakteristika wurden mit Humanserum erhoben.

12.1 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

12.2 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

13. ALLGEMEINE HINWEISE ZUM TEST

- Dieser Kit wurde nach der IVD Richtlinie 98/79/EG hergestellt und in den Verkehr gebracht.
- Alle im Kit enthaltene Reagenzien dürfen ausschließlich zur *in-vitro*-Diagnostik eingesetzt werden.
- ID-Vit® ist eine Marke der Immundiagnostik AG.
- Reagenzien nach Ablauf des Verfallsdatums nicht mehr verwenden (Verfallsdatum siehe Testpackung).
- Einzelkomponenten mit unterschiedlichen Lot-Nummern aus verschiedenen Testpackungen nicht mischen oder austauschen.
- 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 immer mitmessen.
- Die Bestimmung ist immer nach der dem Kit beigefügten Arbeitsanleitung durchzuführen.
- Schwerwiegende Vorfälle sind der Immundiagnostik AG und den nationalen Aufsichtsbehörden zu melden.

14. ENTSORGUNG















Flüssige Testbestandteile, Mikrotiterplatten und Gefäße sind, falls nicht anders angegeben, wie gewöhnlicher Laborabfall zu behandeln. Proben und andere potenziell infektiöse Materialien müssen entsprechend den behördlichen Vorschriften entsorgt werden.

15. 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.

16. SYMBOLE

	Temperaturbegrenzung		Bestellnummer
	In-Vitro-Diagnostikum		Zu verwenden mit
	Hersteller		Inhalt ausreichend für <n> Prüfungen
	Chargenbezeichnung		Verwendbar bis
	Enthält Plasmaderivate oder menschliches Blut		Gebrauchsanweisung beachten
	Spezifikationsdatenblatt beachten		Nicht wiederverwenden
	eindeutige Produktidentifizierung		Enthält Material tierischen Ursprungs
	medizinische Substanz		Enthält Material humanen Ursprungs

ID-Vit[®] vitamin B₁₂

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

For use in human and veterinary medicine and in research

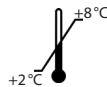
Valid from 2024-10-08

REF KIF012

REF KIF012.2

Σ 96

Σ 2 x 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

Safety information

The assay has to be performed exclusively according to the instructions for use enclosed with the kit. Important safety information for this product can be found in the chapter WARNINGS AND PRECAUTIONS..

Table of Contents

1. INTENDED PURPOSE	17
2. INTRODUCTION	17
3. PRINCIPLE OF THE TEST	18
4. MATERIAL SUPPLIED	18
5. MATERIAL REQUIRED BUT NOT SUPPLIED	19
6. WARNINGS AND PRECAUTIONS	19
7. STORAGE AND PREPARATION OF REAGENTS	20
7.1 Water	20
7.2 Preparation of the sterile assay medium	20
7.3 Preparation of the controls	20
7.4 Preparation of the standard curve	21
7.5 Microtiter plate (PLATE)	21
8. SAMPLE STORAGE AND PREPARATION	22
8.1 Control dilution	22
8.2 Sample pretreatment	22
8.3 Sample dilution	22
9. ASSAY PROCEDURE	22
9.1 Test preparations	22
9.2 Test procedure	22
9.3 Measurement	23
10. EVALUATION OF RESULTS	23
10.1 Calculation	24
10.2 Quality control	24
11. LIMITATIONS	24
12. PERFORMANCE CHARACTERISTICS	24
12.1 Precision and reproducibility	25
12.2 Recovery	25
13. GENERAL NOTES ON THE TEST	26
14. DISPOSAL	27
15. REFERENCES	27
16. SYMBOLS	28

1. INTENDED PURPOSE

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. 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. In the distal ileum, the cobalamin-intrinsic factor complex is bound to special receptors and thus absorbed into the intestinal mucosa cells. In the case of high doses, a diffusion of free vitamin B₁₂ also takes place. Within the cells, vitamin B₁₂ is released from the intrinsic factor and bound to the protein transcobalamin II (TC-II). 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 to folic acid, the body also needs vitamin B₁₂ as an essential cofactor to break down homocysteine.

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 resorption disorders
- Pancreatic insufficiency
- Patients with thrombosis
- Alcoholism
- Chronic liver and kidney disease
- Vitamin B₁₂ deficiency from diet (vegans)
- Pregnancy and lactation

3. PRINCIPLE OF THE TEST

The serum samples are pre-treated with a buffer mixture and diluted, 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 46–50 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
KIF000.30	DIL	Water	4 x 30 ml	5 x 30 ml
KIF012/ KIF012.2	PLATE	microtiter plate, precoated with <i>Lactobacillus delbrueckii</i> subsp. <i>lactis</i> -	1 x	2 x
	SOL	Sample preparation buffer	6 x 5 ml	12 x 5 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 microtiter strips	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) or thermoblock (95 °C)
- ELISA reader 610–630 nm (540–550 nm)
- Calibrated precision pipettors and sterile single use 20–1 000 µl tips
- 5 ml and 10 ml pipets
- 1.5–2 ml reaction vials
- 0.2 µm sterile polyethersulfone (PES) filter with a disposable syringe (10 ml)
- 15 ml centrifuge tubes (e.g. Falcon tubes)
- Biocentrifuge (10 000 g)
- Vortex

6. WARNINGS AND PRECAUTIONS

- The test is based on a microbiological method. Contaminations lead to erroneous results.
- Water quality is extremely important for the test. Use only the water delivered with the test kit (**DIL**).
- For sterile filtration, only a sterile polyethersulfone filter must be used.
- It is essential to run a standard curve for each separate assay.
- Measure controls with each assay.
- We recommend measurements in duplicate.
- Do not use reagents beyond the expiration date shown on the label.
- As a precaution, it is recommended that the human material used is always considered potentially infectious.
- Used microtiter stripes and materials that have been in contact with patient samples must be handled and disposed of as potentially infectious.

7. STORAGE AND PREPARATION OF REAGENTS

- Store test kit and reagents at 2–8 °C.
- Prepare reagents freshly and use them immediately after preparation.
- 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 3 x (KIF012.2) or 4 x (KIF012) within the expiry date stated on the label.

7.1 Water

- Water (**DIL**) for medium (**ASYMED**), standard (**STD**), controls (**CTRL1**, **CTRL2**) and dilutions.

7.2 Preparation of the sterile assay medium

- Fresh sterile assay medium has to be prepared each time before performing a test.
- Remove the desiccant bag from the lyophilised 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 vortex well. This amount is sufficient for 6 microtiter stripes.
- Filter the medium using a disposable syringe (10 ml) and the 0.2 µm PES filter into a centrifuge tube (15 ml, e.g. Falcon).
- After this preparation, the sterile assay medium can be used in the test.

7.3 Preparation of the controls

- The lyophilised controls (**CTRL1**, **CTRL2**) have to be resuspended each with **300 µl** water (**DIL**) from the test kit, then homogenise using a vortex.
- The concentration of the controls changes from lot to lot and is stated in the product specification.

7.4 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 water (**DIL**) (x = see quality control protocol) supplied with the test kit, then homogenise using a vortex.
- Prepare a standard curve in 6 sterile reaction tubes (1.5–2 ml volume) 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

7.5 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.

8. SAMPLE STORAGE AND PREPARATION

- Use serum for analysis.
- Samples are stable at 2–8°C for one day in the dark. For longer storage, samples can be frozen and kept at -20°C for up to 5 months.
- Centrifuge samples prior to measurement (at least 5 min at 10 000 *g*). Use the resulting supernatant in the test.
- Do not use hemolytic samples for analysis as they may give erroneous results. Centrifuge lipemic samples at 13 000 *g* for 10 min before assaying to obtain a serum that is as fat free as possible.

8.1 Control dilution

Add 480 µl water (**DIL**) to 20 µl control and mix. This corresponds to a 1:25-dilution (= sample dilution factor).

8.2 Sample pretreatment

Mix 75 µl serum with 300 µl sample preparation buffer (**SOL**) (ratio 1:5), vortex, heat at 95°C for 30 min, then cool 10 min at 2–8°C and then centrifuge for 10 min (10 000 *g*).

8.3 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).

9. ASSAY PROCEDURE

9.1 Test preparations

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

9.2 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 each cavity.

- Add 150 µl of the prepared standard dilutions (blank, standard 1–5), 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 **46–50 h** in an incubator.

9.3 Measurement

- Press the adhesive cover foil (**FOL**) firmly down again with the hand.
- Turn the microtiter plate (**PLATE**) upside down, place 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 E 540–550 nm).

Please note

- After 46–50 h incubation time, the microtiter plate (**PLATE**) may be stored for a maximum of 48 h in the refrigerator before measuring the turbidity.

10. 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 serves as a visual control to exclude contamination and is not taken into account in the calculation. The optical density must be < standard 1. If this is not the case, the analysis must be carried out again.

10.1 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 reference range is given for guidance only and may differ from other published data.

10.2 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.

11. LIMITATIONS

Only serum can be used for the test.

12. PERFORMANCE CHARACTERISTICS

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

12.1 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

12.2 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

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.
- Do not use reagents beyond the expiration date stated on the kit label.
- Do not interchange different lot numbers of any kit component within the same assay.
- Follow the guidelines for medical laboratories.
- Incubation time, incubation temperature and pipetting volumes of the components are defined by the producer. Any variation of the test procedure, which has not been consulted 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 made within 14 days after reception of the product. The product should be sent to Immundiagnostik AG along with a written complaint.
- Analyse controls with each run.
- Always perform assay according to the enclosed manual.
- Serious incidents are to be reported to Immundiagnostik AG and the national regulatory authorities.

















14. DISPOSAL

Liquid test components, microtiter plates and vials should be treated as ordinary laboratory waste unless otherwise stated. Specimens and other potentially infectious materials must be disposed of in accordance with regulatory requirements.

15. 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.

16. SYMBOLS

	Temperature limitation		Catalogue number
	In Vitro Diagnostic Medical Device		To be used with
	Manufacturer		Contains sufficient for <n> tests
	Lot number		Use by
	Contains plasma derivatives or human blood		Consult instructions for use
	Consult specification data sheet		Do not re-use
	Unique Device Identification		Contains material of animal origin
	Medicinal substance		Contains material of human origin

Immundiagnostik AG

Stubenwald-Allee 8a
64625 Bensheim, Germany

Tel.: +49 6251 70190-0

Fax: +49 6251 70190-363

info@immundiagnostik.com

www.immundiagnostik.com

