



## Vitamin B12 & Folate

(In Health and Disease)

*M Reza Bakhtiari, DCLS, PhD*

  dr.bakhtiari.academy

### Some Challenging Questions

1. Prevalence of B12 and/or Folate Deficiencies
2. Most common etiologies?
3. Early Clinical Manifestations?
4. Early or Late Diagnosis?
5. Which Biomarkers?
6. Always Macrocytic Anemias?
7. Reference Intervals?
8. Significance of High B12 blood level?
9. ....

## Case 1: 33 y Pregnant Woman

No Specific Signs or Symptoms

S Total B12 119 L pmol/L (140-650)

  dr.bakhtiari.academy

## Case 2: 51 y/o Vegetarian Woman

› Hb 96 ↓ g/L (115-160)  
› MCV 81 ↓ fL (80-100)  
› Ferritin 12 ↓ ug/L (20-350)  
› Total B12 175 pmol/L (140-650)

HoloTC assay

## Case 3: 54 y/o, Male (Non-Hodgkin's Lymphoma)

With Suggestive Signs & Symptoms

Test	First	Second	Unit	RR
RBC Folate	1329	1008	nmol/L	600 - 3000
s Total B12	601	373	Pmol/L	140 – 650

## Vitamin B12 History



### CyanoCobalamin

the common form of the drug used in the USA

Cyanocobalamin MW= 1355 Da

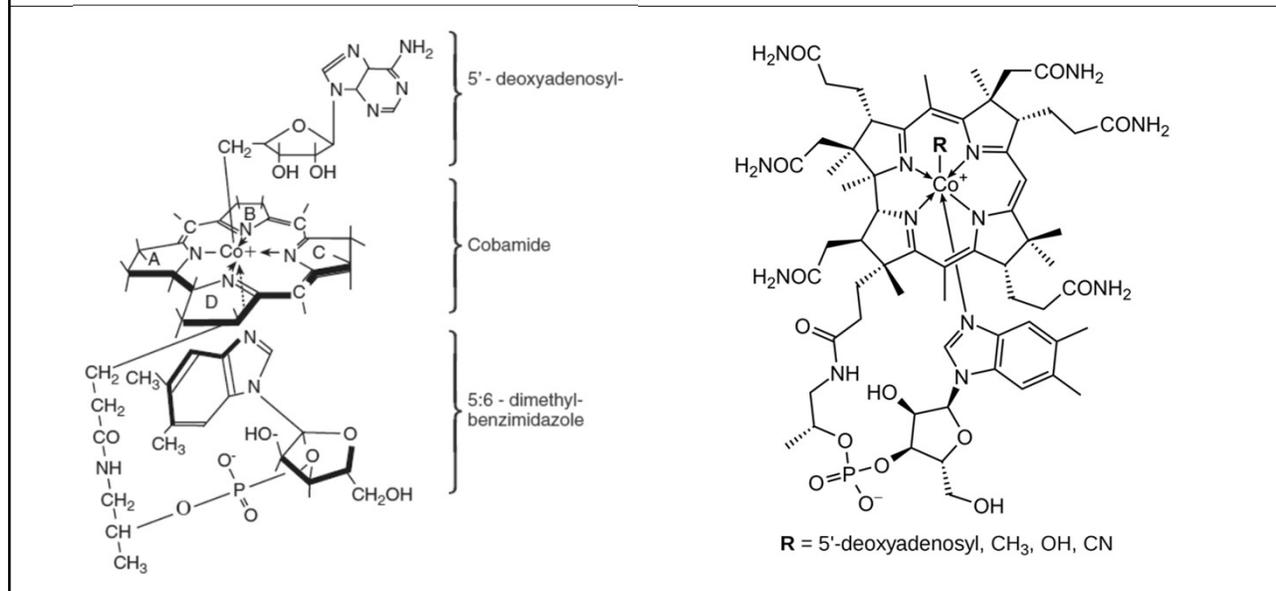
Solubility of 12 g/L in water at 20 °C.

The **1934 Nobel Prize** in Physiology and Medicine was awarded to Minot and Murphy for the discovery that consumption of liver or injection of a liver extract, later found to include gastric intrinsic factor, was able to cure pernicious anemia

Around the 1950s, vitamin B12 was finally isolated and crystallized.

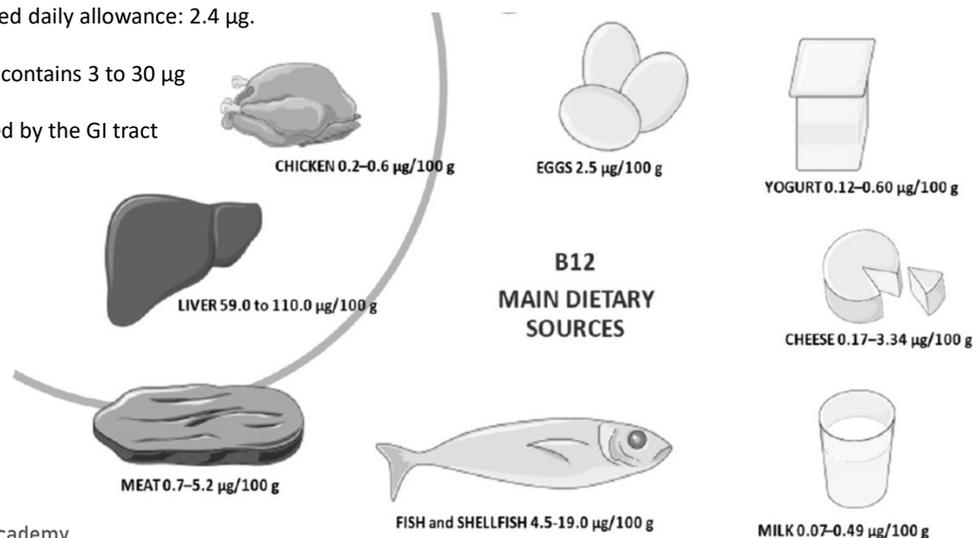
Its structure was determined by x-ray diffraction, a major feat for such a large molecule, winning the **1964 Nobel Prize** in Chemistry for Dorothy Hodgkin

## Vitamin B12 Structure



## Average content of B12 in animal dietary sources

- The adult recommended daily allowance: 2.4  $\mu\text{g}$ .
- The average daily diet contains 3 to 30  $\mu\text{g}$
- with 2 to 3  $\mu\text{g}$  absorbed by the GI tract



## Late Diagnosis, Misdiagnosis of B12 Def.

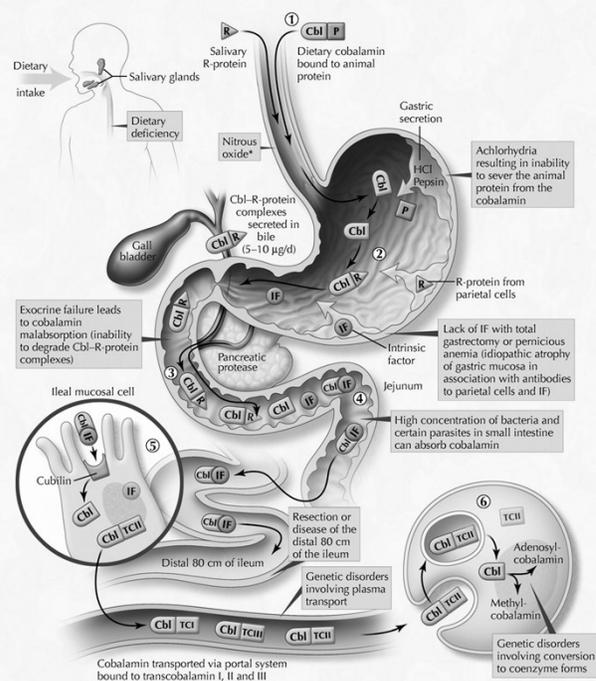
- 33% of Patients waited 5 years for diagnosis
- 14% Waited 10 years
- 44% Initially Misdiagnosed
- A Diagnostic Challenge
  - Laboratory Markers for B12 Def. ?



Hooper et al. British Journal of Nursing, 2014

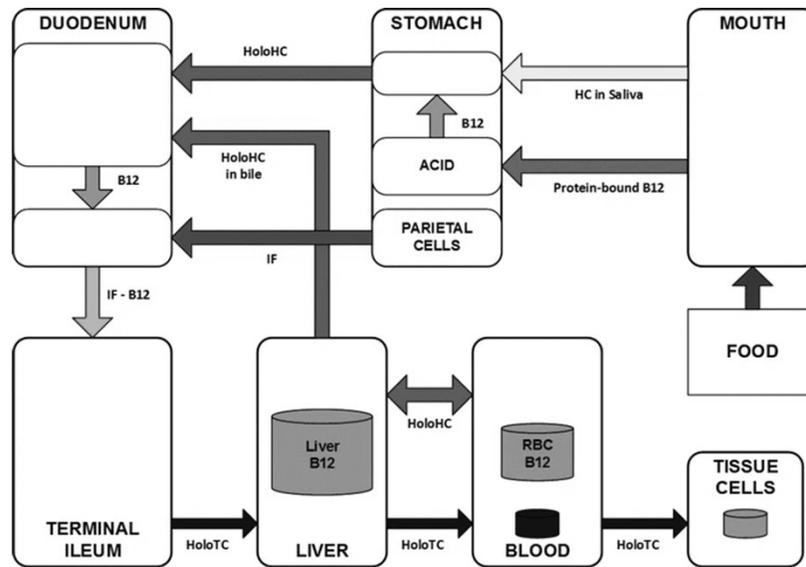
## Absorption of B12

- 1. Mouth:** Food Intake
- 2. Stomach:**
  - ✓ Gastric HCL & pepsin release cobalamin from protein-bound sources
  - ✓ Cobalamin binds to Haptocorrin (R protein)
- 3. Duodenum:** Pancreatic enzymes break down the cobalamin-haptocorrin complex
- 4. Jejunum:** cobalamin binds to intrinsic factor (IF)
- 5. Terminal Ileum:**
  - ✓ Receptor-Mediated Uptake (Cubulin)
  - ✓ Transcobalamin (TCII) Binding
- 6. Target Cells**
  - ✓ Uptake
  - ✓ Metabolism

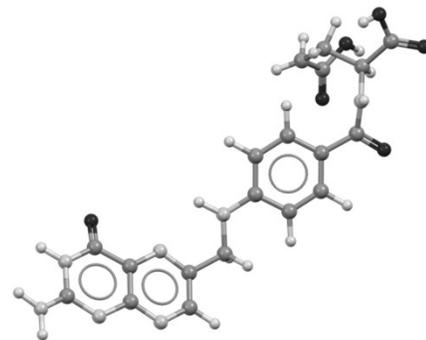
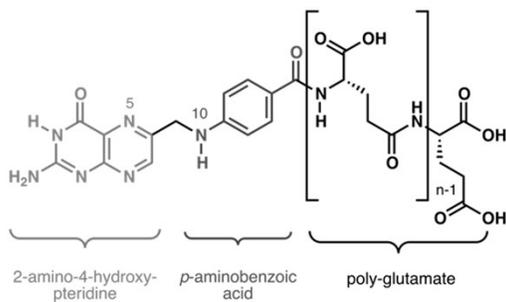


DOI: [10.1503/cmaj.103115](https://doi.org/10.1503/cmaj.103115)

## Absorption of B12



## Folic Acid Structure



Folate (vitamin B9) refers to the many forms of folic acid and its related compounds, including

1. tetrahydrofolic acid (the active form),
2. methyltetrahydrofolate (the primary form found in blood),
3. methenyltetrahydrofolate,
4. folinic acid,
5. folacin,
6. pteroylglutamic acid

## Folate Food Sources

- leafy green vegetables,
- legumes,
- citrus fruits,
- fortified grains



CAULIFLOWER



ASPARAGUS



BROCCOLI



LEAFY GREEN



OKRA



MUSHROOM



AVOCADO



BEETROOT



PAPAYA

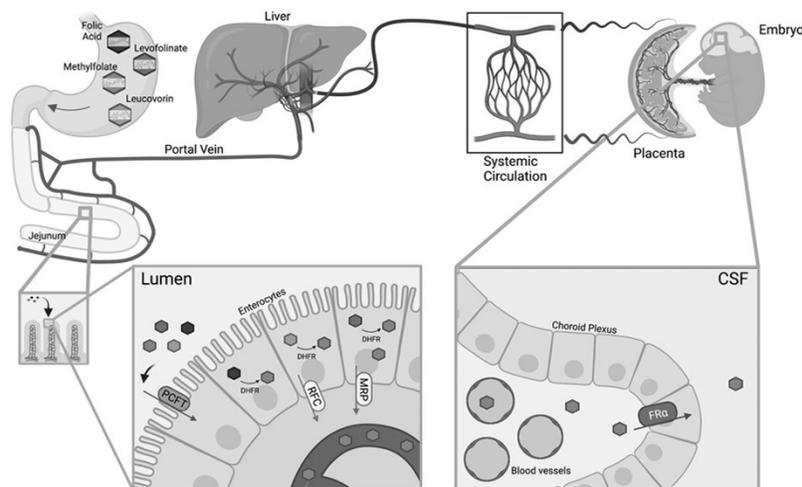


ORANGES

SEEDS,NUTS,BEANS,  
PEAR,LENTILS

[dr.bakhtiari.academy](https://www.instagram.com/dr.bakhtiari.academy)

## Folate Absorption



### Absorption, systemic transport, and embryonic uptake of folate

**Levofolinate:** L-folinic acid; **Leucovorin:** d,l-folinic acid; **PCFT:** proton-coupled folate transporter; **DHFR:** dihydrofolate reductase; **RFC:** reduced folate carrier; **MRP:** multi-drug resistance-associated protein; **CSF:** cerebrospinal fluid; **FR $\alpha$ :** folate receptor alpha



## Causes of Folate deficiency

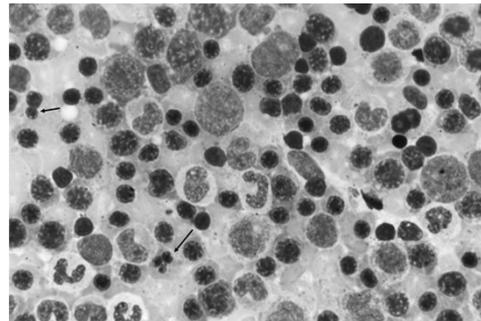
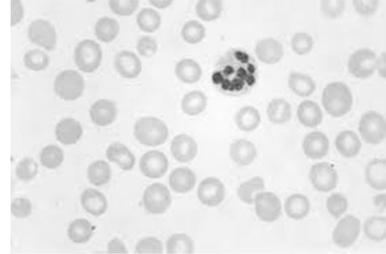
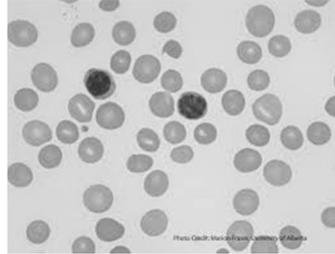
1. **Inadequate dietary intake:** Not consuming enough foods rich in folic acid
2. **Poor absorption:** Certain medical conditions that affect the gastrointestinal tract, such as
  - celiac disease,
  - inflammatory bowel disease,
  - surgical removal of parts of the intestine
3. **Increased metabolic demand:**
  - pregnancy,
  - breastfeeding,
  - rapid growth during childhood,
  - certain cancers,
4. **Chronic Alcoholism:** interfere with folic acid absorption, utilization, and storage in the body.
5. **Medications:** can interfere with folic acid metabolism or increase excretion, potentially leading to deficiency.
  - phenytoin, phenobarbital, methotrexate, sulfasalazine, and oral contraceptives,



## Symptoms & Signs of B12/Folate Deficiency

- |  |  |
|--|--|
| <ol style="list-style-type: none"> <li>1. <b>Neurologic</b> (most prevalent)           <ul style="list-style-type: none"> <li>• symmetrical paresthesia &amp; numbness</li> <li>• weakness or fatigue</li> <li>• muscle ache &amp; cramp</li> <li>• dizziness, blurry vision</li> <li>• ataxia, abnormal gait</li> <li>• decreased reflexes</li> <li>• reduced vibration sense</li> <li>• restless legs syndrome, tremor</li> <li>• erectile dysfunction</li> </ul> </li> <li>3. <b>Hematologic</b> <ul style="list-style-type: none"> <li>• <b>Macrocytic Anemia:</b>, &lt;u&gt;20%&lt;/u&gt; of people with demonstrable low serum B12 have macrocytic anemia.</li> <li>• Iron &amp; B12 Deficiencies often coexist</li> </ul> </li> </ol> | <ol style="list-style-type: none"> <li>2. <b>Neuropsychiatric</b> <ul style="list-style-type: none"> <li>• headache</li> <li>• cognitive disturbances</li> <li>• personality changes,</li> <li>• dementia</li> <li>• depression, mania,</li> <li>• psychosis, paranoia</li> <li>• impaired memory,</li> <li>• disorientation,</li> <li>• fatigue, irritability, lethargy</li> <li>• hallucinations,</li> <li>• obsessive-compulsive disorder</li> </ul> </li> <li>4. <b>Misc:</b> <ul style="list-style-type: none"> <li>• macroglossia, glossitis</li> <li>• Jaundice, hyperpigmentation</li> <li>• weight loss</li> <li>• hair loss</li> </ul> </li> </ol> |
|--|--|

## B12/Folate related Clinical Information



## Skin Manifestations of B12 Deficiency

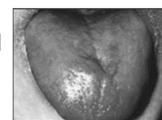
1. **Pale or Jaundiced Skin:** due to red blood cell production

2. **Skin Hyperpigmentation:** Dark patches or spots may develop, particularly on sun-exposed areas of the skin.

3. **Vitiligo:** Vitamin B12 deficiency has been associated with the development or exacerbation of vitiligo, a condition characterized by the loss of pigmentation in certain areas of the skin, resulting in white patches.

4. **Angular Cheilitis:** Angular cheilitis refers to the inflammation or cracking at the corners of the mouth. It can be an indication of various nutrient deficiencies, including vitamin B12 deficiency.

5. **Skin Dryness and Scaling:** Vitamin B12 deficiency may contribute to dryness, itching, and scaling of the skin. This can make the skin appear rough, flaky, or even eczema-like.



## Symptoms & Signs of vitamin B12 Deficiency

### More common symptoms & Signs in new-borns & children:

- Hypotonia, Apathy,
- Decreased visual contact,
- Drooling of saliva
- Failure to thrive
- Lethargy,
- Involuntary movements
- Convulsions
- Pallor
- Glossitis
- Diarrhea, Vomiting
- Coma,

  dr.bakhtiari.academy

Cureus

Open Access Case  
Report

DOI: 10.7759/cureus.20741

### Microcytic Anemia Hiding Vitamin B12 Deficiency Anemia

Review began 12/20/2021  
Review ended 12/25/2021  
Published 12/27/2021

© Copyright 2021  
Busaleh et al. This is an open access article  
distributed under the terms of the Creative  
Commons Attribution License CC-BY 4.0.,  
which permits unrestricted use, distribution,  
and reproduction in any medium, provided  
the original author and source are credited.

Fadi Busaleh<sup>1</sup>, Omkolthoom A. Alasmakh<sup>2</sup>, Fatimah Almohammedsaleh<sup>3</sup>, Maram F. Almutairi<sup>4</sup>, Juwdaa S. Al Najjar<sup>5</sup>, Abbas Alabdulatif<sup>6</sup>

1. Pediatrics, Maternity and Children Hospital, Ministry of Health, Al-Ahsa, SAU 2. Ophthalmology, Al Jabr Hospital, Ministry of Health, Al-Ahsa, SAU 3. Internal Medicine, King Fahad General Hospital, Ministry of Health, Al-Ahsa, SAU 4. Family Medicine, National Guard Health Affairs, Riyadh, SAU 5. Medicine, College of Medicine, King Faisal University, Al-Ahsa, SAU 6. Pediatric Hematology/Oncology, Maternity and Children Hospital, Ministry of Health, Al-Ahsa, SAU

Corresponding author: Fadi Busaleh, fadi.busaleh@gmail.com

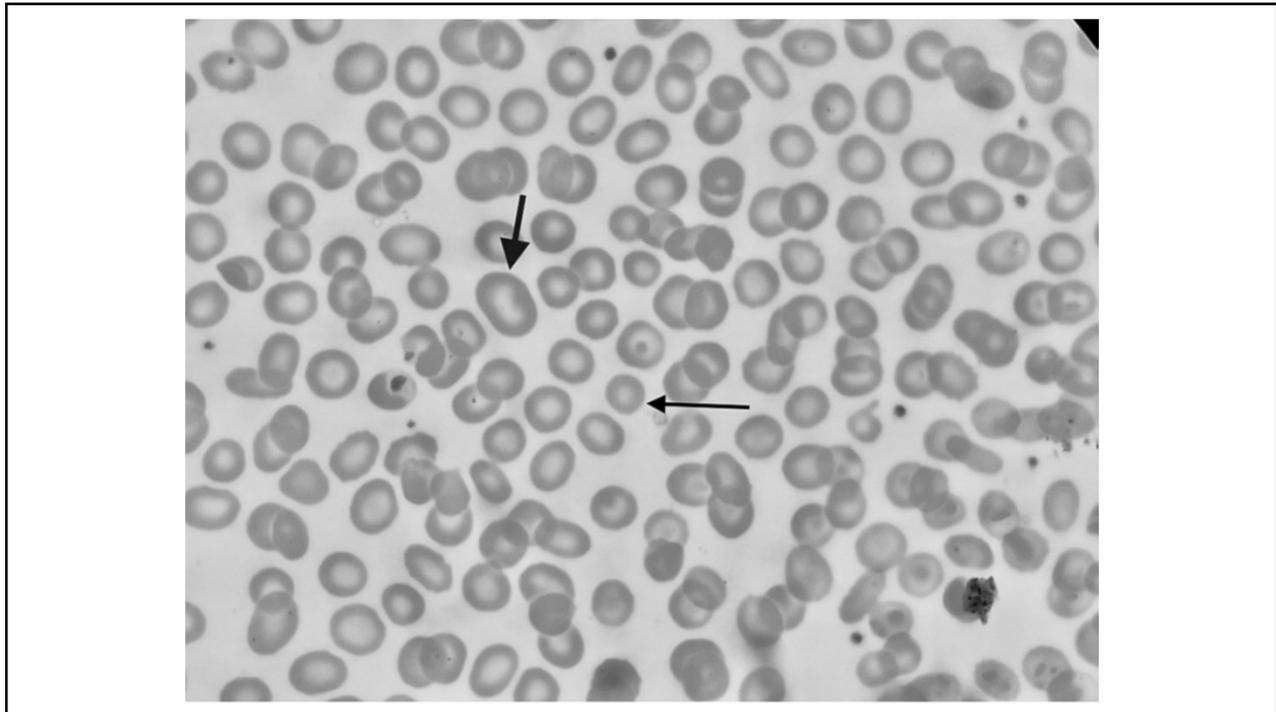
#### Abstract

Vitamin B12 is an essential water-soluble vitamin that mediates multiple coenzymes needed for cell synthesis, mainly the red blood cells. Its deficiency is characterized by megaloblastic anemia and neuropsychiatric symptoms. Macrocytosis is the classical picture seen usually, but having microcytosis is unlikely. We report a case series of three cousins with vitamin B12 deficiency who presented with microcytosis.

Categories: Pediatrics, Hematology

Keywords: cobalamin, microcytic anemia, macrocytic anemia, anemia, vitamin b12

Test	Patient 1 2-year-old boy	Patient 2 20-month-old girl	Patient 3 20-month-old boy	Reference range
Complete blood count				
White blood cell count	13.57	27.78	21.59	3-14x10 <sup>3</sup> /uL
Red blood cells count	3.48	2.16	3.62	4.2-6.1 x10 <sup>6</sup> /uL
Hemoglobin	6.8	4.1	10	11.1-12.6 g/dL
Platelets	162	109	372	150-350x10 <sup>3</sup> /uL
Mean corpuscular volume	66	61.6	63.6	70-78 fL
Reticulocyte count	2.5%	0.31%	-	05-1%
Blood chemistry tests				
Iron level	27	9.5	8.3	9-31.3 micromol/L
Total iron-binding capacity	50.85	-	60	44.75-80.55 micromol/L
Hematological workup				
Hemoglobin A1 level (HbA1)	92.2%	92%	92.4 %	95-98%
Hemoglobin A2 level (HbA2)	3%	5%	4.0 %	<2.2%
Fetal hemoglobin level (HbF)	4.8%	3%	3.6 %	<0.5%
Hemoglobin H preparation	Negative	Negative	Negative	Negative
Vitamin B12 level	19	50	34	200-900 pg/mL



## Skin Manifestations of Folate Deficiency

1. **Pallor:**

2. **Mouth Ulcers:** Folate deficiency may contribute to the development of painful ulcers in and around the mouth. These ulcers can be recurrent and slow to heal.

3. **Glossitis:** Glossitis refers to the inflammation of the tongue, making it swollen, smooth, and tender. Folate deficiency can be a contributing factor to glossitis, along with other nutritional deficiencies.

4. **Skin Lesions:** In some cases of severe folate deficiency, skin lesions may appear. These can include areas of redness, burning, or itching on the skin.



  dr.bakhtiari.academy

## Indications of testing B12 and/or Folate

1. Patients older than 65 years old
2. Anemia patients with elevated MCV
3. Addison-Biermer disease (pernicious anemia)
4. Suspected malabsorption states
5. Patients with unexplained mental status changes
6. Patients with neurological or motor symptoms
7. Unexplained memory loss or dementia
8. Hematological disease associated with increased cell turnover
9. Institutionalized patients
10. Vegans and pregnant or breast feeding vegetarians
11. Newborn children of vegetarian, malnourished, or pernicious anemia mothers
12. Gastric surgery patients
13. Atrophic gastritis patients
14. H. pylori infected patients
15. Chronic users of H2 blocking agents, gastric ATPase inhibitors (PPIs), and metformin or Cholestyramin
16. Thyroid disease, diabetic, and HIV patients
17. Drug therapy e.g. anticonvulsants
18. Infertility
19. Alcohol abuse

## Biomarkers & Tests of Vit B12 Status

### • Old Markers

- Microbiological assay
- Schilling test

### • Static Markers

- Total vitamin B12 level
- Holo-transcobalamin II

### • Functional Markers

- Methyl-Malonic Acid (MMA)
- Homocysteine (Caveats: age, GF R, ethnicity, SNP, RRs)
- Gastrin

### • Antibody Markers

- Anti-IF Ab
- Anti-PC Ab

### • Hematologic Markers

- RBC
- WBC
- HCT
- MCV
- MCHC
- PBS
  - Macrocytosis
  - Megaloblastic changes
  - Neutrophil Hyper-Segmentation



*A man with a watch knows what time it is.  
A man with two watches is never sure.*

Segal's Law

#### Notice:

It is important in the clinical setting to make a distinction between

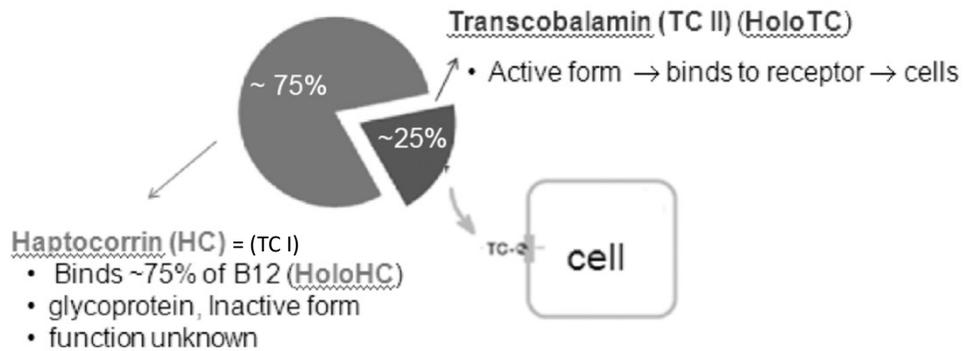
- sub-clinical &
- clinical deficiency

## B12 Test Cautions

Many other conditions are known to cause an increase or decrease in the serum vitamin B12 concentration and should be considered in the interpretation of the assay results, including:

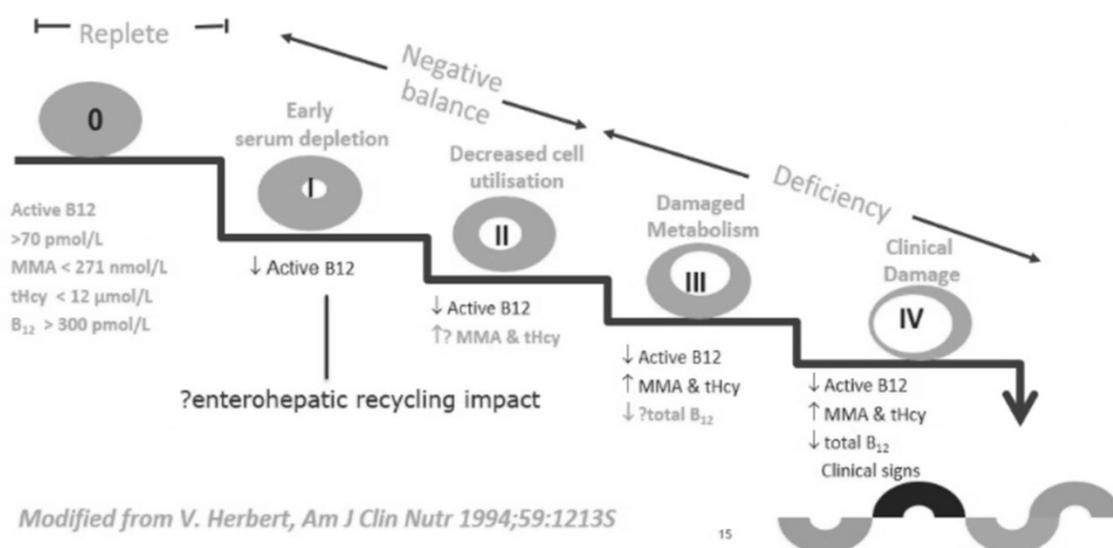
Increased serum vitamin B12	Decreased serum vitamin B12
Ingestion of vitamin C	Pregnancy
Ingestion of estrogens	Aspirin
Ingestion of vitamin A	Anticonvulsants
Hepatocellular injury	Colchicine
Myeloproliferative disorder	Ethanol ingestion
Uremia	Contraceptive hormones
	Smoking
	Hemodialysis
	Multiple myeloma

## Cobalamin Binding Proteins (CBPs) in Blood

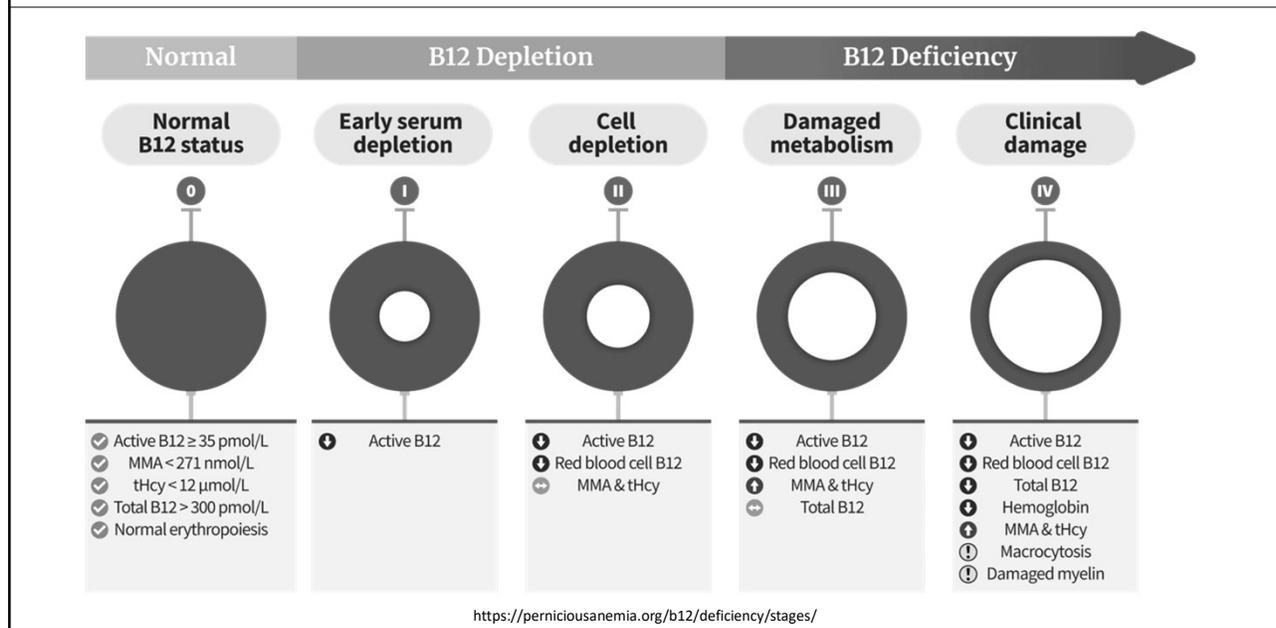


- Total B12 influenced by changes in binding proteins → poor indicator of bioavailable cobalamin
- B12 deficiency can be overlooked by TB12
- In some individuals without symptoms, low levels of serum vitamin B12 may be associated with reductions in the binding protein haptocorrin
- HoloTC (=Active B12) assay is recommended if available

## Staircase to B12 Def.



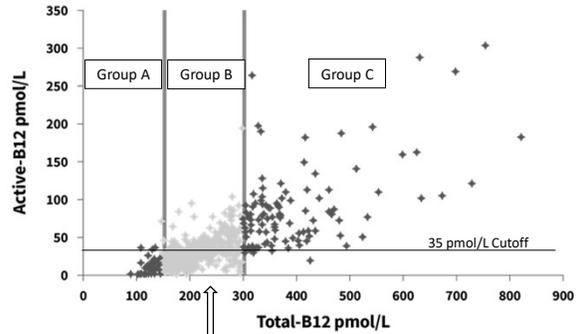
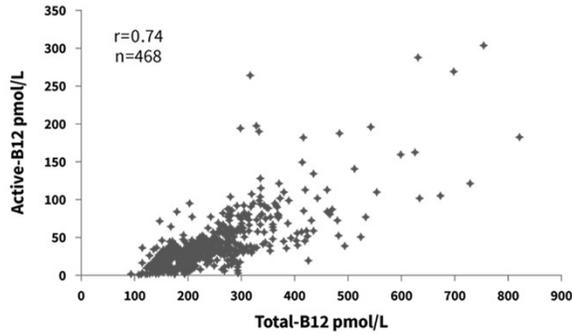
## The 4 Stages of B12 Deficiency



## Sensitivity & Specificity Related Tests

Test	Sensitivity	Specificity
MCV	17% <sup>73</sup>	low
Schilling test phase I	61% <sup>72</sup>	moderate
Serum vitamin B <sub>12</sub>	30-100% <sup>73,74</sup>	60-95% <sup>50,75</sup>
RBC folate	low-moderate	low-moderate
dUST	high <sup>49</sup>	moderate
Serum MMA	98% <sup>76</sup>	high
Urine MMA	79%-86% <sup>77</sup>	85%-98% <sup>77,78</sup>
Plasma tHcy	73-96% <sup>49,74</sup>	38-68% <sup>74</sup>
Holo-TC II	100% <sup>79</sup>	89% <sup>79</sup>
Anti-IF type I	17-73% <sup>70,72</sup>	96-98% <sup>9,74</sup>
Anti-PC	52%->90% <sup>9,70</sup>	50% <sup>9</sup>
Serum gastrin	80-90% <sup>70</sup>	50% <sup>70</sup>
Serum pepsinogen I/II ratio	82% <sup>70</sup>	low <sup>70</sup>
Non-radioactive oral absorption test	81% <sup>72</sup>	high

## Active vs Total B12 Assay



314 out of 468 patients, 2/3  
(True B12 status of patients in this range is uncertain)

Prof. Herrmann  
(Saarbrücken University)

<https://perniciousanemia.org/b12/deficiency/tests/active/utility/>

## Active vs Total B12 Assay

### TOTAL-B12 TEST

<150 pmol/L

150 - 300 pmol/L

>300 pmol/L

Likely deficient

Resolve with Active-B12

Unlikely deficient\*

\* Due to false positives and false negatives, all Total-B12 results could be confirmed with Active-B12

### SUBJECTS AT RISK OF B12 DEFICIENCY

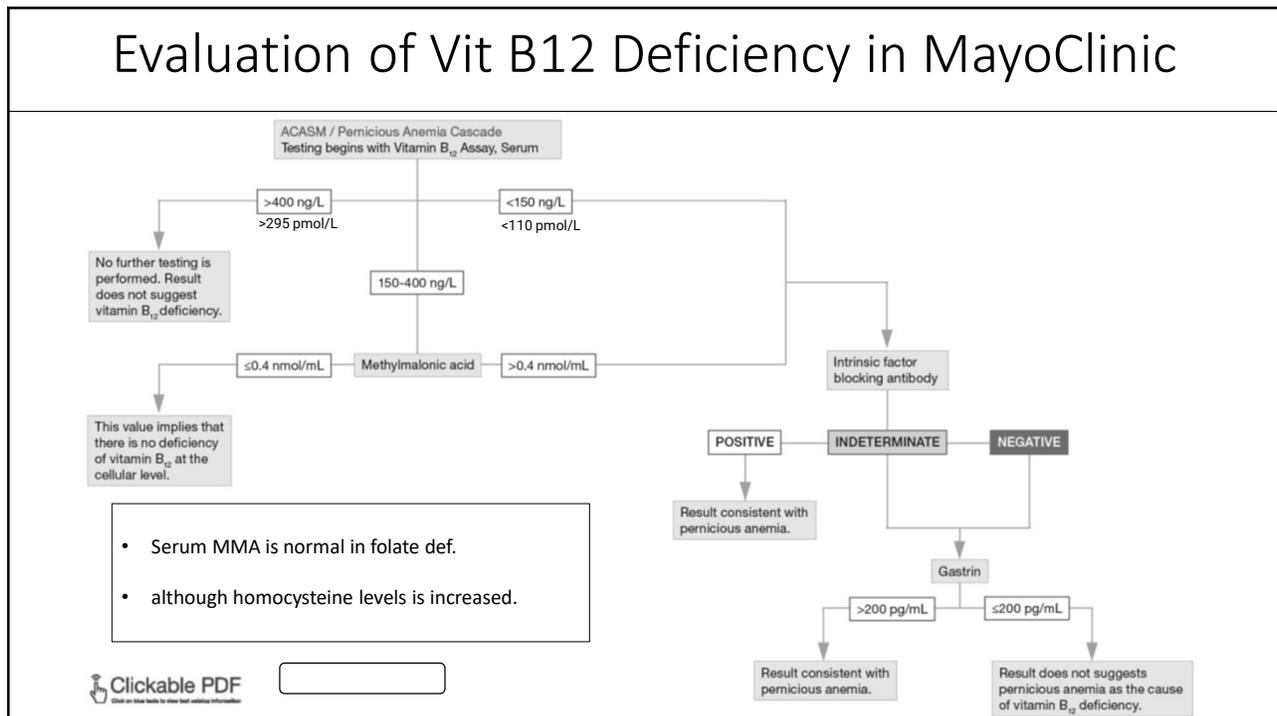
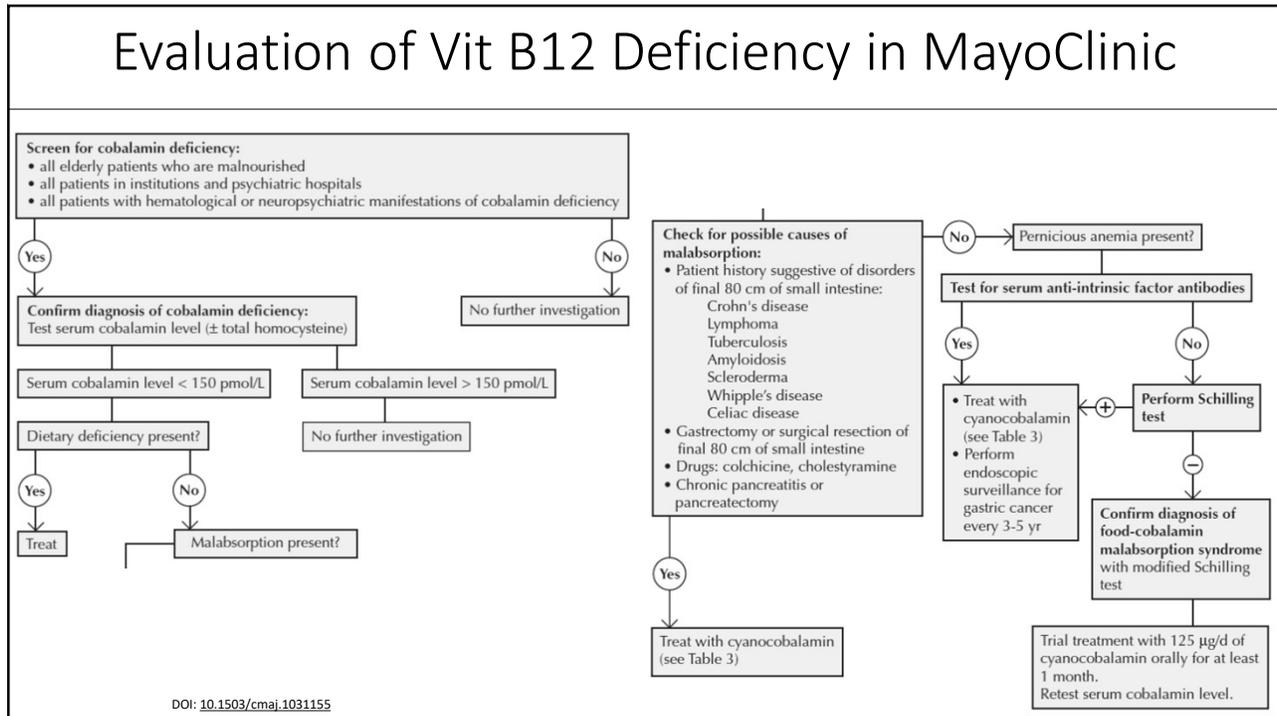
Active-B12 < 35 pmol/L

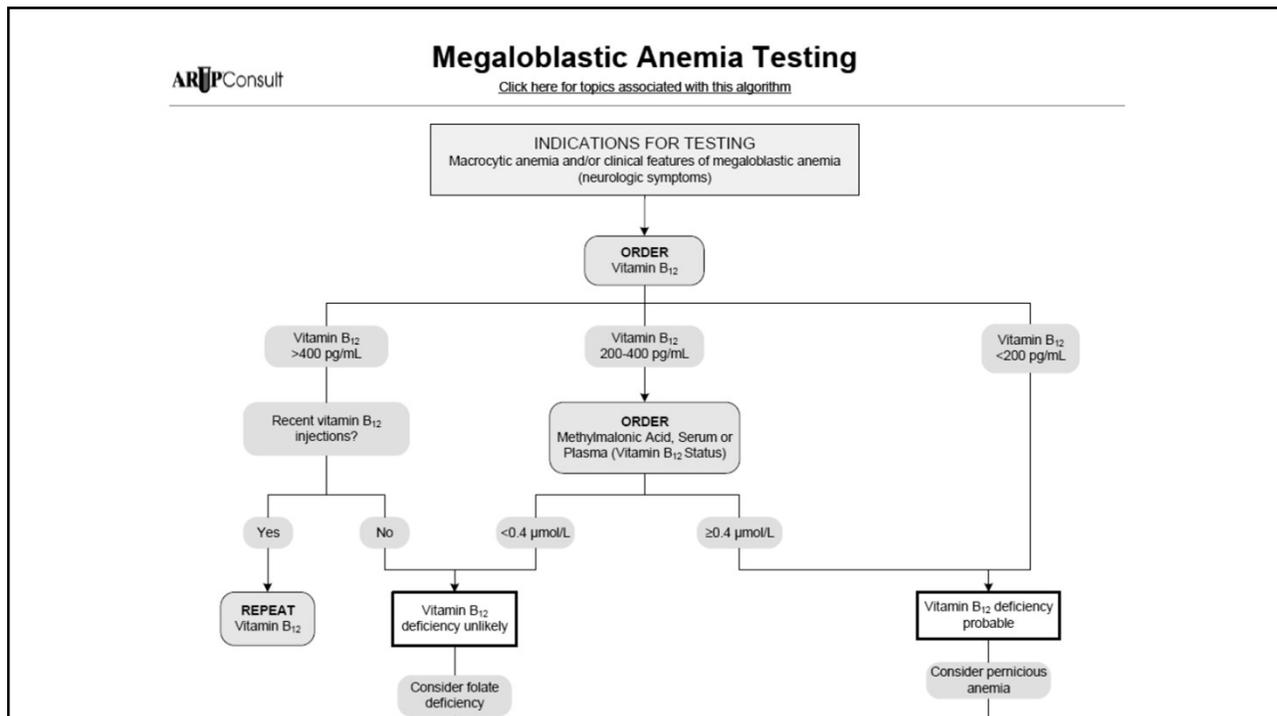
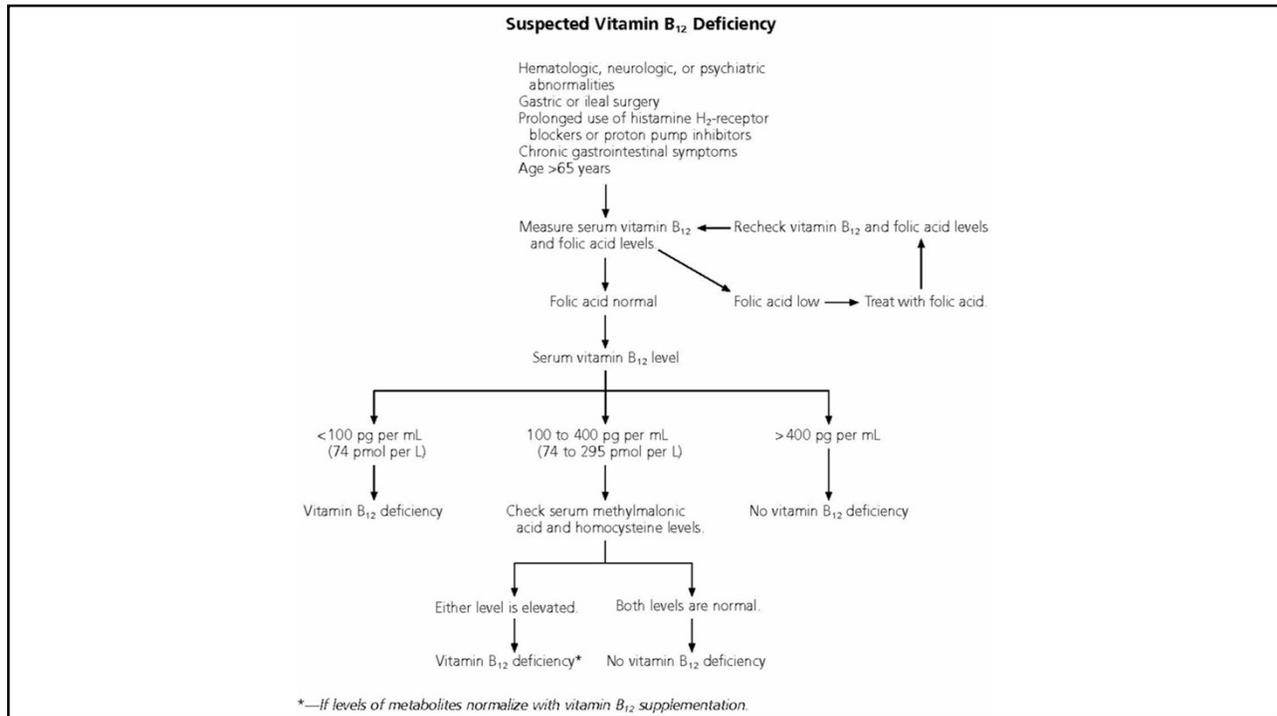
Active-B12 ≥ 35 pmol/L

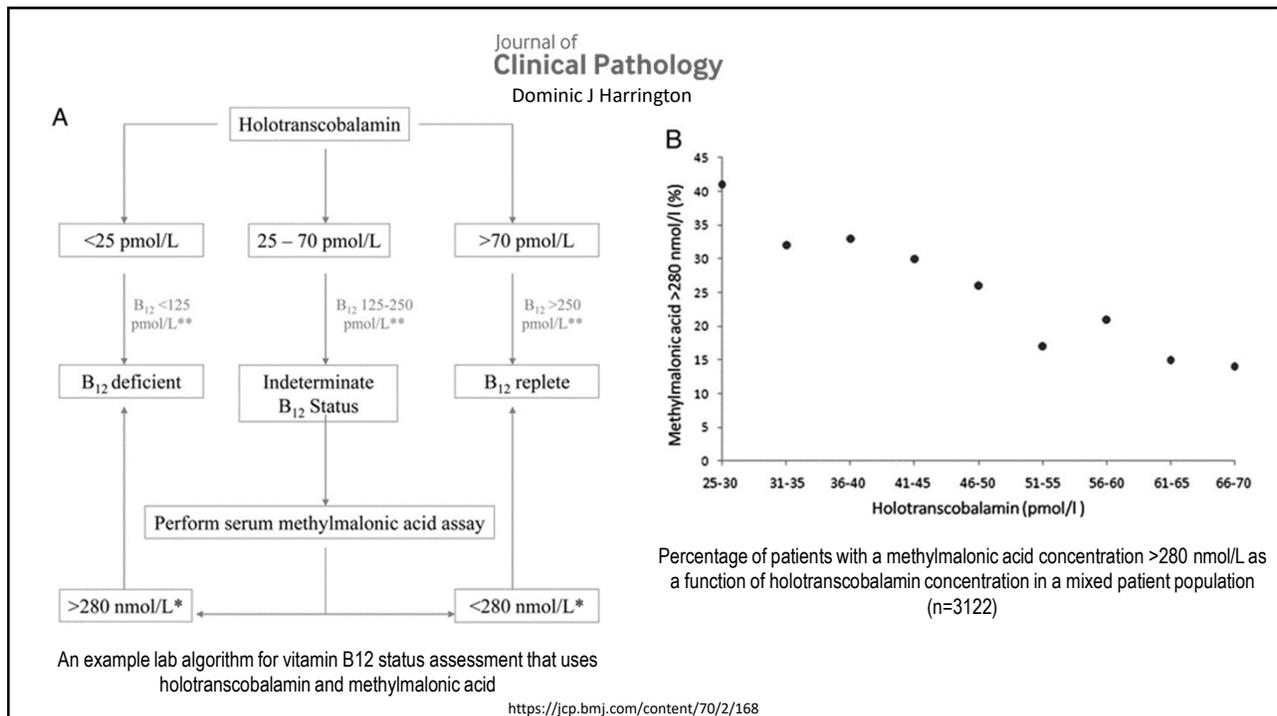
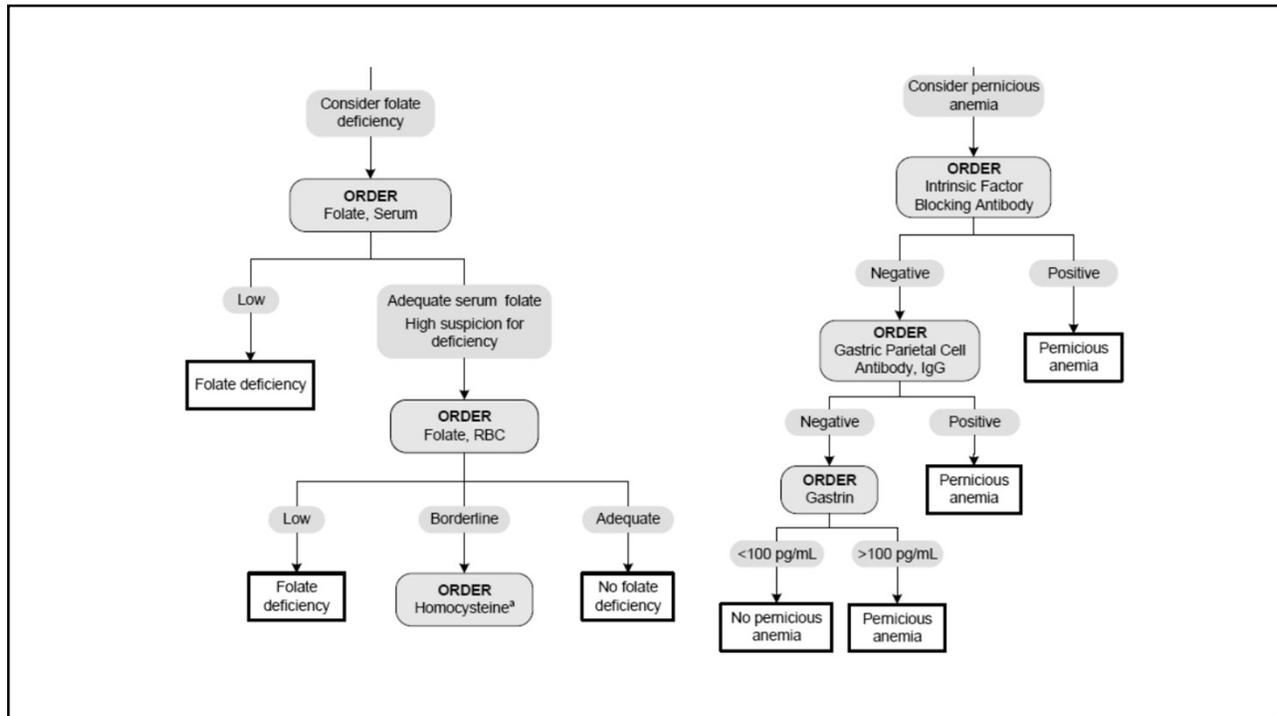
Likely deficient

Unlikely deficient\*

\* Renal patients should be further investigated







## Current B12/Folate Methodologies

	B12	Folate
• Labcorp:	ECL	ECL
• Arup:	CL	CL
• Mayo clinic:	EIA	Competitive-Binding Receptor Assay
• Quest:	EIA	EIA

  dr.bakhtiari.academy

## Preparing for B12 Test

Fasting: 8 hours (Non-fasting specimens yield falsely elevated results)

Specimen Required: Serum

Ask patients if they have received a vitamin B12 injection within the last 2 weeks.

Preferred Method:

ELISA Method: Immunoenzymatic Assay

Specimen Type	Temperature	Time
Serum	Refrigerated (preferred)	7 days
	Frozen	90 days

Reference Values: 180-914 ng/L

  dr.bakhtiari.academy

# Preparing for Folate Test

Fasting: 8 hours (Non-fasting specimens yield falsely elevated results)

Specimen Required: Serum

Do not order on patients who have recently received methotrexate or other folic acid antagonists.

Preferred Method:

ELISA Method: Competitive-Binding Receptor Assay

Specimen Type	Temperature	Time
Serum	Refrigerated (preferred)	7 days
	Frozen	90 days

Reference Values: > or =4.0 µg/L

 dr.bakhtiari.academy



شسته نظیفش آزمایشتان  
ممانن نمونن

**آماده سازی نمونه، کنترل و کالیبراتور**

**Folate & Vit B12**



---

**A. 100 µl از نمونه (کالیبراتور، کنترل و نمونه بیمار) داخل لوله شیشه‌ای بریزید.**

۱. نوک سمپلر را در تماس با دیواره و نزدیک به انتهای لوله قرار داده و محتویات آن را تخلیه نمایید.

**B. 50 µl از محلول آماده شده Stabilizing/Releasing را به لوله شیشه‌ای اضافه کنید.**

(نحوه آماده سازی محلول Stabilizing/Releasing در قسمت سوم مرحله آماده سازی بروشور ذکر شده است)

۱. نوک سمپلر را در تماس با دیواره و نزدیک به انتهای لوله قرار داده و محتویات آن را به آرامی بالای نمونه ها تخلیه نمایید. برای جلوگیری از آلودگی، بهتر است برای هر لوله نوک سمپلر تعویض گردد.

۲. بلافاصله بعد از اضافه کردن محلول Stabilizing/Releasing به هر لوله، لوله را روی ورتکس برای 3-2 ثانیه مخلوط نمایید. بهتر است این عمل برای هر لوله 3 بار انجام شود. (3 × 2-3 ثانیه)

۳. قبل از اضافه شدن محلول Stabilizing/Releasing به لوله بعدی، حتما لوله قبلی ورتکس شود.

**C. 15 دقیقه در دمای اتاق انکوبه نمایید.**

۱. الزامی می باشد که شروع زمان انکوباسیون از آماده سازی اولین لوله صورت گیرد.

**D. 150 µl از محلول Neutralizing را داخل لوله ها اضافه کنید.**

۱. نوک سمپلر را در تماس با دیواره و نزدیک به انتهای لوله قرار داده و محتویات آن را به آرامی محلول موجود در لوله تخلیه نمایید. برای جلوگیری از آلودگی، بهتر است برای هر لوله نوک سمپلر تعویض گردد.

۲. بلافاصله بعد از اضافه کردن Neutralizing به هر لوله، لوله را روی ورتکس برای 3-2 ثانیه تخلیه نمایید. بهتر است این عمل برای هر لوله 3 بار انجام شود. (3 × 2-3 ثانیه)

۳. قبل از اضافه شدن محلول Neutralizing به لوله بعدی، حتما لوله قبلی ورتکس شود.

**E. 5 دقیقه در دمای اتاق انکوبه گردد.**



dr.bakhtiari.academy

Monobind Inc. آماده سازی نمونه، کنترل و کالیبراتور Folate & Vit B12

15 min

**C. 15 دقیقه در دمای اتاق انکوبه نمایید.**

i. الزامی می باشد که شروع زمان انکوباسیون از آماده سازی اولین لوله صورت گیرد.

**D. 50 µl از محلول Neutralizing را داخل لوله ها اضافه کنید.**

i. نوک سمپلر را در تماس با دیواره و نزدیک به انتهای لوله قرار داده و محتویات آن را به آرامی بالای محلول موجود در لوله، تخلیه نمایید. برای جلوگیری از آلودگی، بهتر است برای هر لوله نوک سمپلر تعویض گردد.

ii. بلافاصله بعد از اضافه کردن Neutralizing به هر لوله، لوله را روی ورتکس برای 2-3 ثانیه مخلوط نمایید. بهتر است این عمل برای هر لوله 3 بار انجام شود. (3 × 2-3 ثانیه)

iii. قبل از اضافه شدن محلول Neutralizing به لوله بعدی، حتما لوله قبلی ورتکس شود.

**E. 5 دقیقه در دمای اتاق انکوبه گردد.**

dr.bakhtiari.academy

Monobind Inc. Vitamin B12 (ELISA)

**آماده سازی قبل از انجام تست**

i. گستره یک سانت قبل از شروع تست، کیت را در دمای اتاق قرار دهید (20-27 °C). قبل از شروع تست نمونه می شود، کیت پیرا را به آرامی و بدون لرز در سر و ته نگهدار تا به خوب مخلوط شوند.

ii. **محلول تست:** هفت آماده سازی محلول تست طبق دستورالعمل زیر انجام دهید. 200 µl از آب مقطر به هر یک از 1000 µl (تست 1 به 49) و خوب مخلوط نمایید. محلول هفت 100 µl در دمای اتاق تا قبل از آماده سازی محلول تست طبق دستورالعمل زیر در داخل آن کنید.

iii. **Stabilizing Agent:** هفت آماده سازی محلول (به نسبت 1 به 3) به 30 µl طبق دستورالعمل زیر در 3000 µl Stabilizing Agent اضافه کنید. به محض مورد نیاز تهیه کنید.

iv. **آماده سازی نمونه های بیمار، استاندارد و کنترل:** هفت آماده سازی به اطلاعات موجود در پشت این بسته، رجوع فرمایید.

تذکرات:

- ازم به کار است که کیت هور یک مرتبه مستقیماً بعد از اضافه کردن کواژنگ دار و بعد از انجام زمان انکوباسیون پیرا را به مستقیماً کنار نمونه ها حفظ 5 تا 2-درجه پارا می باشد و هفت نگهداری طولانی تر باید در -20- درجه نگهداری کنید
- نمونه مورد آزمایش را باید به دور از نور و حرارت نگهداری نمایید

مصرفه سرخ / ml	100	1300
سرازان	200	835
سنگین	110	800

**روش انجام تست**

i. هر کدام از نواحی های کواژنگ شده یا قبل از سمپلر کردن داخل پاکت های الیزا، در دمای اتاق، پاکت کواژنگ شده را به آرامی و بدون لرز نگهدار.

ii. ابتدا از نمونه، کواژنگ و کواژنگ شده و پاکت شده را در داخل پاکت ها بریزید.

iii. 50 µl از محلول کواژنگ پیرا 12-Vitamin B را به همه پاکت ها اضافه کنید.

iv. پاکت را برای 20 تا 30 ثانیه به آرامی به سطح میز Stabilizing Agent در دستورات پاکت مخلوط شود. سپس سطح پاکت ها را با دست پاکت بپوشانید تا در بین انکوباسیون محلولات داخل پاکت ها تغییر نکند.

v. پاکت را به مدت 45 دقیقه در دمای اتاق انکوبه نمایید.

vi. ابتدا از محلول کواژنگ پیرا 12-Vitamin B را به آرامی به سطح میز Stabilizing Agent در دستورات پاکت مخلوط شود. سپس سطح پاکت ها را با دست پاکت بپوشانید تا در بین انکوباسیون محلولات داخل پاکت ها تغییر نکند.

vii. پاکت را به مدت 30 دقیقه در دمای اتاق انکوبه نمایید.

viii. محلولات داخل پاکت را تخلیه نمایید.

ix. میکروپلازما از محلول تست طبق دستورالعمل زیر به همه پاکت ها اضافه کنید و سپس تخلیه نمایید. عمل هور باید 3 مرتبه انجام پذیرد.

x. 100 میکروپلازما از محلول سوبسترا را به همه پاکت ها اضافه کنید. (Sobstrat) نمونه پاکت در این مرحله می شود. فرمایید.

xi. پاکت را به مدت 20 دقیقه در دمای اتاق در صورتیکه کواژنگ نگهدار.

xii. 50 میکروپلازما از محلول STOP در همه پاکت ها اضافه کنید و پاکت را برای 20 تا 30 ثانیه به آرامی به سطح میز Stabilizing Agent در دستورات پاکت مخلوط کنید.

xiii. STOP: هرگز کواژنگ MONOBIND در این تست استفاده نشود.

xiv. پاکت را در طول موج 450 nm (با طول موج پیرا 530 nm) بخوانید. فرکانس نمونه ما باید حداقل 30 دقیقه پس از افزودن محلول STOP صورت پذیرد.

dr.bakhtiari.academy



**Monobind, Inc.**

**Vitamin B12 (ELISA)**

شرکت تشخیص آزمایشگاهی  
سامان تهرودیا نور

### آماده سازی قبل از انجام تست

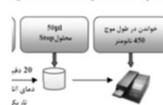
- 1) **کیت:** یک ساعت قبل از شروع تست، کیت را در دمای اتاق قرار دهید ( 20-27 °C ). قبل از شروع تست توصیه می شود کلیه ویال ها را به آرامی و پندین بار سر و ته نمایید تا به خوبی مخلوط گردند.
- 2) **مخلوط شستشو:** جهت آماده سازی مخلوط شستشو ممتوویک ویال ( 20 ml ) را با آب مقطر (رقیق نموده تا حجم کل به 1000 ml برسد (نسبت 1 به 49) و خوب مخلوط نمایید. مخلوط فوق تا 60 روز در دمای اتاق قابل استفاده است. اگر قبل از آماده سازی مخلوط شستشو متوجه وجود کریستال هایی در داخل آن شدید، ویال را به مدت 5 دقیقه در بین ماری 37 °C قرار دهید.
- 3) **Stabilizing Agent /Releasing Agent:** جهت آماده سازی مخلوط ( به نسبت 1 به 39 (رقیق نمایید)، برای مثال میزان 100٪ از Stabilizing Agent را با 3900 از Releasing Agent مخلوط نموده تا حجم کل به (4ml) برسد خوب مخلوط فرمایید. مخلوط فوق پایدار نبوده و به میزان مورد نیاز، در هر ران کاری به حجم مورد نیاز تهیه گردد.
- 4) **آماده سازی نمونه های بیمار، استاندارد و کنترل:** جهت آماده سازی، به اطلاعات مندرج در پشت این برگه، رجوع فرمایید.

**نکته:**

- لازم به ذکر است که کیت فوق یک مرحله شستشو بعد از اضافه کردن کونژوگه دارد و بعد از اتمام زمان انکوباسیون بیوتین، نیاز به شستشو ندارد
- نمونه ها فقط 5 روز در 2-8 درجه پایدار می باشند و جهت نگهداری طولانی تر باید در 20- درجه نگهداری شوند
- نمونه مورد آزمایش را باید به دور از نور و مرارت نگهداری نمایید

محدوده مرجع pg/ml	1300 -	160	نوزائان
	835 -	200	بالغین
	800 -	110	60 سال > بالغین

**روش انجام تست**





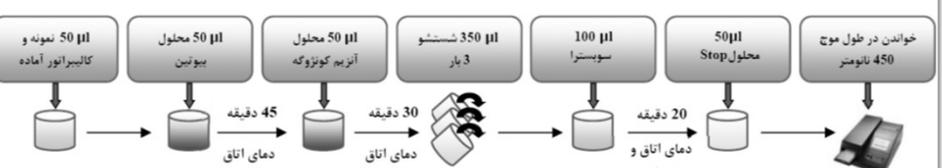
**Monobind, Inc.**

**Vitamin B12 (ELISA)**

شرکت تشخیص آزمایشگاهی  
سامان تهرودیا نور

### روش انجام تست

- 1) هر کدام از لوله های اکسترکشن شده را قبل از سمپل کردن داخل پاکت های ایلیزا، در همان لحظه، یک تانیه ورتکس نمایید.
- 2) 50 لاندا از نمونه، کالیبراتور و کنترل آماده شده و ورتکس شده را در داخل پاکت ها بریزید.
- 3) 50 لاندا از مخلوط کونژوگه بیوتین Vitamin B-12 را به همه پاکت ها اضافه کنید.
- 4) پلیت را برای 20 تا 30 ثانیه به آرامی روی سطح میز Shake دهید تا ممتوویک پاکت مخلوط شود سپس سطح پاکت ها را با هسب پلیت بپوشانید تا در مین انکوباسیون ممتوویک داخل پاکت ها تغییر نکرده.
- 5) پلیت را به مدت 45 دقیقه در دمای اتاق انکوبه نمایید.
- 6) 50 لاندا از مخلوط آدریم کونژوگه Vitamin B-12 را (روی مخلوط های قبل به همه پاکت ها اضافه نمایید.
- 7) پلیت را برای 20 تا 30 ثانیه به آرامی روی سطح میز Shake دهید تا ممتوویک پاکت مخلوط شود سپس سطح پاکت ها را با هسب پلیت بپوشانید تا در مین انکوباسیون ممتوویک داخل پاکت ها تغییر نکرده.
- 8) پلیت را به مدت 30 دقیقه در دمای اتاق انکوبه نمایید.
- 9) ممتوویک داخل پلیت را تغلیظ نمایید.
- 10) 350 میکرولیتر از مخلوط شستشوی رقیق شده را به همه پاکت ها اضافه نموده و سپس تغلیظ نمایید. عمل فوق باید 3 مرتبه انجام پذیرد.
- 11) 100 میکرولیتر از مخلوط سوپرنتر را به همه پاکت ها اضافه نمایید. (توجه: Shake) نمونه پلیت در این مرحله جداً فوداری فرمایید.
- 12) پلیت را به مدت 20 دقیقه در دمای اتاق و در محیط تاریک انکوبه نمایید.
- 13) 50 میکرولیتر از مخلوط Stop در همه پاکت ها اضافه نموده و پلیت را برای 15 تا 20 ثانیه به آرامی روی سطح میز Shake دهید. (توجه: لطفاً از مخلوط STOP دیگر کیت های MONOBIND در این تست استفاده نشود)
- 14) پلیت را در طول موج 450 nm (با طول موج فرانس 630 nm) بفرانید. قرانت نمونه ها باید حداکثر تا 30 دقیقه پس از افزودن مخلوط Stop صورت پذیرد.



**خواندن در طول موج 450 نانومتر**

## Total Allowable Error (TEa) for B12 Assay



HOME SOLUTIONS ▾ PRODUCTS ▾ MEET DI ▾ RESOURCES ▾

### Vitamin B-12

Analyte	Fluid	Method	Limit	Source
Vitamin B-12		Centaur	3 SD	4 CAP

### Vitamin B12

Analyte	Fluid	Method	Limit	Source
Vitamin B12			60 pg/mL or 30%	2 WLSH
Vitamin B12			+/- 25%	3 NYS
Vitamin B12			60 pg/mL or 30%	6 AAB
Vitamin B12			20 pmol/L, 20%	7 RCPA

<https://www.datainnovations.com/allowable-total-error-table>

## Total Allowable Error (TEa) for Folate Assay



HOME SOLUTIONS ▾ PRODUCTS ▾ MEET DI ▾ RESOURCES ▾ SU

### Folate, Serum

Analyte	Fluid	Method	Limit	Source
Folate, Serum		Centaur	3 SD	4 CAP

<https://www.datainnovations.com/allowable-total-error-table>

## Units of Vit B12

<https://unitslab.com/>

SI UNITS (recommended)		CONVENTIONAL UNITS	
pmol/L	<input type="text" value="1"/>	pg/mL	<input type="text" value="1.3554"/>
		pg/dL	<input type="text" value="135.537"/>
		pg/100mL	<input type="text" value="135.537"/>
		pg%	<input type="text" value="135.537"/>
		pg/L	<input type="text" value="1355.37"/>
		ng/L	<input type="text" value="1.3554"/>

  dr.bakhtiari.academy

## Units of Folate

<https://unitslab.com/>

SI UNITS (recommended)		CONVENTIONAL UNITS	
nmol/L	<input type="text" value="1"/>	ng/mL	<input type="text" value="0.44"/>
pmol/L	<input type="text" value="1000"/>	ng/dL	<input type="text" value="44"/>
		ng/100mL	<input type="text" value="44"/>
		ng%	<input type="text" value="44"/>
		ng/L	<input type="text" value="440"/>
		µg/L	<input type="text" value="0.44"/>

  dr.bakhtiari.academy

Emre İspir\*, Muhittin A. Serdar, Taner Ozgurtas, Ozlem Gulbahar, Kadir Okhan Akın,  
Fatih Yesildal and İsmail Kurt

## Comparison of four automated serum vitamin B12 assays

**Table 3** Concordance correlation analysis of vitamin B12 methods against the mean of the vitamin B12 assays.

	Concordance correlation coefficient (95% CI)	Pearson $\rho$ (precision)
ADVIA_Centaur XP	0.9687 (0.9504–0.9803)	0.9758
Architect_i2000sr	0.9722 (0.9598–0.9808)	0.9903
Roche_Cobas E601	0.9913 (0.9861–0.9946)	0.9914
Dxl_800_Unicel	0.9161 (0.8736–0.9447)	0.9568

## Vit. B12 ASSAY INTERFERENCE

1. Interference of serum vitamin B12 assays by IF antibodies has been demonstrated
2. An unknown artifact: in 25% of patients with pernicious anemia, the assay may have produced false-normal values
3. Folate therapy may mask anemia, and not treating with cobalamin may accelerate neurologic damage in people with vitamin B12 deficiency
4. In patients receiving therapy with high biotin doses (>5 mg/day), no sample should be taken after the last biotin administration, preferably overnight to ensure fasting sample.

## Time to Improvement of Abnormalities in B12 Def. after Initiation of Treatment

<i>Abnormality</i>	<i>Expected time until improvement</i>
Homocysteine or methylmalonic acid level, or reticulocyte count	One week
Neurologic symptoms	Six weeks to three months
Anemia, leukopenia, mean corpuscular volume, or thrombocytopenia	Eight weeks

Carmel R. How I treat cobalamin (vitamin B12) deficiency. Blood. 2008; 112(16): 2214-2221.

**TABLE 2. Self-Reported Symptoms of Patient B Before and 1 and 6 Months After Initiation of Hydroxocobalamin Therapy<sup>a</sup>**

Variable	Before treatment	After treatment	
		1 mo	6 mo
Numbness in hands	5	4	1
Difficulties focusing	5	4	3
Not being able to find the right words	6	4	0
Mood changes	7	6	0
Pain in mouth and tongue	6	6	4
Fatigue, weakness	9	9	0
Nausea, reduced appetite	8	6	0
Menstrual pains	9	9	8
Pain in joints	6	6	3
Dyspnea on exertion	6	8	1
Dizzy spells	7	5	0
Pale skin	5	5	4
Feeling cold	8	8	0
Muscle cramps	6	6	4
Stomach complaints, acidity	6	4	0

<sup>a</sup>Symptoms rated on a scale of 0 to 10, in which 0 = no symptoms and 10 = worst symptoms.

## Significance of High B12 blood level

### Well-documented associations

- Fibro-laminar hepatocellular carcinoma
- Autoimmune lymphoproliferative syndrome
- Chronic myeloid leukemia

### Possible associations

- Hematological diseases and malignancies
- Unknown cancer and metastases
- Liver disease (not etiology specific)
- Renal disease
- Anti-transcobalamin auto-antibodies (not disease-related)

### Debatable associations

- Rheumatoid arthritis
- Infectious diseases
- HIV/AIDS

Johan F.B. Arendt, Ebba Nexo, Unexpected high plasma cobalamin. Clin Chem Lab Med 2013; 51(3): 489-496

## Haptocorrin Levels can Vary

### • Decreased in:

- Pregnancy
- Genetic haptocorrin deficiency

### • Increased in:

- Inflammatory States
- Some Liver Diseases
- Impaired kidney function
- Rheumatoid arthritis
- Some hematological conditions
  - chronic myeloid leukemia,
  - primary myelofibrosis,
  - other myeloproliferative neoplasms

Active B12 (HoloTC) is better in some specific groups:

- Inflammatory States
- Pregnancy
- Hematological conditions
- Haptocorrin deficiency
- ....

## Case 1: 33 y Pregnant Woman

- No Specific Signs or Symptoms
- Adequate B12 intake

S Total B12	119 L	pmol/L	(140-650)
S Active B12	47	pmol/L	(23-100)

Comment: Normal physiological changes in pregnancy

Active B12 (HoloTC) is better in some specific groups:

- Inflammatory States
- **Pregnancy**
- Hematological conditions
- Haptocorrin deficiency
- ....

 [dr.bakhtiari.academy](https://www.instagram.com/dr.bakhtiari.academy)

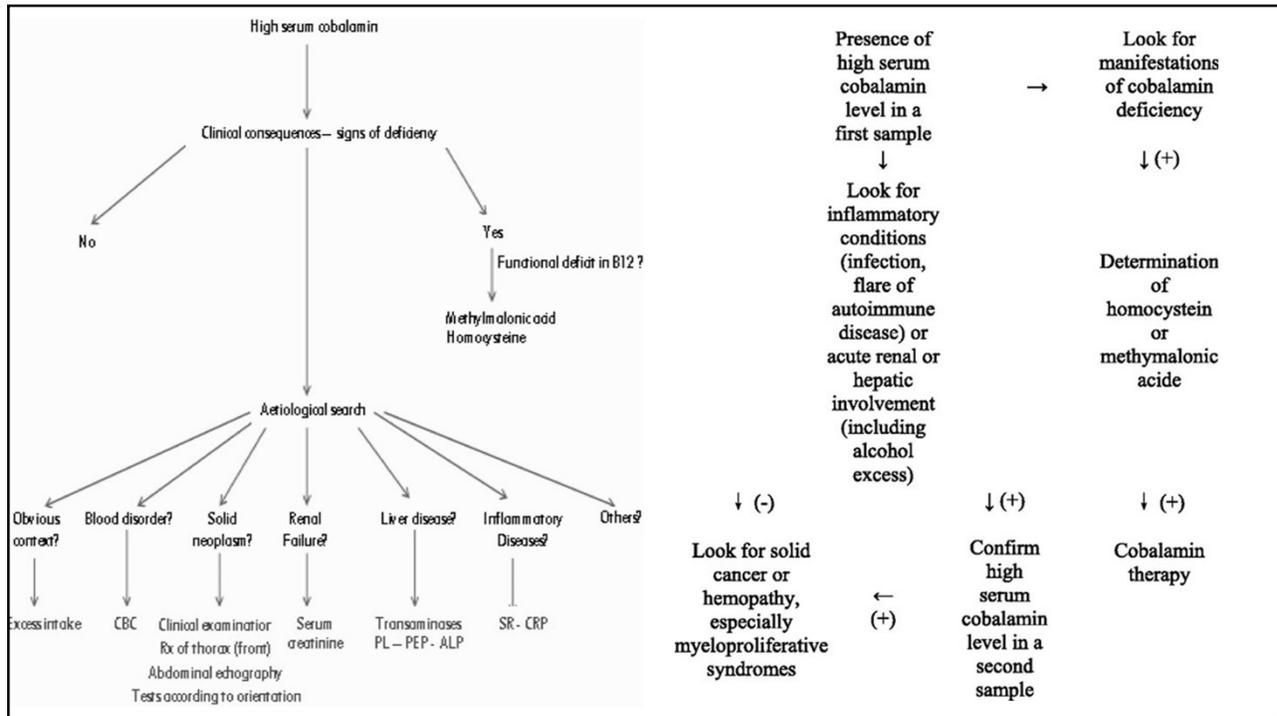
## Case 2: 51 y/o Vegetarian Woman

› Hb	96 ↓	g/L	(115-160)
› MCV	81 ↓	fL	(80-100)
› Ferritin	12 ↓	ug/L	(20-350)
› Total B12	175	pmol/L	(140-650)

**Active B12** 12 ↓ pmol/L (23-100)

Iron & B12 Deficiencies often coexist in vegetarians  
B12 deficiency can be overlooked by TB12

HoloTC assay



## Case 3: 54 y/o, Male (Non-Hodgkin's Lymphoma)

With Suggestive Signs & Symptoms

Test	First	Second	Unit	RR
RBC Folate	1329	1008	nmol/L	600 - 3000
s Total B12	601	373	Pmol/L	140 - 650

Active B12 (HoloTC) is better in some specific groups:

- Inflammatory States
- Pregnancy
- Hematological conditions**
- Haptocorrin deficiency
- ....

## Pitfalls of folate assay in serum

1. **Methodology:** Folate assays can vary in their methodology, and different methods may yield different results. Some assays may be less accurate or precise than others, leading to potential variations in reported folate levels.
2. **Sample handling:** Folate is a fragile compound and can be easily degraded during sample handling and storage. Exposure to light, heat, and oxidation can lead to decreased folate levels. Proper collection, processing, and storage of samples are crucial to obtain accurate results.
3. **Timing of sampling:** Folate levels can fluctuate throughout the day, making the timing of sample collection important. Folate levels are typically highest in the morning and decrease throughout the day. Therefore, obtaining a fasting morning sample is often preferred for accurate assessment.
4. **Interpretation:** Interpreting folate levels solely based on serum concentrations can be misleading. Folate is actively taken up by red blood cells, where it is converted into its active form. Serum folate levels may not reflect the actual folate status in tissues or the functional capacity of folate-dependent enzymes.
5. **Other factors influencing results:** Certain medications, such as antifolate drugs like methotrexate, can interfere with folate assays and lead to inaccurate results. Additionally, other factors like vitamin B12 deficiency or concurrent illnesses can affect folate metabolism and mask the true folate status.

## Conclusions

1. The diagnosis of Vitamin B12/Folate deficiencies remains challenging.
2. The combination of static with functional markers of vitamin status can reveal deficient states previously not detected.
3. A combination of Active Vit B12 with MMA well suits to the mixed patients
4. Extraction steps are important
5. Consider Patient Preparation
6. Harmonize Sample Timing & Handling

*M Reza Bakhtiari, DCLS, PhD*

Your Attention Highly Appreciated

*M Reza Bakhtiari, DCLS, PhD*

