

BIOHIT HealthCare

Innovating for Health



BIOHIT ACTIVE B12
(HOLOTRANSCOBALAMIN)
GEBRAUCHSANWEISUNG

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. VERWENDUNGSZWECK.....	4
2. EINLEITUNG	4
3. PRINZIP DES ASSAYS.....	4
4. WARNHINWEISE UND VORSICHTSMASSNAHMEN	5
5. KOMPONENTEN DES KITS	6
5.1 Konjugatlösung	6
5.2 Substratlösung	6
5.3 Stopplösung.....	6
5.4 Waschpuffer-Konzentrat	7
5.5 Mikrotiterstreifen	7
5.6 Blindlösung	7
5.7 Kalibratoren	7
5.8 Kontrollen.....	7
5.9 Vorbehandlungslösung	7
5.10 Gebrauchsanweisung	7
6. ERFORDERLICHE, NICHT MITGELIEFERTE HILFSMITTEL.....	7
7. STANDARDISIERUNG	8
8. LAGERUNG UND STABILITÄT	8
8.1 Stabilität des geöffneten (in Gebrauch befindlichen) Kits	8
8.2 Stabilität des ungeöffneten Kits	8
8.3 Anmerkungen zu Handhabung und Verfahrensweisen	8
8.4 Anzeichen für Zersetzung.....	9
9. GEWINNUNG UND LAGERUNG VON PROBEN	9
10. DURCHFÜHRUNG DES TESTS	9
10.1 Vorbereitung	9
10.2 Assay-Protokoll.....	10
11. ERGEBNISSE.....	10
11.1. Berechnung und Interpretation	10
11.2 Qualitätskontrolle	11
11.3 Erwartete Werte.....	12
12. LEISTUNGSDATEN	12
12.1 Linearität der Verdünnung	12
12.2 Genauigkeit.....	13

12.3 Präzision	13
12.4 Leerwertgrenze	15
12.5 Nachweisgrenze	15
12.6 Quantifizierungsgrenze	15
12.7 Hook-Effekt bei sehr hoher Konzentration	15
12.8 Kreuzreaktivität	15
12.9 Störeinflüsse	15
13. GARANTIE	16
14. BESTELLINFORMATIONEN	16
15. VERÖFFENTLICHUNGSDATUM	16
16. LITERATURVERWEISE	17

1. VERWENDUNGSZWECK

Der BIOHIT Active B12 (Holotranscobalamin) Assay ist ein Enzymimmunoassay (EIA) für die quantitative Bestimmung des Holotranscobalamin-(HoloTC)-Spiegels in Humanserum. HoloTC (an Transcobalamin gebundenes Vitamin B12) wird bei der Diagnose und Behandlung von Vitamin B12-Mangel eingesetzt.

2. EINLEITUNG

Am Transport von Vitamin B12 durch den Körper sind drei bindende Proteine beteiligt: Intrinsic-Faktor (IF), Transcobalamin (TC) und Haptocorrin (HC). Diese bindenden Proteine gewährleisten die effiziente Aufnahme auch kleinster in der Nahrung enthaltener Mengen an Vitamin B12. Binden TC und HC Vitamin B12, werden die aus dieser Bindung resultierenden Komplexe als Holotranscobalamin (HoloTC) bzw. Holohaptocorrin (HoloHC) bezeichnet, um sie von den kein Vitamin tragenden Proteinen zu unterscheiden.

HoloHC, das in der Blutbahn stärker vertretene Protein, repräsentiert 70 % bis 90 % des im Blut enthaltenen Vitamin B12, ist jedoch biologisch inert. HoloTC repräsentiert nur 10 % bis 30 % des im Blut zirkulierenden Vitamin B12, stellt jedoch die einzige Form von Vitamin B12 dar, die von den Zellen des Körpers aufgenommen werden kann. Nur das TC-Protein transportiert Vitamin B12 von der Absorptionsstelle im Ileum zu den Geweben und Zellen des Körpers. Das Vitamin wird dann über eine spezifische rezeptorvermittelte Aufnahme als HoloTC-Komplex (an Transcobalamin gebundenes Vitamin B12) internalisiert. Dieser Prozess sorgt dafür, dass das Vitamin B12 in die Zellen des Körpers gelangt und stellt das Vitamin als ein Coenzym für essenzielle zelluläre Funktionen wie die DNA-Synthese bereit.

Da HoloTC in der Blutbahn eine kürzere Halbwertszeit als HoloHC aufweist, ist die erste beim Eintreten einer negativen Vitamin-B12-Balance auftretende Veränderung mit großer Wahrscheinlichkeit ein Abfall des HoloTC-Spiegels im Serum¹.

Die Messung des Serum-Gesamt-B12 unterliegt gewissen Einschränkungen; insbesondere ist das Gros des gemessenen Cobalamins an das biologisch inerte HC gebunden. Verschiedene publizierte Studien gelangten zur Schlussfolgerung, dass HoloTC einen besseren Indikator für den Vitamin-B12-Status darstellt als das Serum-Gesamt-B12^{2,3}. Wie erwartet liegt, bei Patienten mit biochemischen Anzeichen für einen Vitamin-B12-Mangel ein niedriger HoloTC-Spiegel vor⁴.

Niedrige Werte wurden für Vegetarier⁵, Veganer⁶ und Populationen mit geringer Vitamin-B12-Aufnahme berichtet⁷. Insbesondere wurden bei M. Alzheimer-Patienten im Vergleich zur gesunden Kontrollgruppe niedrige HoloTC-Spiegel berichtet, jedoch keine verminderten Serum-Gesamt-B12-Spiegel⁸. Der HoloTC-Spiegel reflektiert den Vitamin-B12-Status unabhängig von einer unlängst erfolgten Aufnahme des Vitamins⁹.

3. PRINZIP DES ASSAYS



Die Mikrotiter-Wells sind mit einem für Active-B12 (Holotranscobalamin) hochgradig spezifischen monoklonalen Antikörper beschichtet. Während der ersten Inkubation bindet das Holotranscobalamin im Serum spezifisch an die antikörperbeschichtete Oberfläche. Während der zweiten Inkubation bindet das Konjugat an das eingefangene Holotranscobalamin. Anschließend werden die Wells gewaschen, um ungebundene Komponenten zu entfernen. Gebundenes Holotranscobalamin wird durch Inkubation mit dem Substrat nachgewiesen. Durch Zugabe der

Stopplösung wird die Reaktion, aus der ein gefärbtes Endprodukt resultiert, beendet. Die Holotranscobalamin-Konzentration (in pmol/l) steht in einem direkten Zusammenhang mit der Farbe des Endprodukts und kann durch Interpolation einer auf Kalibratoren basierenden Dosis-Wirkungs-Kurve geschätzt werden.

4. WARNHINWEISE UND VORSICHTSMASSNAHMEN

Nur für die *In-vitro*-Diagnostik. Sicherheitsvorkehrungen

1. Die Anweisungen in dieser Broschüre – insbesondere zu Handhabung und Lagerungsbedingungen – sind auf das Genaueste zu befolgen.
2. Nicht mit dem Mund pipettieren.
3. In Bereichen, in denen Kits und Proben gehandelt werden, nicht rauchen, essen, trinken oder Kosmetika auflegen.
4. Hautleiden, Schnitte, Abschürfungen und andere Hautläsionen adäquat schützen.
5. Kalibratoren, Kontrollen, Konjugate, Vorbehandlungs- und Waschpufferkonzentrat enthalten Natriumazid, das mit Blei- und Kupferrohren unter Bildung hochexplosiver Metallazide reagieren kann. Bei der Entsorgung mit großen Mengen Wasser nachspülen, um die Bildung von Metallaziden zu vermeiden.
6. Die Stopplösung enthält Natriumhydroxid. Berührung mit der Haut, den Augen und Schleimhäuten vermeiden. Verschüttete Mengen müssen mit reichlich Wasser aufgewischt werden. Bei Berührung mit der Haut oder den Augen gründlich mit Wasser abspülen und sofort einen Arzt konsultieren.
7. Materialsicherheitsdatenblätter für alle in diesem Kit enthaltenen gefährlichen Komponenten sind auf Anfrage bei Biohit Oyj erhältlich.
8. Dieses Produkt erfordert den Umgang mit Proben und Materialien humanen und tierischen Ursprungs. Es empfiehlt sich, alle vom Menschen oder vom Tier stammenden Materialien als potenziell infektiös anzusehen und unter Beachtung der OSHA-Standards für hämatogene Krankheitserreger handzuhaben. Bei Materialien, bei denen die Gewissheit oder der Verdacht besteht, dass sie Infektionserreger enthalten, ist nach Biosicherheitsstufe 2 oder anderen angemessenen Biosicherheitspraktiken zu verfahren.

 ÄTZEND	Stopplösung	H314 P264 P280 P305+351+338	Verursacht schwere Verätzungen der Haut und schwere Augenschäden. Nach Gebrauch ... gründlich waschen. Schutzhandschuhe/Schutzkleidung/Augenschutz/Gesichtsschutz tragen. BEI KONTAKT MIT DEN AUGEN: Einige Minuten lang behutsam mit Wasser spülen. Vorhandene Kontaktlinsen nach Möglichkeit entfernen. Weiter spülen.
 GESUNDHEITSSCHÄDLICH	Substrat	H302+312+332 P260 P271 P280 P301+310 P304+340 P312	Gesundheitsschädlich bei Verschlucken, Hautkontakt oder Einatmen. Staub/Rauch/Gas/Nebel/Dampf/Aerosol nicht einatmen. Nur im Freien oder in gut belüfteten Räumen verwenden. Schutzhandschuhe/Schutzkleidung/Augenschutz/Gesichtsschutz tragen. BEI VERSCHLUCKEN: Sofort GIFTINFORMATIONSZENTRUM/Arzt anrufen. BEI EINATMEN: Die Person an die frische Luft bringen und für ungehinderte Atmung sorgen. Bei Unwohlsein GIFTINFORMATIONSZENTRUM/Arzt anrufen.
	Waschpulferkonzentrat (8-fach)	H302 H412 EUH032 P264 P270 P273 P301+310 P330	Gesundheitsschädlich bei Verschlucken. Schädlich für Wasserorganismen, mit langfristiger Wirkung. Entwickelt bei Berührung mit Säure sehr giftige Gase. Nach Gebrauch ... gründlich waschen. Bei Gebrauch nicht essen, trinken oder rauchen. Freisetzung in die Umwelt vermeiden. BEI VERSCHLUCKEN: Sofort GIFTINFORMATIONSZENTRUM/Arzt anrufen. Mund ausspülen.

5. KOMPONENTEN DES KITS

5.1 Konjugatlösung CONJ

Mit Alkaliphosphatase markierte monoklonale Antikörper (Maus) gegen humanes Transcobalamin in Tris-Puffer mit Protein stabilisator, Fläschchen mit 15 ml. Konservierungsmittel: < 0,1 Volumenprozent Natriumazid. Gebrauchsfertig.

5.2 Substratlösung SUBS

para-NitroPhenyl Phosphate (pNPP), Pufferlösung, Fläschchen mit 15 ml. Gebrauchsfertig. Lichtgeschützt lagern. Hinweis: GESUNDHEITSSCHÄDLICH.

5.3 Stopplösung STOP

1 mol Natriumhydroxid, (pH >10), Fläschchen mit 15 ml. Gebrauchsfertig. Hinweis: ÄTZEND.

5.4 Waschpuffer-Konzentrat

WASH 8x



Phosphatpuffer, zwei Fläschchen mit je 25 ml. Konservierungsmittel: 0,72 Volumenprozent Natriumazid.
Vor Gebrauch verdünnen. Hinweis: GESUNDHEITSSCHÄDLICH.

5.5 Mikrotiterstreifen

12 x 8-Well-Mikrotiterstreifen (abbrechbar), beschichtet mit monoklonalem Anti-Holo-transcobalamin-Antikörper (Maus), in wiederverschließbarer Folienverpackung mit Trockenmittel.

5.6 Blindlösung

BLANK



Phosphatpuffer mit Proteinstabilisator (Rind), Fläschchen mit 1 ml.

5.7 Kalibratoren

CAL 1-5



Phosphatpuffer mit HoloTC-haltigem Proteinstabilisator (Rind), fünf Fläschchen mit je 1 ml.
Konservierungsmittel: < 0,1 Volumenprozent Natriumazid. Gebrauchsfertig. Lichtgeschützt lagern.
KONZENTRATIONEN SIEHE ETIKETTIERUNG DER FLÄSCHCHEN.

5.8 Kontrollen

CONTROL LOW CONTROL HIGH



Ein Fläschchen mit niedrig konzentrierter Kontrolle und ein Fläschchen mit hoch konzentrierter Kontrolle: 1 ml
Phosphatpuffer mit HoloTC-haltigem Proteinstabilisator (Rind). Konservierungsmittel: < 0,1 Volumenprozent
Natriumazid.
Gebrauchsfertig. Lichtgeschützt lagern.

5.9 Vorbehandlungslösung

PRE

Citratpuffer, ein Fläschchen mit 25 ml. Konservierungsmittel: < 0,1 Volumenprozent Natriumazid. Gebrauchsfertig.

5.10 Gebrauchsanweisung

6. ERFORDERLICHE, NICHT MITGELIEFERTE HILFSMITTEL

1. 96-Well-Platten/Streifenlesegerät mit 405-nm-Filter.
2. Präzisionspipette(n) für die Abgabe von 100 µl. Ein 8-Kanal-Dispenser (oder vergleichbares Gerät) für die Abgabe von etwa 250 µl bis 300 µl für den manuellen Waschvorgang.
3. Messzylinder (Glas/Kunststoff), 1 x 200 ml.

4. Destilliertes/deionisiertes Wasser.
5. Papiertücher.
6. Zeitgeber für 30-, 35- und 60-Minuten-Intervalle.

7. STANDARDISIERUNG

Es gibt derzeit kein für eine Standardisierung geeignetes international anerkanntes Referenzverfahren oder Referenzmaterial. Die BIOHIT Active-B12 (Holotranscobalamin) Kalibratoren können auf interne Referenzstandards zurückgeführt werden, denen einmalig ein Wert zugewiesen wurde.

8. LAGERUNG UND STABILITÄT

8.1 Stabilität des geöffneten (in Gebrauch befindlichen) Kits

Ein Kit wurde geöffnet und über einen Zeitraum von drei Monaten dreimal eingesetzt, ohne dass sich nachteilige Auswirkungen auf das Leistungsvermögen des Kits zeigten. Nach Verwendung müssen die Komponenten wieder bei 2 °C bis 8 °C gelagert werden.

8.2 Stabilität des ungeöffneten Kits

Bei 2 °C bis 8 °C gelagerte Komponenten eines ungeöffneten Kits sind bis Ablauf des auf den Etiketten angegebenen Haltbarkeitsdatums stabil.

8.3 Anmerkungen zu Handhabung und Verfahrensweisen

1. Kit-Komponenten bei 2 °C bis 8 °C lagern und vor Ablauf des auf den Etiketten angegebenen Haltbarkeitsdatums verwenden. Reagenzien nach Ablauf des Haltbarkeitsdatums nicht mehr verwenden.
2. Jede Charge Reagenzien und Kalibratoren wurde dahingehend standardisiert, dass die Reaktion korrekt abläuft. Reagenzien oder Kalibratoren unterschiedlicher Chargen nicht untereinander austauschen.
3. Die Konzentrationen der Kalibratoren sind auf der Etikettierung der Fläschchen angegeben und können sich von Charge zu Charge unterscheiden.
4. Kits nicht einfrieren.
5. Waschpufferkonzentrat muss vor Gebrauch verdünnt werden. Alle anderen Reagenzien werden gebrauchsfertig geliefert.
6. Verdünnter Waschpuffer ist für mindestens 3 Monate stabil, wenn eine mikrobielle Kontamination verhindert wird. Nach Gebrauch stets wieder bei 2 °C bis 8 °C lagern.
7. Überschüssige (unbenutzte) Mikrotiterstreifen wieder in die Folienverpackung mit Trockenmittel geben. Dichtigkeit des Verschlusses kontrollieren und bis zur Verwendung weiter bei 2 °C bis 8 °C lagern.
8. Kalibratoren, Kontrollen und Substrat lichtgeschützt lagern.
9. Kontamination der Reagenzien vermeiden. Bei jedem Pipettieren eines Reagenzes oder einer Probe eine neue Einmalpipettenspitze verwenden.

8.4 Anzeichen für Zersetzung

Das Substrat muss farblos bis blassgelb sein. Eine stärkere Gelbfärbung weist auf eine Kontaminierung hin, das Reagenz ist zu entsorgen. Trübungen oder Ausfällungen sind bei allen Komponenten als Anzeichen einer Zersetzung anzusehen, die entsprechende Komponente ist zu entsorgen.

9. GEWINNUNG UND LAGERUNG VON PROBEN

1. Der Assay ist für Humanserumproben (insbesondere SST-Röhrchen) vorgesehen.
2. Keine stark hämolysierten oder getrübbten Proben verwenden.
3. Aufgetaute Proben vor der Analyse gründlich durchmischen. Wiederholtes Einfrieren/Auftauen ist zu vermeiden.
4. Proben können bis zu drei Mal eingefroren und wieder aufgetaut werden. Aufgetaute Proben müssen vor Durchführung des Assays mindestens 5 Minuten lang bei mindestens 10.000 g zentrifugiert werden.
5. On-the-Clot- und Off-the-Clot-Proben dürfen nicht länger als über Nacht (≤ 16 Stunden) Temperaturen ausgesetzt werden, die über der Raumtemperatur liegen.
6. Proben können bei 2 °C bis 8 °C für bis zu drei Tage (on the clot) bzw. bis zu vier Wochen (off the clot) gelagert werden. Eine längerfristige Lagerung bis zu 6 Monate erfordert eine Lagerungstemperatur von – 20 °C.
7. Zur Vorbereitung der Probe für den Assay die identische Menge Vorbehandlungslösung zur Probe geben (z. B. 150 µl Probe plus 150 µl Vorbehandlungslösung). Vorbehandelte Proben können (mit Kappe versehen) bis zur Durchführung des Assays bis zu 24 Stunden bei 2 °C bis 8 °C gelagert werden.

10. DURCHFÜHRUNG DES TESTS

10.1 Vorbereitung

Vorbereitung für den Assay

Alle Komponenten des Kits einschließlich der Mikrotiterstreifen vor Gebrauch 30 bis 60 Minuten lang auf 18 °C bis 25 °C erwärmen lassen. Reagenzien durch behutsames Umdrehen durchmischen.

Bei Lagerung bei 2 °C bis 8 °C kommt es beim Waschpuffer zu Ausfällungen (möglicherweise Bildung sichtbarer Kristalle). Den Waschpuffer vor dem Verdünnen in Wasser aufwärmen lassen (erforderlichenfalls zur Beschleunigung des Vorgangs bei 37 °C im Inkubator), bis das bloße Auge **KEINE** Ausfällungen mehr erkennen kann.

Die folgenden Reagenzien verdünnen und gründlich durchmischen:

Reagenz	Volumen	Zugabe
Waschpufferkonzentrat (8-fach)	1 Fläschchen	175 ml destilliertes/deionisiertes Wasser

Die Anzahl der für den aktuellen Assay benötigten Mikrotiterstreifen berechnen und diese in den Mikrotiterstreifenträger einsetzen. Überschüssige Mikrotiterstreifen wieder in die Folienverpackung mit

Trockenmittel geben und bis zur weiteren Verwendung bei 2 °C bis 8 °C lagern. Sicherstellen, dass alle Streifen fest und sicher im Mikrotiterstreifenträger sitzen. Zur eindeutigen Identifizierung empfiehlt es sich, die Streifen am oberen Rand zu nummerieren. Den Mikrotiterstreifenträger für die zukünftige Verwendung beiseite legen. Zur Vorbereitung der Probe für den Assay die identische Menge Vorbehandlungslösung zur Probe geben (z. B. 150 µl Probe plus 150 µl Vorbehandlungslösung). Vorbehandelte Proben können (mit Kappe versehen) bis zur Durchführung des Assays bis zu 24 Stunden bei 2 °C bis 8 °C gelagert werden.

10.2 Assay-Protokoll

1. Wells für die Identifizierung referenzieren.
2. 100 µl Kalibratoren (Doppelbestimmung), Kitkontrolle (Doppelbestimmung) und vorbehandelte (50:50) Patientenproben (Doppelbestimmung) in die entsprechenden Wells pipettieren. Unbedingt nach jedem Pipettieren die Pipettenspitze wechseln. Dieser Schritt darf nicht mehr als 15 Minuten beanspruchen.
3. 60 ± 10 Minuten bei 18 °C bis 25 °C inkubieren.
4. Den Streifeninhalt durch schnelles Umdrehen über einem für die Entsorgung biologischer Materialien vorgesehenen Spülbecken dekantieren. Dabei die von den Proben potenziell ausgehende Infektionsgefahr berücksichtigen. Die umgekehrten Streifen gründlich mit Papiertüchern abtupfen. **Nicht waschen.**
5. In jedes Well 100 µl Konjugat geben.
6. 35 ± 5 Minuten bei 18 °C bis 25 °C inkubieren.
7. Den Streifeninhalt durch schnelles Umdrehen über einem für die Entsorgung biologischer Materialien vorgesehenen Spülbecken dekantieren. Die umgekehrten Streifen gründlich mit Papiertüchern abtupfen.
8. Die Wells **fünf Mal** mit mindestens 250 µl verdünntem Waschpuffer waschen. **Nach jedem Waschschrift dekantieren und abtupfen.**
9. In jedes Well 100 µl Substrat geben.
10. 30 ± 5 Minuten bei 18 °C bis 25 °C inkubieren. **Nicht dekantieren.**
11. In derselben Reihenfolge und derselben Geschwindigkeit wie bei der Zugabe des Substrats 100 µl Stopplösung in jedes Well geben. Wells zum Durchmischen behutsam beklopfen.
12. Streifen innerhalb von 120 Minuten nach Zugabe der Stopplösung bei 405 nm auslesen.

11. ERGEBNISSE

11.1. Berechnung und Interpretation

Den mittleren Extinktionswert der Kalibratoren (y-Achse) gegen die entsprechende Konzentration in pmol/l (x-Achse) auftragen. **DIE KONZENTRATIONEN DER KALIBRATOREN SIND AUF DER ETIKETTIERUNG DER FLÄSCHCHEN ANGEGEBEN. SIE WERDEN JEDER EINZELNEN CHARGE INDIVIDUELL ZUGEWIESEN UND KÖNNEN SICH VON CHARGE ZU CHARGE UNTERSCHIEDEN.**

Zur Berechnung der Konzentration (pmol/l) der jeweiligen Probe wird der Punkt der Kurve bestimmt, der dem mittleren Extinktionswert der Probe entspricht, und die zugehörige Konzentration in pmol/l an der x-Achse abgelesen. Dies kann manuell unter Verwendung von Millimeterpapier oder mittels eines Plattenlesegeräts mit

entsprechender Kurvenanpassungs-Software erfolgen. Bei Verwendung eines Plattenlesegeräts mit interner Software ist die **Kurvenanpassung mittels linearer Regression** durchzuführen.

Das nachstehende Diagramm (Abbildung 1) einer typischen Kalibrierungskurve dient nur zur Illustration des Vorgehens und darf nicht für die Interpretation von Ergebnissen verwendet werden. Proben mit einer Konzentration über 128 pmol/l liegen außerhalb des Messbereichs des Assays und müssen als „>128 pmol/l“ dokumentiert werden. Die Extrapolation des Messwerts ist nicht zulässig. Eine Abweichung von weniger als 20 % bei wiederholten Bestimmungen ein und derselben Probe kann als Bestätigung für die Annehmbarkeit des Assays gewertet werden.

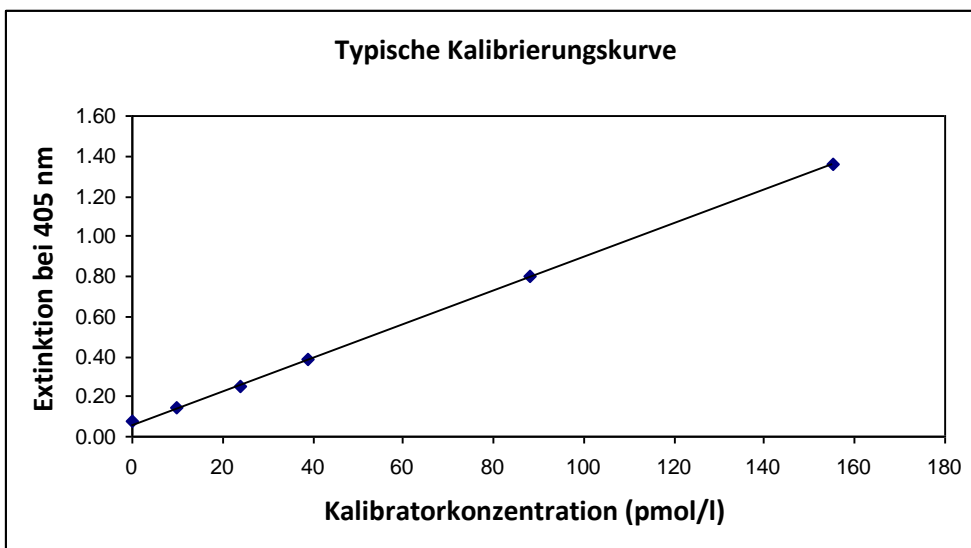


Abbildung 1: Typische Kalibrierungskurve des BIOHIT Active-B12 (Holotranscobalamin) Assays.

Maßeinheit

Die Maßeinheit für den BIOHIT Active B12 (Holotranscobalamin) Assay ist pmol/l.

Messwertbereich

Der Messwertbereich des Assays reicht von 10 pmol/l bis 128 pmol/l.

11.2 Qualitätskontrolle

Es ist sicherzustellen, dass das Plattenlesegerät entsprechend der Herstelleranweisungen adäquat gewartet und kalibriert wird und dass die richtige Wellenlänge (405 nm) und der richtige Kurvenanpassungsalgorithmus (lineare Regression) angewendet werden.

Der Anwender muss sicherstellen, dass er mit den Anweisungen für den Assay – insbesondere den Abschnitten „Warnhinweise und Vorsichtsmaßnahmen“ und „Anmerkungen zu Handhabung und Vorgehensweise“ – vollumfänglich vertraut ist. Vor der Anwendung des Assays auf Patientenproben muss der Anwender nachweisen, dass er die vom Hersteller festgelegten Leistungsspezifikationen hinsichtlich Präzision und Messbereich erbringen kann. Zur Überwachung der Qualität des Testverfahrens müssen gebrauchsfertige Kitkontrollen mit niedriger und mit hoher Konzentration in allen Tests als Doppelbestimmung mitlaufen.

Sofern die vom Hersteller vorgegebenen Präzisionsspezifikationen erfüllt sind, ist der Assay als ungültig anzusehen, wenn das Ergebnis einer der Kontrollen außerhalb des nachstehend angegebenen Spezifikationsbereichs liegen sollte. In diesem Fall dürfen die mit diesem Assay ermittelten Patientenergebnisse nicht herausgegeben werden. Nach Überprüfung der Verfahrensschritte kann der Assay wiederholt werden, alternativ kann der Distributor/Hersteller zu Rate gezogen werden. Für die Wiederholung des Assays ist eine frische Verdünnung der Proben herzustellen. Das Labor kann nach billigem Ermessen in jedem Assay-Durchlauf hausinterne Kontrollen mitlaufen lassen. Kontrollen dieser Art bei oder unter -20 °C lagern und wiederholtes Einfrieren/Auftauen vermeiden. Konservierungsmittel wie Natriumazid ($<0,1$ Volumenprozent) haben keine Auswirkungen auf die Ergebnisse der Proben.

Referenzbereiche und angemessene Cut-off-Werte müssen vom Anwender für die spezifische betreute Population berechnet werden.

Tabelle 1: Spezifikationen für die Kontrollen mit hoher und niedriger Konzentration

Spezifikationen der Kontrollen	Kontrolle mit niedriger Konzentration	Kontrolle mit hoher Konzentration
Mittelwert der Doppelbestimmung	15 bis 35 pmol/l	36 bis 84 pmol/l

11.3 Erwartete Werte

135 Serumproben von asymptomatischen und augenscheinlich gesunden Spendern im Alter zwischen 18 und 75 Jahren mit einer in etwa ausgeglichenen Geschlechterverteilung (65 Männer/70 Frauen) wurden mit einem BIOHIT Active B12 (Holotranscobalamin) EIA getestet.

Die über die gesamte Population gemittelte Active B12 (Holotranscobalamin) Konzentration lag bei 72 pmol/l (15 bis 147 pmol/l). Auf Grundlage der Daten dieser Referenzpopulation ergibt sich folgender Referenzbereich (mittlere 95 % der Ergebnisse):

Referenzbereich	21 bis 123 pmol/l
------------------------	-------------------

Dieser Referenzbereich soll nur als Anhalt dienen. Jedes Labor muss seinen eigenen, auf seine Patientenpopulation – samt ggf. zu beachtender Einflussfaktoren (geographische Lage, Patiententyp, Ernährung, Umweltfaktoren) – und klinischen Verfahren abgestimmten Referenzbereich ermitteln.

12. LEISTUNGSDATEN

Repräsentative Daten; Ergebnisse in individuellen Labors können von diesen Daten abweichen.

12.1 Linearität der Verdünnung

Im Rahmen einer Evaluierung gemäß dem CLSI-Dokument EP6-A¹⁰ wurde die Linearität des BIOHIT Active B12 (Holotranscobalamin) EIA zwischen 5,3 und 156,0 pmol/l (gerundet auf eine Nachkommastelle) festgestellt. Die Ergebnisse in einzelnen Labors können von diesen Daten abweichen.

12.2 Genauigkeit

An Serumproben von augenscheinlich gesunden Erwachsenen wurde eine Korrelationsstudie durchgeführt. Alle Proben wurden gemäß dem CLSI-Dokument EP9-A2¹¹ unter Verwendung des BIOHIT Active B12 (Holotranscobalamin) EIA und eines handelsüblichen Holotranscobalamin-Assays untersucht. Die Konzentration der einzelnen Proben reichte von 13,8 bis 112,8 pmol/l. Tabelle 2 zeigt die ermittelten statistischen Maßzahlen.

Tabelle 2: BIOHIT Active B12 (Holotranscobalamin) EIA im Vergleich zu einem handelsüblichen Assay

BIOHIT Active B12 (Holotranscobalamin) EIA im Vergleich zu einem handelsüblichen Assay	
Anzahl der Proben	111
Steigung der Regressionsgeraden (Passing-Bablok-Regression) (95 %-Konfidenzintervall)	0,95 (0,89 bis 1,01)
y-Achsen-Abschnitt (Passing-Bablok-Regression) (95 %-Konfidenzintervall)	8,39 (5,73 bis 11,77)
Korrelationskoeffizient (r) (Pearson) (95 %-Konfidenzintervall)	0,93 (0,90 bis 0,95)

12.3 Präzision

Sieben Humanserumproben wurden unter Verwendung von drei Chargen Reagenzien getestet. Die Proben wurden von zwei Bedienern über fünf Tage einmal täglich in Achtfachbestimmung (n = 80) getestet. Die Ergebnisse dieser Evaluierung ist in Tabelle 3 zusammengefasst.

Tabelle 3: Daten zur Präzision

Probe	n	Charge	Bediener	Mittelwert (pmol/l)	Intra-Assay-Variationskoeffizient (innerhalb eines Durchlaufs)	Gesamt-Variationskoeffizient
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%
Kontrolle (niedrige Konzentration)	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%
Kontrolle (hohe Konzentration)	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 Leerwertgrenze

Im Rahmen einer repräsentativen Studie erfolgten mittels zweier schwach konzentrierter Holotranscobalamin-Proben und zweier Reagenzien-Chargen (120 Bestimmungen je Reagenzien-Charge) Bestimmungen der Leerwertgrenze. Die Leerwertgrenze für den BIOHIT Active B12 (Holotranscobalamin) EIA ergab sich zu 4,9 pmol/l (auf eine Nachkommastelle gerundet).

12.5 Nachweisgrenze

Im Rahmen einer repräsentativen Studie erfolgten mit fünf schwach konzentrierten Holotranscobalamin-Proben und zwei Reagenzien-Chargen (120 Bestimmungen je Reagenzien-Charge) Bestimmungen der Nachweisgrenze. Die Nachweisgrenze für den BIOHIT Active B12 (Holotranscobalamin) EIA ergab sich zu 8,1 pmol/l (auf eine Nachkommastelle gerundet).

12.6 Quantifizierungsgrenze

Mit fünf schwach konzentrierten Holotranscobalamin-Proben und zwei Reagenzien-Chargen (120 Bestimmungen je Reagenzien-Charge) wurde die Quantifizierungsgrenze bestimmt. Die Quantifizierungsgrenze für den BIOHIT Active B12 (Holotranscobalamin) EIA ergab sich zu 8,3 pmol/l (auf eine Nachkommastelle gerundet).

12.7 Hook-Effekt bei sehr hoher Konzentration

Hook-Effekt ist die Bezeichnung für ein Phänomen, bei dem Proben mit sehr hoher Konzentration fälschlicherweise ein innerhalb des dynamischen Messbereichs des Assays liegendes Ergebnis liefern. Beim BIOHIT Active B12 (Holotranscobalamin) EIA wurde im Rahmen der Analyse von zwei Proben mit einer Konzentration von etwa 419 pmol/l bzw. 2236 pmol/l kein Hook-Effekt beobachtet.

12.8 Kreuzreaktivität

Der BIOHIT Active B12 (Holotranscobalamin) EIA ist so ausgelegt, dass in der Probe enthaltenes Apotranscobalamin oder Haptocorrin zu einer maximalen Abweichung der ermittelten Holotranscobalamin-Konzentration von $\leq 10\%$ führt.

Es wurde eine Evaluierung gemäß dem CLSI-Dokument EP7-A2¹² durchgeführt. Drei Proben mit über den zulässigen Bereich des Assays verteilten Holotranscobalamin-Konzentrationen wurden 500 pmol/l Apotranscobalamin oder 5000 pmol/l Haptocorrin zugegeben. Die maximale Abweichung der ermittelten Holotranscobalamin-Konzentration betrug -5% bis 1% .

12.9 Störeinflüsse

Der BIOHIT Active B12 (Holotranscobalamin) EIA ist so ausgelegt, dass in der Probe enthaltene potenziell störende Substanzen zu einer maximalen Abweichung der ermittelten Holotranscobalamin-Konzentration von $\leq 10\%$ führen.

Es wurde eine Evaluierung gemäß dem CLSI-Dokument EP7-A2¹² durchgeführt. Proben mit innerhalb des Messbereichs liegenden Holotranscobalamin-Konzentrationen wurden die in Tabelle 4 aufgeführten potenziell

störenden Substanzen zugegeben. Die maximale Abweichung der ermittelten Holotranscobalamin-Konzentration betrug –10 % bis 8 %.

Tabelle 4 Liste der potenziell störenden Substanzen

Potenziell störende Substanz	Konzentration, bis zu der keine Störeinflüsse nachweisbar waren
Hämoglobin	500 mg/dl
Bilirubin	30 mg/dl
Triglyceride (Intralipidlösung)	3000 mg/dl
Rheumafaktor	7500 IE/dl
Gesamtprotein	9000 mg/dl

13. GARANTIE

Biohit verpflichtet sich, alle Mängel an einem Produkt (dem „mangelhaften Produkt“) zu beseitigen, die durch Material- und/oder Herstellungsfehler entstanden sind und die ordnungsgemäße mechanische Funktion oder die bestimmungsgemäße Verwendung des Produkts verhindern, einschließlich, jedoch nicht beschränkt auf die in den Biohit-Spezifikationen angegebenen Produktfunktionen. ALLERDINGS WERDEN JEGLICHE GARANTIEANSPRÜCHE AUSGESCHLOSSEN, WENN DIE PRODUKTMÄNGEL DURCH UNSACHGEMÄSSE BEHANDLUNG, ZWECKENTFREMUNG, UNBEABSICHTIGTE BESCHÄDIGUNG ODER FALSCHER LAGERUNG VERURSACHT WURDEN BZW. WENN DIE PRODUKTMÄNGEL ENTSTANDEN SIND, WEIL DAS PRODUKT AUSSERHALB DER ANGEgebenEN EINSCHRÄNKUNGEN, AUSSERHALB DER SPEZIFIKATIONEN ODER ENTGEGEN DEN ANWEISUNGEN IN DER GEBRAUCHSANWEISUNG VERWENDET WURDE. Die Garantiezeit ist in der Gebrauchsanweisung des jeweiligen Produkts angegeben und beginnt mit dem Datum der Lieferung durch Biohit. Dieses diagnostische Kit von Biohit wurde in Übereinstimmung mit den Qualitätsmanagementnormen ISO 9001 und ISO 13485 hergestellt. Bei Fragen zur Auslegung gilt die englische Version dieses Textes.

14. BESTELLINFORMATIONEN






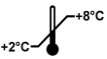



BIOHIT Active B12 (Holotranscobalamin) Katalognr. 602 290

15. VERÖFFENTLICHUNGSDATUM

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

16. LITERATURVERWEISE

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	Medizinprodukt für die <i>In-vitro</i> -Diagnostik	CONTROL LOW	Kontrolle (niedrige Konzentration)
REF	Katalognummer	CONTROL HIGH	Kontrolle (hohe Konzentration)
LOT	Charge	CONJ	Konjugat
	96 Tests	SUBS	Substrat
	Vorsicht	STOP	Stopplösung
	Gebrauchsanweisung beachten	PRE	Vorbehandlungslösung
	Vor Licht schützen	WASH 8x	Waschpuffer-Konzentrat (8-fach)
	Verwendbar bis	BLANK	Blindlösung
	Bei 2 °C bis 8 °C lagern	CAL 1-5	Kalibratoren 1 bis 5
	Nicht wiederverwenden		Ätzend
			Gesundheitsschädlich

Hauptsitz

BIOHIT OYJ

Laippatie 1

00880 Helsinki, Finland

Tel: +358 9 773 861

Fax: +358 9 773 86200

E-mail: info@biohit.fi

www.biohithealthcare.com

400920-02