

VITAMINSTATUS
VITAMIN PROFILING
DOSAGE DE VITAMINES
PROFILO DELLE VITAMINE
PERFIL DE VITAMINAS

Manual de Instrução para Análise em HPLC de
Vitamina B₁
em sangue total

somente para uso diagnóstico *in vitro*
35000



**VITAMINAS B1 EM SANGUE TOTAL – HPLC
VITAMIN B1 (THIAMINDIPHOSPHATE) IN WHOLE BLOOD-HPLC
ANVISA: 10350840142**

Chromsystems Instruments & Chemicals GmbH é certificada de acordo com o DIN EN ISO 9001 e DIN EN ISO 13485 e ISO 13485 CMDR. Os produtos são produzidos e colocados em circulação seguindo as diretrizes do IVD 98/79/EC.

© Este documento é protegido pelos direitos autorais. Todos os direitos reservados.

Importado e Distribuído por: BioSys Ltda.
Rua Coronel Gomes Machado, 358, Centro, Niterói, RJ
CEP: 24020-112
CNPJ: 02.220.795/0001-79
SAC: (21) 3907 2534 – sac@biosys.com.br
www.biosys.com.br

Fabricado por: Chromsystems Instruments & Chemicals GmbH
Am Haag 12
D-82166 Gräfelfing
Munique, Alemanha
Fone: +49 89 18930-0
Fax: +49 89 18930-199
www.chromsystems.de

Conteúdo

1	Informações para requisição	3
1.1	Kits	3
1.2	Componentes individuais	4
2	Introdução	5
2.1	Informações básicas	5
2.2	Princípio do ensaio	6
2.3	Finalidade pretendida	6
2.4	Limitações clínicas	7
3	Sistema HPLC	7
3.1	Equipamento adicional necessário	7
3.1.1	Equipamento essencial	7
3.1.2	Equipamento opcional/recomendado	7
3.2	Parâmetros do equipamento	8
3.3	Coluna HPLC	8
3.4	Ligar o sistema	8
3.5	Shutdown	9
4	Separação cromatográfica	9
5	Preparo da amostra	9
5.1	Coleta e armazenamento de amostras de pacientes	9
5.2	Reconstituição do calibrador	10
5.3	Reconstituição dos controles	10
5.4	Preparo do mix de derivatização	11
5.5	Procedimento de preparo de amostras	13
5.6	Tempo de armazenamento das amostras preparadas	13
6	Controle de qualidade	13
7	Aquisição de dados e avaliação	14
7.1	Calibração do sistema de análise de dados	14
7.2	Exemplos de cromatogramas	14
7.3	Fatores de conversão	15
7.4	Cálculo manual	15
8	Armazenamento e tempo de vida útil dos componentes do kit	16
9	Descarte de resíduos	16
10	Valores de referência	17
11	Testes de interferência	17
11.1	Interferências detectadas	19
11.2	Interferências não detectadas	19
12	Problemas e Soluções	21
13	Literatura	22
	Apêndice I: Informações de segurança	23
	Apêndice II: Dados de desempenho analítico	25
	Apêndice III: Dados de desempenho clínico	27
	Apêndice IV: Rastreabilidade dos calibradores	29
	Apêndice V: Símbolos	31
	Apêndice VI: Histórico de versão	32

1 Informações para requisição

1.1 Kits

Kit reagente para a análise de Vitamina B1 em sangue total

Artigo	Produto	
35000	Kit reagente para determinação de Vitamina B₁ em sangue total por HPLC. Para 100 análises.	
	Fase Móvel	1000 ml
	Tampão de Extração	10 ml
	Reagente de Precipitação	30 ml
	Reagente de Derivatização 1 (liofilizado)	5 x 0,3 ml
	Reagente de Derivatização 2	20 ml
	Tampão de Neutralização	10 ml
	Tampão de Estabilização	10 ml
	Tubos de reação, âmbar	100 peças
	Padrão de Calibração em Sangue Total	5 x 1,0 mL (liof.)
	<i>Os seguintes produtos e acessórios CE/IVD não estão incluídos no kit 35000, mas são necessários para a aplicação do método:</i>	
35110	Coluna HPLC (equilibrada, com cromatograma teste)	1 unidade
0034	Controle Nível I em Sangue Total de Vitaminas B1 e B2 em sangue total	5 x 2,0 mL (liof.)
0035	Controle Nível II em Sangue Total de Vitaminas B1 e B2 em sangue total	5 x 2,0 mL (liof.)
	Kit básico para preparo de amostra	
35000-BK	Kit Básico de HPLC	
	Conteúdo do kit para 100 preparos de amostra:	
	Tampão de Extração	10 mL
	Reagente de Precipitação	30 mL
	Reagente de Derivatização 1	5 x 0,3 mL (liof.)
	Reagente de Derivatização 2	20 mL
	Tampão de Estabilização	10 mL
	Tampão de Neutralização	10 mL
	Frascos de Reação 1,5 mL, cor âmbar (protegidos da luz)	2 x 100 unidades
	<i>Os seguintes produtos e acessórios CE/IVD não estão incluídos no kit 35000-BK, mas são necessários para a aplicação do método:</i>	
35110	Coluna HPLC (equilibrada, com cromatograma teste)	1 unidade
35021	Fase Móvel	1000 mL
37008	Padrão de Calibração em Sangue Total de Vitaminas B1 e B2 em Sangue Total	5 x 1,0 mL (liof.)

0034	Controle Nível I em Sangue Total de Vitaminas B1 e B2 em sangue total	5 x 2,0 mL (liof.)
0035	Controle Nível II em Sangue Total de Vitaminas B1 e B2 em sangue total	5 x 2,0 mL (liof.)

1.2 Componentes individuais

Produtos e acessórios CE/IVD

Para preparo de amostra:

37003	Tampão de Extração	10 mL
37004	Reagente de Precipitação	30 mL
35005	Reagente de Derivatização 1	5 x 0,3 mL (liof.)
35006	Reagente de Derivatização 2	20 mL
35009	Tampão de Neutralização	10 mL
35007	Tampão de Estabilização	10 mL

Para cromatografia:

35021	Fase Móvel	1000 mL
35007	Fase Móvel	10 x 1000 mL
35110	Coluna HPLC (equilibrada, com cromatograma teste)	1 unidade
15009	Pré-filtro em PEEK 5 µm	5 unidades
18010	Cartucho de Pré-Coluna 4/10	1 unidade

Para calibração e controle de qualidade:

37008	Padrão de Calibração em Sangue Total de Vitaminas B1 e B2 em sangue total	5 x 1,0 mL (liof.)
0033	Controle Bi-Nível (I+II) em Sangue Total de Vitaminas B1 e B2 em sangue total	2 x 5 x 2,0 mL (liof.)
0034	Controle Nível I em Sangue Total de Vitaminas B1 e B2 em sangue total	5 x 2,0 mL (liof.)
0035	Controle Nível II em Sangue Total de Vitaminas B1 e B2 em sangue total	5 x 2,0 mL (liof.)

Produtos sem CE/IVD

33005	Frascos de Reação 1,5 mL, cor âmbar (protegidos da luz)	100 unidades
15010	Carcaça do Pré-filtro em PEEK	1 unidade
18001	Suporte do Cartucho de Pré-coluna 4/10	1 unidade

2 Introdução

2.1 Informações básicas

As vitaminas B têm um papel essencial em algumas vias metabólicas básicas. Elas estão entre as vitaminas hidrossolúveis que são pouco armazenadas no organismo, por isso um fornecimento regular pela dieta ou por suplementação é essencial para evitar sintomas de deficiência.

Vitamina B1

A vitamina B₁ (tiamina) é uma vitamina hidrossolúvel que contém dois anéis heterocíclicos (um pirimidina e um tiazol) conectados por uma ponte metileno e um átomo de nitrogênio quaternário (Fig. 1). A tiamina é sensível a soluções alcalinas (que quebram o anel tiazol) e agentes oxidantes e redutores.

A tiamina está majoritariamente localizada nos eritrócitos [1], onde pode ser encontrada em sua forma ativa, tiamina pirofosfato (TPP).

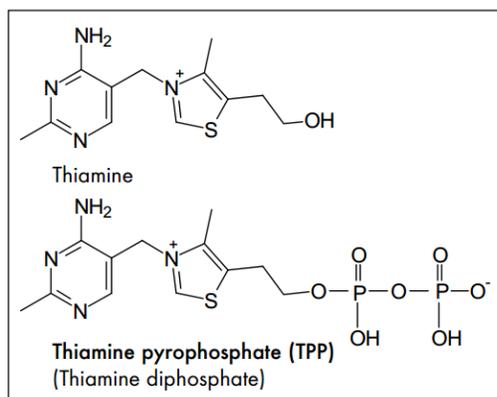


Figura 1 Vitamina B1

A vitamina B₁ é sintetizada por uma variedade de plantas e microorganismos e ocorre na forma livre, ligada a proteínas, como mono-, di- ou trifosfato éster. Como os animais usualmente não podem sintetizá-la, os seres humanos devem suprir as necessidades vitamina B₁ por fontes exógenas na dieta. A tiamina é absorvida no intestino delgado tanto por difusão passiva quanto por transporte ativo. Posterior fosforilação origina a coenzima mais importante fisiologicamente, a tiamina pirofosfato (TPP). A tiamina é excretada pelos rins após sua desfosforilação até a forma livre ou como éster de sulfato conjugado.

Como TPP, a tiamina é coenzima para a descarboxilação oxidativa de ácidos 2-oxo e está assim envolvida no metabolismo energético e nas principais vias biossintéticas do organismo. Como coenzima para aldeído e cetotransferases está envolvida na via das pentoses-fosfato. No sistema nervoso, tem papel na biossíntese de lipídeos e acetilcolina.

No mundo todo, a deficiência de tiamina ocorre predominantemente em populações cujas dietas estão compostas basicamente por arroz polido, cereais moídos e farinha de trigo branca. A doença clássica da deficiência de vitamina B₁ é o beribéri, que tem como sintomas primários, distúrbios cardiovasculares e neurológicos como lesão miocárdica, insuficiência cardíaca, neurite e paralisia neural acompanhada de alterações metabólicas na forma de cetoacidúria de cadeia ramificada. “Beribéri seco” descreve sintomas neurológicos como confusão, distúrbios na visão e ataxia (a encefalopatia de Wernicke) ou distúrbios de memória (síndrome de Korsakov). No “beribéri úmido”, os sintomas incluem acidose láctica e insuficiência cardíaca congestiva. Ambas as formas de beribéri são mais comuns de serem vistas em indivíduos com alcoolismo, dieta desbalanceada ou síndrome de má absorção [2-4].

Outro grupo de alto risco para deficiência de tiamina são pessoas que começaram uma nutrição normal após um longo período de fome ou desnutrição. Eles correm o risco de desenvolver síndrome de realimentação, um grave desequilíbrio metabólico caracterizado por distúrbios na homeostase de eletrólitos e fluidos após o início do suporte

nutricional. A alta demanda de TPP durante a administração de carboidrato na fase de realimentação não consegue ser coberta devido aos depósitos (existentes) esgotados ou insuficientes resultando no aumento de lactato e produção de energia celular reduzida [5,6].

Casos moderados de deficiência de vitamina B1 se manifestam como fadiga física e mental, irritabilidade, confusão, distúrbios do sono e sintomas gastrointestinais [7].

Deficiência de Vitamina B1

Nossa dieta moderna difere da dieta evolucionária, que basicamente era principalmente baseada em plantas consistindo em vegetais, frutas e sementes, com algumas pequenas quantidades de peixe e carne. Nutrição rica em energia, facilmente digerível e pobre em micronutrientes leva à deficiência de vitamina mesmo em sociedades desenvolvidas e está associada com obesidade, doenças cardiovasculares e demência [7]. Avaliação do estado vitamínico deve ser também considerado em dietas não balanceadas.

Além disso, certas doenças estão associadas com deficiência de vitamina. Pacientes com diabete melito tipo 2 são com frequência deficientes em vitaminas B1 [8].

Pessoas com alcoolismo, pacientes de diálise renal, idosos, grávidas, assim como pacientes em pós-cirúrgico têm alto risco de deficiência de vitamina B1 e B6. Distúrbios na absorção, ex: em doenças inflamatórias intestinais, defeitos genéticos causando comprometimento na absorção de tiamina pelas células (ex: síndrome de Roger) ou procedimentos cirúrgicos como cirurgia bariátrica também levam à redução de oferta de nutrientes importantes [3,9].

Alguns medicamentos ex: agentes quimioterapêuticos, diuréticos, isoniazida, e metformina interferem com o metabolismo da vitamina B e podem contribuir para deficiência [3, 10].

Excesso de vitamina B1

Quantidades em excesso de vitaminas hidrossolúveis de vitamina B são excretadas na urina. Nenhuma toxicidade de alta vitamina B1 tem sido relatada, além de reações anafiláticas para administração intravenosa. Contudo, sintomas e sinais de overdose de vitamina B1 podem incluir náusea, letargia, ataxia e diminuição do tônus muscular [11,12].

2.2 Princípio do ensaio

A cromatografia líquida de alta pressão e um sistema otimizado apropriado oferecem a possibilidade da determinação direta de tiamina pirofosfato (TPP), a forma ativa da vitamina B1, em sangue total. O método presente rápido, simples e específico requer um sistema HPLC isocrático com detector de fluorescência. A derivatização pós-coluna habitual usando equipamentos extensos é substituída por uma derivatização simples pré-coluna. O preparo de amostra é restrito a um passo simples de precipitação após a adição do tampão de extração e derivatização subsequente num frasco de reação. Uma coluna de HPLC selecionada e uma fase móvel otimizada para a separação específica, permite a quantificação certa e confiável.

2.3 Finalidade pretendida

O kit de reagentes da Chromsystems 35000 para análise de “Vitamina B₁ em sangue total” é uma ferramenta de diagnóstico in vitro para ser usado em laboratórios clínicos para a detecção da forma fisiologicamente ativa da vitamina B₁ (tiamina pirofosfato, TPP) em amostras de sangue total.

O preparo da amostra é manual, e a separação analítica é feita através de cromatografia líquida de alta eficiência (HPLC).

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.

2.4 Limitações clínicas

Não há valores de referência aplicáveis para tiamina pirofosfato. Resultados obtidos usando diferentes métodos de teste não podem ser comparados. Laboratórios devem indicar o método usado para análise para permitir a correta interpretação dos resultados.

Usuários devem especificar seus próprios valores de referência baseados em assessoria clínica. Fatores de conversão entre os diferentes métodos de análise não devem ser usados para prever resultados para um paciente específico.

3 Sistema HPLC

Atenção: Ao utilizar os reagentes, favor verificar as informações de segurança contidas no Apêndice I.

3.1 Equipamento adicional necessário

Além dos componentes incluídos no kit de reagentes da Chromsystems (artigo no. 35000), a análise em HPLC da vitamina B1 em sangue total requer os seguintes materiais:

3.1.1 Equipamento essencial

Produtos diretamente associados com o kit, disponíveis na Chromsystems:

Necessários para a aplicação do método:

35110	Coluna HPLC (equilibrada, com cromatograma teste)
0033	Controle Bi-Nível (I +II) em Sangue Total
0034	Controle Nível I em Sangue Total
0035	Controle Nível II em Sangue Total

Dispositivos de laboratório para análise em HPLC, somente parcialmente disponíveis na Chromsystems

- Sistema HPLC isocrático
- Amostrador automático
- Detector de fluorescência

Dispositivos de laboratório para preparo de amostra, não disponíveis na Chromsystems:

- Vórtex
- Centrífuga adequada

3.1.2 Equipamento opcional/recomendado

Acessórios, disponíveis na Chromsystems:

15009	Pré-filtro em PEEK 5 µm
18010	Cartucho de pré-coluna 4/10

Equipamento geral de laboratório (produtos sem CE/IVD), disponíveis na Chromsystems:

15010	Carçaça para Pré-filtro em PEEK
18001	Suporte para cartucho de pré-coluna 4/10

A carcaça para pré-filtro (artigo no. 15010) destina-se para ser usado com o Pré-filtro em PEEK 5 µm (artigo no. 15009), o Suporte para cartucho de pré-coluna (artigo no. 18001) para combinação com o Cartucho de pré-coluna 4/10 (artigo no. 18010).

Dispositivos de laboratório:

-Compartimento para coluna com termostato

3.2 Parâmetros do equipamento

As substâncias são separadas cromatograficamente usando uma coluna analítica (artigo no. 35110). Mantenha a Fase Móvel fechada ou coberta durante o uso. O uso de um compartimento de coluna com termostato evitará variações de temperatura e garantirá estabilidade e reprodutibilidade da separação cromatográfica.

Ajustes do instrumento:

Amostrador:	O módulo deve ser protegido da luz, vials de vidro com cor âmbar
Volume de injeção:	50 µL
Tempo de corrida:	6 min
Razão de fluxo:	1,0 mL/min
Temperatura da coluna:	Temperatura ambiente (+20°C a +25°C)
Detector fluorescência:	EX = 367 nm, EM 435 nm
Solução de limpeza da agulha (injetor):	Água destilada (grau HPLC) com no 5-10% de metanol

3.3 Coluna HPLC

A coluna HPLC para análise de tiamina pirofosfato (TPP) é fornecida equilibrada e testada, e está pronta para o uso. A contrapressão de uma coluna nova na razão de fluxo de 1,0mL/min é de cerca de 80 bar (1160 psi), valor que pode elevar com a idade ou uso da coluna. Enquanto as separações estiverem satisfatórias, a contrapressão elevada não tem importância.

Nota:

Nós recomendamos o uso de um pré-filtro (Pré-filtro em PEEK 5 µm, artigo no. 15009) para aumentar a vida útil da coluna. Uma pré-coluna (Cartucho de Pré-coluna 4/10, artigo no. 18010) pode ser usado para proteção adicional da coluna.

A coluna só deve ser lavada com as soluções especificadas neste manual de instrução. Outros solventes podem danificar irreversivelmente a coluna.

3.4 Ligar o sistema

Antes de iniciar uma sequência, prepare o sistema HPLC da seguinte forma:

1. Lavar o sistema com aproximadamente 30 mL de fase móvel
2. Instalar a coluna e equilibrar o sistema com razão de fluxo de 1,0 mL/min por aproximadamente 15 -20 min com Fase Móvel, até que a linha de base esteja estabilizada;
3. Injetar repetidamente o calibrador preparado, até que dois cromatogramas sucessivos apresentem picos com tempo de retenção e área/altura praticamente idênticos;
4. Compare o cromatograma com o do capítulo 7.2
5. Inicie a sequência

Após isso, a fase móvel pode ser recirculada por aproximadamente 100 injeções.

Para o uso apropriado do sistema HPLC, leia o manual de instrução do seu sistema HPLC. Se você tiver perguntas, contate o fabricante do sistema. Treinamento do fabricante pode ser necessário.

3.5 Shutdown

Para períodos de *shut down* de até 3 dias, a fase móvel deve ser recirculada numa razão de fluxo baixa (aproximadamente 0,2 mL/min) para prevenir a cristalização de sais nos selos da bomba. A coluna HPLC permanece conectada, mas, para aumentar o tempo de vida da lâmpada, o detector deve ser desligado.

Para longos períodos de desuso, a coluna HPLC deve ser desconectada. **Limpeza ou conservação não é necessária.** Armazenar a coluna na fase móvel a temperatura ambiente de +18 a +30 °C. A coluna deve ser substituída por uma união e o sistema HPLC limpo com cerca de 50 mL de H₂O/metanol (80/20 vol/vol).

4 Separação cromatográfica

A seguinte tabela mostra o tempo de retenção da tiamina pirofosfato (TPP):

Tabela 1 Tempos de retenção

Substância	Tempo de retenção (aprox.)
Tiamina pirofosfato (TPP)	3,2 min

Pequena variação nos tempos de retenção pode ocorrer, por exemplo, devido a flutuações na temperatura, se você usar um novo lote de Fase Móvel, ou se você substituir a coluna de HPLC. Por isso, use um cromatograma de calibração para determinar os valores corretos.

5 Preparo da amostra

Atenção: Ao utilizar os reagentes, favor verificar as informações de segurança contidas no Apêndice I.

5.1 Coleta e armazenamento de amostras de pacientes

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/transporte é o fator principal que afeta a estabilidade de amostra. Outros fatores identificados em testes preliminares incluem o tipo de anticoagulante (EDTA ou heparina) e diferenças entre os doadores ou amostras de sangue, provavelmente devido aos diferentes estados enzimáticos. Diferenças de estabilidade entre os tipos de EDTA (K2-EDTA, K3-EDTA) ou tipos de heparina (heparina lítica, heparina sódica, heparina de amônio) não têm sido identificados.

Estabilidade de TPP foi determinada em sangue K3-EDTA (representando ambos os tipos de sangue EDTA) e em sangue em heparina lítica (representando os três tipos de sangue com heparina) de cinco doadores diferentes.

Desvios na concentração de analitos de $\leq 15\%$ do referencial foi aceito.

Tabela 2 Estabilidade do analito em amostras de paciente

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

Não há restrições no uso de amostras hemolisadas, lipêmicas e ictéricas (ver capítulo 11).

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.

5.2 Reconstituição do calibrador

O Padrão de Calibração da Chromsystems em Sangue Total (artigo no. 37008) destina-se para a calibração do seu sistema de análise. O calibrador liofilizado é um calibrador pontual. Está baseado em sangue total humano. Após reconstituição, o calibrador é submetido ao mesmo processo de preparo das amostras de pacientes.

Antes do preparo de amostra, **reconstitua o calibrador liofilizado:**

1. Pipetar exatamente 1,0 ml de água destilada no frasco
2. Homogeneizar repetidamente por 10-15 minutos até que o conteúdo esteja homogêneo

Verifique que o conteúdo do frasco esteja homogêneo. Se substâncias não dissolvidas estiverem ainda visíveis, estenda o tempo de reconstituição. Evite a exposição à luz direta do Sol.

O nível do calibrador é rastreável ao material de referência certificado (ver Apêndice IV). A concentração atual depende do lote e será encontrada no folheto de informações que acompanha o calibrador.

Atenção: Este produto foi fabricado a partir de *pool* de sangue total humano testado, fornecendo resultados negativos para anticorpos HIV-1+2, HIV-, HCV- e HBV-DNA (PCR), antígeno HBs, anticorpos HBc, anticorpos HCV e TPHa. Como não existem métodos que dêem segurança absoluta de que produtos contendo materiais de fonte humana serão livres de agentes infecciosos, um possível risco de infecção deve ser levado em conta. Este produto também pode conter agentes desconhecidos e outros patógenos para os quais não existem testes aprovados. Nós assim recomendamos considerar todos os produtos contendo material de fonte humana como potencialmente infeccioso e manipulá-lo com o mesmo cuidado destinado a amostras de pacientes potencialmente infecciosas.

Estabilidade do calibrador em sangue total reconstituído:

O calibrador reconstituído em água tem a seguinte vida útil de armazenamento, mas não além da data indicada no rótulo:

Tabela 3 Estabilidade de tiamina pirofosfato (TPP) no calibrador em sangue total (artigo no. 37008) após reconstituição

Temperatura de armazenamento	Tempo de armazenamento	Outras condições de armazenamento
+20 a +25 °C	3 dias	Protegido da luz, bem fechado
+2 a +8 °C	7 dias	Protegido da luz, bem fechado
abaixo de -18 °C	3 meses	Protegido da luz, bem fechado
Ciclos de congelamento/descongelamento	de 3 ciclos	-

Para evitar ciclos desnecessários de congelamento/descongelamento, faça alíquotas antes de congelar.

5.3 Reconstituição dos controles

Os controles em sangue total da Chromsystems (artigo 0034, 0035) destinam-se a monitorar a exatidão e a precisão de cada sequência analítica. Eles estão disponíveis em dois níveis de concentração diferentes. Os controles liofilizados são baseados em sangue total humano. Após a reconstituição, eles são preparados da mesma maneira que as amostras de pacientes e são analisados dentro da rotina em condições análogas ao respectivo procedimento do teste.

Antes do preparo de amostra, reconstitua os controles de sangue total da seguinte maneira:

1. Pipete 2,0 mL de água ultra-pura no frasco original
2. Reconstitua de 10 a 15 min de +20 a +25 °C, homogeneizando repetidamente

Verifique se o conteúdo do frasco está homogêneo. Se substâncias não dissolvidas ainda estiverem visíveis, estenda o tempo de reconstituição. Evite exposição direta à luz do Sol.

As concentrações de analito nos controles são dependentes do lote. Níveis individuais são fornecidos no folheto que acompanha cada controle.

Atenção: Este produto foi fabricado a partir de *pool* de sangue total humano testado, fornecendo resultados negativos para anticorpos HIV-1+2, HIV-, HCV- e HBV-DNA (PCR), antígeno HBs, anticorpos HBc, anticorpos HCV e TPFA. Como não existem métodos que dêem segurança absoluta de que produtos contendo materiais de fonte humana serão livres de agentes infecciosos, um possível risco de infecção deve ser levado em conta. Este produto também pode conter agentes desconhecidos e outros patógenos para os quais não existem testes aprovados. Nós assim recomendamos considerar todos os produtos contendo material de fonte humana como potencialmente infeccioso e manipulá-lo com o mesmo cuidado destinado a amostras de pacientes potencialmente infecciosas.

Estabilidade do soro controle reconstituído:

Os controles reconstituídos em água têm a seguinte vida útil de armazenamento, mas não além da data indicada no rótulo:

Tabela 4 Estabilidade de tiamina pirofosfato (TPP) em controles de sangue total (artigos no. 0034, 0035) após reconstituição

Temperatura de armazenamento	Tempo de armazenamento	Outras condições de armazenamento
+20 a +25 °C	3 dias	Protegido da luz, bem fechado
+2 a +8 °C	7 dias	Protegido da luz, bem fechado
abaixo de -18 °C	3 meses	Protegido da luz, bem fechado
Ciclos de congelamento/ descongelamento	3 ciclos	-

Para evitar ciclos desnecessários de congelamento e descongelamento, faça alíquotas dos controles antes de congelar.

5.4 Preparo do mix de derivatização

Antes do preparo de amostra, prepare o mix de derivatização da seguinte maneira:

1. Primeiro reconstitua o conteúdo do frasco do Reagente de Derivatização 1 (artigo 35005) com exatamente 0,3 mL de água destilada ultra-pura. Mantenha refrigerado (+2 a +8°C), a estabilidade desta solução é de aproximadamente 2 semanas.
2. Misture 100 µl do reagente reconstituído com 2,0 mL do Reagente de Derivatização 2 (artigo 35006). Proporção 1:21.
3. Para cada amostra, 200 µL desta mistura (= 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.

5.5 Procedimento de preparo de amostras

Importante:

Proteção da luz suficiente durante todo o preparo da amostra é essencial. As amostras não devem ser expostas diretamente à luz do Sol.

Antes do preparo de amostra, deixe reagentes/calibrador/controles/amostras que são armazenados congelados ou refrigerados, atingirem temperatura ambiente e homogeneíze.

Para o preparo de amostras de pacientes, controles e calibrador para análise, trabalhe os seguintes passos na seguinte ordem:

1. Pipete 200 µL de amostra/calibrador/controle em um Frasco de Reação âmbar (artigo no. 33005)
2. Adicione 100 µL de Tampão de Extração (artigo no.: 37003)
3. Agitar por 2 s (vortex).
4. Adicionar 300 µL de Reagente de Precipitação (artigo 37004).
5. Agitar por 30 s (vortex).
6. Centrifugar por 5 min a 9.000 x g
7. Pipete 200 µL do mix de derivatização (ver capítulo 5.4) em um Frasco de Reação âmbar
8. Adicionar 100 µL do sobrenadante e agitar brevemente.
9. Adicionar 100 µL de tampão de neutralização (artigo 35009).
10. Adicionar 100 µL de tampão de estabilização (artigo 35007) e agitar brevemente.
11. Deixar descansar por 20 min
12. Transfira em um vial de vidro âmbar para autosampler, então injetar 50 µL no sistema HPLC.

5.6. Tempo de armazenamento das amostras preparadas

Amostras preparadas para análise como indicado no capítulo 5.5 tem o seguinte tempo de armazenamento:

Tabela 5 Tempo de armazenamento das amostras preparadas

Temperatura de armazenamento	Tempo de armazenamento	Outras condições de armazenamento
+20 a +25 °C	3 dias	Protegido da luz, bem fechado, vials de vidro
+2 a +8 °C	3 dias	Protegido da luz, bem fechado, vials de vidro

6 Controle de qualidade

Precisão e exatidão podem ser monitoradas pela adição de controles adicionais em cada corrida analítica (artigo no. 0034, 0035). Caso a análise desses controles mostre resultados fora do intervalo fornecido nos folhetos de informação, o sistema deve ser avaliado, e, se necessário, recalibrado.

Monitore a qualidade da separação cromatográfica comparando os tempos de retenção e as formas dos picos cromatográficos do analito com o cromatograma do certificado da coluna ou com o cromatograma exemplo (capítulo 7.2). Em caso de uma coluna em uso, compare com as corridas analíticas anteriores do mesmo ensaio (ex: enquanto o sistema é ligado, capítulo 3.4). Desvios significativos podem ser devido à diminuição do desempenho do pré-filtro, pré-coluna e/ou corrida analítica. Indicadores típicos podem ser o caudamento dos picos.

Para mais informação, ver capítulo 12 Problemas e Soluções.

7 Aquisição de dados e avaliação

7.1. Calibração do sistema de análise de dados

Corra um calibrador do sistema de análise para cada série de dosagens. Use o calibrador em sangue total (artigo no. 37008) para isto. A concentração do analito no calibrador é dependente de lote. Níveis exatos são fornecidos no folheto do pacote.

Curva de calibração é construída calculando a área do pico do analito ou a altura no eixo y pela concentração do calibrador no eixo x. Então é construída uma curva de calibração desde a origem (calibração pontual).

Selecione o método de padrão externo para calibração do seu sistema de análise.

7.2. Exemplos de cromatogramas

Os seguintes gráficos fornecem exemplos de cromatogramas usando este método.

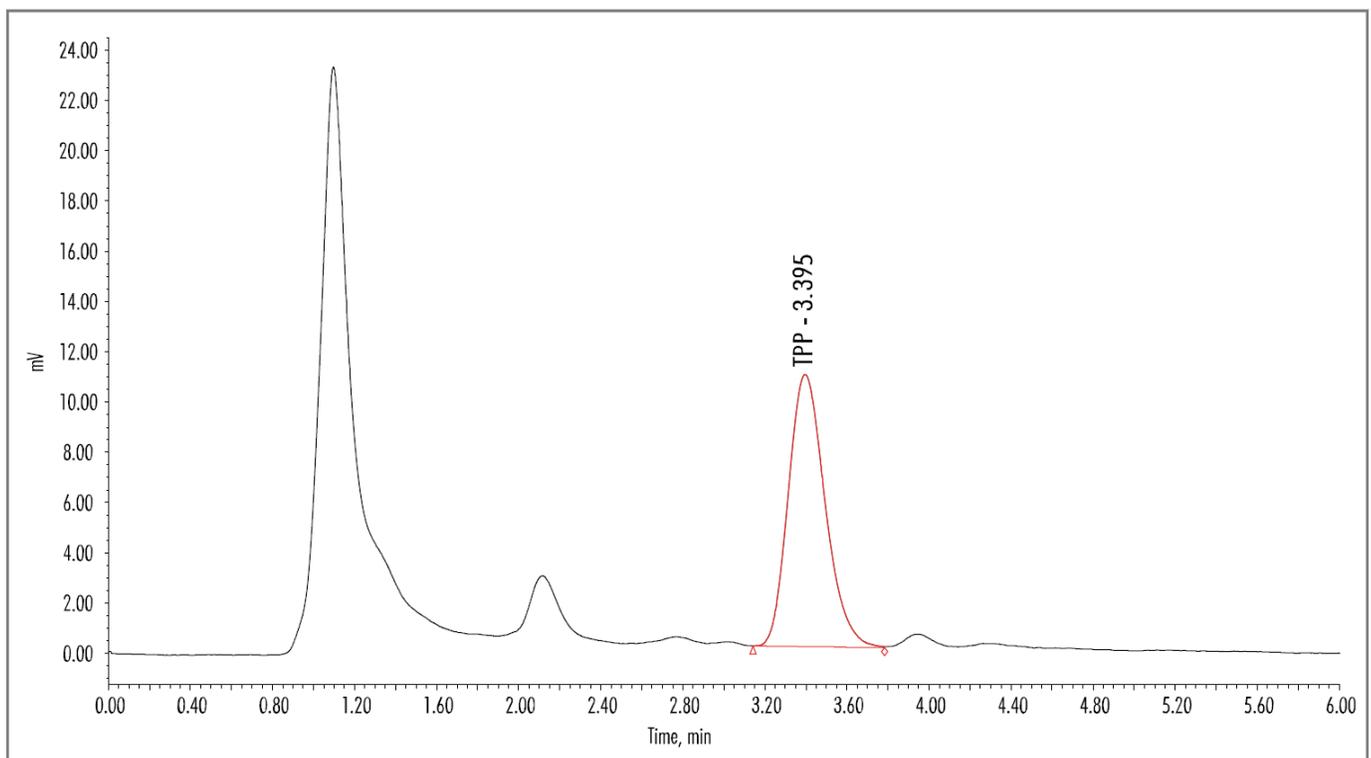


Figura 2 Cromatograma de um calibrador em sangue total
Concentração do analito: Tiamina pirofosfato (TPP): 46,1 µg/L

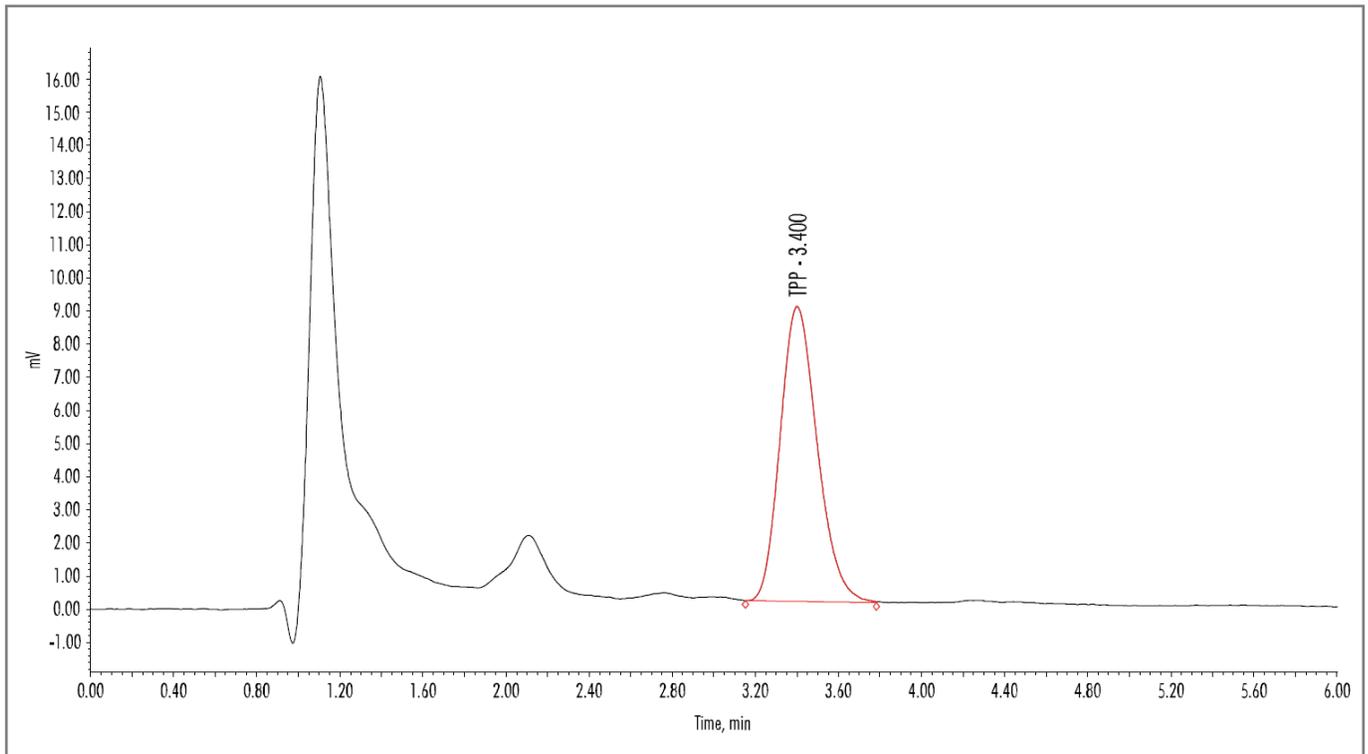


Figura 3 Cromatograma de uma amostra de paciente
Concentração do analito: Tiamina pirofosfato (TPP): 39,5 µg/L

7.3. Fatores de conversão

A seguinte tabela lista os fatores de conversão entre concentrações de massa e molares e vice-versa.

Tabela 6: Fatores de conversão

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

7.4. Cálculo manual

Para o cálculo manual os seguintes dados são necessários:

- Área/altura do pico de substância A no cromatograma da amostra =A_{Amostra}
- Área/altura do pico de substância A no cromatograma do calibrador =A_{Calibrador}
- A concentração de substância A no calibrador =C_{Calibrador}

A concentração da substância A na amostra C_{Amostra} é então calculada da seguinte maneira:

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

8 Armazenamento e tempo de vida útil dos componentes do kit

Fechados, e fornecidos em transporte e armazenamentos adequados, os componentes do kit são estáveis até o indicado pela data de validade do rótulo. Transporte e armazene os componentes de acordo com as seguintes condições:

Tabela 7 Condições de transporte para o kit de reagente e componentes

Produto	Temperatura de transporte
Kit de reagente (artigo no. 35000)	ambiente
Kit básico (artigo no. 35000-BK)	ambiente
Todos os outros componentes listados no capítulo 1	ambiente

Desempacote imediatamente os componentes após o transporte e armazene individualmente como indicado abaixo:

Tabela 8 Condições de armazenamento para reagentes, calibrador e controles

Produto	Temperatura de armazenamento
Fase Móvel (artigo no. 35021, 35022)	+18 a +30 °C
Tampão de Extração (artigo no. 37003)	+18 a +30 °C
Reagente de Precipitação (artigo no. 37004)	+18 a +30 °C
Reagente de Derivatização 1 (artigo no. 35005)	+18 a +30 °C
Reagente de Derivatização 2 (artigo no. 35006)	+18 a +30 °C
Tampão de Neutralização (artigo no. 35009)	+18 a +30 °C
Tampão de Estabilização (artigo no. 35007)	+2 +8 °C
Padrão de Calibração em Sangue Total (artigo no. 37008)	abaixo -18 °C
Controles em Sangue Total (artigo no. 0033, 0034, 0035)	abaixo -18 °C

Tampe os reagentes imediatamente após o uso e armazene-os à temperatura especificada. A vida útil em uso é de um ano, mas não se estende além da data de validade declarada. Detalhes da estabilidade dos calibradores e controles reconstituídos são fornecidos nos capítulos 5.2 e 5.3.

A coluna HPLC, pré-coluna e materiais de laboratório não listados aqui podem ser armazenados de +18 a +30 °C.

O tempo de vida útil em uso da coluna HPLC, pré-coluna e pré-filtro é dependente das condições individuais em que esses componentes são usados (ex: frequência de uso, número de amostras, tipo de amostras, volume de injeção). Considere dosagens de controle de qualidade (capítulo 6) para identificar diminuição do desempenho cromatográfico.

9 Descarte de resíduos

Resíduos perigosos

A Fase Móvel (artigo no. 35021, 35022) 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** (artigo no. 37004), **o Tampão de Neutralização** (artigo no. 35009) **contém ácidos fortes. Neutralize as soluções e descarte em um contêiner para soluções salinas.** O Tampão de Estabilização (artigo no. 35007) contém um sal perigoso. Descarte os resíduos do produto em um contêiner para soluções salinas.

Resíduos de amostras de pacientes, amostras preparadas, controles (artigo no. 0034, 0035) e calibrador (artigo no. 37008) 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 a diretriz 2008/98/EC e de acordo com as exigências

locais e nacionais. Os contêineres de lixo devem ser armazenados apropriadamente e o acesso só deve ser permitido a pessoas autorizadas.

Resíduos não perigosos

Tampão de Extração (artigo no. 37003), Reagente de Derivatização 1 (artigo no. 35005) e consumíveis de laboratório não contaminados não são classificados como perigosos. Descarte de acordo a diretriz 2008/98/EC e de acordo com as exigências locais e nacionais.

10 Valores de referência

Nota:

Valores de referência listados abaixo representam níveis encontrados numa proporção da população saudável (ex: 95% dos doadores de sangue investigados saudáveis). Consequentemente, eles podem ou não se alinhar com níveis de decisão clinicamente relevantes ou valores de corte em relação à finalidade pretendida deste dispositivo. Para dados de desempenho clínico, incluindo valores esperados em pessoas afetadas e não afetadas, ver Apêndice III.

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.

Amostras de sangue com heparina lítica de ao menos 15 homens e 15 mulheres de diversas faixas etárias (21-30, 31-40, 41-50, 51-60, 61-70 e > 70 anos de idade) foram coletados no estudo de G. Steen e M. van der Zwaal [13]. Um questionário foi administrado para verificar os seguintes critérios de exclusão: uso de suplementação oral de vitaminas ou ferro, uso de anticoagulante, diabetes, gravidez, e uso de anticoncepcional oral. O teste foi feito usando HPLC por fluorescência pós derivatização.

Tabela 9: Faixa de referência para tiamina pirofosfato (TPP) em sangue total

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]

11 Testes de interferência

Metabólitos e medicamentos foram enriquecidos em amostras de sangue total ou amostras preparadas de sangue antes da derivatização às mais altas concentrações (ver tabela abaixo) e testadas para interferências.

Além disso, condições de amostras diferentes foram simuladas e sua influência no teste foi examinada. Sistemas de amostragem diferentes também foram testados para interferência.

Tabela 10: Substâncias testadas e suas concentrações - metabólitos

Substância	Concentração no teste em µg/L
Tiamina	500
Tiamina monofosfato	500
Tiamina trifosfato	4,39

Tabela 11: Substâncias testadas e suas concentrações - medicamentos

Substância	Concentração no teste em mg/L
Acetaminofeno (paracetamol)	156
Ácido acetilsalicílico	30,0
Alopurinol	60,0
Alprazolam	0,258
Amlodipina	0,0750
Amoxicilina	54,0
Anfetamina/dexamfetamina	0,330
Apixaban	0,315
Ácido ascórbico	1044
Atenolol	9,00
Atorvastatina	0,750
Azitromicina	11,1
Bisoprolol	0,258
Bupropion	0,396
Candesartan	0,551
Carvedilol	0,233
Cefuroxima	543
Citalopram	5,43
Clonazepam	0,300
Clopidogrel	0,00169
Ciclobenzaprina	0,102
Diclofenaco	24,0
Donezepil	6,00
Duloxetina	0,162
Edoxaban	1,01
Empaglifozin	0,929
Enalaprilat	0,819
Fenoterol	0,00358
Fluoxetina	1,42
Fluticasona	0,00126
Formoterol	0,000273
Furosemida	15,9
Gabapentina	26,7
Galantamina	14,4
Glimepirida	1,64
Glipizida	3,00
Hidroclorotiazida	1,13
Hidrocodona	0,0720
Ibuprofeno	219
Ipratrópio de bromida	0,00300
Lercanidipina	0,0407
Levotiroxina	0,429
Lisinopril	0,246
Lorazepam	0,720
Losartana	0,836
Meloxicam	6,00
Memantina	12,0
Metamizola/dipirona (como 4-metilaminoantipirina)	206
Metformina	12,0
Metocarbamol	123
Metilfenidato	0,108
Metoclopramida	2,25
Metoprolol	1,50
Montelukast	1,65

Nebivolol	0,0300
Nimodipina	54,0
Noscapina	0,810
Omeprazol/esomeprazol	8,40
Pantoprazol	30,0
Fenprocumon	15,0
Pravastatina	0,207
Prednisolona	1,20
Prednisona	0,0990
Pregabalina	22,5
Propranolol	1,01
Ramipril	0,156
Ranitidina	10,5
Rivaroxaban	2,70
Rivastigmina	7,20
Rosuvastatina	0,111
Salbutamol/albuterol	0,0450
Sertralina	0,927
Simvastatina	0,0831
Sitagliptina	1,15
Espironolactona	0,555
Tamsulosina	0,0338
Tilidina (como nortilidina)	0,368
Torasemida	83,1
Tramadol	3,14
Trazodona	14,7
Valsartan	11,7
Venlafaxina	0,696
Zolpidem	0,816

11.1. Interferências detectadas

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

11.2. Interferências não detectadas

As seguintes substâncias foram testadas e tiveram uma influência negligenciável nos resultados quantitativos (desvio \leq 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, duloxetine, 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 \leq 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 \leq 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 \leq 15%).

Os seguintes sistemas de amostragem foram testados sem interferência significativa; os resultados quantitativos não foram afetados (desvio \leq 15%):

Tabela 12: Sistemas de amostragem não causando interferências

Tipo	Fabricante	Artigo no.	Volume	Descrição	Lotes testados
Sangue total EDTA (K3E)	Sarstedt	06.1664.001	1,2 mL	S-Monovette® 1,6 mg K3-EDTA/mL, spray-dried	7030611
Sangue total EDTA (K3E)	Greiner	454036	4,0 mL	Vacurette® K3-EDTA, spray-dried	A161036E
Sangue total K2-EDTA (K2E)	Sarstedt	04.1915.100	2,7 mL	S-Monovette® 1,6 mg K2-EDTA/mL, spray-dried	8595111
Sangue total K2-EDTA (K2E)	BD	368841	2,0 mL	Vacutainer® 1,8 mg K2-EDTA/mL, spray-dried	0027522
Sangue total heparina-Li (LH)	Sarstedt	03.1628	5,5 mL	S-Monovette® 16 I.U./mL Li-heparin, granulate	7034611
Sangue total heparina-Li	BD	368886	6,0 mL	Vacutainer® 17 I.U./mL Li-heparin, spray-dried	7066712
Sangue total heparina-Na (NH)	Sarstedt	01.1613.100	7,5 mL	S-Monovette® 16 I.U./mL Na-heparin, granulate	7032211
Sangue total heparina-Na (NH)	Greiner	454051	4,0 mL	Vacurette® Na-heparin, spray-dried	A19033AM
Sangue total heparina-NH4 (AH)	Sarstedt	05.1105	4,5 mL	S-Monovette® 16 I.U./mL NH4-heparin, granulate	7033011
Sangue total heparina-NH4 (AH)	Greiner	455031	9,0 mL	Vacurette® NH4-heparin, spray-dried	A180936D

Se você tiver perguntas concernentes a interferentes, contate seu representante local Chromsystems ou nosso suporte Chromsystems diretamente pelo telefone +49 89 18930-111 ou por email em support@chromsystems.com.

12 Problemas e Soluções

Tabela 13: Problemas e Soluções

Problema	Possível causa	Solução
Flutuações na linha de base	Lâmpada do detector ainda não aquecida	Aguardar
	Lâmpada do detector velha	Substituir a lâmpada
	Sistema ainda não equilibrado	Repetir a injeção do padrão até que dois cromatogramas consecutivos sejam quase idênticos
	Fluxo inconstante	Verificar a bomba do HPLC
Linha de base instável	Bomba do HPLC	Verificar a bomba do HPLC (ar, selos)
	Ar no sistema	Degaseificar a fase móvel
	Célula do detector contaminada	Limpar a célula
	Fase móvel contaminada	Trocar fase móvel
Picos interferentes	Ar no sistema	Degaseificar a fase móvel
	Injetor contaminado	Limpar o injetor
	Frascos do amostrador automático contaminados	Usar frascos novos ou limpá-los com metanol
	Seringa de injeção contaminada	Limpar a seringa com metanol
	Coluna HPLC contaminada	Substituir a coluna
	Amostras não armazenadas adequadamente	Utilizar amostras recentes
Alargamento de picos, cauda	Reagente de derivatização muito velho	Preparar novos
	Coluna HPLC velha	Substituir a coluna
Picos duplicados	Volume morto nas conexões	Substituir as conexões
	Volume morto na coluna HPLC	Substituir a coluna
Sem picos	Vazamento no sistema	Verificar o injetor, pressão
	Conexão com integrador ou impressora defeituosa ou interrompida	Verificar o sinal do cabo e as conexões
Sem sinal	Lâmpada do detector	Verificar a voltagem da lâmpada, substituir se necessário
	Lâmpada do detector velha	Substituir a lâmpada
Sensibilidade diminuindo	Célula do detector contaminada	Limpar a célula
	Válvula de injeção defeituosa	Avaliar o injetor
	Variações de temperatura	Usar forno de coluna
Mudanças no tempo de retenção	Razão de fluxo instável pulsação da bomba	Avaliar bomba do HPLC
	Sistema não está equilibrado	

Repetir a injeção do padrão até que dois cromatogramas consecutivos sejam quase idênticos

Se você tiver perguntas concernentes a problemas e soluções, contate seu representante local Chromsystems ou nossa equipe de suporte diretamente pelo telefone +49 89 18930-111 ou pelo email support@chromsystems.com.

13 Literatura

- 1 Gressner AM, Arndt T (ed): Lexikon der Medizinischen Laboratoriumsdiagnostik. Springer, Berlin, Heidelberg, 2019.
- 2 Turck D, Bresson J-L, Burlingame B, Dean T, Fairweather-Tait S, Heinonen M, *et al.*: Dietary reference values for thiamin. *EFS2* 2016; 14.
- 3 Berger MM, Shenkin A, Schweinlin A, Amrein K, Augsburger M, Biesalski H-K, *et al.*: ESPEN micronutrient guideline. *Clin Nutr* 2022; 41:1357–1424.
- 4 Araujo Castro M, Vazquez Martinez C: The refeeding syndrome. Importance of phosphorus. *Medicina Clínica (English Edition)* 2018; 150:472–478.
- 5 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.
- 6 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.
- 7 Kennedy DO: B Vitamins and the Brain: Mechanisms, Dose and Efficacy--A Review. *Nutrients* 2016; 8:68.
- 8 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.

Apêndice I: Informações de segurança

Substâncias perigosas

Quando usados os reagentes, as seguintes informações devem ser observadas e as respectivas medidas de segurança deverão ser adotadas. Maiores informações podem ser obtidas nos respectivos folhetos de segurança dos materiais. Estes podem ser baixados do nosso site www.chromsystems.com ou www.grupokovalent.com.br ou mediante solicitação.

Tabela 14: Declarações de perigo e precauções

Produto	Risco
Fase móvel (artigo 35021, 35022) 	Perigo H226 Líquido e vapor inflamáveis. H302+H312+H332 Tóxico por inalação, ingestão e contato com a pele. H370 Causa danos sérios aos órgãos. P280 Utilizar roupa de proteção, luvas adequadas, proteção nos olhos e na face. P301+P312 Em caso de ingestão: ligue imediatamente para um centro de intoxicação ou médico. P302+P352 Em caso de contato com a pele: lave abundantemente com sabão e água. P403+P233 Armazenar em local bem ventilado. Manter bem fechado.
Reagente de Precipitação (artigo 37004) 	Perigo H272 Pode intensificar o fogo; oxidante. H290 Pode ser corrosivo a metais. H314 Causa queimaduras severas e danos aos olhos. P280 Utilizar roupa de proteção, luvas adequadas, proteção nos olhos e na face. P305+P351+P338 Em caso de contato com os olhos: Lave cautelosamente com água por vários minutos. Remova lentes de contato, se presentes e de fácil remoção. Continue lavando. P309+P311 Em caso de acidente ou mal estar, procurar auxílio médico imediatamente, de preferência levar esse manual. P301+P330+P331 Em caso de ingestão: lave a boca. Não induza ao vômito.
Reagente de Derivatização 2 (artigo 35006) 	Perigo H226 Líquido e vapor inflamáveis. H290 Pode ser corrosivo a metais. H301+H311+H331 Tóxico por inalação, ingestão e contato com a pele. H314 Causa queimaduras severas e danos aos olhos. H370 Causa danos aos órgãos. P210 Mantenha distância do calor, superfícies quentes, faíscas, chamas abertas e outras fontes de ignição. Não fume. P280 Utilizar roupa de proteção, luvas adequadas, proteção nos olhos e na face. P301+P310 Em caso de ingestão: ligue imediatamente para um centro de intoxicação ou médico.

	<p>P305+P351+P338 Em caso de contato com os olhos: Lave cautelosamente com água por vários minutos. Remova lentes de contato, se presentes e de fácil remoção. Continue lavando. P301+P330+P331 Em caso de ingestão: lave a boca. Não induza ao vômito. P403+P233 Armazenar em local bem ventilado. Manter bem fechado.</p>
<p>Reagente de Estabilização (artigo 35007)</p> 	<p>Perigo</p> <p>H318 Causa danos sérios aos olhos.</p> <p>P280 Utilizar roupa de proteção, luvas adequadas, proteção nos olhos e na face. P305+P351+P338 Em caso de contato com os olhos: Lave cautelosamente com água por vários minutos. Remova lentes de contato, se presentes e de fácil remoção. Continue lavando. P313 Em caso de acidente ou mal-estar, procurar auxílio médico imediatamente, de preferência levar esse manual. P332+P313 Em caso de irritação na pele: Procure atenção médica.</p>
<p>Tampão de Neutralização (artigo 35009)</p> 	<p>Perigo</p> <p>H290 Pode ser corrosivo a metais. H315 Causa irritação na pele. H319 Causa irritação séria aos olhos.</p> <p>P280 Utilizar roupa de proteção, luvas adequadas, proteção nos olhos e na face. P305+P351+P338 Em caso de contato com os olhos: Lave cautelosamente com água por vários minutos. Remova lentes de contato, se presentes e de fácil remoção. Continue lavando. P309+P311 Em caso de acidente ou mal-estar, procurar auxílio médico imediatamente, de preferência levar esse manual. P332+P313 Em caso de irritação na pele: Procure atenção médica.</p>
<p>Esses componentes não são classificados como perigosos de acordo com a legislação da União Europeia: Tampão de extração (artigo 37003) Reagente de derivatização 1 (artigo 35005) Padrão de calibração em sangue total (artigo 37008) Controles em sangue total (artigo 0033, 0034, 0035)</p>	

Ingredientes ativos:

Tabela 15: Ingredientes ativos

Artigo no.	Descrição	Componente Ativo	Especificação
35021/35022	Fase Móvel	Metanol	10-25%
		Água	75-90%
37003	Tampão de Extração	Água	97-97,5%
37004	Reagente de Precipitação	Ácido perclórico	10-25%
35005	Reagente de Derivatização 1	Complexo ferro quelante	Pó liofilizado
35006	Reagente de Derivatização 2	Metanol	25-50%
		Hidróxido de sódio	5-10%
35009	Tampão de Neutralização	Ácido fosfórico	10-25%
35007	Tampão de Estabilização	Metabissulfito de sódio	3-10%
35110	Coluna Analítica	Polímero baseado em sílica	> 90%

37008	Padrão de Calibração em Sangue Total	Analito (tiamina pirofosfato (TPP))	Conc. ver folheto
0033	Controle Nível I+II em Sangue Total	Ver 0034 e 0035	-
0034	Controle Nível I em Sangue Total	Analito (tiamina pirofosfato (TPP))	Conc. ver folheto
0035	Controle Nível II em Sangue Total	Analito (tiamina pirofosfato (TPP))	Conc. ver folheto

Apêndice II: Dados de desempenho analítico

As características de desempenho foram determinadas e verificadas no seguinte equipamento:

- Detector de fluorescência da Shimadzu RF-20^a

Os usuários que desejarem usar o ensaio de HPLC “Vitamina B1 em sangue total” (artigo no. 35000) com um sistema HPLC diferente que o especificado aqui, devem validar o método no dispositivo.

Áreas de pico foram usadas para calcular resultados dentro da avaliação de desempenho analítico.

Rastreabilidade metrológica e certeza:

Para o Padrão de Calibração em Sangue Total (artigo no. 37008) a rastreabilidade metrológica foi demonstrada e está disponível como cadeia de rastreabilidade (ver Apêndice IV).

Certeza da medida 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 (disponível no centro de download no site: www.chromsystems.com/downloadcenter.html)

Faixa de medição analítica

Menor limite de quantificação (LLOQ) e maior limite de quantificação (ULOQ):

O menor limite de quantificação (LLOQ) foi determinado pela diluição definida de amostras com concentrações endógenas analíticas baixas com solução de fosfato tamponada com cloreto de sódio. O maior limite de quantificação (ULOQ) foi determinado enriquecendo a amostra de sangue total com quantidades definidas de substâncias padrão.

Este método é linear a partir do menor limite de quantificação (LLOQ) até o maior limite de quantificação (ULOQ).

Tabela 16: Menor e maior limite de quantificação

Analito	LLOQ [µg/l]	ULOQ
Tiamina pirofosfato	0.8	Até pelo menos 750

Precisão intra-ensaio:

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

Tabela 17: Precisão intra-ensaio

Substância	Coeficiente de variação (concentração do analito)		
Tiamina pirofosfato (TPP)	4,4 % (26,0 µg/L)	4,0 % (38,7 µg/L)	3,8 % (95,4 µg/L)

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.

Tabela 18: Precisão inter-ensaio

Substância	Coeficiente de variação (concentração do analito)		
Tiamina pirofosfato (TPP)	4,9 % (26,0 µg/L)	4,4 % (38,7 µg/L)	4,7 % (95,4 µg/L)

Desvio

Para identificar qualquer desvio da concentração do analito ao longo do tempo, a concentração do analito em três amostras de sangue total foi comparada ao longo de um período de 10 dias. Nenhum desvio foi observado.

Precisão (reprodutibilidade)

Os dados de desempenho foram determinados em 3 sítios baseados em 4 amostras diferentes. Todas as amostras foram preparadas 5 vezes em 5 dias diferentes. O procedimento é baseado no CLSI EP05-A3 e corresponde a um teste 3 x 5 x 5.

Tabela 19: Reprodutibilidade

Substância	Amostra	Média	Reprodutibilidade		
			Coeficiente de variação	de	Intervalo de 95% de confiança
Tiamina pirofosfato (TPP)	nativa	59,7 µg/L	5,1 %		4,1-6,9 %
	baixa	27,0 µg/L	6,1 %		4,8-8,2 %
	média	114 µg/L	4,4 %		3,6-5,8 %
	alta	375 µg/L	5,5 %		4,3-7,4 %

Carry over

Uma amostra de sangue total preparada com uma concentração de analito na faixa de maior limite de quantificação foi analisada entre diversas amostras em branco. As concentrações do analito nas amostras em branco antes e depois das amostras de nível alto foram comparadas. Em caso de carry-over significativo, a quantidade foi calculada numa porcentagem baseada na relação com a amostra anterior.

Revisão dos dados obtidos não mostraram nenhum efeito de carry-over. Em todos os casos a concentração medida da amostra em branco foi abaixo do limite de quantificação.

Robustez

O efeito das modificações definidas no preparo de amostra e a configuração do sistema HPLC foi avaliada. O método é robusto dentro das seguintes tolerâncias fornecidas desde que permaneçam constantes durante a série de medições:

Tabela 20: Faixas de tolerância no sistema HPLC

Sistema HPLC	Faixa de tolerância
Temperatura da coluna	+20 a +30 °C
Volume de injeção	10 a 100 µL

Tabela 21: Faixas de tolerância no preparo de amostra

Preparo de amostra (de acordo com capítulo 5.5)	Faixa de tolerância
Passo 6: Centrifugue 5 min a 9000 x g	Centrifugue 5 min de 4500 a 9000 x g

Estes dados foram estabelecidos em nosso laboratório somente para verificar o desempenho do kit de reagentes e para cumprir com os requerimentos regulatórios. Nós particularmente enfatizamos que esses dados não são adequados para comparar os sistemas de medição usados, nem para declarar concernente ao desempenho geral.

Apêndice III: Dados de desempenho clínico

O kit de reagentes da Chromsystems 35000 “Vitamina B1 em sangue total” é usado para triar populações específicas para níveis anormais ou para monitorar o estado da vitamina B1 em pacientes, ex: em terapia suplementar. Como o estado da vitamina B1 nunca serve para diagnosticar uma doença diretamente, parâmetros de desempenho clínico como especificidade de diagnóstico, sensibilidade diagnóstica, valor preditivo positivo, valor preditivo negativo ou razão de semelhança não são aplicáveis para estes dispositivos. Em vez disso, parâmetros clínicos relevantes são valores esperados em populações normais e afetadas. A tabela abaixo exibe dados de desempenho clínico usando os ensaios de vitamina B1 da Chromsystems.

Dados de desempenho clínico para vitamina B1

Monitoramento dos níveis de vitamina B1 ou triagem para deficiência ou excesso é relevante em grupos de população que têm mostrado risco elevado para deficiência ou excesso. Estes incluem

Para deficiência de vitamina B1:

- Pacientes com distúrbios alimentares restritivos
- Pacientes em tratamento de hemodiálise

Para excesso de vitamina B1:

- Pacientes em terapia suplementar de vitamina B1

Tabela 22: Desempenho clínico para vitamina B1

Alvo/questão de pesquisa do estudo	Matriz usada para determinar níveis de TPP	Valores esperados na população afetada	Valores esperados na população não afetada	na Ref
Auditoria retrospectiva de adolescentes hospitalizados com transtorno alimentar restritivo que começaram em um regime de realimentação de alto teor calórico foram investigados para deficiência ou excesso de vitamina B1 na admissão ou durante a admissão	Sangue total	Deficiência: < 67 nmol/L Excesso: > 200 nmol/L	67-200 nmol/L	[14]
Triagem para deficiência de tiamina foi realizada em pacientes com distúrbios alimentares pediátricos admitidos pela primeira vez em um hospital ambulatorial	Sangue total	Deficiência: < 66nmol/L	66-200.3 nmol/L	[15]
Estudo para triar parâmetros bioquímicos, nutricionais e hormonais em pacientes adolescentes com anorexia nervosa e para estabelecer quais anormalidades persistem após realimentação de curto prazo	Sangue total	Deficiência: < 82,5 nmol/L	82,5-167,3 nmol/L	[16]
Estudo para medir as vitaminas hidrossolúveis e rastrear elementos no sangue e dialisado em pacientes tratados com hemodiafiltração pós diluição online (HDF)	Sangue total	Deficiência: < 66 nmol/L	66-200 nmol/L	[17]

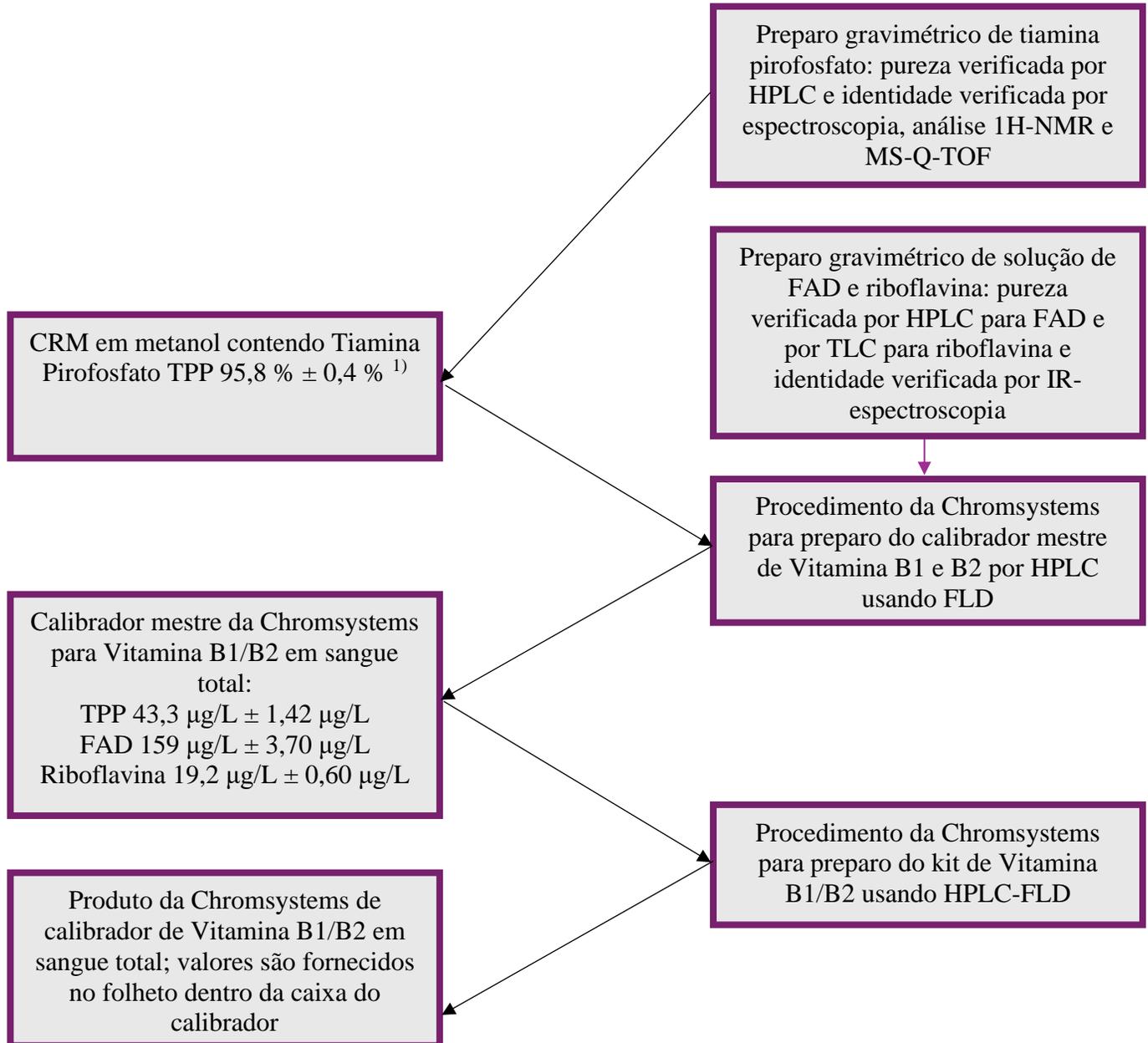
Estudo para investigar a perda intradialítica de vitaminas e de homocisteína em pacientes antes e depois do tratamento de hemodiálise e se esse tipo de perda é dependente do tipo de dialisador	Sangue total	Deficiência: < 47 - nmol/L	[18]
--	--------------	----------------------------	------

Apêndice IV: Rastreabilidade dos calibradores

Padrão de calibração em Sangue total (artigo no. 37008)

Vitaminas B1 e B2 em sangue total

Versão 1.0



O calibrador mestre em sangue total (37008) foi preparado gravimetricamente pela adição de TPP, FAD e riboflavina obtida de um fornecedor comercial. As concentrações foram determinadas pelo fabricante do laboratório usando o kit de reagentes de Vitamina B1 em sangue total e Vitamina B2 em sangue total.

A metodologia para calibrador mestre de sangue total (37008) é usando o kit de reagentes no. 35000 (kit de reagentes para vitamina B1 em sangue total) e kit no. 37000 (kit de reagentes para vitamina B2 em sangue total) por análise em HPLC-FLD.

O padrão de calibração da Chromsystems para vitamina B1/B2 (calibrador de trabalho) (artigo no. 37008) tem uma concentração mostrada no folheto de cada lote, determinado pelo fabricante do laboratório usando o kit de reagentes da Chromsystems como referência. O ensaio foi calibrado usando o calibrador mestre da Chromsystems com uma calibração (incluindo incertezas) como indicada no diagrama acima. A metodologia para o calibrador de trabalho é análise por HPLC-FLD usando o kit de reagentes da Chromsystems no. 35000 (Vitamina B1 em sangue total) e 37000 (Vitamina B2 em sangue total).

Homogeneidade é verificada para cada lote por análises múltiplas de diversas alíquotas baseada na razão estatística da Chromsystems por tamanho de amostra (baseada na ISO 13528 com um conjunto mínimo de 10 repetições e duas corridas). Os valores assinalados e incertezas correspondentes são fornecidas no folheto que acompanha cada calibrador.

- 1) Incerteza da concentração é expressa como “incerteza expandida” em aproximadamente 95% de intervalo de confiança usando um fator de cobertura de $k=2$

Apêndice V: Símbolos

Nós usamos símbolos EN ISSO 15223-1 em nossos rótulos, especificações e pacotes. Os significados de cada símbolo são fornecidos na tabela abaixo:

Símbolo	Significado
	Fabricante
	Data da fabricação
	Data de validade
	Número do artigo
	Suficiente para <n> aplicações
	Cuidado
	Lote/código do lote
	Ver instruções para uso
	Limite máximo de temperatura: Armazene abaixo de determinada temperatura
	Limite de temperatura: Armazene dentro de determinado intervalo de temperatura
	Dispositivo médico de diagnóstico <i>in-vitro</i>
	Número de série
	Marca de CE de conformidade com a legislação europeia
	Marca de CE em conformidade com a legislação europeia (com sufixo 0123 – para o corpo notificado: TÜV Süd Product Service GmbH)

Apêndice VI: Histórico de versão

Versão	Data de lançamento (AAAA-MM-DD)	Descrição
1.0 _{IVDR}	2023-12-19	Criação inicial IVDR