

CONTROL DE CALIDAD:

Recomendamos que cada laboratorio utilice controles de anemia de vitamina B12 para validar el rendimiento de los reactivos.

RESULTADOS:

Los resultados se expresan en pg/mL. Nota: Para convertir a pmol/L, multiplique los resultados por 0.783. Ejemplo: 200 pg/ml a 157 pmol/L.

REFERENCIAS:

1. **Tietz Textbook of Clinical Chemistry**, Third Edition. Carl A. Burtis and Edward R. Ashwood, eds. Philadelphia, PA: WB Saunders, 1999.

2018-11-19



No. de Producto: VB369B (96 Pruebas)

USO INDICADO

El kit de prueba ELISA de vitamina B12 está destinado a la determinación cuantitativa de la vitamina B12 en suero humano y plasma.

PRINCIPIO DE LA PRUEBA

El kit de prueba B12 es un inmunoensayo ligado a enzimas de fase sólida (ELISA), basado en el principio de la unión competitiva retrasada. Los pozos recubiertos de estreptavidina se incuban con estándares de vitamina B12 extraídos, controles, muestras y conjugado de factor intrínseco-biotina a temperatura ambiente durante 45 minutos. Durante la incubación, el factor intrínseco con la etiqueta de biotina se unirá a la vitamina B12 en la muestra, estándar, o suero de control de calidad. Después de la incubación de 45 minutos, se añade el conjugado de vitamina B12-Enzima que compite con la vitamina B12 de la muestra, estándar, o suero de control de calidad para los sitios restantes en el Factor Intrínseco durante 30 minutos adicionales. Todos los conjugados no unidos se retiran y los pozos se lavan. A continuación, se añade una solución de reactivo TMB y se incuba a temperatura ambiente durante 15 minutos, lo que resulta en el desarrollo del color azul. El desarrollo del color se detiene con la adición de la solución stop. La absorbancia se mide espectrofotométricamente a 450 nm. Una curva estándar se obtiene trazando la concentración de la norma frente a la absorbancia. La intensidad del color es inversamente proporcional a la cantidad de vitamina B12 en la muestra. El tiempo total de ejecución del procedimiento de ensayo es de 1.5 horas.

MATERIALES PROPORCIONADOS		96 Pruebas
1.	Placa de micropocillos recubierta con Streptavidin	12x8x1
2.	Set estándar de vitamina B12: 6 viales (listos para usar)	0.5 mL
3.	Reactivo de factor intrínseco biotinilado, 1 frasco (listo para usar)	7 mL
4.	Conjugado de B12-Enzima, 1 botella (listo para usar)	7 mL
5.	Búfer de extracción, 1 botella (lista para usar)	8 mL
6.	Buffer de neutralización, 1 botella (lista para usar)	8 mL
7.	Solución TCEP, 1 botella (40x)	0.25 mL
8.	Solución Stop, 1 botella (lista para usar)	12 mL
9.	Sustrato TMB, 1 botellas (listas para usar)	12 mL
10.	Concentrado de lavado 20X, 1 botella	25 mL

MATERIALES NO SUMINISTRADOS

1. Pipetas de precisión
2. Puntas de pipeta desechables
3. Lector ELISA capaz de leer la absorbancia a 450 nm
4. Mezclador Vortex de cabeza plana
5. Agitador de placas
6. Tubos de ensayo para la preparación de muestras

ADVERTENCIAS Y PRECAUCIONES

1. Posibles materiales biológicos peligrosos:

Los estándares contienen componentes de origen humano que han sido probados y encontrados no reactivos para el antígeno de superficie de la hepatitis B, así como anticuerpos contra el VIH con reactivos autorizados por la FDA. Sin embargo, como no existe un método de prueba que pueda ofrecer la garantía completa de que el VIH, el virus de la hepatitis B u otros agentes infecciosos están ausentes, estos reactivos deben tratarse en el nivel 2 de bioseguridad, como se recomienda en el manual de los Centros para el Control de Enfermedades / Institutos Nacionales de Salud, "Bioseguridad en laboratorios microbiológicos y biomédicos". 1984.

- Este kit está destinado a la cuantificación de la vitamina B12 en el suero humano.
- No pipetear por vía oral. No fumar, comer ni beber en las áreas en las que se manipulan muestras o reactivos.
- Los componentes de este kit están diseñados para su uso como unidad integral. Los componentes de diferentes lotes no deben mezclarse.
- Mantenga los componentes de este kit protegidos de la luz y la exposición prolongada al aire.
- Se recomienda que los estándares, el control y las muestras de suero se ejecuten por duplicado.
- Los resultados óptimos se obtendrán mediante una estricta adhesión a este protocolo. Pipeteos exactos y precisos, así como seguir los requisitos exactos de tiempo y temperatura prescritos son esenciales. Cualquier desviación de esto puede producir datos no válidos.

RECOLECCIÓN Y MANEJO DE MUESTRAS

Para el ensayo se pueden utilizar muestras de suero, plasma heparinizado o plasma EDTA.

- Para el suero, recoger sangre total por venopunción y permitir la coagulación.
- Para plasma, mezcle la muestra por inversión suave antes de la centrifugación.

Centrifugar y separar el suero o plasma tan pronto como sea posible después de la recolección. No utilizar muestras hemolíticas. Las muestras pueden refrigerarse a 2-8°C durante dos semanas. Para el almacenamiento a largo plazo, se pueden almacenar a -20°C. Evitar ciclos repetidos de congelación y descongelación. Dejar que las muestras refrigeradas o congeladas-descongeladas se equilibren a temperatura ambiente durante 30 minutos antes de su uso; las muestras deben mezclarse antes del análisis.

PREPARACIÓN DE REACTIVOS

Antes de ejecutar la prueba, prepare lo siguiente:

1. Agente de extracción:

Inmediatamente antes de su uso, diluir una alícuota de la solución TCEP 1:40 con el búfer de extracción. Por ejemplo, para 1mL de agente de extracción, añadir 25uL de solución TCEP a 975uL de búfer de extracción.

2. Extracción de muestras:

Etiquetar suficientes tubos de ensayo para cada uno de los estándares, muestras y controles. Agregar 50uL de cada muestra para ser probada en tubos individuales. Una vez añadidas todas las muestras, pipetear 25uL de reactivo de extracción a cada muestra. Usar Vortex con el tubo de ensayo después de cada adición. Deje que la extracción continúe durante 15 minutos. Después de 15 min, pipetar 25uL de buffer de neutralización a cada muestra. Usar Vortex en el tubo de ensayo después de cada adición. Dejar las muestras durante 5 minutos para garantizar una neutralización completa. **Duplicar todos los volúmenes para que las muestras se ejecuten como réplicas. NOTA: Los tiempos de extracción coherentes son fundamentales para obtener resultados de ensayos coherentes.**

- Preparar 1X Búfer de lavado añadiendo el contenido de la botella (25ml, 20X) a 475 ml de agua destilada o desionizada. Conservar a temperatura ambiente (20-25°C).

PROCEDIMIENTO

Se debe permitir que todos los reactivos y especímenes lleguen a temperatura ambiente antes de su uso. Todos los reactivos deben mezclarse GENTILMENTE sin espuma. Una vez iniciado el procedimiento, todos los pasos deben completarse sin interrupción.

- Colocar el número deseado de tiras recubiertas en el soporte.
- Dispensar 50 ml de normas, controles y muestras de vitamina B12 extraídos en pozos apropiados.
- Dispensar 50 ml de reactivo de factor intrínseco biotinilo, en cada pozo. Agitar suavemente la microplaca durante 20-30 segundos para mezclar.
- Incubar durante 45 minutos, a temperatura ambiente (20-25°C).
- Añadir 50µl de conjugado enzimático en todos los pocós. Agitar suavemente la microplaca durante 20-30 segundos para mezclar.
- Incubar durante 30 minutos, a temperatura ambiente (20-25°C).
- Agitar rápidamente el contenido de los pozos. Enjuagar los pozos 3 veces con 1X búfer de lavado. Golpear los pozos fuertemente en papel absorbente para eliminar las gotas de agua residuales.
- Con una pipeta multicanal, dispensar 100µl de sustrato de TMB en cada pocillo.

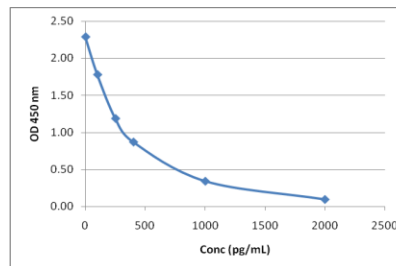
- Incubar durante 15 minutos a temperatura ambiente, preferiblemente en la oscuridad.

10. Añadir 50ml de solución de stop a cada pozo y mezclar suavemente hasta obtener un color uniforme en cada pozo.

- Leer la absorbancia en cada pozo a 450 nm dentro de 15 minutos después de agregar la solución de parada.

Curva estándar:

Se incluyen seis niveles estándar para cada carrera. A continuación, se muestra una curva estándar típica.



Vitamina B12, (pg/ml)	Absorbancia (450nm)
0	2.29
100	1.78
250	1.19
400	0.87
1000	0.34
2000	0.09

CARACTERÍSTICAS DE RENDIMIENTO

1. Precisión

Intra-Ensayo

Suero	No. de Réplicas	Media pg/ml	Desviación Estándar	Coefficiente de variación (%)
1	24	210	13.07	6.23
2	24	691	37.60	5.44
3	24	1783	37.44	2.10

Inter Ensayo

Suero	No. de Réplicas	Media pg/ml	Desviación Estándar	Coefficiente de variación (%)
1	24	201	12.57	6.25
2	24	645	44.19	6.85
3	24	1773	30.72	1.73

2. Sensibilidad

La sensibilidad de este kit de ensayo es de 41pg/ml. La sensibilidad se determinó calculando la media más 2DE del punto cero estándar probado 20 veces en la misma ejecución.

3. Especificidad

La especificidad del factor intrínseco se probó con los compuestos seleccionados añadiendo los compuestos en varias concentraciones al diluyente estándar.

Analito	Interferencia
Hemoglobina	ND
Bilirrubina	ND
Biotina	ND
Cobinamida	ND

4. Rango de Referencia

Se recomienda encarecidamente que cada laboratorio debe establecer su propio rango de referencia para la población a la que sirve. Hasta entonces, las siguientes referencias basadas en la literatura se pueden utilizar para rangos normales.

Población	Rango de Referencia
Recién nacido	160 - 1300 pg/mL
Adulto	200 - 835 pg/mL
Adulto >60 años	110 - 800 pg/mL