


	<b>Axis-Shield Active-B12 (Holo transcobalamin) EIA</b>			
	<b>REF</b> FMABT100		 <b>IVD</b>	

**SOLO PER USO PROFESSIONALE**

Leggere le modifiche evidenziate, apportate nel mese di settembre 2019

### USO PREVISTO

Il test Axis-Shield Active-B12 (Holo transcobalamin) è un dosaggio immunoenzimatico (EIA) per la determinazione quantitativa dell'olotranscobalamina (HoloTC) nel siero umano. L'HoloTC (vitamina B<sub>12</sub> legata alla transcobalamina) viene utilizzata come ausilio nella diagnosi e nel trattamento della carenza di vitamina B<sub>12</sub>.

### INTRODUZIONE

Tre proteine di legame sono coinvolte nel trasporto della vitamina B<sub>12</sub> nell'organismo, ovvero il fattore intrinseco (IF), la transcobalamina (TC) e l'aptocorrina (HC). Queste proteine di legame assicurano l'efficace captazione delle quantità minime di vitamina B<sub>12</sub> presenti negli alimenti assunti. Quando la TC e l'HC si legano alla vitamina B<sub>12</sub>, si ottengono i complessi chiamati olotranscobalamina (HoloTC) e oloaptocorrina (HoloHC) per distinguerli dalle proteine che non trasportano la vitamina.

La principale frazione nel torrente circolatorio, l'HoloHC, rappresenta il 70-90% della vitamina B<sub>12</sub> presente nel sangue, ma è biologicamente inerte. L'HoloTC rappresenta solo il 10-30% della vitamina B<sub>12</sub> in circolo nel sangue, ma è l'unica forma di vitamina B<sub>12</sub> che può essere captata dalle cellule dell'organismo. La proteina TC da sola trasporta la vitamina B<sub>12</sub> dal sito di assorbimento nell'ileo ai tessuti e alle cellule. La vitamina viene poi internalizzata sotto forma di complesso HoloTC (vitamina B<sub>12</sub> legata alla transcobalamina) tramite una specifica captazione recettore-mediata. Questo processo mette a disposizione la vitamina B<sub>12</sub> alle cellule dell'organismo sotto forma di co-enzima per le funzioni cellulari fondamentali, quali la sintesi del DNA.






Poiché l'HoloTC presenta un'emivita circolante più breve rispetto all'HoloHC, la primissima variazione che si verifica in presenza di un bilancio negativo di vitamina B<sub>12</sub> è molto probabilmente una riduzione della concentrazione di HoloTC sierica<sup>1</sup>.


La misurazione della vitamina B<sub>12</sub> totale sierica risente di alcuni limiti, in particolare del fatto che gran parte della cobalamina misurata è legata all'HC biologicamente inerte. Diversi studi pubblicati affermano che l'HoloTC sarebbe un miglior indicatore dello stato della vitamina B<sub>12</sub> rispetto alla vitamina B<sub>12</sub> totale sierica<sup>2,3</sup>. I livelli di HoloTC risultano, come previsto, bassi nei pazienti con segni biochimici di carenza di vitamina B<sub>12</sub><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 B<sub>12</sub><sup>7</sup>. Da notare è che bassi livelli di HoloTC, ma non di vitamina B<sub>12</sub> totale sierica, 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 B<sub>12</sub>, indipendentemente dal recente assorbimento della vitamina<sup>9</sup>.

### PRINCIPIO DEL DOSAGGIO

I pozzetti di microtitolazione vengono rivestiti con un anticorpo monoclonale altamente specifico per Active-B12 (Holo transcobalamin). Durante la prima incubazione, l'olotranscobalamina 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, facendo ottenere 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.

### COMPONENTI DEL KIT

<b>CONJ</b>	1 × 15 mL	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. <b>Pronto per l'uso.</b>	
<b>SUBS</b>	1 × 15 mL	Para-nitrofenil fosfato (pNPP), soluzione tampone. <b>Pronto per l'uso.</b> Conservare al riparo dalla luce. <b>N.B. ATTENZIONE</b>	 
<b>SOLN STOP</b>	1 × 15 mL	1M di idrossido di sodio, (pH >10). <b>Pronto per l'uso.</b> <b>N.B. PERICOLO</b>	
<b>BUF WASH 8X</b>	2 × 25 mL	Tampone fosfato. Conservante: 0,72% (p/vol) di sodio azide. <b>Diluire prima dell'uso. N.B. ATTENZIONE</b>	
<b>MTP 8X12</b>	12 strip di microtitolazione x 8 pozzetti (separabili)	Rivestite con anticorpo monoclonale murino anti-olotranscobalamina, in busta di alluminio risigillabile con essiccante.	
<b>CAL A - CAL F</b>	6 × 1.0 mL	Il calibratore Cal A è un tampone fosfato contenente stabilizzatore proteico (bovino). Conservante: < 0,1% (p/vol) di sodio azide. I calibratori Cal B-F sono tampone fosfato con stabilizzatore proteico (bovino) contenenti HoloTC. Conservante: < 0,1% (p/vol) di sodio azide. <b>Pronto per l'uso. Conservare al riparo dalla luce. VEDERE LE ETICHETTE DEI FLACONCINI PER LE CONCENTRAZIONI.</b>	

<b>CONTROL L</b>	1 x 1.0 mL	Tampone fosfato con stabilizzatore proteico (bovino) contenente HoloTC. Conservante: < 0,1% (p/vol) di sodio azide. <b>Pronto per l'uso. Conservare al riparo dalla luce.</b>	
<b>CONTROL H</b>	1 x 1.0 mL		
<b>PRE-TREATMENT</b>	1 x 25 mL	Citrate buffer. Preservative: < 0.1% (w/v) sodium azide. <b>Ready-to-use.</b>	

## STANDARDIZZAZIONE

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

## CONSERVAZIONE DEI REAGENTI

### **Stabilità del kit aperto**

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.

### **Stabilità del kit non aperto**

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

### **Note sulla manipolazione e sulla procedura**

1. Conservare i componenti del kit ad una temperatura di 2-8°C ed 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 evitando 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 o 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.

### **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 un qualsiasi componente è segno di deterioramento, quindi il componente deve essere eliminato.

### **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 superiore all'intera 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 ad una temperatura di 2-8°C prima del dosaggio.



## 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 membrane mucose. Eventuali fuoriuscite devono essere diluite con abbondante 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 Axis-Shield Diagnostics.
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 biosicurezza 2. Altre adeguate pratiche di biosicurezza devono essere utilizzate per i materiali che contengono o si sospetta che contengano agenti infettivi.

Attenzione: La legge federale limita la vendita di questo dispositivo da parte o dietro prescrizione di un medico.

 <b>Pericolo</b>	<b>Soluzione di arresto</b>	<p><b>ATTENZIONE</b> H314 – <b>PREVENZIONE</b> P264 – P280 – <b>RISPOSTA</b> P305+351+338 -</p>	<p>Provoca gravi ustioni cutanee e gravi lesioni oculari.</p> <p>Lavare accuratamente braccia dopo l'uso. Indossare guanti/indumenti protettivi/Proteggere gli occhi/il viso.</p> <p><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.</p>
 <b>Attenzione</b>	<b>Substrato</b>	<p><b>ATTENZIONE</b> H302 – H312 – H332 – <b>PREVENZIONE</b> P260 – P271 – P280 – <b>RISPOSTA</b> P301+310 –  P304+340 –  P312 -</p>	<p>Nocivo se ingerito. Nocivo per contatto con la pelle. Nocivo se inalato.</p> <p>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.</p> <p><b>IN CASO DI INGESTIONE:</b> contattare immediatamente un CENTRO ANTIVELENI o un medico. <b>IN CASO DI INALAZIONE:</b> trasportare l'infortunato all'aria aperta e mantenerlo a riposo in posizione che favorisca la respirazione. In caso di malessere, contattare un CENTRO ANTIVELENI o un medico.</p>
	<b>Tampone di lavaggio (8X)</b>	<p><b>ATTENZIONE</b> H302 – H412 – EUH032 – <b>PREVENZIONE</b> P264 – P270 – P273 – <b>RISPOSTA</b> P301+310 –  P330 -</p>	<p>Nocivo se ingerito. Nocivo per gli organismi acquatici con effetti di lunga durata. A contatto con acidi libera gas molto tossici.</p> <p>Lavare accuratamente braccia dopo l'uso. Non mangiare, né bere, né fumare durante l'uso. Non disperdere nell'ambiente.</p> <p><b>IN CASO DI INGESTIONE:</b> contattare immediatamente un CENTRO ANTIVELENI o un medico. Sciacquare la bocca.</p>

## PREPARAZIONE

### Materiali/Attrezzature richieste ma non fornite

1. Lettore di micropiastre/strip da 96 pozzetti con filtro a 405 nm.
2. Pipetta/e di precisione per dispensare 100 µL. Pipettatore a 8 canali, o dispositivo simile, per dispensare circa 250-300 µL per il lavaggio manuale (ad esempio il pipettatore a 8 canali StatMatic di Tricontinent).
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.

### Preparativi per il dosaggio

Prima dell'uso portare tutti i componenti del kit, comprese le strip di microtitolazione, a 18-25°C nel giro 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 (ponendolo in un incubatore a 37°C, se necessario per velocizzare il processo) finché **NON** appare più alcuna precipitazione ad occhio nudo.

Diluire i reagenti seguenti e miscelarli accuratamente.

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

Calcolare il numero di strip di microtitolazione necessarie per il dosaggio da effettuare 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 al 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 addizionando un uguale volume di pre-trattamento al campione, ad. es. 150 µL di campione più 150 µL di pre-trattamento. I campioni pre-trattati possono essere conservati coperti fino a 24 ore ad una temperatura di 2-8°C prima del dosaggio.

### PROTOCOLLO DEL DOSAGGIO

1. Definire il rispettivo riferimento dei pozzetti per l'identificazione.
2. Pipettare nei relativi pozzetti 100 µL 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 più di 15 minuti.
3. Incubare per 60±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 rischio potenziale di infezione correlato ai campioni. Asciugare bene le strip capovolte con salviette di carta. **Non lavare.**
5. Aggiungere 100 µL di coniugato a ciascun pozzetto.
6. Incubare per 35±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 µL di tampone di lavaggio diluito. **Decantare e asciugare dopo ciascuna fase di lavaggio.**
9. Aggiungere 100 µL di substrato a ciascun pozzetto.
10. Incubare per 30±5 minuti a 18-25°C. **Non decantare.**
11. Aggiungere 100 µL di soluzione di arresto a ciascun pozzetto, nello stesso ordine e con gli stessi tempi di aggiunta del substrato. Picchiettare delicatamente sui pozzetti per miscelarli.
12. Leggere le strip a 405 nm. Effettuare la lettura entro 120 minuti dall'aggiunta della soluzione di arresto.

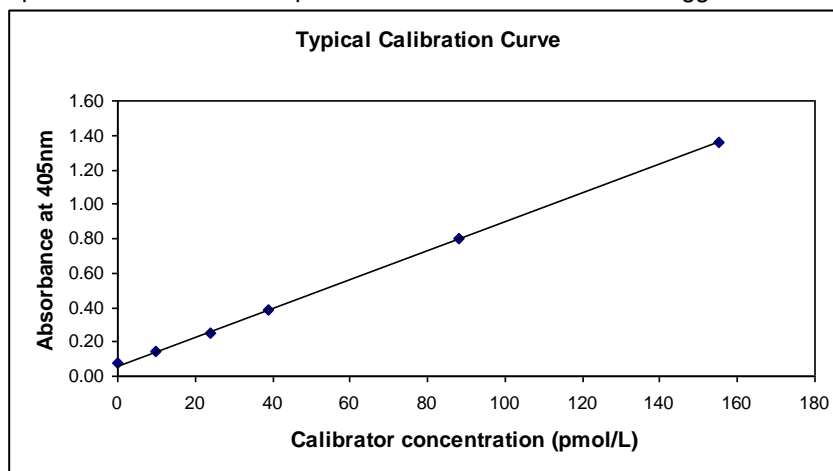
### CALCOLO E INTERPRETAZIONE DEI RISULTATI

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 CALBRATORI SONO INDICATE SULLE ETICHETTE DEI FLACONCINI. I VALORI DI CONCENTRAZIONE SONO ASSEGNATI AD OGNI LOTTO DI CALBRATORI 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 utilizzando un lettore di piastre il cui software integra procedure di curve fitting. Se si utilizza un lettore di micropiastre con software interno, si raccomanda di utilizzare un **algoritmo di curve fitting di regressione lineare.**

La figura che segue mostra un tipico grafico di calibrazione a scopo di riferimento 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.



## RISULTATI

### Unità di misura

L'unità di misura del dosaggio Axis-Shield Active-B12 (olotranscobalamina) è il pmol/L.

### Inervallo di misurazione (range riportabile)

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

## 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 riferire 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 riportati. Una volta rivista la procedura, l'operatore può ripetere il dosaggio oppure contattare il distributore/produttore. Se si ripete il dosaggio, occorre preparare una nuova diluizione di ciascun campione. I laboratori possono decidere di includere dei controlli interni in ciascuna sessione di dosaggio. Conservare il materiale di controllo ad 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 corretti punti di cut-off devono essere calcolati per le popolazioni specifiche di cui si occupano gli operatori.

### Specifiche dei controlli

	Basso	Alto
Specifica (media del duplicato)	da 15 a 35 pmol/L	da 36 a 84 pmol/L

## 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 ad immunodosaggio Axis-Shield Active-B12 (Holo-transcobalamin).

La concentrazione media totale di Active-B12 (Holo-transcobalamin) 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:

### Range di riferimento

21 – 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.

## DATI RELATIVI ALLE PRESTAZIONI

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

### Linearità di diluizione

Basato su uno studio condotto secondo le linee guida del documento CLSI EP6-A<sup>10</sup>, l'immunodosaggio Axis-Shield Active-B12 (Holo-transcobalamin) ha dimostrato linearità da 5,3 a 156,0 pmol/L.

### 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 Axis-Shield Active-B12 (Holo-transcobalamin) e un dosaggio commerciale per l'olotranscobalamina secondo il documento CLSI EP9-A2<sup>11</sup>. Le concentrazioni dei campioni erano comprese nel range fra 13,8 e 112,8 pmol/L. I dati ottenuti hanno prodotto i seguenti valori statistici:

Immunodosaggio Axis-Shield Active-B12 (Holo-transcobalamin) versus dosaggio commerciale	
Numero di campioni	111
Pendenza della linea di regressione (regressione di Passing-Bablok) (IC al 95%)	0.95 (0.89 to 1.01)
Intercetta Y (regressione di Passing-Bablok) (IC al 95%)	8.39 (5.73 to 11.77)
Coefficiente di correlazione (r) (Pearson) (IC al 95%)	0.93 (0.90 to 0.95)

### **Precisione**

7 campioni di siero umano sono stati analizzati presso Axis-Schield 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 seguente

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%

### **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 Axis-Shield Active-B12 (olotranscobalamina) è risultato di 4,9 pmol/L (arrotondato a un decimale).

### **Limite di rilevamento**

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

### **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 Axis-Shield Active-B12 (olotranscobalamina) è risultato di 8,3 pmol/L (arrotondato a un decimale).

### **Effetto gancio ad alte dosi**

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

### **Cross-reattività**

L'immunodosaggio Axis-Shield 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 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%.

### **Interferenza**

L'immunodosaggio Axis-Shield Active-B12 (Holo-transcobalamin) è studiato per presentare la massima deviazione della concentrazione di olotranscobalamina ( $\leq 10\%$ ) in presenza di composti potenzialmente interferenti.










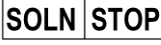





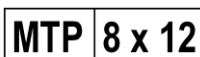
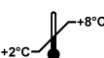
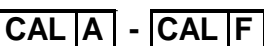

È stato condotto uno studio basato sulle linee guida del documento del Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI) EP7-A2<sup>12</sup>. A sei campioni con livelli di olotranscobalamina entro il range del dosaggio sono stati aggiunti i composti potenzialmente interferenti elencati nella tabella sotto riportata. La deviazione massima della concentrazione di olotranscobalamina è risultata compresa fra -10% e 8%.

<b>Sostanza potenzialmente interferente</b>	<b>Nessuna interferenza riscontrata fino alla concentrazione seguente</b>
Emoglobina	500 mg/dL
Bilirubina	30 mg/dL
Trigliceridi (soluzione di intralipidi)	3000 mg/dL
Fattore Reumatoide	7500 IU/dL
Proteina totale	9000 mg/dL

## **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 Chemistry; Approved Guideline—Second Edition*. CLSI document EP7-A2. Wayne, PA: CLSI; 2005.

## SIMBOLOGIA

	Dispositivo medico diagnostico <i>in vitro</i>		Controllo basso
	Numero di catalogo		Controllo alto
	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
	Da utilizzare entro		Strip di microtitolazione (separabili)
	Conservare a 2-8°C		Calibratori A-F
<b>Rx Only</b>	Usato solo dietro prescrizione medica		Prodotto da



**Axis-Shield Diagnostics Ltd.,  
The Technology Park,  
Dundee,  
DD2 1XA, UK**  
Tel: +44 (0) 1382 422000  
Fax: +44 (0) 1382 422088  
e-mail: axd.axis-shield@alere.com  
Web: www.axis-shield.com



EC Authorized Representative:

Medical Device Safety Service GmbH  
(MDSS)  
Schiffgraben 41,  
30175 Hannover,  
Germany

Tel.: + (49) 511 6262 8630  
Fax: + (49) 511 6262 8633

Ver: 2019/09