

VB12

Vitamina B12(CLIA)

Informações do pedido:

Número de catálogo	Tamanho de embalagem
VB12111	2 ×50 testes
VB12112	2 ×100 testes
VB12113	2 ×30 testes

Uso pretendido

O ensaio de Vitamina B12 (VB12) da série CL é um Imunoensaio quimioluminescente (CLIA) para a determinação quantitativa de Vitamina B12 sérica ou plasmática humana.

Resumo

A VB12, também chamada de cobalamina, refere-se a um grupo de compostos de vitâmero contendo cobalto, que contém metilcobalamina, 5-desoxiadenosina cobalamina, Cianocobalamina, por exemplo. A forma predominante no soro é a metilcobalamina, enquanto a forma celular predominante é a 5'-desoxiadenosila cobalamina. ¹ A Cianocobalamina é a forma mais estável, que é utilizada como composto de referência para medição das concentrações de cobalamina sérica.

As Cobalaminas são principalmente obtidas a partir de produtos de origem animal, tais como carne, ovos, leite e outros produtos lácteos. Quando ingerida, a VB12 é ligada ao fator intrínseco no estômago e, em seguida, absorvida no íleo. Após absorvida, a VB12 será transportada até o fígado.

A VB12 é uma coenzima envolvida em duas vias metabólicas: 1) a síntese de metionina a partir da homocisteína e 2) a conversão de metilmalonil-CoA parasuccinil-CoA.² A deficiência de VB12 resultará em anemia megaloblástica (MA) e problemas neurológicos graves.³ A relação entre os níveis de B12 e a MA nem sempre é clara; alguns indivíduos com MA apresentarão níveis normais de B12; de maneira oposta, muitos indivíduos com deficiência de B12 não apresentam MA. Para diagnosticar a deficiência de VB12, pacientes com sintomas anêmicos devem ser adicionalmente avaliados com testes para homocisteína e ácido metilmalônico.^{2,4,5} A VB12 está muito envolvida no metabolismo do ácido fólico. A deficiência de VB12 impede que o ácido 5'-N-metil-tetrahidrofólico se transforme em ácido tetrahidrofólico, resultando na redução da capacidade de síntese de DNA. Levando isso em consideração, é necessário medir tanto a VB12 quanto o ácido fólico na avaliação clínica. Diversos motivos podem resultar na deficiência de VB12, incluindo vegetarianismo, gastrectomia parcial, gestação, contracepção oral, idade avançada, autoanticorpo e mutação de genes associados à absorção ou transporte da VB12.^{7,8} Elevação dos níveis de VB12 sérica inclui insuficiência renal, doença hepática e doenças mieloproliferativas.⁹

Princípio de ensaio

O ensaio de VB12 da série CL é um ensaio imunoenzimático de ligação competitiva com um pré-tratamento automatizado de amostra para determinar o nível de VB12. Na primeira etapa, amostragem, o reagente de pré-tratamento 1 e o reagente de pré-tratamento 2 são adicionados à cubeta de reação. Após a incubação, a VB12 é liberada a partir de sua proteína de ligação. Na segunda etapa, a amostra pré-tratada é transferida para uma nova cubeta de reação e incubada com o conjugado de fator intrínseco-fosfatase alcalina. Após a incubação, a VB12 na amostra se liga ao conjugado de fator intrínseco-fosfatase alcalina.

Na terceira etapa, micropartículas paramagnéticas revestidas com VB12 biotinilada são adicionadas, levando a ligação competitiva da VB12 biotinilada ao fator intrínseco rotulado como fosfatase alcalina. Após a incubação, as micropartículas são capturadas magneticamente, enquanto

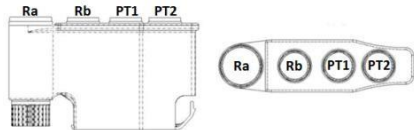
outras substâncias não vinculadas são removidas por lavagem.

Por fim, a solução do substrato é adicionada à cubeta de reação. Ela é catalisada pelo conjugado de fator intrínseco-fosfatase alcalina no imunocomplexo retido nas micropartículas. A reação de quimioluminescência resultante é medida como unidades de luz relativas (RLUs) por um fotomultiplicador integrado no sistema. A quantidade de VB12 na amostra é inversamente proporcional nas unidades de luz relativas (RLUs) geradas durante a reação. A concentração de VB12 pode ser determinada via uma curva de calibração.

Componente reagentes:

Ra	Micropartículas paramagnéticas revestidas com VB12 no tampão Tris com conservante.
Rb	Conjugado de fator intrínseco suíno-fosfatase alcalina no tampão PBS com conservante.
PT1	Ditiotreitol em tampão citrato de sódio com conservante.
PT2	K ₃ Fe(CN) ₆ em tampão hidróxido de sódio

A posição de cada componente reagente é mostrada na figura abaixo (vista frontal à esquerda e vista superior à direita):



Armazenamento e estabilidade:

O kit de reagente VB12 (CLIA) não aberto é estável até a data de expiração indicada quando armazenado entre +2°C a +8°C.

O kit de reagente VB12 (CLIA) pode ser armazenado onboard e usado por um máximo de 28 dias após a abertura entre +2°C a +8°C.

Preparação do reagente:

Ra: Pronto para uso

Rb: Pronto para uso

PT1: Pronto para uso

PT2: Pronto para uso

Materiais necessários, mas não fornecidos:

Analizador de Imunoensaio Quimioluminescente da série CL da Mindray.

Cat.No.VB12211/ VB12212: Calibradores de VB12, 1×2,0

mL/1×1,0 mL para cada calibrador C0, C1 e C2.

Cat.No.MML311: Multicontrolre metabólico (C), 3×2,0 mL.

Cat.No.MMH311: Multicontrolre metabólico (A), 3×2,0 mL.

Cat.No.MML312: Multicontrolre metabólico (C), 6×2,0 mL.

Cat.No.MMH312: Multicontrolre metabólico (A), 6×2,0 mL.

Cat.No.VB411: Tampão de lavagem, 1×10 L.

Cat.No.CS511: Solução de substrato, 4×115 mL. Cubeta de reação.

Instrumentos aplicáveis

Analizador de Imunoensaio Quimioluminescente da série CL da Mindray

Coleta e preparação da amostra

Amostras de soro ou plasma humanos coletados em EDTA, heparina sódica e heparina de lítio são recomendáveis para este ensaio.

Colete todas as amostras de sangue seguindo precauções de rotina para punção venosa. Siga as recomendações de centrifugação do fabricante do tubo de coleta de sangue. Centrifugue as amostras após a conclusão da formação de coágulos. Algumas amostras, principalmente aqueles de pacientes que recebem terapia anticoagulante podem apresentar maior tempo de coagulação. Certifique-se de que

a fibrina residual e a matéria celular sejam removidas antes da análise.

Para obter resultados ideais, veja se há bolhas em todas as amostras. Remova as bolhas com a ponta de uma pipeta antes da análise. As amostras devem ser completamente misturadas após descongelamento. Amostras descongeladas devem ser centrifugadas antes do uso. Se a amostra estiver coberta com uma camada lipídica após a centrifugação, essa amostra deverá ser transferida para um tubo limpo antes do teste. Não transfira a camada lipídica. Manuseie com cuidado para evitar a contaminação cruzada. Não use amostras grosseiramente hemolizadas. Não use amostras inativadas por calor.

As amostras devem ser testadas assim que possível, após a coleta da amostra. Se a testagem não for realizada em 8 horas, as amostras deverão ser armazenadas a 2-8°C ou em temperatura mais fria. As amostras devem ficar estáveis por 48 horas entre +2°C a +8°C, 2 meses a -20°C. Evite mais de um ciclo de congelamento.

Procedimento do ensaio

Para obter o procedimento de ensaio ideal, os operadores devem ler o manual de operação do sistema relacionado com atenção, para obter informações suficientes, como instruções de operação, preservação e administração da amostra, precauções de segurança e manutenção. Prepare todos os materiais necessários para o ensaio também.

Antes de carregar o kit de reagente de VB12 (CLIA) na máquina pela primeira vez, o frasco fechado do reagente deve ser invertido suavemente por pelo menos 30 vezes para ressuspensão das micropartículas que se acomodaram durante a remessa ou armazenamento. Inspeccione visualmente o frasco para assegurar que as micropartículas estão em suspensão de novo. Se as micropartículas permanecerem coladas no frasco, continue invertendo até que elas sejam totalmente ressuspensas. Se não for possível colocar as micropartículas em suspensão de novo, é recomendável não usar esse frasco de reagente. Entre em contato com o Serviço de Atendimento da Mindray para obter ajuda. Não inverta o frasco do reagente aberto. Este ensaio requer 50 µL de amostra para um único teste. Esse volume não inclui o volume morto do contêiner da amostra. Um volume adicional é necessário ao realizar mais testes da mesma amostra. Os operadores devem consultar o manual de operação do sistema e o requisito específico do ensaio para determinar o volume mínimo da amostra.

Calibração

O VB12 (CLIA) da série CL foi padronizado em relação a um teste VB12 comercial (CLIA).

As informações específicas do kit de reagente da curva de calibração principal de VB12 (CLIA) são armazenadas no código de barras bidimensional colado no pacote do reagente. Ele é usado em combinação com os calibradores de VB12 para a calibração do lote do reagente específico. Ao realizar a calibração, verifique as informações da curva de calibração principal do código de barras no sistema primeiro, e depois use os calibradores de VB12 em três níveis. A curva de calibração válida é necessária antes de qualquer teste de VB12. A recalibração é recomendável a cada 4 semanas ou quando um novo lote de reagente é usado, ou os controles de qualidade estão fora do intervalo especificado. Para obter instruções detalhadas de calibração, consulte o manual de operação do sistema.

Controle de qualidade

Recomenda-se que os controles de qualidade sejam executados uma vez a cada 24 horas, se os testes estiverem em uso, ou após cada calibração. A frequência de controle de qualidade deve ser adaptada às necessidades individuais de cada laboratório. Os dois níveis recomendados de controles de qualidade para este ensaio são Multicontrolre metabólico (C) e Multicontrolre metabólico (A). Os resultados do controle de qualidade devem estar dentro dos intervalos aceitáveis. Se um controle estiver fora do intervalo especificado, os resultados do teste associado serão inválidos e as amostras precisarão ser retestadas. Talvez seja necessário recalibrar. Examine o sistema do ensaio consultando o manual operacional do sistema. Se os

resultados do controle de qualidade ainda estiverem fora do intervalo especificado, entre em contato com o Serviço de Atendimento da Mindray para obter ajuda.

Cálculo

O analisador calcula automaticamente a concentração de analito de cada amostra na leitura da curva de calibração principal do código de barras, e um Ajuste da curva logística de 4 parâmetros (4PLC) com as unidades de luz relativas (RLUs) geradas dos calibradores de VB12 dos valores de concentração definidos. Os resultados são mostrados na unidade de pg/mL. Fatores de conversão: pmol/l x 1,36 = pg/mL, pg/mL x 0,738 = pmol/l

Valores esperados

Um estudo em um coorte de 138 indivíduos saudáveis determinou o intervalo de referência do ensaio de VB12 da série CL, gerando uma referência superior não paramétrico de 2,5%-97,5% entre 180-916 pg/mL. Devido à variação de dados geográficos, raça, gênero e idade, é altamente recomendável que cada laboratório estabeleça seu próprio intervalo de referência.

Limitações

O limite superior deste ensaio é de 2000 pg/mL. Uma amostra com concentração de VB12 menor que o limite superior pode ser quantitativamente determinado, enquanto o espécime com uma concentração mais alta do que o limite superior será relatado como >2000 pg/mL.

A concentração de VB12 em um dado espécime, determinada com ensaios de fabricantes diferentes, pode variar devido às diferenças nos métodos do ensaio, calibração e especificidade do reagente. Os resultados do ensaio devem ser usados em conjunto com outros dados para tomar decisões clínicas, como sintomas, resultados de outros testes, histórico clínico.

Os espécimes de indivíduos que foram expostos a anticorpos monoclonais de camundongos podem conter anticorpo humano anticamundongo (HAMA)¹⁰. Essas amostras podem mostrar valores falsamente elevados ou falsamente reduzidos com kits de ensaio que empregam anticorpos monoclonais de camundongos^{11,12}. No entanto, nenhuma interferência óbvia de HAMA foi observada neste ensaio.

Características de desempenho

Limites inferiores de medição

O kit de reagente de VB12 (CLIA) apresenta um Limite de Espaço em Branco (LoB) de ≤ 50 pg/mL, um Limite de Detecção (LoD) de ≤ 125 pg/mL e um Limite de Quantificação (LoQ) de ≤ 150 pg/mL (com um erro relativo permitido total ≤ 30 %).

Intervalo para relatório

O intervalo para relatório é definido pela sensibilidade analítica e o limite superior da curva de calibração principal. O intervalo para relatório do kit de reagente de VB12 (CLIA) é 50-2000 pg/mL.

Especificidade

Hemoglobina até 1000 mg/dL, bilirrubina até 60 mg/dL, triglicérides até 1500 mg/dL e proteína total até 9 g/dL não vão interferir com o ensaio de VB12 da série CL. Essas substâncias mostram menos de 10% de interferências na concentração indicada.

Nenhuma interferência óbvia foi observada do fator reumatoide (até 200 IU/mL) ou anticorpo antinuclear. O Calibrador de VB12 C0 atingiu o pico com dicianocobinamida. Nenhuma reatividade cruzada óbvia foi observada, pois todos os resultados foram ≤0.5 %. Os resultados estão resumidos na tabela abaixo.

Substância	Concentração de reagente cruzado (ng/mL)	Reatividade cruzada
dicianocobinamida	200	0,11%

Exatidão

Dois controles de veracidade com valores rastreáveis e definidos foram usados para verificar a exatidão desse ensaio. Os resultados mostraram que os desvios relativos foram menores que $\pm 10\%$. Os resultados estão resumidos na tabela abaixo.

Amostra	Valor de VB12 Medido (pg/mL)	Valor de VB12 Definido (pg/mL)	Desvio relativo
Nível 1	243,55	252,19	-3,43%
Nível 2	630,58	608,61	3,61%

Precisão

O ensaio de VB12 da série CL foi projetado para ter uma precisão de $\leq 10\%$ (dentro do CV do dispositivo). A precisão foi determinada de acordo com o Comitê Nacional para Normas de Laboratórios Clínicos (NCCLS), Protocolo EP5-A2. Dois níveis de controles de qualidade foram testados em duplicata em duas execuções separadas por dia, em um total de 20 dias, usando um único lote de reagentes e uma única curva de calibração. Os dados de precisão estão resumidos na tabela abaixo.

Amostra	VB12 médio (pg/mL)	Dentro do CV da execução	Entre o CV da execução	Dentro do CV do dispositivo
1	257,65	6,14%	7,21%	9,47%
2	584,49	5,52%	7,13%	9,02%

Linearidade

Uma amostra com alta concentração de VB12 (aproximadamente 2000 pg/mL) foi misturada com uma amostra com baixa concentração (< 125 pg/mL) em proporções diferentes, gerando uma série de diluições. O VB12 de cada diluição foi determinado com o uso do Ensaio de VB12 da série CL da Mindray. A linearidade foi demonstrada no intervalo de 120,92 pg/mL a 2097,29 pg/mL, o coeficiente de correlação r sendo $\geq 0,990$. Os dados de linearidade estão resumidos na tabela abaixo.

Concentração (pg/mL)	1	2	3	4	5	6
VB12 esperado	120,9 2	359,3 0	791,4 8	1259,0 7	1660,2 9	2097,2 9
VB12 medido	120,9 2	416,1 9	911,4 6	1306,7 3	1702,0 0	2097,2 9

Comparação de métodos

O Ensaio de VB12 da série CL da Mindray foi comparado com um kit de diagnóstico comercialmente disponível em um estudo de correlação com cerca de 306 amostras de soro. Os dados estatísticos obtidos pelo modo de computação Deming estão resumidos na tabela abaixo.

Concentração Intervalo (pg/mL)	Inclinação	Interceptação	Coefficiente de correlação
50 ~ 2000	0.9932	5.6632	0.9917

Avisos e precauções

1. Apenas para diagnóstico in vitro.
2. Siga todas as regras ao manusear reagentes de laboratório e adote as precauções de segurança necessárias.
3. Devido às diferenças na metodologia e especificidade do anticorpo, os resultados de teste da mesma amostra podem ser diferentes durante o uso de kits de reagentes de

fabricantes diferentes no sistema da Mindray ou com o uso de kits de reagentes da Mindray em outros sistemas.

- Não use kits de reagentes com a data de validade vencidas.
- Não use reagentes misturados de lotes diferentes.
- Sempre mantenha o pacote de reagente na posição vertical para assegurar que nenhuma micropartícula seja perdida antes do uso.
- Não é recomendável usar o kit aberto a mais de 28 dias.
- A confiabilidade dos resultados do ensaio não poderá ser garantida se as instruções no encarte deste pacote não forem seguidas.
- Todos os espécimes e dejetos de reação devem ser considerados potencialmente perigosos. O manuseio de amostras e dejetos de reação deve ser realizado de acordo com os regulamentos e diretrizes locais.
- A folha de dados de segurança de material (MSDS) está disponível mediante solicitação.

Símbolos gráficos**Referências**

Nelson DA and Davey FR. In Clinical diagnosis and management by laboratory methods. Erythrocytic disorders 1991; 627-635.
Chararin I. Megaloblastic Anemia, Cobalamin and Folate. J Clin Pathol 1987; 40:978-84.
Hoffbrand AV. Vitamin B12 and folate metabolism: the megaloblastic anaemias and other nutritional anaemias. In Blood and its disorders, 1982; 199-263.
Beuerlein FJ. Testing Strategies for Anemias. Lab Mgmt 1988; Dec:23-9.
Klee GC. Cobalamin and Folate Evaluation: Measurement of Methylmalonic Acid and Homocysteine vs. Vitamin B12 and Folate. Clin Chem 46; 2000:1277-83.
Snow CF. Laboratory Diagnosis of Vitamin B12 and Folate Deficiency: A Guide for the Primary Care Physician. Arch Intern Med. 1999; 159:1289-98.
Carethers M. Diagnosing Vitamin B12 Deficiency, A Common Geriatric Disorder. Geriatrics 1988; 43(3):89-112.
Herbert V. Five Possible Causes of All Nutrient Deficiency: Illustrated by Deficiencies of Vitamin B12 and Folic Acid. Am J Clin Nutr 1973; 26:77-86.
Pratt JJ, Woldring MG. Radioassay of Vitamin B12 and Other Corrinoids. Methods Enzymol 1982; 84:369-406.
Boscatto LM, Stuart MC. Heterophilic antibodies: a problem for all immunoassays. Clin Chem 1988; 34:27-33.
Kricka L. Interferences in immunoassays - still a threat. Clin Chem 2000; 46: 1037-1038.
Bjerner J, et al. Immunometric assay interference: incidence and prevention. Clin Chem 2002; 48: 613-621

© 2015 Shenzhen Mindray Bio-Medical Electronics Co., Ltd. Todos os direitos reservados.

Fabricante: Shenzhen Mindray Bio-Medical Electronics Co., Ltd.

Endereço: Mindray Building, Keji 12th Road South, Hi-tech Industrial Park, Nanshan, Shenzhen, 518057 P.R.China

Endereço de e-mail: service@mindray.com

Site: www.mindray.com

Tel: +86-755-26582888

Fax: +86-755-26582680

Representante da EC: Shanghai International Holding Corp. GmbH (Europa)

Endereço: Eiffestraße 80, Hamburgo 20537, Alemanha

Tel: 0049-40-2513175

Fax: 0049-40-255726

Termos e condições de garantia: A Mindray do Brasil garante o desempenho deste produto dentro das especificações até a data de expiração indicada nos rótulos, desde que os cuidados de utilização e armazenamento indicados nos rótulos e nestas instruções de uso sejam seguidos corretamente.

Registrado no Brasil por: Mindray do Brasil Comércio e Distribuição de Equipamentos Médicos Ltda.

CNPJ: 09.058.456.0001 87

Endereço: Av. Pompéia, 634 conj. comercial 406. Vila Pompéia São Paulo SP
CEP: 05022 000

Assistência Técnica/SAC: 0800 8789 911 / sac.br@mindray.com

Responsável Técnica: Carla Rodríguez Morales
Kelciauskas CRF/SP nº 34657

ANVISA nº: 80943610133