





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

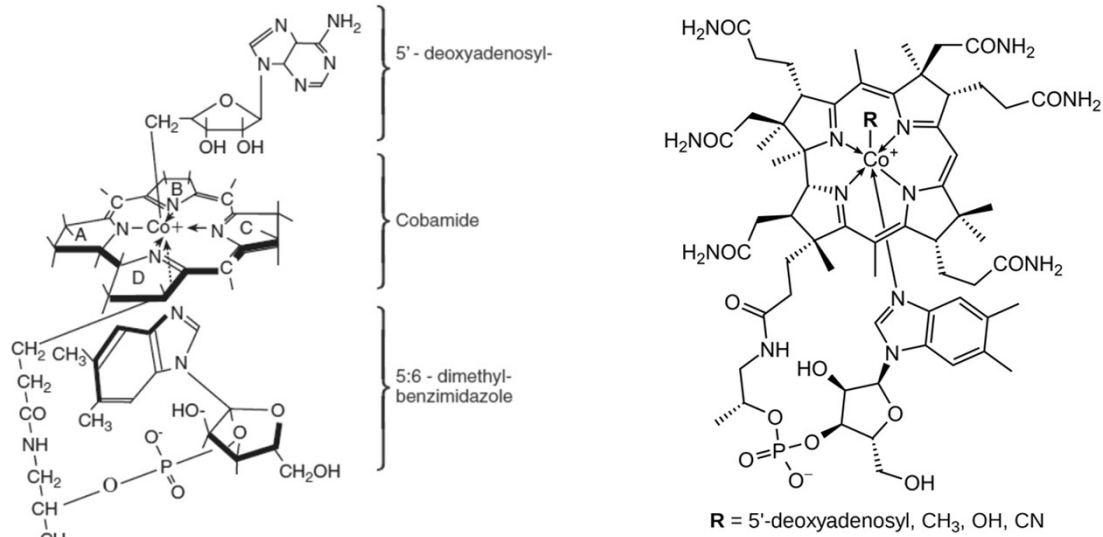
Solubility of 12 g/L in water at 20 °C.

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.

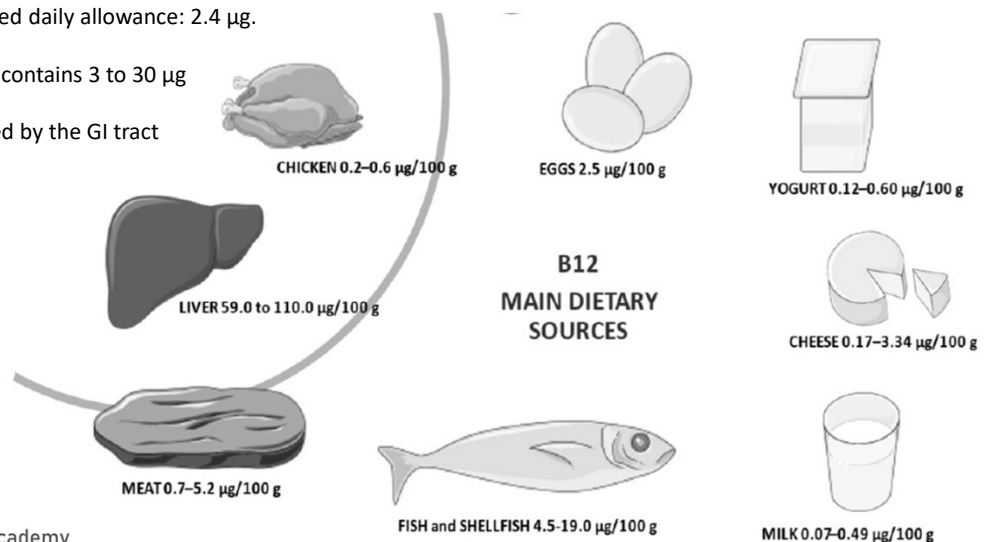
Its structure was determined by x-ray diffraction, a major feat for such a large molecule, winning the **1964 Nobel Prize** in Chemistry for Dorothy Hodgkin

Vitamin B12 Structure



Average content of B12 in animal dietary sources

- The adult recommended daily allowance: 2.4 µg.
- The average daily diet contains 3 to 30 µg
- with 2 to 3 µg absorbed by the GI tract



Late Diagnosis, Misdiagnosis of B12 Def.

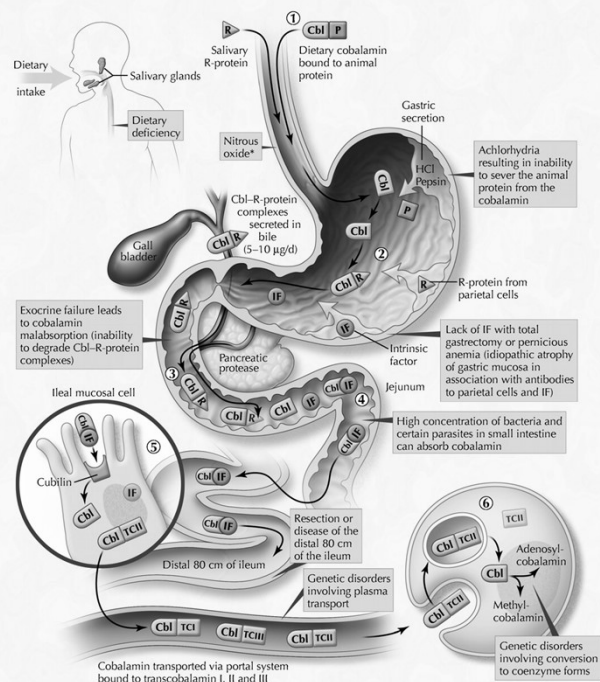
- 33% of Patients waited 5 years for diagnosis
- 14% Waited 10 years
- 44% Initially Misdiagnosed
- A Diagnostic Challenge
 - Laboratory Markers for B12 Def. ?



Hooper et al. British Journal of Nursing, 2014

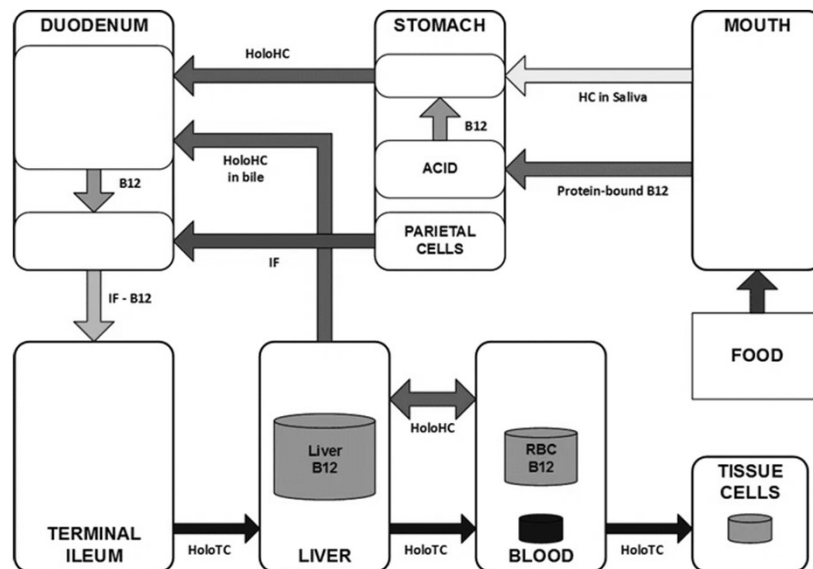
Absorption of B12

- 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

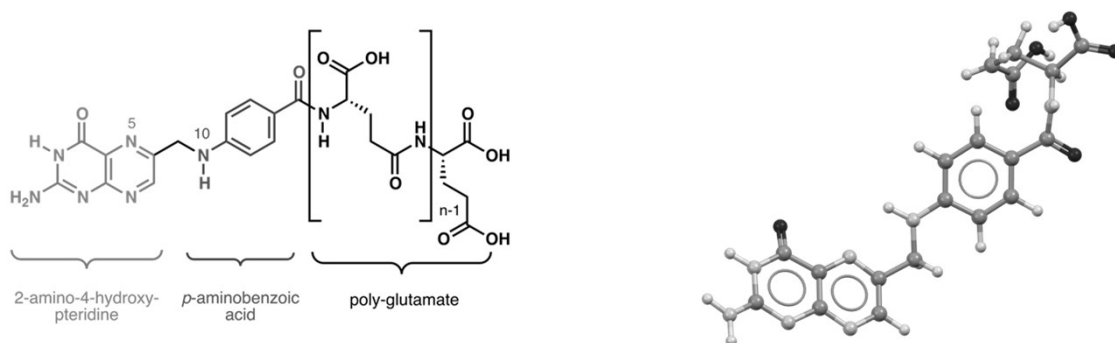


DOI: [10.1503/cmaj.103115](https://doi.org/10.1503/cmaj.103115)

Absorption of B12



Folic Acid Structure

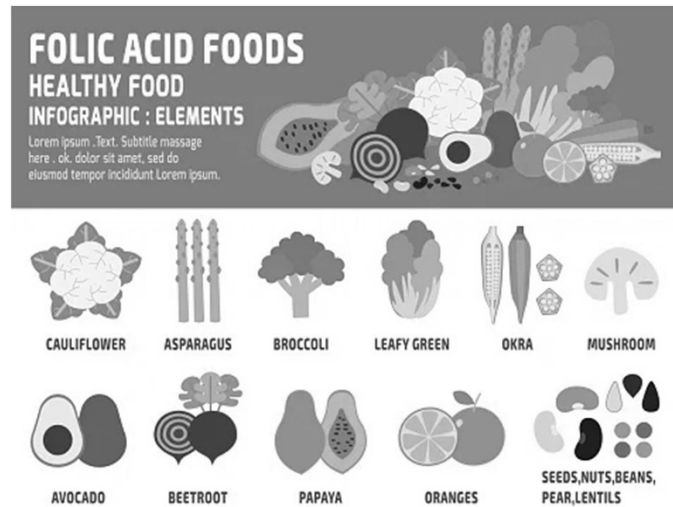


Folate (vitamin B9) refers to the many forms of folic acid and its related compounds, including

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

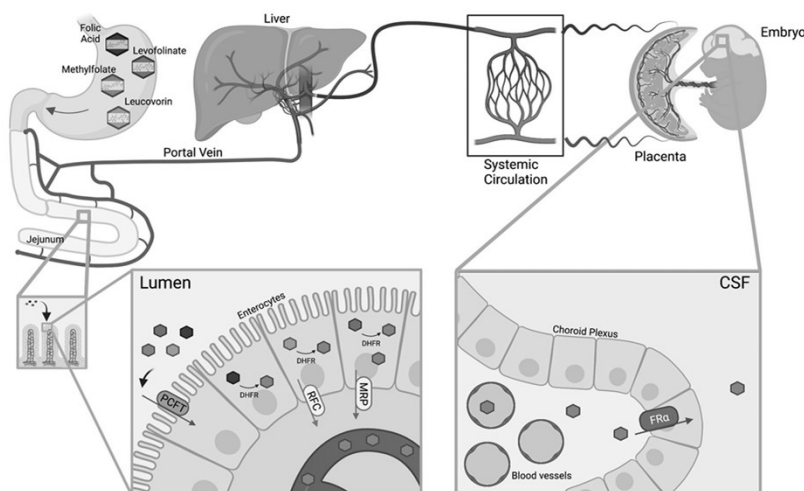
Folate Food Sources

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



dr.bakhtiari.academy

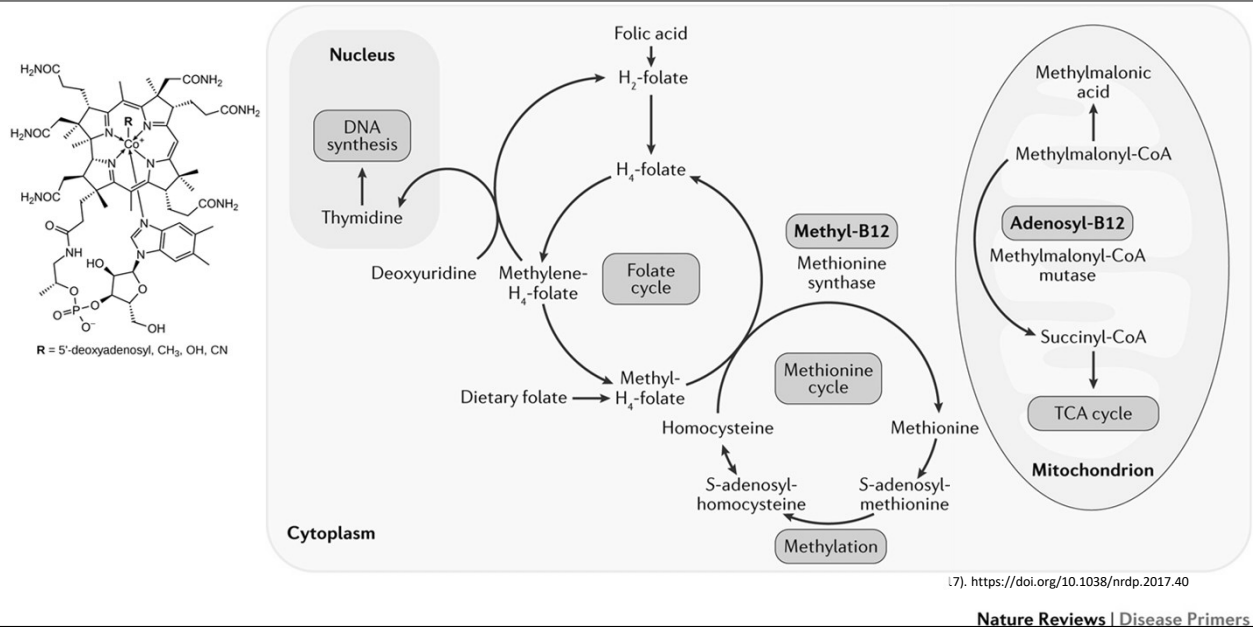
Folate Absorption



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; **FRα:** folate receptor alpha

Intracellular metabolism of Folate & Vitamin B12

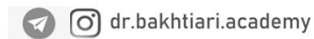


Causes of Vitamin B12 Deficiency

- Inadequate Ingestion:**
 - Veganism
 - Chronic alcoholism
 - Poverty (Malnutrition)
 - Religious tenets
- Dissociation Failure of Food-Cobalamin (60 %):***
 - Atrophic gastritis
 - PPIs, H₂ Blockers
 - Achlorhydria
 - H. pylori infection
 - Pancreatic exocrine failure
- Aging**
- Inadequate Intrinsic Factor (15-20 %):***
 - Antibodies to IF or PC (pernicious anemia)
 - Gastrectomy
 - Atrophic gastritis
 - Zollinger-Ellison Syndrome
- Intestinal Malabsorption:**
 - Small intestinal disorder (Crohn's disease, Sprue),
 - Intestinal resection
 - Competition by intestinal parasites or bacteria
 - Immerslund-Gräsbeck syndrome (Cubulin Defect)
- Inadequate Utilization:**
 - Vitamin B12 antagonists (nitrous oxide),
 - Congenital or acquired intracellular enzyme deficiency or deletion
 - Congenital or acquired abnormal binding to cobalamin binding proteins
- Increased Requirements:**
 - Pregnancy
 - Breastfeeding
 - Hyperthyroidism
 - Infancy
 - Malignancy
 - Hemolysis
 - HIV
- Medications**

Causes of Folate deficiency

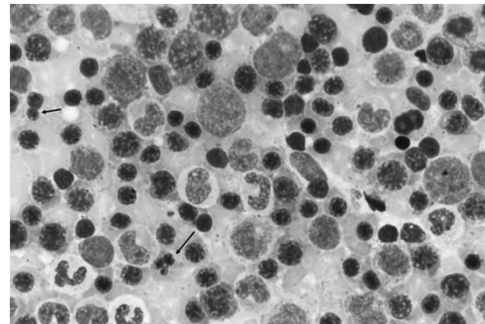
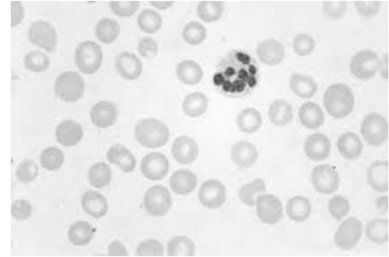
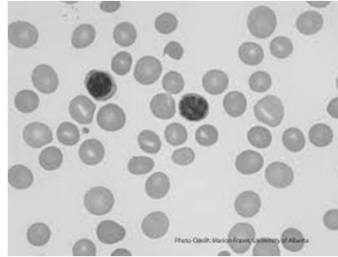
1. **Inadequate dietary intake:** Not consuming enough foods rich in folic acid
2. **Poor absorption:** Certain medical conditions that affect the gastrointestinal tract, such as
 - celiac disease,
 - inflammatory bowel disease,
 - surgical removal of parts of the intestine
3. **Increased metabolic demand:**
 - 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"> 1. Neurologic (most prevalent) <ul style="list-style-type: none"> • symmetrical paresthesia & numbness • weakness or fatigue • muscle ache & cramp • dizziness, blurry vision • ataxia, abnormal gait • decreased reflexes • reduced vibration sense • restless legs syndrome, tremor • erectile dysfunction 3. Hematologic <ul style="list-style-type: none"> • Macrocytic Anemia:, <20% of people with demonstrable low serum B12 have macrocytic anemia. • Iron & B12 Deficiencies often coexist | <ol style="list-style-type: none"> 2. Neuropsychiatric <ul style="list-style-type: none"> • headache • cognitive disturbances • personality changes, • dementia • depression, mania, • psychosis, paranoia • impaired memory, • disorientation, • fatigue, irritability, lethargy • hallucinations, • obsessive-compulsive disorder 4. Misc: <ul style="list-style-type: none"> • macroglossia, glossitis • Jaundice, hyperpigmentation • weight loss • hair loss |
|---|--|

B12/Folate related Clinical Information



Skin Manifestations of B12 Deficiency

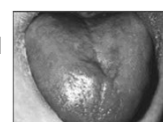
1. **Pale or Jaundiced Skin:** due to red blood cell production

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.

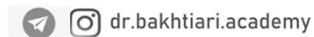
5. **Skin Dryness and Scaling:** Vitamin B12 deficiency may contribute to dryness, itching, and scaling of the skin. This can make the skin appear rough, flaky, or even eczema-like.



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,



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 Busaleh¹, Omkolthoom A. Alasmakh², Fatimah Almohammedsaleh³, Maram F. Almutairi⁴, Juwdaa S. Al Najjar⁵, Abbas Alabdulatif⁶

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

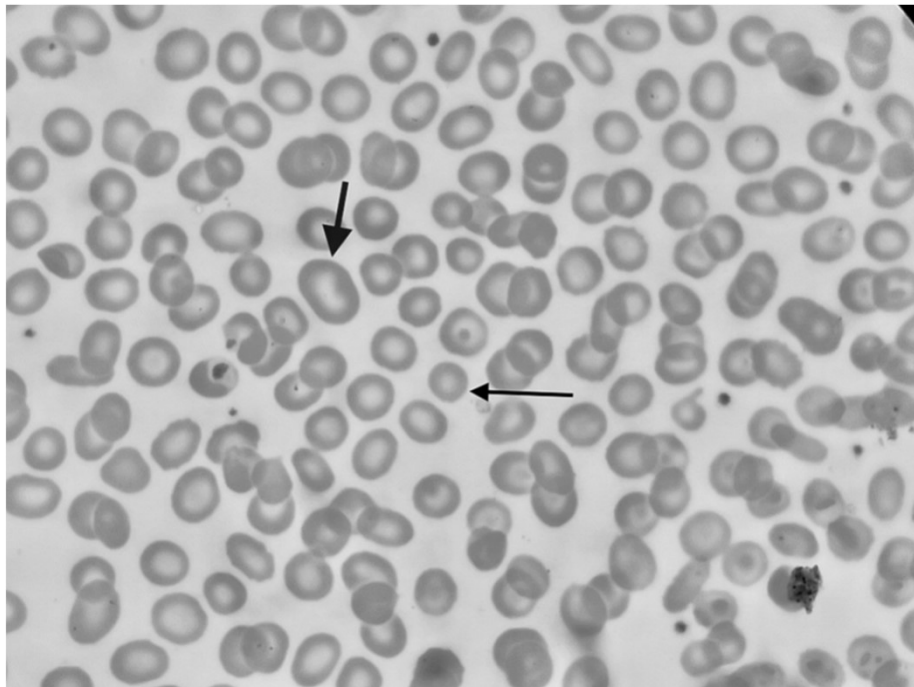
Abstract

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 ³ /uL
Red blood cells count	3.48	2.16	3.62	4.2-6.1 x10 ⁶ /uL
Hemoglobin	6.8	4.1	10	11.1-12.6 g/dL
Platelets	162	109	372	150-350x10 ³ /uL
Mean corpuscular volume	66	61.6	63.6	70-78 fL
Reticulocyte count	2.5%	0.31%	-	0.5-1%
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



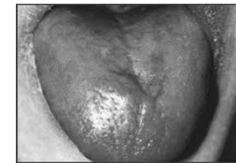
Skin Manifestations of Folate Deficiency



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

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

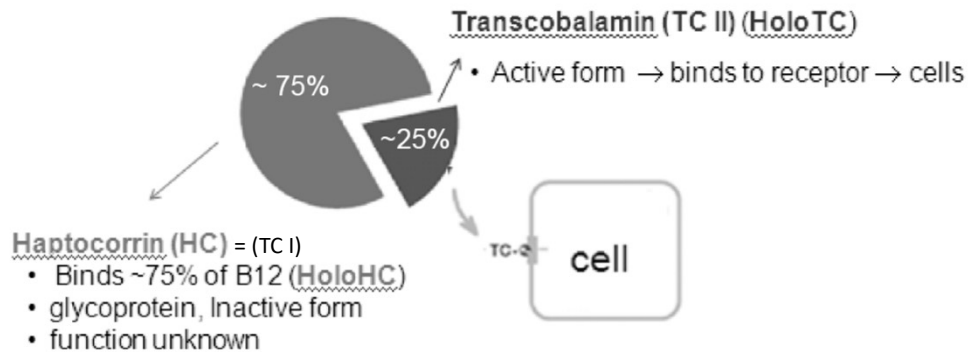
- sub-clinical &
- clinical deficiency

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:

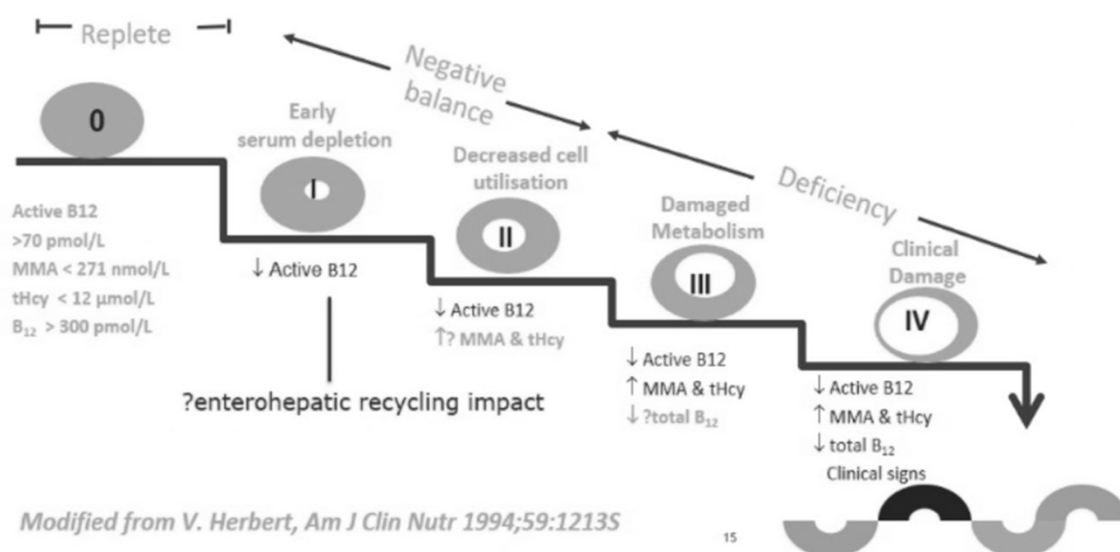
Increased serum vitamin B12	Decreased serum vitamin B12
Ingestion of vitamin C	Pregnancy
Ingestion of estrogens	Aspirin
Ingestion of vitamin A	Anticonvulsants
Hepatocellular injury	Colchicine
Myeloproliferative disorder	Ethanol ingestion
Uremia	Contraceptive hormones
	Smoking
	Hemodialysis
	Multiple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

Cobalamin Binding Proteins (CBPs) in Blood

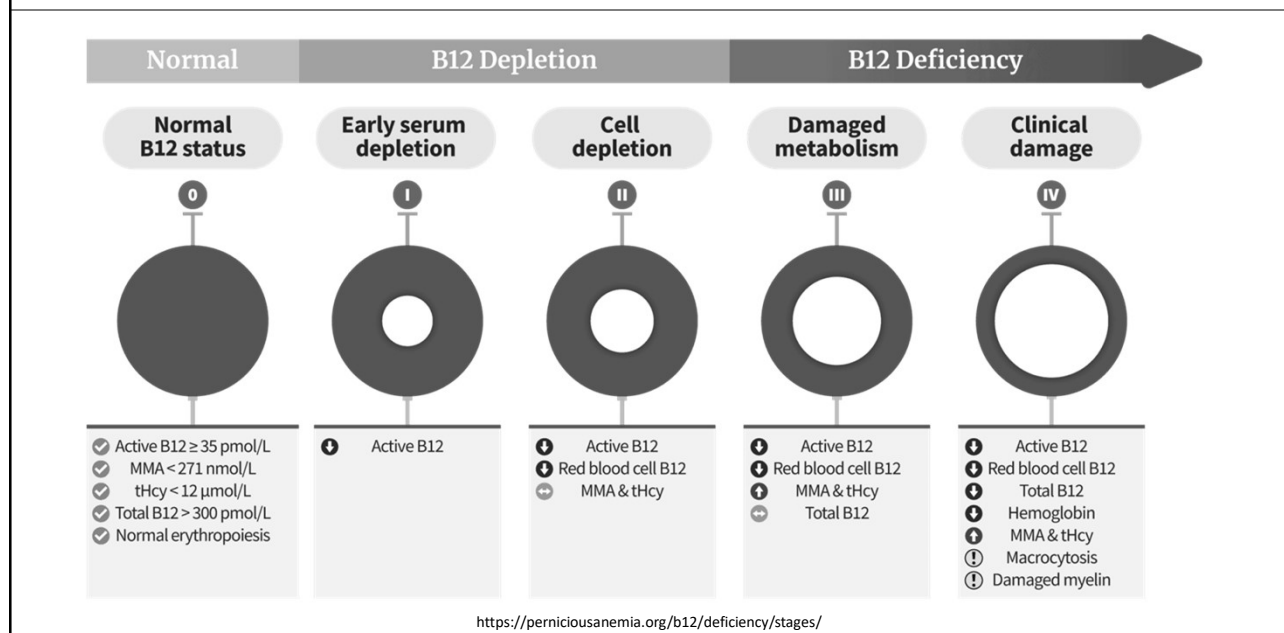


- Total B12 influenced by changes in binding proteins → poor indicator of bioavailable cobalamin
- B12 deficiency can be overlooked by TB12
- In some individuals without symptoms, low levels of serum vitamin B12 may be associated with reductions in the binding protein haptocorrin
- HoloTC (=Active B12)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

Staircase to B12 Def.



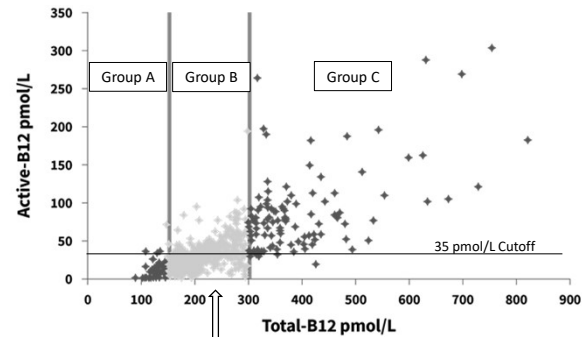
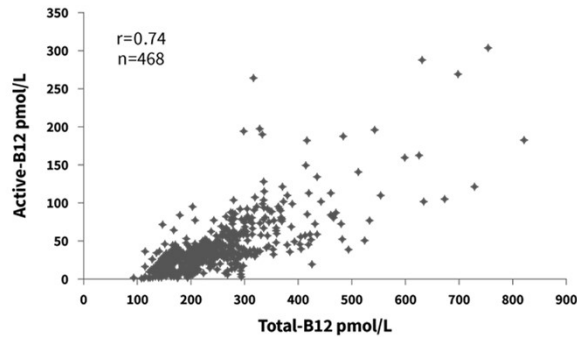
The 4 Stages of B12 Deficiency



Sensitivity & Specificity Related Tests

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

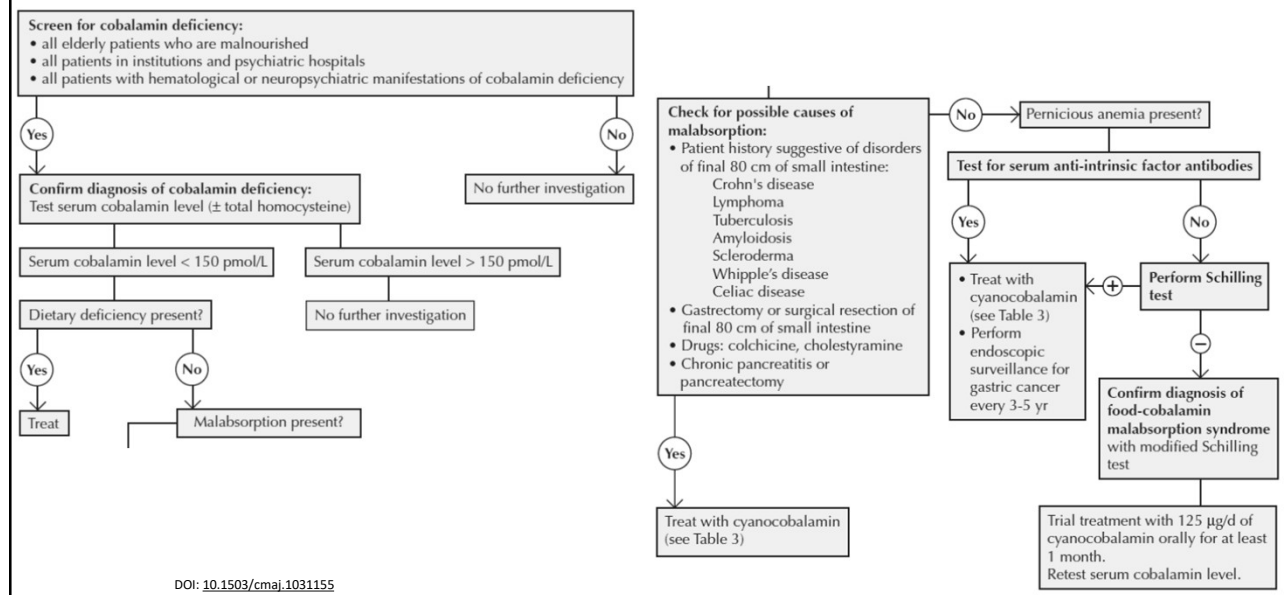
Active-B12 ≥ 35 pmol/L

Likely deficient

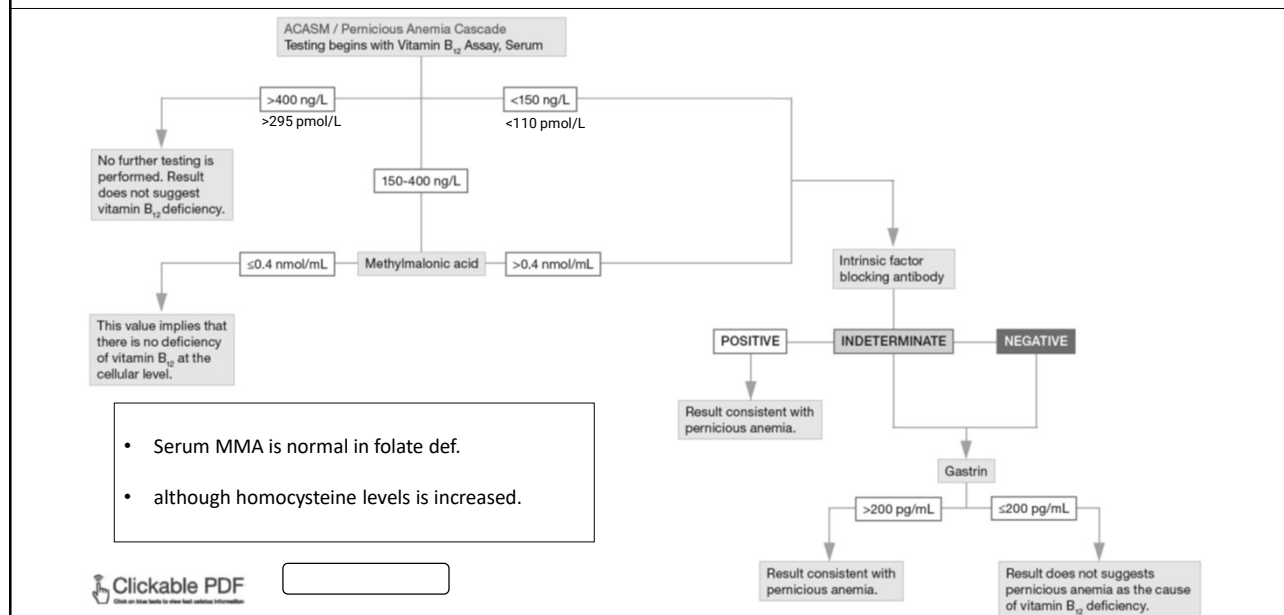
Unlikely deficient*

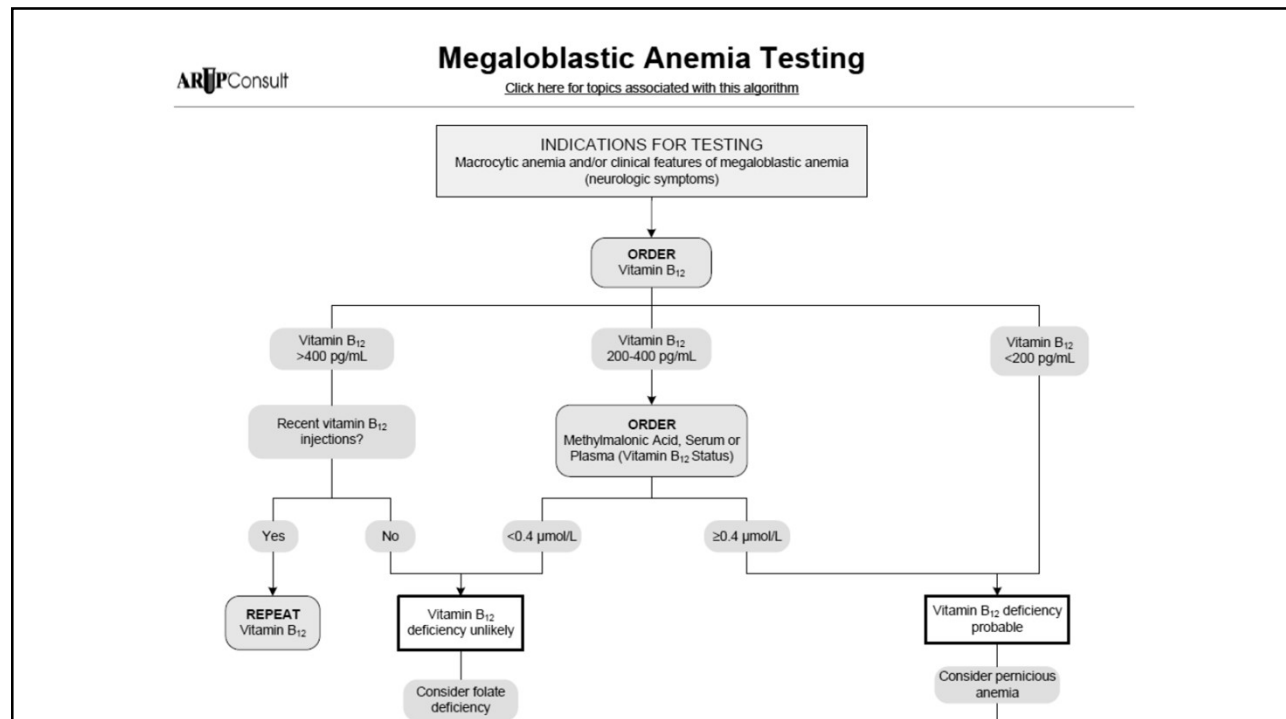
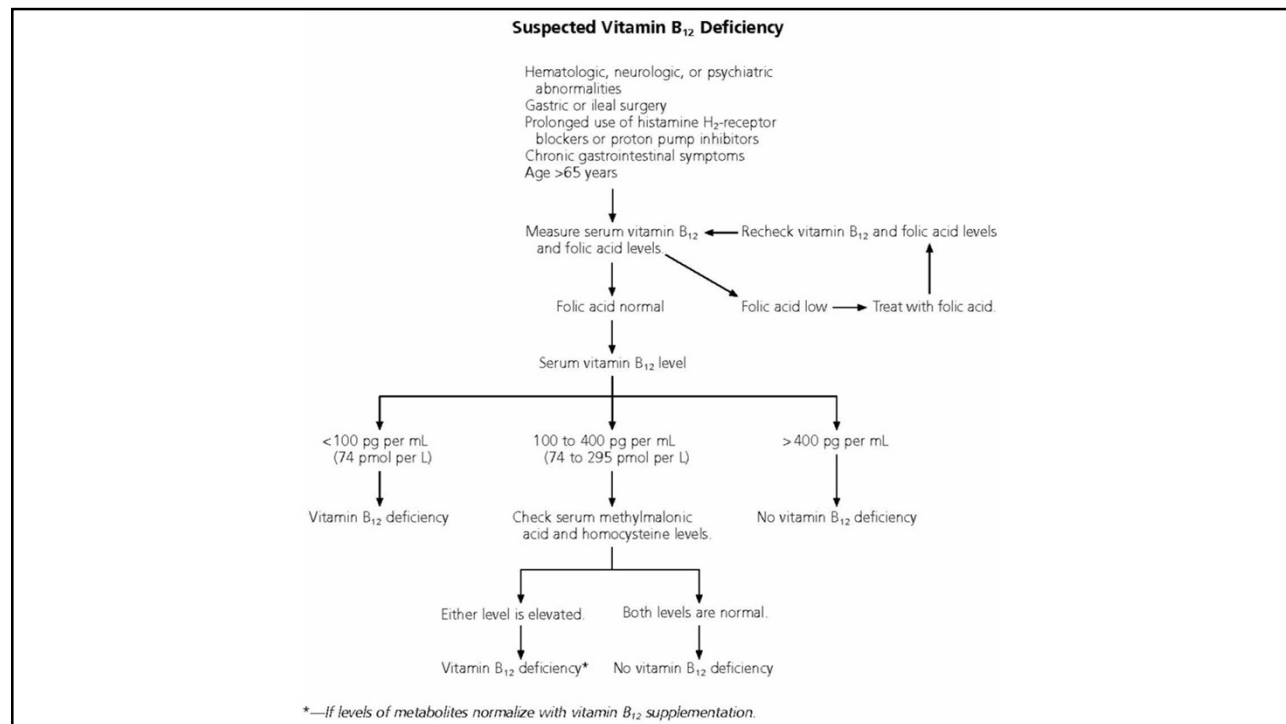
* Renal patients should be further investigated

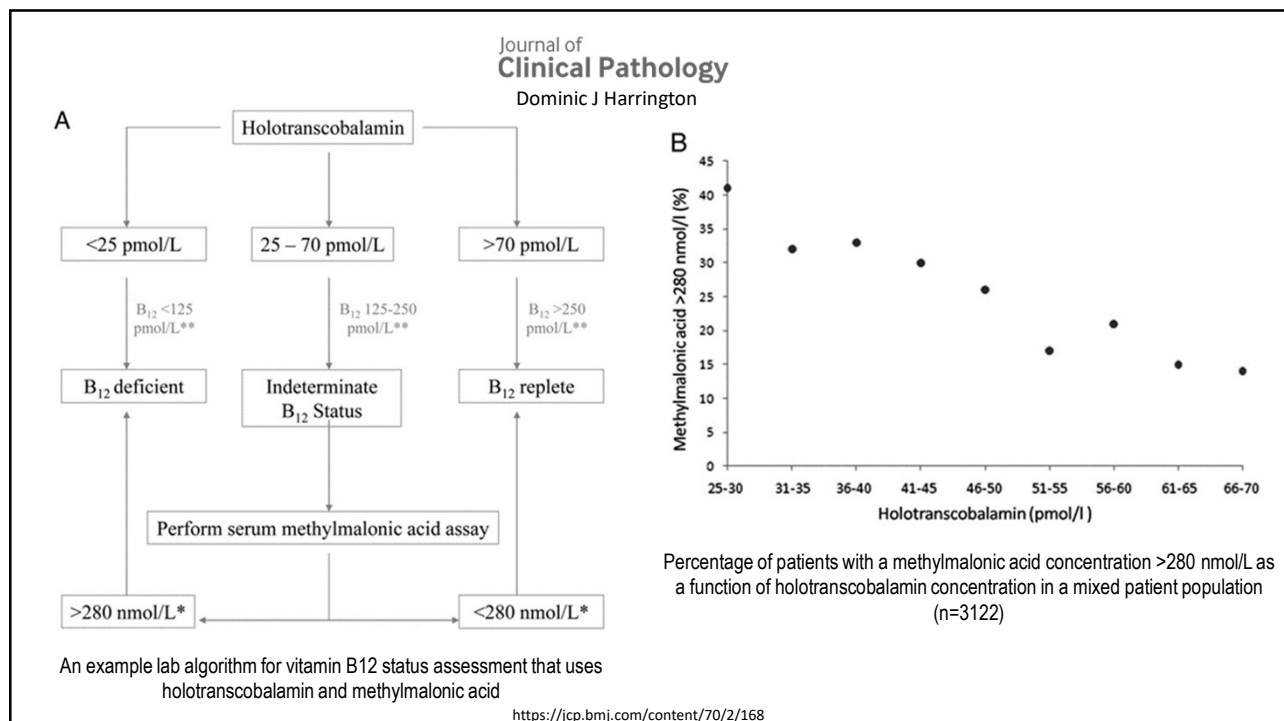
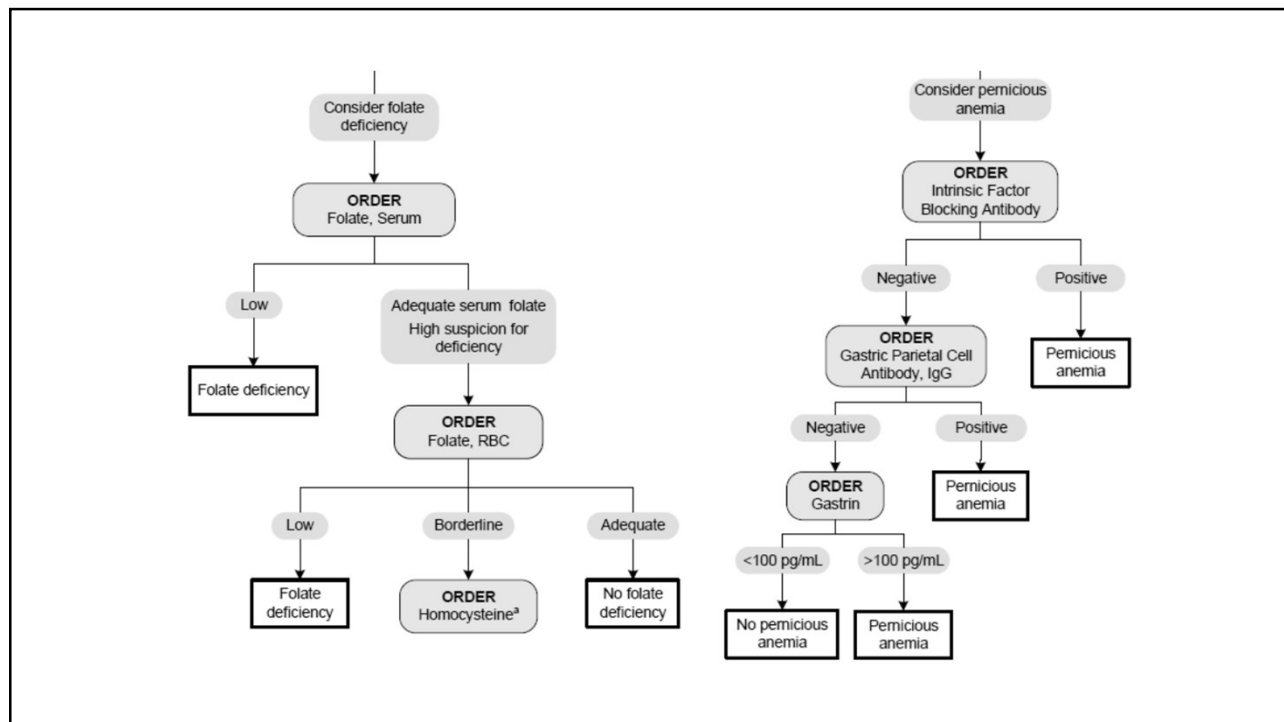
Evaluation of Vit B12 Deficiency in MayoClinic



Evaluation of Vit B12 Deficiency in MayoClinic







Current B12/Folate Methodologies

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

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

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: $> \text{ or } = 4.0 \mu\text{g/L}$

  dr.bakhtiari.academy



آماده سازی نمونه، کنترل و کالیبراتور

Folate & Vit B12

شیشه تخلیه آسان

ممان تصویر

C. 15 دقیقه در دمای اتاق انکوبه نمایید.

I. آزما می باشد که شروع زمان انکوباسیون از آماده سازی اولین لوله صورت گیرد.

D. 50 الی 500 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 مخلوط موجود در لوله. تخلیه نمایید. برای جلوگیری از آلودگی، بهتر است برای هر لوله نوآ تعویض گردد.

II. بلافاصله بعد از اضافه کردن Neutralizing به هر لوله، لوله را روی ورتکس برای 3-2 ثانیه 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، حتماً لوله قبلی ورتکس شود.

E. 5 دقیقه در دمای اتاق انکوبه گردد.

A. 100 الی 1000 از نمونه (کالیبراتور، کنترل و نمونه بیمار) داخل لوله شیشه‌ای بریزید.

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

B. 50 الی 500 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)

I. 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.

II. 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)

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

ADD



MIX



  dr.bakhtiari.academy

آماده سازی نمونه، کنترل و کالیبراتور
Folate & Vit B12

روش تعیین آنکوباسیون

C. 15 دقیقه در دمای اتاق آنکوبه نمایید.

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

D. 50 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 بالای 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 2-3 ثانیه مخلوط نمایید. بهتر است این عمل برای هر لوله 3 بار انجام شود. ($3 \times 2-3$ ثانیه)

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

E. 5 دقیقه در دمای اتاق آنکوبه گردد.

dr.bakhtiari.academy

Vitamin B12 (ELISA)

روش تعیین آنکوباسیون

آماده سازی قبل از انجام تست

۱) گستره یک ساعت قبل از شروع تست، کیت را در دمای اتاق قرار دهید (20-27 °C). قبل از شروع تست نمونه ها را به دمای اتاق باز کنید تا به دمای اتاق باز گردند و سپس در دمای اتاق قرار دهید.

۲) **محلول تست**: هفت آماده سازی محلول تست شامل محلول های زیر را با آب مقطر به حجم کل 1000 µl (تست 1 به 49) و آب مقطر آماده کنید. محلول های 100 و 200 µl در دمای اتاق قرار دهید. اگر قبل از آماده سازی محلول تست به دمای اتاق باز گردند، آن ها را به دمای اتاق باز کنید.

۳) **Stabilizing Agent Releasing Agent**: هفت آماده سازی محلول (به نسبت 1 به 39) به دمای اتاق باز کنید. برای مگن مایکس (Stabilizing Agent) 1000 µl و Releasing Agent 3900 µl را به دمای اتاق باز کنید.

۴) **آماده سازی نمونه های بیمارانی، استاندارد و کنترل**: هفت آماده سازی به اطلاعات جدول در پشت این برگه، توجه فرمایید.

تست:

- ازم به یک تست که کیت فوق یک مرحله ششگانه بعد از اضافه کردن کواچک دارد و بعد از انجام تمامی آنکوباسیون بیرون نیاور به ششگانه ندارد.
- نمونه ها طبق 5-2 در دمای اتاق قرار می گیرند و هفت نگهداری طولانی که باید در 20- درجه نگهداری شوند.
- نمونه مورد آزمایش را باید به دور از نور و حرارت نگهداری نمایند.

مستند مرجع	pg/ml
سیراتین	1300 - 160
پساکین	835 - 200
60 سال د پساکن	800 - 110

روش انجام تست

۱) هر کدام از اجزاء های کیت را طبق جدول در دمای اتاق قرار دهید. در دمای اتاق، یک آنکوباسیون انجام دهید.

۲) ابتدا از نمونه، کواچک و کواچک آلوده و واکنش شده را در داخل واکنش ها بویارید.

۳) ابتدا از محلول کواچک بیرون 12 Vitamin B12 را به همه واکنش ها اضافه کنید.

۴) واکنش را برای 20 تا 30 ثانیه به آرامی روی سطح میز Stabilizing Agent در دمای اتاق قرار دهید. محلول های 100 و 200 µl در دمای اتاق قرار دهید. اگر قبل از آماده سازی محلول تست به دمای اتاق باز گردند، آن ها را به دمای اتاق باز کنید.

۵) واکنش را به مدت 45 دقیقه در دمای اتاق آنکوبه کنید.

۶) ابتدا از محلول کواچک بیرون 12 Vitamin B12 را به همه واکنش ها اضافه کنید.

۷) آنکوباسیون محلول های داخل واکنش ها را به آرامی روی سطح میز Stabilizing Agent در دمای اتاق قرار دهید. محلول های 100 و 200 µl در دمای اتاق قرار دهید. اگر قبل از آماده سازی محلول تست به دمای اتاق باز گردند، آن ها را به دمای اتاق باز کنید.

۸) واکنش را به مدت 30 دقیقه در دمای اتاق آنکوبه کنید.

۹) محلول های داخل واکنش ها را به آرامی روی سطح میز Stabilizing Agent در دمای اتاق قرار دهید.

۱۰) میکروپلکس از محلول ششگانه فوق شده را به همه واکنش ها اضافه کنید و سپس نتیجه آنکوبه را عمل فوق برای 3 مرحله انجام دهید.


۱۱) میکروپلکس از محلول میکروپلکس را به همه واکنش ها اضافه کنید. (نمونه های 100 و 200 µl در دمای اتاق قرار دهید. اگر قبل از آماده سازی محلول تست به دمای اتاق باز گردند، آن ها را به دمای اتاق باز کنید.)

۱۲) واکنش را به مدت 20 دقیقه در دمای اتاق آنکوبه کنید.

۱۳) میکروپلکس از محلول STOP در دمای اتاق قرار دهید. واکنش ها را برای 20 تا 30 ثانیه به آرامی روی سطح میز Stabilizing Agent در دمای اتاق قرار دهید.

۱۴) واکنش را در دمای اتاق قرار دهید. (به جدول مستند مرجع 450 µl) بویارید. فواصل نمونه ها باید مطابق 30 دقیقه پس از آنکوباسیون محلول STOP باشد.


dr.bakhtiari.academy



Monobind, Inc.

Vitamin B12 (ELISA)

شریک تشخیص آزمایشگاهی
سامان تهریز 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 چلندین بار سر و ته نمایید تا به خوبی مخلوط گردند.

(2) **مخلوط شستشو:** جهت آماده سازی مخلوط شستشو محتویات یک ویال (20 ml) را با آب مقطر (رقیق نموده تا حجم کلی 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 بن 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 کلی 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 بیمارانی، 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 کوئوگه دارد و بعد از اتمام زمان آنکوآسیوم بیوتین، نیاز به شستشو ندارد
- نمونه ها فقط 5 روز در 2-8 درجه پایداری 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

مخلوط مرجع	pg/ml
نوزلن	1300 - 160
بالغین	835 - 200
60 سل > بالغین	800 - 110

روش انجام تست

- هر کدام از لوله های اکسترکشن شده را قبل از اسمبل کردن داخل هاک های الیزا، در همان لحظه، یک ثانیه ورتکس نمایید.
- 50 لانداز از نمونه، کالیبراتور و کنترل آماده شده و ورتکس شده را در داخل هاک ها بریزید.
- 50 لانداز از مخلوط کوئوگه بیوتین Vitamin B-12 را به همه هاک ها اضافه کنید.
- پلیت را برای 20 تا 30 ثانیه به آرامی روی سطح میز Shake دهید تا محتویات هاک مخلوط شود سپس سطح هاک ها را با چسب پلیت بپوشانید تا در مین آنکوآسیوم محتویات داخل هاک ها تبخیر نگردد.
- پلیت را به مدت 45 دقیقه در دمای اتاق انکوبه نمایید.
- 50 لانداز از مخلوط آنزیم کوئوگه Vitamin B-12 را روی مخلوط های قبل به همه هاک ها اضافه نمایید.
- پلیت را برای 20 تا 30 ثانیه به آرامی روی سطح میز Shake دهید تا محتویات هاک مخلوط شود سپس سطح هاک ها را با چسب پلیت بپوشانید تا در مین آنکوآسیوم محتویات داخل هاک ها تبخیر نگردد.
- پلیت را به مدت 30 دقیقه در دمای اتاق انکوبه نمایید.
- محتویات داخل پلیت را تخلیه نمایید.
- 350 میکرولیتر از مخلوط شستشوی (رقیق شده را به همه هاک ها اضافه نموده و سپس تخلیه نمایید. عمل فوق باید 3 مرتبه انجام پذیرد.
- 100 میکرولیتر از مخلوط سوپستر را به همه هاک ها اضافه نمایید. (توجه: Shake) نمودن پلیت در این مرحله جداً خودداری فرمایید.
- پلیت را به مدت 20 دقیقه در دمای اتاق و در محیط تاریک انکوبه نمایید.
- 50 میکرولیتر از مخلوط Stop را به همه هاک 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)
- پلیت را در طول موج 450 nm (با طول موج فرانس 630 nm) بفولاند. قرالت نمونه ها باید حداکثر تا 30 دقیقه پس از افزودن مخلوط Stop صورت پذیرد.

خواندن در طول موج 450 نانومتر

مخلوط Stop 50µl

سوستر 100µl

350µl شستشو 3 بار

آنزیم کوئوگه 50µl محلول


بیوتین 50µl محلول


50µl نمونه و کالیبراتور آماده

45 دقیقه دمای اتاق

30 دقیقه دمای اتاق

20 دقیقه دمای اتاق و تاریکی






Monobind, Inc.

Vitamin B12 (ELISA)

شریک تشخیص آزمایشگاهی
سامان تهریز نور



روش انجام تست

(1) هر کدام از لوله های اکسترکشن شده را قبل از اسمبل کردن داخل هاک های الیزا، در همان لحظه، یک ثانیه ورتکس نمایید.

(2) 50 لانداز از نمونه، کالیبراتور و کنترل آماده شده و ورتکس شده را در داخل هاک ها بریزید.

(3) 50 لانداز از مخلوط کوئوگه بیوتین Vitamin B-12 را به همه هاک ها اضافه کنید.

(4) پلیت را برای 20 تا 30 ثانیه به آرامی روی سطح میز Shake دهید تا محتویات هاک مخلوط شود سپس سطح هاک ها را با چسب پلیت بپوشانید تا در مین آنکوآسیوم محتویات داخل هاک ها تبخیر نگردد.

(5) پلیت را به مدت 45 دقیقه در دمای اتاق انکوبه نمایید.

(6) 50 لانداز از مخلوط آنزیم کوئوگه Vitamin B-12 را روی مخلوط های قبل به همه هاک ها اضافه نمایید.

(7) پلیت را برای 20 تا 30 ثانیه به آرامی روی سطح میز Shake دهید تا محتویات هاک مخلوط شود سپس سطح هاک ها را با چسب پلیت بپوشانید تا در مین آنکوآسیوم محتویات داخل هاک ها تبخیر نگردد.

(8) پلیت را به مدت 30 دقیقه در دمای اتاق انکوبه نمایید.

(9) محتویات داخل پلیت را تخلیه نمایید.

(10) 350 میکرولیتر از مخلوط شستشوی (رقیق شده را به همه هاک ها اضافه نموده و سپس تخلیه نمایید. عمل فوق باید 3 مرتبه انجام پذیرد.

(11) 100 میکرولیتر از مخلوط سوپستر را به همه هاک ها اضافه نمایید. (توجه: Shake) نمودن پلیت در این مرحله جداً خودداری فرمایید.

(12) پلیت را به مدت 20 دقیقه در دمای اتاق و در محیط تاریک انکوبه نمایید.

(13) 50 میکرولیتر از مخلوط Stop را به همه هاک 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) بفولاند. قرالت نمونه ها باید حداکثر تا 30 دقیقه پس از افزودن مخلوط Stop صورت پذیرد.

روش انجام تست

- هر کدام از لوله های اکسترکشن شده را قبل از اسمبل کردن داخل هاک های الیزا، در همان لحظه، یک ثانیه ورتکس نمایید.
- 50 لانداز از نمونه، کالیبراتور و کنترل آماده شده و ورتکس شده را در داخل هاک ها بریزید.
- 50 لانداز از مخلوط کوئوگه بیوتین Vitamin B-12 را به همه هاک ها اضافه کنید.
- پلیت را برای 20 تا 30 ثانیه به آرامی روی سطح میز Shake دهید تا محتویات هاک مخلوط شود سپس سطح هاک ها را با چسب پلیت بپوشانید تا در مین آنکوآسیوم محتویات داخل هاک ها تبخیر نگردد.
- پلیت را به مدت 45 دقیقه در دمای اتاق انکوبه نمایید.
- 50 لانداز از مخلوط آنزیم کوئوگه Vitamin B-12 را روی مخلوط های قبل به همه هاک ها اضافه نمایید.
- پلیت را برای 20 تا 30 ثانیه به آرامی روی سطح میز Shake دهید تا محتویات هاک مخلوط شود سپس سطح هاک ها را با چسب پلیت بپوشانید تا در مین آنکوآسیوم محتویات داخل هاک ها تبخیر نگردد.
- پلیت را به مدت 30 دقیقه در دمای اتاق انکوبه نمایید.
- محتویات داخل پلیت را تخلیه نمایید.
- 350 میکرولیتر از مخلوط شستشوی (رقیق شده را به همه هاک ها اضافه نموده و سپس تخلیه نمایید. عمل فوق باید 3 مرتبه انجام پذیرد.
- 100 میکرولیتر از مخلوط سوپستر را به همه هاک ها اضافه نمایید. (توجه: Shake) نمودن پلیت در این مرحله جداً خودداری فرمایید.
- پلیت را به مدت 20 دقیقه در دمای اتاق و در محیط تاریک انکوبه نمایید.
- 50 میکرولیتر از مخلوط Stop را به همه هاک 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)
- پلیت را در طول موج 450 nm (با طول موج فرانس 630 nm) بفولاند. قرالت نمونه ها باید حداکثر تا 30 دقیقه پس از افزودن مخلوط Stop صورت پذیرد.

خواندن در طول موج 450 نانومتر

مخلوط Stop 50µl

سوستر 100µl

350µl شستشو 3 بار

آنزیم کوئوگه 50µl محلول


بیوتین 50µl محلول

50µl نمونه و کالیبراتور آماده

45 دقیقه دمای اتاق

30 دقیقه دمای اتاق

20 دقیقه دمای اتاق و تاریکی



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 Akin,
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 ρ (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^a

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

^aSymptoms 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 Nexø, 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

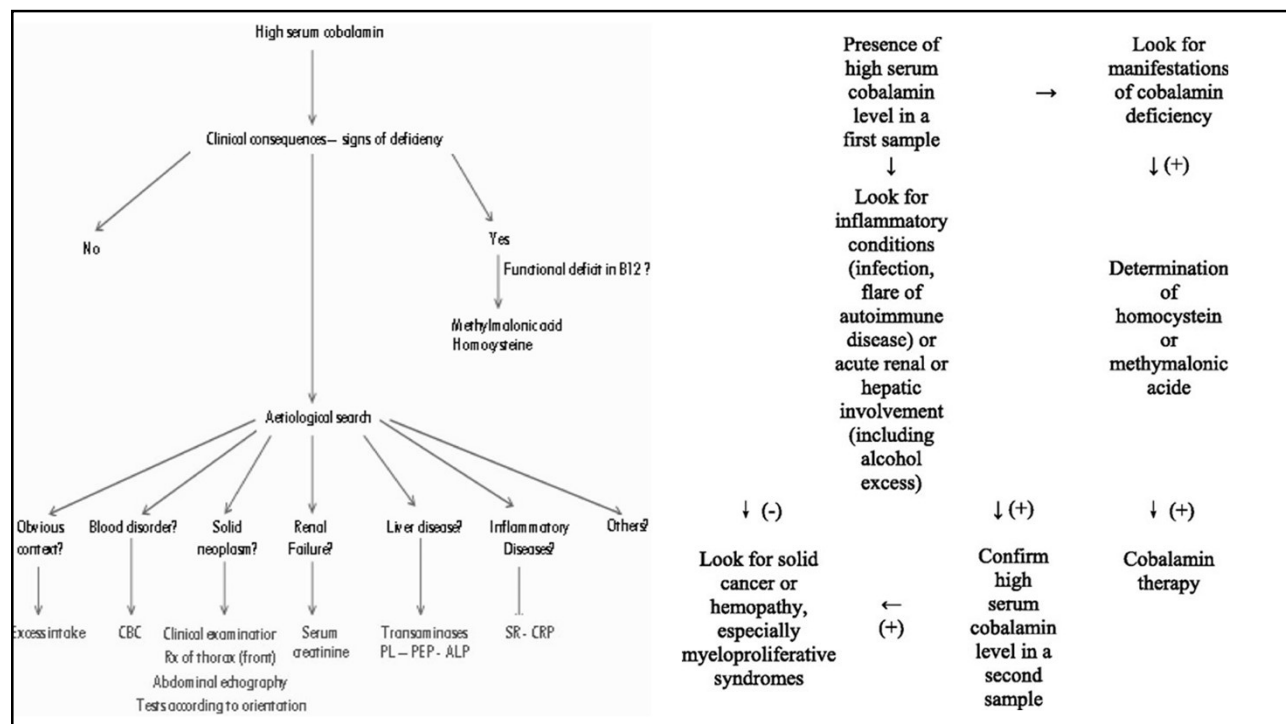
Case 2: 51 y/o Vegetarian Woman

› 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



dr.bakhtiari.academy