

BIOHIT HealthCare

Innovating for Health



BIOHIT ACTIVE B12
(HOLOTRANSCOBALAMIN)
NÁVOD NA POUŽITIE

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. URČENÉ POUŽITIE	4
2. ÚVOD	4
3. PRINCÍP TESTU	4
4. UPOZORNENIA A BEZPEČNOSTNÉ OPATRENIA.....	5
5. OBSAH SÚPRAVY	6
5.1 Roztok konjugátu	6
5.2 Roztok substrátu	6
5.3 Zastavovací roztok.....	7
5.4 Premývací pufrovaný koncentrát	7
5.5 Mikrotitračná dosička	7
5.6 Prázdny roztok.....	7
5.7 Kalibrátory.....	7
5.8 Kontrolné roztoky	7
5.9 Roztok Pre-treatment (na predprípravu).....	7
5.10 Návod na použitie	8
6. MATERIÁLY/ZARIADENIE POTREBNÉ, ALE NEDODÁVANÉ	8
7. ŠTANDARDIZÁCIA.....	8
8. UCHOVÁVANIE A STABILITA	8
8.1 Stabilita otvorenej súpravy.....	8
8.2 Stabilita neotvorenej súpravy.....	8
8.3 Poznámky k manipulácii a postupu	8
8.4 Indikácie zhoršenia kvality	9
9. ODBER A SKLADOVANIE VZORIEK	9
10. TESTOVACÍ POSTUP	9
10.1 Príprava	9
10.2 Testovací protokol	10
11. VÝSLEDKY	11
11.1. Výpočet a interpretácia	11
11.2 Kontrola kvality	12

11.3 Očakávané hodnoty	12
12. TECHNICKÉ ÚDAJE	13
12.1 Linearita riedenia	13
12.2 Presnosť	13
12.3 Presnosť	13
12.4 Hranica prázdnej vzorky	14
12.5 Hranica detekcie	15
12.6 Hranice kvantifikácie	15
12.7 Efekt vysokej dávky (hook effect)	15
12.8 Krížová reaktivita	15
12.9 Interferencia	15
13. ZÁRUKA	16
14. OBJEDNÁVKOVÉ INFORMÁCIE	16
15. DÁTUM VYDANIA	16
16. POUŽITÁ LITERATÚRA	17

1. URČENÉ POUŽITIE

Analýza BIOHIT Active-B12 (Holotranscobalamin) je testovacia metóda enzyme-immunoassay (EIA) na kvantitatívne určenie holotranskobalamínu (HoloTC) v ľudskom sére. HoloTC (vitamín B12 viazaný na kobalamín) sa používa ako podpora v diagnostike a liečbe nedostatku vitamínu B12.

2. ÚVOD

Na preprave vitamínu B12 v organizme sa podieľajú tri väzobné proteíny: vnútorný faktor (= intrinsic factor – IF), transkobalamín (= transcobalamin – TC) a haptokorín (= haptocorrin – HC). Tieto väzobné proteíny zabezpečujú efektívne uchopenie veľmi malých množstiev vitamínu B12 dostupného v strave. Keď TC a HC viažu vitamín B12, výsledné komplexy sú známe pod názvom holotranskobalamín (= HoloTC) a holohaptokorín (= HoloHC), aby boli odlíšené od proteínov, ktoré nedopravujú žiaden vitamín.

Najväčší podiel na obehu – HoloHC predstavuje 70 – 90% vitamínu B12 v krvi, no biologicky je inertný. HoloTC predstavuje len 10 – 30 % vitamínu B12, cirkulujúceho v krvi, no je to jediná forma vitamínu B12, ktorú sú schopné prijať bunky v organizme. TC proteín sám dopravuje vitamín B12 z miesta jeho absorpcie v ileu do tkanív a buniek. Potom je vitamín internalizovaný ako komplex HoloTC (vitamín B12 naviazaný na transkobalamín) cez príjem sprostredkovaný špecifickými receptormi. Tento proces dodáva vitamín B12 do buniek organizmu a zabezpečuje vitamín ako koenzým pre podstatné bunkové funkcie, ako je syntéza DNA.

Keďže HoloTC má v porovnaní s HoloHC kratší obehový polčas, najskoršia zmena, ktorá sa vyskytne pri nástupe zápornej rovnováhy vitamínu B12, je s veľkou pravdepodobnosťou zníženie sérovej koncentrácie HoloTC¹.

Meranie celkového obsahu B12 v sére má isté obmedzenia; predovšetkým to, že väčšia časť meraného kobalamínu je viazaná na biologicky inertný HC. Bolo publikovaných niekoľko štúdií, ktoré usudzujú, že HoloTC by bol lepším indikátorom stavu vitamínu B12, ako celkový obsah B12^{2,3} v sére. Predpokladá sa, že hladiny HoloTC sú u pacientov s biochemickými príznakmi nedostatku vitamínu B12 nízke⁴.

Nízke hodnoty boli zaznamenané u vegetariánov⁵, vegánov⁶ a v populáciách s nízkym príjmom vitamínu B12⁷. Je pozoruhodné, že nízke hladiny HoloTC, ale nie celkového B12 v sére, boli zaznamenané u pacientov s Alzheimerovou chorobou v porovnaní s hladinami u zdravej kontrolnej skupiny⁸. Hladiny HoloTC odrážajú stav vitamínu B12 nezávisle od poslednej absorpcie vitamínu⁹.



3. PRINCÍP TESTU

Mikrotitračné jamky sú potiahnuté vysoko špecifickou protilátkou proti BIOHIT Active B12 (Holotranscobalamin). Počas prvej inkubácie holotranskobalamín v sére sa špecificky naviaže na povrch potiahnutý protilátkou. Pri druhej inkubácii sa konjugát viaže na akýkoľvek zachytený holotranskobalamín. Jamky sa potom opláchnu, aby sa odstránili nenaviazané zložky. Naviazaný holotranskobalamín je detegovaný inkubáciou so substrátom. Pridanie zastavovacieho roztoku (stop roztoku) ukončí reakciu, ktorej výsledkom je sfarbený konečný produkt. Koncentrácia holotranskobalamínu v pmol/l je priamo úmerná vygenerovanému sfarbeniu a dá sa stanoviť interpoláciou krivky závislosti medzi dávkou a reakciou založenej na kalibrátoroch.

4. UPOZORNENIA A BEZPEČNOSTNÉ OPATRENIA

Určené len na použitie pri *in vitro* diagnostike. Bezpečnostné opatrenia

1. Dodržujte dôsledne všetky pokyny uvedené v tejto brožúrke, najmä pri manipulácii a podmienkach skladovania.
2. Nepipetujte ústami.
3. V priestoroch, v ktorých sa manipuluje so súpravami a vzorkami, nefajčíte, nejedzte, nepite, ani nepoužívajte kozmetiku.
4. Všetky kožné neduhy, rezy, odreniny a iné kožné lézie musia byť primerane chránené.
5. Kalibrátory, kontroly, konjugáty, Pre-Treatment a premývacie pufované koncentráty obsahujú azid sodný, ktorý v odpadovom potrubí môže reagovať s olovom alebo meďou a vytvárať vysoko výbušné azidy týchto kovov. Pri likvidácii splachujte veľkým množstvom vody, aby ste zabránili hromadeniu azidov.
6. Zastavovací roztok obsahuje hydroxid sodný. Vyhnite sa kontaktu činidla s pokožkou a očami. Rozliata tekutina sa musí utrieť handrou namočenou vo veľkom množstve vody. V prípade kontaktu s kožou alebo očami okamžite vypláchnite veľkým množstvom vody a vyhľadajte lekársku pomoc.
7. Karty bezpečnostných údajov o všetkých nebezpečných zložkách v tejto súprave vám na vyžiadanie poskytne spoločnosť Biohit Oyj.
8. Tento produkt vyžaduje manipuláciu so vzorkami a materiálmi ľudského a zvieracieho pôvodu. Odporúča sa, aby boli materiály ľudského a zvieracieho pôvodu považované za potenciálne infekčné a bolo s nimi zaobchádzané v súlade s tým, ako popisuje štandard OSHA (Standard on Bloodborne Pathogens Biosafety Level 2), alebo použitím vhodných postupov biologickej bezpečnosti u materiálov, ktoré obsahujú alebo existuje podozrenie, že obsahujú infekčné látky.

 KORÓZNY	Zastavovací roztok	H314 P264 P280 P305+351+338	Povzroča hude opekline kože in poškodbe oči. Po uporabi temeljito umiti ... Nositi zaščitne rokavice/zaščitno obleko/zaščito za oči/zaščito za obraz. PRI STIKU Z OČMI: previdno izpirajte z vodo nekaj minut. Odstranite kontaktne leče, če jih imate in če to lahko storite brez težav. Nadaljujte z izpiranjem.
 ŠKODLIVÝ	Substrát	H302+312+332 P260 P271 P280 P301+310 P304+340 P312	Zdravju škodljivo pri zaužitju, v stiku s kožo ali pri vdihavanju. Ne vdihavati prahu/dima/plina/meglice/hlapov/razpršila. Uporabljati le zunaj ali v dobro prezračevanem prostoru. Nositi zaščitne rokavice/zaščitno obleko/zaščito za oči/zaščito za obraz. PRI ZAUŽITJU: Takoj pokličite CENTER ZA ZASTRUPITVE/zdravnika. PRI VDIHAVANJU: Prenesti osebo na svež zrak in jo pustiti v udobnem položaju, ki olajša dihanje. Ob slabem počutju pokličite CENTER ZA ZASTRUPITVE/zdravnika.
	Premývací pufrovaný koncentrát (8X)	H302 H412 EUH032 P264 P270 P273 P301+310 P330	Zdravju škodljivo pri zaužitju. Škodljivo za vodne organizme, z dolgotrajnimi učinki. V stiku s kisljinami se sprošča zelo strupen plin. Po uporabi temeljito umiti ... Ne jesti, piti ali kaditi med uporabo tega izdelka. Preprečiti sproščanje v okolje. PRI ZAUŽITJU: Takoj pokličite CENTER ZA ZASTRUPITVE/zdravnika. Izprati usta.

5. OBSAH SÚPRAVY

5.1 Roztok konjugátu

Jedna 15 ml liekovka myšacej monoklonálnej protilátky proti ľudskému transkobalamínu v pufrí Tris s proteínovým stabilizátorom označená alkalickou fosfatázou. Konzervačný prostriedok: < 0,1 % (w/v) azid sodný. Pripravený na priame použitie.

5.2 Roztok substrátu

Jedna 15 ml liekovka para-nitrofenylfosfátu (pNPP), pufrovaného roztoku. Pripravený na priame použitie.
Nevystavujte svetlu počas skladovania.
POZOR! ŠKODLIVÝ.

5.3 Zastavovací roztok **STOP**



Jedna 15 ml liekovka 1M hydroxidu sodného, (pH >10).

Pripravený na priame použitie. POZOR! KORÓZNY.

5.4 Premývací pufrovaný koncentrát **WASH 8x**



Dve 25 ml liekovky fosfátového pufru. Konzervačný prostriedok: 0,72 % (w/v) azid sodný.

Nariediť pred použitím. POZOR! ŠKODLIVÝ.

5.5 Mikrotitračná dosička

12 x 8 mikrotitračných (odlomiteľných) prúžkov potiahnutých myšacou monoklonálnou protilátkou proti holotranskobalamínu v zнову zalepiteľnej obalovej fólii s desikantom.

5.6 Prázdny roztok **BLANK**



Jedna 1 ml liekovka fosfátového pufru s proteínovým (bovinným) stabilizátorom.

5.7 Kalibrátory **CAL 1-5**



Päť 1 ml liekoviek fosfátového pufru s proteínovým (bovinným) stabilizátorom obsahujúcim HoloTC.

Konzervačný prostriedok: < 0,1 % (w/v) azid sodný. Pripravený na priame použitie. Nevystavujte svetlu počas skladovania.

POZRI KONCENTRÁCIE NA ŠTÍTKOCH LIEKOVIEK.

5.8 Kontrolné roztoky **CONTROL LOW CONTROL HIGH**



Jedna liekovka kontrolného roztoku s nízkou hladinou a jedna liekovka kontrolného roztoku s vysokou hladinou:

1 ml fosfátového pufru s proteínovým (bovinným) stabilizátorom obsahujúcim HoloTC. Konzervačný prostriedok: < 0,1 % (w/v) azid sodný.

Pripravený na priame použitie. Nevystavujte svetlu počas skladovania.

5.9 Roztok Pre-treatment (na predprípravu) **PRE**

Jedna 25 ml liekovka citrátového pufru. Konzervačný prostriedok: < 0,1 % (w/v) azid sodný. Pripravený na priame použitie.

5.10 Návod na použitie

6. MATERIÁLY/ZARIADENIE POTREBNÉ, ALE NEDODÁVANÉ

1. Čítačka 96-jamkovej platničky/prúžku so 405 nm filtrom.
2. Mikropipety na dávkovanie 100 µl. 8-kanálový dávkovač alebo podobné zariadenie na dávkovanie približne 250 – 300 µl na ručné umývanie.
3. Odmerné valce zo skla alebo plastu: 1x200 ml.
4. Destilovaná/deionizovaná voda.
5. Papierové utierky.
6. Časovač 30-, 35- a 60-minútových intervalov.

7. ŠTANDARDIZÁCIA

V súčasnosti neexistuje žiadna medzinárodne uznávaná referenčná metóda alebo referenčný materiál pre štandardizáciu. Kalibrátory testu BIOHIT Active-B12 (Holo-transcobalamin) je možné vysledovať až k interným referenčným štandardom, ktoré sa podrobili priradeniu jednorazovej hodnoty.

8. UCHOVÁVANIE A STABILITA

8.1 Stabilita otvorenej súpravy

Súprava bola otvorená a opakovane použitá pri troch príležitostiach v priebehu troch mesiacov bez akýchkoľvek nežiaducich účinkov na jej výkonnosť. Po použití sa komponenty musia vrátiť a skladovať pri teplote 2 – 8 °C.

8.2 Stabilita neotvorenej súpravy

Komponenty neotvorenej súpravy sú stabilné pri teplote 2 – 8 °C do dátumu vyznačeného na štítkoch.

8.3 Poznámky k manipulácii a postupu

1. Zložky súpravy skladujte pri 2 – 8 °C a používajte až do uplynutia dátumu expirácie vyznačeného na štítkoch. Nepoužívajte exspirované činidlá.
2. Každá šarža činidiel a kalibrátorov bola štandardizovaná, aby vyprodukovala správnu reakciu. Nevymieňajte činidlá alebo kalibrátory medzi šaržami.
3. Koncentrácie kalibrátora sú uvedené na štítkoch liekoviek a môžu sa líšiť medzi šaržami.
4. Súpravy nezmrazujte.
5. Premývací pufrovaný koncentrát sa musí pred použitím zriediť. Všetky ostatné činidlá sú pripravené na použitie.
6. Zriedený premývací pufor je stabilný najmenej 3 mesiace, ak sa zabráni mikrobiálnej kontaminácii. Po každom použití uskladnite opäť pri teplote 2 – 8 °C.
7. Prebytočné (nepoužitú) mikrotitračné prúžky vráťte do obalovej fólie s desikantom. Presvedčte sa, či je uzáver neporušený a vráťte ich do 2 – 8 °C, až pokiaľ ich znovu nepotrebujete.
8. Nevystavujte kalibrátory, kontrolné roztoky alebo substrát svetlu počas skladovania.

9. Vyvarujte sa kontaminácie činidiel. Pri každej manipulácii s činidlom alebo vzorkou použite nový jednorazový hrot pipety.

8.4 Indikácie zhoršenia kvality

Substrát musí byť bezfarebný, až bledožltá sfarbený. Tmavšie žlté sfarbenie indikuje kontamináciu a činidlo sa musí zlikvidovať. Zákal alebo vyzrážanie v ktorejkoľvek zložke indikuje rozklad a taká zložka sa musí znehodnotiť.

9. ODBER A SKLADOVANIE VZORIEK

1. Analýza sa odporúča pre testovanie ľudského séra (včítane skúmaviek na separáciu séra – SST).
2. Nepoužívajte makroskopicky hemolyzované alebo zakalené vzorky.
3. Rozmrazené vzorky pred analýzou dôkladne premiešajte a vyvarujte sa opakovaného zmrazenia a rozmrazenia
4. Vzorky môžu prejsť 3 cyklami zmrazenia. Pred testovaním sa musia rozmrazené vzorky centrifugovať po dobu 5 minút pri $g \geq 10\,000$.
5. Vzorky obsahujúce zrazeniny alebo bez nich nevystavujte teplote vyššej než izbovej po dobu dlhšiu než cez noc (≤ 16 hodín).
6. Vzorky obsahujúce zrazeniny možno skladovať pri teplote $2 - 8\text{ }^{\circ}\text{C}$ až 3 dni, resp. štyri týždne vzorky neobsahujúce zrazeniny; pre dlhšie skladovanie musia byť vzorky skladované bez zrazenín pri teplote $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ až po dobu 6 mesiacov.
7. Každú vzorku pripravte pred testom pridaním rovnakého množstva Pre-Treatment to Sample (Predpríprava vzorky), napr. 150 μl vzorky plus 150 μl roztoku Pre-Treatment. Predprípravené vzorky sa môžu pred testom skladovať uzavreté po dobu 24 h pri teplote $2 - 8\text{ }^{\circ}\text{C}$.

10. TESTOVACÍ POSTUP

10.1 Príprava

Príprava na analýzu

Umožnite všetkým zložkám súpravy, včítane mikrotitračných prúžkov, aby sa po dobu 30 – 60 minút pred použitím ohriali na $18 - 25\text{ }^{\circ}\text{C}$. Činidlá premiešajte ich jemným prevracaním.

Pri uskladnení pri teplote $2 - 8\text{ }^{\circ}\text{C}$ sa premývací pufor vyzráža (kryštálíky budú viditeľné). Pred rozpustením vo vode nechajte premývací roztok, aby sa zohrial (ak je nutné tento proces urýchliť, môže sa pufor umiestniť do inkubátora pri $37\text{ }^{\circ}\text{C}$), až pokiaľ nie je voľným okom vidieť **ŽIADNU** zrazeninu.

Nasledujúce činidlá zriedte a dôkladne premiešajte.

Činidlo	Objem	Pridať
Premývací pufrovaný koncentrát (8X) destilovanej/deionizovanej vody	1 liekovka	175 ml

Vypočítajte počet mikrotitračných prúžkov, ktoré budete potrebovať pre aktuálnu analýzu a umiestnite ich do držiaka mikrotitračných prúžkov. Zvyšné prúžky vráťte do znovu zalepiteľnej obalovej fólie s desikantom a uskladnite pri teplote 2 – 8 °C, až kým ich opäť nepotrebujete. Zabezpečte, aby všetky prúžky boli bezpečne uchytené v držiaku mikrotitračných prúžkov. Na uľahčenie identifikácie môžu používatelia chcieť, aby každý prúžok bol očíslovaný pozdĺž vrchného okraja. Uchovajte držiak mikrotitračných krúžkov na budúce použitie.

Každú vzorku pripravte pred testom pridaním rovnakého množstva Pre-Treatment to Sample (Predpríprava vzorky), napr. 150 µl vzorky plus 150 µl roztoku Pre-Treatment. Predpripravené vzorky sa môžu pred testom skladovať uzavreté po dobu 24 h pri teplote 2 – 8 °C.

10.2 Testovací protokol

1. Referenčné jamky na identifikáciu.
2. Do vhodných jamôk napipetujte dvojmo 100 µl kalibrátorov, dvojmo kontrolné roztoky súpravy a tak isto dvojmo napipetujte predriedené (50 : 50) vzorky pacientov. Nezapodniete vymeniť hroty pipiet medzi jednotlivými pridaniami. Tento krok by nemal trvať dlhšie ako 15 minút.
3. Inkubujte 60 ± 10 minút pri 18 – 25 °C.
4. Obsah prúžkov zlejte rýchlym prevrátením nad výlevkou vhodnou pre znehodnotenie biologických materiálov, pri čom majte na pamäti možné nebezpečenstvo infekcie vzorkami. Prevrátené prúžky dôkladne vysajte pomocou papierových utierok. **Neoplachujte.**
5. Do každej jamky pridajte 100 µl konjugátu.
6. Inkubujte 35 ± 5 minút pri 18 – 25 °C.
7. Obsah prúžkov zlejte rýchlym prevrátením nad výlevkou vhodnou na znehodnotenie biologických materiálov. Prevrátené prúžky dôkladne vysajte pomocou papierových utierok.
8. Jamky prepláchnite **päť razy** minimálne 250 µl zriedeného premývacieho pufru. **Zlejte a vysušte po každom pridaní premývacieho roztoku.**
9. Do každej jamky pridajte 100 µl substrátu.
10. Inkubujte 30 ± 5 minút pri 18 – 25 °C. **Nedekantujte.**
11. Do každej jamky pridajte 100 µl zastavovacieho roztoku, a to v rovnakom poradí a miere, ako ste pridali substrát. Jemne poklepte po jamkách, aby sa obsah premiešal.
12. Prúžky odčítajte pri 405 nm. Odčítajte v rozpätí 120 minút od pridanía zastavovacieho roztoku.

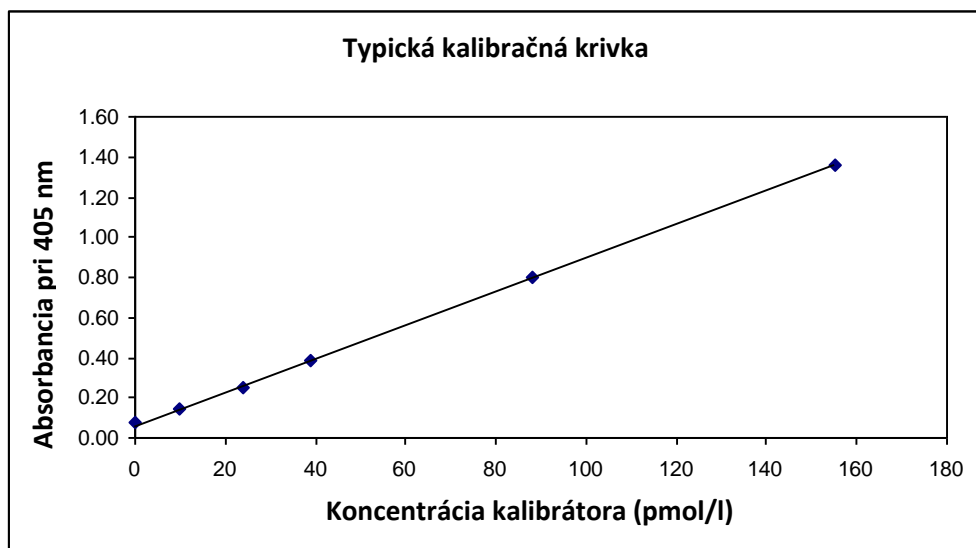
11. VÝSLEDKY

11.1. Výpočet a interpretácia

Hodnotu priemernej absorbancie každého kalibračného roztoku vyneste na os Y oproti zodpovedajúcej koncentrácii kalibračného roztoku na osi X. **KONCENTRÁCIE KALIBRÁTORA SÚ UVEDENÉ NA ŠTÍTKOCH LIEKOVIEK. HODNOTY KONCENTRÁCIE SÚ PRIDELENÉ KAŽDEJ ŠARŽI KALIBRÁTOROV A MÔŽU SA LÍŠIŤ MEDZI ŠARŽAMI.**

Koncentráciu (pmol/l) každej vzorky možno vypočítať vyhľadáním bodu na krivke, ktorý zodpovedá priemernej hodnote absorbancie vzorky, a odčítaním zodpovedajúcej koncentrácie v pmol/l na osi X. Tento postup je možno vykonať ručne použitím milimetrového papiera alebo platničkovej čítačky so softvérom zahŕňajúcom krivkové postupy. Ak použijete čítačku platničky s interným softvérom, **vyneste priemerné hodnoty absorbancie kalibrátorov na os Y oproti jednotkám pmol/l na osi X a použite algoritmus lineárnej regresie** líčovania krivky.

Typický graf kalibračnej krivky (obrázok 1) je zobrazený nižšie pre referenčné účely, no nesmie sa používať na interpretáciu výsledkov. Vzorky s koncentráciami vyššími 128 pmol/l sú mimo rozsahu analýzy a musia byť zaznamenané ako >128 pmol/l a výsledky sa nesmú extrapolovať. Jednotlivé replikáty vzoriek s odchýlkou menej ako 20 % môžu byť považované za indikátory prijateľnosti testu.



Obrázok 1. Typická kalibračná krivka testu BIOHIT Active B12 (Holotranscobalamin).

Merná jednotka

Mernou jednotkou u testu BIOHIT Active B12 (Holotranscobalamin) EIA je pmol/l.

Interval merania (zaznamenateľný rozsah)

Zaznamenateľný rozsah analýzy je 10 pmol/l až 128 pmol/l.

11.2 Kontrola kvality

Zabezpečte, aby sa primeraná údržba a kalibrácia platničkovej čítačky vykonávala podľa pokynov výrobcu, a aby sa používala správna vlnová dĺžka (405 nm) spolu s algoritmom (lineárnou regresiou) lícovania krivky.

Používatelia musia zaistiť, aby boli plne oboznámení s návodom na analýzu, najmä s časťou Upozornenia a Bezpečnostné opatrenia, a s poznámkami, ktoré sa týkajú manipulácie a postupu. Skôr, ako používatelia oznámia výsledky analýz, mali by preukázať, že dokážu získať špecifikácie výkonnosti pre precíznosť a zaznamenateľný rozsah výsledkov testov porovnateľných s tými, ktoré stanovil výrobca. Odporúča sa, aby nízke (LOW) a vysoké (HIGH) súpavy kontrolných roztokov (KIT CONTROLS) boli vo všetkých analýzach spracované dvojmo, aby sa monitorovala kvalita testovacieho postupu.

Ak predpokladáme, že sa podarilo dosiahnuť špecifikácie presnosti určené výrobcom, potom okolnosť, že niektorá kontrola nedosiahla špecifikácie pomeru kontroly robí analýzu neplatnou a výsledky pacienta sa nesmú zaznamenať. Operátor môže analýzu zopakovať po skontrolovaní postupu alebo po kontakte s dodávateľom/výrobcom. Ak analýzu opakujete, pripravte čerstvé nariadenie každej kontroly a vzorky. Niektoré laboratória si môžu želať, aby sa do každej analytickej procedúry zahrnuli jeho vlastné kontroly. Takýto kontrolný materiál skladujte pri teplote $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ alebo nižšej a vyhnite sa opakovaným cyklom zmrazenia a rozmrazenia. Konzervanty ako azid sodný pri $<0,1\%$ (w/v) nemajú na výsledky vzoriek žiaden vplyv.

Referenčné rozsahy a vhodné body cut-off sa musia vypočítať pre špecifické populácie, ktorým poskytuje svoje služby daný používateľ.

Tabuľka 1. Špecifikácie pre kontroly s nízkou a vysokou hladinou.

Špecifikácie kontrol	Nízka kontrola	Vysoká kontrola
Stredná hodnota duplikátu	15 až 35 pmol/l	36 až 84 pmol/l

11.3 Očakávané hodnoty

135 vzoriek séra z asymptomaticky zjavne zdravých darcov s vekovým rozpätím 18 – 75 rokov, medzi ktorými boli približne rovnaké počty mužov [n = 65] a žien [n = 70], bolo testovaných testom BIOHIT Active B12 (Holotranscobalamin) EIA.

Celková priemerná koncentrácia BIOHIT Active-B12 (Holotranscobalamin) u tejto populácie bola 72 pmol/l (rozpätie 15 až 147 pmol/l). Na základe týchto referenčných populačných údajov referenčný rozsah (stredných 95 % výsledkov) je:

Referenčný rozsah	21 – 123 pmol/l
--------------------------	-----------------

Tento referenčný rozsah sa navrhuje len ako návod a každé laboratórium si musí stanoviť svoj vlastný referenčný rozsah, ktorý môže byť jedinečný pre danú populáciu, ktorú obsluhuje, v závislosti od zemepisných, patientskych, diétnych, environmentálnych faktorov alebo klinickej praxe.

12. TECHNICKÉ ÚDAJE

Reprezentatívne údaje. Výsledky v jednotlivých laboratóriách sa môžu líšiť.

12.1 Linearita riedenia

Na základe štúdie uskutočnenej podľa smerníc dokumentu EP6-A¹⁰ vydaného CLSI, test BIOHIT Active-B12 (Holotranscobalamin) preukázal linearitu od 5,3 do 156,0 pmol/l (zaokrúhlené na 1 desatinné miesto). Výsledky v jednotlivých laboratóriách sa môžu od týchto údajov líšiť.

12.2 Presnosť

Uskutočnila sa korelačná štúdia so vzorkami zjavne zdravých dospelých. Všetky vzorky boli analyzované testom BIOHIT Active-B12 (Holotranscobalamin) EIA a komerčne dostupným testom na holotranscobalamín podľa dokumentu EP9-A2¹¹ vydaného CLSI. Koncentrácie vzoriek boli v rozsahu od 13,8 do 112,8 pmol/l. Tabuľka 2 zobrazuje získané štatistické hodnoty.

Tabuľka 2. Analýza BIOHIT Active-B12 (Holotranscobalamin) EIA v porovnaní s komerčne dostupnou analýzou.

Analýza BIOHIT Active-B12 (Holotranscobalamin) EIA v porovnaní s komerčne dostupnou analýzou	
Počet vzoriek	111
Strmosť regresnej línie (regresia Passing a Bablock) (95 % CI)	0,95 (0,89 až 1,01)
Úsek na súradnicovej osi Y (regresia Passing a Bablock) (95 % CI)	8,39 (5,73 až 11,77)
Korelačný koeficient (r) (Pearson) (95 % CI)	0,93 (0,90 až 0,95)

12.3 Presnosť

Sedem (7) vzoriek ľudského séra bolo testovaných s použitím 3 šarží reagensí. Vzorky boli analyzované 2 operátormi v 8 replikách, raz denne po dobu 5 dní (n = 80). Údaje z tejto štúdie sú zhrnuté v tabuľke 3.

Tabuľka 3. Údaje o presnosti.

Vzorka	n	Šarža	Operátor	Priemer (pmol/l)	Variabilita v rámci testu % CV	% CV celkom
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%
Nízka kontrola	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%
Vysoká kontrola	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 Hranica prázdnej vzorky

Určenia hranice prázdnej vzorky v reprezentatívnej štúdií boli vykonané s použitím dvoch vzoriek s nízkou hladinou holotranskobalamínu a dvoch šarží činidiel (so 120 replikami na šaržu činidiel). Bolo zistené, že hranica detekcie testu BIOHIT Active B12 (Holotranscobalamin) EIA je 4,9 pmol/l (zaokrúhlené na 1 desatinné miesto).

12.5 Hranica detekcie

Určenia hranice detekcie v reprezentatívnej štúdií boli vykonané s použitím piatich vzoriek s nízkou hladinou holotranskobalamínu a dvoch šarží činidiel (so 120 replikami na šaržu činidiel). Bolo zistené, že hranica detekcie testu BIOHIT Active B12 (Holotranscobalamin) EIA je 8,1 pmol/l (zaokrúhlené na 1 desatinné miesto).

12.6 Hranice kvantifikácie

Určenia hranice kvantifikácie/funkčnej citlivosti boli vykonané s použitím piatich vzoriek s nízkou hladinou holotranskobalamínu (každá s 120 replikami). Bolo zistené, že hranica kvantitatívneho vyjadrenia/funkčnej citlivosti testu BIOHIT Active B12 (Holotranscobalamin) EIA je 8,3 pmol/l (zaokrúhlené na 1 desatinné miesto).

12.7 Efekt vysokej dávky (hook effect)

Efekt vysokej dávky (hook effect) je fenomén, pri ktorom sa vzorky s vysokou hladinou môžu interpretovať v rámci dynamického rozsahu analýzy. U testu BIOHIT Active B12 (Holotranscobalamin) EIA nebol efekt vysokej dávky (hook effect) detegovaný analýzou sériových zriedení vzorky o koncentracii približne 419 a 2236 pmol/l.

12.8 Krížová reaktivita

Test BIOHIT Active-B12 (Holotranscobalamin) EIA je dimenzovaný tak, aby sa maximálna odchýlka v koncentrácii holotranskobalamínu $\leq 10\%$ prejavila za prítomnosti apotranskobalamínu alebo haptokorínu.

Na základe smernice dokumentu EP7-A2¹² vydaného Ústavom klinických a laboratórnych noriem (Clinical and Laboratory Standards Institute – CLSI) bola uskutočnená štúdia. Do troch vzoriek s hladinami holotranskobalamínu naprieč rozsahu testu bolo pridaných 500 pmol/l apotranskobalamínu alebo 5 000 pmol/l haptokorínu. Maximálna odchýlka v koncentrácii holotranskobalamínu siahala od -5% po 1% .

12.9 Interferencia

Test BIOHIT Active-B12 (Holotranscobalamin) EIA je dimenzovaný tak, aby sa maximálna odchýlka v koncentrácii holotranskobalamínu $\leq 10\%$ prejavila za prítomnosti potenciálne rušivých zlúčenín.

Na základe smernice dokumentu EP7-A2¹² vydaného Ústavom klinických a laboratórnych noriem (Clinical and Laboratory Standards Institute – CLSI) bola uskutočnená štúdia. Vzorky s hladinami holotranskobalamínu naprieč rozsahu testu boli doplnené potenciálne rušivými zlúčeninami, ktorých zoznam je uvedený v tabuľke 4 nižšie. Maximálna odchýlka v koncentrácii holotranskobalamínu siahala od -10% po 8% .

Tabuľka 4. Zoznam testovaných rušivých zlúčenín.

Potenciálne interferujúce látky	Žiadna interferencia nebola nájdená až do nasledujúcich koncentrácií
Hemoglobín	500 mg/dl
bilirubín	30 mg/dl
triglyceridy (roztok Intralipidu)	3000 mg/dl
reumatoidný faktor	7 500 IU/dl
Celkový proteín	9 000 mg/dl

13. ZÁRUKA

Spoločnosť Biohit napraví všetky chyby, ktoré sa u Produktu vyskytli (ďalej len „chybný produkt“) v dôsledku *nevhodných materiálov alebo nedbanlivého opracovania a ktoré znemožňujú mechanické fungovanie alebo zamýšľaný účel Produktov vrátane funkcií uvedených v špecifikáciách spoločnosti Biohit k Produktom. ZÁRUKA SA VŠAK BUDE POVAŽOVAŤ ZA NEPLATNÚ, AK SA ZISTÍ, ŽE K CHYBE DOŠLO V DÔSLEDKU NESPRÁVNEHO ZAOBCHÁDZANIA, NESPRÁVNEHO POUŽITIA, NÁHODNÉHO POŠKODENIA, NESPRÁVNEHO SKLADOVANIA ALEBO POUŽITIA PRODUKTOV NA OPERÁCIE MIMO ICH ŠPECIFIKOVANÝCH OBMEDZENÍ ALEBO ŠPECIFIKÁCIÍ V ROZPORE S POKYNNI UVEDENÝMI V MANUÁLI.* Trvanie tejto záruky sa stanovuje v manuáli k Produktom a začína dňom odoslania príslušného Produktu zo spoločnosti Biohit. Táto diagnostická súprava značky Biohit je vyrobená v súlade s protokolmi manažérstva kvality ISO 9001/ISO 13485. V prípade rozporu vo výklade má prednosť anglické znenie.

14. OBJEDNÁVKOVÉ INFORMÁCIE

















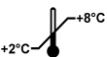




BIOHIT Active B12 (Holotranscobalamin) Cat. No 602 290

15. DÁTUM VYDANIA

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

16. POUŽITÁ LITERATÚRA

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*.

	Určené len na použitie pri <i>in vitro</i> diagnostike.		Nízka kontrola
	Katalógové číslo		Vysoká kontrola
	Kód šarže		Konjugát
	96 testov		Substrát
	Pozor		Zastavovací roztok
	Pozri návod na použitie		Pre-Treatment
	Chráňte pred svetlom		Premývací pufrovaný koncentrát (8x)
	Použiť do		Prázdny roztok
	Skladujte pri 2 – 8 °C		Kalibrátory 1 až 5
	Nepoužívajte opakovane.		Korózný
			Škodlivý

Centrála

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