



GHB

Gamma-Hydroxybutyric Acid

Enzymatic Assay

KK-GHB

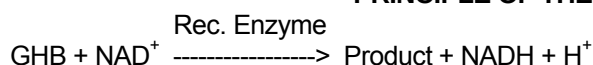
Revision date: 2010-05-21

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, (SSA, succinic semialdehyde), by the action of GHB-specific recombinant enzyme (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
Calibrators ²⁾ lyophilized GHB	2 vials	B-GHB-CASET	Add 2 ml of deionized water ⁴⁾
Controls Low / High ³⁾ 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 and Enzyme that must be stored at -20 °C upon receipt. Do not use reagents after expiration of the kit.	
Opened / Reconstituted Reagents	
Incubation Buffer	Store for up to 2 months at 2 - 8 °C
Cofactor	
Enzyme	Store for up to 15 days per vial (1 month in total) at 2 - 6 °C; refer to Procedural Notes
Calibrators	Store for up to 2 months at 2 - 8 °C
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 H_2O 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. **Do not leave the vial at RT for more than 15 minutes.** Reconstitute the Enzyme refrigerated at 2-6 °C, if you need to extend the reconstitution time.
- Important:** The Enzyme must be kept at 2-6 °C. If the temperature range of the clinical chemistry analyzer in use does not fulfil this requirement, **reagents should be recapped and stored in the refrigerator below 6 °C.** On board, a temperature above 6 °C may cause a loss of enzyme activity.

Thus the OD obtained in the end point measurement might decrease. Controls included in the kit can be used to monitor the assay performance. If the controls do not fit to the range indicated in the QC data sheet a recalibration of the standard curve is mandatory.

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).

Important: Calibration of the assay should be carried out **every 10 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.

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 250 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 blank of 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.

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 - 250 mg/L

PERFORMANCE CHARACTERISTICS

Assay performance characteristics have been determined on KoneLab 30.

Intra-assay precision: Urine: 0.8 - 4.6 %; serum: 1.0 - 3.8 %. The intra-assay precision has been determined by repeated measurements of one urine and serum sample, each spiked with 3 different concentrations of GHB (10, 50, 100 mg/L) in a single run. The mean value is 2.1 % in urine and 2.0 % in serum (Table 12).

Between-days precision: Urine: 2.4 - 7.4 %; serum: 2.7 - 8.3 %. The between-days precision has been determined according to NCCLS EP5-A2 by repeated measurements of two controls and one urine and serum sample, each spiked with 3 different concentrations of GHB (10, 50, 100 mg/L) in 2 runs per day over a period of 20 work days. The mean value is 4.0 % in urine and 4.7 % in serum (Table 13).

Dilution linearity: Urine 98 - 102 %; serum 100 - 110 %. Two urine and serum samples with elevated GHB concentration have been diluted with 0.9% NaCl solution (Table 14). The mean value is 100 % in urine and 105 % in serum. The dilution linearity (observed vs. expected) has been calculated in a concentration range between approximately 100 and 6 mg/L. It is linear between 5 and 250 mg/L.

Spiking recovery: Urine: 102 - 115 %; serum: 103 - 112 %. Five different urine and serum samples have been spiked with increasing amounts of GHB and analyzed in 3 runs. The mean value is 105 % in urine and 109 % in serum (Table 15).

Analytical sensitivity: 1.5 mg/L. The analytical sensitivity is dependent on the precision of the clinical chemistry analyzer used. By repeated measurements with 0.9% NaCl (n= 60) the imprecision of the analyzer was determined by calculating the mean +3 SD value and converted it into GHB mg/L (Table 16).

Functional sensitivity: Urine: 2.8 mg/L; serum: 4.5 mg/L. The functional sensitivity of serum and urine was determined by repeated measurements of 5 urine and serum samples at concentrations between 0 and 250 mg/L. The sensitivity at 15 % CV was determined to be 2.8 and 4.5 mg/L, respectively (Figure 2).

Specificity: The substances listed in Table 17 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 18 and Table 19 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 3. Up to 3‰ the measured GHB concentration is below 10 mg/L. 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:	10.6 mg/L
Median:	3.3 mg/L
n = 75	
Serum: 97.5 th percentile	4.0 mg/L
Median:	0.68 mg/L
n = 50	

METHOD COMPARISON

34 urine samples have been compared to a published IC-GHB method (6) (Figure 4):

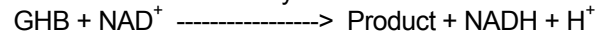
$$KK-GHB = y = 1.07x \text{ IC-GHB} - 15.66; R^2 = 0.997$$

ANWENDUNGSZWECK

Der BÜHLMANN Gamma-Hydroxybuttersäure (GHB) Kit wurde zur direkten und 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 des GHB-spezifischen rekombinanten Enzyms (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 Packungsetikette. Lagerung bei 2 - 8 °C, mit Ausnahme von Cofaktor und Enzym, die nach Erhalt bei -20 °C gelagert werden müssen. Kit nicht nach dem Ablaufdatum verwenden.	
Geöffnete / Rekonstituierte Reagenzien	
Inkubationspuffer	Bis zu 2 Monate bei 2 – 8 °C lagern
Cofaktor	
Enzym	Bis zu 15 Tage (insgesamt 1 Monat) bei 2 - 6 °C lagern. Siehe auch Hinweise zum Ablauf.
Kalibratoren	Bis zu 2 Monate bei 2 - 8 °C lagern
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 unbekannten 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. **Das Enzym nicht länger als 15 Minuten bei Raumtemperatur stehen lassen.** Rekonstituieren Sie das Enzym bei 2

– 6 °C und mischen wie oben beschrieben, wenn Sie die Rekonstitutionszeit nicht exakt einhalten können.

- **Wichtig:** Das Enzym muss bei 2-6 °C gelagert werden. Wenn die Temperaturregelung des eingesetzten klinisch-chemischen Analysers diese Anforderungen nicht erfüllt, **müssen die Reagenzien wiederverschlossen und im Kühlschrank unterhalb von 6 °C aufbewahrt werden.** Eine Temperatur oberhalb von 6 °C im Gerät kann einen Verlust der Enzymaktivität verursachen. Deshalb kann die bei der Endpunktmessung erhaltene OD abnehmen. Die im Kit enthaltenen Kontrollen können verwendet werden, um die Assay Performance zu überwachen. Wenn die Kontrollen nicht in dem, auf dem QC Datenblatt angegebenen Bereich liegen, ist eine Rekalibration der Standardkurve zwingend erforderlich.

ARBEITSANLEITUNG

Der enzymatische GHB Assay wurde für die automatisierte Abarbeitung auf klinisch-chemischen Analysen 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).

Wichtig: Die Kalibrierung des Tests sollte **alle 10 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.

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 250 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 Blank 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.

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 - 250 mg/L

LEISTUNGSMERKMALE

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

Intra-Assay Präzision: Urin 0.8 - 4.6 %; Serum 1.0 - 3.8 %. Die Intra-Assay Präzision wurde bestimmt durch wiederholte Messungen je einer Urin- und Serumprobe in einem Lauf, die jeweils mit 3 verschiedenen GHB Konzentrationen (10, 50, 100 mg/L) angereichert wurde. Der Mittelwert beträgt 2.1 % in Urin und 2.0 % in Serum (Table 12).

Präzision „zwischen Arbeitstagen“: Urin 2.4 - 7.4 %; Serum 2.7 - 8.3 % Die Präzision zwischen Arbeitstagen wurde nach NCCLS EP5-A2 ermittelt durch wiederholte Messungen zweier Kontrollen und je einer Urin- und Serumprobe, die jeweils mit 3 verschiedenen GHB Konzentrationen (10, 50, 100 mg/L) angereichert wurde, in 2 Läufen pro Tag über einen Zeitraum von 20 Arbeitstagen. Der Mittelwert beträgt 4.0 % in Urin und 4.7 % in Serum (Table 13).

Verdünnungslinearität: Urin: 98 - 102 %; Serum 100 - 110 %. 2 Urin- und Serumproben mit erhöhter GHB Konzentration wurden mit 0.9 % Kochsalzlösung verdünnt und in verschiedenen Läufen gemessen. Der Mittelwert beträgt 100 % in Urin und 105 % in Serum (Table 14). Die Verdünnungslinearität (berechnet aus beobachtet vs. erwartet) liegt in einem Bereich zwischen 100 und 6 mg/L.

Der lineare Bereich des Assays liegt zwischen 5 und 250 mg/L.

Wiederfindung: Urin: 102-115 %; Serum: 103 - 112 %. 5 verschiedene Urin- und Serumproben wurden mit steigenden Mengen an GHB versetzt und in drei Läufen analysiert. Der Mittelwert der Wiederfindungs- Experimente liegt bei 105 % in Urin und 109 % in Serum (Table 15).

Analytische Sensitivität: 1.5 mg/L. Die analytische Sensitivität hängt von der Sensitivität des verwendeten klinisch-chemischen Analysers ab. Sie wurde bestimmt durch wiederholte Messung von 0.9% Kochsalzlösung (n=60). Sie wurde errechnet, indem die dem OD-Mittelwert +3 SD entsprechende GHB-Konzentration in mg/L ermittelt wurde (Table 16).

Funktionelle Sensitivität: Urin: 2.8 mg/L; Serum: 4.5 mg/L. Die funktionelle Sensitivität (Konzentration bei 15% CV) wurde durch wiederholte Messung von 5 Urin bzw. Serumproben in 3 Replikaten über einen Konzentrationsbereich von 0 - 250 mg/L ermittelt (Figure 2).
Spezifität: Die in Table 17 aufgelisteten Substanzen wurden in Konzentrationen zwischen 10 und 1000 mg/L getestet, um die Spezifität des Enzyms zu ermitteln.

POTENTIELL INTERFERIERENDE SUBSTANZEN

Medikamente and Drogen: Die in Table 18 and Table 19 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 3 dargestellt. Bis zu 3% ist die gemessene GHB Konzentration unter 10 mg/L. 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: 10.6 mg/L
Median: 3.3 mg/L;
n =75

Serum: 97.5. Perzentile: 4.0 mg/L
Median: 0.68 mg/L;
n = 50

METHODEN VERGLEICH

34 Urinproben wurden mit einer publizierten IC-GHB Methode verglichen (6) (Figure 4):

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

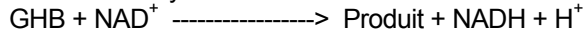
FRANÇAIS

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

Enzyme recombinante



Le GHB est converti en son métabolite, (SSA, succinate semialdéhyde), par l'action de l'enzyme recombinante spécifique au GHB 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'azote 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 et l'enzyme qui doivent être stockés à -20 °C une fois reçus. Ne pas utiliser les réactifs après la date d'expiration.	
Réactifs reconstitués	
Tampon d'incubation	Conserver jusqu'à 2 mois à 2 - 8 °C
Cofacteur	
Enzyme	Conserver jusqu'à 15 jours chaque flacon (1 mois au totale) à 2 - 6 °C. Se référer aux Notes de Procédure.
Calibrateurs	Conserver jusqu'à 2 mois à 2 - 8 °C
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'azote de sodium à <0,1%. L'azote 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'azote.

- 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
- 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. **Ne pas laisser le flacon à température ambiante plus de 15 minutes.** S'il vous faut plus de temps de reconstitution, reconstituer l'Enzyme à 2-6 °C.

- **Important: L'Enzyme doit être conservée à 2-6 °C. Si la plage de température de stockage des réactifs de l'analyseur de chimie clinique ne satisfait pas cette condition, les réactifs doivent être conservés soigneusement fermés au dessous de 6 °C.** En cas de conservation sur l'appareil, une température au-dessus de 6 °C peut entraîner une perte d'activité enzymatique. La valeur de DO ainsi obtenue lors de la mesure en point final peut diminuer. Les contrôles inclus dans le kit peuvent être utilisés pour surveiller la performance de dosage. Si les contrôles ne sont pas inclus dans le domaine de concentration indiqué sur la fiche de QC, il est nécessaire de re-calibrer la courbe d'étalonnage.

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 fournirons 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)
→ incubé pendant 1,5-2 min à 37 °C
3. + 85 µL d'Enzyme (R3)
4. T_{0 min}: mesure à 340 nm (blanc)
→ incubé 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.

Important: Un étalonnage du dosage de GHB est recommandé tous les **10 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.

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 250 mg/L (1 volume d'échantillon + 9 volumes de solution saline). Les résultats doivent être multipliés par 10.

Quand la mesure du blanc 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.

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 - 250 mg/L

CARACTERISTIQUES D'EFFICACITE

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

Précision intra-essai: Urine: 0.8–4.6 %; sérum: 1.0 – 3.8 %. La précision intra-essai a été établie par des mesures répétées sur d'un même échantillon d'urine et de sérum, chacun enrichi avec 3 concentrations différentes de GHB (10, 50, 100 mg/L) dans un même dosage. La valeur moyenne est de 2.1 % dans urine et de 2.0 % dans sérum (Table 12).

Précision du dosage sur plusieurs jours (inter-essay): Urine: 2.7 - 7.4 %; sérum: 2.7 – 8.3 %. La précision du dosage sur plusieurs jours a été établie selon le protocole EP5-A2 par des mesures répétées de deux contrôles et un échantillon d'urine et de sérum, chacun enrichi avec 3 concentrations différentes de GHB (10, 50, 100 mg/L), avec 2 mesures par jour sur une période de 20 jours travaillés. La valeur moyenne est de 4.0 % dans urine et de 4.7 % dans sérum (Table 13).

Linéarité de la dilution: Urine: 98 - 102 %; sérum: 100 - 110 %. Deux échantillons d'urine et 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 100 % dans urine et de 105 % dans sérum. La linéarité de la dilution (observée contre attendue) a été calculée dans un domaine de concentration env. de 100 à 6 mg/L. Le test est linéaire entre 5 et 250 mg/L.

Test de récupération: Urine: 102 - 115 %; sérum: 103 - 112 %. Des quantités croissantes de GHB ont été ajoutées à cinq échantillons différents d'urine et de sérum, puis ces derniers ont été analysés selon la procédure de dosage. La valeur moyenne est de 105 % dans urine et de 109 % dans sérum (Table 15).

Sensibilité analytique: 1.5 mg/L. La sensibilité analytique est dépendante de la précision de l'analyseur de chimie clinique utilisé. Des mesures répétées d'une solution saline à 0,9 % (n=60) ont permis de déterminer l'imprécision de l'analyseur en calculant la valeur de la moyenne +3 SD et de la convertir en mg/L de GHB (Table 16).

Sensibilité fonctionnelle: Urine : 2.8 mg/L ; sérum : 4.5 mg/L. La sensibilité fonctionnelle (concentration à 15 % CV) a été déterminée par des mesures répétées de cinq échantillons d'urine et de sérum à des concentrations comprises entre 0 et 250 mg/L (Figure 2).

Spécificité: Les substances listées dans le Table 17 ont été analysées entre 10 et 10.000 mg/L pour déterminer la spécificité de l'enzyme.

INTERFERENCES

Médicaments et drogues illicites: Les médicaments et les drogues illicites citées dans la Table 18 et Table 19 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 3. La valeur du GHB mesurée est inférieure à 10 mg/L pour des concentrations en **ethanol** inférieures à 3‰. 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: 10,6 mg/L

Médiane: 3,3 mg/L

n = 75

Sérum: 97,5^{ème} percentile 4.0 mg/L

Médiane: 0,68 mg/L

n = 50

COMPARAISON DE METHODES

Trente-quatre échantillons d'urine ont été comparés à une méthode publiée de dosage du GHB par CI (6) (Figure 4):

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

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

enzima ricombinante
 $GHB + NAD^+ \longrightarrow \text{prodotto} + NADH + H^+$

Il GHB viene convertito nel suo metabolita (SSA, succinica semialdeide) 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 4.2 ml 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 dei cofattori e degli enzimi, che devono essere conservati a -20 °C dalla consegna. Non utilizzare i reagenti dopo la data di scadenza del kit.	
Reagenti aperti / ricostituiti	
Tampone di incubazione	Conservare fino a un massimo di 2 mesi a 2-8 °C.
Cofattore	
Enzima	Conservare per 15 giorni ogni flaconcino (un mese in totale) a 2-6°C. Vedi Note Procedurali
Calibratori	Conservare per un massimo di 2 mesi a 2-8 °C.
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 capovolgerlo con delicatezza. **Non lasciare il flaconcino più di 15 minuti a temperatura ambiente.** Se si desidera prolungare i tempi di ricostituzione, ricostituire l'Enzima a 2 - 6 °C.

- **Importante: L'Enzima deve essere mantenuto a 2-6 °C. Se la strumentazione utilizzata non può garantire questo range di temperatura a bordo, i reagenti devono essere ri-tappati e mantenuti in frigor ad una temperatura a 2-6 °C.** Una temperatura a bordo superiore ai 6 °C potrebbe causare una perdita dell'attività dell'enzima. Quindi i risultati in OD ottenuti misurando end point potrebbero essere inferiori. I controlli inclusi nel kit possono essere usati per monitorare le performance del kit. Se i controlli non rientrano nel range indicato nel QC data sheet, si rende necessaria la ri-calibrazione sulla curva.

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.

Importante: la taratura della curva standard può essere effettuata **ogni 10 giorni**, dopo la ricostituzione di un **nuovo flaconcino di enzima 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.

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 tarata.
- 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 250 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.

I campioni di urine con >1.0 OD a 340 nm (base), possono causare risultati falso positivi.

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.

Tutti i risultati positivi devono essere confermati con metodi alternativi.

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 - 250 mg/L

CARATTERISTICHE DI PRESTAZIONE

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

Precisione intra-dosaggio: Urine 0.8 - 4.6 %; siero 1.0 - 3.8 %. La precisione **intra-dosaggio** è stata determinata tramite misurazione ripetuta di un singolo campione di urine e di siero, ciascuno addizionato con 3 concentrazioni differenti di GHB (10, 50, 100 mg/L) in una singola seduta. Il valore medio è 2.1 % nelle urine e 2.0 % nel siero (Table 12).

Precisione inter-dosaggio: Urine 2.4 - 7.4 %; siero 2.7 - 8.3 % La precisione **inter-dosaggio** è stata determinata in conformità al protocollo EP5-A2 NCCLS (Comitato nazionale per gli standard nei laboratori clinici) tramite misurazione ripetuta di due controlli e di un singolo campione di urine e di siero, ciascuno addizionato con 3 concentrazioni differenti di GHB (10, 50, 100 mg/L) in due sedute al giorno nell'arco di 20 giorni lavorativi. Il valore medio è 4.0 % nelle urine e 4.7 % nel siero (Table 13).

Linearità di diluizione: Urine: 98 - 102 %; siero: 100 - 110 %. Due campioni di urine e di siero con alte concentrazioni di GHB sono stati diluiti con soluzione di NaCl allo 0,9 %. Il valore medio è 100 % nelle urine e 105 % nel siero (Table 14). La linearità della diluizione (osservata vs. attesa) è stata calcolata in un ambito di concentrazione compreso approssimativamente tra 100 e 6 mg/L. La linearità del test è risultata tra 5 e 250 mg/L.

Recupero: Urine: 102 - 115 %; siero: 103 - 112 %. Cinque 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 105 % nelle urine e 109 % nel siero (Table 15).

Sensibilità analitica: 1.5 mg/L. La sensibilità analitica dipende dalla precisione dell'analizzatore di chimica clinica utilizzato. Tramite misurazioni ripetute con NaCl 0,9% (n=60), l'imprecisione dell'analizzatore è stata determinata

calcolando il valore medio +3 DS e convertendo in GHB mg/L (Table 16).

Sensibilità funzionale: Urine: 2.8 mg/L; siero: 4.5 mg/L. La sensibilità funzionale nel siero e nelle urine è stata determinata tramite misurazione ripetuta (3 replicati) di 5 campioni di urine e di siero a concentrazioni comprese tra 0 e 250 mg/L. La sensibilità al CV 15 % è risultata pari a 2.8 rispettivamente 4.5 mg/L (Figure 2).

Specificità: Per determinare la specificità dell'enzima sono state analizzate le sostanze riportate nella Table 17 tra 10 e 10.000 mg/L.

INTERFERENZE

Droghe e Farmaci: Sono stati valutati i farmaci e le droghe riportate nelle Tabelle Table 18 e Table 19, 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 3. Fino al 3‰ la misura della concentrazione di GHB è al di sotto di 10mg/L. 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

I range sono stati determinati per le urine e per il siero in adulti che non avevano assunto GHB:

Urine: 97,5° percentile: 10,6 mg/L

Mediana: 3,3 mg/L;
n = 75

Siero: 97,5° percentile 4,0 mg/L

Mediana: 0,68 mg/L;
n = 50

CONFRONTO DEI METODI

34 campioni di urine sono stati confrontati con un metodo CI-GHB pubblicato (6) (Figure 4):

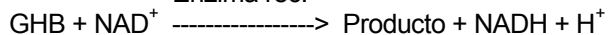
$$KK-GHB = y = 1.07x \text{ CI-GHB} - 15.66; R^2 = 0.997$$

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

Enzima rec.



El GHB se convierte en su metabolito (SSA, semialdehído succínico) por acción de la enzima recombinante específica del GHB (Enzima rec.) 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 el Cofactor y la Enzima, que deben conservarse a -20 °C al recibirse. No usar los reactivos después de la fecha de caducidad del equipo.	
Reactivos abiertos / reconstituidos	
Solución amortiguadora de incubación Cofactor	Conservar durante un período de hasta dos meses a 2 - 8 °C
Enzima	Conservar durante un período de hasta 15 días por vial (un mes en total) a 2 - 6 °C. Referirse a Notas del Procedimiento
Calibradores Controles	Conservar durante un período de hasta dos 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 H_2O 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 μl de muestra en los tubos de muestra específicos del equipo. Para ejecutar la prueba se necesitan menos de 10 μl 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. **No dejar el vial a temperatura ambiente más de 15 minutos.** Reconstituir la enzima a 2 a 6 °C, cuando tiene que ampliar el tiempo de reconstitución.
- **Importante: L'Enzima debe conservarse a una temperatura de 2-6 °C. Cuando la temperatura del analizador de química clínica no puede ser arreglada entre 2 y 6 °C, los reactivos deben cerrarse y conservarse de 2-6 °C en el refrigerador.** L'enzima podría perder actividad cuando la temperatura dentro del analizador esta arriba de 6 °C. Entonces, la absorbancia obtenida usando una modalidad de punto final podría disminuir. Controles incluidos en el kit pueden usarse para vigilar l'eficiencia del kit. Cuando los valores esperados de los controles no estan dentro de los límites establecidos en la QC data sheet, la recalibración de la curva estándar deberá realizarse.

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.

Importante: Recomendemos realizar una calibración del ensayo **cada 10 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.

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 250 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 (fondo), 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.

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 250 mg/l

CARACTERÍSTICAS DE EFICIENCIA

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

Precisión intra-ensayo: Orina 0.8 - 4.6 %; suero 1.0 - 3.8 %. Se ha determinado la precisión intra-ensayo mediante determinaciones repetidas de una muestra de orina y una de suero, y a cada una de ellas se les ha añadido tres concentraciones diferentes de GHB (10, 50, 100 mg/L) en una sola ejecución. El medio del valor es de 2.1 % para orina y 2.0 % para suero (Table 12).

Precisión del ensayo entre días: Orina 2.4 – 7.4 %; suero 2.7 – 8.3 %. Se ha determinado la precisión del ensayo entre días según el documento EP5-A2 de NCCLS mediante la determinación repetida de dos controles y una muestra de suero y de orina, y a cada una de ellas se les han añadido tres concentraciones diferentes de GHB (10, 50, 100 mg/L) en dos ejecuciones al día, durante un período de 20 días laborables. El medio del valor es de 4.0 % para orina y 4.7 % para suero (Table 13).

Linealidad de la dilución: Orina: 98-102 %; suero: 100-110 %. Se han diluido dos muestras de suero y de orina con una concentración elevada de GHB con solución de NaCl al 0,9%. El medio del valor es de 100 % para orina y 105 % para suero (Table 14). Se ha calculado la linealidad de la dilución (observada frente a esperada) en unos límites de concentración entre aproximadamente 100 y 6 mg/l. linealidad de l test est entre 5 – 250 mg/L.

Recuperación de cantidades añadidas: Orina: 102-115 %; suero 103-112 %. A cinco 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 105% para orina y 109% para suero (Table 15).

Sensibilidad analítica: 1.5 mg/l. La sensibilidad analítica depende de la precisión del analizador de química clínica usado. Mediante determinaciones repetidas con NaCl al 0,9% (reactivo blanco), se determinó la imprecisión del analizador mediante el cálculo de la media +3 valor de d.e., y se convirtió en GHB mg/l (Table 16).

Sensibilidad funcional: Orina: 2.8 mg/l; suero: 4.5 mg/l. Se determinó la sensibilidad funcional de la orina y del suero mediante determinaciones repetidas (3 replicatas) de muestras de orinas y suero (n = 5) a concentraciones entre 0 y 250 mg/l. Se determinó que la sensibilidad a un CV del 15 % fue de 2.8 mg/l (orina) y 4.5mg/l (suero) (Figure 2).

Especificidad: Para determinar la especificidad de la enzima se han analizado las sustancias enumeradas en la table Table 17 a concentraciones entre 10 y 10.000 mg/l.

INTERFERENCIAS

Drogas y fármacos: Las drogas y fármacos reportados en Table 18 e Table 19 estaban examinado en acuerdo con las directrices aprobadas para las interferencias affectando 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 3. Asta a 3‰ la concentración de GHB esta debajo de 10mg/L. 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° percentil: 10,6 mg/l

Mediana: 3,3 mg/l

n = 75

Suero: 97,5° percentil: 4,0 mg/l

Mediana: 0,68 mg/l

N = 50

COMPARACIÓN DE LOS MÉTODOS

Se han comparado 34 muestras de orina con un método de CI-GHB publicado (6) (Figure 4):

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

TABLES/ TABELLEN/ TABLES/ TABELLE/ TABLAS

Figure 1: Example of Standard Curve

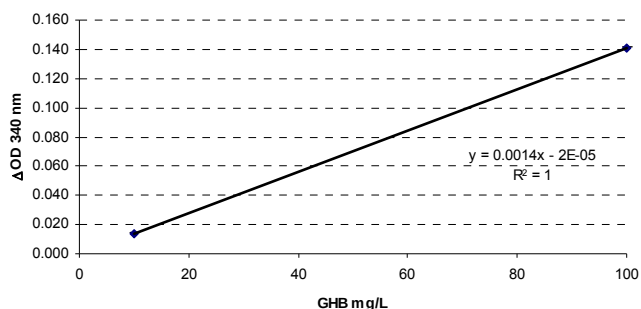


Table 11: Example of Results

Calibrators (n=13)	Mean (ΔOD)	SD (ΔOD)	CV [%]
10	0.014	0.0008	5.7
100	0.141	0.0008	0.6

Controls (n=1 replicate)	Values (ΔOD)	Replicates [mg/L]	Mean [mg/L]	CV [%]
low	0.021	15.2	14.9	2.0
	0.022	14.6		2.0
high	0.103	73.2	73.4	0.3
	0.106	75.5		2.9

Table 12: Intra-Assay Precision

Sample spiked with GHB	Mean [mg/L]	SD [mg/L]	CV [%]
Urine + 10 mg/L	16.4	0.75	4.6
Urine + 50 mg/L	57.9	0.49	0.8
Urine + 100 mg/L	107.8	0.85	0.8
Mean			2.1
Serum + 10 mg/L	10.8	0.42	3.8
Serum + 50 mg/L	54.1	0.69	1.3
Serum +100 mg/L	104.4	1.05	1.0
Mean			2.0

Table 13: Between-Day Precision

Sample spiked with GHB	Mean [mg/L]	SD [mg/L]	CV [%]
Urine + 10 mg/L	12.2	0.9	7.4
Urine + 50 mg/L	52.6	1.21	2.3
Urine + 100 mg/L	100.4	2.36	2.4
Mean			4.0
Serum + 10 mg/L	11.9	0.99	8.3
Serum + 50 mg/L	55.0	1.71	3.1
Serum +100 mg/L	106.9	2.89	2.7
Mean			4.7
Control Low	14.6	0.77	5.3
Control High	75.1	1.43	1.9

Table 14: Dilution Linearity

Example 1 of 2	Dilution	Observed [mg/L]	Expected [mg/L]	O/E [%]
Serum1	1:1	279.9	299.0	94
	1:3	103.3	99.7	104
	1:6	53.3	49.8	107
	1:12	26.5	24.9	106
	1:24	13.0	12.5	104
	1:48	6.0	6.2	96
	1:96	2.9	3.1	92
Serum 1 mean				100
Serum 2 mean				110
Mean serum				105
Urine 1	1:6	580.5	580.5	100
	1:12	297.3	290.3	102
	1:24	149.9	145.1	103
	1:48	76	72.6	105
	1:96	38	36.3	105
	1:192	18	18.1	99
Mean urine 1				102
Mean urine 2				98
Mean urine				100

Table 15: Spiking Recovery

Example 1 of 5	Native [mg/L]	spiked with [mg/L]	Observed [mg/L]	Expected [mg/L]	O/E [%]
Serum1	1.6	10	11.9	11.6	100
		25	28.1	29.6	105
		50	54	51.6	106
		100	102	101.6	102
Mean serum 1					103
Mean serum 2					110
Mean serum 3					110
Mean serum 4					109
Mean serum 5					112
Mean serum					109
Urine1	6.1	10	16.4	16.1	102
		25	32.2	31.1	104
		50	59.5	56.1	106
		100	104.7	106.1	99
Mean urine 1					102
Mean urine 2					102
Mean urine 3					115
Mean urine 4					106
Mean urine 5					102
Mean urine					105

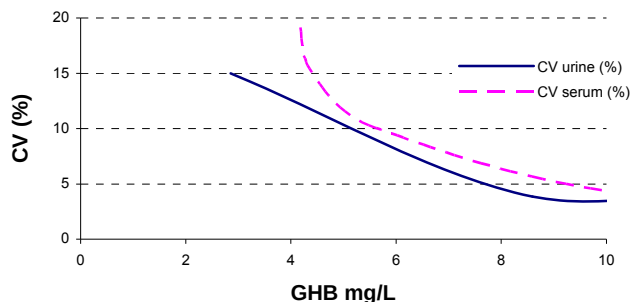
Table 16: Analytical Sensitivity (AS)

Mean (ΔOD)	SD (ΔOD)	Mean+3SD (ΔOD)	AS [mg/L]
0.00034	0.00056	0.00202	1.5

(n=60)

Figure 2: **Functional Sensitivity**

Precision profile for urine and serum

Table 17: **Enzyme Specificity**

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 %

InterferencesTable 18 **Interference of therapeutic drugs**

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

Table 19 **Interference of Drugs of abuse**

Reagent	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

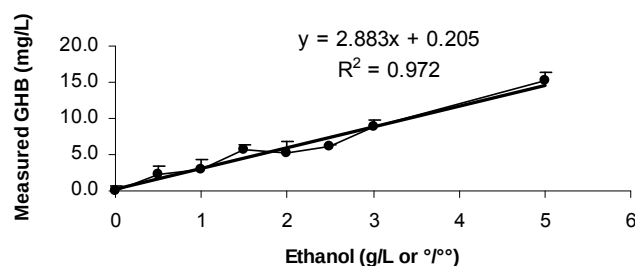
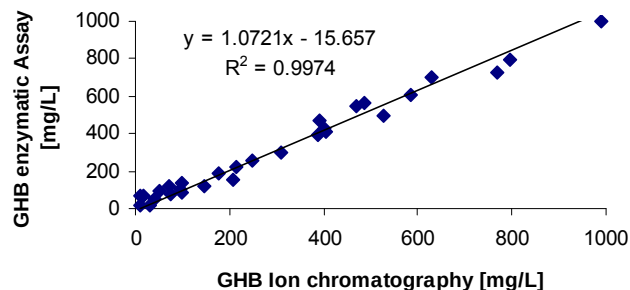
Figure 3 **Interference of Ethanol**Figure 4 **Correlation between KK-GHB and IC-GHB**

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

Tabellenbeschreibung: siehe “Resultate” (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 11), “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, Mar. 2004, Vol. **49**, No.2. Paper ID JFS2003165
2. Mari F et al.: *What constitutes a normal ante-mortem urine GHB concentration*. J of Forensic and Legal Medicine **16** (2009) 148-151
3. Andresen H et al.: *Liquid Ecstasy - A Significant Drug Problem*. Deutsches Ärzteblatt Int. 2008; **105**(36): 599-603
4. Haller Ch. Et al.: *GHB urine concentrations After Single-dose Administration in Humans*. J Anal Toxicol. 2006; **30** (6): 360-364
5. Elliott S.: *The many faces of gamma-hydroxybutyrate (GHB)* Drug Monitor Vol. 4 Issue 2, 2003
6. M.Jordi et al.: *GHB Determination with Ion Chromatography* Therap. Drug Monit. 25 (2003) 486
7. Clinical Laboratory Standards Institute: *Interference Testing in Clinical Chemistry*; approved guideline (EP7-A2), 2005
8. H. Andresen, et al.: *Gamma-Hydroxybutyrate in Urine and Serum: Additional Data Supporting Current Cut-Off Recommendations*, Forensic Sci. Int. (2010), doi:10.1016/j.forsciint.2010.03.035

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>	CAL A	Calibrator A Kalibrator A Calibrateur 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	CAL B	Calibrator B Kalibrator B Calibrateur 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		



Printing Date
2010-06-17