

VITAMIN B1 (THIAMINDIPHOSPHATE) IN WHOLE BLOOD-HPLC VITAMINA B1 EM SANGUE TOTAL – HPLC

Reagente diagnóstico para determinação quantitativa *in vitro* de Vitamina B₁ em Sangue Total por HPLC.

Nº de lote, data de fabricação e validade: vide rótulos dos frascos e da embalagem.

Artigo	Apresentação
35000	Kit Reagente para Análise de Vitamina B ₁ em Sangue Total por HPLC, 100 análises

Para informações detalhadas sobre o método e procedimento, favor consultar o Manual de Instruções para Análise de Vitamina B₁ em Sangue Total por HPLC no site www.biosys.com.br.

FINALIDADE PRETENDIDA

Este kit de reagentes permite uma determinação rápida, simples e específica da forma fisiologicamente ativa da vitamina B₁ (tiamina pirofosfato, TPP) em amostras de sangue total.

O kit é desenvolvido para testes de pacientes cujos níveis de vitamina B₁ requerem monitoramento:

- em pacientes com suspeita de deficiência de Vitamina B₁,
- em pacientes com suspeita de excesso de Vitamina B₁, e/ou
- em pacientes sob terapia de suplementação de Vitamina B₁.

MÉTODO

Cromatografia líquida de alta eficiência (HPLC) com detecção por fluorescência.

PRINCÍPIO

O preparo da amostra se restringe a etapas de extração e de precipitação, seguida da derivatização da vitamina B₁ no frasco de reação. A amostra derivatizada é analisada utilizando detector de fluorescência com comprimento de onda variável.

REAGENTES

Componentes e Composições:

Produto	Composição	Apresentação
Fase Móvel (Mobile Phase)	Metanol	1 x 1000 mL
Tampão de Extração (Extraction Buffer)	Metanol	1 x 10 mL
Reagente de Precipitação (Precipitation Reagent)	Ácido perclórico	1 x 30 mL
Reagente de Derivatização 1 (Derivatization Reagent 1)	Hexacianoferrato tripotássico	5 x 0,3 mL
Reagente de Derivatização 2 (Derivatization Reagent 2)	Metanol Hidróxido de sódio	1 x 20 mL
Tampão de Estabilização (Stabilization Buffer)	Metabisulfito de sódio	1 x 10 mL
Tampão de Neutralização (Neutralization Buffer)	Ácido fosfórico	1 x 10 mL
Frascos de Reação (Reaction vials)	Frascos vazios	2 x 100 unidades

INSTRUÇÕES DE ARMAZENAGEM E ESTABILIDADE DOS REAGENTES

Os reagentes não abertos são estáveis até a data de validade indicada no rótulo, desde que as condições de armazenamento estabelecidas sejam obedecidas. A tabela abaixo apresenta a temperatura de armazenagem dos reagentes do kit.

Artigo	Produto	Armazenamento
35021	Fase Móvel	+18° a +30°C
37003	Tampão de Extração	+18° a +30°C
37004	Reagente de Precipitação	+18° a +30°C
35005	Reagente de Derivatização 1 (liofilizado)	+18° a +30°C
35006	Reagente de Derivatização 2	+18° a +30°C
35007	Tampão de Estabilização	+2° a +8°C
35009	Tampão de Neutralização	+18° a +30°C

CUIDADOS E PRECAUÇÕES

Por favor, consulte a ficha de segurança dos reagentes e tome as precauções necessárias para o manuseio de reagentes de laboratório.

GARANTIA

Estas instruções de uso devem ser lidas atentamente antes da utilização do produto e as instruções nela contidas devem ser rigorosamente cumpridas. A confiabilidade dos resultados do ensaio não poderá ser garantida em caso de desvio às instruções.

DESCARTE

A Fase Móvel e o Reagente de Derivatização 2 contém solventes orgânicos. Descarte os resíduos dos produtos em um contêiner para solventes orgânicos livres de halogênio. O Reagente de Precipitação e o Tampão de Neutralização contém ácidos fortes. Neutralize as soluções e descarte em um contêiner para soluções salinas. O Tampão de Estabilização contém um sal perigoso. Descarte os resíduos do produto em um contêiner para soluções salinas. Resíduos de amostras de pacientes, amostras preparadas, controles e calibrador assim como os consumíveis de laboratório contaminados com material humano devem ser coletados e descartados como resíduos potencialmente infectantes. As soluções mencionadas não devem ser descartadas juntamente com lixo doméstico. Não circule no abastecimento principal de água. Descarte de acordo com as exigências locais e nacionais.

PREPARAÇÃO DOS REAGENTES

Fase Móvel: pronto para uso.

Tampão de Extração: pronto para uso.

Reagente de Precipitação: pronto para uso.

Tampão de Neutralização: pronto para uso.

Tampão de Estabilização: pronto para uso.

Reagente de Derivatização 1: reconstitua o conteúdo do frasco do Reagente de Derivatização 1 (art. 35005) com exatamente 0.3 ml de água destilada ultra-pura. Sob refrigeração (+2 a +8°C), a estabilidade desta solução é de aprox. 2 semanas.

Reagente de Derivatização 2: pronto para uso.

Mix de Derivatização:

Misture 100 µl do Reagente de Derivatização 1 com 2.0 ml do Reagente de Derivatização 2 (art. 35006). Esta mistura (mix de derivatização) na proporção 1:21 está pronta para o uso para o preparo das amostras.

Para cada amostra, 200 µl da mistura de derivatização são usados no preparo.

Nota: O mix de derivatização deve ser preparado imediatamente antes do preparo das amostras. A temperatura ambiente, a estabilidade é de pelo menos 12 horas.

MATERIAIS REQUERIDOS, MAS NÃO FORNECIDOS

- Sistema HPLC (cromatografia líquida de alta pressão) isocrático - Autosampler - Detector de fluorescência
- Coluna HPLC, pré-filtro 5 µm, pré-coluna 4/10
- Controles para Vitamina B1 (ex: Vitaminas B1/B2 Whole Blood Controls - Bi-Level (I+II) da Chromsystems)
- Padrão de Calibração de Vitamina B1 (ex: Vitamins B1/B2 Whole Blood Calibration Standard da Chromsystems)
- Centrifuga adequada; Vórtex; Compartimento para coluna com termostato

AMOSTRA

Para a análise de tiamina pirofosfato (TPP) use sangue total. Ambos EDTA (K3-EDTA e K2-EDTA) e heparina (lítica, sódica e heparina de amônio) são adequados como anticoagulantes. Sangue total em EDTA é recomendado porque sangue total em heparina é muito mais suscetível à falsificação enzimática de resultados (concentrações elevadas ou diminuídas são possíveis) e é mais propenso à coagulação, o que pode reduzir a precisão da pipetagem.

Estabilidade da amostra:

Temperatura de armazenamento	Sangue total - EDTA	Sangue total - heparina
+20 a +25°	24 horas	24 horas
+2 a +8° C	7 dias	7 dias
Abaixo -18° C	3 meses	3 meses
Ciclos de congelamento/descongelamento	1 ciclo	1 ciclo

Não há restrições no uso de amostras hemolisadas, lipêmicas e ictericas.

Atenção: É responsabilidade individual dos laboratórios usar todas as referências disponíveis ou seus próprios estudos para determinar critérios específicos de estabilidade para o seu laboratório.

Estabilidade das amostras preparadas (eluatoss):

Temperatura de armazenamento	Vida útil de armazenamento	Outras condições
+20 a +25°C	3 dias	Proteção contra luz, bem fechado
+2 a +8°C	3 dias	Proteção contra luz, bem fechado

PROCEDIMENTOS DO TESTE

Ajustes do instrumento:

Amostrador:	O compartimento deve ser protegido da luz.
Volume de injeção	50 µl
Tempo de corrida:	6 min
Razão de fluxo:	1.0 ml/min
Temperatura da coluna:	+20°C a +25°C
Detector fluorescência:	EX=367 nm, EM 435 nm
Solução de limpeza da agulha (injetor):	Água ultrapura (grau HPLC) com 5-10% de metanol

Procedimento de Preparo das Amostras:

Em um frasco de reação âmbar, pipetar:

1. 200 µL de amostra (sangue total-EDTA, calibrador ou controle)
+ 100 µL de Tampão de Extração.
2. Agitar por 2 seg. (vortex).
3. Acrescentar 300 µL de Reagente de Precipitação.
4. Agitar por 30 seg. (vortex).
5. Centrifugar por 5 min. a 9.000 g

Nota: Importante! Para obter uma derivatização satisfatória, não altere a sequência dos passos seguintes.

6. Em um novo frasco de reação âmbar (protegido da luz), pipetar 200 µL do mix de derivatização (veja Preparo dos Reagentes).
7. Adicionar 100 µL do sobrenadante e agitar brevemente.
8. Acrescentar 100 µL do Tampão de Neutralização.
9. Acrescentar 100 µL do Tampão de Estabilização e agitar brevemente.
10. Deixar em repouso por 20 min.
11. Injetar 50 µL no sistema HPLC.

Tempo de retenção esperado:

Analito	Tempo de retenção
Vitamina B ₁ (tiamina pirofosfato)	Aprox. 3,2 min

FATORES DE CONVERSÃO

Analito	µg/L para nmol/L	nmol/L para µg/L
Tiamina pirofosfato (TPP)	X 2,357	X 0,4243

CÁLCULOS

$$C_{\text{Amostra}} = \frac{A_{\text{Amostra}}}{A_{\text{Calibrador}}} \times C_{\text{Calibrador}}$$

Área ou altura do pico do analito A no cromatograma da amostra = A_{amostra}

Área ou altura do pico do analito A no cromatograma do calibrador = A_{calibrador}

Concentração do analito A no calibrador = C_{calibrador}

Fatores de conversão:

Analito	µg/L para nmol/L	nmol/L para µg/L
Vitamina B ₁ (Tiamina pirofosfato, TPP)	x 2,357	x 0,424

CONTROLE DE QUALIDADE

A precisão e exatidão das análises podem ser monitoradas pela inclusão de controles adicionais em cada corrida analítica. Se a análise destes controles fornecer valores fora do intervalo indicado nas Instruções de Uso desses produtos, o sistema deve ser verificado e, se necessário, recalibrado.

A Chromsystems disponibiliza os seguintes produtos para calibrar e monitorar a precisão e exatidão das análises:

Artigo	Produto	Apresentação
37008	Vitamins B1/B2 Whole Blood Calibration Standard	5 x 1mL
0033	Vitamins B1/B2 Whole Blood Controls - Bi-Level (I+II)	2 x 5 x 2 mL

DESEMPENHO / CARACTERÍSTICAS

As características de desempenho foram determinadas e verificadas no instrumento: Detector de fluorescência da Shimadzu RF-20^a

Recuperação

A recuperação analítica foi demonstrada dentro do processo de avaliação de desempenho analítico baseado nas seguintes estratégias devido à ausência de um método de referência ou material de referência:

- Comparação com um método CE/IVD
- Participação em esquema de proficiência

Linearidade e menor limite de quantificação (LLOQ):

A linearidade foi determinada por múltiplos preparos da amostra de sangue. O limite de quantificação foi determinado pela diluição definida do controle nível I (0034) com solução de fosfato tamponada com cloreto de sódio. Este método é linear a partir do menor limite de quantificação (LLOQ) a concentração indicada.

Análito	LLOQ [µg/L]	Faixa linear [µg/L]
Tiamina pirofosfato	0,8	Até pelo menos 750

Precisão intra-ensaio:

A determinação da precisão intra-ensaio foi realizada a partir da média e coeficiente de variação de múltiplos preparos (n=10) de uma mesma amostra e a determinação da concentração de tiamina pirofosfato em 3 diferentes concentrações:

Análito	Coeficiente de variação (%) (concentração em µg/L)		
Tiamina pirofosfato	4,4 (26,0)	4,0 (38,7)	3,8 (95,4)

Precisão inter-ensaio:

A determinação da precisão inter-ensaio foi realizada a partir de 10 preparos e determinação da concentração do analito em pool de sangue total em 10 diferentes séries de testes.

Análito	Coeficiente de variação (%) (concentração em µg /L)		
Tiamina pirofosfato	4,9 (26,0)	4,4 (38,7)	4,7 (95,4)

INTERFERENTES

Interferências detectadas

Acetaminofen (paracetamol), um medicamento para tratar febre e dor leve a moderada, leva à falsa determinação baixa de tiamina pirofosfato (TPP).

Interferências não detectadas

As seguintes substâncias foram testadas e tiveram uma influência negligenciável nos resultados quantitativos (desvio ≤ 15%).

Metabólitos

Tiamina, tiamina monofosfato, tiamina trifosfato
Estes metabólitos podem ser convertidos cada um em TPP por reações enzimáticas. Eles não são interferentes analíticos, mas podem ser interferentes farmacocinéticos.

Medicamentos

Ácido acetilsalicílico, alopurinol, alprazolam, amlodipina, amoxicilina, anfetamina/dexanfetamina, apixabana, ácido ascórbico, atenolol, atorvastatina, azitromicina, bisoprolol, bupropiona, candesartana, carvedilol, cefuroxima, citalopram, clonazepam, clopidogrel, ciclobenzaprina, diclofenaco, donepezil, duloxetina, edoxabana, empagliflozina, enalaprilato, fenoterol, fluoxetina, fluticasona, formoterol, furosemida, gabapentina, galantamina, glimepirida, glipizida, hidroclorotiazida, hidrocodona, ibuprofeno, brometo de ipratrópio, lercanidipina, levotiroxina, lisinopril, lorazepam, losartan, meloxicam, memantina, metamizol/dipirona como 4-metilaminoantipirina, metformina, metocarbamol, metilfenidato, metoclopramida, metoprolol, montelucaste, nebivolol, nimodipina, noscapina, omeprazol/esomeprazol, pantoprazol, fenprocumon, pravastatina, prednisolona, prednisona, pregabalina, propranolol, ramipril, ranitidina, rivaroxabana, rivastigmina, rosuvastatina,

salbutamol/albuterol, sertralina, sinvastatina, sitagliptina, espirolactona, tansulosina, tilidina como nortilidina, torasemida, tramadol, trazodona, valsartan, venlafaxina, zolpidem.

Análise livre de interferências é possível com as seguintes condições da amostra:

Hemólise

Amostras recém coletadas de sangue total foram hemolisadas por congelamento e descongelamento. Concentrações do analito foram comparadas com aquelas da amostra original. Nenhuma interferência significativa ocorreu (desvio ≤ 15%).

Lipemia

Concentrações de sangue total foram enriquecidas com diferentes concentrações de uma emulsão lipêmica (0,67 a 10 g/L) e concentrações de analito foram comparadas com aquelas da amostra original. Nenhuma interferência significativa ocorreu (desvio ≤ 15%).

Icterícia

Amostras de sangue total foram enriquecidas com bilirrubina não conjugada e conjugada (cada 0,4 g/L) e as concentrações de analito foram comparadas com aquelas da amostra original. Nenhuma interferência significativa ocorreu (desvio ≤ 15%).

VALORES DE REFERÊNCIA

As seguintes faixas de referência foram retiradas da literatura [13]. Elas podem diferir de outros dados publicados. Como o nível varia dependendo da população dos pacientes e do método de dosagem, determine valores de referência específicos para o seu laboratório. Quando determinados intervalos, tenha certeza que cumpre com os requerimentos nacionais e locais.

Faixa de referência	33,1- 60,7 µg/l 78- 143 nmol/l
Número de resultados obtidos	247
Método estatístico da faixa de referência	Média ± 2x desvio padrão
Correlação entre os resultados obtidos e anos de idade	Nenhuma
Correlação entre os resultados obtidos e gênero	Nenhuma
Fonte	[13]

LITERATURA

- Gressner AM, Arndt T (ed): Lexikon der Medizinischen Laboratoriumsdiagnostik. Springer, Berlin, Heidelberg, 2019.
- Turck D, Bresson J-L, Burlingame B, Dean T, Fairweather-Tait S, Heinonen M, et al.: Dietary reference values for thiamin. *EFS2* 2016; 14.
- Berger MM, Shenkin A, Schweinlin A, Amrein K, Augsburg M, Biesalski H-K, et al.: ESPEN micronutrient guideline. *Clin Nutr* 2022; 41:1357-1424.
- Araujo Castro M, Vazquez Martinez C: The refeeding syndrome. Importance of phosphorus. *Medicina Clínica (English Edition)* 2018; 150:472-478.
- Da Silva JSV, Seres DS, Sabino K, Adams SC, Berdahl GJ, Citty SW, et al.: ASPEN Consensus Recommendations for Refeeding Syndrome. *Nutr Clin Pract* 2020; 35:178-195.
- Wirth R, Diekmann R, Janssen G, Fleiter O, Fricke L, Kreilkamp A, et al.: Refeeding-Syndrom : Pathophysiologie, Risikofaktoren, Prophylaxe und Therapie. *Internist (Berl)* 2018; 59:326-333.
- Kennedy DO: B Vitamins and the Brain: Mechanisms, Dose and Efficacy--A Review. *Nutrients* 2016; 8:68.
- Nix WA, Zirwes R, Bangert V, Kaiser RP, Schilling M, Hostalek U, et al.: Vitamin B status in patients with type 2 diabetes mellitus with and without incipient nephropathy. *Diabetes Res Clin Pract* 2015; 107:157-165.

9. Marce-Grau A, Marti-Sanchez L, Baide-Mairena H, Ortigoza-Escobar JD, Perez-Duenas B: Genetic defects of thiamine transport and metabolism: A review of clinical phenotypes, genetics, and functional studies. *J Inherit Metab Dis.* 2019; 581-597.
10. Zhou J, Effiong U: Isolated Pyridoxine Deficiency Presenting as Muscle Spasms in a Patient With Type 2 Diabetes: A Case Report and Literature Review. *Am J Med Sci* 2021; 361:791-794.
11. Martel JL, Kerndt CC, Doshi H, Franklin DS: Vitamin B1 (Thiamine). StatPearls Publishing, 2023.
12. Sriram K, Manzanares W, Joseph K: Thiamine in nutrition therapy. *Nutr Clin Pract* 2012; 27:41-50.
13. Steen G, Vlasveld LTh, Poot CC, Slot-Verhoeven AJ van, Castel A: Onderzoek naar referentiewaarden van laboratoriumonderzoek in een algemeen ziekenhuis: resultaten en bevindingen. *Ned Tijdschr Klin Chem Labgeneesk* 2009; 34:35-43.
14. Parker E, Maister T, Stefoska-Needham A, Wearne C, Anderson G, Gomes L, et al.: An audit of the changes in thiamine levels during higher caloric nutritional rehabilitation of adolescent patients hospitalised with a restrictive eating disorder. *J Eat Disord* 2020; 8:41.
15. Bahat H, Reisler G, Brandriss N, Bar-Chaim A, Goldman M: Thiamine Deficiency in Adolescents with Eating Disorders: A Prospective Cohort Study. *Nutrients* 2020; 12(5):1396.
16. Castro J, Deulofeu R, Gila A, Puig J, Toro J: Persistence of nutritional deficiencies after short-term weight recovery in adolescents with anorexia nervosa. *Int J Eat Disord* 2004; 35:169-178.
17. Bevier A, Novel-Catin E, Blond E, Pelletier S, Parant F, Koppe L, et al.: Water-Soluble Vitamins and Trace Elements Losses during On-Line Hemodiafiltration. *Nutrients* 2022; 14(17):3454.
18. Heinz J, Domrose U, Westphal S, Luley C, Neumann KH, Dierkes J: Washout of water-soluble vitamins and of homocysteine during haemodialysis: effect of high-flux and low-flux dialyser membranes. *Nephrology (Carlton)* 2008; 13:384-389.

Fabricante: Chromsystems Instruments & Chemicals GmbH

Regularizado por: BioSys Ltda

Rua Coronel Gomes Machado, 358, Centro, Niterói, RJ

CEP: 24020-112

CNPJ: 02.220.795/0001-79

Anvisa: 10350840142

SAC: sac@biosys.com.br – 0800 015 1414 / (21) 3907-2534

www.biosys.com.br

Símbolos utilizados:

	Fabricante
	Número de catálogo
	Quantidade suficiente para <n> ensaios
	Código do lote
	Validade
	Limite de temperatura
	Consultar as instruções para utilização
	Produto para a saúde para diagnóstico <i>in vitro</i>
	Cuidado
	Atenção
	Perigo
	Perigo
	Perigo
	Perigo
	Perigo
	Este produto cumpre as exigências da Regulation (EU) 2017/746 relativa aos dispositivos médicos para diagnóstico <i>in vitro</i>