

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



Manual de Instrução para a Análise por UHPLC de

Vitaminas B1 e B6 em sangue total

para preparo automatizado de amostras

Somente para uso de diagnóstico *in vitro*

Artigo No. 52952/UHPLC/F



**FAMÍLIA VITAMINS B1 AND B6 IN WHOLE BLOOD – AUTOMATED
SAMPLE PREPARATION – UHPLC
ANVISA: 10350840309**

Chromsystems Instruments & Chemicals GmbH é certificada de acordo com a ISO 13485 (incluindo MDSAP). Os produtos são produzidos e colocados em circulação seguindo as diretrizes 98/79/EC de dispositivos de diagnóstico médico *in vitro*.

Você pode baixar a declaração de conformidade de acordo com as diretrizes 98/79/EC do nosso centro de downloads de nosso site.

© 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
www.biosys.com.br

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

Fabricado por: Chromsystems Instruments & Chemicals GmbH

Am Haag 12
82166 Gräfelfing
Alemanha

Fone: +49 89 18930-0
Fax: +49 89 18930-199
www.chromsystems.com

Conteúdo.....	Página
1 Informações para requisição	4
2 Introdução	5
2.1 Informações Básicas.....	5
2.2 Princípio do Kit	7
2.3 Uso específico	8
2.4 Limitações Clínicas	8
3 Sistema UHPLC	9
3.1 Equipamentos requeridos adicionalmente	9
3.2 Princípios do UHPLC	9
3.3 Parâmetros do equipamento	9
3.4 Coluna UHPLC	10
3.5 Ligar o Sistema.....	11
3.6 Shut down	11
4 Separação cromatográfica	11
5 Preparo da amostra	12
5.1 Coleta e armazenamento das amostras de pacientes.....	12
5.2 Reconstituição dos calibradores	13
5.3 Reconstituição dos controles	13
5.4 Preparo da solução finalizadora	14
5.5 Procedimento de preparo das amostras	15
5.6 Estabilidade das amostras preparadas.....	16
5.7 Manuseio de amostras acima da faixa de medição analítica.....	16
6 Controle de Qualidade	16
7 Resultados e avaliação.....	16
7.1 Calibração do sistema de análise.....	16
7.2 Exemplos de cromatogramas	17
7.3 Fatores de Conversão	18
7.4 Cálculo Manual	18
8 Armazenamento e validade dos reagentes	18
9 Descarte de resíduos.....	19
10 Valores de referência.....	19
11 Testes de Interferência.....	20
11.1 Interferências detectadas	21
11.2 Nenhuma interferência detectada	22
12 Problemas e Soluções	23
13 Literatura.....	25

Conteúdo.....	Página
Apêndice I Informações de segurança	26
Apêndice II Validação	28
Apêndice III Validação	31
Apêndice IV Dados de desempenho clínico.....	32
Apêndice V Rastreabilidade dos calibradores.....	34
Apêndice VI Declaração de Conformidade	36
Apêndice VII Símbolos	38

1 Informações para requisição

Artigo	Produto	
52952/UHPLC/F	UHPLC Kit de Reagentes Para preparo automatizado de amostras Vitaminas B1 e B6 em sangue total Com placas de 96 poços	
	Conteúdo para 960 análises:	
	Fase Móvel A (para UHPLC)	2 X 1000 mL
	Fase Móvel B (para UHPLC)	1 x 1000 mL
	Mix de Padrão Interno para placa de 96 poços	1 x 50 mL
	Reagente de Extração para placa de 96 poços	2 x 75 mL
	Solução de Preparo para placa de 96 poços	3 x 25 mL
	Finalizador 1 para placa de 96 poços	2 x 5 x 0,25 mL (liof.)
	Finalizador 2 para placa de 96 poços	1 x 50 mL
	Tampão de Diluição para placa de 96 poços	1 x 100 mL
	Padrão de Calibração para sangue total	5 x 5 x 1,0 mL (liof.)
	Placa de Filtro de 96 poços	2 x 5 unidades
	Placa de Coleta de 96 poços	2 x 10 unidades
	Selos adesivos perfuráveis para placa de 96 poços	2 x 5 unidades
	Coluna UHPLC (equilibrada com cromatograma teste)	1 pc
	Componentes disponíveis separadamente	
52003	Padrão de calibração em sangue total	5 x 1,0 mL (liof.)
52744	Mix de Padrão Interno para placa de 96 poços	50 mL
52705/BR	Reagente de Extração para placa de 96 poços	2 x 75 mL
52706/BR	Solução de Preparo para placa de 96 poços	3 x 25 mL
52707BR	Finalizador 1 para placa de 96 poços	2 x 5 x 0,25 mL (liof.)
52708	Finalizador 2 para placa de 96 poços	50 mL
52709	Tampão de Diluição para placa de 96 poços	100 mL
52057/BR	Placa de filtro de 96 poços	2 x 5 unidades
52058/BR	Placa de coleta de 96 poços	2 x 10 unidades
52059/BR	Selos adesivos perfuráveis para placas de 96 poços	2 x 5 unidades
	Acessórios	
15060	Suporte para pré-filtro UHPLC	1 pc
15061	Pré-filtro UHPLC	5 pcs
	Calibrador e controles Chromsystems para Vitaminas B1 e B6 em sangue total	
52003	Padrão de calibração em sangue total	5 x 1,0 mL (liof.)
0164	Controle Bi nível em sangue total (I + II)	2 x 5 x 2,0 mL (liof.)
0165	Controle em sangue total Nível I	5 x 2,0 mL (liof.)
0167	Controle em sangue total Nível II	5 x 2,0 mL (liof.)

2 Introdução

2.1 Informações Básicas

As vitaminas B desempenham um papel essencial em algumas vias metabólicas básicas. São junto outras vitaminas hidrossolúveis armazenadas em baixa quantidade no organismo, e é por isso que um fornecimento por suplementação ou pela dieta é essencial para evitar sintomas de deficiência.

Vitamina B1

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

A Tiamina, em sua maioria, está localizada nos eritrócitos onde pode ser encontrada na sua forma ativa chamada de Pirofosfato de Tiamina (TPP)

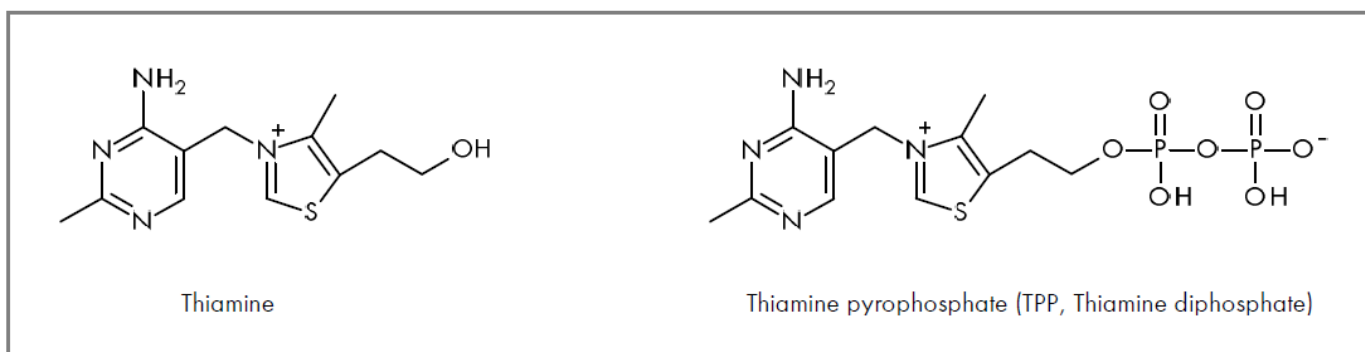


Figura 1: Vitamina B1

A vitamina B1 é sintetizada naturalmente por uma variedade de plantas e microrganismos, mas para a maioria dos animais ela é essencial. A Tiamina é absorvida pelo intestino delgado tanto por difusão passiva quanto por transporte ativo. Uma posterior fosforilação origina a coenzima mais importante fisiologicamente, a tiamina pirofosfato (TPP). A Tiamina é excretada pelos rins após sua desfosforilação a forma livre ou como um conjugado de éster sulfato.

A TPP é um cofator essencial em diversos complexos enzimáticos envolvidos no metabolismo de carboidratos e aminoácidos, produção de energia em adenosina trifosfato (ATP), síntese de moléculas celulares essenciais e neurotransmissores e controle de estresse oxidativo, entre outros. Também tem um papel crucial na saúde cognitiva e neurológica.

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 acidose láctica e cetoacidúria de cadeia ramificada. Outras doenças por deficiência de vitamina B1 são a encefalopatia de Wernicke, síndrome de Korsakov e várias formas da paralisia de Landry.

Outro grupo de alto risco para deficiência de tiamina são pessoas que começaram uma nutrição normal após um período de fome ou desnutrição. Elas correm o risco de desenvolver síndrome de realimentação, um desequilíbrio metabólico grave caracterizado por distúrbios homeostáticos de eletrólitos e fluidos depois do começo do suporte nutricional. A alta demanda de TPP durante a administração de carboidratos na fase de realimentação não consegue

ser suprida devido aos depósitos insuficientes resultando em aumento de lactato e diminuição da produção de energia nas células.

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

Vitamina B6

O termo vitamina B6 (Figura 2) engloba três derivados da piridina de ocorrência natural: piridoxina, piridoxamina e piridoxal assim como seus ésteres 5'fosfato, piridina-5'fosfato, piridoxamina-5'fosfato e piridoxal-5'fosfato (PLP). O piridoxal-5'fosfato é a forma ativa da coenzima e é o principal composto das variedades listadas abaixo.

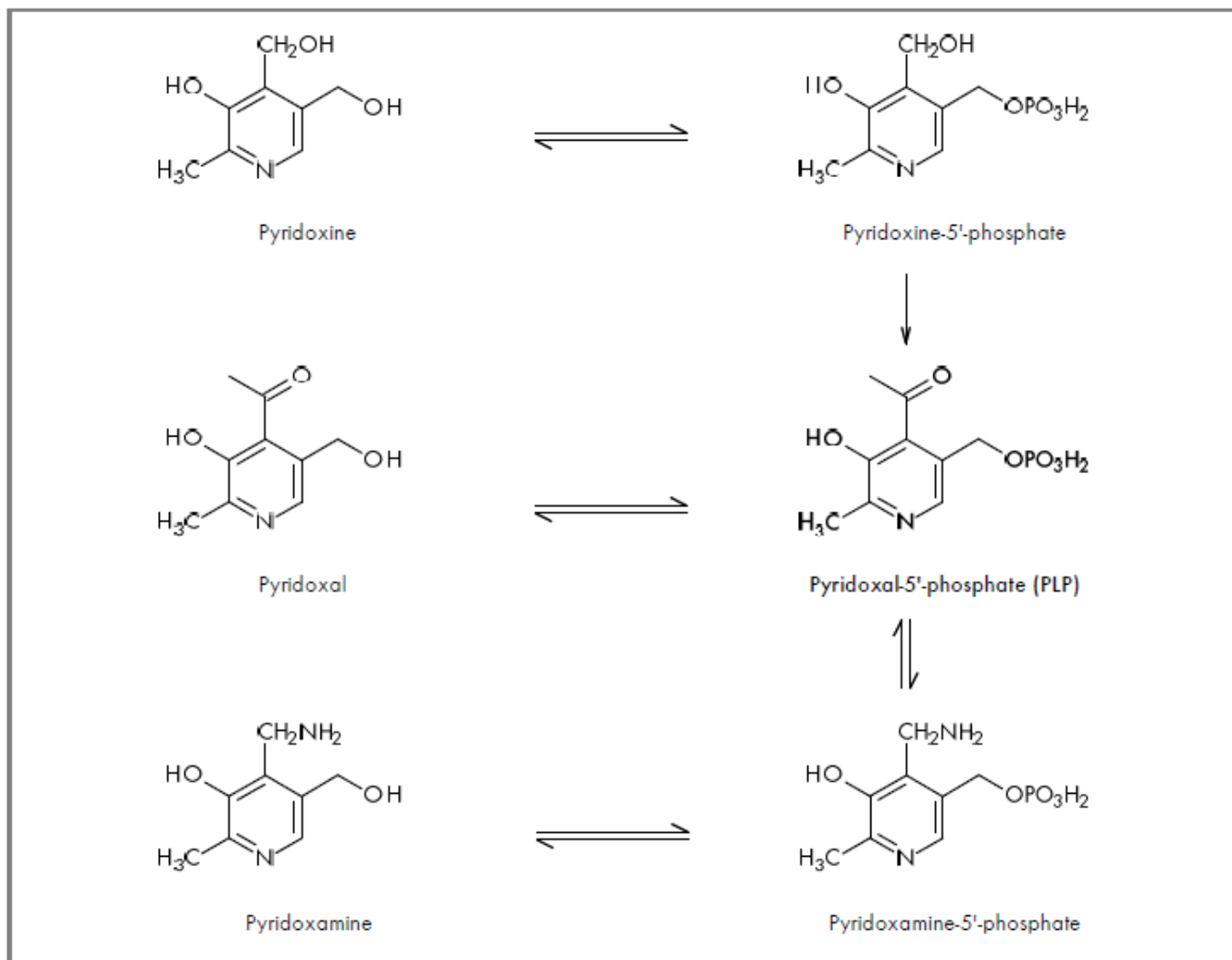


Figura 2: O grupo da Vitamina B6 (modificado após [1])

Os ésteres 5'fosfato de piridoxina, piridoxal e piridoxamina são consumidos a partir dos alimentos, transformados em vitaminas livres no intestino pela fosfatase alcalina, e após a absorção são ativadas pela fosforilação dependente de ATP. Nas células, oxidases dependentes de vitamina B2 oxidam a piridoxina-5'fosfato e a piridoxamina-5'fosfato até PLP. Após uma oxidação dependente de FAD pela aldeído oxidase no fígado, o principal produto de excreção é o ácido piridóxico.

O piridoxal-5'-fosfato é um cofator em muitas reações enzimáticas no metabolismo do corpo, em particular na formação de serotonina no cérebro e de nicotinamida a partir do triptofano. Devido o seu importante papel no metabolismo dos aminoácidos, a deficiência de Vitamina B6 acarreta o aumento na excreção de metabólitos de aminoácidos.

Os sintomas da deficiência de Vitamina B6 são alterações de pele, tais como descamação ou hiperpigmentação assim como irritabilidade e depressão. Pelo envolvimento direto da Vitamina B6 na conversão do aminoácido tóxico homocisteína em cisteína, a deficiência de Vitamina B6 eleva os níveis de homocisteína e aumenta de forma drástica o risco de aterosclerose. A absorção intestinal de ferro também é limitada.

Deficiência da Vitamina B1 e B6

Nossa dieta moderna difere da dieta evolucionária, que basicamente consistia no consumo de vegetais, frutas e sementes, junto com pequenas quantidades de peixes e carnes. Uma nutrição rica em energia, facilmente digerível e pobre em micronutrientes leva a uma deficiência vitamínica, inclusive em sociedades desenvolvidas e está relacionada com obesidade, doenças cardiovasculares e demência [7]. Uma avaliação do estado da vitamina deve ser considerada em caso de dietas não balanceadas.

Também, certas doenças estão associadas com a deficiência da vitamina. Pacientes com diabetes mellitus tipo 2 são frequentemente deficientes em vitaminas B1 e B6. Particularmente no caso de nefropatia incipiente, alterações significativas no metabolismo da vitamina B6 e baixa concentração de PLP no plasma podem ser detectadas [10].

Pessoas com alcoolismo, pacientes em diálise renal, idosos, grávidas, assim como pacientes em pós cirúrgicos estão em um alto risco de ter deficiência de vitamina B1 e B6. Distúrbios na absorção, ex: em doenças inflamatórias intestinais, defeitos genéticos que causam comprometimento de absorção de tiamina pelas células (ex: Síndrome de Roger) ou procedimentos cirúrgicos como cirurgia bariátrica também levam a um fornecimento reduzido de nutrientes importantes [3, 11].

Alguns medicamentos, ex: agentes quimioterapêuticos, diuréticos, isoniazida e metformina interferem no metabolismo da vitamina B e podem contribuir para a deficiência [3, 12].

Excesso de Vitamina B1 e B6

Quantidades em excesso da vitamina B que é hidrossolúvel são excretadas na urina. Nenhuma toxicidade no aumento de vitamina B1 tem sido relatada, além de reações anafiláticas devido à administração endovenosa. Porém, sintomas e sinais de overdose de vitamina B1 podem incluir enjoo, letargia, ataxia e diminuição da motilidade gastrointestinal [13, 14]. Altas doses orais de suplementação de vitamina B6 podem causar neuropatia sensorial com ataxia ou arreflexia, comprometimento cutâneo e da sensação de profundidade e lesões dermatológicas [3].

Pacientes com hipofosfatasia, uma doença rara inata de metabolismo ósseo e mineral, têm altos níveis de PLP que são pelo menos 5 vezes mais altos do que em indivíduos saudáveis. Devido à baixa atividade da fosfatase alcalina tecidual (TNSALP), há uma acumulação extracelular de três substratos-TNSALP: PLP, pirofosfato inorgânico (PPi) e fosfoetanolamina (PEA) [15].

2.2 Princípio do Kit

Este kit de reagentes da Chromsystems permite a determinação confiável e rápida das formas fisiologicamente ativas das Vitaminas B1 e B6, tiamina pirofosfato e piridoxal-5'-fosfato via cromatografia líquida de ultra performance (UHPLC) em uma única corrida, com a mesma preparação de amostra e sem derivatização pós-coluna. A amostra derivatizada é analisada utilizando detector de fluorescência com comprimento de onda variável. Um gradiente binário garante uma separação confiável dos analitos.

O uso de dois padrões internos garante alta precisão e segurança na quantificação dos analitos.

O preparo de amostras é feito completamente automatizado em uma placa de 96 poços; assim, o processamento de até 96 amostras é possível em menos de 2 horas.

2.3 Uso específico

O Kit de reagentes para a análise automatizada por UHPLC de Vitamina B1 e Vitamina B6 em sangue total é uma ferramenta de diagnóstico in vitro que deve ser utilizado em laboratórios clínicos para a detecção quantitativa das formas fisiologicamente ativas de Vitamina B1 (Tiamina pirofosfato, TPP) e Vitamina B6 (piridoxal-5'-fosfato, PLP) em amostras de sangue total humano via cromatografia líquida de ultra performance (UHPLC). Trata-se de um teste para pacientes com suspeita de deficiência de Vitamina B1 ou Vitamina B6.

2.4 Limitações Clínicas

Não há valores de referência universalmente aplicáveis para tiamina pirofosfato e piridoxal 5'-fosfato. Resultados obtidos usam diferentes métodos de ensaio e não podem ser comparados. Laboratórios devem indicar o método usado pela análise para ter uma interpretação correta dos resultados.

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

Valores de piridoxal 5'-fosfato acima de 1000 ug/L não podem ser corretamente quantificados em sangue total. Esses valores podem ocorrer em uma administração muito alta de piridoxina.

3 Sistema UHPLC

Atenção:

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

3.1 Equipamentos requeridos adicionalmente

A determinação de vitamina B1 e vitamina B6 por UHPLC em sangue total requer os seguintes equipamentos adicionais que não estão no kit de reagentes:

Equipamentos laboratoriais para análise por UHPLC:

- Sistema UHPLC binário de alta pressão em gradiente;
- Autosampler;
- Detector fluorescente (programável)

Equipamentos laboratoriais para o preparo de amostra:

- Equipamento de manipulação de líquidos com:
 - Agitador para placa de 96 poços;
 - Centrífuga com rotor de placa de 96 poços (velocidade mínima de 2000 x g)
 - Incubador de placa de 96 poços
 - Detecção de coágulo

3.2 Princípios do UHPLC

A particularidade da Cromatografia Líquida de Ultra Performance (UHPLC) é a utilização de pequenas e numerosas partículas do material no empacotamento da coluna. Isso melhora significativamente a resolução de separação analítica e acelera o processo cromatográfico.

Análises em tempos reduzidos aumentam substancialmente a produtividade de amostras, além de promover a redução significativa do consumo de solvente da fase móvel.

No entanto, como o uso de numerosas e pequenas partículas aumentam significativamente a pressão de operação do sistema, colunas UHPLC não podem ser utilizadas em combinação com unidades de HPLC. Sistemas especiais com pressões altamente estáveis são necessários. A coluna utilizada nesse kit UHPLC gera uma contrapressão de aproximadamente 450 bar. O sistema UHPLC deve ser capaz de operar nesta faixa de pressão como um mínimo.

3.3 Parâmetros do equipamento

Para a análise de Vitamina B1 e Vitamina B6 em sangue total são requeridos um sistema UHPLC com bomba binária, injetor e um detector de fluorescência programável. Para evitar alterações na composição da fase móvel, elas devem ser mantidas tampadas mesmo durante o funcionamento.

Ajustes do instrumento:

Amostrador (Sampler):

Volume de injeção 2,5 – 5 µL

Tempo de corrida analítica de 3 minutos

Compartimento deve ser protegido da luz.

Temperatura da coluna:

Temperatura ambiente

Detector fluorescência: Início: EX 320 nm, EM 415 nm
 Após aprox. 1,6 minuto alterar para: EX 367 nm, EM 435 nm
 Solução de limpeza da agulha do injetor: Água/metanol = 95/5

Perfil gradiente

O perfil de gradiente mostrado abaixo e o exemplo de cromatograma no capítulo 7.2 é projetado como base para otimização. Devido às diferenças de volume morto dos sistemas UHPLC individuais, o seguinte perfil de gradiente pode precisar de modificações.

Tabela 1: Perfil de gradiente (fluxo de 0,7 mL/min)

Tempo [min]	Fase Móvel A	Fase Móvel B
0 min	100 %	0 %
0,86 min	100 %	0 %
0,87 min	30 %	70 %
1,29 min	30%	70 %
1,30 min	0 %	100 %
2,50 min	0 %	100 %
2,51 min	100 %	0 %
3,00 min	100 %	0 %

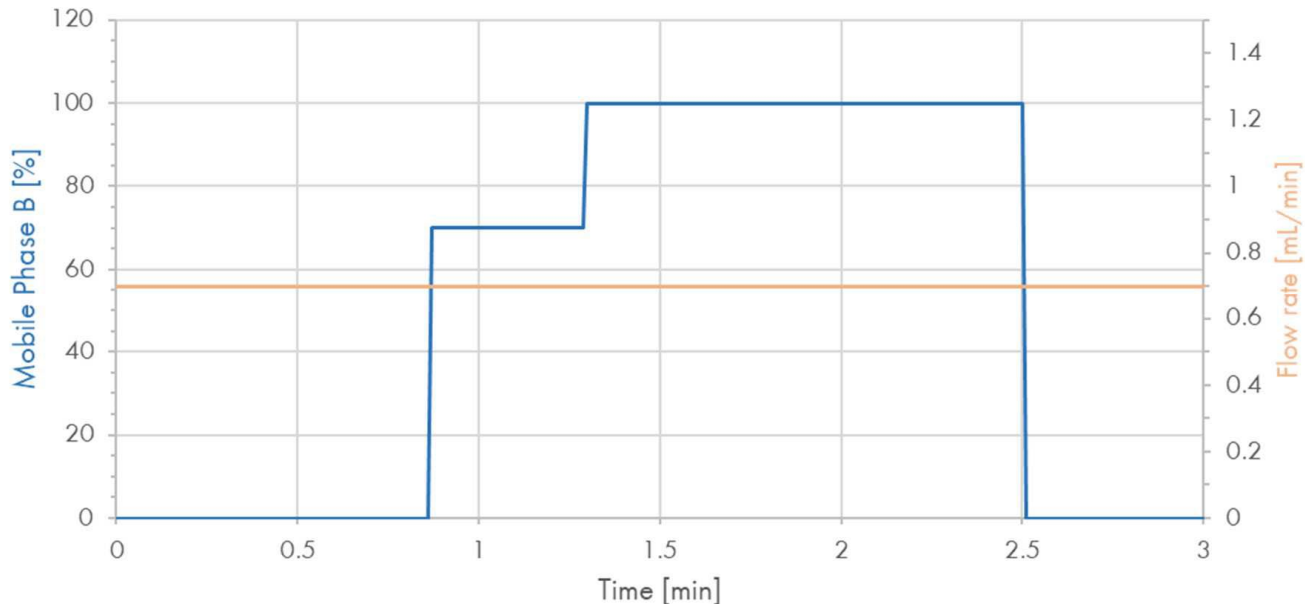


Figura 3 Diagrama do perfil gradiente

3.4 Coluna UHPLC

A coluna UHPLC para análise de vitamina B₁/B₆ é fornecida equilibrada e testada, e está pronta para o uso. Ela não deve ser lavada com nenhuma outra solução. A contrapressão de uma coluna nova na razão de fluxo de 0,7 mL/min é de cerca

de 290 (\pm 40) bar, valor que pode elevar com a idade e/ou uso da coluna. Enquanto as separações estiverem satisfatórias, a contrapressão elevada não tem importância. Para prolongar o tempo de vida da coluna, a coluna deve ser lavada após o final de cada sequência com aproximadamente 10 mL de Fase Móvel A. Este procedimento pode ser realizado overnight com um método de shutdown. Para este procedimento de lavagem, um método é programado com um fluxo de aproximadamente 0,025 mL/min usando 100% de Fase Móvel A, que é iniciado no fim de uma sequência. Além disso, um pré-filtro (artigos 15061 e 15060) pode ser utilizado. No caso de uma contrapressão muito alta da coluna ou deterioração da separação cromatográfica, troque o pré-filtro.

Nota:

Nós recomendamos o uso de um pré-filtro (Pré-filtro 0,5 μ m, artigo no. 15061) para aumentar a vida útil da coluna.

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

3.5 Ligar o Sistema

Antes de iniciar uma corrida, prepare o sistema UHPLC da seguinte forma:

1. Lave o sistema com aproximadamente 15 mL de Fase Móvel A antes de instalar a coluna de UHPLC;
2. Instalar a coluna e equilibrar o sistema com um fluxo de 0,7 mL/min por aproximadamente 10 min com 100% da Fase Móvel A, até que a linha de base esteja estabilizada;
3. Injetar 2,5 μ L de água grau HPLC uma vez com o gradiente e defina os tempos de mudança de comprimento de onda como indicados acima;
4. E em seguida o calibrador preparado diversas vezes até que os tempos de retenção e as áreas/alturas dos picos sejam consistentes;
5. Avalie se os analitos e padrões internos aparecem no cromatograma e compare com o cromatograma mostrado no capítulo 7.2;
6. Se o gradiente for adequado para o seu sistema, inicie então a corrida analítica.

Para o uso correto do seu sistema UHPLC, leia o manual de instrução do seu sistema UHPLC. Se tiver alguma dúvida, pergunte ao fabricante. Treinamento do fabricante pode ser requerido.

3.6 Shut down

Para períodos de *shut down* de até 1 dia, a fase móvel A deve ser recirculada numa razão de fluxo baixa (aproximadamente 0,05 a 0,2 mL/min) para prevenir a cristalização de sais nas juntas da bomba. A coluna UHPLC 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 em Fase Móvel A (**a temperatura ambiente**). A coluna deve ser substituída por uma união e o sistema UHPLC limpo com cerca de 50 mL de H₂O/metanol (90/10 vol/vol).

4 Separação cromatográfica

A tabela a seguir mostra os tempos de retenção dos analitos e padrões internos no gradiente mostrado no capítulo 3.3:

Tabela 2: Tempos de retenção

Analito	Tempo de retenção (aprox.)
Padrão Interno 1 (PLP)	0,5 min
Vitamina B ₆ (PLP)	1,0 min
Vitamina B ₁ (TPP)	1,9 min
Padrão Interno 2 (TPP)	2,6 min

A separação cromatográfica leva cerca de 3 min. Pequenas variações nos tempos de retenção podem ser devido a, por exemplo, variações de volumes mortos dos sistemas, mudanças de temperatura, mudanças ou pequenas pulsações na bomba. Se um novo lote de fase móvel for utilizado ou se a coluna for substituída, os tempos de retenção podem variar suavemente. Portanto, use um cromatograma de calibração para determinar os valores.

5 Preparo da amostra

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

Cuidado

Apesar da adição de anticoagulantes (EDTA ou heparina), amostras de sangue total podem conter coágulos. A presença de coágulos pode alterar o volume de pipetagem.

Quando dispositivos automatizados de manipulação de líquidos são usados, alguns resultados podem ser falsos se o sistema não tiver características de **detecção de coágulo** adequadas. Sistemas configurados com monitoramento de pressão têm demonstrado vantagens práticas com relação a sistemas baseados em medição de condutividade. Contate o fabricante do sistema, uma vez que a Chromsystems não pode assumir a responsabilidade pela adequabilidade do sistema. O kit de reagentes da Chromsystems não produz resultados confiáveis ao menos que haja garantia de que o volume correto de amostra tenha sido utilizado.

Assegure-se que com uma sequência, o lote utilizado dos reagentes (incluindo o padrão interno) para o preparo das amostras assim como o lote do calibrador e controle não sejam mudados. Se necessário, junte a quantidade necessária de padrão interno de diversos vials.

5.1 Coleta e armazenamento das amostras de pacientes

Utilize sangue total para a análise de tiamina pirofosfato e piridoxal 5'-fosfato.

Notas importantes:

- Para a dosagem de PLP, amostras de sangue devem ser colhidas pela manhã em jejum, antes de qualquer medicação e na ausência de consumo recente de álcool [16];
- Em certas doenças, como a hipofosfatase, um nível alterado de vitamina B6 é indicativo. Nesses casos, o uso de suplementação de vitamina B6 deve ser evitada por pelo menos 2 semanas antes da coleta de sangue, pois níveis elevados de PLP podem ocorrer devido à suplementação [15];
- Altos níveis de ácido ascórbico (vitamina C) podem interferir com a análise de tiamina pirofosfato e levar a falsos resultados elevados (ver capítulo 11).

Ambos EDTA (K3-EDTA e K2-EDTA) e heparina (lítio, sódio e heparina de amônio) são usados como anticoagulantes. Sangue total com EDTA é recomendado porque o sangue total com heparina é muito mais suscetível à ação enzimática que pode levar a resultados falso positivos ou negativos e é mais propenso a coagulação, que pode reduzir a precisão da pipetagem.

Estabilidade da amostra

A temperatura de armazenamento/transporte é o fator principal que pode afetar a estabilidade da amostra. Outros fatores identificados em testes preliminares incluem o tipo de anticoagulante (EDTA ou heparina) e diferenças entre doadores e amostras de sangue, provavelmente devido aos estados enzimáticos diferentes. Diferenças de estabilidade entre os tipos de EDTA (K2-EDTA, K3-EDTA) ou tipos de heparina (heparina lítica, sódica ou de amônio) não têm sido identificadas. Estabilidade de TPP e PLP foi determinada em sangue K3-EDTA (representando ambos os tipos de sangue EDTA) e em sangue heparina lítica (representando todos os três tipos de sangue com heparina) de cinco doadores diferentes. Desvios de $\leq 15\%$ do referencial nas concentrações do analito foram aceitos.

Tabela 3: Estabilidade do analito em amostras de pacientes

TPP (vitamina B1)	PLP (vitamina B6)
-------------------	-------------------

Temperatura de armazenamento	Sangue total EDTA	Sangue total com heparina	Sangue total EDTA	Sangue total com heparina
+20 a +25°C	24 horas	24 horas	24 horas	24 horas
+2 a +8°C	7 dias	7 dias	4 semanas	4 semanas
Abaixo de -18°C	3 meses	3 meses	3 meses	3 meses
Ciclos de congelamento/descongelamento	1 ciclo	1 ciclo	1 ciclo	1 ciclo

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

Nota:

É da responsabilidade de cada laboratório usar todas as referências disponíveis e/ou seus próprios estudos para determinar os critérios específicos do laboratório.

5.2 Reconstituição dos calibradores

O Padrão de Calibração em Sangue Total da Chromsystems (artigo 52003) destina-se para a calibração do seu sistema de análise. O calibrador liofilizado é um calibrador pontual. A matriz dele é sangue total humano. Após a reconstituição, é preparado da mesma maneira que uma amostra de paciente e é analisado sobre as condições de rotina análogas ao respectivo procedimento do teste.

Antes do preparo de amostras, reconstitua o calibrador em sangue total (artigo 52003) como a seguir:

1. Pipete 1,0 mL de água destilada no frasco original
2. Reconstitua por 10 a 15 min entre +20 a +25°C, mexa repetidamente

Verifique se o conteúdo do frasco está homogêneo. Se ainda houver substâncias visivelmente não dissolvidas, aumente o tempo de reconstituição.

Os níveis do calibrador são rastreáveis aos pesos iniciais das substâncias puras. As concentrações do analito no calibrador são dependentes de lote. Os níveis individuais são dados na bula do calibrador.

Atenção: Este produto foi fabricado a partir de *pool* de plasma humano ou sangue total humano testado, fornecendo resultados negativos para infecções pelo vírus da imunodeficiência adquirida (HIV), vírus da hepatite B (HBV), vírus da hepatite C (HCV) e pela bactéria *Treponema pallidum*. Ainda assim, um risco potencial de infecção não pode ser totalmente excluído. Considere todos os produtos contendo material de fonte humana como potencialmente infeccioso e tome o mesmo cuidado ao manipulá-lo do que ao destinado a amostras de pacientes potencialmente infecciosas.

Estabilidade do calibrador após reconstituição:

O calibrador dissolvido em água possui a seguinte estabilidade, mas não além da data indicada no rótulo:

Tabela 4 Estabilidade do calibrador em sangue total (artigo no. 52003) após reconstituição

Temperatura de armazenamento	Estabilidade	Outras condições de armazenamento
+20 a +25°C	24 horas	Protegidos da luz, bem fechados
+2 a +8°C	5 dias	Protegidos da luz, bem fechados
Abaixo de -18°C	3 meses	Protegidos da luz, bem fechados
Ciclos de congelamento/descongelamento	3 ciclos	-

Para evitar ciclos desnecessários de congelamento/descongelamento, alíquotar calibradores antes do congelamento

5.3 Reconstituição dos controles

Os controles em sangue total da Chromsystems (artigos no. 0165, 0167) destinam-se a monitorar a acurácia e precisão de cada sequência analítica. Eles estão disponíveis em dois diferentes níveis de concentração. Os controles liofilizados têm como matriz sangue total humano. Após a reconstituição, devem ser preparados da mesma maneira como amostra de paciente e são analisados dentro da rotina em condições análogas ao procedimento do teste respectivo.

Antes do preparo de amostras, reconstitua os controles em sangue total como a seguir:

1. Pipete 2,0 mL de água destilada no frasco original
2. Reconstitua por 10 a 15 min entre +20 a +25°C, mexa repetidamente

Verifique se o conteúdo do frasco está homogêneo. Se ainda houver substâncias visivelmente não dissolvidas, aumente o tempo de reconstituição.

Os níveis dos controles são rastreáveis aos pesos iniciais das substâncias puras. As concentrações do analito nos controles são dependentes de lote. Os níveis individuais são dados na bula do controle.

Atenção: Este produto foi fabricado a partir de *pool* de plasma humano ou sangue total humano testado, fornecendo resultados negativos para infecções pelo vírus da imunodeficiência adquirida (HIV), vírus da hepatite B (HBV), vírus da hepatite C (HCV) e pela bactéria *Treponema pallidum*. Ainda assim, um risco potencial de infecção não pode ser totalmente excluído. Considere todos os produtos contendo material de fonte humana como potencialmente infeccioso e tome o mesmo cuidado ao manipulá-lo do que ao destinado a amostras de pacientes potencialmente infecciosas.

Estabilidade do controle reconstituído:

O calibrador dissolvido em água possui a seguinte estabilidade, mas não além da data indicada no rótulo:

Tabela 5 Estabilidade dos controles em sangue total (artigos no. 0165, 0167) após reconstituição

Temperatura de armazenamento	Estabilidade	Outras condições de armazenamento
+20 a +25°C	24 horas	Protegidos da luz, bem fechados
+2 a +8°C	5 dias	Protegidos da luz, bem fechados
Abaixo de -18°C	3 meses	Protegidos da luz, bem fechados
Ciclos de congelamento/ descongelamento	3 ciclos	-

Para evitar ciclos de congelamento/ descongelamento desnecessários, alíquotar controles antes do congelamento.

5.4 Preparo da solução finalizadora

Antes da preparação da amostra (ver capítulo 5.5) prepare a solução finalizadora da seguinte maneira:

1. Primeiro reconstitua a garrafa do Finalizador 1 (artigo 52707) com exatamente 250 µL de água destilada. Mantida refrigerada (+2 a +8°C), a estabilidade desta solução é de 4 semanas.
2. Depois disso, adicione exatamente 5,0 mL do Finalizador 2 (artigo 52708) e misture (proporção 1:20).
3. Para o preparo de amostras, 50 µL desta mistura (=solução finalizadora) são usados por amostras (ver cap. 5.5 e 5.6). A solução é suficiente para exatamente uma placa de 96 poços.

Nota:

A solução finalizadora deve ser preparada **imediatamente antes do preparo de amostra**. Protegida da luz e refrigerada (+2 a +8°C), a solução finalizadora é estável por até 2 dias.

Se a solução for aberta e não refrigerada no dispositivo de manuseio de Líquidos, ela é estável durante a duração de uma sequência de programa. Se várias placas forem preparadas em sequência, a solução finalizadora deverá ser preparada fresca para cada placa.

5.5 Procedimento de preparo das amostras

Importante:

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

Antes do preparo de amostra, deixe reagentes/calibradores/controles/amostras que são armazenados congelados ou refrigerados a temperatura ambiente e agite repetidamente.

Preparando o sistema de pipetagem

Execute as medições recomendadas pelo fabricante antes de iniciar o preparo automatizado de amostras. Dependendo do sistema usado, o sistema de distribuição pode precisar ser lavado ou passar por procedimentos de manutenção diária.

Importante:

Ao usar o Reagente de Extração (artigo 52705), certifique-se de trabalhar de modo limpo e cuidadoso. Para evitar danos aos componentes de plástico do sistema de pipetagem (ex. carreador), evite contato direto com o reagente. Qualquer respingo na superfície no sistema de pipetagem deve ser removido imediatamente.

Preparo de amostras automatizado com sistema de pipetagem

Para preparar amostras de pacientes, controles e calibradores para análise, trabalhe as etapas a seguir na ordem descrita:

Importante:

Se forem usadas amostras frescas de sangue, elas deverão ser homogeneizadas imediatamente antes de serem carregadas no dispositivo de pipetagem com o objetivo de garantir uma mistura adequada pelo dispositivo de pipetagem.

1. Pipete 100 µL de sangue total (calibrador, controle, amostras) em uma placa de coleta de 96 poços (artigo no. 52058)
2. Adicione 50 µL do Mix de Padrão Interno (artigo no. 52744)
3. Adicione 150 µL do Reagente de Extração (artigo no.52705)
4. Misture por 4 min (800-1100 rpm*, em órbita de 2 mm)
5. Separe o precipitado por centrifugação (3 min, 2000 x g)
6. Transfira 75 µL do sobrenadante em uma placa filtrante de 96 poços (artigo no. 52057)
7. Adicione 75 µL da Solução de Preparo (artigo no. 52706)
8. Adicione 50 µL da solução finalizadora (ver cap. 5.5)
9. Misture por 30 s (800-1200 rpm*, em órbita de 2 mm)
10. Coloque a placa filtrante de 96 poços em uma placa de coleta de 96 poços (artigo no.52058)
11. Separe o precipitado por centrifugação (2 min, 1500 x g), descarte a placa filtrante de 96 poços
12. Incube a solução obtida a +60°C por 45 min
13. Adicione 100 µL do Tampão de Diluição (artigo no.52709), misture por 180 s (400 rpm, em órbita de 2 mm)
14. Sele a placa com um selo adesivo (artigo no. 52059) e transfira para o autosampler
15. Injete 2,5 – 5 µL do eluato no sistema de UHPLC

Mantenha a ordem de pipetagem!

*Dependendo do agitador, a velocidade pode ter que ser adaptada para evitar derramamento. Verifique antes com uma placa com água se a velocidade é adequada.

Nota adicional:

Certifique-se que a temperatura da solução atinja +60°C. Somente então o preparo da amostra é eficaz.

Manutenção do sistema de pipetagem e shut-downs

Medições especiais para manter o sistema de pipetagem em boas condições de trabalho podem ser requeridas em intervalos regulares e antes e após shut-downs prolongados. Siga as inscrições do fabricante do sistema de pipetagem.

5.6 Estabilidade das amostras preparadas

As amostras preparadas para análise como indicado na seção 5.5 possuem as seguintes estabilidades:

Tabela 6: Estabilidade das amostras preparadas

Temperatura de armazenamento	Estabilidade	Outras condições de armazenamento
+20 a +25°C	1 dia	Na placa de coleta selada com um selo adesivo perfurável (artigo 52059)
+2 a +8°C	7 dias	Na placa de coleta selada com um selo adesivo perfurável (artigo 52059)

Armazenamento de amostras preparadas abaixo de -18°C não é recomendado pela formação de cristais.

5.7 Manuseio de amostras acima da faixa de medição analítica

As amostras de pacientes cujas concentrações estão acima da faixa de medição analítica (veja Apêndice II) devem ser manuseadas da seguinte maneira:

Antes do preparo de amostra, misture volumes iguais da amostra original do paciente com Controle em Sangue Total Nível I (artigo no. 0165). O resultado da análise medido da mistura deve estar dentro da faixa de medição do ensaio.

Quando for calculada a concentração do sangue total após a diluição, a concentração do analito do Controle em Sangue Total Nível I deve ser levada em consideração. Isto é feito usando a seguinte fórmula:

$$\text{Conc, amostra} = 2 \times (\text{valor medido} - 0,5 \times \text{valor alvo do controle de qualidade})$$

6 Controle de Qualidade

Monitore a precisão e acurácia das análises incluindo controles adicionais (artigo no. 0165, 0167) em cada corrida analítica. Se a análise desses controles traz valores fora da faixa indicada no folheto informativo, verifique o sistema. Se a discrepância continua, calibre novamente o sistema.

Monitore a qualidade da separação cromatográfica comparando os tempos de retenção e os formatos dos picos dos analitos e padrões internos com o cromatograma do certificado da coluna ou com o exemplo de cromatograma (capítulo 7.2). Em caso de uma coluna em uso, compare com as corridas analíticas anteriores do mesmo ensaio (ex: durante a inicialização do sistema, capítulo 3.5). Desvios significativos podem ser devido à diminuição da performance do pré-filtro e/ou da coluna analítica. Indicadores comuns podem ser caudas posteriores nos picos.

Para mais informação veja o capítulo 12 Problemas e Soluções.

7 Resultados e avaliação

7.1 Calibração do sistema de análise

Para calibrar o seu sistema de análises e verificar a eficiência da separação do sistema de UHPLC, conduza um número de corridas testes antes de analisar as amostras de pacientes. Use o calibrador em sangue total (artigo 52003) para isso. A concentração do analito no calibrador é dependente do lote. Os níveis exatos são apresentados na bula que acompanha o produto.

As curvas de calibração são feitas calculando a razão entre a área de pico do analito e o padrão interno (ISTD) ou razão da altura do pico no eixo y em relação à concentração do calibrador no eixo x. Em seguida, trace uma curva de calibração através da origem para todos os analitos (calibração pontual).

Selecione o método de padrão interno para calibração no seu sistema de análise e configure a concentração do padrão interno como "1".

7.2 Exemplos de cromatogramas

Os seguintes gráficos fornecem vários exemplos de cromatograma criados usando este método.

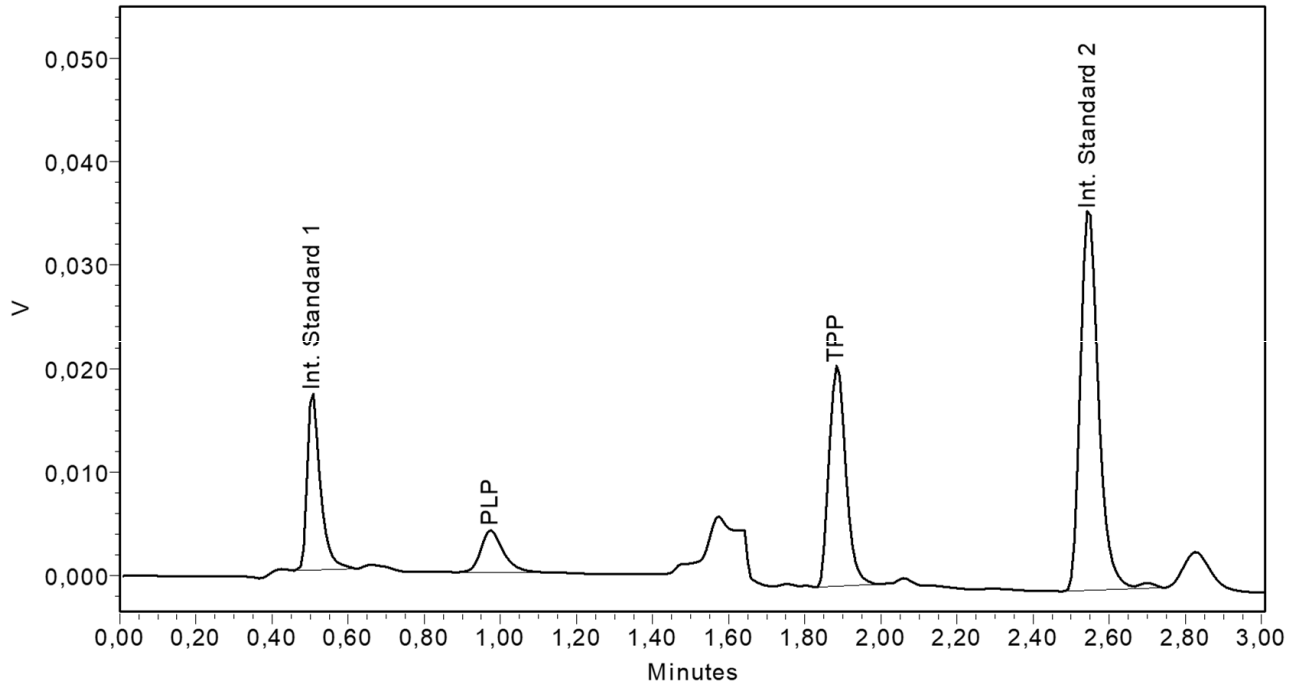


Figura 4 Cromatograma do calibrador em sangue total
Concentração dos analitos: PLP: 17µg/L, TPP: 39µg/L

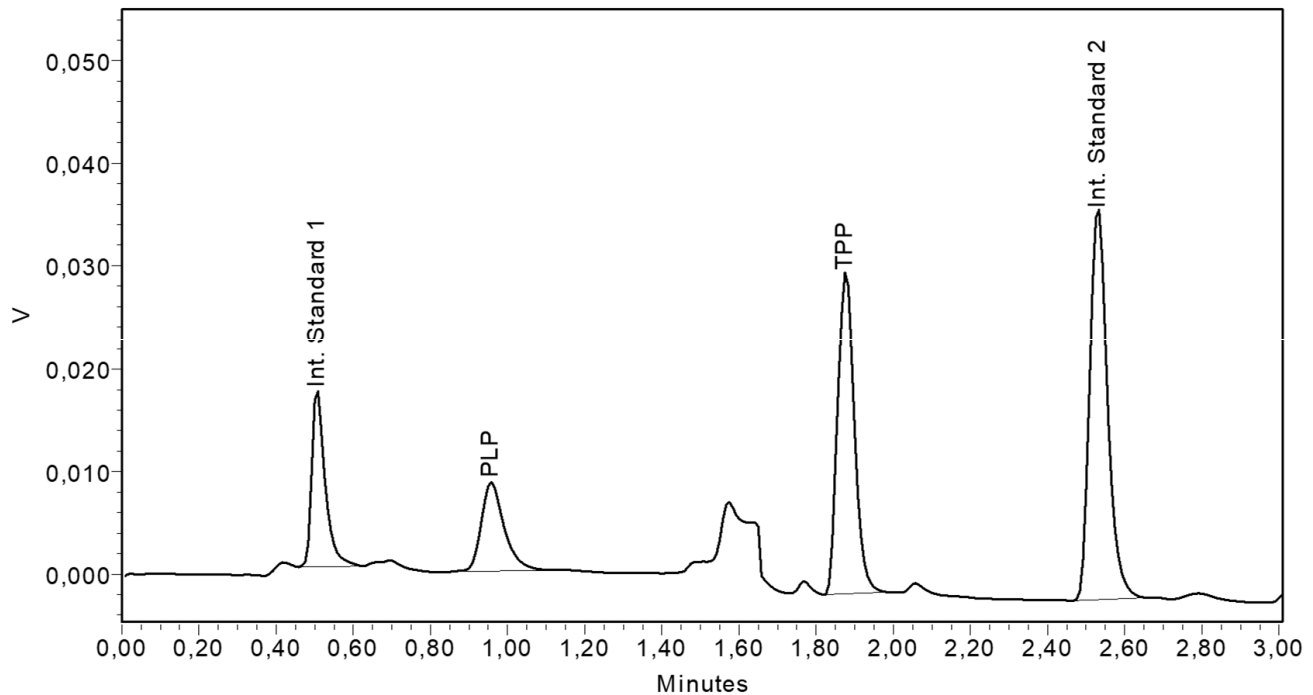


Figura 5 Cromatograma de uma amostra de paciente em sangue total
Concentração dos analitos: PLP: 36µg/L, TPP: 57 µg/L

7.3 Fatores de Conversão

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

Tabela 7: Fatores de conversão

Analito	µg/L para nmol/L	nmol/L para µg/L
Tiamina pirofosfato (TPP)	x 2,357	x 0,4243
Piridoxal-5'-fosfato (PLP)	x 4.046	X 0.2471

7.4 Cálculo Manual

Calibre o sistema de análise de acordo com o capítulo 7.1. Para o cálculo manual, os seguintes dados são necessários:

- Área do pico/ altura da substância A no cromatograma da amostra = $A_{amostra}$
- Área do pico/ altura do padrão interno no cromatograma da amostra = $IS_{amostra}$
- Inclinação da curva de calibração ($A_{calibrador} / IS_{calibrador} / C_{calibrador}$) = a

Calcule a concentração do analito A na amostra $C_{amostra}$ desta forma:

$$C_{amostra} = \frac{(A_{amostra} \frac{1}{IS_{amostra}})}{a}$$

8 Armazenamento e validade dos reagentes

Reagentes não abertos podem ser utilizados até a data de validade estabelecida no rótulo, desde que as condições de estocagem indicadas no rótulo sejam obedecidas. O transporte e armazenamento dos reagentes devem seguir as seguintes condições:

Tabela 8: Temperatura de transporte do kit de reagentes

Produto	Temperatura de transporte
Kit de reagentes (artigo 52952/UHPLC/F)	+18 a +30°C
Todos os outros componentes listados no capítulo 1	Ambiente

Após o transporte, desembale imediatamente os reagentes e armazene individualmente como descrito abaixo:

Tabela 9: Condições de armazenamento dos reagentes, calibradores e controles

Produto	Armazenamento
Fase móvel A (para UHPLC, REF 52911)	+18 a +30°C
Fase móvel B (para UHPLC, REF 52922)	+18 a +30°C
Mix de Padrão Interno (artigo 52744)	+2 a +8°C
Reagente de Extração (artigo 52705)	+18 a +30°C
Solução de Preparo (artigo 52706)	+18 a +30°C
Finalizador 1 (artigo 52707)	+18 a +30°C
Finalizador 2 (artigo 52708)	+2 a +8°C
Tampão de Diluição (52709)	+18 a +30°C
Calibradores em Sangue Total (artigo 52003)	abaixo de -18°C
Controles em Sangue Total (artigos 0164, 0165, 0167)	abaixo de -18°C

Os reagentes devem ser adequadamente fechados e armazenados nas condições estabelecidas imediatamente após o uso. Desde que nada além tenha sido estipulado, a estabilidade será de 1 ano após a data da abertura, mas, não excederá o prazo de validade. Detalhes da estabilidade de calibradores, controles e Finalizador 1 reconstituídos são informados nos capítulos 5.2 a 5.4.

A coluna de UHPLC e os materiais de laboratórios não listados aqui podem ser armazenados entre +18 a +30°C.

A vida útil da coluna analítica e do pré-filtro depende das condições individuais em que eles são utilizados (ex: frequência de uso, número de amostras, tipo de amostras, volume de injeção). Considere medidas de controle de qualidade (capítulo 6) para identificar diminuição no desempenho cromatográfico.

9 Descarte de resíduos

Resíduos perigosos

As Fases Móveis (artigos 52911 e 52922) contêm solventes orgânicos. Descarte os resíduos dos produtos em um recipiente para solventes livres de halogênio de acordo com os regulamentos locais.

O Reagente de Extração (artigo 52705) contém um ácido forte, a Solução de Preparo (artigo 52706), uma base forte. Neutralize os resíduos do produto e descarte em um recipiente para soluções salinas.

Resíduos de amostras de pacientes e amostras preparadas, assim como controles (artigos 0165, 0167) e calibradores (artigo 52003) e os consumíveis do laboratório devem ser coletados e descartados como lixo potencialmente infeccioso.

As soluções mencionadas não devem ser descartadas junto com o lixo doméstico. Não circule no abastecimento principal de água. Descarte de acordo com as diretrizes 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

O mix de Padrão Interno (artigo 52744), Finalizador 1 (artigo 52707), Finalizador 2 (artigo 52708), Tampão de Diluição (artigo 52709), e consumíveis de laboratórios não contaminados não são classificados como perigosos. Descarte de acordo com as diretrizes 2008/98/EC e de acordo com as exigências locais e nacionais.

10 Valores de referência

Nota:

Os valores de referência listados abaixo representam níveis encontrados em uma proporção de populações saudáveis (ex: de 95% de doadores de sangue investigados). Consequentemente, eles podem ou não estar alinhados com níveis relevantes de decisão clínica ou os valores de cut-off relativos à finalidade específica deste kit. Para dados de desempenho clínico, inclua os valores esperados em pessoas afetadas e não afetadas, ver Apêndice IV.

As faixas de referência apresentadas são guias baseados na literatura. Eles podem se diferenciar de outros dados publicados. Como os níveis variam dependendo da população de pacientes e dos métodos de medição, determine faixas específicas para o seu laboratório. Ao determinar as faixas, tenha certeza de que você esteja cumprindo as exigências nacionais locais.

Amostras de sangue em 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 colhidas no estudo de G. Steen e M. van der Zwaal [17]. Um questionário foi aplicado para verificar critérios de exclusão: uso de suplementação de vitaminas ou ferro, uso de anticoagulantes, diabetes, gravidez e uso de contraceptivos orais. Os testes foram feitos usando ensaio de fluorescência UHPLC após a derivatização.

Tabela 10: Faixas de referência

	Tiamina pirofosfato (TPP) sangue total	Piridoxal 5'-fosfato (PLP) sangue total
Valores de referência	33,1-60,7 µg/L 78-143 nmol/L	12,6-45,2 µg/L 51-183 nmol/L
Número de resultados obtidos	247	246
Método estatístico do valor de referência	Média ±2x desvio padrão	Remoção dos resultados acima e abaixo de 2,5%
Correlação entre os resultados obtidos e os anos de idade	Nenhuma	Diminuição com aumento de idade

		21-30 anos: 138 nmol/L (homens) e 113 nmol/L (mulheres); >70 anos: 79 nmol/L (homens) e 84 nmol/L (mulheres) Efeito fraco: nenhuma relação à idade foi incluída aos valores de referência
Correlação entre os resultados obtidos e gênero	Nenhuma	Nenhuma
Fonte	[17]	[17]

11 Testes de Interferência

Compostos relacionados à estrutura e medicamentos foram adicionados em amostras de sangue total, preparados junto com as amostras antes da derivatização ou água antes da derivatização nas concentrações mais altas esperadas (ver tabela abaixo) e testados para interferências.

Além disso, condições diferentes das amostras foram simuladas e verificadas quanto à sua influência no teste. Diversos sistemas de amostras também foram analisados quanto a interferência.

Substância	
Compostos relacionados à estrutura	Concentrações no teste em mg/L
Isopiridoxal	30,6
Piridoxal	2,80
Piridoxamina	0,400
Piridoxamina 5'-fosfato	5,00
Tiamina	1,70
Tiamina monofosfato (TMP)	1,80
Tiamina trifosfato (TTP)	4,39
Medicamentos	Concentrações no teste em mg/L
Acetaminofeno (paracetamol)	156
Acetazolamida	59,9
Acetilcisteína	1663
Ácido acetilsalicílico	652
Aciclovir	3,00
Alopurinol	40,0
Alopurinol (testado como oxipurinol)	20,0
Amicacina	80,2
Amlodipina	0,100
Amoxicilina	75,2
Ampicilina	53,0
Ácido ascórbico	Várias concentrações de até 1044 mg/L
Azatioprina	2,99
Azitromicina	12,0
Bisoprolol	0,300
Captopril	4,99
Carbamazepina	30,0
Carbamazepina-10, 11-epoxida	15,0
Cefradina	2,00
Cloramfenicol	50,1
Clordiazepoxida	9,99
Cimetidina	20,0
Ciprofloxacina	10,0
Claritromicina	20,0
Substância	
Dexametazona	0,601

Diazepam	5,13
Diclofenaco	50,0
Digitoxina	0,00609
Dihidrocodeína	0,993
Disopiramida	10,0
Enalaprilato	0,300
Eritromicina	59,9
Furosemida	59,9
Ganciclovir	2,00
Gentamicina	9,99
Hidroclotiazida	6,02
Ibuprofeno	500
Dinitrato de isosorbida	0,150
Isoniazida	60,0
Itraconazol	8,00
Cetoconazol	1,00
Levofloxacina	18,0
Levotiroxina	1,00
Lidocaína	12,0
Lorazepam	1,00
Metformina	40,0
Metilprednisolona	0,150
Metoclopramida	0,450
Metoprolol	4,99
Ácido micofenólico	10,0
Ácido micofenólico glucuronida	10,0
N-acetilprocainamida	39,9
Nadolol	1,20
N-desmetildiazepam	5,01
Neomicina	0,200
Nifedipina	0,400
Norverapamil	2,00
Omeprazol	6,00
Oxazepam	5,02
Penicilina G	20,0
Penicilina V	20,0
Fenitoína	49,9
Prazosina	0,150
Prednisolona	3,00
Prednisona	0,301
Procainamida	24,0
(±)-Propranolol	2,00
Ranitidina	6,00
Rifampicina	64,3
Risperidona	0,362
Salbutamol/Albuterol	0,399
Ácido salicílico	599
Fluoreto de sódio	2,00
Estreptomicina	10,0
Sulfametoxazol	400
Tramadol	3,00
Triamtereno	8,86
Trimetoprim	40,0
Ácido valpróico	499
Vancomicina	100
Verapamil	2,00

11.1 Interferências detectadas

Acetaminofeno (paracetamol), um medicamento para tratar a febre e dor de leve a moderada, leva a uma falsa dosagem de tiamina pirofosfato (TPP) e piridoxal 5'-fosfato (PLP), pois modifica a linha de base e causa diversos picos interferentes.

Isoniazida, um antimicrobiano, interage com piridoxal 5'-fosfato e leva a uma falsa dosagem baixa de piridoxal 5'-fosfato (PLP).

Piridoxina é geralmente administrada como medicamento junto com a isoniazida. Altos níveis endógenos esperados desta substância não influenciam significativamente o resultado quantitativo, mas piridoxina pode ser convertida em piridoxal 5'-fosfato (PLP) por reações enzimáticas. Portanto, não é uma interferência analítica, porém, farmacocinética.

A presença de ácido ascórbico (vitamina C) causa degradação do sinal tiamina pirofosfato (TPP) assim como a do padrão interno IS2 correspondente. Devido a este último ser afetado em um nível mais elevado, o padrão interno não compensa por inteiro a degradação do analito, levando a falsos resultados altos de tiamina pirofosfato (TPP). Em caso de concentrações de vitamina C > 125 mg/L isto pode afetar a precisão dos resultados do teste em >15%.

As seguintes substâncias não foram observadas como interferentes na injeção primária. Mas eluíram numa injeção subsequente e podem afetar a precisão dos resultados do teste:

- Levofloxacina
- Ácido micofenólico
- Triamtereno

11.2 Nenhuma interferência detectada

Nenhuma interferência calculável ocorreu. Os resultados quantitativos não foram afetados (desvio \leq 15%).

Compostos relacionados à estrutura:

Isopiridoxal, piridoxal*, piridoxamina*, piridoxamina 5'-fosfato*, ácido 4-piridóxico, piridoxina*, piridoxina 5'-fosfato, tiamina*, tiamina monofosfato*, tiamina trifosfato*.

*Estes metabolitos podem ser convertidos cada um em PLP ou TPP por reações enzimáticas. Eles não são interferentes analíticos, porém são interferentes farmacocinéticos.

As seguintes substâncias foram testadas e não formaram picos interferentes e nenhuma interferência calculável ocorreu (desvio \leq 15%).

Medicamentos

Acetazolamida, acetilcisteína, ácido acetilsalicílico, aciclovir, alopurinol, ampicacina, amlopidina, amoxicilina, ampicilina, azatioprina, azitromicina, bisoprolol, captopril, carbamazepina, cefradina, cloranfenicol, clordiazepóxido, cimetidina, ciprofloxacina, claritromicina, dexametasona, diazepam, diclofenaco, digitoxina, digoxina, dihidrocodeína, disopiramida, enalaprilato, eritromicina, furosemida, ganciclovir, gentamicina, hidroclorotiazida, ibuprofeno, dinitrato de isossorbida, itraconazol, cetoconazol, levofloxacina, levotiroxina, lidocaína, lorazepam, metformina HCL (1,1-dimetilbiguanida), meticilina, metilprednisolona, metoclopramida, metoprolol, ácido micofenólico, glicuronídeo de ácido micofenólico, N-acetilprocainamida, nadolo, fluoreto de sódio, N-desmetildiazepam, neomicina, nifedipina, norverapamil, omeprazol, oxazepam, oxipurinol, penicilina G, penicilina V, fenitoína, prazosina, prednisolona, prednisona, procainamida, (\pm)-propranolol, ranitidina, rifampicin, risperidone, salbutamol (albuterol), salicylic acid (2-OH benzoic acid), streptomycin, sulfamethoxazole, tramadol, triamterene, tramethoprim, valproic acid, vancomycin, verapamil.

Análises sem interferências são possíveis com os seguintes estados das amostras:

Hemólise

Amostras de plasma foram enriquecidas com hemoglobina até uma concentração de 5g/L e as concentrações do analito foram comparadas com as amostras no seu estado original:

Não ocorreu nenhuma interferência significativa (desvio \leq 15%).

Ictericia

Amostras de sangue total foram enriquecidas com bilirrubina não conjugada e conjugada (0,4 g/L) e as concentrações do analito foram comparadas com as amostras no seu estado original (desvio \leq 15%).

Os seguintes sistemas de amostras foram testados sem interferência significativa; os resultados quantitativos não foram influenciados (desvio $\leq 15\%$).

Tipo	Fabricante	Artigo	Volume	Descrição	Lotes testados
K3E	Sarstedt	01.1605.001	7,5 mL	S-Monovette® 1,6 mg K3EDTA/mL, spray seco	1093001
K2E	BD	368861	4,0 mL	Vacutainer® 1,8 mg K2EDTA/mL, spray seco	3070432
K2E	Greiner Bio-One	454023	4,0 mL	Vacurette® K2EDTA, spray seco	A1100306Z
LH	Sarstedt	01.1604.001	7,5 mL	S-Monovette® Granulado contend 16 IU/mL Heparina-Li	1093003
NH	BD	367876	5,0 mL	Vacutainer® Granulado contend 17 IU/mL Heparina-Na	3245227

Se você possui alguma dúvida com relação a interferentes, contate o seu representante local da Chromsystems, ou entre em contato com a nossa central pelo telefone +49 89 18930-111 ou pelo e-mail 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 a linha de base estabilizar
	Lâmpada do detector velha	Substituir a lâmpada
	Sistema ainda não equilibrado	Repetir a injeção do calibrador até que dois cromatogramas consecutivos sejam quase idênticos
	Desvio de temperatura	Usar forno para coluna
Linha de base instável	Fluxo inconstante	Verificar a bomba do HPLC
	Bomba do UHPLC	Verificar a bomba do HPLC (ar, selos)
	Ar no sistema	Degaseificar a fase móvel
	Célula do detector contaminada	Limpar a célula
Picos interferentes	Fase móvel contaminada	Substituir a fase móvel
	Ar no sistema	Degaseificar a fase móvel
	Injetor contaminado	Limpar o injetor
	Frascos do amostrador automático contaminados	Usar frascos novos ou limpá-los
	Seringa de injeção contaminada	Limpar a seringa com metanol

	Coluna UHPLC contaminada	Substituir a coluna
	Amostras não armazenadas adequadamente	Utilizar amostras recentes
	Solução finalizadora velha	Preparar nova solução
Alargamento de picos, cauda	Coluna UHPLC sobrecarregada	Reduzir volume de injeção
	Coluna UHPLC velha	Substituir a coluna
Picos duplicados	Volume morto nas conexões	Substituir as conexões
	Volume morto na coluna UHPLC	Substituir a coluna
Sem picos	Vazamento no sistema	Verificar o injetor, pressão
	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 para coluna
Mudanças no tempo de retenção	Razão de fluxo instável	Avaliar bomba do UHPLC
	Sistema não está equilibrado	Repetir a injeção do calibrador até que dois cromatogramas consecutivos sejam quase idênticos
Sem sinal	Conexão com integrador ou registrador defeituosa ou interrompida	Verificar o sinal do cabo e as conexões
	Lâmpada do detector	Verificar a voltagem da lâmpada, substituir se necessário

Se você possui alguma dúvida, contate o seu representante local da Chromsystems, ou entre em contato com a nossa central pelo telefone +49 89 18930-111 ou pelo e-mail support@chromsystems.com.




13 Literatura


- 1 Gressner AM, Arndt T (ed): Lexikon der Medizinischen Laboratoriumsdiagnostik. Springer, Berlin, Heidelberg, 2019.
- 2 EFSA Panel on Dietetic Products, Nutrition and Allergies (NDA): Dietary Reference Values for thiamin.
- 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 Talwar D, Catchpole A, Wadsworth JM, Toole BJ, McMillan DC: The relationship between plasma albumin, alkaline phosphatase and pyridoxal phosphate concentrations in plasma and red cells: Implications for assessing vitamin B6 status. *Clin Nutr* 2020; 39:2824-2831.
- 9 Himmelreich N, Montioli R, Bertoldi M, Carducci C, Leuzzi V, Gemperle C, *et al.*: Aromatic amino acid decarboxylase deficiency: Molecular and metabolic basis and therapeutic outlook. *Mol Genet Metab* 2019; 127:12-22.
- 10 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.
- 11 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.
- 12 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.
- 13 Martel JL, Kerndt CC, Doshi H, Franklin DS: Vitamin B1 (Thiamine). StatPearls Publishing, 2023.
- 14 Sriram K, William Manzanares, Joseph K: Thiamine in nutrition therapy 2012.
- 15 Jandl NM, Volk A, Barvencik F: Hypophosphatasie - eine klinisch und genetisch variable Erkrankung. *Medizinische Genetik* 2019; 31:364-371.
- 16 Rojas-Hernandez CM OT: The Unusual Nutritional and Toxin-related Underproduction Anemias Approaching the Riddle Beyond Iron_Cobalamin and Folate. *Discov Med* 2018; 67-74.
- 17 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.
- 18 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.
- 19 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.
- 20 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.
- 21 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.
- 22 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.
- 23 Looman M, Geelen A, Samlal RAK, Heijligenberg R, Klein Gunnewiek JMT, Balvers MGJ, *et al.*: Changes in Micronutrient Intake and Status, Diet Quality and Glucose Tolerance from Preconception to the Second Trimester of Pregnancy. *Nutrients* 2019; 11.

Apêndice I: Informações de segurança

As seguintes informações devem ser observadas e as respectivas medidas de segurança deverão ser adotadas. Maiores informações podem ser obtidas nas respectivas fichas de segurança dos materiais (www.chromsystems.de) ou mediante solicitação.

Tabela 11: Informações de segurança

Produto	Risco
Fase móvel A para UHPLC (artigo 52911) 	Perigo H302+H312+H332 Nocivo por inalação, ingestão e contato com a pele. H371 Pode causar danos aos órgãos. P280 Utilizar roupa de proteção, luvas adequadas, proteção nos olhos e na face. P301+P312 Se inalado: Ligue para um centro de envenenamento/médico se você não se sentir bem. P302+P352 Se em contato com a pele: Lave com bastante sabão e água. P403+P233 Armazene em um local bem ventilado. Mantenha os frascos bem fechados.
Fase Móvel B para UHPLC (artigo 52922) 	Perigo H225 Líquido e vapor inflamáveis. P301+P312 Se engolido: Ligue para um centro de envenenamento/médico se você não se sentir bem. H370 Causa danos aos órgãos. P210 Manter longe do calor, superfícies quentes, faíscas, chamas abertas ou outras fontes de ignição. Não fumar. P280 Utilizar roupa de proteção, luvas adequadas, proteção nos olhos e na face. P301+P310 Se engolido: Ligue imediatamente para um centro de envenenamento/médico. P302+P352 Se em contato com a pele: Lave com bastante sabão e água. P403+P233 Armazene em um local bem ventilado. Mantenha os frascos bem fechados.
Reagente de Extração (artigo 52705) 	Perigo H272 Pode intensificar fogo; oxidante. H290 Pode ser corrosivo a metais. H314 Causa queimaduras severas na pele e danos ao olhos. P280 Utilizar roupa de proteção, luvas adequadas, proteção nos olhos e na face. P301+P330+P331 Se engolido: lave a boca. Não induza ao vômito. P305+P351+P338 Em caso de contato com os olhos, lavar cuidadosamente com água por vários minutos. Remova lentes de

	contato, se presentes e de fácil remoção. Continue lavando. P309+P311 Se exposto ou se você não se sentir bem: Ligue imediatamente para um centro de envenenamento/médico.
<p>Solução de Preparo (artigo 52706)</p> 	<p>Perigo</p> <p>H290 Pode ser corrosivo em metais.</p> <p>H315 Causa irritação de pele</p> <p>H319 Causa grave irritação aos olhos</p> <p>P280 Use luvas de proteção/roupa de proteção/proteção de olhos/proteção de face</p> <p>P302+P352 EM CONTATO COM A PELE: Lave abundantemente com água</p> <p>P305+P352+P338 EM CONTATO COM OS OLHOS: Enxague cuidadosamente com água por muitos minutos. Remova lentes de contato, se tiver e for de fácil remoção. Continue enxaguando.</p> <p>P332+P313 Se houver irritação de pele: Procure atenção/ajuda médica</p> <p>P337+P313 Se persistir a irritação nos olhos: Procura atenção/ajuda médica</p>
<p>Esses componentes não são classificados como perigosos de acordo com a legislação da União Europeia:</p> <p>Padrão de calibração em sangue total (artigo 52003)</p> <p>Mix de padrão interno (artigo 52744)</p> <p>Finalizador 1 (artigo 52707)</p> <p>Finalizador 2 (artigo 52708)</p> <p>Tampão de diluição (artigo 52709)</p> <p>Controles em sangue total (artigos 0164, 0165, 0167)</p>	

Apêndice II: Validação

Para verificar a linearidade e validar o método, amostras de sangue total foram fortificadas com quantidades definidas de PLP ou TPP e preparadas várias vezes.

As características de performance foram determinadas e verificadas nos seguintes equipamentos:

- Shimadzu Nexera with RF-20A FLD
Hamilton ML-Starlet IVD 4x 1000UL, equipado com centrífuga Ixion 102 e Heater Shaker (agitador com aquecedor) (HHS)
- Agilent série 1290 com 1260 FLD
Tecan Evo 100, equipado com ponteiras fixas e incubadora

Recuperação:

A recuperação analítica foi determinada a partir do coeficiente angular da curva de calibração das amostras de sangue total fortificadas e de diluições de soluções padrão. As recuperações para todas as substâncias testadas e para o padrão interno foram:

Tabela 15: Taxas de recuperação, determinação com Hamilton ML-Starlet IVD e UHPLC Shimadzu Nexera

Analito	Taxa de recuperação
Vitamina B ₆ (PLP)	80 %
Vitamina B ₁ (TPP)	96 %
Padrão Interno 1	104 %
Padrão Interno 2	104 %

Linearidade e limite de quantificação (LLOQ):

A linearidade foi determinada pela fortificação de amostras de sangue total com quantidades definidas de substâncias padrões. O limite inferior de detecção (LLOQ) foi determinado por diluições definidas de amostras de sangue com tampão fosfato-salino (PBS).

O método é linear a partir do limite inferior de quantificação (LLOQ) até o limite superior de quantificação determinado (faixa linear).

Tabela 16: Limite de quantificação e linearidade, determinação com Hamilton ML-Starlet IVD e UHPLC Shimadzu Nexera

Analito	LLOQ* (aprox.)	Limite máximo de linearidade
Vitamina B ₆ (PLP)	2,5 µg/L	500 µg/L
Vitamina B ₁ (TPP)	4 µg/L	750 µg/L

*O limite de detecção depende do detector empregado.

Precisão intra-ensaio:

A determinação da precisão intra-ensaio foi realizada em três diferentes concentrações pelas médias de múltiplos preparos (n = 10) da mesma amostra de sangue total em uma sequência:

Tabela 17: Precisão intra-ensaio, determinação com Hamilton ML-Starlet IVD e Shimadzu Nexera

Analito	Coeficiente de variação (concentração do analito)		
Vitamina B ₆ (PLP)	3,4 % (9,9 µg/L)	3,6 % (16,4 µg/L)	3,4 % (25,7 µg/L)
Vitamina B ₁ (TPP)	3,1 % (24,6 µg/L)	2,3 % (43,7 µg/L)	2,6 % (89,7 µg/L)

Tabela 18: Precisão intra-ensaio, determinação com Tecan Evo 100 e UHPLC Agilent 1290 UHPLC

Analito	Coeficiente de variação (concentração do analito)		
	Vitamina B ₆ (PLP)	4,6 % (10,8 µg/L)	4,1 % (19,5 µg/L)
Vitamina B ₁ (TPP)	2,0 % (26,1 µg/L)	1,1 % (45,1 µg/L)	1,1 % (99,4 µg/L)

Precisão inter-ensaio:

A determinação da precisão inter-ensaio foi realizada em três diferentes concentrações pelas médias de múltiplos preparos (n = 5) da mesma amostra de sangue total em 20 ou 5 dias diferentes:

Tabela 19: Precisão inter-ensaio, determinação com Hamilton ML-Starlet IVD e Shimadzu Nexera, n = 100

Matriz	Coeficiente de variação (concentração do analito)		
	Vitamina B ₆ (PLP)	4,4 % (10,1 µg/L)	4,5 % (19,4 µg/L)
Vitamina B ₁ (TPP)	3,2 % (26,6 µg/L)	3,1 % (48,5 µg/L)	3,5 % (106 µg/L)

Tabela 20: Precisão inter-ensaio, determinação com Tecan Evo 100 e UHPLC Agilent 1290, n = 25

Matriz	Coeficiente de variação (concentração do analito)		
	Vitamina B ₆ (PLP)	4,2 % (10,8 µg/L)	5,3 % (19,5 µg/L)
Vitamina B ₁ (TPP)	3,2 % (26,1 µg/L)	3,6 % (45,1 µg/L)	3,8 % (99,4 µg/L)

Esses dados foram estabelecidos em nosso laboratório somente com o objetivo de verificar a performance do kit de reagentes e cumprir os requerimentos regulatórios. Nós particularmente enfatizamos que estes dados não são adequados para comparação de sistemas de medição usados, ou para fazer nenhuma declaração a respeito da performance geral.

Comparação do método com o preparo manual de amostras

Durante este procedimento, as amostras de pacientes e amostras de sangue total fortificadas foram medidos usando o preparo manual de amostras existente (kit 52952/UHPLC) versus o kit de preparo automatizado de amostras (kit 52952/UHPLC/F) e matematicamente avaliado pela correlação de Passing e Bablok e cálculos dos desvios dos valores medidos.

Para o preparo de amostras foi usado um sistema Hamilton ML-Starlet IVD, e para medição um UHPLC Shimadzu Nexera. Os seguintes gráficos mostram os resultados das comparações dos métodos:

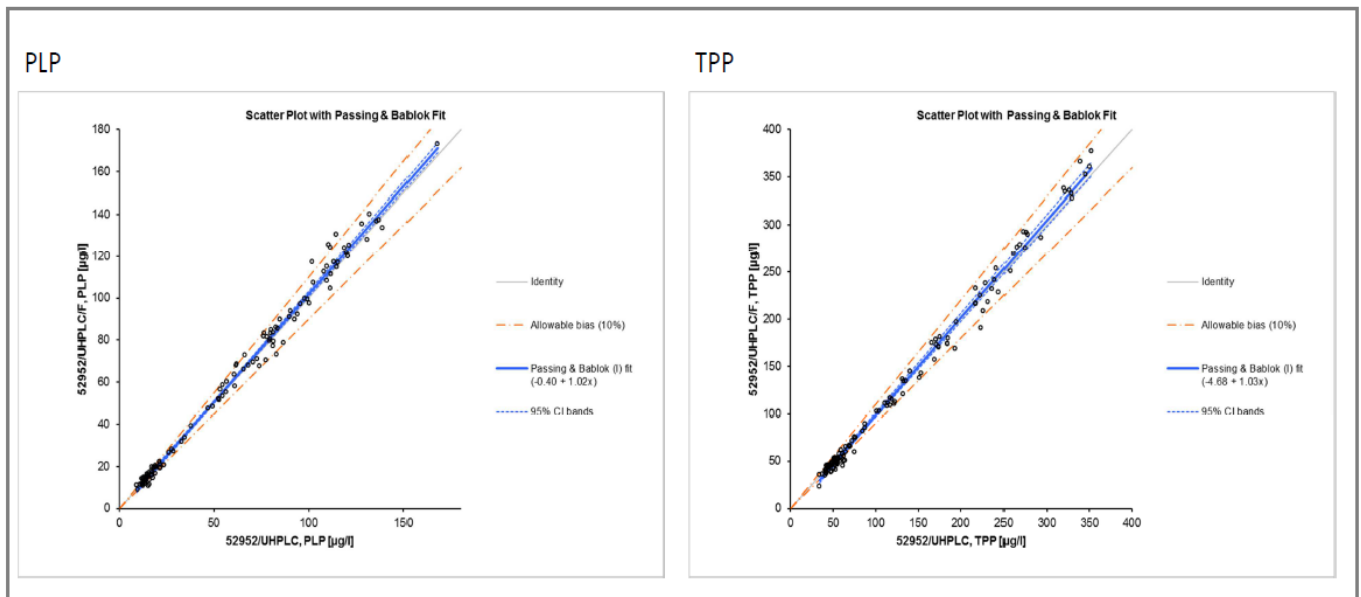


Figura 5: Curva de regressão Passing-Bablok

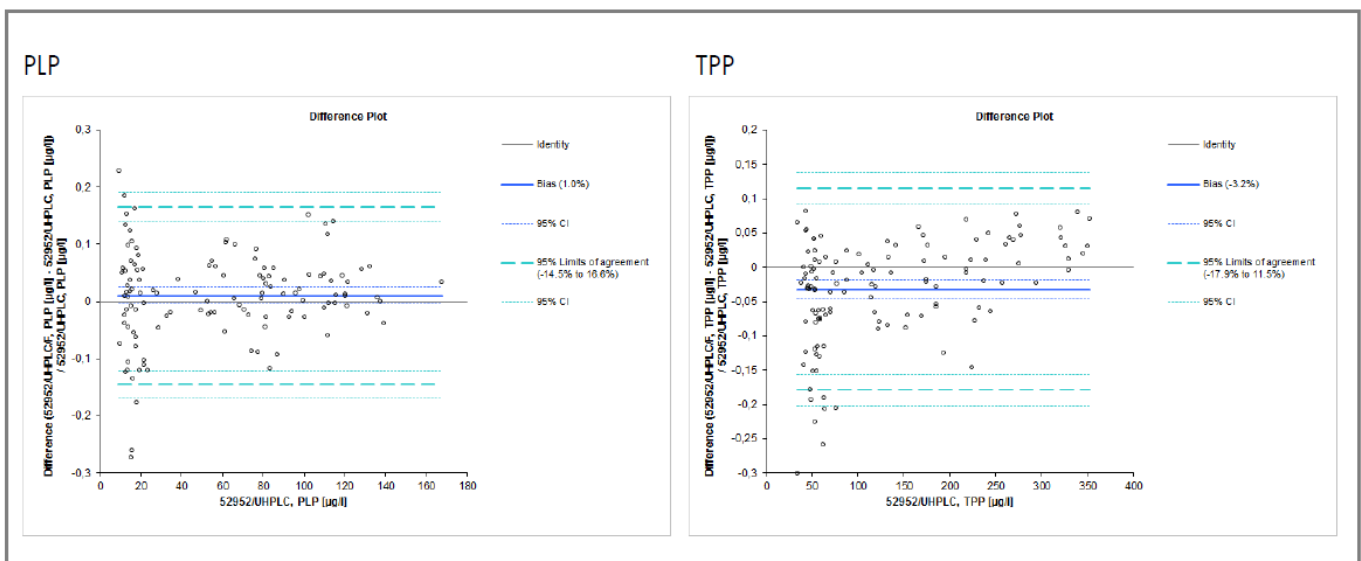


Figura 6: Gráfico diferencial

Apêndice III: Validação

O método apresentado e descrito aqui usando o preparo automatizado de amostras para a análise de vitaminas B1 e B6 em sangue total foi comparado ao método certificado com o preparo manual de amostras com o objetivo de verificar o método e avaliar a performance.

Durante este procedimento, amostras de pacientes e amostras de pacientes fortificadas foram medidas usando o preparo manual de amostras já existente (kit 52952/UHPLC) versus o kit de preparo automatizado de amostras (kit 52952/UHPLC/F) e matematicamente avaliado pela correlação de Passing & Bablok. Ambas as correlações de Passing & Bablok e os desvios médios dos valores medidos (bias) estiveram dentro da faixa requerida para vitaminas B1 e B6. Os seguintes gráficos mostram os resultados das comparações dos métodos:

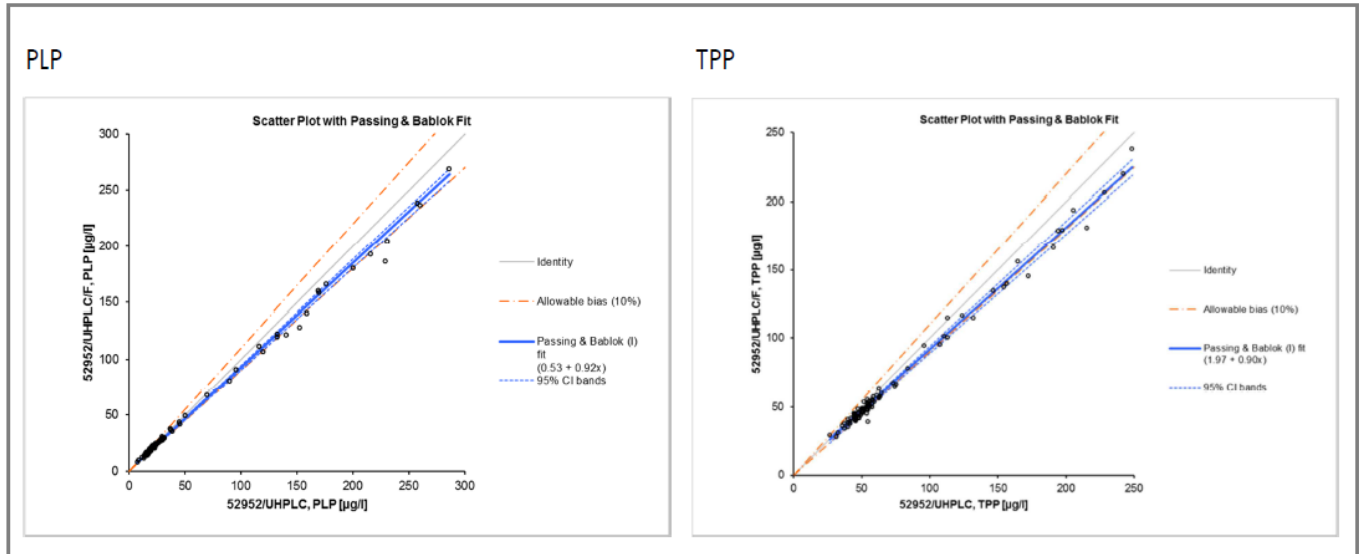


Figura 7: Curva de regressão Passing-Bablok

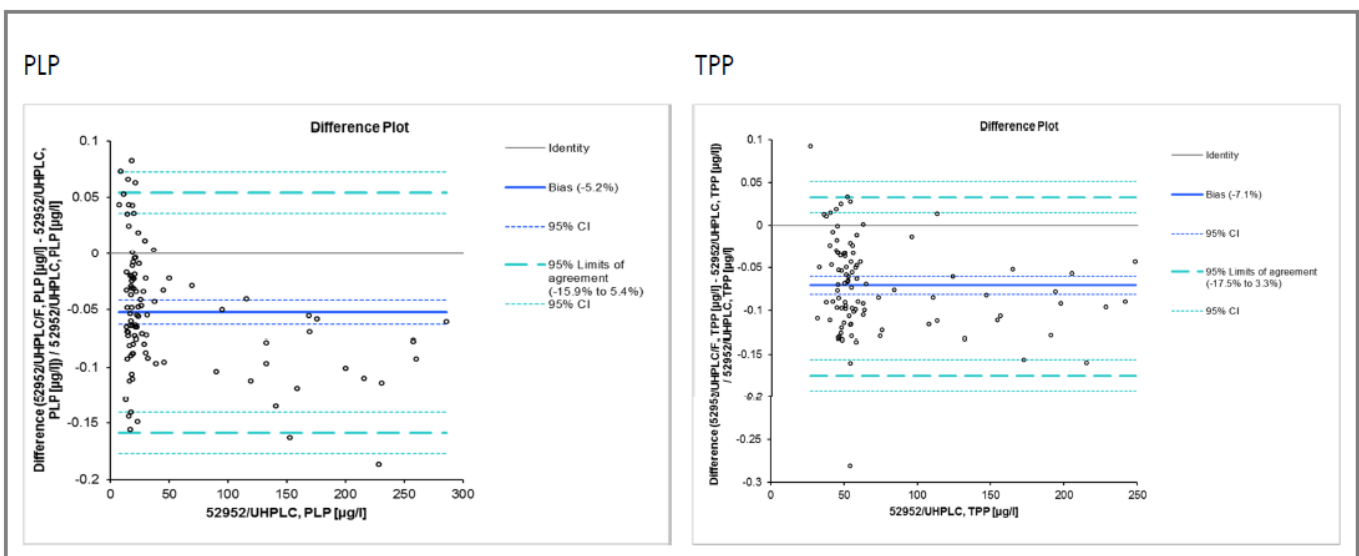


Figura 8: Gráfico diferencial

Os resultados obtidos no presente estudo comparativo confirmam os dados de performance do kit de reagentes para análise automatizada de Vitamina B1 e B6 por UHPLC em sangue total, que foi determinada durante a verificação.

Apêndice IV Dados de desempenho clínico

O kit de reagentes da Chromsystems 52952/UHPLC/F “Vitaminas B₁ e B₆ em sangue total” é usado para triar níveis anormais em populações específicas ou para monitorar o estado da vitamina B₁ ou B₆ em pacientes, ex: que estão em terapia com suplementação. Como o estado da vitamina B₁ e B₆ nunca serve para diagnosticar uma doença diretamente, parâmetros de desempenho clínico como a especificidade diagnóstica, sensibilidade diagnóstica, valor preditivo positivo, valor preditivo negativo ou razão de verossimilhança não são aplicáveis a estes dispositivos.

Em vez disso, parâmetros clínicos relevantes são esperados em populações normais e afetadas. A tabela abaixo exibe os dados de desempenho clínico usando os ensaios de Vitamina B₁ e B₆ da Chromsystems.

Dados de performance clínica para Vitamina B₁

Monitoramento dos níveis da vitamina B1 ou triagem para a deficiência ou excesso é relevante em grupos de populações que tem mostrado um alto risco de deficiência ou excesso. Estes incluem:

Para deficiência de vitamina B1:

- Pacientes com distúrbios de restrição alimentar
- Pacientes em hemodiálise

Para excesso de vitamina B1:

- Pacientes em suplementação de vitamina B1

Objetivo do estudo	Matriz utilizada para determinar níveis de TPP	Valores esperados na população afetada	Valores esperados na população não afetada	Ref
Revisão retrospectiva de adolescentes hospitalizados com distúrbios alimentares que começaram um regime de realimentação altamente calórica e foram investigados para deficiência ou excesso de vitamina B1 na entrada e durante a hospitalização	Sangue total	Deficiência <67 nmol/L Excesso: > 200 nmol/L	67-200 nmol/L	[18]
Triagem para deficiência de tiamina realizada em crianças com distúrbios alimentares admitidas por primeira vez em ambulatorial	Sangue total	Deficiência <66nmol/L	66-200,3 nmol/L	[19]
Estudo para triar parâmetros bioquímicos, nutricionais e hormonais de anormalidades nutricionais em pacientes adolescentes com anorexia nervosa e para estabelecer se certas anormalidades persistem depois da realimentação em curto prazo	Sangue total	Deficiência <82,5nmol/L	82,5-167,3 nmol/L	[20]
Estudo para dosar vitaminas hidrossolúveis e rastrear elementos em sangue e dialisante em pacientes tratados hemodiafiltração on-line pós-dilucional	Sangue total	Deficiência < 66 nmol/L	66-200 nmol/L	[21]
Estudo para investigar as perdas de vitaminas intradialíticas e de	Sangue total	Deficiência < 47 nmol/L	-	[22]

homocisteína em pacientes antes e depois de tratamento com hemodiálise e se a perda é dependente do tipo de dialisador				
--	--	--	--	--

Desempenho clínico para vitamina B6

Monitoramento de níveis de vitamina B6 ou triagem são relevantes em grupos populacionais que tem mostrado um risco alto para deficiência ou excesso. Estes incluem:

Para deficiência de vitamina B6:

- Pacientes com distúrbios alimentares restritivos
- Mulheres grávidas
- Pacientes em tratamento com hemodiálise
- Pacientes idosos

Para excesso de vitamina B6:

- Pacientes em terapia com suplementação de vitamina B6
- Pacientes com hipofosfatase

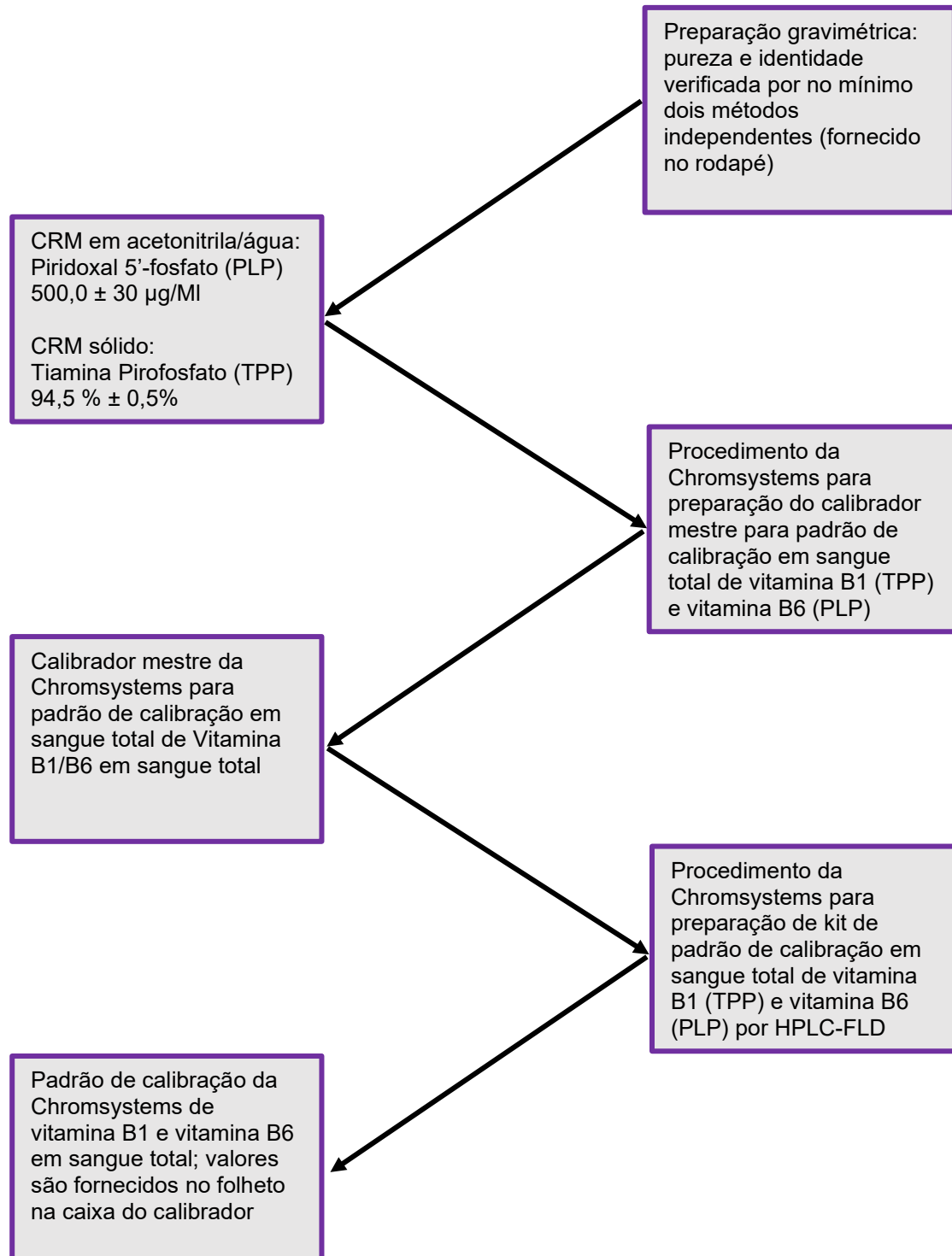
Objetivo do estudo	Matriz usada para determinar níveis de PLP	Valores esperados na população afetada	Valores esperados na população não afetada	Ref
Estudo para triar parâmetros bioquímicos, nutricionais e hormonais para anormalidades nutricionais em adolescentes com anorexia nervosa e para estabelecer se certas anormalidades persistem depois da realimentação em curto prazo	Sangue total	Deficiência < 14,4 nmol/L	14,4-72,8 nmol/L	[20]
Estudo para descrever mudanças na ingestão de determinados micronutrientes (incluindo a vitamina B6), o estado dos micronutrientes (B6 etc) e a qualidade da dieta como um todo em mulheres desde a concepção até o segundo trimestre da gravidez	Sangue total	Sem categorização/ diagnóstico Mulheres grávidas suplementadas com vitamina B6 foram dosadas em 3 momentos diferentes <u>TO (antes da gravidez)</u> 89,8 ± 3,4 nmol/L <u>T1 (12ª semana de gestação):</u> 88,7 ± 2,9 nmol/L <u>T2 (24ª semana de gestação):</u> 80,0 ± 2,8 nmol/L		[23]
Estudo para dosagem de vitaminas hidrossolúveis e rastrear elementos em sangue e dialisante em pacientes tratados por hemodiafiltração on-line pós-dilucional	Sangue total	--	35-110 nmol/L	[21]

Apêndice V Rastreabilidade dos calibradores

Padrão de Calibração em Sangue Total (artigo 52003)

Vitamina B1 e Vitamina B6 em sangue total

Versão 2.0



O calibrador mestre de sangue total foi preparado gravimetricamente pela adição de piridoxal puro 5'- fosfato (PLP, vitamina B6) e pirofosfato de tiamina (TPP, vitamina B1) obtidos de um fornecedor comercial. As concentrações foram determinadas no laboratório do fabricante utilizando o kit de reagentes de HPLC para vitamina B1 e vitamina B6 com CRMs obtidos de

fornecedores certificados ISO 17025 (e ISO 17034) (concentrações indicadas no gráfico acima). A pureza e a identidade dos CRMs foram determinadas por fornecedores usando no mínimo 2 métodos independentes, conforme resumido na nota de rodapé.

A metodologia para o calibrador mestre de sangue total usa o kit de reagentes Chromsystems no. 52052 (kit de reagentes para determinação de vitamina B1 e B6 no sangue total) por análise HPLC-FLD.

O produto da Chromsystems de calibrador de sangue total de vitamina B1 e vitamina B6 do (calibrador de trabalho) tem um concentração conforme mostrado no folheto informativo de cada lote, determinada pelo laboratório do fabricante usando o método do kit de reagentes Vitamina B1 e Vitamina B6 da Chromsystems como referência. O ensaio foi calibrado usando o calibrador mestre Chromsystems com uma concentração (incluindo incerteza) conforme mostrado em o diagrama acima. A metodologia para trabalhar o calibrador é usar o kit de reagentes Chromsystems no. 52052 por análise HPLC-FLD.

A homogeneidade é verificada para cada lote por múltiplas análises de diversas alíquotas baseadas na justificativa estatística da Chromsystems para o tamanho da amostragem (com base na ISO 13528 com um conjunto mínimo de 10 repetições e duas corridas).


Os valores atribuídos são fornecidos no folheto informativo de cada calibrador.

¹⁾ A incerteza da concentração é expressa como uma “incerteza expandida” com uma confiança aproximada de 95% intervalo usando um fator de cobertura de $k = 2$ para ambos os analitos

²⁾ Pureza por HPLC-UV e LC-MS; identidade por LC/MS e ¹H-NMR

³⁾ Pureza por HPLC-UV, Balanço de massa, solvente residual, titulação Karl-Fischer; identidade por espectroscopia IR, MS (HR-QTOF) e ¹H-RMN.

Apêndice VI: Declaração de Conformidade



DIAGNOSTICS BY HPLC & LC-MS/MS

COPY

EC-Declaration of Conformity

according to directive 98/79 EC on in vitro diagnostic medical devices

We, as manufacturer

Chromsystems Instruments & Chemicals GmbH
 Am Haag 12
 82166 Gräfelfing, Germany

declare on our own responsibility, that herein after called in vitro diagnostic medical devices for the HPLC determination of:

GMDN Code 60484, term "Multiple vitamin IVD, kit, liquid chromatography"

EDMA Nomenclature term: Other Vitamin Tests
 EDMA Nomenclature code: 12-07-02-90-00
 IVDD Classification: other product

Reagent Kit: 52052 – Vitamin B₁ in whole blood and Vitamin B₆ in whole blood/plasma
 52052/Premix – Vitamin B₁ in whole blood and Vitamin B₆ in whole blood/plasma – with Pre-mixed Neutralisation Tubes
 52752/F – Vitamin B₁ and Vitamin B₆ in whole blood – Automated Sample Preparation
 52952/UHPLC – Vitamin B₁ in whole blood and Vitamin B₆ in whole blood/plasma
 52952/UHPLC/F – Vitamin B₁ and Vitamin B₆ in whole blood – Automated Sample Preparation

Calibrator: 52003 – Whole Blood Calibration Standard – Vitamins B₁/B₆ in whole blood
 36005 – Plasma Calibration Standard – Vitamin B₆ in plasma/serum

Controls: 0164 – Whole Blood Control Bi-Level (I+II) - Vitamins B₁/B₆ in whole blood
 0165 – Whole Blood Control Level I - Vitamins B₁/B₆ in whole blood
 0167 – Whole Blood Control Level II - Vitamins B₁/B₆ in whole blood
 0031 – Plasma Control Bi-Level (I+II) - Vitamin B₆ in plasma/serum
 0038 – Plasma Control Level I - Vitamin B₆ in plasma/serum
 0039 – Plasma Control Level II - Vitamin B₆ in plasma/serum

EC declaration valid until May 26th, 2022

Chromsystems
Instruments & Chemicals GmbH

Am Haag 12
82166 Gräfelfing/Germany

Tel/fax: +49 89 18930-0
Tel/fax: +49 89 18930-199

mailto:info@chromsystems.com
www.chromsystems.com

Vers. 3.0
Managementsystem zertifiziert nach:
ISO 9001, ISO 13485 (including MDSAP)

CHROMSYSTEMS

DIAGNOSTICS BY HPLC & LC-MS/MS

meet all applicable requirements of the directive 98/79/EC.

Conformity assessment procedure: Annex III of the directive 98/79/EC

Applied harmonized standards:

EN ISO 13485, EN 13612, EN 13641, EN ISO 14971, EN 18113-1, EN 18113-2,
EN 15223-1, EN 17511, EN 23640

Notified body: -

Gräfelfing, July 11th, 2019



Michael Meier
Managing Director

EC declaration valid until May 26th, 2022

Chromsystems
Instruments & Chemicals GmbH

Am Haag 12
83164 Gräfelfing/Germany

Telefax: +49 89 18930-0
Telefax: +49 89 18930-199

mailto:info@chromsystems.com
www.chromsystems.com













Management system certified according to:
ISO 9001, ISO 13485 (including MDSAP)

Vers. 3.0

Apêndice VII: Símbolos

Nós utilizamos os símbolos EN ISO 15223-1 em nossos rótulos, especificações e embalagens. O significado de cada símbolo é apresentado abaixo:

Tabela 18: Símbolos

Símbolo	Significado
	Fabricante
	Usado por
	Número do artigo
	Lote
	Ver manual de instruções
	Limite superior de temperatura: Armazene abaixo de certa temperatura
	Limite de temperatura: Armazene dentro de uma faixa de temperatura
	Ferramenta de diagnóstico <i>in vitro</i>
	Suficiente para <n> aplicações
	Número de série