

**BIOHIT HealthCare**

Innovating for Health



**BIOHIT ACTIVE B12  
(HOLOTRANSCOBALAMIN)**

**ISTRUZIONI PER L'USO**

**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](mailto:info@biohit.fi), [www.biohithealthcare.com](http://www.biohithealthcare.com)

**BIOHIT Active B12 (Holotranscobalamin)****N. cat. 602290**

1. USO PREVISTO .....	4
2. INTRODUZIONE.....	4
3. PRINCIPI DEL DOSAGGIO .....	4
4. AVVERTENZE E PRECAUZIONI .....	5
5. COMPONENTI DEL KIT .....	6
5.1 Soluzione di coniugato .....	6
5.2 Soluzione di substrato .....	6
5.3 Soluzione di arresto .....	7
5.4 Tampone di lavaggio concentrato .....	7
5.5 Micropiastra.....	7
5.6 Soluzione bianco .....	7
5.7 Calibratori .....	7
5.8 Controlli.....	7
5.9 Soluzione pre-trattamento .....	7
5.10 Istruzioni per l'uso .....	7
6. MATERIALI/ATTREZZATURE RICHIESTI MA NON FORNITI .....	7
7. STANDARDIZZAZIONE .....	8
8. CONSERVAZIONE E STABILITÀ .....	8
8.1 Stabilità del kit aperto (in uso).....	8
8.2 Stabilità del kit non aperto .....	8
8.3 Note sulla manipolazione e la procedura .....	8
8.4 Indicazioni di deterioramento .....	9
9. PRELIEVO E CONSERVAZIONE DEI CAMPIONI.....	9
10. PROCEDURA DEI TEST .....	9
10.1 Preparazione .....	9
10.2 Protocollo del dosaggio.....	10
11. RISULTATI .....	10
11.1. Calcolo e interpretazione dei risultati.....	10
11.2 Controllo di qualità .....	11

11.3 Valori attesi .....	13
12. DATI RELATIVI ALLE PRESTAZIONI .....	13
12.1 Linearità di diluizione .....	13
12.2 Accuratezza .....	13
12.3 Precisione.....	14
12.4 Limite del bianco .....	15
12.5 Limite di rilevamento.....	16
12.6 Limite di quantificazione.....	16
12.7 Effetto gancio ad alte dosi .....	16
12.8 Cross-reattività .....	16
12.9 Interferenza.....	16
13. GARANZIA .....	17
14. INFORMAZIONI PER LE ORDINAZIONI.....	17
15. DATA DI PUBBLICAZIONE.....	17
16. BIBLIOGRAFIA.....	18

## 1. USO PREVISTO

Il test BIOHIT Active B12 (Holotranscobalamin) è un dosaggio immunoenzimatico (EIA) per la determinazione quantitativa dell'olotranscobalamina (HoloTC) nel siero umano. L'HoloTC (vitamina B12 legata all'olotranscobalamina) viene utilizzata come ausilio nella diagnosi e nel trattamento della carenza di vitamina B12.

## 2. INTRODUZIONE

Tre proteine di legame sono coinvolte nel trasporto della vitamina B12 nell'organismo: il fattore intrinseco (IF), la transcobalamina (TC) e l'aptocorrina (HC). Queste proteine di legame assicurano l'efficace captazione delle quantità minime di vitamina B12 presenti negli alimenti assunti. Quando la TC e l'HC si legano alla vitamina B12, si ottengono due complessi, chiamati olotranscobalamina (HoloTC) e oloaptocorrina (HoloHC) per distinguerli dalle proteine che non trasportano la vitamina.

L'HoloHC, la principale frazione presente nel torrente ematico, rappresenta il 70-90% della vitamina B12 presente nel sangue, ma è biologicamente inerte. L'HoloTC rappresenta solo il 10-30% della vitamina B12 circolante nel sangue, ma è l'unica forma di vitamina B12 che può essere captata dalle cellule dell'organismo. La proteina TC da sola trasporta la vitamina B12 dal sito di assorbimento nell'ileo ai tessuti e alle cellule. La vitamina viene poi internalizzata sotto forma di complesso HoloTC (vitamina B12 legata alla transcobalamina) tramite una specifica captazione recettore-mediata. Questo processo mette la vitamina B12 a disposizione delle cellule dell'organismo sotto forma di co-enzima per funzioni cellulari fondamentali, quali la sintesi del DNA.

Dato che l'HoloTC presenta un'emivita circolante più breve rispetto all'HoloHC, la prima variazione che si verifica in presenza di un bilancio negativo di vitamina B12 è molto probabilmente una riduzione della concentrazione di HoloTC sierica<sup>1</sup>.

La misurazione della vitamina B12 sierica totale risente di alcuni limiti, in particolare del fatto che gran parte della cobalamina misurata è legata all'HC biologicamente inerte. Secondo diversi studi, l'HoloTC sarebbe un indicatore migliore dello stato della vitamina B12 rispetto alla vitamina B12 sierica totale<sup>2,3</sup>. Come prevedibile, i livelli di HoloTC risultano bassi nei pazienti con segni biochimici di carenza di vitamina B12<sup>4</sup>.

Sono stati riportati bassi valori nei soggetti vegetariani<sup>5</sup>, vegani<sup>6</sup> e in popolazioni con ridotto apporto di vitamina B12<sup>7</sup>. È interessante notare che bassi livelli di HoloTC, ma non di vitamina B12 sierica totale, sono stati riportati in pazienti con malattia di Alzheimer rispetto ai livelli registrati in un gruppo di controllo di soggetti sani<sup>8</sup>. I livelli di HoloTC riflettono lo stato della vitamina B12, indipendentemente dal recente assorbimento della vitamina<sup>9</sup>.

## 3. PRINCIPI DEL DOSAGGIO

I pozzetti di microtitolazione vengono rivestiti con un anticorpo monoclonale altamente specifico per BIOHIT Active B12 (Holotranscobalamin). Durante la prima incubazione l'olotranscobalamina presente nel siero si lega in modo specifico alla superficie rivestita con l'anticorpo. Nella seconda incubazione il coniugato si lega all'olotranscobalamina catturata. I pozzetti vengono poi lavati per eliminare i componenti non legati.



L'olotranscobalamina legata viene rilevata mediante incubazione con il substrato. L'aggiunta di soluzione di arresto pone fine alla reazione, dando luogo a un prodotto finale colorato. La concentrazione di

olotranscobalamina in pmol/L è direttamente correlata al colore ottenuto e può essere valutata per interpolazione su una curva dose-risposta basata sui calibratori.

## 4. AVVERTENZE E PRECAUZIONI

### **Esclusivamente per uso diagnostico *in vitro* . Precauzioni di sicurezza**

1. Attenersi scrupolosamente alle istruzioni fornite nel presente foglietto illustrativo, soprattutto relativamente alle condizioni di manipolazione e conservazione.
2. Non pipettare con la bocca.
3. Non fumare, mangiare, bere o applicare cosmetici nelle aree in cui si manipolano kit e campioni.
4. Proteggere adeguatamente eventuali affezioni cutanee, tagli, abrasioni e altre lesioni della pelle.
5. I calibratori, i controlli, il coniugato, il pre-trattamento e il tampone di lavaggio concentrato contengono sodio azide, che può reagire con le tubature in piombo e rame, formando azidi metallici altamente esplosivi. Per lo smaltimento, far defluire i prodotti con abbondante acqua per impedire la formazione di azidi.
6. La soluzione di arresto contiene idrossido di sodio. Evitare il contatto con la pelle, gli occhi e le mucose. Eventuali fuoriuscite devono essere diluite con abbondanti quantità d'acqua e poi asciugate. In caso di contatto con la pelle o gli occhi, lavare con acqua e consultare immediatamente un medico.
7. Le schede tecniche di sicurezza relative a tutti i componenti pericolosi contenuti in questo kit possono essere richieste ad Biohit Oyj.
8. Questo prodotto comporta la manipolazione di campioni e materiali di origine umana e animale. Tutti i materiali di origine umana e animale devono essere considerati potenzialmente infettivi, pertanto devono essere manipolati in conformità con la norma OSHA sui patogeni trasmissibili per via ematica, livello di biosicurezza2. Altre adeguate pratiche di biosicurezza devono essere utilizzate per i materiali che contengono (o si sospetta che contengano) agenti infettivi.

 <b>CORROSIVO</b>	Soluzione di arresto	H314 P264 P280 P305+351+338	Provoca gravi ustioni cutanee e gravi lesioni oculari. Lavare accuratamente ... dopo l'uso. Indossare guanti/indumenti protettivi/proteggere gli occhi/il viso. <b>IN CASO DI CONTATTO CON GLI OCCHI:</b> sciacquare accuratamente per parecchi minuti. Togliere le eventuali lenti a contatto se è agevole farlo. Continuare a sciacquare.
 <b>NOCIVO</b>	Substrato	H302+312+332 P260 P271 P280 P301+310 P304+340 P312	Nocivo se ingerito, a contatto con la pelle o se inalato. Non respirare la polvere/i fumi/i gas/la nebbia/i vapori/gli aerosol. Utilizzare soltanto all'aperto o in luogo ben ventilato. Indossare guanti/indumenti protettivi/proteggere gli occhi/il viso. <b>IN CASO DI INGESTIONE:</b> contattare immediatamente un CENTRO ANTIVELENI/un medico. <b>IN CASO DI INALAZIONE:</b> trasportare l'infortunato all'aria aperta e mantenerlo a riposo in posizione che favorisca la respirazione. Contattare un CENTRO ANTIVELENI/un medico in caso di malessere.
	Tampone di lavaggio concentrato (8X)	H302 H412 EUH032 P264 P270 P273 P301+310 P330	Nocivo se ingerito. Nocivo per gli organismi acquatici con effetti di lunga durata. A contatto con acidi libera gas molto tossici. Lavare accuratamente ... dopo l'uso. Non mangiare, né bere, né fumare durante l'uso. Non disperdere nell'ambiente. <b>IN CASO DI INGESTIONE:</b> contattare immediatamente un CENTRO ANTIVELENI/un medico. Sciacquare la bocca.

## 5. COMPONENTI DEL KIT

### 5.1 Soluzione di coniugato **CONJ**

Un flaconcino da 15 mL di anticorpo monoclonale murino marcato con fosfatasi alcalina diretto contro la transcobalamina umana in tampone Tris contenente stabilizzatore proteico. Conservante: <0,1% (p/vol) di sodio azide. Pronto per l'uso.

### 5.2 Soluzione di substrato **SUBS**



Un flaconcino da 15 mL di para-nitrofenil fosfato (pNPP), soluzione tampone. Pronto per l'uso. Conservare al riparo dalla luce.

N.B. NOCIVO.

### 5.3 Soluzione di arresto

**STOP**



Un flaconcino da 15 mL di idrossido di sodio 1M (pH >10).

Pronto per l'uso. N.B. CORROSIVO

### 5.4 Tampone di lavaggio concentrato

**WASH 8x**



Due flaconcini da 25 mL di tampone fosfato. Conservante: 0,72% (p/vol) di sodio azide.

Diluire prima dell'uso. N.B. NOCIVO.

### 5.5 Micropiastra

12 strip di microtitolazione x 8 pozzetti (separabili) rivestite con anticorpo monoclonale murino anti-olotranscobalamina in busta di alluminio risigillabile con essiccante.

### 5.6 Soluzione bianco

**BLANK**



Un flaconcino da 1 mL di tampone fosfato con stabilizzatore proteico (bovino).

### 5.7 Calibratori

**CAL 1-5**



Cinque flaconcini da 1 mL di tampone fosfato con stabilizzatore proteico (bovino) contenente HoloTC.

Conservante: <0,1% (p/vol) di sodio azide. Pronto per l'uso. Conservare al riparo dalla luce.

VEDERE LE ETICHETTE DEI FLACONCINI PER LE CONCENTRAZIONI.

### 5.8 Controlli

**CONTROL LOW CONTROL HIGH**



Un flaconcino di controllo basso e un flaconcino di controllo alto: 1 mL di tampone fosfato con stabilizzatore proteico (bovino) contenente HoloTC. Conservante: <0,1% (p/vol) di sodio azide.

Pronto per l'uso. Conservare al riparo dalla luce.

### 5.9 Soluzione pre-trattamento

**PRE**

Un flaconcino da 25 mL di tampone citrato. Conservante: <0,1% (p/vol) di sodio azide. Pronto per l'uso.

### 5.10 Istruzioni per l'uso

## 6. MATERIALI/ATTREZZATURE RICHIESTI MA NON FORNITI

1. Lettore di micropiastra/strip da 96 pozzetti con filtro a 405 nm.

2. Pipetta/e di precisione per dispensare 100  $\mu\text{L}$ . Pipettatore a 8 canali, o dispositivo simile, per dispensare circa 250-300  $\mu\text{L}$  per il lavaggio manuale.
3. Cilindro graduato in vetro/plastica 1x200 mL.
4. Acqua distillata/deionizzata.
5. Salviette di carta.
6. Timer per intervalli da 30, 35 e 60 minuti.

## **7. STANDARDIZZAZIONE**

Non esistono attualmente metodi di riferimento riconosciuti a livello internazionale o materiali di riferimento per la standardizzazione. I calibratori BIOHIT Active B12 (Holotranscobalamin) sono tracciabili secondo gli standard di riferimento interni, a cui sono stati assegnati valori in un'unica soluzione.

## **8. CONSERVAZIONE E STABILITÀ**

### **8.1 Stabilità del kit aperto (in uso)**

Un kit è stato aperto e riutilizzato in tre diverse occasioni in un periodo di tempo di tre mesi senza alcun effetto negativo sulle relative prestazioni. Dopo l'uso, i componenti devono essere conservati di nuovo a 2-8°C

### **8.2 Stabilità del kit non aperto**

A 2-8°C i componenti del kit non ancora aperti sono stabili come indicato sulle etichette

### **8.3 Note sulla manipolazione e la procedura**

1. Conservare i componenti del kit ad una temperatura di 2-8°C e utilizzarli entro la data di scadenza indicata sulle etichette. Non utilizzare reagenti scaduti
2. Tutti i lotti di reagenti e calibratori sono stati standardizzati per produrre la reazione corretta. Non scambiare i reagenti o i calibratori fra diversi lotti.
3. Le concentrazioni dei calibratori sono indicate sulle etichette dei flaconcini e possono variare da lotto a lotto.
4. Non congelare i kit.
5. Il tampone di lavaggio concentrato deve essere diluito prima dell'uso. Tutti gli altri reagenti sono pronti per l'uso.
6. Il tampone di lavaggio diluito rimane stabile per almeno 3 mesi se viene evitata la contaminazione microbica. Dopo l'uso conservare di nuovo a 2-8°C.
7. Riporre le strip di microtitolazione in eccesso (inutilizzate) nella busta di alluminio con l'essiccante. Controllare che la sigillatura sia completa e riportare a 2-8°C, fino al nuovo utilizzo.
8. Conservare i calibratori, i controlli e il substrato al riparo dalla luce.
9. Evitare la contaminazione dei reagenti. Utilizzare un nuovo puntale monouso del pipettatore per ogni campione o reagente manipolato.



## 8.4 Indicazioni di deterioramento

Il substrato deve essere incolore oppure presentare una colorazione giallo pallido. Una colorazione giallo più scuro indica la presenza di contaminazione e segnala che il reagente deve essere eliminato. La presenza di torbidità o precipitazione in qualsiasi componente è segno di deterioramento, quindi il componente deve essere eliminato.

## 9. PRELIEVO E CONSERVAZIONE DEI CAMPIONI

1. Il dosaggio è raccomandato per campioni di siero umano (comprese provette con separatore di siero).
2. Non utilizzare campioni emolizzati grossolanamente o torbidi.
3. Miscelare accuratamente i campioni scongelati prima di eseguire il dosaggio ed evitare ripetuti cicli di congelamento/scongelo.
4. I campioni possono subire 3 cicli di congelamento/scongelo. I campioni scongelati devono essere centrifugati a  $\geq 10.000$  g per 5 minuti prima di eseguire il dosaggio.
5. Non sottoporre i campioni sul coagulo o separati dal coagulo a temperature superiori alla temperatura ambiente per un intervallo di tempo maggiore di una notte ( $\leq 16$  ore).
6. I campioni possono essere conservati a 2-8°C sul coagulo per un massimo di 3 giorni o separati dal coagulo per quattro settimane; in caso di conservazione per periodi più lunghi, i campioni devono essere conservati separati dal coagulo a -20°C al massimo fino a 6 mesi.
7. Preparare ogni campione prima del dosaggio aggiungendo un uguale volume di pre-trattamento al campione, ad. es. 150  $\mu$ L di campione più 150  $\mu$ L di pre-trattamento. I campioni pre-trattati possono essere conservati coperti fino a 24 ore a una temperatura di 2-8°C prima del dosaggio.

## 10. PROCEDURA DEI TEST

### 10.1 Preparazione

#### *Preparazione per il dosaggio*

Prima dell'uso portare tutti i componenti del kit, comprese le strip di microtitolazione, a 18-25°C per 30-60 minuti. Miscelare i reagenti capovolgendoli delicatamente.

Se conservato a 2-8°C, il tampone di lavaggio precipita (possono apparire dei cristalli). Prima della diluizione in acqua, far riscaldare il tampone di lavaggio (se necessario, ponendolo in un incubatore a 37°C per velocizzare il processo) finché a occhio nudo **NON** è più visibile alcuna precipitazione.

Diluire il reagente seguente e miscelarlo accuratamente:

Reagente	Volume	Aggiungere
Tampone di lavaggio concentrato (8X) distillata/deionizzata	1 flaconcino	175 mL di acqua

Calcolare il numero di strip di microtitolazione necessarie per il dosaggio e assicurarle nel supporto per strip di microtitolazione. Riporre le strip restanti nella busta di alluminio risigillabile con l'essiccante e conservare a 2-8°C fino a un nuovo utilizzo. Assicurarsi che tutte le strip siano saldamente trattenute nell'apposito supporto. Se lo

desiderano, gli operatori possono numerare ciascuna strip sul bordo superiore per facilitarne l'identificazione.

Conservare il supporto per strip di microtitolazione per gli usi successivi.

Preparare ogni campione prima del dosaggio aggiungendo un uguale volume di pre-trattamento al campione, ad. es. 150  $\mu$ L di campione piú 150  $\mu$ L di pre-trattamento. I campioni pre-trattati possono essere conservati coperti fino a 24 ore a una temperatura di 2-8°C prima del dosaggio.

## 10.2 Protocollo del dosaggio

1. Definire il rispettivo riferimento dei pozzetti per l'identificazione.
2. Pipettare nei relativi pozzetti 100  $\mu$ L dei calibratori in duplicato, i controlli del kit in duplicato e i campioni dei pazienti pre-trattati (50:50) in duplicato. Ricordarsi di cambiare il puntale del pipettatore tra un'operazione e l'altra. Questa fase non deve durare piú di 15 minuti.
3. Incubare per 60 $\pm$ 10 minuti a 18-25°C.
4. Decantare il contenuto delle strip capovolgendole rapidamente su un lavabo idoneo allo smaltimento di materiali biologici, tenendo presente il potenziale rischio di infezione correlato ai campioni. Asciugare bene le strip capovolte con salviette di carta. **Non lavare.**
5. Aggiungere 100  $\mu$ L di coniugato a ciascun pozzetto.
6. Incubare per 35 $\pm$ 5 minuti a 18-25°C.
7. Decantare il contenuto delle strip capovolgendole rapidamente su un lavabo idoneo allo smaltimento di materiali biologici. Asciugare bene le strip capovolte con salviette di carta.
8. Lavare i pozzetti per **cinque volte** con almeno 250  $\mu$ L di tampone di lavaggio diluito. **Decantare e asciugare dopo ciascuna fase di lavaggio.**
9. Aggiungere 100  $\mu$ L di substrato a ciascun pozzetto.
10. Incubare per 30 $\pm$ 5 minuti a 18-25°C. **Non decantare.**
11. Aggiungere 100  $\mu$ L di soluzione di arresto a ciascun pozzetto, nello stesso ordine e con gli stessi tempi di aggiunta del substrato. Picchiare delicatamente sui pozzetti per miscelarli.
12. Leggere le strip a 405 nm. Effettuare la lettura entro 120 minuti dall'aggiunta della soluzione di arresto.

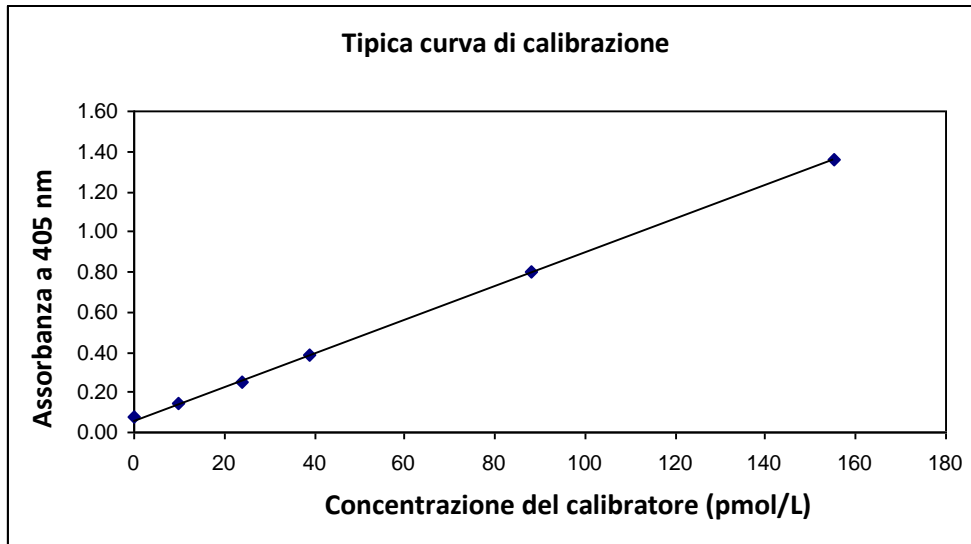
## 11. RISULTATI

### 11.1. Calcolo e interpretazione dei risultati

Rappresentare graficamente il valore medio di assorbanza di ciascun calibratore sull'asse y rispetto alla corrispondente concentrazione in pmol/L sull'asse x. **LE CONCENTRAZIONI DEI CALIBRATORI SONO INDICATE SULLE ETICHETTE DEI FLACONCINI. I VALORI DI CONCENTRAZIONE SONO ASSEGNATI A OGNI LOTTO DI CALIBRATORI E POSSONO VARIARE DA LOTTO A LOTTO.**

La concentrazione (pmol/L) di ogni campione può essere calcolata localizzando sulla curva il punto corrispondente al valore medio di assorbanza del campione e leggendo la corrispondente concentrazione in pmol/L dall'asse x. Questa procedura può essere eseguita manualmente utilizzando carta per grafici oppure usando un lettore di piastre il cui software integri procedure di curve fitting. Se si utilizza un lettore di micropiastre con software interno, si raccomanda di usare un **algoritmo di curve fitting di regressione lineare.**

A scopo di riferimento, qui di seguito è mostrato un tipico grafico di calibrazione (Figura 1) che tuttavia non deve essere utilizzato per l'interpretazione dei risultati. I campioni con concentrazioni superiori a 128 pmol/L sono esterni al range del dosaggio e devono essere registrati come >128pmol/L; pertanto i relativi risultati non devono essere estrapolati. Singoli replicati di campioni con deviazione inferiore al 20% possono essere assunti per indicare l'accettabilità del dosaggio.



**Figura 1.** Tipica curva di calibrazione del dosaggio BIOHIT Active B12 (Holotranscobalamin).

#### **Unità di misura**

L'unità di misura del dosaggio BIOHIT Active B12 (Holotranscobalamin) è pmol/L.

#### **Intervallo di misurazione (range riportabile)**

Il range misurabile del dosaggio è compreso fra 10 pmol/L e 128 pmol/L.

## **11.2 Controllo di qualità**

Assicurarsi che la manutenzione e la taratura del lettore di micropiastre siano state eseguite conformemente alle istruzioni del produttore e che vengano utilizzati la lunghezza d'onda (405 nm) e l'algoritmo di curve fitting (regressione lineare) corretti.

Gli operatori devono avere una conoscenza completa e approfondita delle istruzioni del dosaggio, in particolare delle sezioni Avvertenze e precauzioni e Note sulla manipolazione e sulla procedura. Prima di refertare i risultati dei test dei pazienti, gli operatori devono inoltre dimostrare di essere in grado di ottenere prestazioni di precisione e di range riportabile dei risultati, confrontabili a quelle stabilite dal produttore. In tutti i dosaggi occorre testare in duplicato un controllo basso e un controllo alto del kit pronti per l'uso, allo scopo di controllare la qualità della procedura di analisi.

Ipotizzando che le specifiche di precisione descritte dal produttore vengano rispettate, se un controllo non soddisfa le specifiche dei controlli sotto riportate, il dosaggio non è da ritenersi valido e i risultati del paziente non devono essere refertati. Una volta rivista la procedura, l'operatore può ripetere il dosaggio oppure contattare il produttore.

Se si ripete il dosaggio, occorre preparare una nuova diluizione di ciascun campione. I laboratori possono decidere di includere controlli interni in ciascuna sessione di dosaggio. Conservare il materiale di controllo a una temperatura pari o inferiore a -20°C ed evitare ripetuti congelamenti/scongelamenti. I conservanti, come il sodio azide a <0,1% (p/v), non influenzano i risultati dei campioni.

I range di riferimento e i punti di cut-off corretti devono essere calcolati per le popolazioni specifiche di cui si occupano gli operatori.

**Tabella 1.** Specifiche dei controlli basso e alto.

<b>Specifiche dei controlli</b>	<b>Controllo basso</b>	<b>Controllo alto</b>
Media del duplicato	da 15 a 35 pmol/L	da 36 a 84 pmol/L

### 11.3 Valori attesi

135 campioni sierici da donatori asintomatici apparentemente sani, di età compresa tra 18 e 75 anni, comprendenti un numero di maschi [n = 65] e femmine [n = 70] pressoché uguale, sono stati sottoposti a immunodosaggio BIOHIT Active B12 (Holotranscobalamin).

La concentrazione media totale di BIOHIT Active B12 (Holotranscobalamin) per questa popolazione è risultata di 72 pmol/L (range da 15 a 147 pmol/mL). Sulla base di questi dati ottenuti dalla popolazione di riferimento, il range di riferimento (95% centrale dei risultati) è il seguente:

<b>Range di riferimento</b>	da 21 a 123 pmol/L
-----------------------------	--------------------

Questo range di riferimento vale esclusivamente come indicazione di massima, quindi ciascun laboratorio dovrà stabilire il proprio range di riferimento specifico della popolazione che prende in esame, tenendo conto dei fattori geografici, demografici, dietologici e ambientali oppure di quelli correlati alla pratica clinica.

## 12. DATI RELATIVI ALLE PRESTAZIONI

Dati rappresentativi; i risultati possono variare da laboratorio a laboratorio.

### 12.1 Linearità di diluizione

In base a uno studio condotto secondo le linee guida del documento CLSI EP6-A<sup>10</sup>, l'immunodosaggio BIOHIT Active B12 (Holotranscobalamin) ha dimostrato linearità da 5,3 a 156,0 pmol/L (arrotondato a un decimale); i risultati dei singoli laboratori possono variare rispetto a questi dati.

### 12.2 Accuratezza

È stato condotto uno studio di correlazione con campioni di siero ottenuti da adulti apparentemente sani. Tutti i campioni sono stati analizzati con l'immunodosaggio BIOHIT Active B12 (Holotranscobalamin) e un dosaggio commerciale per l'olotranscobalamina secondo il documento CLSI EP9-A2<sup>11</sup>. Le concentrazioni dei campioni erano comprese nel range da 13,8 a 112,8 pmol/L. La Tabella 2 mostra i valori statistici ottenuti.

**Tabella 2.** Immunodosaggio BIOHIT Active B12 (Holotranscobalamin) versus dosaggio commerciale

Immunodosaggio BIOHIT Active B12 (Holotranscobalamin) versus dosaggio commerciale	
Numero di campioni	111
Pendenza della linea di regressione (regressione di Passing-Bablok) (IC al 95%)	0,95 (da 0,89 a 1,01)
Intercetta Y (regressione di Passing-Bablok) (IC al 95%)	8,39 (da 5,73 a 11,77)
Coefficiente di correlazione (r) (Pearson) (IC al 95%)	0,93 (da 0,90 a 0,95)

### 12.3 Precisione

Sette (7) campioni di siero umano sono stati analizzati utilizzando 3 lotti di reagenti. I campioni sono stati analizzati da 2 operatori in replicati di 8, una volta al giorno per 5 giorni (totale n=80). I dati di questo studio sono sintetizzati nella Tabella 3.

**Tabella 3.** Dati di precisione

Campione	n	Lotto	Operatore	Media (pmol/L)	Intra-saggio %CV	Totale %CV
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%
Controllo basso	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%
Controllo alto	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 Limite del bianco

In uno studio rappresentativo le determinazioni del limite del bianco (LOB) sono state eseguite utilizzando campioni di olotranscobalamina a basso livello e due lotti di reagenti (120 replicati per ogni lotto di reagenti). Il limite del bianco dell'immunodosaggio BIOHIT Active B12 (Holo-transcobalamin) è risultato di 4,9 pmol/L (arrotondato a un decimale).

## 12.5 Limite di rilevamento

In uno studio rappresentativo le determinazioni del limite di rilevamento (LOD) sono state eseguite utilizzando cinque campioni di olotranscobalamina a basso livello e due lotti di reagenti (120 replicati per ogni lotto di reagenti). Il limite di rilevamento dell'immunodosaggio BIOHIT Active B12 (Holo transcobalamin) è risultato di 8,1 pmol/L (arrotondato a un decimale).

## 12.6 Limite di quantificazione

Le determinazioni del limite di quantificazione sono state eseguite utilizzando cinque campioni di olotranscobalamina a basso livello e due lotti di reagenti (120 replicati per ogni lotto di reagenti). Il limite di quantificazione dell'immunodosaggio BIOHIT Active B12 (Holo transcobalamin) è risultato di 8,3 pmol/L (arrotondato a un decimale).

## 12.7 Effetto gancio ad alte dosi

L'effetto gancio ad alte dosi è un fenomeno per cui campioni con livelli molto elevati possono rientrare nel range dinamico del dosaggio. Per l'immunodosaggio BIOHIT Active B12 (Holo transcobalamin) non è stato osservato alcun effetto gancio analizzando due campioni con una concentrazione di circa 419 e 2236 pmol/L.

## 12.8 Cross-reattività

L'immunodosaggio BIOHIT Active B12 (Holo transcobalamin) è studiato per presentare la massima deviazione della concentrazione di olotranscobalamina ( $\leq 10\%$ ) in presenza di apotranscobalamina o aptocorrina. È stato condotto uno studio basato sulle linee guida del documento del Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI) EP7-A2<sup>12</sup>. A tre campioni con livelli di olotranscobalamina compresi entro il range del dosaggio sono stati aggiunti 500 pmol/L di apotranscobalamina o 5000 pmol/L di aptocorrina. La deviazione massima della concentrazione di olotranscobalamina è risultata compresa fra -5% e 1%.

## 12.9 Interferenza

L'immunodosaggio BIOHIT Active B12 (Holo transcobalamin) è studiato per presentare la massima deviazione della concentrazione di olotranscobalamina ( $\leq 10\%$ ) in presenza di composti potenzialmente interferenti. È stato condotto uno studio basato sulle linee guida del documento del Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI) EP7-A2<sup>12</sup>. A campioni con livelli di olotranscobalamina compresi entro il range del dosaggio sono stati aggiunti i composti potenzialmente interferenti elencati nella Tabella 4, qui di seguito. La deviazione massima della concentrazione di olotranscobalamina è risultata compresa fra -10% e 8%.



**Tabella 4.** Elenco dei composti potenzialmente interferenti analizzati.

Sostanza potenzialmente interferente	Nessuna interferenza riscontrata fino alla concentrazione seguente
Emoglobina	500 mg/dL
Bilirubina	30 mg/dL
Trigliceridi (soluzione di intralipidi)	3000 mg/dL
Fattore reumatoide	7500 IU/dL
Proteine totali	9000 mg/dL

### **13. GARANZIA**

Biohit è tenuto a porre rimedio a tutti i difetti scoperti in qualsiasi Prodotto (“Prodotto difettoso”) causati dall’uso di materiali non adeguati o da errori di lavorazione che impediscano il funzionamento meccanico o l’uso previsto dei Prodotti, tra cui, ma non in modo limitativo, le funzioni indicate nelle specifiche sui Prodotti fornite da Biohit. **QUALSIASI GARANZIA VERRÀ TUTTAVIA RITENUTA NULLA SE I DIFETTI SONO STATI CAUSATI DA ABUSO, USO ERRATO, DANNI ACCIDENTALI, CONSERVAZIONE O UTILIZZO ERRATO DEI PRODOTTI IN OPERAZIONI CHE ESULANO DAI LIMITI O DALLE SPECIFICHE INDICATE, IN MODO NON CONFORME ALLE INDICAZIONI FORNITE NEL MANUALE DI ISTRUZIONI.** Il periodo di garanzia è definito nel manuale di istruzioni dei Prodotti e ha inizio dalla data in cui il Prodotto rilevante viene inviato da Biohit. Questo kit diagnostico Biohit è stato prodotto in conformità con i protocolli di gestione della qualità ISO 9001/ISO 13485. In caso di controversie interpretative si applica il testo in lingua inglese.

### **14. INFORMAZIONI PER LE ORDINAZIONI**

















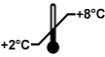




BIOHIT Active B12 (Holotranscobalamin)      Cat. No 602 290

### **15. DATA DI PUBBLICAZIONE**

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

## 16. BIBLIOGRAFIA

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*.

	Per uso diagnostico <i>in vitro</i>		Controllo basso
	Numero di catalogo		Controllo alto
	Codice lotto		Coniugato
	96 test		Substrato
	Attenzione		Soluzione di arresto
	Leggere le istruzioni per l'uso		Pre-trattamento
	Tenere al riparo dalla luce		Tampone di lavaggio concentrato (8x)
	Data di scadenza		Bianco
	Conservare a 2-8°C		Calibratori 1-5
	Non riutilizzare		Corrosivo
			Nocivo

**Sede centrale**

**BIOHIT OYJ**

Laippatie 1

00880 Helsinki, Finland

Tel: +358 9 773 861

Fax: +358 9 773 86200

E-mail: [info@biohit.fi](mailto:info@biohit.fi)

[www.biohithealthcare.com](http://www.biohithealthcare.com)

400920-02