



VITAMIN B₆

Pyridoxal-5'-Phosphate ³H-REA

RK-VB6 100 tests

Revision date: 2008-10-29

INTENDED USE

The BÜHLMANN Vitamin B₆ radio-enzymatic assay (REA) is intended for the quantitative *in vitro* diagnostic determination of Pyridoxal 5'-Phosphate (PLP, vitamin B₆) in EDTA-Plasma (1-4).

PRINCIPLE OF THE ASSAY

³H-tyrosine is decarboxylated by the vitamin B₆-dependent enzyme tyrosine apodecarboxylase (Y-apoDC) from *Streptococcus faecalis* to ³H-tyramine. The activity of tyrosine apodecarboxylase is quantitatively dependent on the amount of pyridoxal 5'-phosphate present in the reaction mixture. The ³H-tyramine thus produced is selectively extracted in the scintillation cocktail (the excess of ³H-tyrosine remains in the aqueous phase) and can be measured by liquid scintillation counting.

REAGENTS SUPPLIED AND PREPARATION

Reagents	Quantity	Code	Reconstitution
Incubation Buffer Acetate buffer	1 vial 60 ml	B-VB6-IB	Ready to use
Calibrator Lyoph. pyridoxal 5'-phosphate (PLP) ¹⁾	3 vials	B-VB6-CA	Reconstitute with 1 ml of Incubation Buffer
Control Low/Normal ²⁾ lyophilized human serum	3 vials	B-VB6-CONSET	Reconstitute with 1 ml of Incubation Buffer
Enzyme Buffer	1 vial 6 ml	B-VB6-EB	Ready to use
Enzyme lyoph. Y-apoDC from <i>S. faecalis</i>	1 vial	B-VB6-E	Reconstitute with 5.5 ml of Enzyme Buffer
Tracer ³ H-tyrosine	1 vial 5.5 ml	B-VB6-TR	Ready to use
Borate Buffer	1 vial 21 ml	B-VB6-BB	Ready to use
Scintillation Powder ³⁾	1 vial 0.96 g	B-VB6-SCP	Dissolve in a mixture of 80 ml ethyl acetate and xylene each

Table 1

¹⁾ Lot specific amounts of PLP in rabbit serum. Refer to the additional QC data sheet. **Do not store reconstituted Calibrators**, but reconstitute a fresh Calibrator vial each time an assay is performed. After reconstitution, proceed immediately to the Calibrator dilution.

²⁾ Lot specific amount of PLP in human serum. Refer to the additional QC data sheets. **Do not store reconstituted Low and Normal Control**, but reconstitute a fresh control vial each time an assay is performed.

³⁾ The following **non-Xylene** scintillation fluid is an acceptable substitute for the Scintillation Powder: Ultima Gold F (PerkinElmer # 6013329). Mix 80 ml of Ultima Gold F with 80 ml of ethyl acetate to obtain the scintillation reagent. Store in a **brown** glass bottle at 18-28°C for up to 6 months.

STORAGE AND SHELF LIFE OF REAGENTS

Unopened Reagents	
Calibrators, Controls, Enzyme and Enzyme Buffer are to be stored at -20°C. Store the Incubation Buffer and the Tracer at 2-8°C. Borate Buffer and Scintillation Powder may be stored at 18-28°C. Do not use past kit expiration date printed on the labels.	
Opened / Reconstituted Reagents	
Incubation Buffer	Store at 2-8°C
Tracer	
Controls	Do not Store reconstituted
Calibrator	
Enzyme	Stable for 3 months at -20°C. Aliquot if repeated use is expected.
Enzyme Buffer	Store at -20°C
Borate Buffer	Store at 18-28°C
Scintillation Powder	Store at 18-28°C in a brown glass bottle.

Table 2

WARNINGS AND PRECAUTIONS

This kit contains **radioactive material** which does not exceed 518 kBq (14 µCi) of Tritium (³H) for the RK-VB6. The receipt, acquisition, possession, use and transfer are subject to the local regulations. Concerning the proper precautions for the handling and disposal of kit reagents, radioactive material, radioactive waste and patient specimens, we highly recommend to first consult the special local regulations of your country.

Reagents Containing Human Source Material: The Controls (B-VB6-CONSET) of this kit contain components of human origin. Each serum used in the preparation of the kit components was tested by a FDA-approved method and found negative for HBV surface antigen, HCV and HIV1/2 antibodies. Although those methods are highly accurate, there is no guarantee that this material cannot transmit Hepatitis or AIDS. *Therefore, all patient specimens and kit components should be handled as if capable of transmitting infections.* All products containing human source material should be handled in accordance with good laboratory practices using appropriate precautions.

MATERIALS REQUIRED BUT NOT PROVIDED

- 25 µl, 50 µl, 500 µl and 1000 µl precision pipettes and multipipette with disposable tips.
- 5 ml volumetric pipette.
- Cylinders and brown glass bottle necessary for preparation of scintillation cocktail.
- Ethyl acetate p.a. (e.g. Merck no. 9623).
- Xylene p.a. (e.g. Merck no. 8681).
- Disposable polypropylene, polystyrene or glass tubes for preparation of calibrator and sample dilutions.
- Disposable 2 ml polypropylene tubes with tight screw-caps for the assay (preferably Sarstedt minitubes no. 72.693).
- Water bath set at 37°C.
- Scintillation vials.
- Beta-counter.

SPECIMEN COLLECTION AND STORAGE

The patient must not have a radioisotope scan prior to the collection of a blood sample.

A minimum volume of 0.5 ml of blood is recommended for duplicate determinations. Draw blood into an EDTA venipuncture tube. Centrifuge for 15 minutes at 1000 x g and 2-8°C immediately after collection. **Avoid exposure to light.** After centrifugation, collect the plasma in suitable tubes and store at -20°C or less if not assayed immediately. PLP in plasma will remain stable for up to 2 years if stored at -20°C or less and protected from light. Avoid repeated freeze-thaw cycles.

ASSAY PROCEDURE

Protect calibrators, controls and diluted plasma samples from exposure to direct light during the entire assay.

Preparation of Calibrators: In order to prepare an entire standard curve, 1:2 serial dilutions of the PLP Calibrator stock solution are required as follows:

1. Label five tubes A through E.
2. Pipet 500 µl of Incubation Buffer into tubes A – D.
3. Pipet 500 µl of PLP stock Calibrator into tubes E and D, vortex tube D.
4. Transfer 500 µl from tube D to tube C, vortex tube C.
5. Serially transfer 500 µl from tube C to tube B and then from tube B to tube A, vortex following each transfer.

Table 3 illustrates a complete standard curve prepared from 1:2 serial dilutions of a stock Calibrator Solution (example

with a lot-specific value of 192 nmol/l) and the resulting values of the individual working calibrators:

Tube	Blank	A	B	C	D	E
Final Dilution	Inc. Buffer	1:16	1:8	1:4	1:2	Stock Calibrator
Conc. [nmol/l]	0	12	24	48	96	192

Table 3

Note: The Calibrator solutions contain an effective concentration of PLP which is 20-fold lower than indicated in the table above for equalizing the 1:20 sample dilution (see below: Dilution of specimens). Therefore, sample and control values can be directly read from the standard curve without recalculation.

Dilution of Specimens: Patient samples must be diluted 20-fold just prior to performing the assay: Pipet 50 µl of EDTA plasma into a disposable Polypropylene, Polystyrene or Glass tube. Add 950 µl of Incubation Buffer and vortex.

Note: Controls must not be diluted.

Radioenzymatic Assay (REA)

1. Prepare eight suitable screw-cap microtubes (Sarstedt minitubes no. 72.693 or equal) in duplicate for blank, calibrators and controls. Prepare additional tubes in duplicate for patient samples.

Note: Do not label any of these tubes or caps. Any marks on the tubes or caps will quench the Scintillation counting efficiency.

- 2a. Pipet 25 µl of Incubation Buffer into the blank tubes.
- 2b. Pipet 25 µl of standard dilutions A to E into the corresponding tubes.
- 2c. Pipet 25 µl of Low and Normal Controls into the corresponding tubes.
- 2d. Pipet 25 µl of each diluted patient sample into the corresponding tubes.
3. Add 25 µl of Incubation Buffer to all tubes.
4. Add 50 µl of Enzyme solution to all tubes. Vortex.
5. Incubate all tubes for 30 ± 1 minutes in a water bath set at 37°C.
6. Add 50 µl of (³H)-tyrosine Tracer solution to all tubes. Cover the tubes and vortex.
7. Incubate all tubes for 60 ± 1 minutes in a water bath set at 37°C.
8. Pipet 200 µl of Borate Buffer into each tube.
9. Immediately add 1.5 ml of scintillation cocktail to all tubes. Screw caps on tightly.
10. Vortex each tube for at least 10 seconds. Incubate all tubes for 2 hours ± 5 min in a water bath set at 37°C to complete the extraction. Again, vortex each tube for at least 10 seconds.
11. Place each tube into an individual scintillation vial. Label the caps of the scintillation vials. Equilibrate scintillation vials for at least 60 minutes at 18-28°C in the dark.
12. Count each vial for 2 minutes in a Beta-counter.

RESULTS

Standard Curve: Record the counts per minute (cpm) for the blank and for the standard tubes. Calculate the mean cpm for each pair of tubes. Subtract the mean assay blank (blank tubes) from the respective mean of each pair of tubes:

$$cpm_{net} = cpm_{average} - cpm_{average\ blank}$$

Prepare a log-log graph paper and plot the net cpm (vertical axis) versus the pyridoxal 5'-phosphate (PLP) concentration in nmol/l (horizontal axis) for each of the calibrators. Draw the best fitting curve or calculate the standard curve using a four parameter algorithm.

Samples and Controls: Record the mean cpm for each pair of tubes. Subtract the mean assay blank (blank tubes) from the respective mean of each pair of tubes:

$$cpm_{net} = cpm_{average} - cpm_{average\ blank}$$

Locate the net cpm value of the Controls and samples on the vertical axis of the standard curve, draw a horizontal line intersecting the standard curve and read the pyridoxal 5'-phosphate (PLP) concentration in nmol/l from the horizontal axis. Since the 1 in 20 sample dilution is already considered by the standard labeling indicated, sample and control values can be read directly from the standard curve without recalculation. Samples which have been further diluted, because their concentrations were above the highest standard, should be multiplied by the additional dilution factor. Samples that fall below the sensitivity of the assay (<2.6 nmol/l) should be reported as "non-detectable".

Standardization: The BÜHLMANN PLP standard consists of a rabbit serum pool which is calibrated in at least 10 independent runs against a weighed-in preparation of PLP. The PLP material is checked for purity and proper concentration by UV scanning spectroscopy immediately before using it for calibration.

See Table 16 and Figure 1 for examples of results and standard curves. *These results and standard curves are for demonstration purposes only. A standard curve must be generated for each set of samples to be assayed.*

QUALITY CONTROL

A thorough understanding of this instruction for use is necessary for the successful use of the product. Reliable results will be obtained only by using precise laboratory techniques (current GLP guidelines) and accurately following this instruction for use.

The reproducibility of standard curve parameters and control values should be within established limits of laboratory acceptability. The confidence limits for the Controls are lot-specific and printed on the QC Data Sheet added to the kit. Because no international pyridoxal-5'-phosphate reference preparations are available the use of at least one additional pool serum is recommended for internal quality control.

If the precision of the assay does not correlate with the established limits and repetition excludes errors in technique, check the following issues: i) pipetting, temperature controlling and timing devices ii) expiration dates of reagents iii) storage and incubation conditions iv) purity of water.

LIMITATIONS AND TROUBLE SHOOTING

- Since PLP is light-sensitive (5), PLP Calibrator and Controls must be protected from light. It is also recommended to perform the vitamin B₆ REA protected from exposure to direct light.
- Do not label neither calibrator, control and sample tubes, respectively, nor corresponding caps. Any marks on the tubes or caps will reduce (quench) the scintillation counting efficiency. Labeling the caps of scintillation vials is allowed.
- Counting time should be sufficient to prevent statistical counting error: e.g., accumulation of 2000 cpm will yield 2.2% counting error, 10000 cpm will yield 1% counting error.
- PLP values should be used as supplementary data available to the physician in developing a diagnosis.

PERFORMANCE CHARACTERISTICS

Intra-Assay Precision (Within-Run): 4.6%. The intra-assay precision was calculated from the results of 15 pairs of values from each sample in a single run (n=3). The values are presented in Table 17 as nmol/l of PLP.

Inter-Assay Precision (Run-to-Run): 9.2%. The inter-assay precision was calculated from the results of 10 pairs of values (n=3) in 10 consecutive runs (over 15 days). The values are presented in Table 18 as nmol/l of PLP.

Specificity: Several compounds were substituted in the vitamin B6 assay and showed the cross-reactivities presented in Table 19.

Spiking Recovery: 99.8%. Two EDTA plasma samples containing a low (sample 1) and a normal (sample 2) endogenous PLP concentration, respectively, were spiked with equal volumes of synthetic PLP solutions and subsequently analyzed according to the assay procedure. The results are presented in Table 20.

Dilution Linearity/Parallelism: 101.4%. Two human EDTA plasma samples containing high concentrations of endogenous PLP were diluted serially with Incubation Buffer and subsequently analyzed according to the assay procedure. The results are presented in Table 21.

Analytical Sensitivity: 2.6 nmol/ml. Ten zero standard replicates were assayed in a single run. The minimum detectable concentration of PLP was calculated to be **2.6 nmol/l** by adding two standard deviations to the mean Blank cpm and intersecting this value with the standard curve obtained in the same run. Since the 1:20 dilution of plasma samples has already been taken into consideration for the calculation the effective sensitivity of the assay is 0.13 nmol/l.

Method Comparison: 100 EDTA plasma samples were split and analyzed by the BÜHLMANN Vitamin B₆ REA and by High-Performance Liquid Chromatography (HPLC). A linear regression analysis of the results is presented in Figure 2. The range of values was 8.0-146.5 nmol/l (mean = 39.8) for the REA and 0-117.5 nmol/l (mean = 29.1) for HPLC, respectively (6).

The REA values are some 30% higher than the HPLC values. This might be caused by the retention of PLP in the protein precipitate during the deproteinization step proceeding HPLC analysis.

EXPECTED VALUES

In a study using EDTA plasma samples from 123 apparently healthy donors supplied by the Swiss Red Cross Center in Basel, the **normal values** for pyridoxal 5'-phosphate (PLP) displayed in Table 22 were found.

These normal ranges should be used as guidelines only. It is recommended that each laboratory establishes its own expected range for its patient population.

ANWENDUNGSZWECK

Der BÜHLMANN Vitamin B₆ Radioenzymatische Test (REA) wird für die quantitative *in vitro* diagnostische Bestimmung von Pyridoxal 5'-Phosphate (PLP, Vitamin B6) in EDTA Plasma verwendet (1-4).

PRINZIP DER METHODE

³H-Tyrosine wird durch das Vitamin B₆ abhängige Enzym Tyrosin Apodecarboxylase (Y-apoDC) von Streptococcus faecalis zu ³H-Tyramine decarboxyliert. Die Aktivität der Tyrosin Apodecarboxylase ist quantitativ abhängig von der vorhandenen Menge Pyridoxal 5'-Phosphat in der Lösung. Das dadurch entstandene ³H-Tyramine wird selektiv im Scintillationscocktail extrahiert, wobei der Überschuss an ³H Tyrosine in der wässrigen Phase verbleibt. Durch flüssige Scintillationszählung kann das gebildete ³H-Tyramin gemessen werden.

GELIEFERTE REAGENZIEN UND VORBEREITUNG

Reagenzien	Menge	Art.-Nr.	Rekonstitution
Inkubations-Puffer Acetat Puffer	1 Fl. 60 ml	B-VB6-IB	Gebrauchsfertig
Kalibrator Lyoph. pyridoxal 5-phosphat (PLP) ¹⁾	3 Fl.	B-VB6-CA	Mit 1 ml Inkubations-Puffer lösen
Kontrolle tief / normal ²⁾ Lyoph. human Serum	3 Fl.	B-VB6-CONSET	Mit 1 ml Inkubations-Puffer lösen
Enzym-Puffer	1 Fl. 6 ml	B-VB6-EB	Gebrauchsfertig
Enzym lyoph. Y-apoDC aus <i>S. faecalis</i>	1 Fl.	B-VB6-E	Mit 5.5 ml Enzympuffer lösen
Tracer ³ H-Tyrosin	1 Fl. 5.5 ml	B-VB6-TR	Gebrauchsfertig
Borat Buffer	1 Fl. 21 ml	B-VB6-BB	Gebrauchsfertig
Scintillations-Pulver ³⁾	1 Fl. 0.96 g	B-VB6-SCP	In einer Mischung aus je 80 ml Ethyl Acetat und Xylen lösen

Table 4

- ¹⁾ Lot-abhängige Menge an PLP in Kaninchenserum, siehe beigelegtes QC Datenblatt. **Gelöste Kalibratoren können nicht gelagert werden. Bei jeder Testdurchführung muss ein neues Fläschchen gelöst werden.** Nach der Rekonstitution direkt die Kalibratoren Verdünnung durchführen.
- ²⁾ Lot-abhängige Menge an PLP in Humanserum, siehe beigelegtes QC Datenblatt. **Gelöste Kontrollen können nicht gelagert werden.** Bei jeder Testdurchführung muss ein neues Fläschchen gelöst werden.
- ³⁾ Die folgende nicht-Xylen Scintillations-Flüssigkeit ist ein gleichwertiger Ersatz für das Scintillations-Pulver: Ultima Gold F (PerkinElmer Art.-Nr. 6013329). 80 ml Ultima Gold F mit 80 ml Ethyl Acetate zusammen geben und mischen. Für 6 Monate bei 18-28°C in eine r **braunen** Glasflasche haltbar.

LAGERUNG UND HALTBARKEIT DER REAGENZIEN

Ungeöffnete Reagenzien	
Kalibratoren, Kontrollen, Enzym und Enzympuffer müssen bei -20°C gelagert werden. Inkubationspuffer und Tracer bei 2-8°C. Borat Puffer und Scintillations Pulver können bei 18-28°C gelagert werden. Nach Ablauf des Verfallsdatums nicht mehr verwenden.	
Geöffnete / Rekonstituierte Reagenzien	
Inkubations-Puffer	Bei 2-8°C lagern
Tracer	
Kontrollen	Nicht wiederverwenden
Kalibratoren	
Enzym	Bei -20°C für 3 Monate haltbar. Bei mehrmaligem Gebrauch aliquotieren.
Enzym-Puffer	Bei -20°C haltbar.
Borat Puffer	Bei 18-28°C haltbar.
Scintillations-Pulver	Bei 18-28°C in einer braunen Glasflasche lagern.

Table 5

WARNUNG UND VORSICHTSMASSNAHMEN

Radioaktives Material: Die RK-VB6 Testpackung enthält radioaktives Material, welches eine Strahlung von weniger als 518 kBq (14 µCi) an Tritium (^3H) abgibt.

Der Erwerb sowie der Gebrauch von radioaktivem Material müssen entsprechend der landesspezifischen Bestimmungen erfolgen.

Wir empfehlen dringend sich über die lokalen Bestimmungen Ihres Landes betreffend der Vorsichtsmassnahmen beim Gebrauch und der Entsorgung von Kitreagenzien, radioaktivem Material und Patientenproben zu informieren.

Reagenzien mit Humanmaterial: Die Kontrollen (B-VB6-CONSET) enthalten Komponenten menschlicher Herkunft. Jedes einzelne Spenderserum wurde durch eine FDA genehmigte Methode auf HBV Oberflächen Antigen, sowie auf HCV und HIV1/2 Antikörper getestet, und als negativ freigegeben. Trotz hoher Genauigkeit dieser Methoden kann keine Garantie gewährleistet werden, dass die Materialien nicht Hepatitis oder AIDS übertragen können. *Aus diesem Grunde müssen diese Kit Komponente, sowie die Patientenproben als potentiell infektiös betrachtet werden.* Alle Produkte welche humanes Material enthalten, müssen mit größter Vorsicht und nach den aktuellen Vorgaben der „Guten Labor Praxis“ verarbeitet werden.

ERFORDERLICHE LABORGERÄTE UND HILFSMITTEL

- 25 µl, 50 µl, 500 µl Und 1000 µl Präzisionspipetten mit Einwegspitzen.
- 5 ml volumetrische Pipette.
- Messzylinder and braune Glassflasche für die Zubereitung des Scintillationscocktails.
- Ethyl Acetat p.a. (e.g. Merck no. 9623).
- Xylen p.a. (e.g. Merck no. 8681).
- Einweg Polypropylen, Polystyren oder Glassröhrchen für die Vorbereitung der Kalibratoren und die Probenverdünnungen.
- 2 ml Einweg Polypropylenröhrchen mit Schraubverschluss für die Testdurchführung (vorzugsweise Sarstedt Minutubes no. 72.693).
- 37°C Wasserbad.
- Scintillationsröhrchen.
- Beta-Counter.

UNTERSUCHUNGSMATERIAL UND LAGERUNG

Vor der Probenentnahme darf der Patient keinen invasiven radiologischen Untersuchungen ausgesetzt werden.

Eine minimale Menge von 0.5 ml Blut ist für die Doppelwertbestimmung erforderlich. Blut in einem EDTA Entnahmeröhrchen sammeln. Unmittelbar nach der Entnahme das Blut 15 Minuten bei 1000 x g und 2-8°C zentrifugieren. **Lichtexposition vermeiden.** Nach der Zentrifugation das Plasma in entsprechenden Röhrchen sammeln und falls nicht direkt getestet wird bei -20°C oder tiefer lagern. Falls die Proben bei -20°C oder tiefer und vor Licht geschützt gelagert werden, ist PLP in Plasma bis zu zwei Jahre stabil. Wiederholtes Auftauen/Einfrieren sollte vermieden werden.

ARBEITSANLEITUNG

Die Kalibratoren, Kontrollen und verdünnten Plasmaproben während der gesamten Testdurchführung vor direktem Licht schützen.

Vorbereitung der Kalibratoren: Um eine vollständige Standardkurve zu erhalten, wird eine serielle 1:2 Verdünnungsreihe des PLP Kalibrators folgendermassen durchgeführt:

1. Fünf Röhrchen A-E markieren.
1. 500 µl Inkubations-Puffer in Röhrchen A-D geben.
2. 500 µl PLP Kalibrator in Röhrchen E und D geben, Röhrchen D vortexen.

3. 500 µl aus Röhrchen D in Röhrchen C transferieren, Röhrchen C vortexen.
4. 500 µl aus Röhrchen C in Röhrchen B geben und danach von Röhrchen B in Röhrchen A geben. Nach jedem Transfer vortexen.

Table 3 zeigt eine vollständige Standardkurve durch serielle 1:2 Verdünnungen aus der Kalibratorlösung (Beispiel mit einem Lot-spezifischen Wert von 192 nmol/l PLP):

Röhrchen	Blank	A	B	C	D	E
Endverdünnung	Inc. Puffer	1:16	1:8	1:4	1:2	Kalibrator
Konz. [nmol/l]	0	12	24	48	96	192

Table 6

Hinweis: Die Kalibratorlösung enthält eine tatsächliche PLP Konzentration, welche 20fach tiefer liegt als in der Tabelle angegeben, dies um die 1:20 Verdünnung der Proben auszugleichen (siehe Probenverdünnung). Dadurch können die Proben und Kontrollwerte direkt aus der Standardkurve herausgelesen werden.

Probenverdünnung: Patientenproben müssen vor der Testdurchführung 20fach verdünnt werden: 50 µl EDTA Plasma in ein Einweg Polypropylen, Polystyren oder Glassröhrchen geben und 950 µl Inkubations-Puffer zugeben, vortexen.

Hinweis: Kontrollen müssen nicht verdünnt werden.

Radioenzymatischer Test (REA)

1. Acht verschliessbare Röhrchen (Sarstedt minutubes Art.-Nr. 72.693 oder ähnliche) im Doppel vorbereiten für Blank, Kalibratoren und Kontrollen. Weitere Röhrchen für die Patientenproben im Doppel vorbereiten.

Hinweis: Weder Deckel noch Röhrchen markieren.

Markierungen auf dem Deckel oder dem Röhrchen beeinträchtigt die Effizienz der Scintillationszählung (Quenching).

- 2a. 25 µl Inkubations-Puffer in das Blankröhrchen geben.
- 2b. 25 µl verdünnte Kalibratoren A bis E in die entsprechenden Röhrchen geben.
- 2c. 25 µl Kontrolle tief und normal in die entsprechenden Röhrchen geben.
- 2d. 25 µl der verdünnten Patientenproben in die entsprechenden Röhrchen geben.
3. 25 µl Inkubations-Puffer zu allen Röhrchen zugeben.
4. 50 µl Enzymlösung zu allen Röhrchen zugeben. Vortexen.
5. Alle Röhrchen für 30±1 Minuten in einem Wasserbad bei 37°C inkubieren.
6. 50 µl (^3H)-Tyrosin Tracer zu allen Röhrchen zugeben. Röhrchen schliessen und vortexen.
7. Alle Röhrchen für 60±1 Minuten in einem Wasserbad bei 37°C inkubieren.
8. 200 µl Borat Puffer in jedes Röhrchen geben.
9. Unmittelbar danach 1.5 ml Scintillationscocktail zu allen Röhrchen zugeben. Deckel gut verschliessen.
10. Jedes Röhrchen für mindestens 10 Sekunden vortexen. Alle Röhrchen für 2 Stunden ±5 Min in einem Wasserbad bei 37°C inkubieren, um die Extraktion zu vervollständigen. Danach jedes Röhrchen für mindestens 10 Sekunden vortexen.
11. Jedes Röhrchen in ein eigenes Scintillationsröhrchen legen. Den Deckel des Scintillationsröhrchens markieren. Die Röhrchen im Dunkeln für mindestens 60 Minuten bei 18-28°C stehen lassen.
12. Jedes Röhrchen für mindestens 2 Minuten in einem Beta-Counter zählen.

RESULTATE

Standardkurve: Für den Blank und die Kalibratoren werden die "counts per minute" (cpm) im Beta-Counter bestimmt. Den Durchschnittswert (average) der Doppelwerte berechnen und den Durchschnittswert vom Blank von jedem berechneten Mittelwert subtrahieren:

$$\text{cpm}_{\text{netto}} = \text{cpm}_{\text{average}} - \text{cpm}_{\text{average Blank}}$$

Auf einem logarithmischen Papier werden auf der vertikalen Achse die netto cpm gegen die PLP Konzentration in nmol/l auf der horizontalen Achse aufgetragen. Danach eine „best fitting curve“ bilden oder durch Verwendung eines vier Parameter Algorithmus berechnen.

Proben und Kontrollen: Den cpm Durchschnittswert für jedes Probenpaar ermitteln und davon den gemittelten Blank subtrahieren (siehe oben)

Den netto cpm Wert der Kontrollen und der Proben auf der vertikalen Achse der Standardkurve lokalisieren und durch Intersektion die PLP Konzentration auf der horizontalen Achse ablesen. Dabei ist die 1:20 Probenverdünnung bereits berücksichtigt und die Proben- und Kontrollwerte können ohne weitere Berechnungen erfasst werden. Proben, welche eine andere Verdünnung aufweisen müssen entsprechend umgerechnet werden. Proben, welche unter die analytische Sensitivität fallen sollten als „nicht nachweisbar“ ausgewiesen werden

Standardisierung: Der BÜHLMANN PLP Kalibrator besteht aus einem Pool aus Kaninchenserum, welcher in mindestens 10 unabhängigen Ansätzen gegen eine eingewogene PLP Menge getestet wurde. PLP wird unmittelbar vor der Verwendung zur Standardisierung mittels einer UV-Spektroskopie auf deren Reinheit und richtige Konzentrierung getestet.

Für ein Beispiel der Resultate und der Standardkurve, siehe Table 16 und Figure 1. Diese Resultate und Standardkurve sind nur zu Demonstrationzwecken gedacht. Eine Standardkurve muß bei jedem Testansatz erstellt werden.

QUALITÄTSKONTROLLE

Ein vollständiges Verständnis dieser Gebrauchsanleitung ist für den erfolgreichen Gebrauch des Produktes notwendig. Zuverlässige Resultate werden nur erreicht, durch die Anwendung „Guter Laborpraxis“ (aktuelle GLP Richtlinien) und die Einhaltung der Arbeitsanleitung.

Die Reproduzierbarkeit der Eichkurvenparameter und der Kontrollwerte sollte innerhalb des etablierten Erwartungsbereichs liegen. Alle Kontrollen müssen im etablierten Vertrauensbereich liegen. Die Vertrauensbereiche der Kontrollen sind Lot-spezifisch und sind auf dem zusätzlichen QC-Datenblatt angegeben. Es wird empfohlen mindestens ein Serum Pool zur internen Qualitätskontrolle mitzutesten, da keine internationale PLP Referenz erhältlich ist. Falls die Präzision des Testes nicht mit dem etablierten Erwartungsbereich übereinstimmt und wiederholte Messungen ein technisches Problem ausschliessen, sind folgende Bedingungen zu überprüfen: i) Pipettierung, Temperatur- und Zeitmessende Geräte, ii) Verfallsdaten der Reagenzien, iii) Lagerung- und Inkubations-Bedingungen, iv) Wasserreinheit.

LIMITIERUNGEN

- Aufgrund der Licht Empfindlichkeit von PLP (5), müssen die Kalibratoren und Kontrollen vor direktem Licht geschützt werden. Es wird auch empfohlen, während der Testdurchführung des Vitamin B₆ REA direkte Lichtexposition zu vermeiden.
- Die Messdauer im Beta-Counter sollte ausreichend sein, um statistische Fehler auszuschliessen: z.B. die Akkumula-

tion von 2000 cpm ergibt einen Zählfehler von 2.2%, 10000 cpm ergeben einen Zählfehler von 1%.

- PLP Werte sollten für den Arzt als zusätzliche Information dienen, um eine Diagnose erstellen zu können.

LEISTUNGSMERKMALE

Intra-Assay Präzision: 4.6%. Die Intra-Assay Präzision wurde aufgrund der Resultate von 15 Doppelwerten berechnet (n=3), welche im gleichen Testansatz durchgeführt wurden. Die Werte sind in Table 17 als nmol/l PLP angegeben.

Inter-Assay Präzision: 9.2%. Die Inter-Assay Präzision wurde aufgrund von 10 Doppelwerten aus 10 aufeinanderfolgenden (über 15 Tage) Testansätzen berechnet (n=3). Die Werte sind in Table 18 als nmol/l PLP angegeben.

Spezifität: Verschiedene Verbindungen wurden anstelle von Vitamin B₆ im REA ausgetestet und zeigten die in Table 19 aufgelisteten Kreuzreaktivitäten.

Wiederfindung: 99.8%. Zwei EDTA Plasmaproben, mit tiefer (Probe 1) und normaler (Probe 2) endogener PLP Konzentration, wurden mit gleicher Menge synthetischem PLP versetzt und anschliessend entsprechend der Arbeitsanleitung getestet. Die durchschnittliche Wiederfindung beträgt 99.8%. Die Resultate sind in Table 20 dargestellt.

Verdünnungslinearität: 101.4%. Zwei humane EDTA Plasmaproben, mit hoher endogener PLP Konzentration, wurden seriell mit Inkubations-Puffer verdünnt und anschliessen entsprechend der Arbeitsanleitung getestet. Die durchschnittliche Verdünnungslinearität beträgt 101.4%. Die Resultate sind in Table 21 dargestellt.

Analytische Sensitivität: 2.6 nmol/ml. Zehn Blank Doppelbestimmungen (Inkubations-Puffer) wurden im gleichen Ansatz durchgeführt. Die minimale nachweisbare PLP Konzentration wurde durch die Addition von zwei Standardabweichungen zum mittleren cpm Blankwert und der darauffolgenden Intersektion in der, im gleichen Ansatz erhaltenen Standardkurve berechnet und beträgt 2.6 nmol/l. Da die 1:20 Verdünnung der Plasmaproben bereits darin enthalten ist, beträgt die tatsächliche Sensitivität des REA 0.13 nmol/l.

Methoden Vergleich: 100 EDTA Plasmaproben wurden aufgeteilt und im BÜHLMANN Vitamin B₆ REA und durch High-Pressure Liquid Chromatography (HPLC) analysiert. Die lineare Regressionsanalyse der Resultate ist in Figure 2 dargestellt.

Der Bereich der im REA erhaltenen Werte liegt zwischen 8.0-146.5 nmol/l (Mittelwert = 39.8) und 0-117.5 nmol/l (Mittelwert = 29.1) mit der HPLC Methodik (6).

Die REA Werte liegen um etwa 30% höher als die HPLC Werte. Dieser Unterschied ist dadurch erklärbar, dass PLP Moleküle in der, vor der HPLC Analyse durchgeführten, Proteinfällung im Präzipitat gebunden bleiben.

NORMALWERTE

In einer Studie mit 123 EDTA Plasmaproben von normalen Blutspendern, erhalten vom Blutspende Zentrum des Schweizerischen Roten Kreuzes in Basel wurden die PLP Normalwerte welche in Table 22 dargestellt sind ermittelt.

Diese Normalwerte sollten nur als Richtlinie verwendet werden. Es wird empfohlen, dass jedes Labor seinen eigenen zu erwartenden Bereich für dessen Patienten Population ermittelt.

UTILISATION

La trousse Vitamine B₆ essai radio-enzymatique (REA) des Laboratoires BÜHLMANN est destinée à la détermination diagnostique quantitative *in vitro* du Pyridoxal 5'-Phosphate (PLP, vitamine B₆) dans le plasma EDTA (1-4).

PRINCIPE DU DOSAGE

La ³H-tyrosine est décarboxylée en ³H-tyramine par la tyrosine apodécarboxylase (Y-apoDC), enzyme dépendant de la tyrosine et obtenu à partir de *Streptococcus faecalis*. L'activité de la tyrosine apodécarboxylase est quantitativement dépendante de la quantité de pyridoxal 5-phosphate présente au cours de la réaction. La ³H-tyramine ainsi produite est sélectivement extraite dans le cocktail de scintillation (l'excès de ³H-tyrosine reste dans la phase aqueuse) et peut être mesurée par le comptage du liquide de scintillation.

REACTIFS FOURNIS ET PREPARATION

Réactifs	Quantité	Code	Reconstitution
Tampon d'incubation Tampon acétate	1 flacon 60 ml	B-VB6-IB	Prêt à l'emploi
Calibrateur PLP ¹⁾ lyophilisé	3 flacons	B-VB6-CA	Reconstituer avec 1 ml de tampon d'incubation
Contrôles faible/normal²⁾ Sérum humain lyoph.	3 flacons	B-VB6-CONSET	Reconstituer avec 1 ml de tampon d'incubation
Tampon Enzyme	1 flacon 6 ml	B-VB6-EB	Prêt à l'emploi
Enzyme lyoph. Y-apoDC de <i>S. faecalis</i>	1 flacon	B-VB6-E	Reconstituer avec 5.5 ml de tampon enzyme
Marqueur ³ H-tyrosine	1 flacon 5.5 ml	B-VB6-TR	Prêt à l'emploi
Tampon Borate	1 flacon 21 ml	B-VB6-BB	Prêt à l'emploi
Poudre de scintillation³⁾	1 flacon 0.96 g	B-VB6-SCP	Dissoudre dans un mélange de 80 ml d'acétate d'éthyle et 80 ml de xylène

Table 7

¹⁾ Concentrations de PLP dans un sérum de lapin spécifiques à chaque lot. Cf. les données de QC additionnelles pour les valeurs exactes. **Ne pas conserver les calibrateurs reconstitués**, mais préparer un nouveau flacon de calibrateur pour chaque essai. Après reconstitution, procéder immédiatement aux dilutions du calibrateur.

²⁾ Concentrations de PLP dans un sérum de lapin spécifiques à chaque lot. Cf. les données de QC additionnelles pour les valeurs exactes. **Ne pas conserver les contrôles reconstitués**, mais préparer de nouveaux flacons de contrôles pour chaque essai.

³⁾ En remplacement de la poudre à reconstituer avec du xylène, il est possible d'utiliser le liquide de scintillation suivant: Ultima Gold F (Canberra Packard no. 6013329). Mélanger 120 ml de Ultima Gold F avec 40 ml d'acétate d'éthyle afin d'obtenir le liquide de scintillation. Il peut être conservé dans une bouteille de verre brun jusqu'à 6 mois à une température ambiante.

STOCKAGE ET PEREMPTION DES REACTIFS

Réactifs fermés	
Les calibrateurs, contrôles, enzyme et tampon enzyme doivent être conservés à -20°C. Le tampon d'incubation et le marqueur radioactif se conservent à -2-8°C. Le tampon borate et la poudre de scintillation se conservent à température ambiante. Ne pas utiliser au-delà des dates de péremption imprimées sur les étiquettes.	
Réactifs ouverts/reconstitués	
Tampon d'incubation	Conservé à -2-8°C
Marqueur	
Contrôles	Ne pas garder après reconstitution
Calibrateur	
Enzyme	Stable pdt 3 mois à -20°C. Aliquoter si l'intégral ité n'est pas utilisée.
Tampon enzyme B	Conservé à -20°C
Tampon borate	Conservé à 18-28°C
Poudre de scintillation	Conservé à 18-28°C dans une bouteille de verre brun

Table 8

MISES EN GARDE ET PRECAUTIONS

Cette trousse contient du **matériel radioactif** n'excédant pas 518 kBq (14 µCi) de tritium (³H) pour la trousse RK-VB6. La réception, l'acquisition, la possession, l'utilisation et le transfert de ce type de matériel doivent se faire en accord avec la réglementation de chaque pays. Nous vous conseillons de prendre contact avec les autorités locales et de suivre scrupuleusement les consignes relatives à la manipulation de matériel radioactif et à la gestion des déchets radioactifs et biologiques (échantillons de patients).

Réactifs contenant du matériel d'origine humaine: les contrôles (B-VB6-CONSET) de cette trousse contiennent des composants d'origine humaine. Chaque unité de sérum de donneur utilisée dans la préparation des réactifs de la trousse a été testée par une méthode approuvée par la FDA et a été séronégative pour l'antigène de surface de l'hépatite B (HBsAg) et pour les anticorps anti-VIH 1/2 et anti- HCV. Cependant, bien que ces méthodes soient très fiables, il ne peut être garanti que ce matériel ne puisse transmettre une hépatite B ou le SIDA.

En conséquence, tous les échantillons et tous les réactifs doivent être manipulés comme s'ils étaient infectieux. Tous les produits contenant du matériel d'origine humaine doivent être manipulés conformément aux bonnes pratiques de laboratoire en respectant les précautions d'usage.

MATERIEL REQUIS MAIS NON FOURNI

- Pipettes de précision de 25 µl, 50 µl, 500 µl et 1000 µl et multi-pipette avec pointes jetables
- Pipette volumétrique de 5ml
- Epprouvettes graduées et bouteilles de verre brun pour la préparation du cocktail de scintillation
- Acétate d'éthyle p.a. (*par exemple* Merck no. 9623)
- Xylène p.a. (*par exemple* Merck no. 8681) ou, alternativement, Ultima Gold F liquide de scintillation (Canberra Packard no. 6013329)
- Tubes jetables en polypropylène, polystyrène ou en verre pour la préparation du calibrateur et les dilutions d'échantillons
- Tubes jetables de 2 ml en polypropylène avec bouchons à visser pour l'essai (de préférence, minitubes Sarstedt no. 72.693).
- Tubes de scintillation
- Bain-marie à 37°C
- Vortex
- Compteur bêta.

PRELEVEMENT ET CONSERVATION DES ECHANTILLONS

Le patient ne doit pas avoir subi de scanner (radioisotope) avant le prélèvement de l'échantillon.

Prélever le sang sur EDTA dans un tube pour ponction veineuse. Un volume minimal de 0.5 ml de sang est recommandé pour une détermination en double. Centrifuger pendant 15 minutes à 1000 x g et à 2-8°C immédiatement après le prélèvement. Eviter l'exposition à la lumière. Après la centrifugation, recueillir le plasma dans des tubes appropriés et conserver à -20°C ou à une température inférieure si l'essai est différé. Le PLP est stable jusqu'à 2 ans dans le plasma conservé à -20°C ou à une température inférieure et à l'abri de la lumière. Eviter les cycles répétés de congélation/décongélation.

PROTOCOLE DE DOSAGE

Protéger le calibrateur, les contrôles et les échantillons de plasma dilués de la lumière directe durant tout le dosage.

Préparation des calibrateurs: dans le but de constituer une courbe d'étalonnage complète, il convient de procéder aux dilutions en série au 1:2 de la solution stock du calibrateur, comme ci-dessous :

1. Marquer 5 tubes de A à E.
2. Pipeter 500 µl de tampon d'incubation dans les tubes de A à D.
3. Pipeter 500 µl de la solution stock du calibrateur PLP dans les tubes de E à D, vortexer le tube D.
4. Transférer 500 µl du tube D au tube C, vortexer le tube C.
5. Transférer en série 500 µl du tube C au tube B puis du tube B au tube A, vortexer après chaque transfert.

Le tableau ci-dessous (Table 3) montre une courbe d'étalonnage intégrale préparée à partir des dilutions en série au 1:2 de la solution stock du calibrateur (exemple avec une concentration spécifique de 192 nmol/l) et les concentrations individuelles des calibrateurs obtenues :

Tube	Blanc	A	B	C	D	E
Dilution finale	Tampon d'incubation	1:16	1:8	1:4	1:2	Solution Stock de calibrateur
Conc. [nmol/l]	0	12	24	48	96	192

Table 9

Remarque: Les calibrateurs présentent des concentrations effectives de PLP qui sont 20 fois plus faibles que celles indiquées dans le tableau ci-dessus afin de correspondre aux dilutions d'échantillons au 1:20 (voir ci-dessous: dilution des échantillons). Pour cette raison, les concentrations d'échantillons peuvent être directement lues sur la courbe d'étalonnage générée sans tenir compte des facteurs de dilution.

Dilution des échantillons: les échantillons de patients doivent être préalablement dilués au 1: 20 :

Pipeter 50 µl de plasma EDTA dans des tubes jetables en polypropylène, polystyrène ou en verre. Ajouter 950 µl de tampon d'incubation puis vortexer. **Remarque:** les contrôles ne doivent pas être dilués.

Essai radioenzymatique (REA)

1. Préparer 8 tubes avec bouchons à visser (minitubes Sarstedt no. 72.693 ou équivalent) en double pour le blanc (calibrateur zéro), les calibrateurs et les contrôles. Préparer autant de minitubes en double qu'il y a d'échantillons à analyser.

Remarque: Ne marquer ni les tubes, ni les bouchons. Toute inscription a une influence sur le comptage !

- 2a. Transférer 25 µl de tampon d'incubation dans les tubes blancs
- 2b. Pipeter 25 µl des dilutions de standards de A à E dans les tubes correspondants.
- 2c. Pipeter 25 µl des contrôles faible et normal dans les tubes correspondants.
- 2d. Pipeter 25 µl de chaque échantillon de patient dilué dans les tubes correspondants.
3. Ajouter 25 µl de tampon d'incubation à tous les tubes.
4. Ajouter 50 µl de l'enzyme en solution à tous les tubes. Vortexer.
5. Incuber tous les tubes pendant 30 ± 1 minutes dans un bain-marie à 37°C.
6. Ajouter 50 µl de marqueur radioactif (³H)-tyrosine à tous les tubes. Couvrir les tubes et vortexer.
7. Incuber tous les tubes pendant 60 ± 1 minutes dans un bain-marie à 37°C.

8. Pipeter 200 µl de tampon borate dans chaque tube.
9. Pipeter immédiatement 1.5 ml de cocktail de scintillation dans les minitubes. Visser soigneusement les bouchons.
10. Vortexer chaque tube durant au moins 10 secondes. Incuber tous les tubes pendant 2 heures ± 5 minutes dans un bain-marie à 37°C afin d'achever l'extraction. Vortexer à nouveau chaque tube durant au moins 10 secondes.
11. Placer chaque tube dans un tube de scintillation individuel. Marquer le bouchon du tube de scintillation. Equilibrer les tubes de scintillation durant au moins 60 minutes à 18-28°C dans l'obscurité.
12. Mesurer chaque tube durant 2 minutes dans le compteur bêta.

RESULTATS

Courbe d'étalonnage: Enregistrer les coups par minute (cpm) pour le "blanc" et les calibrateurs. Calculer la moyenne des cpm pour chaque paire de tubes. Soustraire la moyenne des tubes "blanc" des moyennes précédemment obtenues :

$$\text{cpm}_{\text{nets}} = \text{cpm}_{\text{moyenne}} - \text{cpm}_{\text{moyenne "Blanc"}}$$

Préparer du papier graphique log-log et reporter les cpm nets sur l'axe vertical et les concentrations de pyridoxal 5'-phosphate (PLP) en nmol/l sur l'axe horizontal pour chaque calibrateur. Tracer la courbe ou la calculer au moyen d'un algorithme à quatre paramètres.

Echantillons et contrôles: Enregistrer les coups par minute (cpm) pour chaque paire de tubes. Soustraire la moyenne des tubes "blanc" des moyennes précédemment obtenues :

$$\text{cpm}_{\text{nets}} = \text{cpm}_{\text{moyenne}} - \text{cpm}_{\text{moyenne "Blanc"}}$$

Localiser les valeurs de cpm nets obtenus pour les contrôles et les échantillons sur l'axe vertical de la courbe d'étalonnage, tracer une ligne horizontale jusqu'à l'intersection avec la courbe d'étalonnage et lire la concentration de pyridoxal 5'-phosphate (PLP) en nmol/l sur l'axe horizontal. Comme la dilution au 1:20 est déjà prise en compte, les concentrations des contrôles et des échantillons ne nécessitent aucune correction. Les échantillons ayant nécessité d'autres dilutions doivent être multipliés par le facteur de dilution correspondant. Les échantillons présentant des concentrations inférieures à la limite de détection (<2.6 nmol/l) doivent être définis comme présentant des "concentrations non-detectables".

Standardisation: Le standard PLP des laboratoires BÜHLMANN PLP est un pool sérique de lapin calibre au cours de 10 essais indépendants par rapport à une préparation de PLP pesée préalablement. La pureté et la justesse de la concentration de PLP sont contrôlées par spectroscopie UV immédiatement avant d'être utilisé pour la calibration.

Cf. Table 16 et Figure 1 pour des exemples de résultats et de courbes d'étalonnage. Ces exemples ne sont donnés qu'à titre indicatif. Il convient de générer une courbe d'étalonnage pour chaque dosage d'échantillons.

CONTRÔLE QUALITE

Une lecture exhaustive de ce manuel est recommandée pour l'utilisation correcte de ce produit. Des résultats fiables ne seront obtenus que par un travail en laboratoire précis (bonnes pratiques de laboratoire usuelles) et en suivant fidèlement les recommandations de cette brochure.

La reproductibilité des paramètres de la courbe d'étalonnage ainsi que celle des valeurs des contrôles doivent être comprises dans le domaine des valeurs attendues établies par chaque laboratoire. Les limites de confiance des contrôles sont spécifiques à chaque lot et sont imprimées sur la fiche de QC ajoutée à la trousse.

Comme il n'existe pas de préparation internationale de référence de pyridoxal-5'-phosphate, nous recommandons l'utilisation d'un pool sérique additionnel en tant que contrôle qualité interne.

Si la précision des mesures ne correspond pas aux limites établies et que les répétitions excluent toute erreur technique, il est recommandé de contrôler les paramètres suivants: i) pipetage, appareils de contrôle de température et de temps, ii) date de péremption des réactifs, iii) conditions de stockage et d'incubation, iv) pureté de l'eau.

LIMITATIONS

- Comme le PLP est sensible à la lumière (5), les calibrateurs et les contrôles doivent en être protégés. Il est également recommandé de procéder à l'essai vitamine B₆ REA en évitant soigneusement de travailler à la lumière directe.
- Ne marquer ni les tubes, ni les bouchons (calibrateurs, contrôles et échantillons). Toute inscription a une influence sur le comptage. Le marquage des bouchons des tubes de scintillation est possible.
- Le temps de comptage doit être suffisamment long pour éviter toute erreur statistique de comptage: par exemple, le cumul de 2000 cpm induira une erreur de comptage de 2.2%, alors que 10000 cpm comptés induiront une erreur de comptage de seulement 1%.
- Les valeurs de PLP obtenues doivent être considérées comme des indications complémentaires pour le médecin dans l'établissement de son diagnostic.

CARACTERISTIQUES DE PERFORMANCE

Précision Intra-essai (Within-Run): 4.6%. Elle a été obtenue à partir des résultats de 15 paires de valeurs de chaque échantillon au cours d'un même essai. Les valeurs se trouvent en Table 17 et sont exprimées en nmol/l de PLP.

Précision Inter-essai (Run-to-Run): 9.2%. Elle a été obtenue à partir des résultats de 10 paires de valeurs au cours de 10 essais consécutifs sur 15 jours. Les valeurs se trouvent en Table 18 et sont exprimées en nmol/l de PLP.

Spécificité: Plusieurs composants furent substitués au cours de l'essai vitamine B₆ et présentèrent les réactions croisées présentées en Table 19.

Test de récupération: 99.8%. Deux échantillons de plasma EDTA humain présentant des concentrations endogènes de PLP respectivement faibles (échantillon 1) et normales (échantillon 2) furent additionnés de volumes égaux de solutions de PLP synthétique. Les résultats sont présentés en Table 20.

Linéarité de la dilution/Parallélisme: 101.4%. Deux échantillons de plasma EDTA humain présentant des concentrations endogènes de PLP élevées furent diluées en série avec du tampon de dilution puis analysés d'après le protocole standard. Les résultats obtenus sont présentés en Table 21.

Sensibilité analytique: 2.6 nmol/ml. 10 doubles du calibrateur zéro standard furent analysés au cours d'un même essai. La plus petite concentration de PLP détectable fut définie à 2.6 nmol/l en ajoutant 2 déviations standard à la moyenne des cpm des blancs et en reportant cette valeur sur la courbe d'étalonnage. Comme le facteur de dilution (dilution au 1:20) est pris en compte, la sensibilité effective est de 0.13 nmol/l pour cet essai.

Comparaison de méthodes: 100 échantillons de plasma EDTA furent analysés parallèlement avec la trousse BÜHLMANN Vitamine B₆ REA et par HPLC. L'analyse de la régression linéaire des résultats est présentée en Figure 2.

Les valeurs obtenues présentèrent des concentrations comprises entre 8.0 et 146.5 nmol/l (moyenne = 39.8) pour le

REA et entre 0 et 117.5 nmol/l (moyenne = 29.1) pour le dosage par HPLC, (6).

Les résultats obtenus avec le REA sont supérieures d'environ 30% à celles obtenues par HPLC. Cette différence peut être expliquée par la rétention de PLP dans le précipité protéique au cours de l'étape de déprotéinisation dans la procédure HPLC.

VALEURS ATTENDUES

Lors d'une étude, l'analyse de 123 échantillons de plasma EDTA de donneurs supposés sains de la Croix Rouge de Bâle permit d'établir les valeurs normales de pyridoxal 5'-phosphate (PLP) présenté en Table 22

Ces valeurs normales ne sont données qu'à titre indicatif. Nous conseillons à chaque laboratoire d'établir ses propres valeurs normales correspondant à sa population spécifique de patients.

USO

Il dosaggio radioenzimatico BÜHLMANN vitamina B₆ (REA) è concepito per la determinazione quantitativa diagnostica in vitro del piridoxal 5'-fosfato (PLP, vitamina B₆) nel plasma EDTA (1-4).

PRINCIPIO DEL DOSAGGIO

L³H-tirosina è decarbossilata attraverso l'enzima tirosina apodecarbossilasi dipendente dalla vitamina B₆ (Y-apoDC) dallo streptococco faecalis in ³H-tiramina. L'attività della tirosina apodecarbossilasi è quantitativamente dipendente dalla quantità di piridoxal 5'-fosfato presente nella miscela di reazione. La ³H-tiramina così prodotta viene estratta selettivamente nel cocktail di scintillazione (I³H-tirosina in eccesso rimane nella fase acquosa) e può essere misurata attraverso la conta della scintillazione liquida.

REAGENTI FORNITI E PREPARAZIONE

Reagenti	Quantità	Codice	Ricostituzione
Tampone di incubazione Tampone acetato	1 flacone 60 ml	B-VB6-IB	Pronto all'uso
Calibratore PLP ¹⁾ liofilo	3 flaconi	B-VB6-CA	Ricostituire con 1 ml di tampone di incub.
Controllo basso / normale²⁾ Siero umano liofilo	3 flaconi	B-VB6-CONSET	Ricostituire con 1 ml di tampone di incub.
Tampone enzimatico	1 flacone 6 ml	B-VB6-EB	Pronto all'uso
Enzima Y-apoDC liofilo da <i>S. faecalis</i>	1 flacone	B-VB6-E	Ricostituire con 5.5 ml di tampone enzimatico
Tracciante ³ H-tirosina	1 flacone 5.5 ml	B-VB6-TR	Pronto all'uso
Tampone borato	1 flacone 21 ml	B-VB6-BB	Pronto all'uso
Polvere di scintillazione³⁾	1 flacone 0.96 g	B-VB6-SCP	Dissolvere in una miscela di 80 ml di acetato di etile e 80 ml di xilene

Table 10

¹⁾ Quantitativi lotto specifici di PLP in siero di coniglio. Fare riferimento alle informazioni contenute nei fogli di QC per le concentrazioni esatte. **Non conservare i calibratori ricostituiti**, ma ricostituire un flacone di calibratore fresco ogni volta che si effettua un dosaggio. Dopo ricostituzione, procedere immediatamente alla diluizione del calibratore.

²⁾ Quantitativi lotto specifici di PLP in siero umano. Fare riferimento alle informazioni contenute nei fogli di QC per le concentrazioni esatte. **Non conservare il controllo basso e normale**, ma ricostituire un flacone di controllo fresco ogni volta che si effettua un dosaggio.

³⁾ Il fluido di scintillazione **non-Xilene** è un sostituto accettabile della polvere di scintillazione: Ultima Gold F (Canberra Packard no. 6013329). Mescolare 80 ml di Ultima Gold F con 80 ml di acetato di etile per ottenere il reagente di scintillazione. Conservare in un flacone di vetro **scuro** a 18-28°C fino a 6 mesi.

CONSERVAZIONE ED EMIVITA DEI REAGENTI

Reagenti non aperti	
I calibratori, i controlli, l'enzima ed il tampone enzimatico devono essere conservati a -20°C. Conservare il tampone di incubazione ed il tracciante a 2-8°C. Il tampone borato e la polvere di scintillazione possono essere conservati a 18-28°C. Non utilizzare oltre la data di scadenza stampata sulle etichette.	
Reagenti aperti/ricostituiti	
Tampone di incubazione	Conservare a 2-8°C.
Tracciante	
Controlli	Non conservarli se ricostituiti.
Calibratore	
Enzima	Stabile per 3 mesi a -20°C. Aliquotare se si pensa di utilizzarli ancora.
Tampone enzimatico	Conservare a -20°C.
Tampone borato	Conservare a 18-28°C.
Polvere di scintillazione	Conservare a 18-28°C in un flacone di vetro scuro .

Table 11

AVVERTENZE E PRECAUZIONI

Questo kit contiene materiale radioattivo che non eccede i 518 kBq (14 µCi) di trizio (H³) per RK-VB6. Il ricevimento, acquisizione, possesso, utilizzo e trasferimento sono soggetti a regolamentazioni locali. In merito alle precauzioni appropriate per la manipolazione e l'eliminazione dei reagenti, del materiale radioattivo e dei campioni, consigliamo vivamente di consultare le regolamentazioni specifiche del vostro paese.

Reagenti che Contengono Materiali di Origine Umana: I controlli (B-VB6-CONSET) di questo kit contengono componenti di origine umana. Ciascuna unità di siero utilizzata nella preparazione dei componenti del kit è stata testata da un metodo approvato dall'FDA e trovata negativa per l'antigene di superficie dell'HBV, per gli anticorpi anti-HCV ed anti-HIV1 e 2. Benché questi metodi siano altamente accurati, non esistono garanzie che questo materiale non possa trasmettere l'epatite o l'AIDS. *Quindi, tutti i campioni ed i componenti del kit devono essere manipolati come se potessero trasmettere infezioni.* Tutti i prodotti contenenti materiali di origine umana, devono essere manipolati secondo quanto previsto dalle buone pratiche di laboratorio utilizzando idonee precauzioni.

MATERIALI RICHIESTI MA NON FORNITI

- Pipette di precisione con puntali monouso per 25 µl, 50 µl, 500 µl e 1000 µl
- Pipetta volumetrica da 5 ml.
- Cilindri e flacone di vetro scuro necessari per la preparazione del cocktail di scintillazione.
- Acetato di Etile p.a. (e.g. Merck no. 9623).
- Xilene p.a. (e.g. Merck no. 8681).
- Provette monouso di polipropilene, polistirene o vetro per la preparazione delle diluizioni dei calibratori e dei campioni.
- Provette monouso di polipropilene da 2 ml con tappo a vite (preferibilmente Sarstedt miniprovette no. 72.693).
- Bagnetto termostato a 37°C.
- Flaconi di scintillazione.
- Beta-counter.

PRELIEVO E CONSERVAZIONE DEI CAMPIONI

Il paziente non deve essere sottoposto a scannerizzazione radioisotopica prima del prelievo di campioni di sangue. Prelevare il sangue in provette EDTA. Si consiglia un volume minimo di 0.5 ml di sangue per determinazioni in duplicato. Centrifugare per 15 minuti a 1000 x g a 2-8°C immediatamente dopo il prelievo. **Evitare l'esposizione alla luce.** Dopo centrifugazione, raccogliere il plasma in provette idonee e conservarlo a -20°C o a temperature inferiori se non si effettua immediatamente il dosaggio. Il PLP nel plasma rimarrà stabile fino a 2 anni se conservato a -20°C o a temperature inferiori protetto dalla luce. Evitare cicli ripetuti di congelamento-scongelo.

PROCEDURA DEL DOSAGGIO

Proteggere le soluzioni standard, i controlli ed i campioni di plasma diluiti dall'esposizione alla luce diretta durante tutto il dosaggio.

Preparazione dei Calibratori: Per la preparazione della curva standard, sono richieste diluizioni seriali 1:2 della soluzione stock dei calibratori PLP come segue:

1. Etichettare cinque provette dalla A alla E.
2. Dispensare 500 µl di tampone di incubazione nelle provette A - D.
3. Dispensare 500 µl di calibratore stock PLP nelle provette dalla E alla D, vortexare la provetta D.

- Trasferire 500 µl dalla provetta D alla provetta C, vortexare la provetta C.
- Trasferire serialmente 500 µl dalla provetta C alla B e quindi dalla provetta B alla provetta A, vortexare a seguito di ogni trasferimento.

La Table 3 illustra una curva standard completa preparata con diluizioni seriali di 1:2 della soluzione stock dei calibratori (esempio con un valore lotto specifico di 192 nmol/l) ed i valori risultanti dei calibratori singoli:

Provetta	Bianco	A	B	C	D	E
Diluizione finale	Inc. tampone	1:16	1:8	1:4	1:2	Calibratore stock
Conc. [nmol/l]	0	12	24	48	96	192

Table 12

Nota: Le soluzioni dei calibratori contengono una concentrazione effettiva di PLP che è 20 volte inferiore a quanto indicato nella tabella di cui sopra per eguagliare la diluizione del campione 1:20 (vedi di seguito: Diluizione dei campioni). Quindi, i valori dei campioni e dei controlli possono essere letti direttamente dalla curva standard senza ricalcolo.

Diluizione dei Campioni: I campioni dei pazienti devono essere diluiti 20 volte prima dell'esecuzione del dosaggio:

Dispensare 50 µl di plasma EDTA in provette monouso di polipropilene, polistirene o vetro. Aggiungere 950 µl di tampone di incubazione e vortexare. **Nota:** i controlli non devono essere diluiti.

Dosaggio Radioenzimatico (REA)

- Preparare otto microprovette con tappo a vite (Sarstedt miniprovette no. 72.693 o equivalenti) in duplicato per i bianchi, i calibratori ed i controlli. Preparare altre provette in duplicato per i campioni dei pazienti.

Nota: Non etichettare nessuna delle provette o dei tappini. Qualsiasi segno sulle provette o sui tappini attenuerà l'efficienza della conta di scintillazione.

- Dispensare 25 µl di tampone di incubazione nei bianchi.
- Dispensare 25 µl delle diluizioni standard dalla A alla E nelle provette corrispondenti.
- Dispensare 25 µl dei controlli basso e normale nelle provette corrispondenti.
- Dispensare 25 µl di ciascun campione diluito nelle provette corrispondenti.
- Aggiungere 25 µl di tampone di incubazione a tutte le provette.
- Aggiungere 50 µl di soluzione enzimatica ad ogni provetta. Vortexare.
- Incubare tutte le provette per 30 ± 1 minuti in un bagnetto ad acqua a 37°C.
- Aggiungere 50 µl di (H³)-tirosina soluzione tracciante a tutte le provette. Coprire tutte le provette e vortexare.
- Incubare tutte le provette per 60 ± 1 minuti in un bagnetto ad acqua settato a 37°C.
- Dispensare 200 µl di tampone borato in ciascuna provetta.
- Aggiungere immediatamente 1.5 ml di cocktail di scintillazione a tutte le provette. Avvitare bene i tappini.
- Vortexare ciascuna provetta per almeno 10 secondi. Incubare tutte le provette per 2 ore ± 5 min in un bagnetto ad acqua settato a 37°C per completare l'estrazione. Quindi, vortexare ciascuna provetta per almeno 10 secondi.
- Collocare ciascuna provetta in flaconi singoli di scintillazione. Etichettare i tappini dei flaconi di scintillazione. Equilibrare i flaconi di scintillazione per almeno 60 minuti a 18-28°C al buio.
- Contare ciascuna provetta per 2 minuti in un Beta-counter.

RISULTATI

Curva Standard: Annotare le conte al minuto (cpm) per il bianco e per le provette standard. Calcolare i cpm medi per ciascuna coppia di provette. Sottrarre il bianco medio (provette dei bianchi) per le rispettive medie di ciascuna coppia di provette:

$$cpm_{net} = cpm_{average} - cpm_{average\ blank}$$

Preparare un grafico log-log e tracciare i cpm netti (asse verticale) verso la concentrazione di piridoxal 5'-fosfato (PLP) in nmol/l (asse orizzontale) per ciascuno dei calibratori. Disegnare la curva che meglio si adatta o calcolare la curva standard utilizzando un algoritmo a quattro parametri.

Campioni e Controlli: Annotare i cpm medi per ciascuna coppia di provette. Sottrarre il bianco medio (provette dei bianchi) dalla media rispettiva di ciascuna coppia di provette:

$$cpm_{net} = cpm_{average} - cpm_{average\ blank}$$

Collocare il valore dei cpm netti dei controlli e dei campioni sull'asse verticale della curva standard, disegnare una linea orizzontale che intersechi la curva standard e leggere la concentrazione di piridoxal 5'-fosfato (PLP) in nmol/l dall'asse orizzontale. Poiché la diluizione 1:20 viene già considerata attraverso l'etichettatura standard indicata, i valori dei campioni e dei controlli possono essere letti direttamente dalla curva standard senza ricalcolo. I campioni che sono stati ulteriormente diluiti, poiché la loro concentrazione era più elevata dello standard, devono essere moltiplicati aggiungendo il fattore di diluizione. I campioni che cadono al di sotto della sensibilità del dosaggio (<2.6 nmol/l) devono essere descritti come "non-rilevabili".

Standardizzazione: Lo standard BÜHLMANN PLP è composto da un pool di siero di coniglio calibrato in almeno 10 sedute distinte verso una preparazione pesata di PLP. Il materiale PLP viene verificato per quanto riguarda la purezza e la concentrazione attraverso spettroscopia a raggi UV immediatamente prima di utilizzarlo per la calibrazione.

Vedi Table 16 e Figure 1 per esempi di risultati e di curve standard. Questi risultati e le curve standard sono a solo scopo dimostrativo. Occorre generare una curva standard per ciascun set di campioni da dosare.

CONTROLLO DI QUALITÀ

Occorre attenersi scrupolosamente a quanto descritto in questa metodica per poter utilizzare al meglio il prodotto. Risultati affidabili potranno essere ottenuti solo utilizzando tecniche di laboratorio precise (attuali linee guida GLP) e seguendo accuratamente le istruzioni per l'utilizzo.

La riproducibilità dei parametri della curva standard ed i valori dei controlli devono essere entro limiti di accettabilità stabiliti dal laboratorio. I limiti di confidenza per i controlli sono lotto-specifici e stampati sul foglio dati del QC aggiunto al kit. Poiché non sono disponibili preparazioni di riferimento internazionale del piridoxal-5'-fosfato si consiglia l'utilizzo di almeno un pool di siero aggiuntivo per il controllo di qualità interno.

Se la precisione del dosaggio non correla con i limiti stabiliti e la ripetizione esclude gli errori nella tecnica, verificare quanto segue: i) dispensazione, controllo della temperatura e dispositivi di rilevazione del tempo ii) date di scadenza dei reagenti iii) condizioni di conservazione e di incubazione iv) purezza dell'acqua.

LIMITI E TROUBLE SHOOTING

- Poiché il PLP è sensibile alla luce (5), i calibratori ed i controlli PLP devono essere protetti dalla luce. E' inoltre consigliato effettuare il dosaggio della vitamina B₆ REA protetti dall'esposizione alla luce diretta.
- Non etichettare, rispettivamente, né le provette dei calibratori, né dei controlli né dei campioni, né dei tappini corrispondenti. Qualsivoglia segno sulle provette o sui tappini ridurrà l'efficienza delle conte della scintillazione. E' consentita l'etichettatura dei tappini delle provette di scintillazione.
- Il tempo di conta deve essere sufficiente ad evitare l'errore statistico nella conta. Es.: accumulo di 2000 cpm produrrà un errore nella conta del 2.2%, 10000 cpm produrranno un errore dell'1% nella conta.
- I valori PLP devono essere utilizzati come dati supplementari disponibili per il medico nella formulazione della diagnosi.

CARATTERISTICHE DELLE PRESTAZIONI

Precisione inter-dosaggio (da seduta a seduta): 4.6%. La precisione inter-dosaggio è stata calcolata dai risultati di 10 coppie di valori in 10 sedute consecutive (oltre 15 giorni). I valori sono presentati in Table 17 come nmol/l di PLP.

Precisione intra-dosaggio (all'interno della stessa seduta): 9.2%. La precisione intra-dosaggio è stata calcolata dai risultati di 15 coppie di valori da ciascun campione in un'unica seduta. I valori sono presentati in Table 18 come nmol/l di PLP.

Specificità: Diversi composti sono stati sostituiti nel dosaggio vitamina B₆ e presentavano le crossreattività descritte in Table 19.

Recupero: 99.8%. Due campioni di plasma EDTA contenenti, rispettivamente, una concentrazione endogena bassa (campione 1) ed una concentrazione normale (campione 2) di PLP, sono stati diluiti con eguali volumi di soluzioni PLP sintetiche. La media complessiva del recupero era di 99.8%. I risultati sono descritti in Table 20.

Linearità di Diluizione/Parallelismo: 101.4%. Due campioni di plasma umano EDTA contenenti concentrazioni elevate di PLP endogeno sono stati diluiti serialmente con il tampone di incubazione e successivamente dosati secondo la procedura del dosaggio. La media complessiva del recupero era 99.8%. I risultati sono descritti in Table 21.

Sensibilità Analitica: 2.6 nmol/ml. Dieci replicati dello standard zero sono stati dosati in un'unica seduta. La concentrazione minima rilevabile di PLP è stata calcolata in **2.6 nmol/l** aggiungendo due deviazioni standard ai cpm medi del Bianco e intersecando questo valore con la curva standard ottenuta nella stessa seduta. Poiché la diluizione 1:20 dei campioni di plasma è già stata presa in considerazione nel calcolo (la sensibilità effettiva del dosaggio è 0.13 nmol/l).

Comparazione di Metodi: 100 campioni di plasma EDTA sono stati suddivisi e dosati con il dosaggio BÜHLMANN Vitamina B₆ REA e con Cromatografia Liquida ad Elevata Pressione (HPLC). Un'analisi con regressione lineare dei risultati è descritta in Figure 2.

Il range dei valori era, rispettivamente, 8.0 - 146.5 nmol/l (media = 39.8) per il REA e 0 - 117.5 nmol/l (media = 29.1) per l'HPLC (6).

I valori REA sono del 30% superiori ai valori di HPLC. Ciò può essere causato dalla ritenzione del PLP nel precipitato proteico durante la deproteinizzazione che precede l'analisi con HPLC.

VALORI ATTESI

In uno studio che utilizza campioni di plasma EDTA di 123 donatori in apparente buono stato di salute forniti dal Centro della Croce Rossa Svizzera a Basilea, sono stati prodotti i **valori normali** per il piridoxal 5'-fosfato (PLP) descritti in Table 22.

Questi range normali devono essere utilizzati solo come linee guida. Si consiglia ad ogni laboratorio di stabilire il proprio range atteso per la propria popolazione di pazienti.

USO PREVISTO

El radioenzimoenálisis (REA) de Vitamina B₆ BÜHLMANN ha sido diseñado para la determinación diagnóstica cuantitativa *in vitro* de 5'-fosfato de piridoxal (PLP, vitamina B₆) en plasma con EDTA (1-4).

PRINCIPIOS BÁSICOS DEL ENSAYO

La ³H-tirosina es descarboxilada por la enzima dependiente de la vitamina B₆ tirosina apodescarboxilasa (Y-apoDC) de *Streptococcus faecalis* a ³H-tiramina. La actividad de la tirosina apodescarboxilasa es cuantitativamente dependiente de la cantidad de 5'-fosfato de piridoxal presente en la mezcla de la reacción. La ³H-tiramina producida de esta manera se extrae selectivamente en el cóctel de centelleo (el exceso de ³H-tirosina permanece en la fase acuosa) y puede medirse mediante un recuento de centelleo líquido.

REACTIVOS INCLUIDOS Y PREPARACIÓN

Reactivos	Cantidad	Código	Reconstitución
Tampón de incubación Tampón de acetato	1 vial 60 ml	B-VB6-IB	Listo para usar
Calibrador Pyridoxal 5'-phosph. (PLP) liof. ¹⁾	3 viales	B-VB6-CA	Reconstituir con 1 ml de tampón de incubación
Control Bajo / Normal ²⁾ suero humano liof.	3 viales	B-VB6-CONSET	Reconstituir con 1 ml de tampón de incubación
Tampón de enzima	1 vial 6 ml	B-VB6-EB	Listo para usar
Enzima Y-apoDC de S. <i>faecalis</i> liof.	1 vial	B-VB6-E	Reconstituir con 5,5 ml de tampón de enzima
Trazador ³ H-tirosina	1 vial 5.5 ml	B-VB6-TR	Listo para usar
Tampón de borato	1 vial 21 ml	B-VB6-BB	Listo para usar
Polvo de centelleo ³⁾	1 vial 0.96 g	B-VB6-SCP	Disolver en una mezcla de 80 ml de acetato de etilo y 80 ml de xileno

Tabla 13

¹⁾ Cantidades de PLP en suero de conejo específicas del lote. Consulte la hoja de datos de control de calidad adicional para las concentraciones exactas.

No almacene los calibradores reconstituidos, reconstituya un vial de calibrador de nuevo cada vez que se realice un ensayo. Después de la reconstitución proceda inmediatamente a la dilución del calibrador.

²⁾ Cantidad de PLP en suero humano específica del lote. Consulte las hojas de datos adicionales para las concentraciones exactas.

No almacene los controles bajo y normal, reconstituya un vial de control de nuevo cada vez que se realice un ensayo.

³⁾ El siguiente líquido de centelleo **sin xileno** es un sustituto aceptable del Polvo de centelleo: Ultima Gold F (Canberra Packard ref. 6013329). Mezcle 80 ml de Ultima Gold F con 80 ml de acetato de etilo para obtener el reactivo de centelleo. Almacénelo en una botella de vidrio **marrón** a 18-28°C hasta 6 meses.

ALMACENAMIENTO Y DURACIÓN DE LOS REACTIVOS

Reactivos sin abrir	
Los Calibradores, los Controles, la Enzima y el Tampón de enzima deben almacenarse a -20°C. Almacénese el tampón de incubación y el trazador a 2-8°C. El Tampón de borato y el Polvo de centelleo pueden almacenarse a 18-28°C. No utilice el kit pasada la fecha de caducidad indicada en las etiquetas.	
Reactivos abiertos / reconstituidos	
Tampón de incubación	No lo almacene reconstituido
Trazador	
Controles	
Calibrador	
Enzima	Estable durante 3 meses a -20°C. Hacer alícuotas si se espera repetir el uso.
Tampón de enzima	Almacénese a -20°C
Tampón de borato	Almacénese a 18-28°C.
Polvo de centelleo	Almacénese a 18-28°C en una botella de cristal marrón .

Tabla 14

ADVERTENCIAS Y PRECAUCIONES

Este kit contiene **material radiactivo** que no supera 518 kBq (14 µCi) de Tritio (³H) para el RK-VB6. La recepción, adquisición, posesión, el uso y la cesión están sujetos a las normativas locales. Respecto a las precauciones adecuadas para la manipulación y eliminación de los reactivos del kit, material radiactivo, desechos radiactivos y especímenes de los pacientes, recomendamos encarecidamente que consulte primero las normativas locales especiales de su país.

Reactivos que contienen material de origen humano: Los controles (B-VB6-CONSET) de este kit contienen componentes de origen humano. Todos los sueros utilizados en la preparación de los componentes del kit han sido analizados por un método aprobado por la FDA, dando resultados negativos para el antígeno de superficie del virus de la hepatitis B, y para los anticuerpos del virus de la hepatitis C y VIH1/2 (virus de inmunodeficiencia humana 1/2). Aunque estos métodos son extremadamente exactos, no se garantiza que este material no pueda transmitir hepatitis o SIDA. *Por consiguiente, todas las muestras de pacientes y todos los componentes del kit deben ser manipulados como si fueran susceptibles de transmitir infecciones.* Todos los productos que contengan material de origen humano deben ser manipulados de acuerdo con las buenas prácticas de laboratorio tomando las precauciones adecuadas.

MATERIALES NECESARIOS NO INCLUIDOS

- pipetas de precisión de 25 µl, 50 µl, 500 µl y 1000 µl y pipeta múltiple con puntas desechables.
- Pipeta volumétrica de 5 ml.
- Cilindros y botella de cristal marrón necesarios para la preparación del cóctel de centelleo.
- Acetato de etilo p.a. (p.ej. Merck ref. 9623).
- Xileno p.a. (p.ej. Merck ref. 8681).
- Tubos de polipropileno, poliestireno o vidrio desechables para la preparación de las diluciones de los calibradores y las muestras.
- Tubos de polipropileno de 2 ml desechables con con tapón a rosca hermético para el ensayo (preferiblemente minitubos Sarstedt ref. 72.693).
- Baño de agua ajustado a 37°C.
- Viales de centelleo.
- Contador beta.

RECOGIDA Y ALMACENAMIENTO DE MUESTRAS

El paciente no debe someterse a una exploración con radioisótopos antes de la recogida de una muestra de sangre. Extraiga sangre en un tubo de venipunción con EDTA. Se recomienda un volumen mínimo de 0,5 ml de sangre para las determinaciones por duplicado. Centrifugue durante 15 minutos a 1000 x g y 2-8°C inmediatamente después de la recogida. **Evite la exposición a la luz.** Después de la centrifugación recoja el plasma en tubos apropiados y almacénelo a -20°C o menos si no se va a realizar el ensayo inmediatamente. El PLP en plasma permanecerá estable hasta 2 años si se almacena a -20°C o menos y está protegido de la luz. Evite los ciclos repetidos de congelación y descongelación.

PROCEDIMIENTO DEL ENSAYO

Proteja las soluciones estándar, los controles y las muestras de plasma diluidas de la exposición a la luz directa durante todo el ensayo.

Preparación de los Calibradores: Para preparar una curva estándar completa se requieren diluciones seriadas 1:2 de la solución de stock del calibrador de PLP tal como se indica a continuación:

1. Etiqueta cinco tubos A hasta E.

- Pipetee 500 µl del tampón de incubación en los tubos A - D.
- Pipetee 500 µl del stock del calibrador de PLP en los tubos E y D y agite con el vórtex el tubo D.
- Transfiera 500 µl del tubo D al tubo C y agite con el vórtex el tubo C.
- Transfiera de manera seriada 500 µl del tubo C al tubo B y luego del tubo B al tubo A. Agite con el vórtex después de cada transferencia.

Table 3 ilustra una curva estándar completa preparada a partir de diluciones seriadas 1:2 de una solución de stock del calibrador (ejemplo con un valor específico del lote de 192 nmol/l) y los valores resultantes de los calibradores de trabajo individuales:

Tubo	Blanco	A	B	C	D	E
Dilución final	Tampón de inc.	1:16	1:8	1:4	1:2	Stock del Calibrador
Conc. [nmol/l]	0	12	24	48	96	192

Tabla 15

Nota: Las soluciones del calibrador contienen una concentración efectiva de PLP que es 20 veces menor que la indicada en la tabla anterior para la eculización de la dilución 1:20 de la muestra (véase más abajo: Dilución de las muestras). Por tanto, los valores de las muestras y de los controles pueden leerse directamente de la curva estándar sin recálculo.

Dilución de las muestras: Las muestras de los pacientes deben diluirse 20 veces inmediatamente antes de realizar el ensayo. Pipetee 50 µl de plasma con EDTA en un tubo desechable de polipropileno, poliestireno o vidrio. Añada 950 µl de tampón de incubación y agite con el vórtex. **Nota:** Los controles no deben diluirse.

Radioenzimología (REA)

- Prepare ocho microtubos idóneos con tapón a rosca (minitubos Sarstedt ref. 72.693 o similar) por duplicado para el blanco, los calibradores y los controles. Prepare tubos adicionales por duplicado para las muestras de los pacientes.

Nota: No etiquete ninguno de estos tubos o tapones. Cualquier marca en los tubos o tapones disminuirá la eficacia del recuento de centelleo.

- Pipetee 25 µl del tampón de incubación en los tubos del blanco.
- Pipetee 25 µl de las diluciones estándar A a E en los tubos correspondientes.
- Pipetee 25 µl de los controles bajo y normal en los tubos correspondientes.
- Pipetee 25 µl de cada muestra de los pacientes diluida en los tubos correspondientes.
- Añada 25 µl del tampón de incubación a todos los tubos.
- Añada 50 µl de la solución de enzima a todos los tubos. Agite con el vórtex.
- Incube todos los tubos durante 30 ± 1 minutos en un baño de agua ajustado a 37°C.
- Añada 50 µl de la solución del trazador (³H)-tirosina a todos los tubos. Cubra los tubos y agite con el vórtex.
- Incube todos los tubos durante 60 ± 1 minutos en un baño de agua ajustado a 37°C.
- Pipetee 200 µl de tampón de borato a todos los tubos.
- Añada inmediatamente 1,5 ml del cóctel de centelleo a todos los tubos. Enrosque los tapones herméticamente.
- Agite con el vórtex cada tubo como mínimo durante 10 segundos. Incube todos los tubos durante 2 horas ± 5 min en un baño de agua ajustado a 37°C para completar la extracción. Agite de nuevo con el vórtex como mínimo durante 10 segundos.

- Coloque cada tubo en un vial de centelleo individual. Etiquete los tapones de los viales de centelleo. Equilibre los viales de centelleo como mínimo durante 60 minutos a 18-28°C en la oscuridad.
- Cuente cada vial durante 2 minutos en un contador beta.

RESULTADOS

Curva estándar: Registre las cuentas por minuto (cpm) para el blanco y para los tubos del estándar. Calcule el promedio de las cpm para cada par de tubos. Reste el promedio del blanco del ensayo (tubos del blanco) del promedio respectivo de cada par de tubos:

$$cpm_{netas} = cpm_{promedio} - cpm_{promediode\ blanco}$$

Prepare un papel gráfico logarítmico y represente las cpm netas (eje vertical) frente a la concentración de 5'-fosfato de piridoxal (PLP) en nmol/l (eje horizontal) para cada uno de los calibradores. Dibuje la mejor curva de ajuste o calcule la curva estándar utilizando un algoritmo de cuatro parámetros. **Muestras y controles:** Registre el promedio de las cpm para cada par de tubos. Reste el promedio del blanco del ensayo (tubos del blanco) del promedio respectivo de cada par de tubos:

$$cpm_{netas} = cpm_{promedio} - cpm_{promediode\ blanco}$$

Localice el valor de las cpm netas de los controles y las muestras en el eje vertical de la curva estándar, dibuje una línea horizontal que corte la curva estándar y lea la concentración de 5'-fosfato de piridoxal (PLP) en nmol/l en el eje horizontal. Puesto que la dilución 1 a 20 de la muestra ya está considerada en el etiquetado estándar indicado, los valores de las muestras y de los controles pueden leerse directamente a partir de la curva estándar sin recálculo. Las muestras que se han diluido adicionalmente porque sus concentraciones estaban por encima del estándar más alto deben multiplicarse por el factor de dilución adicional. Las muestras que caen por debajo de la sensibilidad del ensayo (<2,6 nmol/l) deben informarse como "no detectable".

Estandarización: El estándar de PLP de BÜHLMANN consiste en una reserva de suero de conejo que se calibra en 10 pruebas independientes como mínimo contra una preparación pesada de PLP. Se comprueba la pureza y la concentración adecuada del material de PLP mediante espectroscopia de escáner UV inmediatamente antes de utilizarlo para la calibración.

Véase Figure 1 y Table 16 para ejemplos de resultados y curvas estándar. *Estos resultados y curvas estándar se ofrecen únicamente con propósitos de demostración. Se debe generar una curva estándar para cada conjunto de muestras que se ensaye.*

CONTROL DE CALIDAD

Es necesario comprender totalmente estas instrucciones de uso para que la utilización del producto dé unos resultados satisfactorios. Sólo se obtendrán resultados fiables utilizando técnicas de laboratorio precisas (guías de Buenas Prácticas de Laboratorio actuales) y siguiendo cuidadosamente estas instrucciones de uso.

La reproducibilidad de los parámetros de la curva estándar y de los valores de control debe encontrarse dentro de los límites establecidos de aceptabilidad del laboratorio. Los límites de confianza para los controles son específicos del lote y están impresos en la hoja de datos de control de calidad adicional del kit.

Dado que no se dispone de preparaciones internacionales de referencia de pyridoxal-5'-phosphate, se recomienda el

uso de una reserva adicional de suero como mínimo para el control de calidad interno.

Si la precisión del ensayo no se correlaciona con los límites establecidos y la repetición excluye errores de la técnica, compruebe los siguientes aspectos: i) instrumentos de pipeteado, control de temperatura y tiempo ii) fechas de caducidad de los reactivos iii) condiciones de almacenamiento e incubación iv) pureza del agua.

LIMITACIONES Y DETECCIÓN DE PROBLEMAS

- Puesto que el PLP es sensible a la luz (5), el calibrador y los controles de PLP deben protegerse de la luz. También se recomienda realizar el REA de vitamina B₆ REA protegido de la exposición a la luz directa.
- No etiquete los tubos de los calibradores, controles y muestras, respectivamente, ni los tapones correspondientes. Cualquier marca en los tubos o tapones reducirá (apagará) la eficacia del recuento del centelleo. Está permitido el etiquetado de los tapones de los viales de centelleo.
- El tiempo de recuento debe ser suficiente para evitar un error estadístico del recuento: p.ej., la acumulación de 2000 cpm producirá un error del recuento del 2.2%, 10000 cpm producirán un error de recuento del 1%.
- Los valores de PLP deben utilizarse como datos suplementarios disponibles para el médico en la elaboración del diagnóstico.

CARACTERÍSTICAS DE EFICIENCIA

Precisión inter-ensayo (prueba a prueba): 4.6%. La precisión inter-ensayo se calculó a partir de los resultados de 10 pares de valores en 10 pruebas consecutivas (durante 15 días). Los valores se presentan en Table 17 como nmol/l de PLP.

Precisión intra-ensayo (dentro de la prueba): 9.2%. La precisión intra-ensayo se calculó a partir de los resultados de 15 pares de valores obtenidos de cada muestra en una única prueba. Los valores se presentan en Table 18 como nmol/l de PLP.

Especificidad: Se sustituyeron varios compuestos en el ensayo de vitamina B₆ y mostraron las reactividades cruzadas presentadas en Table 19.

Recuperación del *spiking*: 99.8%. Se enriquecieron dos muestras de plasma con EDTA que contenían una concentración baja (muestra 1) y una concentración normal (muestra 2) de PLP endógeno, respectivamente, con volúmenes iguales de soluciones de PLP sintético. El promedio de la recuperación global fue 99,8%. Los resultados se presentan en Table 20.

Linealidad/paralelismo de dilución: 101.4%. Se diluyeron en serie dos muestras de plasma humano con EDTA que contenían altas concentraciones de PLP endógeno con tampón de incubación y se analizaron a continuación según el procedimiento del ensayo. El promedio de la recuperación global fue 99,8%. Los resultados se presentan en Table 21.

Sensibilidad analítica: 2,6 nmol/ml. Se ensayaron en una única prueba 10 duplicados del estándar cero. La concentración mínima detectable de PLP se calculó en **2,6 nmol/l** al sumar dos desviaciones estándar al promedio de las cpm del blanco y calculando la intersección de este valor con la curva estándar obtenida en la misma prueba. Ya se ha tenido en cuenta la dilución 1:20 de las muestras de plasma para el cálculo (la sensibilidad efectiva del ensayo es 0,13 nmol/l).

Comparación del método: Se dividieron y analizaron 100 muestras de plasma con EDTA con el REA de Vitamina B₆ de BÜHLMANN y con Cromatografía Líquida de Alta

Presión (HPLC). Se presenta un análisis de regresión lineal de los resultados en Table 22.

El intervalo de valores fue 8,0 – 146,5 nmol/l (media = 39,8) para el REA y 0 - 117,5 nmol/l (media = 29,1) para HPLC, respectivamente (6).

Los valores del REA son aproximadamente un 30% mayores que los valores de la HPLC. Esto puede deberse a la retención de PLP en el precipitado de proteínas durante el paso de desproteinización del proceso de análisis con HPLC.

VALORES ESPERADOS

En un estudio con muestras de plasma con EDTA de 123 donantes aparentemente sanos suministradas por el Centro de la Cruz Roja suiza en Basilea se encontraron los **valores normales** para 5'-fosfato de piridoxal (PLP) que se muestran en Table 22.

Estos rangos normales deben utilizarse únicamente como orientativos. Se recomienda que cada laboratorio establezca su propio rango esperado para su población de pacientes.

Table 16: Example of Results

Tubes	Conc. [nmol/l]	cpm	Calc. Conc. [nmol/l]	CV conc. [%]
Blank	0	2122		
Blank	0	2077		
Blank Avg.	0	2099		1.5
Standard A	12	5247	12.3	
Standard A	12	5086	11.7	
Standard A Avg.	12	5066	12.0	4.1
Standard B	24	7717	23.8	
Standard B	24	7783	24.2	
Standard B Avg.	24	7750	24.0	1.0
Standard C	48	12269	48.8	
Standard C	48	12003	47.2	
Standard C Avg.	48	12136	48.0	2.4
Standard D	96	18813	95.6	
Standard D	96	18916	96.4	
Standard D Avg.	96	18864	96.0	0.6
Standard E	192	27762	193.7	
Standard E	192	27496	190.3	
Standard E Avg.	192	27629	192.0	1.3
Control LOW		6660	18.8	
Control LOW		6487	18.0	
Control LOW Avg.		6573	18.4	3.1
Control NORMAL		14468	62.8	
Control NORMAL		13799	58.4	
Control NORMAL Avg.		14133	60.6	5.2
Sample 1		19232	99.2	
Sample 1		19406	100.7	
Sample 1 Avg.		19319	99.9	1.1

ED₂₀ = 33.5 nmol/l ED₅₀ = 76.2 nmol/l ED₈₀ = 135.9 nmol/l

Figure 1: Example of a Standard Curve

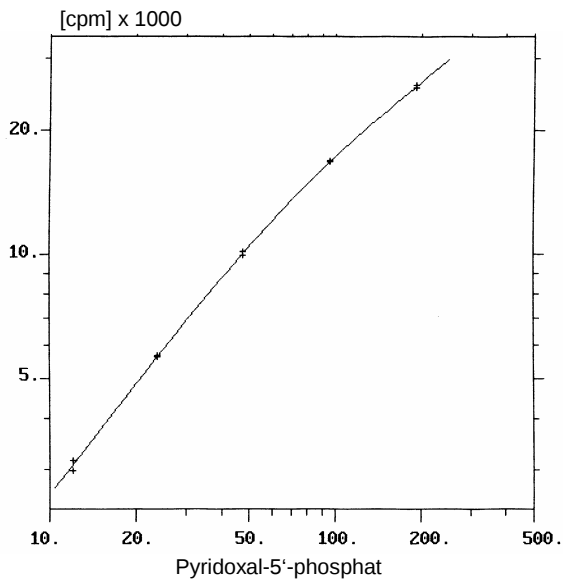


Table 17: Intra-Assay Precision (Within-Run)

Sample	Mean Value [nmol/l]	SD [nmol/l]	CV [%]
Low	16.0	0.5	3.0
Normal	47.6	2.2	4.6
Elevated	69.7	4.4	6.3
Mean			4.6

Table 18: Inter-Assay Precision (Run-to-Run)

Sample	Mean Value [nmol/l]	SD [nmol/l]	CV [%]
Low	18.5	1.9	10.1
Normal	49.4	4.8	9.6
Elevated	92.9	7.3	7.9
Mean			9.2

Table 19: Specificity

Compound	Concentration	Cross reactivity
Pyridoxamine-phosphate	1 µmol/l 1 nmol/l	2.2 <0.5
Pyridoxamine	1 µmol/l 1 nmol/l	<0.5 <0.5
Pyridoxine-HCl	1 µmol/l 1 nmol/l	<0.5 <0.5
Pyridoxal-HCl	1 µmol/l 1 nmol/l	<0.5 <0.5

Table 20: Spiking Recovery

Sample	endogen PLP [nmol/l]	PLP added [nmol/l]	observed value (O) [nmol/l]	expected value (E) [nmol/l]	Recovery (O/E) [%]
1	16.0	10	23.3	26.0	90
	16.0	20	31.1	36.0	86
	16.0	40	46.5	56.0	83
	16.0	80	96.4	96.0	100
2	44.0	10	57.4	54.0	106
	44.0	20	65.2	64.0	102
	44.0	40	89.1	84.0	106
	44.0	80	155.0	124.0	125
Mean					99.8

Table 21: Dilution Linearity/Parallelism

Sample	Dilution	observed (O) [nmol/l]	expected (E) [nmol/l]	recovery O/E [%]
3	1:20	101.1	---	---
	1:40	47.9	50.6	95
	1:80	24.8	25.3	98
	1:160	12.3	12.6	98
	1:320	5.5	6.3	87
4	1:20	240.6	---	---
	1:40	143.3	120.3	119
	1:80	66.0	60.2	110
	1:160	29.7	30.1	99
	1:320	15.4	15.0	103
	1:640	7.8	7.5	104
Mean				101.4

Figure 2: Method Comparison

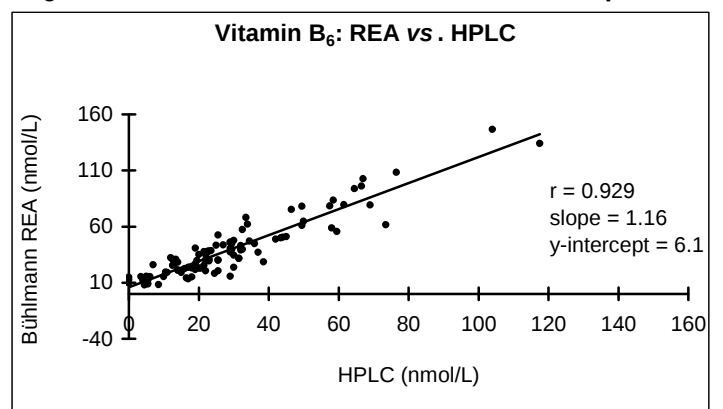


Table 22: **Expected Values**

Gender	Women	Men
n	54	69
Age (yrs, mean $\pm$ SD)	43.9 $\pm$ 13.9	48.4 $\pm$ 12.2
Mean Value [nmol/l]	60.8	57.8
Median Value [nmol/l]	38.5	51.3
Range [10-90 th Percentile]	21.6 - 104.1	29.8 - 102.4
Lowest Value [nmol/l]	11.5	20.9
Highest Value [nmol/l]	296.0	138.7

Table description: cf. "Results" (page 3), "Performance Characteristics" and "Expected Values" (page 4).

Tabellenbeschreibung: siehe "Resultate" (Seite 5), "Leistungsmerkmale" und "Normalwerte" (Seite 6).

Explication relatives aux tableaux : voir « Résultats » (page 8), « Caractéristiques de Performance » et « Valeur Attendue » (page 9).

Descrizione tavola: cf. "Risultati" (pagina 11), "Caratteristiche di Prestazione" e "Valori Attesi" (pagina 12).

Explicaciones relativas de las Tablas: ver „Resultados“, "Características de Eficiencia" (página 14) y "Valores Esperados" (página 15).

APPENDIX II

REFERENCES/ LITERATURREFERENZEN/ REFERENCES/ RIFERIMENTI/ REFERENCIAS

1. Leklem, J.E.: *Vitamin B₆*. In: Machlin, L. (ed.): Handbook of Vitamins, pp. 341-392. Marcel Dekker, New York (1991).
2. Amorim Cruz J. A. et al.: *Longitudinal changes in the intake of vitamins and minerals of elderly Europeans. SENECA Investigators*. Eur. J. Clin. Nutr. **50**, S77-S85 (1996).
3. Selhub, J. et al.: *Vitamin status and intake as primary determinants of homocysteinemia in an elderly population*. JAMA **270**, 2726-2727 (1993).
4. Folsom, A.R. et al.: *Prospective study of coronary heart disease incidence in relation to fasting total homocysteine, related genetic polymorphism, and B vitamins. The Atherosclerosis Risk in Communities (ARIC) Study*. Circulation **98**, 204-210 (1998).
5. Bates, C.J.: *Vitamin analysis*. Review. Ann. Clin. Biochem. **34**, 599-626 (1997).
6. Coburn, S.P. et al.: *Comparison of pyridoxal 5'-phosphate (PLP) determinations in plasma by cation-exchange HPLC and a kit based on tyrosine decarboxylase*. Clin. Chem. **42**, S301 (1996).

RADIOENZYMATIC ASSAY PROCEDURE									
Minitubes in Duplicate	Standard, Control, Sample (μ l)	Incubation Buffer (μ l)	Enzyme Solution (μ l)		Tracer (μ l)		Borate Buffer (μ l)	Scinti-lation Cocktail (ml)	
Blank	--	50	50	Vortex and incubate at 37°C for 30 minutes ($\pm$ 1 min)	50	Cover tubes, vortex and incubate at 37°C For 60 minutes ($\pm$ 1 min)	200	1.5	Cap tubes tightly, vortex for 10 seconds and incubate at 37°C for 2 hours ($\pm$ 5 min) ↓ Vortex for 10 seconds ↓ Place tubes into scintillation vials, equilibrate for 1 hour in the dark and count tubes for 2 minutes in a beta counter
Standard A	25	25	50		50		200	1.5	
Standard B	25	25	50		50		200	1.5	
Standard C	25	25	50		50		200	1.5	
Standard D	25	25	50		50		200	1.5	
Standard E	25	25	50		50		200	1.5	
Low Control	25	25	50		50		200	1.5	
Normal Control	25	25	50		50		200	1.5	
Sample (1:20)	25	25	50		50		200	1.5	

Symbol	Explanation
	Use By Verwendbar bis Utiliser jusqu'au Utilizzare entro Fecha de caducidad
REF	Catalogue number Bestellnummer Référence du catalogue Numero di catalogo Número de catálogo
LOT	Batch code Chargenbezeichnung Code du lot Codice del lotto Codigo de lote
IVD	<i>In Vitro</i> Diagnostic Medical Device <i>In Vitro</i> Diagnostikum Dispositif médical de diagnostic <i>in vitro</i> Dispositivo medico-diagnostico <i>in vitro</i> Producto sanitario para diagnóstico <i>in vitro</i>
	Upper limit of temperature Temperaturobergrenze Limite supérieure de température Limite superiore di temperatura Limite superior de temperatura
	Temperature limitation Zulässiger Temperaturbereich Limites de température Limiti di temperatura Limite de temperatura
	Consult Instructions for Use- Gebrauchsanweisung beachten Consulter le mode d'emploi Consultare le istruzioni per l'uso Consulte las instrucciones de uso
	Contains sufficient for <n> tests Ausreichend für „n“ Ansätze Contenu suffisant pour „n“ tests Contenuto sufficiente per „n“ saggi Contenido suficiente para <n> ensayos
	Radioactive Material Radioaktives Material matériel radioactif materiale radioattivo material radiactivo

Symbol	Explanation
BUF INC	Incubation Buffer Inkubations-Puffer Tampon d'incubation Tampone d'incubazione Tampón de incubación
CAL	Calibrator Kalibrator Calibrateur Calibratore Calibrador
CONTROL L	Control Low Kontrolle tief Contrôle bas Controllo basso Control bajo
CONTROL N	Control Normal Kontrolle Normal Contrôle Normal Controllo normale Control normal
BUF ENZ	Enzyme Buffer Enzym-Puffer Tampon enzyme Tampone enzimatico Tampón enzimático
ENZ	Enzyme Enzym Enzyme Enzima Enzima
TR	Tracer Tracer Traceur Elemento tracciante Trazador
BUF BOR	Borate Buffer Borat Puffer Tampon borate Tampone borato Tampón borato
SCP	Scintillation Powder Szintilations-Pulver Poudre de scintillation Polvere di scintillazione Polvo de centelleo



Printing Date
2008-10-29