

BIOHIT HealthCare

Innovating for Health



BIOHIT ACTIVE B12
(HOLOTRANSCOBALAMIN)
KÄYTTÖOHJEET

REF 602 290

IVD

CE

For *in vitro* diagnostic use
Store at 2-8 °C Upon Receipt

Biohit Oyj Laippatie 1, FI-00880 Helsinki, Finland
Tel. +358 9 773 861, info@biohit.fi, www.biohithealthcare.com

1. KÄYTTÖTARKOITUS.....	4
2. JOHDANTO.....	4
3. TESTIN PERIAATE.....	4
4. VAROITUKSET JA VAROTOIMENPITEET.....	5
5. KITIN KOMPONENTIT.....	6
5.1 Konjugaattiliuos.....	6
5.2 Substraattiliuos.....	6
5.3 Pysäytysliuos.....	6
5.4 Konsentroitunut pesupuskuri.....	7
5.5 Mikrotiiterilevy.....	7
5.6 0-näyteliuos.....	7
5.7 Kalibraattorit.....	7
5.8 Kontrollit.....	7
5.9 Esikäsittelyliuos.....	7
5.10 Käyttöohje.....	7
6. TARVITTAVAT MATERIAALIT/LAITTEET, JOTKA EIVÄT TULE PAKKAUKSEN MUKANA.....	7
7. STANDARDISOINTI.....	8
8. SÄILYTTÄMINEN JA SÄILYVYYS.....	8
8.1 Avatun (käytössä olevan) kitin säilyvyys.....	8
8.2 Avaamattoman kitin säilyvyys.....	8
8.3 Käsittelyä ja menetelmää koskevia huomautuksia.....	8
8.4 Hajoamisen merkit.....	8
9. NÄYTTEEN OTTAMINEN JA SÄILYTTÄMINEN.....	9
10. TESTIMENETELMÄ.....	9
10.1 Valmistelu.....	9
10.2 Testin suorittaminen.....	10
11. TULOKSET.....	10
11.1 Tulosten laskenta ja tulkinta.....	10
11.2 Laadunvalvonta.....	11
11.3 Odotetut arvot.....	12
12. SUORITUSKYKYTIETOJA.....	12
12.1 Laimennuksen lineaarisuus.....	12
12.2 Tarkkuus.....	12

12.3 Toistettavuus	13
12.4 Taustan raja-arvo.....	14
12.5 Toteamisraja	15
12.6 Määritysraja	15
12.7 Suuren pitoisuuden vääristymä (hook effect)	15
12.8 Ristireaktiot	15
12.9 Häiritsevät tekijät	15
13. TAKUU	16
14. TILAUSINFORMAATIO	16
15. JULKAISUPÄIVÄ	16
16. KIRJALLISUUS.....	17

1. KÄYTTÖTARKOITUS

BIOHIT Active B12 (Holo-transkobalamin) -vitamiinittesti on entsyymi-immunomääritys (EIA) holotranskobalamiinin (HoloTC) kvantitatiiviseen mittaamiseen ihmisen seerumista. HoloTC:tä (transkobalamiiniin sitoutunutta B12-vitamiinia) käytetään apuna B12-vitamiinipuutoksen diagnosoinnissa ja hoidossa.

2. JOHDANTO

B12-vitamiinia kuljettaa elimistössä kolme sitojaproteiinia – sisäinen tekijä (IF), transkobalamiini (TC) ja haptokorriini (HC). Nämä sitojaproteiinit varmistavat ruokavaliosta saatavan B12-vitamiinin tehokkaan imeytymisen. Kun transkobalamiini (TC) ja haptokorriini (HC) sitovat B12-vitamiinia, muodostuneita komplekseja kutsutaan holotranskobalamiiniksi (HoloTC) ja holohaptokorriiniksi (HoloHC). Näin ne voidaan erottaa proteiineista, jotka eivät kuljeta vitamiinia.

Suurin osa, 70–90 %:a verenkierron B12-vitamiinista on HoloHC muodossa, mutta se on biologisesti inaktiivinen. HoloTC edustaa vain 10–30 %:a verenkierrossa kiertävästä B12-vitamiinista, mutta se on ainoa B12-vitamiinin muoto, jota elimistön solut voivat hyödyntää. Vain HoloTC otetaan soluihin reseptorivälitteisen mekanismin avulla. Tämä prosessi kuljettaa B12-vitamiinia elimistön soluihin, joissa se toimii koentsyyminä solun tärkeissä toiminnoissa, kuten DNA-synteesissä. Koska HoloTC:n puoliintumisaika verenkierrossa on lyhyempi kuin HoloHC:n, B12-vitamiinipuutos tulee esiin ensimmäiseksi hyvin todennäköisesti HoloTC-pitoisuuden laskuna¹.

Seerumin B12-vitamiinin kokonaispitoisuuden (HoloTC+HoloHC) mittaamisessa on huomioitava, että suurin osa mitatusta kobalamiinista on sitoutunut biologisesti reagoimattomaan HC:hen. On julkaistu useita tutkimuksia, joiden mukaan HoloTC on parempi B12-vitamiinin tilan indikaattori kuin seerumin B12-vitamiinin kokonaispitoisuus^{2,3}. Odotusten mukaisesti HoloTC-pitoisuus on pieni potilailla, joilla havaitaan muita biokemiallisia merkkejä B12-vitamiinin puutoksesta⁴.

Matalia arvoja on raportoitu kasvissyöjillä⁵, vegaaneilla⁶ ja muilla ryhmillä, jotka saavat ravinnosta vain vähäisiä määriä B12-vitamiinia⁷. Erityisesti Alzheimerin tautia sairastavilla potilailla on todettu matalia HoloTC-pitoisuuksia, mutta ei matalia seerumin B12-vitamiinin kokonaispitoisuuksia verrattuna terveen verrokkiryhmän pitoisuuksiin⁸. HoloTC-pitoisuudet heijastavat B12-vitamiinin tilaa huolimatta vitamiinin viimeaikaisesta imeytymisestä⁹.



3. TESTIN PERIAATE

Mikrotiitterilevyn kuopat on päällystetty spesifisellä monoklonaalisella aktiivisen B12-vitamiinin (holotranskobalamiini) vasta-aineella. Ensimmäisen inkubaation aikana näytteen holotranskobalamiini sitoutuu mikrotiitterilevyn pinnan vasta-aineeseen. Toisen inkubaation aikana konjugaatti sitoutuu kiinni jääneeseen holotranskobalamiiniin. Tämän jälkeen kuopat pestään sitoutumattoman näytteen poistamiseksi. Sitten kuoppiin lisätään substraatiuuos, joka reagoi konjugaatin fosfataasin kanssa muodostaen keltaisen värin. Pysäytysliuoksen lisääminen lopettaa reaktion. Syntyvä väri on suoraan verrannollinen näytteen holotranskobalamiinin pitoisuuteen pmol/L, joten pitoisuus voidaan arvioida kalibraatiokäyrältä.

4. VAROITUKSET JA VAROTOIMENPITEET

Vain *in vitro*-diagnostiikkaan. Varotoimenpiteet:

1. Noudata testipaketin ohjeita tarkasti, erityisesti käsittely- ja säilytysohjeita.
2. Pipetointi suulla on kielletty.
3. Tupakointi, syöminen, juominen ja meikkaus on kielletty tiloissa, joissa käsitellään testipakettia tai näytteitä.
4. Viillot, hiertymät ja muut mahdolliset ihovauriot tulee suojata sopivalla tavalla.
5. Kalibraattorit, kontrollit, konjugaatti, esikäsitelyliuos ja pesupuskuriliuoskonsentraatti sisältävät natriumatsidia, joka voi reagoida lyijy- tai kupariputkien kanssa ja muodostaa erittäin räjähdysalttiita metalliatsideja. Hävityksen yhteydessä atsidien kerääntyminen on estettävä huuhtelemalla aineet viemäriin suuren vesimäärän kera.
6. Pysäytysliuos sisältää natriumhydroksidia. Kemikaalin joutumista iholle, silmiin ja limakalvoille on varottava. Jos kemikaalia läikkyi, läikkeitä on pyyhittävä pois käyttäen runsaasti vettä. Roiskeet iholta tai silmiltä on huuhdeltava välittömästi vedellä ja mentävä lääkäriin.
7. Tämän testipaketin sisältämällä kaikilla vaarallisilla komponenteilla on käyttöturvallisuustiedotteet, jotka ovat saatavilla pyynnöstä Biohit Oyj:ltä.
8. Tämä tuote vaatii ihmis- ja eläinperäisten näytteiden ja materiaalien käsittelyä. Kaikkia ihmis- ja eläinperäisiin materiaaleihin tulee suhtautua kuin ne olisivat tartuntavaarallisia ja käsitellä OSHA-standardin "Blood borne Pathogens Biosafety Level 2" mukaisesti, tai käytettävä muita asianmukaisia bioturvallisuuskäytäntöjä materiaaleille, jotka sisältävät tai joiden epäillään sisältävän tartuntavaarallisia aineita.

 SYÖVYTTÄVÄ	Pysäytys - liuos	H314 P264 P280 P305+351 +338	Voimakkaasti ihoa syövyttävää ja silmiä vaurioittavaa. Pese kädet huolellisesti käsittelyn jälkeen. Käytä suojakäsineitä/suojavaatetusta/silmiensuojainta/kasvonsuojainta. JOS KEMIKAALIA JOUTUU SILMIIN: Huuhto huolellisesti vedellä usean minuutin ajan. Poista piilolinssit, jos sen voi tehdä helposti. Jatkahuuhtomista.
 HAITALLINEN	Subst- raatti	H302+312 +332 P260 P271 P280 P301+310 P304+340 P312	Haitallista nieltynä, joutuessaan iholle tai hengitettynä. Älä hengitä pölyä/savua/kaasua/sumua/höyryä/suihketta. Käytä ainoastaan ulkona tai tiloissa, joissa on hyvä ilmanvaihto. Käytä suojakäsineitä/suojavaatetusta/silmiensuojainta/kasvonsuojainta. JOS KEMIKAALIA ON NIELTY: Ota välittömästi yhteys MYRKYTYSTIETOKESKUKSEEN tai lääkäriin. JOS KEMIKAALIA ON HENGITETTY: Siirrä henkilö raittiiseen ilmaan ja pidä lepoasennossa, jossa on helppo hengittää. Ota yhteys MYRKYTYSTIETOKESKUKSEEN tai lääkäriin, jos ilmenee pahoinvointia.
	Konsen- troitu pesupus- kuri (8x)	H302 H412 EUH032 P264 P270 P273 P301+310 P330	Haitallista nieltynä. Haitallista vesieliöille, pitkäaikaisia haittavaikutuksia. Kehittää erittäin myrkyllistä kaasua hapon kanssa. Pese kädet huolellisesti käsittelyn jälkeen. Syöminen, juominen ja tupakointi kielletty kemikaalia käytettäessä. Vältettävä päästämistä ympäristöön. JOS KEMIKAALIA ON NIELTY: Ota välittömästi yhteys MYRKYTYSTIETOKESKUKSEEN tai lääkäriin. Huuhto suu.

5. KITIN KOMPONENTIT

5.1 Konjugaattiliuos **CONJ**

Yksi 15 ml:n pullo alkalisella fosfataasilla leimattua rotan monoklonaalista vasta-ainetta ihmisen transkobalamiinille Tris-puskuriliuoksessa, jossa on proteiinin stabilisaattoria. Säilytysaine: < 0,1 % (w/v) natriumatsidi. Käyttövalmis.

5.2 Substraattiliuos **SUBS**

Yksi 15 ml:n pullo para-nitrofenyylifosfaattia (pNPP), puskuriliuos. Käyttövalmis. Säilytettävä valolta suojattuna. HUOMIO: HAITALLISTA.

5.3 Pysäytysliuos **STOP**

Yksi 15 ml:n pullo natriumhydroksidia (1 M), (pH > 10).
Käyttövalmis. HUOMIO: SYÖVYTTÄVÄÄ.

5.4 Konsentroidu pesupuskuri

WASH 8x



Kaksi 25 ml:n pulloa fosfaattipuskuria. Säilytysaine: 0,72 % (w/v) natriumatsidia.
Laimennettava ennen käyttöä. HUOMIO: HAITALLISTA.

5.5 Mikroitiiterilevy

12 x 8 kuopallista mikroitiiteriliuskaa (irrotettavia), jotka on päällystetty rotan monoklonalisella antiholotranskobalamiinin vasta-aineella, uudelleensuljettavassa foliopussissa, jossa on kuivausainetta.

5.6 0-näyteliuos

BLANK



Yksi 1 ml:n pullo fosfaattipuskuriliuosta sisältäen nautaperäisen proteiinistabilisaattorin. Säilytettävä valolta suojattuna.

5.7 Kalibraattorit

CAL 1-5



Viisi 1 ml:n pulloa HoloTC:tä fosfaattipuskuriliuoksessa, jotka sisältävät proteiinistabilisaattorin (nautaperäinen).
Säilytysaine: < 0,1 % (w/v) natriumatsidia. Käyttövalmis. Säilytettävä valolta suojattuna.
KATSO PITOISUUDET PULLOJEN ETIKETEISTÄ.

5.8 Kontrollit

CONTROL LOW CONTROL HIGH



Yksi pullo matalan pitoisuuden kontrolliliuosta ja yksi pullo korkean pitoisuuden kontrolliliuosta: 1 ml HoloTC:tä fosfaattipuskuriliuoksessa, jossa on nautaperäistä proteiinistabilisaattoria. Säilytysaine: < 0,1 % (w/v) natriumatsidi.
Käyttövalmis. Säilytettävä valolta suojattuna.

5.9 Esikäsitteilyliuos

PRE

Yksi 25 ml:n pullo sitraattipuskuria. Säilytysaine: <0,1 % (w/v) natriumatsidia. Käyttövalmis.

5.10 Käyttöohje

6. TARVITTAVAT MATERIAALIT/LAITTEET, JOTKA EIVÄT TULE PAKKAUKSEN MUKANA

1. 96-kuoppalevyn/liuskan lukija, jossa on 405 nm:n suodatin.
2. Tarkkuuspiipetit, joilla voi annostella 100 µl. 8-kanavainen annostelupipetti tai vastaava noin 250–300 µl:n annosteluun manuaalista pesua varten.

3. Lasinen/muovinen mitta-astia 1 x 200 ml.
4. Tislattua/deionisoitua vettä.
5. Paperipyyhkeitä.
6. Ajastin 30, 35 ja 60 minuutin väliajoille.

7. STANDARDISOINTI

Tällä hetkellä aktiiviselle B12-vitamiinimääritykselle ei ole olemassa kansainvälisesti tunnustettua standardisoinnin viitemenetelmää tai viitemateriaalia. Kalibraattorit ovat jäljitettävissä sisäisiin standardeihin, joiden pitoisuus on määritetty kertaluontoisesti.

8. SÄILYTTÄMINEN JA SÄILYVYYS

8.1 Avatun (käytössä olevan) kitin säilyvyys

Testipaketin säilyvyystutkimus osoitti, että paketin avaus ja käyttö kolme kertaa kolmen kuukauden aikana ei aiheuttanut suorituskyvyn heikkenemistä. Käytön jälkeen komponentit on palautettava säilytyslämpötilaan 2–8 °C.

8.2 Avaamattoman kitin säilyvyys

Avaamattomat komponentit säilyvät 2–8 °C lämpötilassa etiketin ohjeiden mukaisesti.

8.3 Käsittelyä ja menetelmää koskevia huomautuksia

1. Säilytä testipaketin osat 2–8 °C lämpötilassa. Testipakettia voi käyttää etiketeissä mainittuun viimeiseen käyttöpäivämäärään asti. Vanhentuneita reagensseja ei saa käyttää.
2. Älä käytä reagensseja tai kalibraattoreita ristiin eri erien välillä. Jokainen reagenssi- ja kalibraattorierä on erikseen optimoitu tuottamaan oikean reaktion.
3. Kalibraattoripitoisuudet näkyvät pullojen etiketeissä ja voivat vaihdella erästä toiseen.
4. Kittejä ei saa jäädyttää.
5. Konsentroidu pesupuskuri on laimennettava ennen käyttöä. Kaikki muut reagenssit ovat käyttövalmiita.
6. Laimennettu pesupuskuri säilyy vähintään kolmen kuukauden ajan, jos mikrobikontaminaatiolta vältytään. Palautettava 2–8 °C säilytyslämpötilaan käytön jälkeen.
7. Ylimääräiset (käyttämättömät) mikrotiiteriliuskat on asetettava takaisin foliopussiin kuivausaineen kanssa. Varmista, että sinetti on suljettu ja palauta säilytyslämpötilaan 2–8 °C seuraavaa käyttöä varten.
8. Suojaa kalibraattorit, kontrollit tai substraatti valolta säilytyksen aikana.
9. Vältä reagenssien kontaminoitumista. Käytä uutta kertakäyttöistä pipetin kärkeä jokaista reagenssin tai näytteen pipetointia varten.

8.4 Hajoamisen merkit

Substraatin tulee olla väritöntä tai hyvin heikosti keltaista. Tummempi keltainen väri on kontaminaation merkki ja tällöin reagenssi on hävitettävä. Minkä tahansa komponentin sameus tai sakkautuminen on hajoamisen merkki ja komponentti on hävitettävä.

9. NÄYTTEEN OTTAMINEN JA SÄILYTTÄMINEN

1. Määritys suositellaan tehtäväksi ihmisen seeruminäytteistä (mukaan lukien seerumin erotusputkeen otetut näytteet).
2. Älä käytä voimakkaasti hemolysoituneita tai sameita näytteitä.
3. Sekoita sulatetut näytteet perusteellisesti ennen määritystä ja vältä toistuvaa jäädyttämistä ja sulattamista.
4. Näytteet voidaan pakastaa ja sulattaa 3 kertaa. Jäädetyttyjä näytteitä on sentrifugoitava nopeudella $\geq 10\,000$ g viiden minuutin ajan ennen määritystä.
5. On-the clot- ja Off-the clot -näytteitä ei saa altistaa huonelämpötilaa korkeammalle lämpötilalle pidempään kuin seuraavaan päivään (≤ 16 tuntia).
6. On-the clot -näytteitä voidaan säilyttää 2–8 °C lämpötilassa kolme vuorokautta ja Off-the clot -näytteitä neljä viikkoa. Pidempiaikaista säilytystä varten näytteitä on säilytettävä Off-the-clot –20 °C lämpötilassa enintään kuusi kuukautta.
7. Näytteet on esivalmisteltava ennen määritystä sekoittamalla sama määrä esikäsittelyliuosta ja näytettä keskenään, kuten 150 μ l näytettä plus 150 μ l esikäsittelyliuosta. Esikäsiteltyjä näytteitä voidaan säilyttää korkilla suljettuina enintään 24 tuntia 2–8 °C lämpötilassa ennen määritystä.

10. TESTIMENETELMÄ

10.1 Valmistelu

Määrityksen valmistelu

Ota kaikki kitin komponentit mikrotiitterilevyn liuskat mukaan lukien lämpenemään 18–25 °C:n lämpötilaan 30–60 minuuttia ennen käyttöä. Sekoita reagenssit kääntämällä niitä varovasti ylösalaisin.

Kun pesupuskuria säilytetään 2–8 °C lämpötilassa, se saostuu (kiteitä voi näkyä). Ennen vedellä tehtävää laimennusta pesupuskurin on annettava lämmitä (voidaan asettaa inkubaattoriin 37 °C:seen tarvittaessa, jos prosessia halutaan nopeuttaa), kunnes saostumia **EI** näy paljaalla silmällä.

Laimenna seuraava reagenssi ja sekoita perusteellisesti:

Reagenssi	Tilavuus	Lisää
Konsentroidu pesupuskuri x 8	1 pullo	175 ml tislattua/deionisoitua vettä

Laske, kuinka monta mikrotiitterilevyn liuskaa tarvitaan määritykseen ja pidä nämä mikrotiitteriliuskoille tarkoitettussa kehyksessä. Palauta ylimääräiset liuskat uudelleensuljettavaan foliopussiin, jossa on kuivausainetta, ja säilytä ne 2–8 °C lämpötilassa seuraavaa käyttökertaa varten. Varmista, että kaikki liuskat ovat tukevasti kiinni mikrotiitteriliuskoille tarkoitettussa kehyksessä. Voi olla hyödyllistä numeroida jokaisen liuskan yläreuna helpottamaan tunnistamista. Säilytä mikrotiitteriliuskoille tarkoitettu kehys myöhempää käyttöä varten. Näytteet on valmisteltava ennen määritystä sekoittamalla sama määrä esikäsittelyliuosta ja näytettä keskenään, kuten esimerkiksi 150 μ l näytettä ja 150 μ l esikäsittelyliuosta. Esikäsiteltyjä näytteitä voidaan säilyttää korkilla suljettuina enintään 24 tuntia 2–8 °C lämpötilassa ennen määritystä.

10.2 Testin suorittaminen

1. Merkitse muistiin kuoppien tunnuks.
2. Pipetoi 100 µl kalibraattoreita kahtena rinnakkaisena, testikitin kontrollit kahtena rinnakkaisena ja esikäsitellyt (50:50) potilasnäytteet kahtena rinnakkaisena asianmukaisesti kuoppiin. Muista vaihtaa pipetinkärkiä lisäysten välillä. Tämän vaiheen pitäisi kestää korkeintaan 15 minuuttia.
3. Inkuboi 60 ± 10 minuuttia $18-25$ °C lämpötilassa.
4. Kaada kuoppien sisältö pois kääntämällä ne nopeasti ylösalaisin biologisten materiaalien hävittämiseen soveltuvan kaatoaltaan yläpuolella, pitäen mielessä, että näytteet ovat mahdollisesti tartuntavaarallisia. Taputtele ylösalaisin olevia liuskoja hyvin paperipyyhkeitä vasten. **Ei saa pestä.**
5. Lisää 100 µl konjugaattia kuhunkin kuoppaan.
6. Inkuboi 35 ± 5 minuuttia $18-25$ °C lämpötilassa.
7. Kaada kuoppien sisältö pois kääntämällä ne nopeasti ylösalaisin biologisten materiaalien hävittämiseen soveltuvan kaatoaltaan yläpuolella. Taputtele ylösalaisin olevia liuskoja hyvin paperipyyhkeitä vasten.
8. Pese kuopat **viisi kertaa** vähintään 250 µl:lla laimennettua pesupuskuria. **Kaada neste pois ja taputtele liuskoja paperipyyhkeitä vasten jokaisen pesuvaiheen jälkeen.**
9. Lisää 100 µl substraattia kuhunkin kuoppaan.
10. Inkuboi 30 ± 5 minuuttia $18-25$ °C lämpötilassa. **Älä kaada pois.**
11. Lisää 100 µl pysäytysliuosta jokaiseen kuoppaan, samassa järjestyksessä ja samalla nopeudella kuin lisäsit substraatin. Sekoita napauttamalla kuoppia varovasti.
12. Lue liuskat aallonpituudella 405 nm. Lue 120 minuutin sisällä pysäytysliuoksen lisäämisestä.

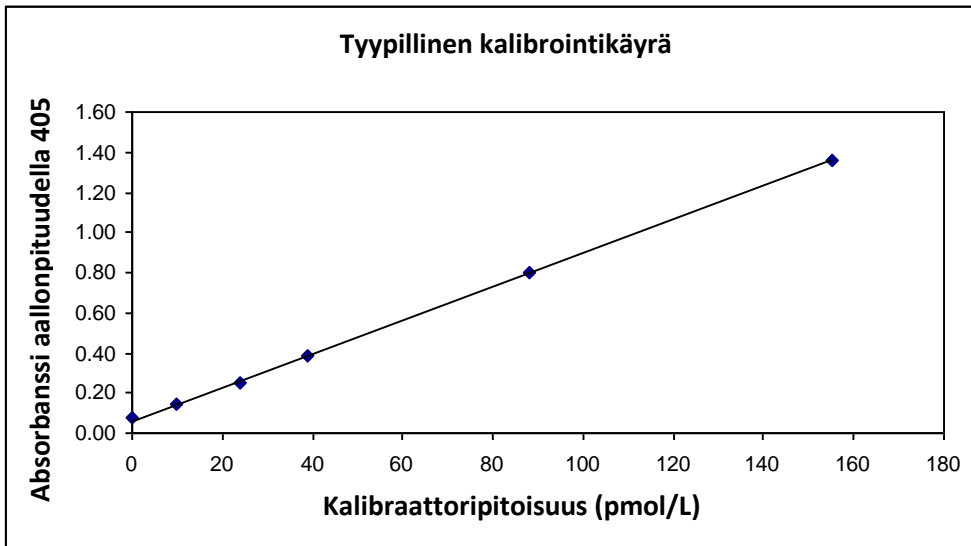
11. TULOKSET

11.1 Tulosten laskenta ja tulkinta

Laske absorbanssien keskiarvo kalibraattoreille, kontrolleille ja potilasnäytteille, jotka on määritetty kaksoiskappalein. Merkitse kalibraattorien keskiarvo kaavioon siten, että absorbanssi-arvon keskiarvo on Y-akselilla ja vastaava pitoisuus yksikkönä pmol/L on X-akselilla. **Kalibraattoripitoisuudet näkyvät pullojen etiketeissä. Pitoisuusarvo määritetään kalibraattorieräkohtaisesti, ja se voi vaihdella eri erien välillä.**

Kunkin näytteen pitoisuus (pmol/L) voidaan laskea hakemalla käyrältä piste, joka vastaa näytteen absorbanssin keskiarvoa, ja katsomalla vastaava pitoisuus yksikkönä pmol/L X-akselilta. Tämä toimenpide voidaan suorittaa käsin käyttämällä kaaviopaperia tai levynlukijaa ohjelmistoavusteisilla käyränsovitustoimenpiteillä. Jos käytetään levynlukijaa, jossa on sisäinen ohjelmisto, **on käytettävä lineaarista regressiokäyrän sovitusalgoritmia.**

Seuraavassa on tyypillinen kalibrintikaavio viitteeksi (Kuva 1). Sitä ei saa käyttää tulosten tulkintaan. Näytteet, joiden pitoisuus on yli 128 pmol/L, ovat määrittämisen alueen ulkopuolella, ja ne on rekisteröitävä arvona > 128 pmol/L. Tuloksia ei saa ekstrapoloida. Jos yksittäisten näytteiden replikaattien poikkeama on alle 20 %, määrittäminen voidaan katsoa hyväksyttäväksi.



Kuva 1. BIOHIT Active B12 (Holotranscobalamin) -vitamiinitestimäärityksen tyypillinen kalibrointikäyrä.

Mittayksikkö

BIOHIT Active B12 (Holotranscobalamin) -vitamiinitestimäärityksen mittayksikkö on pmol/L.

Mittausväli (raportoitava alue)

Määrityksen mittausväli on 10–128 pmol/L.

11.2 Laadunvalvonta

Varmista, että levynlukija huolletaan ja kalibroidaan asianmukaisesti valmistajan ohjeiden mukaisesti ja että käytetään oikeaa aallonpituutta (405 nm) ja käyränsovitusalgoritmia (lineaarinen regressio).

Käyttäjien on varmistettava, että he tuntevat täysin määrityksen ohjeet, erityisesti kohdan Varoitukset ja varotoimet, ja käsittelyä ja toimenpiteitä koskevat huomautukset. Käyttäjien on osoitettava, että he saavat testituloksia, jotka ovat tarkkuudeltaan ja raportoivalta alueeltaan vertailukelpoisia valmistajan tulosten kanssa, ennen kuin he raportoivat potilaiden testituloksia. Käyttövalmiit matalat ja korkeat kontrollit on ajettava kahtena rinnakkaisena kaikissa näytteissä testimenetelmän laadun seuraamista varten.

Jos valmistajan kuvaamat tarkkuuspesifikaatiot ovat täyttyneet mutta jokin kontrolli ei täytä alla annettuja kontrollin spesifikaatioita, määritys on epäkelvo eikä potilastuloksia saa raportoida. Käyttäjä voi toistaa määrityksen tarkistettuaan menetelmän tai ottaa yhteyttä jälleenmyyjään tai valmistajaan. Jos määritys toistetaan, valmista jokaisesta näytteestä uusi laimennus. Laboratoriot voivat halutessaan lisätä mukaan omia kontrollejaan jokaiseen määritysajoon. Säilytä kontrollimateriaali $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$:n lämpötilassa tai tätä kylmemmässä ja vältä toistuvaa jäädytystä ja sulatusta. Säilöntäaineet, kuten $< 0,1$ -prosenttinen natriumatsidi (w/v), eivät vaikuta näytetuloksiin. Referenssialueet ja asianmukaiset raja-arvot on kaikki laskettava kyseisille populaatioille, joista näytteet koostuvat.

Taulukko 1. Matalien ja korkeiden kontrollien spesifikaatiot.

Kontrollien spesifikaatiot	Matala kontrolli	Korkea kontrolli
Toistojen keskiarvo	15–35 pmol/L	36–84 pmol/L

11.3 Odotetut arvot

135 seeruminäytettä oireettomilta, ilmeisen terveiltä 18–75-vuotiailta luovuttajilta, joista suunnilleen sama määrä oli miehiä [n = 65] ja naisia [n = 70], testattiin BIOHIT Active B12 (Holotranscobalamin) EIA-määrittelyllä. Keskimääräinen BIOHIT Active B12 (Holotranscobalamin) -vitamiinitesti pitoisuus tässä populaatiossa oli 72 pmol/l (vaihteluväli 15–147 pmol/l). Tämän referenssipopulaation tietojen perusteella ehdotetaan seuraavaa referenssialuetta (tuloksista keskimääräiset 95 %):

Referenssialue	21–123 pmol/L
----------------	---------------

Tämä referenssialue on vain ohjeellinen, ja jokaisen laboratorion on asetettava oma referenssialueensa, joka voi olla väestöryhmäkohtainen ja vaihdella maantieteellisten, potilaaseen liittyvien, ruokavalioon liittyvien tai ympäristöön liittyvien tekijöiden tai kliinisen käytännön mukaan.

12. SUORITUSKYKYTIETOJA

Edustava aineisto; tulokset yksittäisissä laboratorioissa saattavat vaihdella.

12.1 Laimennuksen lineaarisuus

Perustuen tutkimukseen, joka suoritettiin CLSI-asiakirjan EP6-A suositusten mukaisesti,¹⁰ BIOHIT Active B12 (Holotranscobalamin) -vitamiinitestin EIA-määrittely osoittautui lineaariseksi välillä 5,3–156,0 pmol/L (pyöristetty yhteen desimaaliin); yksittäisten laboratorioiden tulokset voivat poiketa näistä tiedoista.

12.2 Tarkkuus

Korrelaatiotutkimus tehtiin ilmeisen terveiden aikuisten seeruminäytteistä. Kaikki näytteet analysoitiin BIOHIT Active B12 (Holotranscobalamin) EIA-määrittelyllä ja kaupallisesti saatavalla holotranscobalamiinimäärityksellä CLSI-asiakirjan EP9-A2 mukaisesti¹¹. Näytepitoisuudet vaihtelivat välillä 13,8–112,8 pmol/L. Taulukossa 2 näkyvät saadut seuraavat tilastolliset arvot.

Taulukko 2.

BIOHIT Active B12 (Holotranscobalamin) EIA-määrityksellä verrattuna kaupallisesti saatavilla olevaan määritykseen	
Näytteiden lukumäärä	111
Regressiosuoran kulmakerroin (Passing-Bablok-regressio) (95 % CI)	0,95 (0,89–1,01)
Y-poikkileikkauspiste (Passing-Bablok-regressio) (95 % CI)	8,39 (5,73–11,77)
Korrelaatiokerroin (r) (Pearson) (95 % CI)	0,93 (0,90–0,95)

12.3 Toistettavuus

Seitsemän (7) ihmisen seeruminäytettä analysoitiin käyttämällä kolmea reagenssierää. Kaksi käyttäjää analysoi näytteet kahdeksana rinnakkaisena, kerran vuorokaudessa viiden vuorokauden ajan (yhteensä n=80). Taulukko 3 sisältää yhteenvedon tämän tutkimuksen tiedoista.

Taulukko 3. Sisäisen tarkkuuden tiedot.

Näyte	n	Erä	Käyttäjä	Keskiarvo (pmol/L)	Määrittämissisäinen variaatiokerroin, %	Kokonaisvariaatiokerroin, %
1 A	80	1	1	17.8	7.5%	8.2%
			2	17.5	3.1%	9.3%
		2	1	20.1	6.0%	6.6%
			2	20.3	6.9%	9.2%
		3	1	19.1	5.5%	8.0%
			2	18.9	8.5%	11.0%
2 A	80	1	1	21.8	5.5%	9.9%
			2	21.8	3.9%	7.5%
		2	1	22.6	5.6%	8.7%
			2	23.5	9.0%	10.3%
		3	1	23.9	7.0%	10.2%
			2	23.2	5.8%	8.9%
3 A	80	1	1	28.8	3.8%	7.8%
			2	30.7	4.3%	9.6%
		2	1	31.0	6.8%	8.0%
			2	31.4	4.3%	6.1%
		3	1	31.5	4.5%	6.4%
			2	32.2	4.0%	9.2%
4 A	80	1	1	49.3	3.9%	7.4%
			2	52.6	4.1%	6.7%
		2	1	50.8	5.6%	10.0%
			2	51.7	4.7%	5.9%
		3	1	52.6	4.6%	4.8%
			2	55.0	5.5%	6.1%
5 A	80	1	1	68.4	4.0%	7.6%
			2	73.2	3.7%	7.5%
		2	1	74.8	4.3%	8.2%
			2	75.9	4.6%	6.4%
		3	1	75.1	4.4%	7.9%
			2	76.3	4.9%	6.2%
7 A	80	1	1	115.9	4.2%	5.9%
			2	121.1	3.6%	7.0%
		2	1	123.2	4.3%	10.2%
			2	124.0	4.2%	6.4%
		3	1	127.0	4.8%	10.1%
			2	129.5	3.2%	5.6%
Matala kontrolli	80	1	1	23.7	9.4%	10.9%
			2	23.8	5.1%	11.5%
		2	1	20.0	6.0%	7.5%
			2	18.6	5.8%	8.5%
		3	1	20.3	8.3%	9.7%
			2	20.1	8.3%	10.0%
Korkea kontrolli	80	1	1	61.2	6.3%	6.4%
			2	58.8	4.5%	8.9%
		2	1	50.3	6.3%	8.1%
			2	50.2	5.9%	8.4%
		3	1	52.2	7.7%	9.2%
			2	50.8	5.8%	8.5%

12.4 Taustan raja-arvo

Edustavassa tutkimuksessa taustan (nolla-arvon) rajan määrittämiseen käytettiin kahta vähän holotranskobalamiinia sisältävää näytettä ja kahta reagenssierää (120 replikaattia kussakin reagenssierässä). BIOHIT Active B12 (Holotranscobalamin) EIA:n nolla-arvon rajan todettiin olevan 4,9 pmol/L (pyöristettynä 1 desimaaliin).

12.5 Toteamisraja

Edustavassa tutkimuksessa toteamisrajan määrittämiseen käytettiin viittä vähän holotranskobalamiinia sisältävää näytettä ja kahta reagenssierää (120 replikaattia kussakin reagenssierässä). BIOHIT Active B12 (Holotranscobalamin) EIA:n toteamisrajan todettiin olevan 8,1 pmol/L (pyöristettynä 1 desimaaliin).

12.6 Määrittämiss raja

Määrittämiss rajan määrittämiseen käytettiin viittä vähän holotranskobalamiinia sisältävää näytettä ja kahta reagenssierää (120 replikaattia kussakin reagenssierässä). BIOHIT Active B12 (Holotranscobalamin) EIA:n määrittämiss rajan todettiin olevan 8,3 pmol/L (pyöristettynä 1 desimaaliin).

12.7 Suuren pitoisuuden vääristymä (hook effect)

Suuren pitoisuuden vääristymä on ilmiö, jossa erittäin suuria pitoisuuksia sisältäviä näytteitä saattaa määrittämiss tuloksissa tulla määrittämiss dynaamiselle alueelle. BIOHIT Active B12 (Holotranscobalamin) EIA:ssa ei todettu suuren pitoisuuden vääristymää mitattaessa kahta näytettä, joiden pitoisuus oli noin 419 ja 2 236 pmol/L.

12.8 Ristireaktiot

BIOHIT Active B12 (Holotranscobalamin) EIA:ssa on enintään ≤ 10 %:n poikkeama holotranskobalamiinipitoisuudessa, kun näytteessä esiintyy apotranskobalamiinia tai haptokorriinia. Tutkimus suoritettiin Clinical and Laboratory Standards -instituutin (CLSI) asiakirjan EP7-A2¹² suositusten mukaisesti. Kolmeen näytteeseen, joiden holotranskobalamiinipitoisuudet olivat eri puolilla määrittämiss aluetta, lisättiin 500 pmol/L apotranskobalamiinia tai 5 000 pmol/L haptokorriinia. Suurin holotranskobalamiinipitoisuuden poikkeama oli -5 ja 1 % välillä.

12.9 Häiritsevät tekijät

BIOHIT Active B12 (Holotranscobalamin) EIA:ssa on enintään ≤ 10 %:n poikkeama holotranskobalamiinipitoisuudessa, kun näytteessä esiintyy mahdollisesti häiritseviä yhdisteitä. Tutkimus suoritettiin Clinical and Laboratory Standards -instituutin (CLSI) asiakirjan EP7-A2¹² suositusten mukaisesti. Näytteisiin, joiden holotranskobalamiinipitoisuudet olivat eri puolilla määrittämiss aluetta, lisättiin mahdollisesti häiritseviä yhdisteitä, jotka on lueteltu alla olevassa taulukossa 4. Näytteistä havaitut holotranskobalamiinipitoisuuden enimmäispoikkeamat olivat -10 ja 8 % välillä.

Taulukko 4. Luettelo testatuista häiritsevistä aineista.

Mahdollinen häiritsevä aine	Vaikutusta tuloksiin ei havaittu seuraaviin pitoisuuksiin mennessä
Hemoglobiini	500 mg/dl
Bilirubiini	30 mg/dl
Triglyseridi (Intralipid-liuos)	3 000 mg/dl
Reumatekijä	7 500 IU/dl
Kokonaisproteiini	9 000 mg/dl

13. TAKUU

Valmistaja lupaa korvata kaikki sen tuotteissa löydetyt viat ("Viallinen tuote") jotka johtuvat epäsovivista materiaaleista tai huolimattomasta

valmistustyöstä, mikä estää tuotteen mekaanisen toiminnan tai tarkoitetun käytön mukaanlukien, muttei rajoitettuna vain, toiminnot jotka on

lueteltu valmistajan antamassa tuoteselostuksessa. TAKUU TULLAAN SILTI PITÄMÄÄN MITÄTÖITYNÄ JOS VIAN HUOMATAAN AIHEUTUNEEN TUOTTEEN VAHINGOITTAMISESTA, VÄÄRINKÄYTÖSTÄ, VÄÄRÄSTÄ SÄILYTYKSESTÄ, TAI KÄYTÖSTÄ ANNETTUJEN SPESIFIKAATIOIDEN TAI RAJOITUSTEN ULKOPUOLELLA. TAI KÄYTTÖOHJEEN VASTAISESTI. Takuun voimassaoloaika vastaa tuotteen

säilyvyysaikaa. Tämä Biohitin diagnostinen kitti on valmistettu ISO 9001- /ISO 13485 -laaduntarkailukäytännön mukaisesti. Säilyvyysaika on esitetty pakkausmerkinnöissä. Tulkinnasta johtuvien epäselvyyksien kyseenollessa englanninkielinen versio on voimassa.

14. TILAUSINFORMAATIO






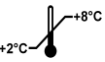



BIOHIT Active B12 (Holotranscobalamin) Cat. No 602 290

15. JULKAISUPÄIVÄ

BIOHIT Active B12 (Holotranscobalamin) Version 02, August 2015.

16. KIRJALLISUUS

1. Nexo E. Hvas A-M. Bleie Ø *et al.* Holo-transcobalamin is an early marker of changes in cobalamin homeostasis. A randomized placebo-controlled study. *Clin Chem* 2002;48(10):1768-71.
2. Valente E. Scott JM. Ueland PM *et al.* Diagnostic accuracy of holotranscobalamin, methylmalonic acid, serum cobalamin, and other indicators of tissue vitamin B12 status in the elderly. *Clin Chem* 2011;57(6):856-863.
3. Nexo E. Hoffmann-Lucke E. Holotranscobalamin, a marker of vitamin B12 status: analytical aspects and clinical utility. *Am J Clin Nutr* 2011;94(1):359S-365S.
4. Obeid R. Jouma M. Hermann W. Cobalamin status (holotranscobalamin, methylmalonic acid) and folate as determinants of homocysteine concentration. *Clin Chem* 2002;48(11):2064-5.
5. Herrmann W. Schorr H. Obeid R *et al.* Vitamin B12 status, particularly holotranscobalamin II and methylmalonic acid concentrations and hyperhomocysteinemia in vegetarians. *Am J Clin Nutr* 2003;78:131-6.
6. Lloyd-Wright Z. Hvas A-M. Moller J *et al.* Holotranscobalamin as an indicator of dietary vitamin B12 deficiency. *Clin Chem* 2003;49(12):2076-8.
7. Refsum H. Yajnik CS. Gadkari M *et al.* Hyperhomocysteinemia and elevated methylmalonic acid indicate a high prevalence of cobalamin deficiency in Asian Indians. *Am J Clin Nutr* 2001;74:233-41.
8. Refsum H. Smith AD. Low Vitamin B12 status in confirmed Alzheimer's disease as revealed by serum holotranscobalamin. *J Neurol Neurosurg Psychiatry* 2003;74:959-61.
9. Chen X. Remacha AF. Sarda MP *et al.* Influence of cobalamin deficiency compared with that of cobalamin absorption on serum holo-transcobalamin II. *Am J Clin Nutr* 2005;81:110-14.
10. The National Committee for Clinical Laboratory Standards (NCCLS). *Evaluation of the Linearity of Quantitative Measurement Procedures: A Statistical Approach; Approved Guideline*. NCCLS document EP6-A. Wayne, PA: NCCLS; 2003.
11. The National Committee for Clinical Laboratory Standards (NCCLS). *Method Comparison and Bias Estimation Using Patient Samples; Approved Guideline—Second Edition*. NCCLS Document EP9-A2. Wayne, PA: NCCLS; 2002.
12. Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI). *Interference Testing in Clinical Symbols*.

IVD	<i>In vitro</i> –diagnostinen käyttö	CONTROL LOW	Matala kontrolli
REF	Kataloginumero	CONTROL HIGH	Korkea kontrolli
LOT	Eräkoodi	CONJ	Konjugaattiliuos
	96 testiä	SUBS	Substraattiliuos
	Varoitus	STOP	Pysäytysliuos
	Lue käyttöohjeet	PRE	Esikäsittelyliuos
	Suojattava valolta	WASH 8x	Konsentroidu pesupuskuri (8x)
	Käytettävä ennen	BLANK	Näyteliuos
	Säilytettävä 2–8 °C:n lämpötilassa	CAL 1-5	Kalibraattorit 1–5
	Ei saa käyttää uudelleen		Syövyttävä
			Haitallinen

Pääkonttori

BIOHIT OYJ

Laippatie 1

00880 Helsinki, Finland

Tel: +358 9 773 861

Fax: +358 9 7738 6200

E-mail: info@biohit.fi

www.biohithealthcare.com

400920-02