

ID-Vit® Vitamin B₁₂

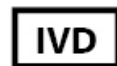
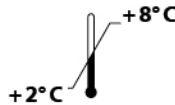
Mikrobiologisches Verfahren zur Bestimmung des Gesamtgehalts
von Vitamin B₁₂ in Serum mittels einer *Lactobacillus delbrueckii*
subsp. *lactis*-beschichteten Mikrotiterplatte
Zur Verwendung in Human- und Veterinärmedizin und
zu Forschungszwecken

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 06.07.2011



KIF012



ifp Institut für Produktqualität GmbH
Teltowkanalstr. 2
12247 Berlin, Germany
www.produktqualitaet.com

Vertrieb durch/ distributed by:
Immundiagnostik AG
Stubenwald-Allee 8a
64625 Bensheim, Germany
www.immundiagnostik.com

Inhalt

Content	14
1. VERWENDUNGSZWECK	2
2. EINLEITUNG	2
3. TESTPRINZIP	3
4. INHALT DER TESTPACKUNG	4
5. ERFORDERLICHE LABORGERÄTE UND HILFSMITTEL	4
6. LAGERUNG DER REAGENZIEN	5
7. HINWEISE UND VORSICHTSMASSNAHMEN	5
8. PROBENVORBEREITUNG	6
8.1 Probenvorbehandlung	6
8.2 Probenverdünnung	6
9. TESTDURCHFÜHRUNG	6
9.1 Testvorbereitungen	6
9.2 Testansatz	8
9.3 Messung	8
10. AUSWERTUNG DER ERGEBNISSE	9
11. TESTCHARAKTERISTIKA	10
12. LITERATUR	12
13. ALLGEMEINE HINWEISE ZUM TEST	12

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 incl. 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 Corrinoide 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 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 an 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 erhöhte 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-Mangelerscheinung** 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 [PLATE] gegeben, die mit *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *lactis* beschichtet sind. Nach Zugabe von Vitamin B₁₂ als Standard [STD] oder als in einer Serumprobe enthaltenes Vitamin wächst der Keim solange, bis das Vitamin aufgebraucht ist. Die Inkubation erfolgt bei **37 °C** für **44 - 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

Artikel Nr.	Abkürzung	Kit Komponenten	Menge
KIF012MTP	PLATE	1 x Mikrotiterplatte, beschichtet mit <i>Lactobacillus delbrueckii</i> subsp. <i>lactis</i> , gebrauchsfertig	12 Streifen à 8 Kavitäten
KIF012SO	SOL	Probenvorbereitungspuffer 5 ml, gebrauchsfertig	4 x
KIF012STAB	STAB	Stabilisierungsreagenz	4 x
KIF012DI	DIL	Wasser 30 ml, gebrauchsfertig	4 x
KIF012ME	ASYMED	Vitamin B ₁₂ -Assay-Medium	4 x
KIF012ST	STD	Vitamin B ₁₂ -Standard	4 x
KIF012FO	FOL	Abklebefolie	4 x
KIF012FR	FRA	Ersatzrahmen zum Umstecken der Mikrotiterstreifen	1 x
KIF012KO1	CTRL1	Vitamin B ₁₂ -Kontrolle 1	4 x
KIF012KO2	CTRL2	Vitamin B ₁₂ -Kontrolle 2	4 x

5. ERFORDERLICHE LABORGERÄTE UND HILFSMITTEL

- Inkubator mit dunkler Inkubationskammer, 37 °C
- Wasserbad (90°C - 100°C)
- ELISA-Reader 610 - 630 nm (540 - 550 nm)
- Mikropipette 20 - 200 µl
- Mikropipette 100 -1000 µl
- Mikropipettenspitzen 20 - 200 µl und 100 -1000 µl, steril
- Pipette 5 bzw. 10 ml
- 1,5 - 2 ml Reaktionsgefäße, steril
- 0,2 µm Sterilfilter (Polyethersulfon) und Einwegspritze (10 ml)
- 15 ml Zentrifugenröhrchen, steril (z.B. Falcons)
- Biozentrifuge (10 000 x g)

6. LAGERUNG DER REAGENZIEN

- Den Testkit / die Reagenzien bei 2 - 8 °C lagern.
- Angesetzte Reagenzien unmittelbar verwenden und nach Testansatz verwerfen.
- Nicht angebrochene Reagenzien (Standard, Medium) in den Testkit zurücklegen und bei 2 - 8 °C lagern.
- Nicht benötigte Mikrotiterplatten-Streifen zusammen im Rahmen mit dem Trockenmittel im Folienbeutel gut verschlossen aufbewahren und bei 2- 8 °C lagern. Die Mikrotiterplatten-Streifen müssen vor Kontamination und Feuchtigkeit geschützt sein.
- Nach Ablauf des Verfallsdatums (siehe Testkit - Außenetikett) kann keine Qualitätsgarantie mehr übernommen werden.
- Bitte achten Sie bei mehrfachem Einsatz der Platte [PLATE] 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 4 x je nach Probenaufkommen bis zum angegebenen Haltbarkeitsdatum verwendet werden.

7. HINWEISE UND 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] für den Ansatz des Mediums [ASYMED] und die Rekonstitution des Standards [STD] verwenden.
- Bei jeder Testdurchführung sollte eine **Kalibration** mitgeführt werden.
- Es wird eine **Doppelbestimmung** der Standards [STD], der Kontrollen [CTRL1, CTRL2] und der Proben empfohlen.
- Ergibt die höhere Verdünnung einen höheren Messwert, können **Hemmstoffe wie Antibiotika** vorliegen.
- Die Reagenzien dürfen nach Ablauf des Mindesthaltbarkeitsdatums nicht mehr verwendet werden.
- Während der Testdurchführung Handschuhe tragen.
- Gebrauchte Mikrotiterplattenstreifen sowie andere mit Patientenproben in Kontakt gekommene Materialien als potenziell infektiös behandeln und entsprechend entsorgen.
- Anzeichen für Reagenzienverfall: Der höchste Standard sollte eine Absorption größer als 0,6 Extinktionseinheiten ($A_{630nm} > 0,6$) erreichen.

8. PROBENVORBEREITUNG

Hinweise

- 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 x g). Den resultierenden Überstand im Test einsetzen.

8.1 Probenvorbehandlung

4 ml Probenvorbereitungspuffer [SOL] in Fläschchen mit Stabilisierungsreagenz [STAB] überführen. Gut schütteln.

75 µl Serum oder Kontrolle [CTRL1, CTRL2] mit 300 µl dieser vorbereiteten Lösung versetzen, mischen, bei 95° C 30 min erhitzen, schnell abkühlen und 10 min zentrifugieren (10 000 x g).

8.2 Probenverdünnung

Vom Überstand der vorbehandelten Serumprobe oder Kontrolle [CTRL1, CTRL2] 100 µl abnehmen, 400 µl Wasser [DIL] zugeben und mischen. Die Probenvorbehandlung und -verdünnung entsprechen insgesamt einer 1:25-Verdünnung (= Probenverdünnungsfaktor).

9. TESTDURCHFÜHRUNG

Hinweise

- Qualitätskontrollen sollten immer mitgemessen werden.
- Inkubationszeit, Temperatur und Pipettivolumina sind vom Hersteller festgelegt. Jegliche Abweichung der Testvorschrift, die nicht den Angaben des Herstellers entspricht, kann zu fehlerhaften Ergebnissen führen.
- Die Bestimmung ist immer nach der im Kit beigelegten Arbeitsanleitung durchzuführen.

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.

Wasser [DIL] für Medium [ASYMED], Standard [STD] und Kontrollen [CTRL1, CTRL2]

- Alu-Bördelkappe nach oben drücken, nach hinten bis zum Glasrand abziehen und dann durch Drehen den gesamten Verschluss entfernen.

Assay-Medium [ASYMED]

- Das Medium [ASYMED] muss vor jedem Test frisch hergestellt werden.
- Trockenbeutel vom Medium [ASYMED] im Fläschchen mit Pinzette abschütteln, herausnehmen und werfen.
- Zum Assay-Medium [ASYMED] 10 ml Wasser [DIL] zugeben, das Fläschchen gut verschließen und schütteln. Die Menge ist ausreichend für 6 Mikrotiterstreifen.
- Mediumflasche [ASYMED] 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 [ASYMED] immer fest verschlossen ist.
- Mediumflasche [ASYMED] schnell auf unter 30 °C abkühlen.
- Medium [ASYMED] mit Einwegspritze (10 ml) und einem 0,2 µm-Filter in ein steriles Zentrifugenröhrchen (15 ml, z.B. Falcon) sterilfiltrieren.

Standard [STD]

Standardverdünnungsreihe vor dem Test frisch herstellen:

- Standardflasche [STD] öffnen, Schraubdeckel mit dem Kopf nach unten ablegen.
- In die Standardflasche [STD] x ml (x = siehe dem Testkit beiliegendes QS-Datenblatt) Wasser [DIL] aus dem Testkit zugeben, mit dem Schraubdeckel verschließen und schütteln = Standard (Konzentrat).
- In 6 sterilen Reaktionsgefäßen (Fassungsvermögen 1,5 - 2,0 ml) Wasser [DIL] aus dem Testkit vorlegen und anschließend Standard (Konzentrat) hinzupipettieren, d.h. eine Standardkurve nach folgendem Schema erstellen:

Vitamin B ₁₂ [ng / l]	Wasser [DIL] [µl]	+	Standard [STD] [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

Kontrollen [CTRL1, CTRL2]

Kontrollen vor dem Test frisch herstellen:

- Kontrollflaschen [CTRL1, CTRL2] öffnen, Schraubdeckel mit dem Kopf nach unten ablegen.
- In die Kontrollflaschen [CTRL1, CTRL2] 0.3 ml Wasser [DIL] aus dem Testkit zugeben, Deckel schließen und Fläschchen vortexten (= Kontrolle 1 und Kontrolle 2).
- Die Kontrollen [CTRL1, CTRL2] werden nach dem Rekonstituieren wie eine Probe behandelt.
- Pro Kavität werden 150 µl der verdünnten Kontrollen [CTRL1, CTRL2] pipettiert. Wir empfehlen eine Doppelbestimmung der Kontrollen [CTRL1, CTRL2].
- Die Konzentration der Kontrollen [CTRL1, CTRL2] entnehmen Sie bitte der Kontrollspezifikation.

9.2 Testansatz

- Benötigte Mikrotiterstreifen entnehmen und in den Ersatzrahmen [FRA] stecken. Die nicht gebrauchten Streifen im Rahmen sofort in den Beutel zurücklegen und diesen sorgfältig verschließen. Die Mikrotiterplatten-Streifen müssen vor Kontamination und Feuchtigkeit geschützt sein.
- Ein Mediumansatz ist ausreichend für 6 Mikrotiterstreifen (= 48 Kavitäten).
- 150 µl steriles Vitamin B₁₂-Assay-Medium [ASYMED] in die Kavitäten geben.
- 150 µl Standard [STD] bzw. Probe oder Kontrolle [CTRL1, CTRL2] in die jeweiligen Kavitäten pipettieren. Pipettenspitzen jeweils mit der Standard-, Proben- bzw. Kontroll-Lösung [CTRL1, CTRL2] vorspülen.
- Sorgfältig die befüllten Kavitäten mit Folie [FOL] abkleben. Wichtig: die Kavitäten müssen durch Andrücken mit Hand luftdicht verschlossen werden!
- Bei 37 °C für 48 h im Brutschrank inkubieren.

9.3 Messung

- Klebefolie [FOL] nochmals mit der Hand fest andrücken
- Platte [PLATE] über Kopf drehen, auf eine Tischoberfläche legen und Keime gut aufschütteln
- Platte [PLATE] wieder zurückdrehen und die Abklebefolie [FOL] diagonal, von oben rechts beginnend, in einem Winkel von ca. 180° **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 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.

10. AUSWERTUNG DER ERGEBNISSE

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

Serum

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

Referenzbereich für Humanserum

Vitamin B₁₂ :

n = 83 25 - 500 ng/l (= 18,4 - 368,5 pmol/l)

Anmerkung

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

Wir empfehlen, dass jedes Labor seinen eigenen Normalwerte-Bereich erstellt, weil 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.

11. TESTCHARAKTERISTIKA (mit Humanserum erhoben)

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

Wiederfindung

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

n = 5

Probe	Mittelwert der 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

n = 5

Probe	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

n = 5

Probe	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. LITERATUR

Strohecker R, Henning H (1963) Vitamin-Bestimmungen. Hrsg. E. Merck AG, Darmstadt. Verlag Chemie, Weinheim

Obeid R, Herrmann W (2006) Mechanism of homocysteine neurotoxicity in neurodegenerative diseases with special reference to dementia. FEBS Lett 29, 580(13):2994-3005, Epub 2006 May 6

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.
- 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 charakteristischen Testdaten wie Pipettiervolumina der verschiedenen Komponenten und der Aufbereitung der Proben wurden firmenintern festgelegt. Nicht mit dem Hersteller abgesprochene Veränderungen in der Testdurchführung können die Resultate beeinflussen. Das ifp Institut für Produktqualität GmbH übernimmt für direkt daraus resultierende Schäden und Folgeschäden keine Haftung.

Verwendete Symbole:



Temperaturbegrenzung



Bestellnummer



In-Vitro-Diagnostikum



Inhalt ausreichend für <n> Prüfungen



Hersteller



Verwendbar bis



Chargenbezeichnung

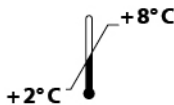
ID-Vit® Vitamin B₁₂

**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 06.07.2011



KIF012



ifp Institut für Produktqualität GmbH
Teltowkanalstr. 2
12247 Berlin, Germany
www.produktqualitaet.com

Distributed by:
Immundiagnostik AG
Stubenwald-Allee 8a
64625 Bensheim, Germany
www.immundiagnostik.com

Content

1. INTENDED USE	15
2. INTRODUCTION	15
3. PRINCIPLE OF THE TEST	16
4. MATERIAL SUPPLIED	17
5. MATERIAL REQUIRED BUT NOT SUPPLIED	17
6. PREPARATION AND STORAGE OF REAGENTS	18
7. PRECAUTIONS	18
8. SAMPLE PREPARATION	19
8.1 Sample pretreatment	19
8.2 Sample dilution	19
9. ASSAY PROCEDURE	19
9.1 Test preparations	20
9.2 Test Initiation	21
9.3 Measurement	21
10. EVALUATION OF RESULTS	22
11. PERFORMANCE CHARACTERISTICS	22
Recovery	23
12. REFERENCES	24
13. GENERAL NOTES ON THE TEST AND TEST PROCEDURE	24

1. INTENDED USE

ID-Vit® Vitamin B₁₂ is a microtiter plate test kit based on a microbiological assay which measures the total Vitamin B₁₂ content in serum. The test kit contains all required reagents, e.g. standard, medium and microtiter plate coated with a specific microorganism, sufficient for 96 determinations including standard curves. An ELISA reader is required for evaluation of the Vitamin B₁₂ content. For use in human and veterinary medicine and in research. The test kit is 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 in the metabolism process as a co-enzyme, 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 methionine from homocysteine.

Vitamin B₁₂-Deficiency

Vitamin B₁₂ deficiency is seldom 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 could 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 the intake because their liver vitamin B₁₂ stores may 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)
- Homocysteinurie
- Peripheral neuropathy
- Patients with CED, gastritis, gastrektomy, gluten intolerance or intestinal resorption 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 is pre-treated and diluted with a buffer mixture, and then samples were transferred in the wells of a microtiter plate [PLATE] coated with *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *lactis*. The addition of vitamin B₁₂ in either standards [STD] or samples gives a vitamin B₁₂-dependent growth response until vitamin B₁₂ is consumed. After incubation at **37°C** for **44 - 48 h**, the growth of *Lactobacillus plantarum* 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

Catalog No	Label	Kit Components	Quantity
KIF012MTP	PLATE	One Lactobacillus delbrueckii subsp. lactis-precoated microtiter plate, ready to use	12 x 8 wells
KIF012SO	SOL	Sample preparation buffer 5 ml, ready to use	4 x
KIF012STAB	STAB	Stabilizer	4 x
KIF012DI	DIL	Water 30 ml	4 x
KIF012ME	ASYMED	Vitamin B ₁₂ assay medium	4 x
KIF012ST	STD	Vitamin B ₁₂ standard	4 x
KIF012FO	FOL	Cover plastic foil	4 x
KIF012FR	FRA	Replacement holder for 96-well plates	1 x
KIF012KO1	CTRL1	Control 1 Vitamin B ₁₂	4 x
KIF012KO2	CTRL2	Control 2 Vitamin B ₁₂	4 x

5. MATERIAL REQUIRED BUT NOT SUPPLIED

- Incubator with a dark incubation chamber, 37 °C
- Water bath (90°C - 100°C)
- ELISA-Reader 610 - 630 nm (540 - 550 nm)
- Micropipette 20 - 200 µl
- Micropipette 100 -1000 µl
- Micropipette tips to deliver 20 - 200 µl and 100 -1000 µl, sterile
- Pipettes of 5 and 10 ml
- 1,5 - 2 ml reaction vials, sterile
- 0,2 µm sterile polyethersulfone filter with a sterile tip
- 15 ml centrifugal tubes, sterile (e.g. Falcon tubes)
- Biocentrifuge (10 000 x g)

6. PREPARATION AND STORAGE OF REAGENTS

- Store test kit / reagents at 2-8°C.
- Prepare reagents freshly and use immediately after preparation. Discard remaining unused reagents and waste in accordance with country, federal, state, and local regulations.
- Put unused reagents (standard, controls, medium) in the test kit and store at 2-8°C.
- Store unused strips in the original package with dry bag securely closed at 2-8° C to prevent contamination or moisture exposure.
- No warranty can be given after the expiry date (see label of test package).
- To run assay more than once, ensure that reagents are stored at conditions stated on the label. Prepare only the appropriate amount necessary for each assay. The kit can be used up to 4 times within the expiry date stated on the label.

7. PRECAUTIONS

- As the test is based on a microbiological method, the general guidelines for sterile work must be observed as far as possible, (work in a sterile bench, PCR-Hood, use of sterile instruments or equipment).
- GLP (Good Laboratory Practice)-guidelines should be observed.
- Water quality is extremely important. Only the water delivered with the test kit [DIL] should be used for medium dilution [ASYMED], standard [STD] and control [CTRL1, CTRL2] reconstitution as well as for sample preparation.
- It is essential to run a standard curve for each separate assay.
- It is recommended to run a duplicate standard [STD] curve as well as a sample and control [CTRL1, CTRL2] analysis.
- If a higher dilution results in a higher measured value, inhibitors like antibiotics might be present.
- Reagents should not be used beyond the expiration date shown on kit label.
- Wear gloves during the test.
- Used microtiter plates [PLATE] and materials that have been in contact with patient's samples should be handled and disposed as potentially infectious.
- Signs for reagent damage: The highest standard should have an absorption higher than 0.6 Extinction units (A630nm > 0,6)

8. SAMPLE PREPARATION

Notes

- Patient serum is used for analysis.
- Original samples should be kept light-protected at 2-8°C until measurement. The samples are stable for 8 hours at 2-8°C 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 x g before assaying to obtain fat free serum as far as possible.
- Samples should be centrifuged (5 min at 10000 g) prior to measurement and the resulting supernatant used in the test.

8.1 Sample pretreatment

Add 4 ml sample preparation buffer [SOL] to the bottle with the stabilizer [STAB]. Mix well. Add 75 µl serum sample or control [CTRL1, CTRL2] to 300 µl of this solution, mix, heat to 95°C for 30 min and then cool quickly. Afterwards, centrifuge for 10 min at 10000 g.

8.2 Sample dilution

Take 100 µl from the supernatant of the treated serum sample and control [CTRL1, CTRL2], add 400 µl water [DIL] and mix. The sample treatment and dilution results in a final dilution of 1:25 (= sample dilution factor).

9. ASSAY PROCEDURE

Procedural notes

- Quality control guidelines should be observed.
- 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.
- The assay should always be performed according the enclosed manual.

9.1 Test preparations

Take as many microtiter strips as needed from kit. Return unused strips and any unused test kit component to the original foil bag, reseal them together with the desiccant provided, and put in the refrigerator. Bring all necessary reagents to room temperature.

Water [DIL] for medium [ASYMED], standard [STD] and controls [CTRL1, CTRL2]

Push the lid up, pull it back to the rim of the glass and then remove the entire seal by turning.

Assay medium [ASYMED]

- The medium must be freshly prepared before each test.
- Take the dry bag out of medium vial [ASYMED] by tweezers, shake off and discard.
- Add 10 ml of water [DIL] to the assay medium [ASYMED], securely close the bottle and shake well. The amount is sufficient for 6 strips.
- Heat the bottle with medium [ASYMED] in a water-bath at 90 - 100 °C for 5 min, while shaking well at least twice. It is important to make sure that the medium bottle [ASYMED] is firmly closed at all times.
- Quickly cool the medium bottle [ASYMED] to under 30 °C.
- Filter 10 ml medium [ASYMED] sterilely with a 0.2 µm filter in a centrifuge test tube (e.g. 15 ml, Falcon).

Controls [CTRL1, CTRL2]

- The controls must be freshly prepared before the test.
- Open the bottles of controls [CTRL1, CTRL2], remove seal. Dispose of screw-top lid and seal.
- Add 0.3 ml water [DIL] from the test kit to the control bottles [CTRL1, CTRL2], close the bottle and dissolve by vortexing the bottle (= control).
- Treat the controls afterwards as the sample is treated.
- Pipette 150 µl of the reconstituted controls [CTRL1, CTRL2] into each well. We recommend to run a duplicate.
- For the concentration of the controls [CTRL1, CTRL2] please see control specification.

Standard [STD]

Before the test, freshly prepare the standard curve solutions:

- Open the bottle of standard [STD], place the screw-top lid upside-down on the work bench.
- Add x ml (x = see QS test kit data sheet) water [DIL] from the test kit to the standard bottle [STD], close the bottle and shake (= standard concentrate).
- Add water [DIL] into 6 sterile reaction vials (capacity 1.5 – 2.0 ml) and then pipet the standard concentrate to the vials. Prepare a standard curve using the following

scheme:

Vitamin B ₁₂ [ng / l]	Water [DIL] [μl]	+	Standard [STD] [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

9.2 Test Initiation

- Take as many microtiter strips as needed from the kit in put them in the second microtiter strip holder [FRA]. Return unused strips to the original foil bag, reseal them together with the desiccant provided, and store at 2-8° C to prevent contamination or moisture exposure.
- A medium solution is sufficient for 6 strips.
- Put 150 μl Vitamin B₁₂ assay medium [ASYMED] in the cavities.
- Add 150 μl standard [STD], controls [CTRL1, CTRL2], respectively, sample in the cavities. Pre-rinse the pipette tip with standard, control and sample solution respectively.
- Carefully seal the plate with plastic foil [FOL]. Important: the cavities must be made airtight by pressing down with the hand!
- Keep at **37 °C** for 48 hrs in an incubator.

9.3 Measurement

- Securely press the foil [FOL] down with the hand.
- Upturn the plate [PLATE] onto a tabletop and shake the germination well.
- Turn the plate [PLATE] over again and carefully remove the foil [FOL], beginning with the upper right corner and pulling diagonally backwards at an angle of 180°. 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 pipette tip or a needle.
- Read turbidity in an ELISA-Reader at E 610 - 630 nm (alternatively at 540 - 550 nm).

Please note

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

10. EVALUATION OF RESULTS

We recommend to use the „4-Parameter-algorithm to calculate the results. The sample dilution factor should be considered for data evaluation.

Serum

Vitamin B₁₂ in ng / l = Value from the standard curve x sample dilution factor

Reference value for human serum

Vitamin B₁₂ (n = 83): 25 - 500 ng/L (= 18.4 - 368.5 pmol/L)

Please note: A concentration range of 150 - 1350 ng/L Vitamin B₁₂ is covered at a sample dilution 1 : 25.

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

11. PERFORMANCE CHARACTERISTICS (obtained using human serum)

Precision and reproducibility

Intra Assay (n = 21)		
	Vitamin B ₁₂ [ng/L]	CV [%]
Sample	294	5.38
Inter-Assay (n = 3)		
	Vitamin B ₁₂ [ng/L]	CV [%]
Sample	285	8.0

Recovery

Samples from 3 patients were spiked with Vitamin B₁₂ and analyzed. The mean values are shown below:

n = 5

Sample	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 [%]
A	566.58	187.5	754.08	726.36	85
		375.0	941.58	908.21	91
Recovery rate in total [%]					88

n = 5

Sample	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

n = 5

Sample	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. REFERENCES

Strohecker R, Henning H (1963) Vitamin-Bestimmungen. Hrsg. E. Merck AG, Darmstadt. Verlag Chemie, Weinheim

Obeid R, Herrmann W (2006) Mechanism of homocysteine neurotoxicity in neurodegenerative diseases with special reference to dementia. FEBS Lett 29,580(13):2994-3005, Epub 2006 May 6

13. GENERAL NOTES ON THE TEST AND TEST PROCEDURE

- This assay was produced and put on the market according to the IVD guidelines of 98/79/EC.
- Test components contain organic solvents. Contact with skin or mucous membranes must be avoided.
- All reagents in the test package are for in vitro diagnostic use only.
- Reagents should not be used after the date of expiry stated on the label.
- Single components with different lot numbers should not be mixed or exchanged.
- Guidelines for medical laboratories should be observed.
- Incubation time, incubation temperature and pipetting volumes of the different components are defined by the producer. Any variations of the test procedure that are not coordinated with the producer may influence the results of the test. ifp Institute for Product Quality GmbH can, therefore, not be held reliable for any damage resulting from this.

Used symbols:



Temperature limitation



Catalogue Number



In Vitro Diagnostic Medical Device



Contains sufficient for <n> tests



Manufacturer



Use by



Lot number



Immundiagnostik AG

Stubenwald-Allee 8a
D-64625 Bensheim

Tel.: +49 (0) 62 51/70 19 00

Fax: +49 (0) 62 51/84 94 30

info@immundiagnostik.com

www.immundiagnostik.com