

VITAMINA B1 E VITAMINA B6 IN SANGUE INTERO IN FLUORIMETRIA

REF Z85710

Questo prodotto adempie a tutte le esigenze della Direttiva 98/79/CE sui dispositivi medico-diagnostici in vitro (IVD). La dichiarazione di conformità CE è disponibile su richiesta.



ISTRUZIONI PER L'USO

IVD

Per uso diagnostico *in vitro*

CE



EUREKA S.R.L. LAB DIVISION
Via M. D'Antona 28
60033 Chiaravalle (AN) - Italy
Tel +39 071 7450790
eureka-support@sentinel.it
www.eurekakit.com

INDICE

DESTINAZIONE D'USO.....	3
CONTENUTO DEL KIT PER 100 TEST.....	3
ACCESSORI E CONSUMABILI FORNIBILI A PARTE.....	4
STRUMENTAZIONE.....	4
MATRICE – PROCEDURA DI RACCOLTA E CONSERVAZIONE.....	4
VALORI DI RIFERIMENTO	5
PROCEDURA PREANALITICA E ANALITICA	6
GRADIENTE.....	7
CARATTERISTICHE TECNICHE - PARTE I.....	8
CARATTERISTICHE TECNICHE - PARTE II.....	9
CARATTERISTICHE TECNICHE - PARTE III	9
RECUPERO	9
CROMATOGRAMMI DI RIFERIMENTO	10
AVVERTENZE GENERALI	12
ABBREVIAZIONI.....	13
BIBLIOGRAFIA	14
NORME DI RIFERIMENTO.....	15
SIMBOLI IVD.....	16

DESTINAZIONE D'USO

Dispositivo Medico diagnostico *In vitro* per la rilevazione e l'analisi quantitativa di Vitamina B1 e Vitamina B6 in sangue intero come monitoraggio della ipovitaminosi da Vitamina B1 e B6.
Metodo Manuale per uso professionale.

CONTENUTO DEL KIT PER 100 TEST

CONTENUTO	DESCRIZIONE	CONFEZIONAMENTO	AVVERTENZE
Reagente A	Soluzione Diluente	1 x 10 ml	Stoccare a 2-8°C
Reagente B	Soluzione Derivatizzante	4 x 5 mg	Stoccare a 2-8°C
Reagente B1	Soluzione di Ricostituzione 1	4 x 2,5 ml	Stoccare a 2-8°C
Reagente B2	Soluzione Ricostituzione 2	4 x 2,5 ml	Stoccare a 2-8°C
Reagente C	Soluzione Precipitante	1 x 5 ml	Stoccare a 2-8°C
Reagente D	Soluzione Standard Interno	1 x 7 ml	Stoccare a 2-8°C
Reagente E	Soluzione Tampone	1 x 20 ml	Stoccare a 2-8°C
Reagente F	Soluzione Test Vitamina B1	1 x 1 ml	Stoccare a 2-8°C
Reagente G	Soluzione Test Vitamina B6	1 x 1 ml	Stoccare a 2-8°C
Calibratore liofilo su sangue intero		3 x 1 ml	(confezionato separatamente – Codice Z85716 -vedi scheda tecnica)
Reagente M1	Fase Mobile M1	4 x 500 ml	Stoccare a 2-8°C
Reagente M2	Fase Mobile M2	3 x 500 ml	Stoccare a 2-8°C
Provetta conica con tappo tipo Eppendorf da 1,5 ml ambrate		200 Pz	Stoccare a 15-25°C

ACCESSORI E CONSUMABILI FORNIBILI A PARTE

CODICE	DESCRIZIONE	CONFEZIONAMENTO
Z85716	Calibratore per Vitamine B1/B6 su sangue intero	4 x 1 ml
Z85719	Controllo per Vitamine B1/B6 su sangue intero	2 x 5 x 1 ml
Z85711	Fase Mobile M1	4 x 500 ml
Z85721	Fase Mobile M2	4 x 500 ml
ZTF25303154630	Colonna Analitica Hypersil Gold AQ (150 x 4,6 mm - 3 µm)	1 Pz
S90199511	Javelin prefilter (analytical column protection)	1 x 10 Pz
S29004U	Vial ambrate di vetro da 2 ml	1 x 100 Pz
S24717	Insert per vials da 2 ml	1 x 100 Pz
S51820717	Tappi per Vial a calicetto da 15 µl a 1,5 ml e Vial ambrate di vetro da 2 ml	1 x 100 Pz

STRUMENTAZIONE

DESCRIZIONE	AVVERTENZE												
Strumento HPLC con pompa binaria e detector Fluorimetrico	Necessario												
<table><tr><th>Tempo (min)</th><th>λ_{exc}</th><th>λ_{em}</th></tr><tr><td>0</td><td>320</td><td>415</td></tr><tr><td>8.0</td><td>320</td><td>415</td></tr><tr><td>8.01</td><td>367</td><td>435</td></tr></table>	Tempo (min)	λ_{exc}	λ_{em}	0	320	415	8.0	320	415	8.01	367	435	
Tempo (min)	λ_{exc}	λ_{em}											
0	320	415											
8.0	320	415											
8.01	367	435											
Computer gestionale	Necessario												
Autocampionatore	Necessario												

MATRICE – PROCEDURA DI RACCOLTA E CONSERVAZIONE

MATRICE	PROCEDURA
Sangue intero	Prelevare 3 ml di sangue venoso in una provetta con EDTA come anticoagulante. Il campione di sangue intero deve essere stoccato immediatamente al riparo dalla luce in un contenitore chiuso a 2-8°C (stabile 1 settimana). I campioni che non vengono analizzati subito devono essere congelati ad una temperatura che va da -25 a -15°C. Evitare il ricongelamento.

VALORI DI RIFERIMENTO

Vitamine	Range di normalità
Vitamina B1	32 – 95 ng/ml
Piridossale-5'-fosfato (PLP) [Vitamina B6]	8,7 – 27,2 ng/ml

PROCEDURA PREANALITICA E ANALITICA

FASE	DESCRIZIONE																								
Procedura Preanalitica	In una provetta di tipo Eppendorf ambrata aggiungere: • 300 µl di Reagente F • 300 µl di Reagente G • 100 µl di Reagente D • 5 µl di Reagente E • 100 µl di Reagente B (da ricostituire come in <u>FASE 5</u> della Procedura Analitica sotto riportata) Derivatizzare per 25 minuti a 60°C (bagno ad acqua). Incubare a 2-8°C per 2 minuti. Trasferire in vial con insert. Iniettare 2 µl della soluzione nel Sistema HPLC.																								
Procedura Analitica 1	Dispensare in provette di tipo Eppendorf ambrata: <table><tr><td></td><td>Calibratore</td><td>Campione</td><td>Controllo</td></tr><tr><td>Calibratore</td><td>150 µl</td><td></td><td></td></tr><tr><td>Campione</td><td></td><td>150 µl</td><td></td></tr><tr><td>Controllo</td><td></td><td></td><td>150 µl</td></tr><tr><td>Reagente A</td><td>90 µl</td><td>90 µl</td><td>90 µl</td></tr><tr><td>Reagente D</td><td>60 µl</td><td>60 µl</td><td>60 µl</td></tr></table> <u>Vortex per 10 secondi</u>		Calibratore	Campione	Controllo	Calibratore	150 µl			Campione		150 µl		Controllo			150 µl	Reagente A	90 µl	90 µl	90 µl	Reagente D	60 µl	60 µl	60 µl
	Calibratore	Campione	Controllo																						
Calibratore	150 µl																								
Campione		150 µl																							
Controllo			150 µl																						
Reagente A	90 µl	90 µl	90 µl																						
Reagente D	60 µl	60 µl	60 µl																						
2	Aggiungere 40 µl di Reagente C ad ogni provetta di tipo Eppendorf ambrata preparata nella FASE 1. <u>Attenzione: deproteinizzare direttamente sul Vortex per almeno 30 secondi</u>																								
3	Incubare a 2-8°C per 10 minuti Centrifugare a 15.000 rpm per 5 minuti																								
4	Pipettare 200 µl del surnatante in una provetta di tipo Eppendorf ambrata. Aggiungere 200 µl del Reagente E <u>Vortex per 10 secondi</u>																								

5	Ricostituzione del <u>Reagente B</u> Aggiungere al <u>Reagente B</u> 2,5 ml di <u>Reagente B1</u> e 2,5 ml di <u>Reagente B2</u>. <u>Vortex per 10 secondi</u> <i>Questo reagente derivatizzante così preparato NON è stabile. NON va preparato in anticipo e NON va tenuto in frigo. Deve essere preparato esattamente dopo che il surnatante viene diluito con il Reagente E.</i>
6	Aggiungere 100 µl del <u>Reagente B</u> (come ricostituito nelle FASE 5) al surnatante diluito come in FASE 4.
7	Derivatizzare per 25 minuti a 60°C (bagno ad acqua). Incubare a 2-8°C per 2 minuti. Centrifugare a 15.000 rpm per 2 minuti. <u>Il campione così preparato è stabile 2 giorni a 2-8°C</u> Trasferire in vial con insert.
INIEZIONE	Iniettare 5 µl della soluzione nel Sistema HPLC.

GRADIENTE

SISTEMA HPLC [Colonna Analitica Hypersil Gold AQ (150 x 4,6 mm - 3 µm)]

Tempo (min)	% M1 (POMPA A)	% M2 (POMPA B)	Flusso (µl/min)
0	100	0	1200
5.0	100	0	1200
5.1	50	50	1200
6.0	50	50	1200
6.1	0	100	1200
12.0	0	100	1200
12.1	100	0	1200
16.0	100	0	1200

CARATTERISTICHE TECNICHE - PARTE I

ABBREVIAZIONI	SIGNIFICATO
C LLOQ	Concentrazione al limite minimo di quantificazione
C1	Concentrazione bassa
C2	Concentrazione media
C3	Concentrazione alta

ANALITI	CONCENTRAZIONI USATE PER CALCOLARE LA RIPRODUCIBILITÀ E L'ACCURATEZZA (ng/ml)			
	C LLOQ	C1	C2	C3
Vitamina B1	4,5	34,4	103,5	173,6
Vitamina B6	3	13	27,7	42,3

ANALITI	ACCURATEZZA INTRA SERIE (ERRORE RELATIVO %)		ACCURATEZZA INTER SERIE (ERRORE RELATIVO %)	
	C LLOQ (%)	C2 (%)	C LLOQ (%)	C2 (%)
Vitamina B1	8,43	2,80	11,80	6,56
Vitamina B6	10,62	3,57	12,44	6,81

ANALITI	ACCURATEZZA INTRA SERIE (ERRORE RELATIVO %)		ACCURATEZZA INTER SERIE (ERRORE RELATIVO %)	
	C1 (%)	C3 (%)	C1 (%)	C3 (%)
Vitamina B1	4,15	1,34	5,44	8,41
Vitamina B6	10,58	2,02	14,21	5,16

CARATTERISTICHE TECNICHE - PARTE II

ANALITI	RIPRODUCIBILITÀ INTRA SERIE (COEFFICIENTE DI VARIAZIONE %)		RIPRODUCIBILITÀ INTER SERIE (COEFFICIENTE DI VARIAZIONE %)	
	C LLOQ (%)	C2 (%)	C LLOQ (%)	C2 (%)
Vitamina B1	7,45	2,26	10,10	7,84
Vitamina B6	7,55	3,80	8,31	8,50

ANALITI	RIPRODUCIBILITÀ INTRA SERIE (COEFFICIENTE DI VARIAZIONE %)		RIPRODUCIBILITÀ INTER SERIE (COEFFICIENTE DI VARIAZIONE %)	
	C1 (%)	C3 (%)	C1 (%)	C3 (%)
Vitamina B1	3,95	1,59	10,40	10,75
Vitamina B6	1,42	1,93	15,09	9,59

CARATTERISTICHE TECNICHE - PARTE III

ANALITI	LLOD (ng/ml)	LINEARITÀ (ng/ml)	COEFFICIENTE DI CORRELAZIONE R2 + STD DEV
Vitamina B1	1,5	4,5 - 1000	0,9965 ± 0,0019
Vitamina B6	1,0	3 - 500	0,9945 ± 0,0055

RECUPERO

ANALITI	RECUPERO (%)
Vitamina B1	98,4
Vitamina B6	96,2

CROMATOGRAMMI DI RIFERIMENTO

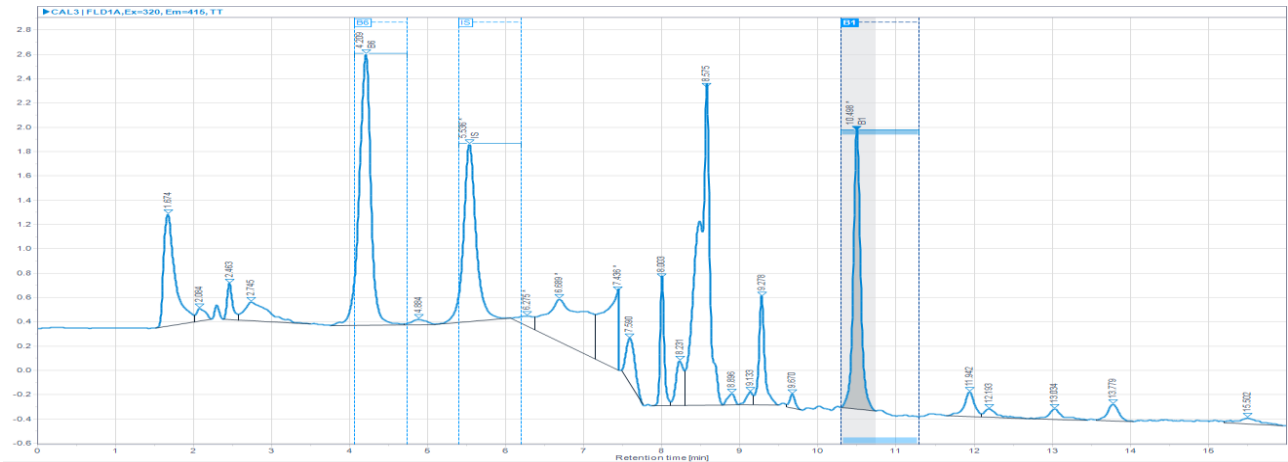


Fig. 1:	Calibratore su sangue intero	
	R.T. 4.02	Vitamina B6 23,5 ng/ml
	R.T. 5.53	Standard Interno
	R.T. 10.49	Vitamina B1 63,2 ng/ml

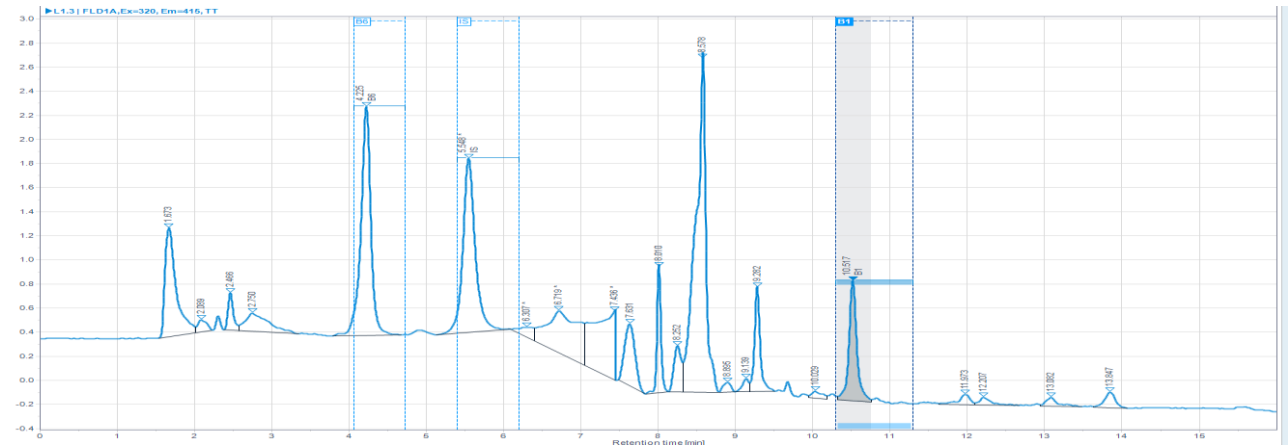


Fig. 2:	Controllo su sangue intero Livello 1	
	R.T. 4.22	Vitamina B6 15,6 ng/ml
	R.T. 5.54	Standard Interno
	R.T. 10.51	Vitamina B1 30,8 ng/ml

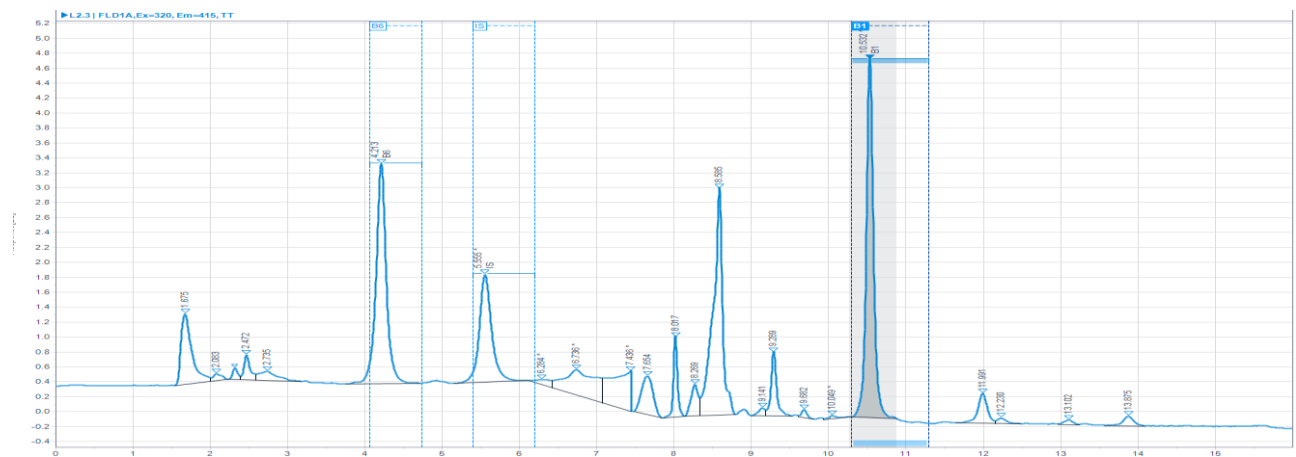


Fig. 3:	Controllo su sangue intero Livello 2	
	R.T. 4.21	Vitamina B6 32,8 ng/ml
	R.T. 5.55	Standard Interno
	R.T. 10.53	Vitamina B1 105,5 ng/ml

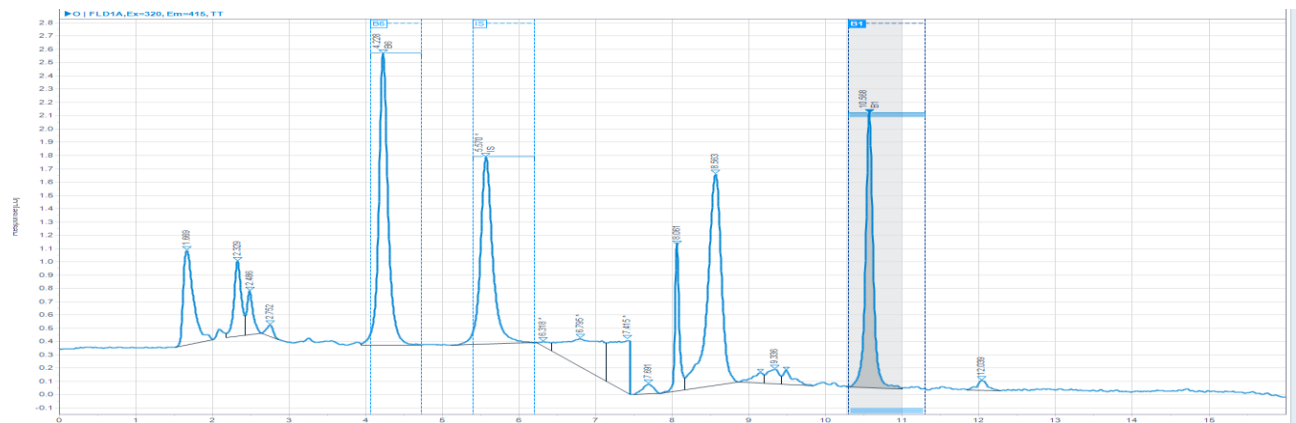


Fig. 4:	Campione reale	
	R.T. 4.22	Vitamina B6
	R.T. 5.57	Standard Interno
	R.T. 10.56	Vitamina B1

AVVERTENZE GENERALI

1. STOCCAGGIO E DURATA DI CONSERVAZIONE

Tutti i componenti sono pronti all'uso tranne il **Reagente B** che va ricostituito come da Procedura Analitica. Sono stabili per 3 anni a 2-8°C.

2. TRATTAMENTO DELLA NUOVA COLONNA

Installare la nuova colonna analitica Hypersil Gold AQ (150 x 4,6 mm - 3 µm), termostata a 25°C. Disconnettere il detector e far passare 20 ml di una soluzione di H₂O:Acetonitrile (20 : 80 v/v) impostando il flusso a 1 ml/minuto. Non riciclare le soluzioni di lavaggio.

3. CONDIZIONAMENTO DELLA COLONNA

Flussare 15 ml di Acqua grado HPLC ad una portata di 1 ml/min. Condizionare la nuova colonna analitica Hypersil Gold AQ (150 x 4,6 mm - 3 µm) con 30 ml di Fase Mobile M1, impostare il flusso a 1 ml/minuto e scaricare. Non è possibile effettuare analisi a ricircolo di fase. Se la Temperatura dell'ambiente è > 20°C, conservare la Fase Mobile a 2-8°C tra una sessione analitica e l'altra.

4. PULIZIA DELLA COLONNA

Disconnettere il detector e fluxare 45 ml di Acqua grado HPLC o di una soluzione di Acido Acetico in Acqua (1,5 ml/l) al flusso di 1 ml/min. Dopodiché fluxare una soluzione composta da H₂O:Acetonitrile (80 : 20 v/v) impostando il flusso a 1 ml/minuto per 15 min. La colonna deve essere stoccata in una soluzione di H₂O:Acetonitrile (20:80 v/v). **Si raccomanda di lavare accuratamente la colonna a fine seduta analitica.**

5. LAVAGGIO SIRINGA AUTOCAMPIONATORE

Lavare la siringa con Acqua di grado HPLC prima dell'utilizzo.

ABBREVIAZIONI

ABBREVIAZIONI	SIGNIFICATO
es. 5 x 1 x 1 ml	N° di livelli x N° di vials x volume
SI	Standard Interno
pz	Pezzo/Pezzi
RT	Tempo di Ritenzione
STD DEV	Deviazione Standard

BIBLIOGRAFIA

1. The Reaction of Pyridoxal S-Phosphate with Cyanide and Its Analytical Use. VINCENZO BONAVITA, From the Graduate Department of Biochemistry, Brandeis University, Waltham, Massachusetts (1960)
2. G.J. den Ottolander, Diagnostisch Kompas, S.441(*) (1997)
3. Piridoxal Phosphate decreases in plasma but not Erythrocytes during systemic inflammatory response. Taiwar-Quasim-Mcmillan (2003)
4. A simple and effective Method for HPLC quantification of simultaneous vitamin B1 and vitamin B6 from whole blood. Wei-Orlowicz-Pike (2014)
5. Washout of water-soluble vitamins and of homocysteine during haemodialysis: Effect of high-flux and low-flux dialyser membranes JUDITH HEINZ, UTE DOMRÖSE, SABINE WESTPHAL, CLAUS LULEY, KLAUS H NEUMAN and JUTTA DIERKES (2008)

NORME DI RIFERIMENTO

Sistema di **Garanzia della Qualità** conforme alle normative:

UNI CEI EN ISO 13485:2016,

UNI EN ISO 9001:2015

Ogni modifica apportata al Dispositivo Medico se non autorizzata da Eureka S.r.l. - Lab Division rende la presente dichiarazione non valida.

Si dichiara che i dispositivi in oggetto ottemperano alle seguenti **Norme Tecniche**:

UNI CEI EN ISO 14971:2012

UNI CEI EN ISO 15223-1:2017

UNI EN ISO 18113-2:2012

Si dichiara che il dispositivo in oggetto viene commercializzato in confezione non sterile.

SIMBOLI IVD

NUMERO	SIMBOLO	DESCRIZIONE
1		Fabbricante
2		Numero di catalogo
3		Avvertenze
4		Numero di lotto del prodotto
5		Utilizzare entro
6		Consultare le istruzioni per l'uso
7		Data di fabbricazione
8		Limite di temperatura
9		Per uso diagnostico <i>in vitro</i>
10		Conformità Europea
11		Confezione