

MassChrom® Vitamins B1 and B6 in whole blood

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

Artigo	Apresentação
87000 87000/DWP	Conjunto de reagentes para 480 análises

Para informações detalhadas sobre o método e procedimento, favor consultar o Manual de Instruções MassChrom® Vitamins B1 and B6 in whole blood no site www.biosys.com.br.

Finalidade pretendida

Este kit de reagentes em sangue total da Chromsystems é um produto de diagnóstico *in vitro* para uso em laboratórios clínicos para determinar quantitativamente as formas fisiologicamente ativas da vitamina B1 (pirofosfato de tiamina, TPP) e da vitamina B6 (piridoxal 5'-fosfato, PLP) em amostras de sangue total humano por cromatografia líquida com espectrometria de massa em tandem (LC-MS/MS). O kit é usado como um teste para pacientes nos quais os níveis de vitamina B1 e/ou vitamina B6 devem ser monitorados.

MÉTODO

Cromatografia líquida com espectrometria de massa em tandem (LC-MS/MS).

PRINCÍPIO

Este ensaio da Chromsystems permite a determinação combinada das formas ativas da vitamina B1 (pirofosfato de tiamina, TPP) e da vitamina B6 (piridoxal 5'-fosfato, PLP) em sangue total por LC-MS/MS. A preparação da amostra consiste em uma simples etapa de precipitação de proteínas, sem necessidade de derivatização. Isso resulta em uma preparação de amostra muito mais rápida e alta produtividade de amostras. O método pode ser realizado em frascos de reação de 2 mL ou em placas de 96 poços.

Os analitos e potenciais interferências são separados de forma eficaz e rápida em 2,5 minutos, o que indica a alta seletividade e velocidade do método.

Padrões internos marcados com isótopos para ambos os parâmetros, bem como calibradores 6PLUS1® e controles MassCheck®, garantem resultados precisos e exatos.

Componentes e Composição:

O produto é fornecido em 2 diferentes apresentações:

- art. 87000 – contendo frascos de reação de 2 mL
- art. 87000/DWP – contendo placas de 96 poços

Componente	Composição	Apresentação
Fase móvel A (Mobile Phase A, art. 87001)	Ácido acético	1 x 700 mL
Fase móvel B (Mobile Phase B, art. 87002)	Metanol	1 x 350 mL
Conjunto de Padrão Interno (art. 87004), consistindo de:		
Mix Padrão Interno (Internal Standard Mix, REF 87004)	Padrões internos marcados	5 x 8,0 mL (liof.)
Tampão de Reconstituição (Reconstitution Buffer, REF 87006)	Ácido clorídrico	5 x 8,5 mL
Reagente de Precipitação (Precipitation Reagent, art. 87005)	Ácido tricloroacético Ácido fosfórico	2 x 85 mL
Solução de Lavagem (Rinsing Solution, art. 87009)	Metanol	1 x 500 mL

Na apresentação, art. 87000, o seguinte componente é fornecido:

Frascos de reação de 2 mL (Reaction Vials 2 mL, art. 33008)	5 x 100 unidades
--	------------------

Na apresentação, art. 87000/DWP, os seguintes componentes são fornecidos:

Placa de 96 poços (96 Deep Well Plates, art. 87057)	2 x 3 unidades
Placas de coleta (Collection Plates, art. 87058)	2 x 3 unidades
Selos adesivos perfuráveis para placas de 96 poços (Pierceable Adhesive Seals for 96 well plates, art. 87059)	2 x 3 unidades

Acessórios, fornecidos separadamente

Componente	Composição	Apresentação
Tuning Mix MassChrom® Vitamins B1 and B6 in whole blood (art. 87015)	Metanol	1 x 1 mL
Tampão de Diluição (Dilution Buffer, art. 87018)	Ácido tricloroacético Ácido fosfórico	1 x 100 mL
Reagente de Ajuste para pequenos volumes de injeção (Adjustment Reagent for small injection volumes, art. 87019)	Ácido tricloroacético	1 x 20 mL

INSTRUÇÕES DE ARMAZENAMENTO DOS REAGENTES

Os reagentes não abertos são estáveis até a data de validade indicada nos rótulos, desde que as condições de armazenamento estabelecidas sejam obedecidas.

Componentes fornecidos	Condição de armazenamento
Fase móvel A (art. 87001)	+18 a +30°C
Fase móvel B (art. 87002)	+18 a +30°C
Mix Padrão Interno (REF 87004)	Abaixo de -18°C
Tampão de Reconstituição (REF 87006)	Abaixo de -18°C ou +18 a +30°C*
Reagente de Precipitação (art. 87005)	+18 a +30°C
Solução de Lavagem (art. 87009)	+18 a +30°C

Componentes fornecidos separadamente	Condição de armazenamento
Tuning Mix MassChrom® Vitamins B1 and B6 in whole blood, art. 87015)	Abaixo de -18°C
Tampão de Diluição (art. 87018)	+18 a +30°C
Reagente de Ajuste para pequenos volumes de injeção (art. 87019)	+18 a +30°C

*Armazene o Tampão de Reconstituição (REF 87006) juntamente com o Mix Padrão Interno (REF 87004) abaixo de -18°C. Alternativamente, o Tampão de Reconstituição pode ser armazenado separadamente entre +18 e +30°C. Isso não tem impacto no prazo de validade indicado na rotulagem do mesmo.

Feche os reagentes imediatamente após o uso e armazene-os na temperatura especificada. O prazo de validade em uso é de um ano, mas não se estende além da data de validade indicada.

CUIDADOS E PRECAUÇÕES

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

DESCARTE

A Fase Móvel B, a Solução de Lavagem e o Tuning Mix contêm solventes orgânicos. Descarte os resíduos do produto em um recipiente de coleta para solventes orgânicos isentos de halogênio.

O Reagente de Precipitação, o Tampão de Diluição e o Reagente de Ajuste contêm uma substância ácida e ambientalmente perigosa. Neutralize os resíduos do produto e descarte-os em um recipiente de coleta para soluções salinas.

Resíduos de amostras de pacientes e amostras preparadas, bem como controles e calibradores, devem ser coletados e descartados como resíduos potencialmente infecciosos.

As soluções mencionadas não devem ser descartadas juntamente com o lixo doméstico. Não recircule na rede de abastecimento de água. Descarte em conformidade com os requisitos nacionais e locais em vigor. Os recipientes de resíduos devem ser armazenados adequadamente e o acesso deve ser permitido apenas a pessoas autorizadas.

GARANTIA

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

PREPARO DOS REAGENTES

Fase Móvel A e Fase Móvel B: pronto para uso.

Reagente de Precipitação: pronto para uso.

Solução de lavagem: pronto para uso.

Reconstituição do Padrão Interno (*Internal Standard Mix*, art. 87004)

Antes do preparo da amostra, reconstitua o Mix Padrão Interno (REF 87004) como a seguir:

- Descongele um frasco de Mix Padrão Interno (REF 87004) e um frasco de Tampão de Reconstituição (REF 87006).
- Pipete 8,0 mL de Tampão de Reconstituição no frasco original do Mix Padrão Interno.
- Reconstitua por 2 minutos a +20 a +25°C, agitando o frasco por rotação repetidamente.

Verifique se o conteúdo do frasco está homogêneo. Se ainda houver substâncias não dissolvidas visíveis, prolongue o tempo de reconstituição. Evite a exposição direta à luz solar.

Prazo de validade dos padrões internos após a reconstituição:

O Mix Padrão Interno dissolvido no Tampão de reconstituição possui o seguinte prazo de validade.

Estabilidade do Mix Padrão interno após reconstituição com Tampão de reconstituição.

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

O Tampão de reconstituição contém aditivos estabilizantes. O Mix Padrão Interno reconstituído é estável somente se o Tampão de reconstituição for utilizado.

MATERIAIS REQUERIDOS, MAS NÃO FORNECIDOS

- Espectrômetro de massas em tandem triplo quadrupolo com fonte ESI (sensibilidade suficiente fornecida)
- Sistema de HPLC com gradiente
- Forno para coluna

- Amostrador automático com refrigeração
 - Agitador vortex para frascos de reação de 2 mL ou Agitador para placas de 96 poços (necessário ao usar placas de 96 poços)
 - Centrífuga para frascos de reação de 2 mL ou centrífuga para placas de 96 (por exemplo, centrífuga Eppendorf 5810 com rotor A-4-81 com pelo menos 2 caçambas)
 - 6PLUS1® Multilevel Whole Blood Calibrator Set (art. 87039)
 - MassCheck® Vitamins B1 and B6 Whole Blood Control Level I (art. 0273)
 - MassCheck® Vitamins B1 and B6 Whole Blood Control Level II (art. 0274)
 - MassCheck® Vitamins B1 and B6 Whole Blood Control Level III (art. 0275)
 - Analytical Column (equilibrated, with test chromatogram) (art. 87100)
 - Tuning Mix - MassChrom® Vitamins B1 and B6 in whole blood (art. 87015)
 - Dilution Buffer (art. 87018)
 - Adjustment Reagent for small injection volumes (art. 87019)
- Equipamento opcional/recomendado:
- Válvula de controle de 2 posições para comutação de resíduos de MS

PROCEDIMENTO DO TESTE

A análise LC-MS/MS das vitaminas B1 e B6 em sangue total requer um espectrômetro de massas em tandem triplo quadrupolo com sensibilidade suficiente e um sistema HPLC com gradiente (limite de pressão operacional de pelo menos 350 bar) com forno de coluna e amostrador automático com função de resfriamento. Uma válvula de 2 posições que permite a comutação MS/descarte é um recurso opcional.

Mantenha as fases móveis fechadas ou cobertas mesmo durante o uso. As substâncias são separadas em uma coluna analítica (código 87100).

Ajustes do instrumento:

Amostrador automático	Racks protegidos da luz e refrigerados a +8°C.
Volume de injeção	20 µL (alternativamente 10 µL)*
Tempo de corrida	2,5 min
Gradiente de fluxo	0,5 mL/min
Temperatura da coluna	+30°C
Solução de lavagem para agulha do injetor	Solução de lavagem (art. 87009)

*O volume de injeção padrão é de 20 µL e não pode ser alterado. O sobrenadante da precipitação de proteínas pode ser diluído com o Tampão de Diluição (art. 87018) para se adequar ao dispositivo que você está usando.

É possível trabalhar com um volume de injeção reduzido de 10 µL se o sobrenadante da precipitação de proteínas for diluído com o Reagente de Ajuste (87019).

Para mais detalhes sobre a diluição, consulte o item "**Diluição das amostras preparadas**".

Perfil de gradiente:

O perfil de gradiente apresentado serve como base para otimização. Devido aos diferentes volumes mortos de cada sistema cromatográfico, o perfil de gradiente a seguir pode precisar ser modificado.

Perfil de gradiente

Tempo	Fase Móvel A	Fase Móvel B
0 min	90%	10%
0,30 min	90%	10%
1,80 min	0%	100%
2,10 min	0%	100%
2,11 min	90%	10%
2,50 min	90%	10%

Perfil de válvula MS/Resíduos:

Uma válvula MS/resíduos é um recurso opcional que transporta o solvente para descarte de resíduos após passar pela coluna analítica. A posição da válvula é alterada antes da eluição do analito (MS/MS).

Perfil de válvula MS/Resíduos

Tempo	Posição da válvula
0 – 1,5 min	Resíduo
1,5 – 2,4 min	MS
2,4 – 2,5 min	Resíduo

OTIMIZANDO OS MRMs (utilizando Tuning Mix)

É altamente recomendável verificar a precisão e a resolução de massa do sistema MS/MS. Se a precisão e a resolução de massa estiverem fora das especificações do fabricante do instrumento, recomenda-se uma recalibração do espectrômetro de massas. Em seguida, as transições MRM do analito devem ser ajustadas da seguinte forma:

1. Dilua o Tuning Mix (art. 87015) com a Fase Móvel A (art. 87001), conforme apropriado para o dispositivo específico.
2. Injete o Tuning Mix diluído ou infunda por bomba de seringa através de uma conexão em T no fluxo de solvente (Fase Móvel A/B 50/50 v/v a uma vazão de 0,5 mL/min).
3. Use a Varredura Q1 (Varredura MS) para determinar as posições exatas dos máximos de sinal das massas MS1 (íons precursores/pais) (com pelo menos uma casa decimal).
4. Determine as posições exatas dos máximos de sinal das massas MS2 (íons produto/filhos) por meio da varredura de íons produto (com pelo menos uma casa decimal).
5. Otimize os parâmetros individuais para cada transição MRM (por exemplo, energia de colisão).
6. Use as transições MRM otimizadas para otimizar o íon. fonte, especialmente a voltagem capilar, a temperatura e os fluxos de gás.

Recomenda-se a leitura do manual de operação do sistema LC-MS/MS. Em caso de dúvidas, entre em contato com o fabricante do instrumento. Treinamento pelo fabricante pode ser necessário, se for o caso.

TRANSIÇÕES MRM:

A tabela a seguir inclui todas as transições MRM para os analitos e seus padrões internos marcados isotopicamente. Meça os analitos e os padrões internos no modo de ionização positiva (ESI).

Todas as transições MRM mencionadas (MRM 1 = quantificador, MRM 2 = qualificador) são validadas.

Transições MRM recomendadas

Substância/padrão interno (ISTD)	MRM1	MRM2
Pirifosfato de tiamina (TPP)	425 > 122	425 > 126
Padrão Interno 1	428 > 125	428 > 126
Piridoxal 5'-fosfato (PLP)	248 > 122	248 > 94
Padrão Interno 2	251 > 125	251 > 97

As massas especificadas são pontos de partida para a otimização. A posição precisa das massas exatas pode variar ligeiramente de um sistema de espectrometria de massas para outro e precisa ser determinada com precisão durante o ajuste do método. Para configurar o método, recomendamos especificar a posição da massa com pelo menos uma casa decimal. Use o Tuning Mix para essa finalidade (art. 87015, consulte o item "OTIMIZANDO OS MRMs" sobre otimização de transições MRM).

PREPARAÇÃO DA AMOSTRA

Coleta e armazenagem da amostra do paciente

Utilize sangue total para análise. Tanto sangue com EDTA (K3-EDTA e K2-EDTA) quanto sangue com heparina (heparina de lítio, heparina sódica e heparina de amônio) podem ser utilizados. O sangue com EDTA é recomendado porque o sangue com heparina é muito mais suscetível à alteração enzimática dos resultados (aumentos e diminuições nas concentrações do analito são possíveis) e é mais propenso à coagulação, o que pode reduzir a precisão da pipetagem.

As amostras de sangue devem ser coletadas pela manhã, em jejum.

Estabilidade da amostra

A temperatura de armazenamento/transporte é o principal fator que provavelmente afeta a estabilidade da amostra. Outros fatores identificados em testes preliminares incluem o tipo de anticoagulante (EDTA ou heparina) e diferenças entre doadores ou amostras de sangue, aparentemente devido a diferentes estados enzimáticos. Não foram identificadas diferenças de estabilidade entre os tipos de EDTA (K2-EDTA, K3-EDTA) ou tipos de heparina (heparina de lítio, heparina sódica, heparina de amônio).

A estabilidade do TPP e do PLP foi determinada em sangue K3-EDTA (representando ambos os tipos sanguíneos EDTA) e em sangue com heparina de lítio (representando os três tipos de heparina) de cinco doadores diferentes em três temperaturas (-18°C, +2 a +8°C e +20 a +25°C) em cada caso. Os efeitos de três ciclos de congelamento/descongelamento nos resultados também foram testados.

Desvios nas concentrações dos analitos de ≤15% em relação ao nível basal foram aceitos. O armazenamento das amostras dos pacientes não resultou em picos de interferência ou quaisquer alterações nos cromatogramas obtidos.

Estabilidade dos analitos em amostras de pacientes

TPP (vitamina B1)		
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 -18°C	3 meses*	3 meses*
Ciclos de congelamento/descongelamento	3 ciclos	3 ciclos

PLP (vitamina B6)		
Temperatura de armazenamento	Sangue total EDTA	Sangue total Heparina
+20 a +25°C	24 horas	24 horas
+2 a +8°C	4 semanas	4 semanas
Abaixo -18°C	3 meses*	3 meses*
Ciclos de congelamento/descongelamento	3 ciclos	3 ciclos

*As amostras devem permanecer em repouso por pelo menos 1,5 horas após o descongelamento (testadas em até 5 horas) para obter condições estáveis e resultados reproduzíveis.

Não existem restrições quanto à utilização de amostras hemolisadas, lipêmicas e ictericas (consulte o item "Interferentes").

Nota:

É responsabilidade de cada laboratório utilizar todas as referências disponíveis e/ou seus próprios estudos para determinar critérios de estabilidade específicos para seu laboratório.

Preparação manual da amostra em frascos de reação de 2 mL

Para preparar amostras de pacientes, controles e calibradores para análise, siga os passos abaixo na ordem indicada:

1. Pipete 40 µL da amostra/calibrador/controle em um frasco de reação de 2 mL (art. 33008)
2. Adicione 80 µL da mistura de padrão interno reconstituída (art. 87046, consulte o item "Preparo dos reagentes")
3. Vortex por 2–5 s
4. Adicione 350 µL do Reagente de Precipitação (art. 87005)
5. Vortex por 60 s
6. Centrifugue por 2 min a aproximadamente 15.000 x g
7. Transfira o sobrenadante para o frasco do amostrador automático; Se necessário, dilua o sobrenadante com o Tampão de Diluição (art. 87018) ou o Reagente de Ajuste (art. 87019) e misture (consulte o item "Diluição das amostras preparadas").
8. Injete 20 µL (ou 10 µL) no sistema LC-MS/MS (consulte o item "Diluição das amostras preparadas").

Preparação manual de amostras com placas de 96 poços

Para preparar amostras de pacientes, controles e calibradores para análise, siga os passos abaixo na ordem indicada:

1. Pipete 40 µL de amostra/calibrador/controle em uma placa de 96 poços (art.87057)
2. Adicione 80 µL de Mix Padrão Interno reconstituído (art. 87046, consulte o item "Preparo dos reagentes")
3. Agite por 2 a 5 segundos a 1200 rpm (órbita de 2 mm)
4. Adicione 350 µL do Reagente de precipitação (art. 87005)
5. Agite por 60 segundos a 1200 rpm (órbita de 2 mm)
6. Centrifugue por 5 minutos a aproximadamente 2000 x g
7. Transfira o sobrenadante para uma placa de coleta (art. 87058); Se necessário, dilua o sobrenadante com Tampão de Diluição (art. 87018) ou Reagente de Ajuste (art. 87019, consulte o item "**Diluição das amostras preparadas**"), volume máximo de preenchimento: 200 µL; sele a Placa de Coleta com o Selo Adesivo Perfurável (art. 87059); se diluído, misture (1 min a 1200 rpm, órbita de 2 mm)
8. Injete 20 µL (ou 10 µL) no sistema LC-MS/MS (consulte o item "**Diluição das amostras preparadas**")

Diluição das amostras preparadas

As amostras preparadas podem ser diluídas de duas maneiras diferentes, dependendo do volume de injeção escolhido e da faixa linear do sistema LC-MS/MS.

Volume de injeção de 20 µL (recomendado):

O sobrenadante da precipitação de proteínas pode ser injetado diretamente, ou seja, sem diluição. Para garantir que os calibradores com os níveis mais baixos e mais altos estejam dentro da faixa linear do sistema MS/MS (dependendo do sistema MS/MS que você estiver usando), o sobrenadante pode ser diluído com o Tampão de Diluição (art. 87018) em qualquer proporção. Para determinar o fator de diluição ideal, prepare uma série de diluições com o calibrador de nível baixo preparado (REF 87039/0) e o Tampão de Diluição e analise essas diluições em concentrações crescentes até que todas as substâncias sejam facilmente quantificáveis. Em seguida, analise o calibrador de maior concentração (REF 87039/6) na diluição identificada e certifique-se de que nenhuma substância exceda a faixa de trabalho linear do sistema MS/MS.

Volume de injeção reduzido de 10 µL:

O volume de injeção reduzido de 10 µL é usado com sistemas LC que não conseguem injetar 20 µL.

O sobrenadante da precipitação de proteínas precisa ser diluído com o Reagente de Ajuste (art. 87019) para que seja possível trabalhar com o volume de injeção reduzido de 10 µL. Dilua o sobrenadante com o Reagente de Ajuste (4 partes por volume de sobrenadante + 1 parte por volume de Reagente de Ajuste, por exemplo, 160 µL de sobrenadante + 40 µL de Reagente de Ajuste) e misture vigorosamente.

Se o nível do calibrador estiver fora da faixa linear do espectrômetro de massa, também é possível diluir o sobrenadante com o Tampão de Diluição (art. 87018) em qualquer proporção como primeiro passo e, em seguida, misturar vigorosamente este sobrenadante diluído com o Reagente de Ajuste na proporção de 4 + 1 em um segundo passo.

Vida útil de armazenamento das amostras preparadas

A vida útil de armazenamento das amostras preparadas foi determinada com base nos produtos da matriz e em amostras de sangue total com K3-EDTA e heparina de lítio.

Vida útil de armazenamento das amostras preparadas

Temperatura de armazenamento	Vida útil de armazenamento	Outras condições de armazenamento
+20 a + 25°C	1 semana ou 1 dia*	Protegido da luz, bem fechado, frasco de vidro
+2 a +8°C	2 semanas	
Abaixo de -18°C	2 semanas	

*Se você estiver diluindo com o Reagente de Ajuste (art. 87019), a vida útil de armazenamento das amostras preparadas a +20 a +25°C diminui para um dia. Em contrapartida, para amostras preparadas sem diluição ou diluídas com o Tampão de Diluição (art. 87018), a vida útil de armazenamento é de uma semana.

Todas as outras condições de armazenamento não estão associadas a quaisquer diferenças no prazo de validade entre os diferentes tipos de amostra diluída.

Seja diluída com o Tampão de Diluição (art. 87018) ou com o Reagente de Ajuste (art. 87019), as amostras preparadas na placa de coleta devem ser armazenadas a +8°C no amostrador automático refrigerado e analisadas em até 3 dias. Para armazenamento prolongado, transfira as amostras preparadas para frascos de vidro e feche-os hermeticamente.

Manipulação de amostras fora da faixa linear

Amostras reais com concentrações de analito acima da faixa linear (ver item "*Limite inferior de quantificação (LLOQ) e linearidade (limite superior de quantificação)*") no item "Dados de desempenho") devem ser manuseadas da seguinte forma:

As amostras iniciais de sangue total podem ser diluídas com solução de NaCl a 0,9% até uma proporção de 1:10 antes do preparo da amostra, de modo que o resultado analítico esteja na faixa linear e, idealmente, na faixa de calibração do método, sem levar em consideração o fator de diluição.

As amostras são então preparadas de acordo com o item "Preparação da amostra".

Para o cálculo da concentração do analito das amostras de sangue total previamente diluídas, o fator de diluição deve ser levado em consideração.

Aquisição e avaliação de dados

Realize uma calibração completa do sistema de análise para cada série de medições. Utilize os calibradores multiníveis 6PLUS1® (art. 87039) para essa finalidade. As concentrações dos diversos analitos nos calibradores variam conforme o lote. Os níveis exatos são fornecidos na bula do produto. As curvas de calibração são construídas calculando a razão entre a área do pico do analito e a área do pico do padrão interno (ISTD) no eixo y em função das concentrações dos calibradores no eixo x. Em seguida, plote uma curva de calibração para todos os analitos usando regressão linear e ponderação 1/x.

Para garantir que as condições de LC-MS/MS dentro da sequência de medição não tenham sido alteradas, injete os controles *MassCheck*® preparados pelo menos uma vez durante e ao final de uma série de amostras.

Verifique periodicamente a precisão e a resolução de massa do espectrômetro de massas e recalibre-o caso observe desvios. Leia as informações no manual de instruções do seu espectrômetro de massa antes de prosseguir e entre em contato com o fabricante do equipamento caso necessite de mais informações.

Controle de qualidade

Monitore a precisão e a exatidão das análises incluindo controles adicionais (controles *MassCheck*®, art. 0273, 0274, 0275) em cada análise. Se a análise desses controles apresentar valores fora da faixa indicada no folheto informativo que acompanha o produto, verifique o sistema. Se a discrepância persistir, recalibre o sistema.

CÁLCULO MANUAL

Os quocientes das intensidades de sinal dos analitos divididos pelas intensidades de sinal do padrão interno, plotados em função das concentrações dos analitos, produzem uma curva de calibração por regressão linear ponderada por 1/x.

A equação resultante é aplicada para cada substância.

- Área do pico do analito A no cromatograma MRM
= $A_{amostra}$

- Área do pico do Padrão Interno no cromatograma MRM
= $IS_{amostra}$

- Inclinação da curva de calibração
= a

- Intersecção com o eixo y da curva de calibração
= b

Calcule a concentração do analito A na amostra C_{amostra} da seguinte forma:

C_{amostra} =
$$\frac{(A_{amostra} / IS_{amostra} - b)}{a}$$

FATORES DE CONVERSÃO

Substância	µg/L a nmol/L	nmol/L a µg/L
Tiamina pirofosfato (TPP)	X 2,357	X 0,4243
Piridoxal 5'-fosfato (PLP)	X 4,047	X 0,2471

INTERVALOS DE REFERÊNCIA

Os intervalos de referência indicados servem como orientação baseada na literatura [1, 2]. Eles podem diferir de outros dados publicados. Como os níveis variam de acordo com a população de pacientes e o método de medição, determine intervalos de referência específicos para o seu laboratório. Ao definir os intervalos, certifique-se de cumprir as exigências nacionais locais.

Nos estudos de Steen G. e van der Zwaal M. [1, 2], foram coletadas amostras de sangue com heparina-lítio de pelo menos 20 homens e 20 mulheres de várias faixas etárias (18–30, 31–40, 41–50, 51–60, 61–70 e > 70 anos). Aplicou-se um questionário para verificar os seguintes critérios de exclusão: uso de suplementos orais de vitaminas ou ferro, uso de anticoagulantes, diabetes, gravidez e uso de contraceptivos orais. As análises foram realizadas utilizando ensaio de fluorescência por HPLC após derivatização.

Intervalos de referência [1, 2]

	Vitamina B1 (TPP)	Vitamina B6 (PLP)
Intervalo 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	254	256
Método estatístico do intervalo de referência	Média ± 2x desvio-padrão	Remoção dos 2,5% superiores e dos 2,5% inferiores dos resultados
Correlação entre resultados obtidos e idade	Nenhuma	Diminuição com o aumento da idade 18–30 anos: 129±34 nmol/l; >70 anos: 90±31 nmol/l Efeito fraco: não foram estabelecidos intervalos de referência por faixa etária
Correlação entre resultados obtidos e sexo	Nenhuma	Nenhuma

DADOS DE DESEMPENHO

Recuperação

A recuperação relativa foi determinada usando matrizes de sangue total com EDTA e heparina. A matriz foi enriquecida repetidamente com os analitos para esse fim. Três níveis de concentração dentro das faixas de trabalho dos analitos foram investigados para esse fim.

Taxas de recuperação, determinadas com espectrômetro de massa SCIEX 4500MD™, sangue total com EDTA

Substância	Taxa de recuperação em sangue total com EDTA (concentração sobrecarregada)	
Tiamina pirofosfato (TPP)	96% (40 µg/L)	98% (200 µg/L)
Piridoxal 5'-fosfato (PLP)	93% (20 µg/L)	96% (200 µg/L)

Taxas de recuperação, determinadas com espectrômetro de massa SCIEX 4500MD™, sangue total com heparina

Substância	Taxa de recuperação em sangue total com heparina (concentração sobrecarregada)	
Tiamina pirofosfato (TPP)	97% (40 µg/L)	101% (200 µg/L)
Piridoxal 5'-fosfato (PLP)	94% (20 µg/L)	96% (200 µg/L)

Limite inferior de quantificação (LLOQ) e linearidade (limite superior de quantificação)

A linearidade foi determinada pela adição de quantidades definidas de substâncias padrão a amostras de sangue total com EDTA e heparina. O limite inferior de quantificação (LLOQ) foi determinado usando diluições definidas de amostras de sangue total com EDTA e heparina com matriz livre de analito. O método é linear do limite inferior de quantificação (LLOQ) ao limite superior de quantificação declarado (faixa linear).

Limite de quantificação e linearidade, determinação com espectrômetro de massa SCIEX 4500MD™, diluição 1+1 com tampão de diluição

Substância	Matriz	LLOQ	Faixa linear até pelo menos
Tiamina pirofosfato (TPP)	Sangue total com EDTA	3,3 µg/L	875 µg/L
	Sangue total com heparina	3,4 µg/L	875 µg/L
Piridoxal 5'-fosfato (PLP)	Sangue total com EDTA	2,6 µg/L	1000 µg/L
	Sangue total com heparina	2,8 µg/L	1000 µg/L

Limite de quantificação e linearidade, determinação com espectrômetro de massa SCIEX 4500MD™, diluição com Reagente de Ajuste

Substância	Matriz	LLOQ	Faixa linear até pelo menos
Tiamina pirofosfato (TPP)	Sangue total com EDTA	3,5 µg/L	875 µg/L
	Sangue total com heparina	3,3 µg/L	875 µg/L
Piridoxal 5'-fosfato (PLP)	Sangue total com EDTA	2,6 µg/L	1000 µg/L
	Sangue total com heparina	2,9 µg/L	1000 µg/L

Precisão intra-ensaio:

Os dados de desempenho foram determinados com base em pelo menos 5 amostras diferentes, por processamento duplo em 20 dias diferentes, com 2 execuções por dia. O procedimento baseia-se na CLSI EP05-A3 e corresponde a um delineamento de teste 20 × 2 × 2.

Precisão (repetibilidade)

Substância	Amostra	Média	Repetibilidade	
			CV	IC 95%
Tiamina pirofosfato (TPP)	Sangue total com EDTA	47,8 µg/L	2,2%	1,8–2,8%
	Sangue total com heparina	45,2 µg/L	2,2%	1,8–2,9%
	CQ I	25,9 µg/L	1,9%	1,6–2,5%
	CQ II	61,2 µg/L	2,3%	1,9–3,0%
	CQ III	98,2 µg/L	2,1%	1,8–2,7%
Piridoxal 5'-fosfato (PLP)	Sangue total com EDTA	19,1 µg/L	4,8%	4,0–6,2%
	Sangue total com heparina	18,2 µg/L	5,2%	4,3–6,7%
	CQ I	18,3 µg/L	4,6%	3,8–5,9%
	CQ II	39,3 µg/L	4,7%	3,8–6,0%
	CQ III	59,7 µg/L	4,8%	3,9–6,2%

Substância	Amostra	Média	Precisão intra-laboratorial	
			CV	IC95%
Tiamina pirofosfato (TPP)	Sangue total com EDTA	47,8 µg/L	2,7 %	2,3–3,2 %
	Sangue total com heparina	45,2 µg/L	2,9 %	2,5–3,5 %
	CQ I	25,9 µg/L	2,8 %	2,4–3,5 %
	CQ II	61,2 µg/L	2,6 %	2,2–3,0 %
	CQ III	98,2 µg/L	2,5 %	2,1–3,0 %
Piridoxal 5'-fosfato (PLP)	Sangue total com EDTA	19,1 µg/L	6,9 %	5,8–8,4 %
	Sangue total com heparina	18,2 µg/L	7,1 %	6,0–8,5 %
	CQ I	18,3 µg/L	6,2 %	5,3–7,5 %
	CQ II	39,3 µg/L	5,2 %	4,5–6,2 %
	CQ III	59,7 µg/L	5,5 %	4,8–6,6 %

INTERFERENTES

Amostras de sangue total processadas foram enriquecidas com as seguintes substâncias na concentração mais alta esperada sem interferência significativa; os resultados quantitativos não foram influenciados (desvio $\leq 15\%$):

Compostos/metabólitos isobáricos

Adenosina-3',5'-difosfato, adenosina-5'-difosfato, isopiridoxal, piridoxal*, piridoxamina*, piridoxamina-5'-fosfato*, piridoxina*, piridoxina-5'-fosfato*, ácido 4-piridóxico, tiamina*, tiamina-monofosfato*, tiamina-trifosfato*

* Esses metabólitos podem ser convertidos uns nos outros e em PLP ou TPP por meio de reações enzimáticas.

Não se trata de interferências analíticas, mas sim farmacocinéticas.

Vitaminas hidrossolúveis

Ácido ascórbico (vitamina C), biotina, cobalamina (vitamina B12), ácido fólico, niacina, ácido pantotênico (vitamina B5), riboflavina (vitamina B2)

Substâncias farmacêuticas

Acetazolamida, ácido acetilsalicílico, aciclovir, alopurinol, amicacina, anlodipino, amoxicilina, ampicilina, azatioprina, azitromicina, bisoprolol, brivaracetam, captopril, carbamazepina, 10-OH-carbamazepina, carbamazepina-10,11-epóxido, carbamazepina-diol, cefradina, cloranfenicol, clordiazepóxido, cimetidina, ciprofloxacino, claritromicina, clindamicina, dexametasona, diazepam, diclofenaco, digitoxina, digoxina, diidrocodeína, disopiramida, donepezila, enalaprilato, eritromicina, etossuximida, felbamato, furosemida, gabapentina, galantamina, ganciclovir, gentamicina, hidroclorotiazida, ibuprofeno, isoniazida, dinitrato de isossorbida, itraconazol, cetozonazol, lacosamida, lamotrigina, levetiracetam, levofloxacino, levotiroxina, lidocaína, lorazepam, memantina, metformina, metilprednisolona, metilicina, metoclopramida, metoprolol, ácido micofenólico, glicuronídeo do ácido micofenólico, N-acetilprocainamida, nadolol, fluoreto de sódio, N-desmetildiazepam, N-desmetilmesuximida, neomicina, nifedipino, nimodipino, norverapamil, omeprazol, oxazepam, oxcarbazepina, oxipurinol, paracetamol, penicilina G, penicilina V, perampanel, fenobarbital, feniletilmalonamida, fenitoína, prazosina, prednisolona, prednisona, pregabalina, primidona, procainamida, (±)-propranolol, ranitidina, retigabina, rifampicina, risperidona, rivastigmina, rufinamida, salbutamol, ácido salicílico, estiripentol, estreptomicina, sulfametoxazol, sultiam, teofilina, tiagabina, topiramato, tramadol, triantereno, trimetoprima, ácido valproico, vancomicina, verapamil, vigabatrina, zonisamida

Substâncias relevantes para o procedimento descrito acima foram adicionadas às amostras de sangue total nas concentrações máximas esperadas para fins de confirmação. Observou-se a seguinte interferência:

A acetilcisteína é utilizada como expectorante para tosse. Quando a acetilcisteína é adicionada a amostras de sangue total, ocorre um pequeno pico de interferência, não totalmente separado, em todas as transições MRM, logo após o TPP e o padrão interno (IS) associado. A integração fica prejudicada. Isso pode afetar a precisão dos resultados.

A isoniazida, um antibiótico bactericida, interage com a vitamina B6 (PLP) e leva a uma determinação falsamente elevada da vitamina B6 (PLP). Ambas as transições MRM são afetadas.

As seguintes condições de amostra foram simuladas sem interferência significativa; os resultados quantitativos não foram influenciados (desvio $\leq 15\%$):

Hemolisadas:

Não foram realizados testes de hemólise, uma vez que amostras de sangue total podem ser utilizadas tanto frescas quanto após ciclos de congelamento e descongelamento.

Lipêmicas:

Amostras de sangue total foram enriquecidas com diferentes concentrações de uma emulsão lipídica, e as concentrações dos analitos foram comparadas com as da amostra original.

Ictéricas:

Amostras de sangue total foram enriquecidas com bilirrubina não conjugada e conjugada, e as concentrações dos analitos foram comparadas com as da amostra original.

Todos os testes foram realizados em um espectrômetro de massas SCIEX 4500MD™.

Limitações clínicas

Não existem intervalos de referência universalmente aplicáveis para os analitos abrangidos pelo kit de reagentes LC-MS/MS MassChrom® Vitamins B1 and B6 in whole blood. Resultados obtidos por meio de métodos de teste diferentes não podem ser comparados. Os laboratórios devem indicar o método utilizado para a análise, a fim de permitir uma interpretação precisa dos resultados.

Os usuários devem definir seus próprios intervalos de referência com base na avaliação clínica. Fatores de conversão entre diferentes métodos de análise não devem ser utilizados para prever resultados de um paciente específico.

LITERATURA

1. Steen G, Vlasveld L Th, Poot CC, van der Slot-Verhoeven AJ, Castel A. (2009) Onderzoek naar referentiewaarden van laboratoriumonderzoek in een algemeen ziekenhuis: resultaten en bevindingen. *Ned Tijdschr Klin Chem Labgeneesk* 34(1): 35-43.
2. Steen G, van der Zwaal M. (2007) Reference values for vitamin B1 and vitamin B6 in whole blood. *Dialog* 2/07: 3-4, <https://www.chromsystems.com/publications/dialog.html>.

Símbolos utilizados:

	Fabricante
	Número de catálogo
	Quantidade suficiente para <n> ensaios
	Código do lote
	Validade
	Limite de temperatura
	Consultar as instruções para utilização
	Produto para a saúde para diagnóstico <i>in vitro</i>

	Cuidado
	Atenção
	Perigo
	Perigo
	Perigo

Fabricante: Chromsystems Instruments & Chemicals GmbH
Am Haag 12 - 82166 Gräfelfing - Alemanha
Regularizado por: BioSys Ltda
Rua Coronel Gomes Machado, 358, Centro, Niterói, RJ
Cep: 24020-112
CNPJ: 02.220.795/0001-79
Anvisa: 10350840500
SAC: sac@biosys.com.br – 0800 015 1414 / (21) 3907-2534
www.biosys.com.br