



GHB

Gamma-Hydroxybutyric Acid

Enzymatic Assay

KK-GHB

Revision date: 2016-08-02

BÜHLMANN LABORATORIES AG

Baselstrasse 55
4124 Schönenbuch, Switzerland
Tel.: +41 61 487 1212
Fax: +41 61 487 1234
info@buhlmannlabs.ch

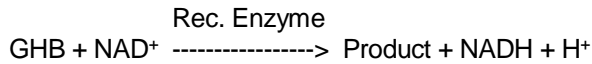
English	page	2
Deutsch	Seite	4
Français	page	7
Italiano	pagina	9
Español	página	12

ENGLISH

INTENDED USE

The BÜHLMANN gamma-hydroxybutyric acid (GHB) kit has been designed for the direct and quantitative determination of GHB in human urine and serum. The assay can be adapted to clinical chemistry analyzers according to specific instrument protocols.

PRINCIPLE OF THE ASSAY



The GHB is converted to its metabolite, succinic semialdehyde (SSA), by the action of GHB-Dehydrogenase (Rec. Enzyme) and oxidized nicotinamide adenine dinucleotide (NAD⁺). The increase in absorbance at 340 nm resulting from the reduction of NAD⁺ into NADH is proportional to the amount of GHB in the sample.

REAGENTS SUPPLIED AND PREPARATION

Reagents ¹⁾	Quantity	Code	Reconstitution
Incubation Buffer	1 vial 12 mL	B-GHB-IB	Ready to use
Cofactor lyophilized NAD ⁺	1 vial	B-GHB-CF	Add 5.6 mL of deionized water ⁴⁾
Enzyme lyophilized recombinant Enzyme	2 vials	B-GHB-E	Add 4.2 mL of deionized water ⁴⁾ ; do not vortex
Calibrators²⁾ lyophilized GHB	2 vials	B-GHB-CASET	Add 2 mL of deionized water ⁴⁾
Controls Low / High³⁾ lyophilized GHB in human urine	2 vials	B-GHB-CONSET	Add 2 mL of deionized water ⁴⁾

Table 1

- 1) All reagents contain sodium azide (<0.1%) as preservative.
- 2) After reconstitution the GHB concentration of the Calibrators is 10 and 100 mg/L, respectively.
- 3) The Controls contain lot-specific amounts of GHB. Refer to the QC data sheet for actual concentrations.
- 4) For reconstitution see chapter Procedural Notes.

STORAGE AND SHELF LIFE OF REAGENTS

Unopened Reagents	
The unopened kit components are stable at 2 - 8 °C, except Cofactor that must be stored at -20 °C upon receipt . Do not use reagents after expiration of the kit.	
Opened / Reconstituted Reagents	
Incubation Buffer	At 2-8 °C until the expiration date
Cofactor	Store for up to 2 months at 2-8 °C
Enzyme	
Calibrators	
Controls	

Table 2

WARNINGS AND PRECAUTIONS

- B-GHB-CASET and B-GHB-CONSET contain GHB at <100 mg/L. At this concentration GHB is considered as non-toxic.
- All reagents contain sodium azide at <0.1 %. Sodium azide may react with copper or lead and form explosive compounds in metal drain lines. Upon disposal, flush with a large volume of water to prevent azide build up.
- Do not ingest.
- Use only deionized H₂O for reconstitution. See chapter Procedural Notes.

- Calibrators and Controls contain components of human urine. Thus the risk of transmitting pathogens of known or unknown origin cannot be completely excluded.
- Urine samples should be handled as potentially infectious.
- All products and samples containing human material should be handled in accordance with good laboratory practice using appropriate precautions.

MATERIALS REQUIRED BUT NOT PROVIDED

- Accurate pipeting devices (1, 5 or 10 mL pipettes)
- Test tubes/rack
- Clinical chemistry analyzer with an optical filter at 340 nm
- Deionized water
- 0.9 % saline solution

SPECIMEN COLLECTION AND STORAGE

- Depending on the dead volume of the analyzer, ~110 µL sample volume must be transferred into the instrument specific sample tubes. Less than 10 µL of urine or serum sample is needed to run the test. For details refer to the instrument manual.
- Urine: Collect urine (pH 5-8) without additives, keep the samples refrigerated, and have them filtered or centrifuged. Collect the supernatant.
- Serum: Refer to page 4 to learn about the interference of hemolytic, lipemic or icteric samples. Collect blood into plain tubes (no anti-coagulant), avoid haemolysis, leave to clot for one hour, centrifuge for 10 minutes at approximately 1500 x g at room temperature (18-28 °C), and collect the supernatant.
- Sample storage: Urine and serum samples can be stored at 2-8 °C for at least two weeks. For longer storage keep the samples frozen at -20 °C. GHB stability in samples has intensively been investigated (8).

PROCEDURAL NOTES

Reconstitution of Reagents:

- Calibrator and Control vials are under vacuum. Thus, it is mandatory to remove the caps slowly and carefully in order to prevent loss of material.
- Cofactor (B-GHB-CF), Calibrators (B-GHB-CASET) and Controls (B-GHB-CONSET): Vortex the vials for 30 seconds after reconstitution or use a suspension mixer for 15 minutes.
- Enzyme (B-GHB-E): **DO NOT VORTEX!** Use a suspension mixer for 15 minutes at RT until the lyophilized Enzyme has completely dissolved. Alternatively, gently swivel the vial after reconstitution, leave it 15 minutes at RT, and gently move it upside-down afterwards.
- On board, the Enzyme can be kept up to 2 months at a temperature up to 15 °C.

ASSAY PROCEDURE

GHB enzymatic assay is designed for automated analysis on clinical chemistry analyzers. It has to be programmed as a three reagent test. For details refer to the analyzer specific protocols.

The following protocol has been established for KoneLab 30 (Thermo) and is used here as a general example for the test procedure. For applications on other instruments, we will provide assistance.

1. 100 µL of Incubation Buffer (R1)
+ 8 µL of urine or serum sample (S)
+ 7 µL of deionized water
 2. +50 µL of Cofactor (R2)
→ Incubate for 1.5-2 min at 37 °C
 3. +85 µL of Enzyme (R3)
 4. T_{0 min.}: Measurement at 340 nm (Blank)
→ Incubation for 5-6 min at 37 °C
 5. T_{5-6 min.}: Measurement at 340 nm
-

RESULTS

Calibration

Use endpoint mode at 340 nm. The absorbance obtained after reading 1 (M1) and 2 (M2) is calculated using the absorbance differences (M2-M1). The standard curve will be calculated from the two calibrators using a linear regression mode. Refer to Table 11 and Figure 1 for typical results and standard curve. Depending on the instrument it might be necessary to read additionally at a secondary wavelength (e.g. 700 nm).

Calibration is stable for at least 2 weeks. Calibration of the assay should be carried out every 14 days, when a fresh vial of Enzyme is reconstituted or when the controls are out of the confidence range.

Samples and Controls

The absorbance at 340 nm is recorded for the Calibrators and the GHB concentration for each Control and sample is calculated as indicated above.

CALCULATION

Automated procedure: For calculation of the results use the endpoint mode with two calibrators (10 and 100 mg/L). Refer to the instrument manual for further details.

Dynamic range: 5 - 230 mg/L

STANDARDIZATION

The GHB Calibrators have been calibrated against commercially available GHB quantified with HPLC.

QUALITY CONTROL

- The values of the Low and High Control provided with the kit must be within the lot specific range indicated on the corresponding QC data sheet. Otherwise, the standard curve has to be re-calibrated.
- It is good laboratory practice to record the following data for each assay: kit lot number, reconstitution dates of kit components, results for Calibrators and Controls, and internal urine or serum pool.
- The precision and expected values of standard curve and controls should be within established limits. The confidence limits for the controls are lot-specific and printed on the QC data sheet delivered with the kit.

- Reliable results will only be obtained by using precise laboratory techniques (current GLP guidelines) and by accurate attention of this instruction for use.
-

LIMITATIONS

Samples exceeding 230 mg/L should be diluted 1:10 with 0.9% saline solution (1 volume sample + 9 volumes saline solution). The results have to be multiplied by 10.

If the OD of the urine samples exceeds 1.0 OD at 340 nm, results may be falsely positive.

Positive results should be confirmed by alternative methods.

Substances and/or factors other than those investigated in the specificity study may interfere with the test and cause false results.

PERFORMANCE CHARACTERISTICS

Assay performance characteristics have been determined on KoneLab 30.

Limit of Blank (LoB): <1 mg/L. The LoB has been established by repeated measurements of blank values (0.9% NaCl, n= 60) in accordance with CLSI protocol EP17-A.

Limit of Detection (LoD): 1.5 mg/L. The LoD has been established by repeated measurements of two samples containing 4.8 and 6.2 mg/L GHB (n= 40 and 10, respectively) in accordance with CLSI protocol EP17-A (Table 12).

Limit of Quantification (LoQ): Urine: 5.0 mg/L; serum: <5.0 mg/L. The LoQ of urine and serum was determined by three measurements of three urine and serum samples at concentrations between 3 and 16 mg/L. The sensitivity at 10 % CV was determined to be 5.0 and <5.0 mg/L, respectively.

Precision: Repeatability: ≤5 % CV; Between run: <10 % CV; Between day: <5 % CV; Total precision: <10 % CV. The precision of urine and serum samples has been determined in accordance with CLSI protocol EP5-A2 by repeated measurements in two runs per day over a period 10 – 20 work days (Table 13).

Dilution linearity: Urine 100 - 105 %; serum 99 - 100 %. Three urine and two serum samples with elevated GHB concentration have been diluted with 0.9% NaCl solution (Table 14). The mean value is 103 % in urine and 100 % in serum. It is linear between 5 and 230 mg/L.

Recovery: Urine: 95 - 107 %; serum: 106 - 113 %. Three different urine and serum samples have been spiked with increasing amounts of GHB. The mean value is 100 % in urine and 110 % in serum (Table 15).

Specificity: The substances listed in Table 16 have been analyzed between 10 and 1000 mg/L to determine the enzyme specificity.

INTERFERING SUBSTANCES

Therapeutic drugs and drugs of abuse: The **therapeutic drugs** and **drugs of abuse** listed in Table 17 and Table 18 were evaluated according to the approved guideline for interference testing in clinical chemistry, EP7-A2 (7), on the KoneLab 30. No interference has been observed up to the listed concentrations.

The interference of **Ethanol** is shown in Figure 2. 1 g/L Ethanol raises the GHB value by 3 mg/L.

Serum Indices: No interference is detected with the following substances up to the listed concentrations: **Triglycerides** (Intralipid® 275 mg/dL; equivalent to 7.7 mmol/L triglycerides), **conjugated bilirubin** (360 µmol/L; 30 mg/dL), **unconjugated bilirubin** (513 µmol/L; 30 mg/dL) or **haemoglobin** (3.1 mmol/L; 500 mg/dL) on KoneLab 30.

EXPECTED VALUES

The following reference range for urine and serum (97.5th percentile) has been determined from individuals, who did not consume GHB:

Urine: 97.5 th percentile:	3.1 mg/L
Median:	<1.5 mg/L
n =	46
Serum: 97.5 th percentile	6.1 mg/L
Median:	<1.5 mg/L
n =	65

METHOD COMPARISON

34 urine samples have been compared to a published IC-GHB method (6) (Figure 3):

$$KK\text{-GHB} = y = 1.07x\text{ IC-GHB} - 15.66; R^2 = 0.997$$

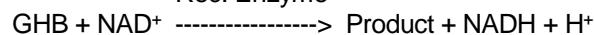
DEUTSCH

ANWENDUNGSZWECK

Der BÜHLMANN Gamma-Hydroxybuttersäure (GHB) Kit wurde zur direkten and quantitativen Bestimmung von GHB in humanem Urin und Serum entwickelt. Der Assay kann mit entsprechenden Protokollen auf offenen klinisch-chemischen Analysegeräten durchgeführt werden.

PRINZIP DER METHODE

Rec. Enzyme



Durch die Aktivität der GHB-Dehydrogenase (rekombinantes Enzyme) und NAD⁺ (Cofaktor) wird GHB in seinen Metaboliten SSA (Succinat-Semialdehyd) umgewandelt. Durch die Reduktion von NAD⁺ zu NADH steigt die OD bei 340 nm; der Anstieg ist proportional zur GHB Konzentration in der Probe.

GELIEFERTE REAGENZIEN UND VORBEREITUNG

Reagenzien ¹⁾	Anzahl	Code	Rekonstitution
Inkubationspuffer	1 Fläschchen 12 mL	B-GHB-IB	Gebrauchsfertig
Cofaktor Lyophilisiertes NAD ⁺ ;	1 Fläschchen	B-GHB-CF	5.6 mL deionisiertes Wasser zugeben ⁴⁾
Enzym Lyophilisiert; rekombinantes Enzym in Puffer	2 Fläschchen	B-GHB-E	4.2 mL deionisiertes Wasser zugeben ⁴⁾ Nicht vortexen
Kalibratoren²⁾ Lyophilisiertes GHB	2 Fläschchen	B-GHB-CASET	2 mL deionisiertes Wasser zugeben ⁴⁾
Kontrollen Low / High³⁾ Lyophilisiert; GHB in humanem Urin	2 Fläschchen	B-GHB-CONSET	2 mL deionisiertes Wasser zugeben ⁴⁾

Table 3

- ¹⁾ Alle Reagenzien enthalten Natriumazid (<0.1%) als Konservierungsmittel.
- ²⁾ Nach Rekonstitution betragen die GHB Konzentrationen der Kalibratoren 10 bzw. 100 mg/L.
- ³⁾ Die GHB Konzentrationen der Kontrollen sind lot-spezifisch. Sie sind auf dem QC Datenblatt angegeben.
- ⁴⁾ Für die Rekonstitution lesen Sie den Abschnitt Hinweise zum Ablauf.

LAGERUNG UND HALTBARKEIT DER REAGENZIEN

Ungeöffnete Reagenzien	
Zu verwenden bis zum angegebenen Verfallsdatum auf der Verpackungsetikette. Lagerung bei 2 - 8 °C, mit Ausnahme von Cofaktor, der nach Erhalt bei -20 °C gelagert werden muss . Kit nicht nach dem Ablaufdatum verwenden.	
Geöffnete / Rekonstituierte Reagenzien	
Inkubationspuffer	Bis zum Verfallsdatum bei 2 - 8 °C lagern
Cofaktor	Bis zu 2 Monate bei 2 - 8 °C lagern
Enzym	
Kalibratoren	
Kontrollen	

Table 4

WARNHINWEISE UND VORSICHTSMASSNAHMEN

- B-GHB-CASET und B-GHB-CONSET enthalten GHB in Konzentrationen <100 mg/L. In dieser Konzentration wird GHB als nicht toxisch angesehen.
- Alle Reagenzien enthalten Natriumazid in Konzentrationen <0.1 %. Natriumazid kann mit Kupfer oder Blei explosive Substanzen in Abwasserleitungen bilden. Deshalb bei Entsorgung mit reichlich Wasser nachspülen.
- Nicht verschlucken.
- Nur demineralisiertes H₂O zum Rekonstituieren verwenden. Lesen Sie auch den Abschnitt: Hinweise zum Ablauf.
- Kalibratoren und Kontrollen enthalten Komponenten aus humanem Urin. Deshalb kann das Risiko einer Übertragung von Erregern bekannten oder unbekanntem Ursprungs nicht vollständig ausgeschlossen werden.
- Urinproben sollten deshalb als potentiell infektiös behandelt werden.
- Alle Produkte, die humanes Material enthalten, müssen mit größter Vorsicht und nach den Vorgaben der Guten Labor Praxis verarbeitet werden.

ERFORDERLICHE LABORGERÄTE UND HILFSMITTEL

- Präzisionspipetten (1, 5 oder 10 mL)
- Plastikröhrchen
- Klinisch-chemischer Analyser mit einem optischen Filter bei 340 nm.
- Deionisiertes Wasser
- 0.9 % Kochsalzlösung

UNTERSUCHUNGSMATERIAL UND LAGERUNG

- Abhängig vom Totvolumen des Analysers, müssen ca.110 µL Probe in die gerätespezifischen Probengefäße pipettiert werden. Für die Bestimmung werden weniger als 10 µL Urin bzw. Serum benötigt. Details entnehmen Sie bitte der Bedienungsanleitung des Gerätes.
- Urin: Urin (pH 5-8) ohne weitere Zusätze sammeln und kühl lagern, filtrieren oder zentrifugieren und den Überstand sammeln.
- Serum: Angaben zu Interferenzen von lipämischen, hämolytischen und ikterischen Seren finden Sie auf Seite 6 dieser Anleitung. Blut in Plastikröhrchen (ohne Antikoagulant) sammeln, dabei Hämolyse vermeiden, für eine Stunde gerinnen lassen und 10 Minuten bei 1500 x g bei Raumtemperatur (18-28 °C) zentrifugieren, den Überstand abgiessen.
- Probenlagerung: Proben bei 2-8 °C mindestens 2 Wochen und bei -20 °C für eine längere Lagerung. Die Stabilität von GHB wurde intensiv untersucht (8).

HINWEISE ZUM ABLAUF

Auflösen der Reagenzien:

- Kalibrator and Kontrollfläschchen wurden unter Vakuum abgefüllt. Die Stopfen müssen deshalb sehr langsam entfernt werden, um einen Verlust des Lyophilisates zu vermeiden.
- Cofaktor (B-GHB-CF), Kalibratoren (B-GHB-CASET) und Kontrollen (B-GHB-CONSET): Vortexen Sie die Fläschchen für 30 Sekunden nach der Rekonstitution

oder rekonstituieren Sie 15 Minuten auf dem Rollenmischer.

- Enzym (B-GHB-E): **NICHT VORTEXEN!** Auf einem Rollenmischer 15 Minuten bei Raumtemperatur mischen, bis sich das lyophilisierte Enzym vollständig gelöst hat. Alternativ das Fläschchen vorsichtig schwenken, 15 Minuten stehen lassen und danach nochmals über Kopf schwenken.
- Onboard kann das Enzym bei Temperaturen bis zu 15 °C für bis zu 2 Monate gelagert werden.

ARBEITSANLEITUNG

Der enzymatische GHB Assay wurde für die automatisierte Abarbeitung auf klinisch-chemischen Analysern konzipiert. Er muss als 3-Reagenzien-Assay programmiert werden. Details können Sie den gerätespezifischen Protokollen entnehmen. Das folgende Protokoll wurde für den KoneLab 30 (Thermo) entwickelt und als allgemeines Beispiel für den Testablauf verwendet. Für Applikationen auf anderen Geräten bieten wir Unterstützung an.

1. 100 µL Inkubationspuffer (R1)
+ 8 µL Urin- oder Serumprobe (S)
+ 7 µL deionisiertes Wasser
2. + 50 µL Cofaktor (R2)
→ Für 1.5-2 Min. bei 37 °C inkubieren
3. + 85 µL Enzym (R3)
4. T₀: Messung bei 340 nm (Blank)
→ Inkubation für 5-6 Min. bei 37
5. T₅₋₆: Messung bei 340 nm

ERGEBNISSE UND AUTOMATISIERUNG

Kalibration

Es wird eine Endpunktmessung bei 340 nm vorgenommen. Die Delta-Extinktion wird nach Abschluss der Messungen M1 und M2 aus der Extinktionsdifferenz von M2 und M1 berechnet (M2-M1). Die Standardkurve wird mit Hilfe von 2 Standardpunkten unter Verwendung einer linearen Regression erstellt. Exemplarische Ergebnisse und eine typische Standardkurve sind in Table 11 und Figure 1 dargestellt. Abhängig vom Typ des Analysers kann eine Messung bei einer zusätzlichen Wellenlänge erforderlich sein (z.B. bei 700 nm).

Die Kalibration ist für mindestens 2 Wochen stabil. Die Kalibrierung des Tests sollte alle 14 Tage durchgeführt werden, wenn ein frisches Fläschchen Enzym eingesetzt wird oder wenn die Kontrollen ausserhalb des festgelegten Bereiches liegen.

Proben und Kontrollen

Messen Sie die Extinktion für die Kalibratoren wie oben beschrieben bei 340 nm und ermitteln Sie die GHB Konzentration für jede Kontrolle und Probe.

RESULTATE UND AUTOMATISIERUNG

Klinisch-chemische Analyser: Zur Ermittlung der Extinktionen wird die Endpunktbestimmung verwendet. Zur Berechnung der Ergebnisse wird eine lineare Regression mit zwei Kalibratoren durchgeführt (10 und 100 mg/L). Weitere Details entnehmen Sie der Bedienungsanleitung.

Messbereich : 5 - 230 mg/L

STANDARDISIERUNG

Die GHB Kalibratoren sind gegen kommerziell erhältliches, mit HPLC quantifiziertes GHB kalibriert.

QUALITÄTSKONTROLLE

- Die Werte der im Kit enthaltenen Low und High Control müssen innerhalb der auf dem Kontrollblatt angegebenen Lot-spezifischen Bereiche liegen. Andernfalls muss die Standardkurve neu kalibriert werden.
- Es entspricht Good Laboratory Practice, die folgenden Angaben für jeden Testlauf zu dokumentieren: Lotnummer des Kits, Rekonstitutionsdatum der Reagenzien, Ergebnisse von Kalibratoren, Kontrollen und internen Urin - bzw. Serum Pools, falls vorhanden.
- Die Präzision und die erwarteten Werte von Standardkurve und Kontrollen müssen innerhalb der angegebenen Werte liegen. Die Vertrauensbereiche für die Kontrollen sind lot-spezifisch und auf dem mit dem Kit gelieferten QC-Datenblatt angegeben.
- Zuverlässige Ergebnisse erhalten Sie nur unter Einhaltung der GLP Richtlinien (gute Laborpraxis) und Einhaltung der Arbeitsanleitung.

GRENZEN DES VERFAHRENS

Proben, die oberhalb von 230 mg/L gemessen werden, sollten 1:10 mit 0.9 % Kochsalzlösung verdünnt werden (1 Volumenteil Probe + 9 Volumenteile Kochsalzlösung). Die Ergebnisse müssen mit 10 multipliziert werden.

Urine, deren OD grösser als 1.0 bei 340 nm gemessen werden, können falsch positive Ergebnisse zeigen.

Positive Ergebnisse müssen mit alternativen Methoden bestätigt werden.

Substanzen oder Faktoren, die nicht in der Spezifitätsstudie getestet wurden, können möglicherweise mit dem Test interferieren und falsche Ergebnisse oder Störungen verursachen.

LEISTUNGSMERKMALE

Die Leistungsmerkmale des Tests sind auf dem KoneLab 30 bestimmt worden.

Limit of Blank (LoB): <1 mg/L. Der LoB wurde bestimmt durch wiederholte Messungen des Blanks (0.9% NaCl, n= 60) gemäss CLSI EP17-A.

Limit of Detection (LoD): 1.5 mg/L. Der LoD wurde gemäss CLSI EP17-A bestimmt durch wiederholte Messungen von zwei Proben, die 4.8 bzw. 6.2 mg/L GHB enthielten (n= 40; resp. n=10) (Table 12).

Limit of Quantification (LoQ): Urin: 5 mg/L; Serum: <5.0 mg/L. Der LoQ wurde bestimmt durch drei Messungen von Urin- und Serumproben mit Konzentrationen zwischen 3 und 16 mg/L. Die Sensitivität bei 10 % CV wurde als 5 mg/L bzw. <5.0 mg/L definiert.

Präzision: Repeatability: <5 % CV; Between run <10 % CV; Between day <5 % CV; Total precision: <10 % CV. Die Präzision von Urin und Serumproben wurde gemäss CLSI EP5-A2 durch wiederholte Messungen in 2 Läufen/Tag über einen Zeitraum von 10-20 Arbeitstagen bestimmt (Table 13).

Verdünnungslinearität: Urin: 100 - 105 %; Serum 99 - 100 %. 3 Urin- und 2 Serumproben mit erhöhter GHB Konzentration wurden mit 0.9 % Kochsalzlösung verdünnt und in verschiedenen Läufen gemessen (Table 14). Der Mittelwert beträgt 103 % in Urin und 100 % in Serum. Der Assay ist linear zwischen 5 und 230 mg/L.

Wiederfindung: Urin: 95-107 %; Serum: 106 - 113 %. 3 verschiedene Urin- und Serumproben wurden mit steigenden Mengen an GHB versetzt und analysiert. Der Mittelwert der Wiederfindungs- Experimente liegt bei 100 % in Urin und 110 % in Serum (Table 15).

Spezifität: Die in Table 16 aufgelisteten Substanzen wurden in Konzentrationen zwischen 10 und 1000 mg/L getestet, um die Spezifität des Enzyms zu ermitteln.

POTENTIELL INTERFERIERENDE SUBSTANZEN

Medikamente und Drogen: Die in Table 17 and Table 18 aufgelisteten Medikamente und Drogen wurden nach den gültigen Richtlinien für die Untersuchung von Interferenzen in klinisch chemischen Tests, EP7-A2 (7), auf dem KoneLab 30 ausgetestet. Bis zu den aufgeführten Konzentrationen treten keine Interferenzen auf.

Der Einfluss von **Ethanol** ist in Figure 2 dargestellt. 1 g/L Ethanol erhöht die GHB Konzentration um 3 mg/L.

Serum Indices: Für die folgenden Substanzen bis zu den aufgeführten Konzentrationen wurden keine Interferenzen festgestellt: **Triglyzeride (Intralipid® 275 mg/dL; equivalent zu 7.7 mmol/L Triglyzeriden), Konjugiertes Bilirubin (360 µmol/L; 30 mg/dL), unkonjugiertes Bilirubin (513 µmol/L; 30 mg/dL) oder Haemoglobin (3.1 mmol/L; 500 mg/dL).**

NORMALWERTE

Die folgenden Referenzbereiche für Urin und Serum (97.5. Perzentile) wurden ermittelt an Hand von Spendern, die kein GHB eingenommen hatten:

Urin: 97.5. Perzentile: 3.1 mg/L
Median: <1.5 mg/L;
n = 46

Serum: 97.5. Perzentile: 6.1 mg/L
Median: <1.5 mg/L;
n = 65

METHODEN VERGLEICH

34 Urinproben wurden mit einer publizierten IC-GHB Methode verglichen (6) (Figure 3):

$$KK\text{-GHB} = y = 1.07x \text{ IC-GHB} - 15.66 \quad R^2 = 0.997$$

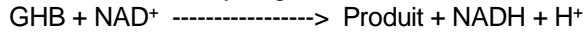
FRANÇAIS

DOMAINE D'UTILISATION

Le kit acide gamma-hydroxybutyrique (GHB) de BÜHLMANN est conçu pour la détermination directe et quantitative de GHB dans l'urine et le sérum humains. Le dosage peut être adapté aux analyseurs de chimie clinique, en accord avec les protocoles spécifiques de l'appareil.

PRINCIPE DU DOSAGE

GHB dehydrogenase



Le GHB est converti en son métabolite, (SSA, succinate semialdéhyde), par l'action de la GHB dehydrogenase (enzyme recombinante) et du nicotinamide adénine dinucléotide (NAD⁺) dans la forme oxydée. L'augmentation de l'absorbance à 340 nm provenant de la réduction de NAD⁺ en NADH est proportionnelle à la quantité de GHB présent dans l'échantillon.

REACTIFS FOURNIS ET PREPARATION

Réactifs ¹⁾	Quantité	Code	Reconstitution
Tampon d'incubation	1 flacon 12 mL	B-GHB-IB	Prêt à l'emploi
Cofacteur NAD ⁺ lyophilisé	1 flacon	B-GHB-CF	Ajouter 5,6 mL d'eau déionisée ⁴⁾
Enzyme Enzyme recombinante lyophilisée dans un tampon	2 flacons	B-GHB-E	Ajouter 4,2 mL d'eau déionisée ⁴⁾ Ne pas vortexer
Calibrateurs ²⁾ GBH lyophilisé	2 flacons	B-GHB- CASET	Ajouter 2 mL d'eau déionisée ⁴⁾
Contrôles Bas / Elevés ³⁾ GBH lyophilisé dans de l'urine humaine	2 flacons	B-GHB- CONSET	Ajouter 2 mL d'eau déionisée ⁴⁾

Table 5

- ¹⁾ Tous les réactifs contiennent de l'azoture de sodium (<0,1%) comme conservateur.
- ²⁾ Après reconstitution la concentration en GHB des calibrateurs est respectivement 10 et 100 mg/L.
- ³⁾ Les contrôles contiennent des quantités de GHB spécifiques au lot. Pour les concentrations réelles, se référer à la fiche de données de contrôle qualité.
- ⁴⁾ Pour la reconstitution, voir le chapitre Notes de procédure.

STOCKAGE ET PEREMPTION DES REACTIFS

Réactifs non reconstitués	
Les composants non reconstitués de cette trousse sont stables à 2 - 8 °C, sauf le cofacteur qui doit être stocké à -20 °C une fois reçus . Ne pas utiliser les réactifs après la date d'expiration.	
Réactifs reconstitués	
Tampon d'incubation	Conservé jusqu'à la date de péremption à 2 - 8 °C
Cofacteur	Conservé jusqu'à 2 mois à 2 - 8 °C
Enzyme	
Calibrateurs	
Contrôles	

Table 6

RECOMMANDATIONS ET PRECAUTIONS D'UTILISATION

- B-GHB-CASET et B-GHB-CONSET contiennent du GHB à <100 mg/L. A cette concentration, le GHB est considéré comme non toxique.
- Tous les réactifs contiennent de l'azoture de sodium à <0,1%. L'azoture de sodium peut réagir avec le cuivre ou le plomb et former des composés explosifs dans les canalisations métalliques. Après élimination, rincer abondamment avec de l'eau pour éviter toute accumulation d'azoture.

- Ne pas ingérer.
- Pour la reconstitution, n'utiliser que de l'eau déionisée. Voir le chapitre Notes de procédure.
- Les Calibrateurs et les Contrôles contiennent des composants d'urine humaine. Ainsi, la transmission d'agents pathogènes d'origine connue ou inconnue ne peut pas être totalement exclue.
- Les échantillons d'urine doivent être manipulés comme étant potentiellement infectieux.
- Tous les produits et échantillons contenant du matériel d'origine humaine doivent être manipulés conformément aux bonnes pratiques de laboratoire en respectant les précautions d'usage.

MATERIEL REQUIS MAIS NON FOURNI

- Dispositif de pipetage de précision (pipettes de 1,5 ou 10 mL)
- Tubes à essai/portoir
- Dispositif d'analyses cliniques pouvant mesurer l'absorbance à 340 nm
- L'eau déionisée
- Solution saline à 0,9%

PRELEVEMENT, PREPARATION ET CONSERVATION DES ECHANTILLONS

- Selon le volume mort de l'analyseur, un volume d'échantillon de ~110 µL doit être transféré dans les tubes d'échantillon spécifiques à l'appareil. Moins de 10 µL d'urine ou de sérum sont nécessaires pour effectuer le test. Veuillez-vous référer au manuel de votre appareil pour de plus amples informations.
- Urine: recueillir l'urine (pH 5-8) sans autres additifs et maintenir les échantillons réfrigérés et les filtrer ou centrifuger et récupérer le surnageant.
- Sérum: Se référer à la page 9 pour les informations sur interférences. Recueillir le sang dans des tubes secs (sans anti-coagulant), éviter l'hémolyse, laisser coaguler une heure, centrifuger 10 minutes à environ 1500 x g à température ambiante (18-28 °C), récupérer le surnageant.
- Conservation des échantillons: Les échantillons d'urine et de sérum peuvent être conservés à 2-8 °C pendant au moins deux semaines. Congeler les échantillons à -20 °C pour une conservation à long terme. La stabilité du GHB dans les échantillons a été largement étudiée (8).

NOTES DE PROCEDURE

Reconstitution des réactifs :

- Les flacons de Calibrateur et de Contrôle sont sous vide. Ainsi, **il faut absolument retirer les bouchons doucement et avec précaution** de façon à empêcher la perte de matière.
- Cofacteur (B-GHB-CF), Calibrateurs (B-GHB-CASET) et Contrôles (B-GHB-CONSET): Mélanger les flacons au vortex pendant 30 secondes après reconstitution ou utiliser un mélangeur de suspension pendant 15 minutes.
- Enzyme (B-GHB-E): **NE PAS VORTEXER!** Utiliser un mélangeur de suspension pendant 15 minutes à température ambiante jusqu'à ce que l'enzyme lyophilisée ait été complètement dissoute. Autrement, pivoter doucement le flacon après reconstitution, le laisser 15 minutes à température ambiante puis le retourner doucement.

- Dans l'analyseur l'Enzyme peut être conservée jusqu'à 15°C pour jusqu'à 2 mois.

PROCEDURE DE DOSAGE

Le dosage enzymatique de GHB est conçu pour l'analyse automatique avec des analyseurs de chimie clinique. Il doit être programmé comme test à trois réactifs. Veuillez-vous référer au manuel de votre appareil pour de plus amples informations.

Le protocole qui suit a été établi pour le KoneLab 30 (Thermo) et est utilisé ici comme exemple général pour la procédure de test. Nous fournissons l'assistance nécessaire pour une application sur d'autres appareils.

1. 100 µL de tampon d'incubation (R1)
+ 8 µL d'échantillon d'urine ou de sérum (S)
+ 7 µL d'eau déionisée
2. + 50 µL de Cofacteur (R2)
→ incuber pendant 1,5-2 min à 37 °C
3. + 85 µL d'Enzyme (R3)
4. T_{0 min}: mesure à 340 nm (blanc)
→ incuber pendant 5-6 min à 37 °C
5. T_{5-6 min}: mesure à 340 nm

RESULTATS

Etalonnage

Utiliser un mode en point final à 340 nm. L'absorbance obtenue après les mesures 1 (M1) et 2 (M2) est calculée en faisant la différence des absorbances (M2-M1). La courbe d'étalonnage sera calculée à partir des deux Calibrateurs, en utilisant un mode de régression linéaire. Se reporter au Table 11 et Figure 1 pour les résultats caractéristiques et la courbe d'étalonnage. Selon l'appareil utilisé, il peut être nécessaire de faire une autre lecture à une deuxième longueur d'onde, par exemple à 700 nm.

Un étalonnage du dosage de GHB est stable pour deux semaines. Un étalonnage du dosage de GHB est recommandé tous les 14 jours, lorsqu'un flacon frais d'Enzyme est reconstitué, ou quand les contrôles ne sont pas situés dans les limites établies.

Echantillons et Contrôles

L'absorbance à 340 nm est mesurée pour les Calibrateurs et la concentration de GHB pour chaque Contrôle et échantillon est calculée comme indiqué ci-dessus.

CALCUL DES RESULTATS

Procédure automatisée: Pour calculer les résultats, utiliser le mode en point final avec deux calibrateurs (10 et 100 mg/L). Veuillez-vous référer au manuel de votre appareil pour de plus amples informations.

Domaine de mesure: 5 - 230 mg/L

STANDARDISATION

Les Calibrateurs GHB ont été calibrés par rapport au GBH disponible dans le commerce, déterminé par HPLC.

CONTROLE DE QUALITE

- Les valeurs des Contrôles "Bas" et "Elevé" fournis avec le kit doivent se situer dans l'intervalle spécifique au lot mentionné sur la fiche de QC. Dans le cas contraire, la courbe d'étalonnage doit être à nouveau étalonnée.
- Les bonnes pratiques de laboratoire (BPL) entendent que les données suivantes soient notées pour chaque dosage: N° de lot du kit, dates de reconstitution des réactifs utilisés, résultats pour les

Calibrateurs et Contrôles, ainsi que du pool interne d'urines ou de sérums.

- Les valeurs attendues et de précision de la courbe d'étalonnage et des contrôles doivent se situer dans les limites établies. Les limites de confiance pour les contrôles sont spécifiques au lot et inscrites sur la fiche de données de QC fournie avec le kit.
- On obtient des résultats fiables seulement en pratiquant des techniques de laboratoire précises (directives actuelles de BPL) et en respectant ces instructions d'utilisation.

LIMITES

Une dilution à 1 :10 avec une solution saline à 0,9 % est recommandée pour les échantillons dépassant 230 mg/L (1 volume d'échantillon + 9 volumes de solution saline). Les résultats doivent être multipliés par 10.

Quand la mesure d'échantillon d'urine excède 1.0 DO à 340 nm, le test peut générer des résultats faux positifs.

Des méthodes alternatives peuvent être utilisées pour confirmer les résultats positifs.

Des substances et/ou des facteurs autres que ceux examinés dans le cadre de l'étude de spécificité peuvent interférer avec le test et générer des résultats erronés.

CARACTERISTIQUES D'EFFICACITE

Les caractéristiques d'efficacité ont été déterminées sur KoneLab 30.

Limite de blanc (LOB) : < 1 mg/L. La LOB est calculée par des mesures répétées de valeur de blanc (0.9% NaCl, n=60) selon le protocole CLSI EP17-A.

Limite de détection (LOD) : 1.5 mg/L. La LOD est calculée par des mesures répétées de deux échantillons contenant respectivement 4.8 et 6.2 mg/L de GHB (respectivement n = 40 et n=10) selon le protocole CLSI EP17-A (Table 12).

Limite de quantification (LOQ) : Urine : 5.0 mg/L ; sérum : < 5.0 mg/L. La LOQ des échantillon d'urine et de sérum est calculée par des mesures répétées d'échantillons à des concentrations comprises entre 3 et 16 mg/L. Une limite de 10 % de CV est appliquée.

Précision : Répétabilité : < 5 % de CV ; Précision inter-série : < 10% CV ; Précision jour-à-jour : < 5 % CV ; Précision totale : < 10 % de CV. La précision des échantillons d'urine et de sérum est calculée selon le protocole CLSI EP5-A2 par des mesures répétées à raison de 2 analyses par jour sur une durée de 10-20 jours ouvrés (Table 13).

Linéarité de la dilution : Urine : 95 - 107 % ; sérum : 106 - 113 %. Trois échantillons d'urine et deux de sérum présentant une concentration en GHB élevée ont été dilués avec une solution de NaCl à 0,9 % (Table 14). La valeur moyenne est de 103 % dans l'urine et de 100 % dans le sérum Le test est linéaire entre 5 et 230 mg/L.

Test de récupération: Urine: 95 - 107 % ; sérum: 106 - 113 %. Des quantités croissantes de GHB ont été ajoutées à trois échantillons différents d'urine et de sérum, puis ces derniers ont été analysés selon la procédure de dosage. La valeur moyenne est de 100 % dans l'urine et de 110 % dans le sérum (Table 15).

Spécificité: Les substances listées dans le Table 16 ont été analysées entre 10 et 1000 mg/L pour déterminer la spécificité de l'enzyme.

INTERFERENCES

Médicaments et drogues illicites: Les médicaments et les drogues illicites citées dans la Table 17 et Table 18 ont été testés, sur le KoneLab 30, selon les directives EP7-A2 (7) sur l'analyse des interférences en chimie clinique. Aucune interférence n'a été observée avec les concentrations indiquées.

L'interférence de l'**ethanol** est montrée dans la Figure 2. 1 g/L d'Ethanol augmente la valeur du GHB mesurée de 3 mg/L.

Indices Sériques: Aucune interférence n'a été observée avec les substances suivantes à la concentration indiquée: **Triglycérides** (Intralipid® 275 mg/dL; équivalent à 7.7 mmol/L de triglycérides), **bilirubine conjuguée** (360 µmol/L; 30 mg/dL), **bilirubine non conjuguée** (513 µmol/L; 30 mg/dL) ou **hémoglobine** (3.1 mmol/L; 500 mg/dL) sur le KoneLab 30.

VALEURS ATTENDUES

Les valeurs attendues ont été définies pour l'urine et le sérum d'adultes qui n'ont pas consommé de GHB :

Urine: 97,5^{ème} percentile: 3.1 mg/L

Médiane: <1.5 mg/L

n = 46

Sérum: 97,5^{ème} percentile 6.1 mg/L

Médiane: <1.5 mg/L

n = 65

COMPARAISON DE METHODES

Trente-quatre échantillons d'urine ont été comparés à une méthode publiée de dosage du GHB par CI (6) (Figure 3):

KK-GHB = y = 1.07x CI-GHB - 15.66 R² = 0.997

ITALIANO

OBIETTIVI DEL DOSAGGIO

Il kit BÜHLMANN acido gamma-idrossibutirrico (GHB) è destinato alla determinazione quantitativa diretta del GHB nelle urine e nel siero umano. Il dosaggio può essere utilizzato con gli analizzatori di chimica clinica in conformità ai protocolli specifici dello strumento.

PRINCIPIO DEL DOSAGGIO

GHB deidrogenase

GHB + NAD⁺ -----> prodotto + NADH + H⁺

Il GHB viene convertito nel suo metabolita succinica semialdeide, (SSA) grazie all'azione dell'enzima ricombinante specifico del GHB e della nicotinammide adenina dinucleotide ossidata (NAD⁺). L'aumento di assorbanza a 340 nm dovuto alla riduzione di NAD⁺ a NADH è proporzionale alla quantità di GHB presente nel campione.

REAGENTI FORNITI E PREPARAZIONE

Reagenti ¹⁾	Quantità	Codice	Ricostituzione
Tampone di incubazione	1 flaconcino 12 mL	B-GHB-IB	Pronto per l'uso
Cofattore NAD ⁺ liofilizzato	1 flaconcino	B-GHB-CF	Aggiungere 5.6 mL di acqua deionizzata ⁴⁾
Enzima Enzima liofilizzato in tampone	2 flaconcini	B-GHB-E	Aggiungere 4.2mL di acqua deionizzata ⁴⁾ Non vortexare
Calibratori ²⁾ GHB liofilizzato	2 flaconcini	B-GHB-CASET	Aggiungere 2 mL di acqua deionizzata ⁴⁾
Controllo basso / alto ³⁾ GHB liofilizzato in urine umane	2 flaconcini	B-GHB-CONSET	Aggiungere 2 mL di acqua deionizzata ⁴⁾

Table 7

- ¹⁾ Tutti i reagenti contengono sodio azide (<0,1%) come conservante.
- ²⁾ Dopo la ricostituzione, la concentrazione di GHB dei calibratori è, rispettivamente, di 10 e 100 mg/L.
- ³⁾ I controlli contengono quantità di GHB specifiche per ogni lotto. Per le concentrazioni effettive si rimanda alla scheda tecnica del CQ.
- ⁴⁾ Per la ricostituzione si rimanda al paragrafo Note procedurali.

CONSERVAZIONE E VALIDITÀ DEI REAGENTI

Reagenti non aperti	
I componenti non aperti del kit sono stabili a 2 – 8 °C, ad eccezione del cofattore, che deve essere conservato a -20 °C dalla consegna. Non utilizzare i reagenti dopo la data di scadenza del kit	
Reagenti aperti / ricostituiti	
Tampone di incubazione	Conservare a 2-8 °C fino alla data di scadenza
Cofattore	Conservare fino a 2 mesi a 2-8°C
Enzima	
Calibratori	
Controlli	

Table 8

AVVERTENZE E PRECAUZIONI

- B-GHB-CASET e B-GHB-CONSET contengono GHB a concentrazioni <100 mg/L. A questa concentrazione, il GHB è considerato non tossico.
- Tutti i reagenti contengono sodio azide <0,1%. La sodio azide può reagire con il rame e con il piombo e formare composti altamente esplosivi nelle tubature in metallo. Dopo lo smaltimento, risciacquare con abbondante acqua per prevenire le reazioni dell'azide.
- Non ingerire.

- Utilizzare esclusivamente acqua deionizzata per la ricostituzione. Vedi Note procedurali.
- I Calibratori e i Controlli contengono componenti delle urine umane. Pertanto, il rischio di trasmissione di patogeni di origine nota o non nota non può essere completamente escluso.
- I campioni di urine devono essere trattati come potenzialmente infettivi.
- Tutti i prodotti e i campioni contenenti materiale di origine umana devono essere maneggiati in conformità alle norme di buona pratica di laboratorio, adottando le precauzioni necessarie.

MATERIALI NECESSARI MA NON FORNITI

- Pipette di precisione (pipette da 1, 5 o 10 mL)
- Provette/porta provette
- Analizzatore clinico idoneo a misurare l'assorbanza a 340 nm.
- Acqua deionizzata
- Soluzione salina allo 0,9%

PRELIEVO E CONSERVAZIONE DEI CAMPIONI

- A seconda del volume morto dell'analizzatore, ~110 µL di campione devono essere trasferiti nelle provette specifiche dello strumento. Per il dosaggio sono necessari meno di 10 µL di urine o siero. Per i dettagli si rimanda al manuale d'impiego dello strumento.
- Urine: raccogliere le urine (pH 5-8) senza altri additivi e refrigerare i campioni. Filtrare o centrifugare e prelevare il sovrantante.
- Siero: Per quanto riguarda le interferenze di campioni emolizzati, lipemici o itterici, fare riferimento a pagina 11. Prelevare il sangue in provette non pretrattate (senza anticoagulanti), evitare l'emolisi, lasciare riposare per un'ora fino alla formazione del coagulo, centrifugare per 10 minuti a circa 1500 x g a temperatura ambiente (18-28 °C), prelevare il sovrantante.
- Conservazione dei campioni: Campioni di siero ed urine possono essere conservati a 2-8 °C fino a due settimane. Per tempi di conservazione più lunghi congelare i campioni a -20 °C. La stabilità del GHB nei campioni è stata approfonditamente studiata (8).

NOTE PROCEDURALI

Ricostituzione dei reagenti

- I flaconcini del Calibratore e dei Controlli sono sotto vuoto. Pertanto, è **indispensabile rimuovere lentamente e con attenzione i tappi di gomma**, per evitare perdite di materiale.
- Cofattore (B-GHB-CF), Calibratori (B-GHB-CASET) e Controlli (B-GHB-CONSET): vortexare i flaconcini per 30 secondi dopo la ricostituzione o utilizzare un miscelatore per sospensione per 15 minuti.
- Enzimi (B-GHB-E): **NON VORTEXARE!** Utilizzare un miscelatore per sospensione per 15 minuti a temperatura ambiente fino al completo dissolvimento dell'Enzima liofilizzato. In alternativa, dopo la ricostituzione far ruotare con delicatezza il flaconcino, lasciarlo riposare per 15 minuti a temperatura ambiente e quindi capovolverlo con delicatezza.
- Negli analizzatori di chimica clinica l'enzima deve essere mantenuto al di sotto dei 15 °C per almeno 2 mesi.

- por fino a due mesi.

PROCEDURA

Il dosaggio enzimatico GHB è destinato all'analisi automatica con analizzatori di chimica clinica e deve essere programmato come test a tre reagenti. Per i dettagli si rimanda ai protocolli specifici dello strumento.

Il protocollo seguente è stato creato per KoneLab30 e viene qui utilizzato come esempio generico della procedura. Per l'impiego con altri strumenti saremo lieti di fornire l'assistenza necessaria.

1. 100 µL di tampone di incubazione (R1)
+ 8 µL del campione di urine o siero (S)
+ 7 µL di acqua deionizzata
2. + 50 µL di Cofattore (R2)
→ Incubare per 1,5-2 min a 37 °C.
3. + 85 µL di Enzima (R3)
4. T_{0 min.}: misurare a 340 nm (base)
→ Incubare per 5-6 min a 37 °C.
5. T_{5-6 min.}: misurare a 340 nm

RISULTATI

Taratura

Utilizzare la modalità endpoint a 340 nm. L'assorbanza ottenuta con le misurazioni 1 (M1) e 2 (M2) viene calcolata per mezzo delle differenze di assorbanza (M2-M1). La curva standard viene generata con i due Calibratori tramite regressione lineare. Per i risultati e una curva standard tipici si rimanda alla Table 11 e alla Figure 1. A seconda dello strumento utilizzato può essere necessaria una lettura aggiuntiva a una lunghezza d'onda secondaria.

La calibrazione è stabile per almeno 2 settimane. La calibrazione della curva standard deve essere effettuata ogni 14 giorni, quando un nuovo flaconcino di enzima viene ricostituito o quando i controlli non si trovano all'interno del range indicato.

Campioni e controlli

L'assorbanza a 340 nm per i Calibratori viene acquisita e la concentrazione di GHB di ciascun controllo e campione viene calcolata come descritto precedentemente.

CALCOLO

Procedura automatica: per il calcolo dei risultati utilizzare la modalità endpoint con due calibratori (10 e 100 mg/L). Per ulteriori dettagli si rimanda al manuale d'impiego dello strumento.

Ambito di misurazione: 5 - 230 mg/L

STANDARDIZZAZIONE

I Calibratori GHB sono stati tarati con GHB disponibile in commercio quantificato tramite HPLC.

CONTROLLO DI QUALITÀ

- I valori dei Controlli basso e alto, forniti con il kit, devono trovarsi all'interno del range specifico per il lotto riportato nella relativa scheda tecnica. In caso contrario, la curva standard deve essere nuovamente tarato.
- È buona pratica di laboratorio registrare i seguenti dati di ciascun dosaggio: numero di lotto del kit, data di ricostituzione dei componenti del kit, risultati dei calibratori e dei controlli e del pool interno di urine o siero.

- La precisione e i valori attesi della curva standard e dei controlli devono trovarsi all'interno dei limiti approvati. I limiti di confidenza dei controlli, specifici per ogni lotto, sono riportati nella scheda tecnica di CQ allegata al kit.
- Solo utilizzando tecniche di laboratorio accurate (linee guida BPL attuali) e rispettando accuratamente le presenti istruzioni si otterranno risultati affidabili.

LIMITAZIONI

I campioni di urine con valori superiori a 230 mg/L possono essere diluiti 1:10 con soluzione salina allo 0,9 % (1 volume di campione + 9 volumi di soluzione salina). I risultati devono essere moltiplicati per 10.

Se il valore delle OD dei campioni di urine eccedono 1 OD a 340 nm (base), i risultati possono essere dei falsi positivi.

I risultati positivi devono essere confermati con metodi alternativi.

Altre sostanze e/o fattori che non compaiono tra quelli ricercati nell'ambito dello studio di specificità possono interferire con il test e causare risultati falso positivi.

CARATTERISTICHE DI PRESTAZIONE

I caratteristiche di prestazione sono state determinate con gli analizzatore di chimica clinica, KoneLab 30.

Limite del Bianco (LoB): <1 mg/L. Il LoB è stato determinato mediante misurazioni ripetute di valori di bianco (NaCl 0,9%, n= 60) in conformità con il protocollo CLSI EP17-A.

Limite di rilevabilità (LoD): 1.5 mg/L. Il LoD è stato determinato mediante misurazioni ripetute di due campioni contenenti 4.8 e 6.2 mg/L di GHB (n= 40 e n=10, rispettivamente) in conformità con il protocollo CLSI EP17-A (Table 12).

Limite di Quantificazione (LoQ): Urine: 5 mg/L; siero: <5.0 mg/L: Il LoQ del siero e delle urine è stato determinato mediante misurazioni ripetute di 3 campioni di urine e di sieri a concentrazioni comprese tra 3 e 16 mg/L. È stato determinato che rispettivamente la sensibilità al 10% del CV è di 5.0 e <5.0 mg/mL.

Precisione: Riproducibilità: <5% del CV; tra run <10 % del CV; tra giorni <5 % del CV; Precisione totale: <10% del CV. La precisione di campioni di urine e di sieri è stata determinata in conformità con il protocollo CLSI EP5-A2 mediante misurazioni ripetute in 2 run per giorno, per un periodo di 10-20 giorni lavorativi (Table 13).

Linearità di diluizione: Urine: 100 - 105%; siero: 99 - 100%. Tre campioni di urine e due di siero con alte concentrazioni di GHB sono stati diluiti con una soluzione di NaCl allo 0,9%. Il valore medio è 103% nelle urine e 100% nel siero (Table 14). Il test è lineare tra 5 e 230 mg/L.

Recupero: Urine: 95 - 107%; siero: 106 - 113%. Tre campioni diversi di urine e di siero sono stati addizionati con quantità crescenti di GHB e analizzati seguendo la procedura del dosaggio. Il valore medio è 100% nelle urine e 110% nel siero (Table 15).

Specificità: Per determinare la specificità dell'enzima sono state analizzate le sostanze riportate nella Table 16 tra 10 e 1000 mg/L.

INTERFERENZE

Droghe e Farmaci: Sono stati valutati i farmaci e le droghe riportate nelle Tabelle Table 17 e Table 18, in accordo con le linee guida approvate per le interferenze per i test di chimica clinica EP-A2 (7) su KoneLab 30. Nessuna interferenza è stata riscontrata per le concentrazioni elencate.

L'interferenza dell'**etanolo** è riportata nella Figure 2. 1g/L di etanolo eleva i valori di GHBdi 3 mg/L.

Parametri sierici: Nessuna interferenza è stata riscontrata per le seguenti sostanze alle concentrazioni elencate: Trigliceridi (**Intralipid**[®] 275 mg/dL; equivalenti a 7.7 mmol/L trigliceridi), **bilirubina coniugata** 360 µmol/L; 30 mg/dL), **bilirubina libera** (513 µmol/L; 30 mg/dL) o **emoglobina** (3.1 mmol/L; 500 mg/dL) su KoneLab 30.

VALORI ATTESI

Sono stati determinati i seguenti range per le urine e per il siero (97,5° percentile) in individui che non hanno assunto GHB:

Urine: 97,5° percentile:	3.1 mg/L
Mediana:	<1.5 mg/L;
n =	46
Siero: 97,5° percentile	6.1 mg/L
Mediana:	<1.5 mg/L;
n =	65

CONFRONTO DEI METODI

34 campioni di urine sono stati confrontati con un metodo CI-GHB pubblicato (6) (Figure 3):

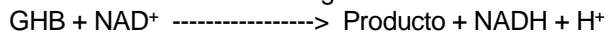
$$KK-GHB = y = 1.07x \text{ CI-GHB} - 15.66; R^2 = 0.997$$

USO ESPECÍFICO

El equipo de ácido γ -hidroxibutírico (GHB) de BÜHLMANN se ha ideado para la determinación directa y cuantitativa del GHB en la orina y el suero humanos. El ensayo puede adaptarse a los analizadores de química clínica según los protocolos del equipo específico.

PRINCIPIOS BÁSICOS DEL ENSAYO

GHB dehidrogenasa



El GHB se convierte en su metabolito semialdehído succínico, (SSA), por acción de la GHB dehidrogenasa (enzima recombinante) y el dinucleótido de nicotinamida adenina oxidado (NAD⁺). El aumento de la absorbancia a 340 nm resultante de la reducción de NAD⁺ en NADH es proporcional a la cantidad de GHB en la muestra.

REACTIVOS INCLUIDOS Y PREPARACIÓN

Reactivos ¹⁾	Cantidad	Código	Reconstitución
Solución amortiguadora de incubación	1 vial 12 mL	B-GHB-IB	Listo para usar
Cofactor NAD ⁺ liofilizado	1 vial	B-GHB-CF	Añadir 5.6 mL de agua desionizada ⁴⁾
Enzima Rec. Enzima liofilizada	2 viales	B-GHB-E	Añadir 4.2 mL de agua desionizada ⁴⁾ No agitar en vórtice
Calibradores²⁾ GHB liofilizado	2 viales	B-GHB-CASET	Añadir 2 mL de agua desionizada ⁴⁾
Controles bajo /alto³⁾ GHB liofilizado en orina humana	2 viales	B-GHB-CONSET	Añadir 2 mL de agua desionizada ⁴⁾

Table 9

- 1) Todos los reactivos contienen azida sódica (< 0,1%) como conservante.
- 2) Después de la reconstitución, las concentraciones de GHB de los calibradores son 10 y 100 mg/mL, respectivamente.
- 3) Los controles contienen cantidades de GHB específicas del lote. Consulte las concentraciones reales en la hoja de datos del control de calidad.
- 4) Para la reconstitución, consulte las notas del procedimiento

CONSERVACIÓN Y DURACIÓN DE LOS REACTIVOS

Reactivos no abiertos	
Los componentes del equipo sin abrir son estables a una temperatura de 2 - 8 °C, excepto del Cofactor, que debe conservarse a -20 °C al recibirse. No usar los reactivos después de la fecha de caducidad del equipo.	
Reactivos abiertos / reconstituídos	
Solución amortiguadora de incubación	Conservar hasta la fecha de caducidad a 2 - 8 °C
Cofactor	Conservar durante un período de hasta dos meses a 2 - 8 °C
Enzima	Conservar durante un período de hasta seis meses a 2 - 8 °C
Calibradores	Conservar durante un período de hasta seis meses a 2 - 8 °C
Controles	Conservar durante un período de hasta seis meses a 2 - 8 °C

Table 10

ADVERTENCIAS Y PRECAUCIONES

- B-GHB-CASET y B-GHB-CONSET contienen GHB a una concentración <100 mg/L. A esta concentración, el GHB se considera no tóxico.
- Todos los reactivos contienen azida sódica a una concentración <0,1%). La azida sódica puede reaccionar con el cobre o el plomo y formar compuestos explosivos en las cañerías de drenaje. Tras desechar el producto, abra el grifo y deje que salga abundante agua para despejar las cañerías de cualquier acumulación de azidas.

- No ingerir.
- Usar sólo H₂O desionizada para la reconstitución. Véase el apartado Notas del procedimiento.
- Los Calibradores y los controles contienen componentes de la orina humana. Por lo tanto, no puede excluirse completamente el riesgo de transmitir patógenos de origen conocido o desconocido.
- Las muestras de orina deberán manipularse como si fueran potencialmente infecciosas.
- Todos los productos y muestras que contienen material humano deben manipularse de conformidad con las prácticas adecuadas de laboratorio, con el uso de las precauciones adecuadas.

MATERIALES NECESARIOS Y NO INCLUIDOS

- Pipetas de precisión (pipetas de 1, 5 ó 10 mL).
- Tubos de ensayo / gradilla.
- Analizador clínico con capacidad para medir la absorbancia a 340 nm.
- Agua desionizada.
- Solución salina al 0.9%.

RECOGIDA Y CONSERVACIÓN DE LAS MUESTRAS

- Dependiendo del volumen muerto del analizador, debe colocarse un volumen aproximado de 110 μ L de muestra en los tubos de muestra específicos del equipo. Para ejecutar la prueba se necesitan menos de 10 μ L de muestra de orina o suero. Consulte las instrucciones en el manual del equipo.
- Orina: Recoger orina (pH de 5 a 8) sin otros aditivos, y mantener las muestras en refrigeración, filtrar o centrifugarlos y recoger el sobrenadante.
- Suero: En cuanto a interferencias de muestras hemolizadas, lipémicas o ictericas referirse a página 14. Recoger la sangre en tubos llanos (sin anticoagulante), evitar la hemólisis, dejar que coagule durante una hora, centrifugar durante 10 minutos a aproximadamente 1500 x g a temperatura ambiente (18 a 28 °C), recoger el sobrenadante.
- Conservación de las muestras: Las muestras están estables a una temperatura de 2 a 8 °C durante al menos dos semanas. Para conservarlas durante un tiempo más largo, mantenerlas a -20 °C.

NOTAS DEL PROCEDIMIENTO

Reconstitución de los reactivos:

- Los viales de calibrador y control están en condiciones de vacío. Por lo tanto, **es imprescindible retirar lentamente y con cuidado los tapones de goma**, a fin de evitar la pérdida de material.
- Cofactor (B-GHB-CF), Calibradores (B-GHB-CASET) y Controles (B-GHB-CONSET): Agitar en vórtice los viales durante 30 segundos después de la reconstitución, o usar una mezcladora de suspensión durante 15 minutos.
- Enzima (B-GHB-E): **NO AGITAR EN VÓRTICE!** Usar una mezcladora de suspensión durante 15 minutos a temperatura ambiente, hasta que la enzima liofilizada se haya disuelto completamente.
- También se puede hacer girar con cuidado el vial después de la reconstitución, dejarlo durante 15

minutos a temperatura ambiente y, después, invertirlo con cuidado.

- En analizadores de química clínica l'enzima puede conservarse hasta 15 °C por hasta dos meses.

PROCEDIMIENTO DEL ENSAYO

El ensayo enzimático de GHB está ideado para el análisis automático en analizadores de química clínica. Debe programarse como una prueba con tres reactivos. Consultar más detalles en los protocolos específicos del analizador.

Se ha establecido el siguiente protocolo para KoneLab 30 (Thermo) y se usa aquí como ejemplo general para el procedimiento del análisis. Para las aplicaciones en otros analizadores, proporcionaremos asistencia.

1. 100 µL de solución amortiguadora de incubación (R1).
+ 8 µL de muestra de suero u orina (S).
+ 7 µL de agua desionizada.
2. +50 µL de Cofactor (R2).
→ Incubación durante 1,5 a 2 minutos, a 37 °C.
3. +85 µL de Enzima (R3).
4. T_{0 min.}: Determinación a 340 nm (fondo)
→ Incubación durante 5 a 6 minutos, a 37 °C.
5. T_{5-6 min.}: Determinación a 340 nm.

RESULTADOS

Calibración

Usar una modalidad de punto final a 340 nm. La absorbancia obtenida después de la determinación a (M1) y 2 (M2) se calcula usando las diferencias de absorbancia (M2 - M1). La curva estándar se calculará a partir de los dos Calibradores, mediante una modalidad de regresión lineal. Consulte los resultados característicos y la curva estándar en Table 11 y Figure 1. Dependiendo del equipo, tal vez sea necesario leer, además, a una longitud de onda secundaria.

La calibración esta estable por dos semanas. Recomendemos realizar una calibración del ensayo cada 14 días, cuando se reconstituya un vial nuevo de Enzima o cuando los controles no se encuentran dentro de los límites específicos.

Muestras y controles

Se registra la absorbancia a 340 nm correspondiente a los calibradores, y se calcula la concentración de GHB correspondiente a cada Control y muestra, tal como se indica más arriba.

CÁLCULOS

Procedimiento automático: Para el cálculo de los resultados, usar la modalidad de punto final con dos calibradores (10 y 100 mg/L). Consultar más detalles en el manual del equipo.

Gama de medición: 5 a 230 mg/L

ESTANDARDIZACIÓN

Los Calibradores de GHB se han calibrado contra GHB comercial, cuantificado mediante HPLC.

CONTROL DE CALIDAD

- Los valores de los Controles bajo y alto proporcionados con el equipo deben estar dentro de los límites específicos del lote indicados en la hoja de datos correspondiente. En caso contrario, la curva estándar debe recalibrarse.
- Constituye una práctica adecuada de laboratorio anotar los siguientes datos de cada ensayo: número

de lote del equipo, fechas de reconstitución de los compuestos del equipo, resultados de los calibradores y los controles, y mezcla interna de orina o suero.

- La precisión y los valores esperados de la curva estándar y los controles deberán estar dentro de límites establecidos. Los límites de confianza de los controles son específicos del lote y están impresos en la hoja de datos de control de calidad suministrada con el equipo.
- Sólo se obtendrán unos resultados fiables mediante el uso de técnicas precisas de laboratorio (directrices actuales de las prácticas adecuadas de laboratorio) y mediante el cumplimiento preciso de estas instrucciones de uso.

LIMITACIONES

Recomendemos diluir las muestras que sobrepasen 230 mg/L a 1:10 con solución salina al 0,9% (1 volumen de muestra + 9 volúmenes de solución salina). Los resultados deben multiplicarse por 10.

Muestras de orina que sobrepasen 1.0 OD, puedan generar resultados falsamente positivos.

Sustancias y/o factores distintos de los investigados específicamente en este estudio puedan interferir con la prueba y generar resultados falsos; por ejemplo, errores de carácter técnico o de procedimiento.

Todos los resultados positivos deberán confirmarse mediante otros métodos.

CARACTERÍSTICAS DE EFICIENCIA

Las precisiones intra-ensayo y entre días se han determinado con el analizador de química clínica, KoneLab 30.

Límite para el blanco (LoB): <1 mg/L. El LoB se ha establecido mediante medidas repetidas de los valores del blanco (0.9% NaCl, n= 60) conforme al protocolo CLSI EP17-A.

Límite de detección (LoD): 1.5 mg/L. El LoD se ha establecido mediante medidas repetidas de los valores de dos muestras que contenían 4.8 y 6.2 mg/L (n= 40 y n=10 respectivamente) conforme al protocolo CLSI EP17-A. (Table 12).

Límite de cuantificación (LoQ): Orina: 5 mg/L; siero: <5 mg/L. El LoQ de muestras de orina y siero se determinó mediante medidas repetidas de tres muestras de orina y dos de siero con concentraciones de entre 3 y 16 mg/L. Se aplicó un límite del 10 % de CV.

Precisión: Repetibilidad: <5 % de CV; Inter run: <10 % CV; Inter días: <5 % CV; Precisión total: <10 % de CV. La precisión de muestras de orina y siero se determinó de conformidad con el protocolo CLSI EP5-A2 mediante medidas repetidas en 2 tandas al día durante un período de 20 días de trabajo (Table 13).

Linealidad de la dilución: Orina: 100-105 %; suero: 99-100 %. Se han diluido tres muestras de orina y dos de suero con una concentración elevada de GHB con solución de NaCl al 0,9 %. El medio del valor es de 103 % para orina y 100 % para suero (Table 14). Linealidad de I test est entre 5 – 230 mg/L.

Recuperación de cantidades añadidas: Orina: 95-107 %; suero 106-113 %. A tres muestras de orina y suero diferentes se les han añadido cantidades crecientes de GHB, y se han analizado en dos determinaciones según el

procedimiento del ensayo. El medio del valor es de 100 % para orina y 110 % para suero (Table 15).

Especificidad: Para determinar la especificidad de la enzima se han analizado las sustancias enumeradas en la table Table 16 a concentraciones entre 10 y 1000 mg/L.

INTERFERENCIAS

Drogas y fármacos: Las drogas y fármacos reportados en Table 17 e Table 18 estaban examinado en acuerdo con las directrices aprobadas para las interferencias afectando los ensayos de química clínica EP-A2 (7) utilizando el KoneLab 30. Ninguna interferencia estaba encontrado asta a las concentraciones listadas en tabella 18 y 19.

L'interferencia de l'etanol esta reportato en la Figure 2. 1g/L de l' etanol aumenta la concentración di GHB a 3 mg/L.

Parametros de suero: Ninguna interferencia estaba encontrada para las siguientes sustancias asta a las concentraciones siguientes: Trigliceridos (**Intralipid**[®] 275 mg/dL; equivalentos a 7.7 mmol/L trigliceridi), **bilirrubina conjugata** 360 µmol/L; 30 mg/dL), **bilirrubina no conjugada** (513 µmol/L; 30 mg/dL) o **hemoglobina** (3.1 mmol/L; 500 mg/dL) utilizando el analizador KoneLab 30.

VALORES ESPERADOS

Se ha determinado los valores esperados de referencia para la orina y el suero de adultos que no han consumado GHB:

Orina: 97,5^o percentil: 3.1 mg/L
Mediana: <1.5 mg/L
n = 46

Suero: 97,5^o percentil: 6.1 mg/L
Mediana: <1.5 mg/L
N = 65

COMPARACIÓN DE LOS MÉTODOS

Se han comparado 34 muestras de orina con un método de CI-GHB publicado (6) (Figure 3):

KK-GHB = y = 1.07x CI-GHB - 15.66; R² = 0.997

TABLES/ TABELLEN/ TABLES/ TABELLE/ TABLAS

Figure 1: Example of Standard Curve

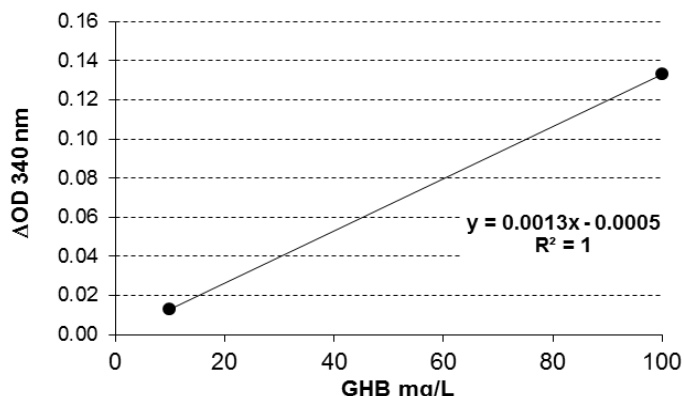


Table 11: Example of Results

Calibrators (2 replicates)	Mean (ΔOD)	SD (ΔOD)	CV [%]
10	0.013	0.0001	0.7
100	0.124	0.0025	2.0

Controls (2 replicates)	Values (ΔOD)	Replicates [mg/L]	Mean [mg/L]	CV [%]
low	0.017	13.0	13.0	0.3
	0.017	13.1		
high	0.096	76.7	76.7	0.0
	0.095	76.6		

Table 12: LoB , LoD and LoQ

LoB [mg/L]	LoD [mg/L]	LoQ [mg/L]
<1	1.5	Urine: 5 Serum: <5

Table 13: Assay Precision

Sample [mg/L]	Total Precision [%]	Repeatability (Within Run) [%]	Between Run [%]	Between Day [%]
Urine				
11.2	8.6%	4.9%	7.0%	0.0%
55.3	4.5%	3.0%	3.0%	1.5%
100.3	5.2%	1.0%	2.9%	4.2%
Serum				
12.0	9.7%	5.0%	8.3%	0.0%
55.2	4.1%	2.1%	3.6%	0.0%
106.6	3.7%	1.4%	3.5%	0.0%

Table 14: Dilution Linearity

Example 1 of 3	Dilution	Observed [mg/L]	Expected [mg/L]	O/E [%]
Urine 1	1:1	238.6	287.3	83
	1:1.5	170.6	191.5	89
	1:2.25	119.9	127.7	94
	1:3.4	85.1	85.1	100
	1:5.1	58.8	56.7	104
	1:7.6	41.1	37.8	109
	1:11.4	27.8	25.2	110
	1:17.1	19.6	16.8	117
	1:25.6	13.0	11.2	116
	1:38.4	8.3	7.5	112
Mean urine 1				103
Mean urine 2				105
Mean urine 3				100
Mean urine				103
Serum 1	1:1	239.9	295.3	81
	1:1.5	184.0	210.9	87
	1:2.25	132.7	140.6	94
	1:3.4	93.7	93.7	100
	1:5.1	66.1	62.5	106
	1:7.6	45.1	41.7	108
	1:11.4	30.5	27.8	110
	1:17.1	20.0	18.5	108
	1:25.6	12.4	12.3	101
	1:38.4	7.9	8.2	96
	1:57.7	5.1	5.5	94
Mean serum 1				99
Mean serum 2				100
Mean serum				100

Table 15: Spiking Recovery

Example 1 of 3	Native [mg/L]	Spiked with [mg/L]	Observed [mg/L]	Expected [mg/L]	O/E [%]
Urine1	<1.5	10	10.1	10.0	97
		25	15.2	15.0	91
		50	49.1	50.0	98
		100	90.5	100.0	95
Mean urine 1				95	
Mean urine 2				98	
Mean urine 3				107	
Mean urine				100	
Serum1	<1.5	10	11.8	10.0	107
		25	18.3	15.0	118
		50	54.7	50.0	110
		100	102.6	100.0	104
Mean serum 1				110	
Mean serum 2				113	
Mean serum 3				106	
Mean serum				110	

Table 16:
Specificity

Enzyme

Component/substrate	Substrate specificity
γ-hydroxyvaleric acid, (GHV)	<0.1 %
γ-butyrolactone, (GBL)	4.0 %
1,4-butanediol, (1,4-BD)	<0.1 %
α-hydroxybutyric acid, (AHB)	<0.1 %
β-hydroxybutyric acid, (BHB)	<0.1 %
γ-hydroxyvaleric acid, (GHV)	<0.1 %
succinic acid	<0.1 %
γ-valerolactone, (GVL)	<0.1 %

Interferences

Table 17
drugs

Interference of therapeutic

Therapeutic drugs	No interference up to	
Amikacin	53.2	μmol/L
Caffeine	84.5	μmol/L
Carbamazepine	75.4	μmol/L
Cyclosporine	480	nmol/L
Digoxin	4.43	nmol/L
Ethosuximide	970	μmol/L
Gentamicin	18.6	μmol/L
Lithium	1.77	mmol/L
Lithium (Vitros)	2.25	mmol/L
Methotrexate	7.78	μmol/L
Paracetamol	1.44	mmol/L
Phenobarbitone	223	μmol/L
Phenytoin	74.9	μmol/L
Primidone	58.8	μmol/L
Salicylic acid	2.86	mmol/L
Theophylline	177	μmol/L
Tobramycin	19.5	μmol/L
Valproic acid	998	μmol/L
Vancomycin	20.3	μmol/L

Table 18
Interference of Drugs of abuse

Substance	No interference up to	
Amphetamines (d-Methamphetamines)	1250	ng/mL
Barbiturates (Secobarbital)	375	ng/mL
Benzodiazepines (Oxazepam)	390	ng/mL
Cannabinoids (11-Nor-Δ-9-THC-9-COOH)	65	ng/mL
Cocaine (Benzoyllecgonine)	500	ng/mL
LSD	1	ng/mL
Methadone	375	ng/mL
Opiates (Free Morphine)	2500	ng/mL
Phencyclidine	31	ng/mL
Propoxyphene (Norpropoxyphene)	375	ng/mL
Nortryptiline	375	ng/mL

Figure 2

Interference of Ethanol

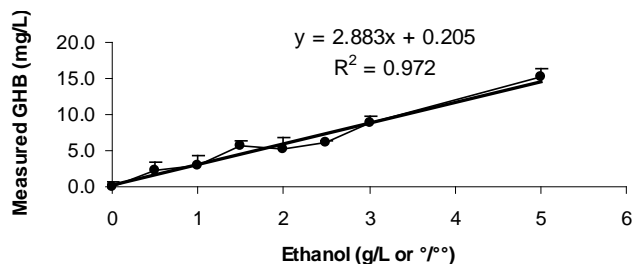


Figure 3 Correlation between KK-GHB and IC-GHB

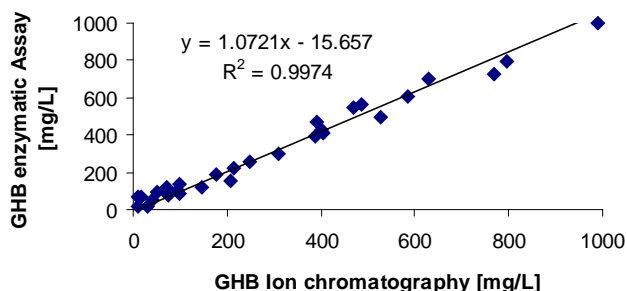


Table description: “Calculation” (page 3), “Performance Characteristics” (page 4), and “Interpretation of Results” (page 4).






Tabellenbeschreibung: siehe “Resultate” (Seite 5), “Leistungsmerkmale” (Seite 6) und “Interpretation der Resultate” (Seite 6).

Explications relatives aux tableaux: voir “Résultats” (page 8), “Caractéristiques de Performance” (page 8) et “Interprétation des Résultats” (page 9).

Descrizione tavola: “Risultati” (pagina 10), “Caratteristiche di Prestazione” (pagina 11) e “interpretazione dei risultati” (pagina 11).

Explicaciones relativas a las Tablas: ver “Resultados” (página 13), “Características de Eficiencia” (página 13) y “Interpretaciones de los resultados” (página 14).

1. Bravo DT et al.: *Reliable, sensitive, rapid and quantitative enzyme-based assay for gamma-hydroxybutyric acid (GHB)*. J Forensic Sci. 2004, **49**(2): 379-87
2. Mari F et al.: *What constitutes a normal ante-mortem urine GHB concentration?* J Forensic Leg Med. 2009, **16**(3): 148-51
3. Andresen H et al.: *Liquid ecstasy - a significant drug problem*. Dtsch Arztebl Int. 2008; **105**(36): 599-603
4. Haller C et al.: *GHB urine concentrations after single-dose administration in humans*. J Anal Toxicol. 2006; **30**(6): 360-4
5. Elliott SP: *The many faces of gamma hydroxybutyric acid (GHB)*. Drug Monit. 2003; **4**(2): 9-12
6. Andresen H et al.: *Gamma-hydroxybutyrate in urine and serum: additional data supporting current cut-off recommendations*. Forensic Sci Int. 2010; **200**(1-3): 93-9
7. Hasan L et al.: *An enzymatic method to determine γ -hydroxybutyric acid in serum and urine*. Ther Drug Monit. 2011; **33**(6): 757-65
8. Jordi M et al.: *GHB Determination with Ion Chromatography* Therap. Drug Monit. 25 (2003) 486
9. Clinical Laboratory Standards Institute: *Interference Testing in Clinical Chemistry*; approved guideline (EP7-A2), 2005

Symbol	Explanation	Symbol	Symbol
	Use By Verwendbar bis Utiliser jusqu'au Utilizzare entro Fecha de caducidad	BUF INC	Incubation Buffer Inkubations-Puffer Tampon d'incubation Tampone di incubazione Tampón de incubación
REF	Catalogue number Bestellnummer Référence du catalogue Numero di catalogo Número de catálogo	COF	Cofactor Kofaktor Cofacteur Cofattore Cofactor
LOT	Batch code Chargenbezeichnung Code du lot Codice del lotto Codigo de lote	ENZ	Enzyme Enzym Enzyme Enzime Enzime
IVD	<i>In Vitro</i> Diagnostic Medical Device <i>In Vitro</i> Diagnostikum Dispositif médical de diagnostic <i>in vitro</i> Dispositivo medico-diagnostico <i>in vitro</i> Producto sanitario para diagnóstico <i>in vitro</i>	CALA	Calibrator A Kalibrator A Calibreur A Calibratore A Calibrador A
	Contains sufficient for <n> tests Ausreichend für "n" Ansätze Contenu suffisant pour „n“ tests Contenuto sufficiente per „n“ saggi Contenido suficiente para <n> ensayos	CALB	Calibrator B Kalibrator B Calibreur B Calibratore B Calibrador B
	Consult Instructions for Use Gebrauchsanweisung beachten Consulter le mode d'emploi Consultare le istruzioni per l'uso Consulte las instrucciones de uso	CONTROL L	Control Low Kontrolle tief Contrôle bas Controllo basso Control bajo
	Temperature limitation Zulässiger Temperaturbereich Limites de température Limiti di temperatura Limite de temperatura	CONTROL H	Control High Kontrolle hoch Contrôle élevé Controllo alto Control alto
	Upper limit of temperature Temperaturobergrenze Limite de température maximale Limite de temperatura maximale Limite de temperatura maximale		

IVD

CE

Patent pending