

ID-Vit® Vitamin B₆

Mikrobiologisches Verfahren zur Bestimmung von
Vitamin B₆ in Serum mittels einer
Saccharomyces cerevisiae-beschichteten Mikrotiterplatte
Zur Verwendung in Human- und Veterinärmedizin und zu
Forschungszwecken

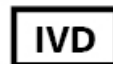
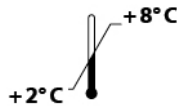
ID-Vit® Vitamin B₆

Microbiological test kit for the
determination of vitamin B₆ in serum with a
Saccharomyces cerevisiae coated microtitre plate
For use in human and veterinary medicine and in research

Gültig ab / Valid from 11.06.2010



KIF006



ifp Institut für Produktqualität GmbH
Teltowkanalstr. 2
12247 Berlin, Germany
www.produktqualitaet.com

Vertrieb durch/ Distributed by:
Immundiagnostik AG
Stubenwald-Allee 8a
64625 Bensheim, Germany
www.immundiagnostik.com

Inhalt

Content	14
---------	----

1. VERWENDUNGSZWECK	2
2. EINLEITUNG	2
3. TESTPRINZIP	3
4. INHALT DER TESTPACKUNG	4
5. ERFORDERLICHE LABORGERÄTE UND HILFSMITTEL	4
6. LAGERUNG DER REAGENZIEN	5
7. HINWEISE UND VORSICHTSMASSNAHMEN	5
8. PROBENVORBEREITUNG	6
8.1. Probenvorbereitung / -aufschluss	6
9. TESTDURCHFÜHRUNG	6
9.1. Testvorbereitungen	6
9.2. Testansatz	8
9.3. Messung	8
10. AUSWERTUNG DER ERGEBNISSE	9
11. EINSCHRÄNKUNGEN	9
12. TESTCHARAKTERISTIKA	10
13. LITERATUR	11
14. ALLGEMEINE HINWEISE ZUM TEST	12

1. VERWENDUNGSZWECK

Der **ID-Vit® Vitamin B₆** Mikrotiterplattentest ist ein mikrobiologisches Verfahren zur Bestimmung des Gesamtgehalts von Vitamin B₆ (Pyridoxin, Pyridoxal, Pyridoxamin) in Serum. Alle benötigten Reagenzien und Standards sind im Test enthalten. Mit dem Test können 96 Bestimmungen incl. der Standards durchgeführt werden. Für die Auswertung ist ein ELISA-Reader notwendig. Zur Verwendung in Human- und Veterinärmedizin und zu Forschungszwecken. Nur zur In-vitro-Diagnostik.

2. EINLEITUNG

Vitamin B₆ ist der Sammelbegriff für Pyridoxin, Pyridoxal, Pyridoxamin und deren Phosphatverbindungen, die alle über den Stoffwechsel in die Wirkform Pyridoxal-5-phosphat umgewandelt werden. Die Wirkform des Pyridoxal-5-phosphats (im Folgenden als Vitamin B₆ bezeichnet) ist als Coenzym im Proteinstoffwechsel (Aminosäurestoffwechsel) für mehr als 50 Reaktionen unentbehrlich. An der Blutbildung ist Vitamin B₆ als Bestandteil des hämbildenden Enzyms beteiligt. Weiterhin werden durch Vitamin B₆ Neurotransmitter und biogene Amine (z.B. Histamin) gebildet.

Symptome des Vitamin B₆-Mangels

- Störungen der Proteinbiosynthese
- Muskelschwund, Bewegungsstörungen
- Hautveränderungen (Schuppung, Hyperpigmentierung)
- Störungen des Nervensystems (Reizbarkeit, Depressionen, Lähmungen)
- Schlaflosigkeit

Ein Vitamin B₆-Mangel wird auch als Risikofaktor für Herzinfarkt, periphere vaskuläre Erkrankungen und Arteriosklerose, speziell in Verbindung mit der Regulierung des Homocystein-Stoffwechsels, angesehen.

Vitamin B₆-Mangel

Ein niedriger Vitamin B₆-Spiegel kann vorliegen bei:

- chronischen Magen-Darm-Erkrankungen
- Dialysepatienten
- Alkoholismus
- erblichen Eiweißstoffwechselkrankheiten (z.B. Homozysteinurie)
- Schwangerschaft und Stillzeit

Indikationen

- Ermittlung des Vitamin B₆-Status
- Homozysteinämie
- Hautveränderungen
- Bewegungsstörungen
- Anämie, Depressionen

3. TESTPRINZIP

Serumproben werden enzymatisch vorbehandelt, so dass das gesamte Vitamin B₆ bestimmt werden kann. Die verdünnten Proben werden dann in die Kavitäten einer Mikrotiterplatte [PLATE] gegeben, die mit *Saccharomyces cerevisiae* beschichtet sind. *S. cerevisiae* ist auf die Anwesenheit von Vitamin B₆ angewiesen. Nach Zugabe von Vitamin B₆ als Standard [STD], Kontrolle [CTRL] oder als in einer Serumprobe enthaltenes Vitamin wachsen die Hefezellen so lange, bis das Vitamin aufgebraucht ist. Die Inkubation erfolgt bei **30 °C** für 44 - 48 h. Das Wachstum von *S. cerevisiae* wird als Trübung bei 610 - 630 nm (alternativ bei 540 - 550 nm) im ELISA-Reader gemessen und mit einer Standard-Konzentrationsreihe verglichen. Die Menge des Vitamin B₆ ist dabei direkt proportional der Trübung.

4. INHALT DER TESTPACKUNG

Artikel Nr.	Abkürzung	Kit Komponenten	Menge
KIF006MTP	PLATE	1 x Mikrotiterplatte, beschichtet mit <i>Saccharomyces cerevisiae</i> , gebrauchsfertig	12 Streifen à 8 Kavitäten
KIF006SO	SOL	Probenvorbereitungspuffer, 5 ml	4 x
KIF006ENZ	ENZ	Enzym (lyophilisiert)	4 x
KIF006DI	DIL	Wasser, 30 ml, gebrauchsfertig	4 x
KIF006ME	ASYMED	Vitamin B ₆ -Assay-Medium	4 x
KIF006ST	STD	Vitamin B ₆ -Standard	4 x
KIF006KO1	CTRL1	Kontrolle 1	4 x
KIF006KO2	CTRL2	Kontrolle 2	4 x
KIF006FO	FOL	Abklebefolie	4 x
KIF006FR	FRA	Ersatzrahmen zum Umstecken der Mikrotiterstreifen	1 x

5. ERFORDERLICHE LABORGERÄTE UND HILFSMITTEL

- Inkubator mit dunkler Inkubationskammer, **30 °C**
- Wasserbad oder Thermoblock, **37°C**
- Wasserbad 90 - 100°C
- ELISA-Reader 610 - 630 nm (540 - 550 nm)
- Mikropipette 20 - 200 µl
- Mikropipette 100 -1000 µl
- Mikropipettenspitzen 20 - 200 µl und 100 -1000 µl, steril
- Pipette 5 bzw. 10 ml
- 1,5 - 2 ml Reaktionsgefäße, steril
- 0,2 µm Sterilfilter (Polyethersulfon) und Einwegspritze (10 ml)
- 15 ml Zentrifugenröhrchen, steril (z.B. Falcons)
- Biozentrifuge (10 000 x g)

6. LAGERUNG DER REAGENZIEN

- Den Testkit / die Reagenzien bei 2 - 8 °C lagern.
- Angesetzte Reagenzien unmittelbar verwenden und nach Testansatz verwerfen.
- Nicht angebrochene Reagenzien (Standard, Medium) in den Testkit zurücklegen und bei 2 - 8 °C lagern.
- Nicht benötigte Mikrotiterplatten-Streifen zusammen im Rahmen mit dem Trockenmittel im Folienbeutel gut verschlossen aufbewahren und bei 2- 8 °C lagern. Die Mikrotiterplatten-Streifen müssen vor Kontamination und Feuchtigkeit geschützt sein.
- Nach Ablauf des Verfallsdatums (siehe Testkit - Außenetikett) kann keine Qualitätsgarantie mehr übernommen werden.
- Bitte achten Sie bei mehrfachem Einsatz der Platte [PLATE] darauf, dass die Reagenzien, wie in der Vorschrift beschrieben, gelagert und nur die für den jeweiligen Ansatz benötigten Reagenzienmengen frisch angesetzt werden. Der Kit kann so bis zu 4 x je nach Probenaufkommen bis zum angegebenen Haltbarkeitsdatum verwendet werden.

7. HINWEISE UND VORSICHTSMASSNAHMEN

- Es handelt sich um einen mikrobiologischen Test, daher sollten alle Maßnahmen, soweit möglich, für ein **steriles Arbeiten** getroffen werden (bevorzugt unter Sterilbank bzw. PCR-Hood arbeiten, sterile Arbeitsgeräte verwenden).
- Die GLP (Good Laboratory Practice)-Regeln sind bei der Testdurchführung einzuhalten.
- Die **Wasserqualität** ist von großer Bedeutung für den Testablauf. Nur das im Testkit enthaltene Wasser [DIL] für den Ansatz des Mediums [ASYMED] und die Rekonstitution des Standards [STD] und der Kontrollen [CTRL1, CTRL2] verwenden.
- Bei jeder Testdurchführung sollte eine **Kalibration** mitgeführt werden.
- Es wird eine **Doppelbestimmung** der Standards [STD], der Kontrollen [CTRL1, CTRL2] und der Proben empfohlen.
- Ergibt die höhere Verdünnung einen höheren Messwert, können **Hemmstoffe wie Antimykotika** vorliegen.
- Die Reagenzien dürfen nach Ablauf des Mindesthaltbarkeitsdatums nicht mehr verwendet werden.
- Während der Testdurchführung Handschuhe tragen.
- Gebrauchte Mikrotiterplattenstreifen sowie andere mit Patientenproben in Kontakt gekommene Materialien als potenziell infektiös behandeln und entsprechend entsorgen.
- Anzeichen für Reagenzienverfall: Der höchste Standard sollte eine Absorption größer als 0,6 Extinktionseinheiten ($A_{630nm} > 0,6$) erreichen.

8. PROBENVORBEREITUNG

Hinweise

- Als Probe eignet sich Serum.
- Originalproben bis zur Analyse lichtgeschützt bei 4°C aufbewahren. Die Haltbarkeit der Probe beträgt bei 2 - 8 °C im Dunkeln 1 Tag. Zur längeren Lagerung sollte die Probe bei -20 °C aufbewahrt werden.
- Hämolytische Proben beeinflussen das Testergebnis und sollten nicht verwendet werden. Lipämische Proben sollten vor dem Einsatz im Test bei 13 000 g zentrifugiert werden, um ein möglichst fettfreies Serum zu erhalten.
- Proben sollten vor dem Einsatz gevortext und anschließend zentrifugiert werden (mind. 5 min bei 10 000 x g). Den resultierenden Überstand im Test einsetzen.

8.1. Probenvorbereitung / -aufschluss

- Enzym [ENZ] mit dem Probenvorbereitungspuffer [SOL] resuspendieren: 4 ml Probenvorbereitungspuffer [SOL] in das Fläschchen mit dem lyophilisierten Enzym [ENZ] überführen, verschließen und vortexen.
- 300 µl Serum oder Kontrolle [CTRL1, CTRL2] mit 300 µl gebrauchsfertiger Enzymlösung versetzen, vortexen und 30 min bei 37 °C im Dunkeln inkubieren. Anschließend den Ansatz 30 min bei 95 °C erhitzen, schnell abkühlen und zentrifugieren (10 min bei 10 000 x g).
- Vom Überstand der vorbehandelten Serumprobe 100 µl abnehmen, 400 µl Wasser [DIL] zugeben und mischen. Die Probenvorbehandlung und -verdünnung entsprechen insgesamt einer 1 : 10-Verdünnung (= Probenverdünnungsfaktor).

9. TESTDURCHFÜHRUNG

Hinweise

- Qualitätskontrollen sollten immer mitgemessen werden.
- Inkubationszeit, Temperatur und Pipettiervolumina sind vom Hersteller festgelegt. Jegliche Abweichung der Testvorschrift, die nicht den Angaben des Herstellers entspricht, kann zu fehlerhaften Ergebnissen führen.
- Die Bestimmung ist immer nach der im Kit beigefügten Arbeitsanleitung durchzuführen.

9.1. Testvorbereitungen

Entnehmen Sie die benötigten Reagenzien und Materialien für den durchzuführenden Test und legen Sie den restlichen Testkit zurück in den Kühlschrank. Bringen Sie die benötigten Reagenzien auf Raumtemperatur.

Wasser [DIL] für Medium [ASYMED], Standard [STD] und Kontrollen [CTRL1, CTRL2]

- Bördelkappe nach oben drücken, nach hinten bis zum Glasrand abziehen und dann durch Drehen den gesamten Verschluss entfernen.

Assay-Medium [ASYMED]

- Das Medium [ASYMED] muss vor jedem Test frisch hergestellt werden.
- Trockenbeutel vom Medium [ASYMED] im Fläschchen mit Pinzette abschütteln, herausnehmen und werfen.
- Zum Assay-Medium [ASYMED] 10 ml Wasser [DIL] zugeben, das Fläschchen gut verschließen und schütteln. Die Menge ist ausreichend für 6 Mikrotiterstreifen.
- Mediumflasche [ASYMED] im Wasserbad bei 95 °C für 5 min erhitzen; währenddessen mindestens 2 mal gut schütteln. Es ist darauf zu achten, dass dabei die Mediumflasche [ASYMED] immer fest verschlossen ist.
- Mediumflasche [ASYMED] schnell auf unter 30 °C abkühlen.
- Medium [ASYMED] mit Einwegspritze (10 ml) und einem 0,2 µm-Filter in ein steriles Zentrifugenröhrchen (15 ml, z.B. Falcon) steril filtrieren.

Kontrollen [CTRL1, CTRL2]

Kontrollen vor dem Test frisch herstellen:

- Kontrollflasche [CTRL1, CTRL2] öffnen, Schraubdeckel mit dem Kopf nach unten ablegen.
- In die Kontrollflasche [CTRL1, CTRL2] 0,75 ml Wasser [DIL] aus dem Testkit zugeben, mit dem Schraubdeckel verschließen und vortexen (= Kontrolle).
- Die Kontrollen [CTRL1, CTRL2] werden nach dem Rekonstituieren wie eine Probe behandelt, d.h. 300 µl Kontrolllösung werden mit 300 µl gebrauchsfertiger Enzymlösung versetzt, gevortext und 30 min bei 37°C im Dunkeln inkubiert. Anschließend wird der Ansatz 30 min bei 95 °C erhitzt, schnell abgekühlt und zentrifugiert (10 min bei 10 000 x g).
- Vom Überstand der vorbehandelten Kontrolllösung 100 µl abnehmen, 400 µl Wasser [DIL] zugeben und mischen. Die Vorbehandlung und -verdünnung entspricht insgesamt einer 1 : 10-Verdünnung (= Verdünnungsfaktor).
- Die Konzentration der Kontrollen [CTRL1, CTRL2] entnehmen Sie bitte der Kontrollspezifikation.

Standard [STD]

Standardverdünnungsreihe vor dem Test frisch herstellen:

- Standardflasche [STD] öffnen, Schraubdeckel mit dem Kopf nach unten ablegen.
- In die Standardflasche [STD] x ml (x = siehe dem Testkit beiliegendes QS-Datenblatt) Wasser [DIL] aus dem Testkit zugeben, mit dem Schraubdeckel verschließen und vortexen = Standard (Konzentrat).

- In 6 sterilen Reaktionsgefäßen (Fassungsvermögen 1,5 - 2,0 ml) nach folgen-dem Schema eine Standardkurve erstellen (hierfür zunächst Wasser [DIL] aus dem Testkit vorlegen und anschließend Standard (Konzentrat) hinzupipettieren):

Vitamin B ₆ [µg/l]	Wasser [DIL] [µl]	+	Standard [STD] (Konz.) [µl]	=	Gesamtvolumen [µl]
Blank: 0	940	+	0	=	940
Standard 1: 0.36	940	+	60	=	1000
Standard 2: 1.2	400	+	100	=	500
Standard 3: 1.8	350	+	150	=	500
Standard 4: 2.4	300	+	200	=	500
Standard 5: 3.6	200	+	300	=	500

9.2. Testansatz

- Benötigte Streifen von der Mikrotiterplatte [MTP] entnehmen und in den Ersatzrahmen [FRA] stecken. Die nicht gebrauchten Streifen im Rahmen sofort in den Beutel zurücklegen und diesen sorgfältig verschließen. Die Mikrotiterplatten-Streifen müssen vor Kontamination und Feuchtigkeit geschützt sein.
- Ein Mediumansatz ist ausreichend für 6 Mikrotiterstreifen (= 48 Kavitäten).
- 150 µl steriles Vitamin B₆-Assay-Medium [ASYMED] in die Kavitäten geben.
- 150 µl Standard [STD], Kontrolle [CTRL1, CTRL2] bzw. Probe in die jeweilige Kavität pipettieren. Pipettenspitzen jeweils mit der Standard- bzw. Probenlösung vorspülen.
- Sorgfältig die befüllten Kavitäten mit Folie [FOL] abkleben. Wichtig: die Kavitäten müssen durch Andrücken mit der Hand luftdicht verschlossen werden!
- Bei 30 °C für 44 - 48 h im Brutschrank inkubieren.

9.3. Messung

- Klebefolie [FOL] nochmals mit der Hand fest andrücken
- Platte [PLATE] über Kopf drehen, auf eine Tischoberfläche legen und Keime gut aufschütteln
- Platte [PLATE] wieder zurückdrehen und Abklebefolie [FOL] diagonal, von oben rechts

beginnend, 180° nach hinten vorsichtig abziehen (die Platte dabei fest fixieren)

- Vorhandene Bläschen an der Oberfläche der Messlösung in den Kavitäten zerstören, z.B. mit Hilfe einer Pipettenspitze oder einer Nadel
- Trübung im ELISA-Reader bei E 610 - 630 nm messen (alternativ bei E 540 - 550 nm)

Hinweise

- Nach 48 h Inkubation kann die Mikrotiterplatte [PLATE] auch für max. 48 h im Kühlschrank aufbewahrt werden, um danach die Trübung zu messen.
- Um Zeitverluste durch Feiertage oder Wochenende zu vermeiden, kann die Mikrotiterplatte [PLATE] auch noch nach bis zu 60 h Inkubation ausgewertet werden.

10. AUSWERTUNG DER ERGEBNISSE

Wir empfehlen für die Auswertung eine 4-Parameter Funktion. Der Probenverdünnungsfaktor muss bei der Auswertung berücksichtigt werden.

Vitamin B₆ im Serum:

Vitamin B₆ [$\mu\text{g}/\text{l}$] = Konzentration Standardkurve x Probenverdünnungsfaktor (10)

Anmerkungen:

- Bei einem Probenverdünnungsfaktor von 10 ist in der Probe ein Messbereich von 3.6 - 36.1 $\mu\text{g}/\text{l}$ Vitamin B₆ abgedeckt.
- Unterlässt man die enzymatische Probenvorbehandlung, kann über eine Differenzmessung zwischen der phosphorylierten und der nichtphosphorylierten Form unterschieden werden.

Referenzbereich für Humanserum

(n=74) Vitamin B₆: 4.8 - 17.7 $\mu\text{g}/\text{l}$

Wir empfehlen jedem Labor seinen eigenen Referenzbereich zu erstellen, da Referenzbereiche stark von der Auswahl des Probandenkollektivs abhängig sind. Die Angabe des Referenzbereichs für Vitamin B₆ dient lediglich der Orientierung und kann von anderen publizierten Daten abweichen.

11. EINSCHRÄNKUNGEN

Stark hämolysierte oder lipämische Proben können zu fehlerhaften Ergebnissen führen. Wir empfehlen solche Proben nicht zu analysieren.

12. TESTCHARAKTERISTIKA (mit Humanserum erhoben)

Präzision und Reproduzierbarkeit

Intra-Assay (n=16)		
	Vitamin B ₆ [µg/l]	VK [%]
Probe 1	9.87	9.17
Inter-Assay (n=5)		
	Vitamin B ₆ [µg/l]	VK [%]
Probe 1	10.98	6.78

Wiederfindung

Proben von 3 Patienten wurden mit Vitamin B₆ gespiked und analysiert. Die Mittelwerte sind im Folgenden dargestellt:

n = 5

Probe	Mittelwert der Originalprobe [µg/l]	Spike [µg/l]	Vitamin B ₆ erwartet [µg/l]	Vitamin B ₆ gemessen [µg/l]	Wiederfindungsrate [%]
A	11.99	10	21.99	26.00	140
		20	31.99	35.60	118
Wiederfindungsrate gesamt [%]					129

n = 5

Probe	Mittelwert der Originalprobe [µg/l]	Spike [µg/l]	Vitamin B ₆ erwartet [µg/l]	Vitamin B ₆ gemessen [µg/l]	Wiederfindungsrate [%]
B	9.46	10	19.46	22.99	135
		20	29.46	32.50	115
Wiederfindungsrate gesamt [%]					125

n = 5

Probe	Mittelwert der Originalprobe [µg/l]	Spike [µg/l]	Vitamin B ₆ erwartet [µg/l]	Vitamin B ₆ gemessen [µg/l]	Wiederfindungsrate [%]
C	8.85	10	18.85	18.31	95
		20	28.85	32.36	118
Wiederfindungsrate gesamt [%]					107

13. LITERATUR

Morris M C et al. (2004) Dietary niacin and the risk of incident Alzheimer's disease and of cognitive decline. J Neurol Neurosurg Psychiatry 75: 1093-1099

Ambrosch A et al. (2000) Relation between homocysteinaemia and diabetic neuropathy in patients with Type 2 diabetes mellitus. Diabetic Med 18; 185-192

Dierkes J et al. (2001) Vitamin supplementation can markedly reduce the homocysteine elevation induced by fenofibrate. Atherosclerosis 158; 161-164

Dierkes J et al. (2001) Homocysteine lowering effect of different multivitamin preparations in patients with end-stage renal disease. J Renal Nut 11; 67-72

Selhub J et al. (1995) Association between plasma homocysteine concentrations and extra-cranial carotid-artery stenosis. N Engl J Med 332:286-291

14. ALLGEMEINE HINWEISE ZUM TEST

- Dieser Kit wurde nach der IVD Richtlinie 98/79/EG hergestellt und in den Verkehr gebracht.
- Sämtliche in der Testpackung enthaltene Reagenzien dürfen ausschließlich zur in-vitro-Diagnostik eingesetzt werden.
- Die Reagenzien sollten nach Ablauf des Verfallsdatums nicht mehr verwendet werden (Verfallsdatum siehe Testpackung).
- Einzelkomponenten mit unterschiedlichen Lot-Nummern aus verschiedenen Testpackungen sollten nicht gemischt oder ausgetauscht werden.
- Für die Qualitätskontrolle sind die dafür erstellten Richtlinien für medizinische Laboratorien zu beachten.
- Die charakteristischen Testdaten wie Pipettiervolumina der verschiedenen Komponenten und der Aufbereitung der Proben wurden firmenintern festgelegt. Nicht mit dem Hersteller abgesprochene Veränderungen in der Testdurchführung können die Resultate beeinflussen. Das ifp Institut für Produktqualität GmbH übernimmt für direkt daraus resultierende Schäden und Folgeschäden keine Haftung.

Verwendete Symbole:



Temperaturbegrenzung



Bestellnummer



In-Vitro-Diagnostikum



Inhalt ausreichend für <n> Prüfungen



Hersteller



Verwendbar bis



Chargenbezeichnung

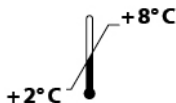
ID-Vit® Vitamin B₆

Microbiological test kit for the determination
of vitamin B₆ in serum with a
Saccharomyces cerevisiae coated microtitre plate
For use in human and veterinary medicine and in research

Gültig ab / Valid from 11.06.2010



KIF006



ifp Institut für Produktqualität GmbH
Teltowkanalstr. 2
12247 Berlin, Germany
www.produktqualitaet.com

Vertrieb durch/ distributed by:

Immundiagnostik AG
Stubenwald-Allee 8a
64625 Bensheim, Germany
www.immundiagnostik.com

Content

1. INTENDED USE	15
2. INTRODUCTION.....	15
3. PRINCIPLE OF THE TEST	16
4. MATERIAL SUPPLIED.....	16
5. MATERIAL REQUIRED BUT NOT SUPPLIED	17
6. PREPARATION AND STORAGE OF REAGENTS	17
7. PRECAUTIONS	18
8. SAMPLE PREPARATION.....	18
8.1. Sample preparation	18
9. ASSAY PROCEDURE.....	19
9.1. Test preparations	19
9.2. Test Initiation.....	21
9.3. Measurement	21
10. EVALUATION OF RESULTS	22
11. PERFORMANCE CHARACTERISTICS	22
Precision and reproducibility	22
Recovery	23
12. REFERENCES	24
13. GENERAL NOTES ON THE TEST AND TEST PROCEDURE	24

1. INTENDED USE

ID-Vit® Vitamin B₆ is a microtiter plate test kit based on a microbiological assay which measures the vitamin B₆ content (pyridoxine, pyridoxal, pyridoxamine) in serum. The test kit contains all required reagents, e.g. standard, medium and microtiter plate coated with a specific microorganism, sufficient for 96 determinations including standard curves. An ELISA reader is required for evaluation of the vitamin B₆ content. For use in human and veterinary medicine and in research. The test kit is for in vitro diagnostic use only.

2. INTRODUCTION

The vitamin B₆ group comprises three natural forms: pyridoxine, pyridoxamine and pyridoxal, which, during metabolism, are converted to the enzymatically active form pyridoxal-5-phosphate (P5P). Pyridoxal-5-phosphate (here described as „vitamin B₆“) is a cofactor in more than a hundred enzyme reactions. One of its functions is to perform transamination, a key step in both breaking down and producing amino acids in the body. Vitamin B₆ is also necessary for the synthesis of neurotransmitters, as well as hemoglobin in red blood cells. And vitamin B₆ plays a central role in fat metabolism.

Vitamin B₆ deficiency symptoms

- Disturbance of protein biosynthesis
- Muscular weakness, loss of muscle control
- Skin disorders (dermatitis, pigment abnormality)
- Nervous disorders (irritability, depression, palsy)
- Insomnia

Vitamin B₆ deficiency can be considered as a risk factor for myocardial infarction, peripheral vascular diseases and atherosclerosis, especially in connection with the regulation of homocysteine metabolism.

Indications

Vitamin B₆ deficiency can result from:

- Chronic inflammatory bowel diseases (colitis ulcerosa, Crohn's disease, gluten sensitivity)
- Dialysis
- Alcohol abuse
- Homocysteinuria
- Pregnancy and lactation

3. PRINCIPLE OF THE TEST

The serum samples are enzymatically pre-treated in order to determine the total vitamin B₆ content. The diluted samples are transferred in the wells of a microtiter plate [PLATE] coated with *Saccharomyces cerevisiae* which metabolizes vitamin B₆. The addition of vitamin B₆ in either standards [STD], controls [CTRL] or samples gives a vitamin B₆-dependent growth response until vitamin B₆ is consumed. After incubation at **30°C** for **44 - 48 h**, the growth of *Saccharomyces cerevisiae* is measured turbidimetrically at 610 - 630 nm (alternatively at 540 - 550 nm) in an ELISA-reader and a standard curve is generated from the dilution series. The amount of vitamin B₆ is directly proportional to the turbidity.

4. MATERIAL SUPPLIED

Catalog No	Label	Kit Components	Quantity
KIF006MTP	PLATE	One <i>Saccharomyces cerevisiae</i> -precoated microtiter plate, ready to use	12 x 8 wells
KIF006SO	SOL	Sample preparation buffer 5 ml, ready to use	4 x
KIF006ENZ	ENZ	Enzyme	4 x
KIF006DI	DIL	Water 30 ml	4 x
KIF006ME	ASYMED	Vitamin B ₆ assay medium	4 x
KIF006ST	STD	Vitamin B ₆ standard	4 x
KIF006KO1	CTRL1	Control 1	4 x
KIF006KO2	CTRL2	Control 2	4 x
KIF006FO	FOL	Cover plastic foil	4 x
KIF006FR	FRA	Replacement holder for 96-well plates	1 x

5. MATERIAL REQUIRED BUT NOT SUPPLIED

- Incubator with a dark incubation chamber, 30°C
- Water bath or thermo block, 37°C
- Water bath, 90°C - 100°C
- ELISA-Reader 610 - 630 nm (540 - 550 nm)
- Micropipette 20 - 200 µl
- Micropipette 100 -1000 µl
- Micropipette tips to deliver 20 - 200 µl and 100 -1000 µl, sterile
- Pipettes of 5 and 10 ml
- 1,5 - 2 ml reaction vials, sterile
- 0,2 µm sterile polyethersulfone filter with a sterile tip
- 15 ml centrifugal tubes, sterile (e.g. Falcon tubes)
- Biocentrifuge (10 000 x g)

6. PREPARATION AND STORAGE OF REAGENTS

- Store test kit / reagents at 2-8°C.
- Prepare reagents freshly and use immediately after preparation. Discard remaining unused reagents and waste in accordance with country, federal, state, and local regulations.
- Put unused reagents (standard, medium) in the test kit and store at 2-8°C.
- Store unused strips in the original package with dry bag securely closed at 2-8° C to prevent contamination or moisture exposure.
- No warranty can be given after the expiry date (see label of test package).
- To run assay more than once, ensure that reagents are stored at conditions stated on the label. Prepare only the appropriate amount necessary for each assay. The kit can be used up to 4 times within the expiry date stated on the label.

7. PRECAUTIONS

- As the test is based on a microbiological method, the general guidelines for sterile work must be observed as far as possible, (work in a sterile bench, PCR-Hood, use of sterile instruments or equipment).
- GLP (Good Laboratory Practice)-guidelines should be observed.
- Water quality is extremely important. Only the water delivered with the test kit [DIL] should be used for medium dilution [ASYMED], standard [STD], controls [CTRL1, CTRL2] reconstitution, as well as for sample preparation.
- It is essential to run a standard curve for each separate assay.
- It is recommended to run a duplicate standard curve [STD] as well as a sample and controls [CTRL1, CTRL2] analysis.
- If a higher dilution results in a higher measured value, inhibitors like antimycotics might be present.
- Reagents should not be used beyond the expiration date shown on kit label.
- Wear protective gloves during the test.
- Used microtiter plates [PLATE] and materials that have been in contact with patient's samples should be handled and disposed as potentially infectious.
- Signs for reagent damage: The highest standard should have an absorption higher than 0.6 extinction units ($A_{630nm} > 0,6$)

8. SAMPLE PREPARATION

Notes

- Patient serum is used for analysis.
- Original samples should be kept light-protected at 2-8°C until measurement. The samples are stable for 8 hours at 2-8°C in the dark. For longer storage, samples should be frozen and kept at -20°C.
- Hemolytic samples may give erroneous results and should not be used for analysis. Lipemic samples should be centrifuged at 13 000 x g before assaying to obtain fat free serum as far as possible.
- Samples should be vortexed and then centrifuged (5 min at 10000 g) prior to measurement and the resulting supernatant used in the test.

8.1. Sample preparation

- Resuspend the enzyme [ENZ] with sample preparation buffer [SOL]: add 4 ml sample preparation buffer [SOL] in the flask containing the lyophilized enzyme [ENZ], close and vortex.
- Add 300 µl serum or control [CTRL1, CTRL2] to 300 µl of the prepared enzyme solution,

vortex and incubate for 30 min at 37 °C in the dark. Afterwards, heat to 95°C for 30 min, cool quickly and centrifuge for 10 min at 10 000 x g.

- Take 100 µl from the supernatant of the treated serum sample, add 400 µl water [DIL] and mix. The sample treatment and dilution results in a final dilution of 1:10 (= sample dilution factor).

9. ASSAY PROCEDURE

Procedural notes

- Quality control guidelines should be observed.
- Incubation time, incubation temperature and pipetting volumes of the components are defined by the producer. Any variation of the test procedure, which is not coordinated with the producer, may influence the results of the test.
- The assay should always be performed according the enclosed manual.

9.1. Test preparations

Take as many microtiter strips as needed from kit. Return unused strips and any unused test kit component to the original foil bag, reseal them together with the desiccant provided, and put in the refrigerator. Bring all necessary reagents to room temperature.

Water [DIL] for medium [ASYMED], standard [STD] and controls [CTRL1, CTRL2]

Push the lid up, pull it back to the rim of the glass and then remove the entire seal by turning.

Assay medium [ASYMED]

- The medium must be freshly prepared before each test
- Take the dry bag out of medium vial [ASYMED] by tweezers, shake off and discard.
- Add 10 ml of water [DIL] to the assay medium [ASYMED], securely close the bottle and shake well. The amount is sufficient for 6 strips.
- Heat the bottle with medium [ASYMED] in a water-bath at 95 °C for 5 min, while shaking well at least twice. It is important to make sure that the medium bottle [ASYMED] is firmly closed at all times.
- Quickly cool the medium bottle [ASYMED] to under 30 °C.
- Filter 10 ml medium [ASYMED] sterilely with a 0.2 µm filter in a centrifuge test tube (e.g. 15 ml, Falcon).

Controls [CTRL1, CTRL2]

- The controls must be freshly prepared before each test.
- Open the bottle of control [CTRL1, CTRL2], place the screw-top lid upside-down on the work bench.
- Add 0,75 ml water [DIL] from the test kit to the control bottle [CTRL1, CTRL2], close the bottle and dissolve by vortexing the bottle (= control).
- Add 300 µl serum to 300 µl of the prepared enzyme solution, shake and incubate for 30 min at 37 °C in the dark. Afterwards, heat to 95°C for 30 min, cool quickly and centrifuge for 10 min at 10 000 x g.
- Take 100 µl from the supernatant of the treated control, add 400 µl water [DIL] and mix. The control treatment and dilution results in a final dilution of 1:10 (= dilution factor).
- For the concentration of the controls [CTRL1, CTRL2] please see control specification.

Standard [STD]

Before the test, freshly prepare the standard curve solutions:

- Open the bottle of standard [STD], place the screw-top lid upside-down on the work bench.
- Add x ml (x = see QS test kit data sheet) water [DIL] from the test kit to the standard bottle [STD], close the bottle and shake (= standard concentrate).
- Add water [DIL] into 6 sterile reaction vials (capacity 1.5 – 2.0 ml) and then pipet the standard concentrate to the vials. Prepare a standard curve using the following scheme:

Vitamin B ₆ [µg / l]	Water [DIL] [µl]	+	Standard [STD] [µl]	=	Total volume [µl]
Blank: 0	940	+	0	=	940
Standard 1: 0.36	940	+	60	=	1000
Standard 2: 1.2	400	+	100	=	500
Standard 3: 1.8	350	+	150	=	500
Standard 4: 2.4	300	+	200	=	500
Standard 5: 3.6	200	+	300	=	500

9.2. Test Initiation

- Take as many microtiter strips as needed from the kit in put them in the second microtiter strip holder [FRA]. Return unused strips to the original foil bag, reseal them together with the desiccant provided, and store at 2-8° C to prevent contamination or moisture exposure.
- A medium solution is sufficient for 6 strips.
- Put 150 µl Vitamin B₆ assay medium [ASYMED] in the cavities.
- Add 150 µl standard [STD], sample and control [CTRL1, CTRL2], respectively, in the cavities. Pre-rinse the pipette tip with standard and sample solution respectively.
- Carefully seal the cavities with plastic foil [FOL]. Important: the cavities must be made airtight by pressing down with the hand!
- Keep at **30 °C** for 44 - 48 hrs in an incubator.

9.3. Measurement

- Securely press the foil [FOL] down with the hand.
- Upturn the plate [PLATE] onto a tabletop and shake the germination well.
- Turn the plate over again and carefully remove the foil [FOL], beginning with the upper, right corner and pulling diagonally backwards at an angle of 180°.
- Remove air bubbles in the cavities using a pipette tip or a needle.
- Read turbidity in an ELISA-Reader at E 610 - 630 nm (alternatively at 540 - 550 nm).

Please note

- After 48 hrs incubation time, the microtiter plate may be stored for a maximum of 48 hrs in the refrigerator before measuring the turbidity.
- To prevent time-loss through holidays or weekends, the microtiter plate may also be evaluated after 60 hrs incubation.

10. EVALUATION OF RESULTS

We recommend to use the **4-Parameter-algorithm** to calculate the results. The sample dilution factor should be considered for data evaluation.

Vitamin B₆ in serum:

Vitamin B₆ [µg/l] = Value from the standard curve x sample dilution factor (10)

Please note:

- A concentration range of 3.6 - 36.1 µg/l vitamin B₆ is covered using a sample dilution factor of 10.
- If the enzymatic treatment is omitted, the phosphorylated and nonphosphorylated forms can be differentiated.

Reference value for human serum

(n=74) Vitamin B₆: 4.8 - 17.7 µg/l

We recommend each laboratory to develop its own normal range. The values mentioned above are only for orientation and can deviate from other published data.

11. PERFORMANCE CHARACTERISTICS (obtained using human serum)

Precision and reproducibility

Intra-Assay (n=16)		
	Vitamin B ₆ [µg/l]	CV [%]
Sample 1	9.87	9.17
Inter-Assay (n=5)		
	Vitamin B ₆ [µg/l]	CV [%]
Sample 1	10.98	6.78

Recovery

Samples from 3 patients were spiked with Vitamin B₆ and analyzed. The mean values are shown below:

n = 5

Sample	Mean value measured in original sample [µg/l]	Spike [µg/l]	Vitamin B ₆ expected [µg/l]	Vitamin B ₆ measured [µg/l]	Recovery Rate [%]
A	11.99	10	21.99	26.00	140
		20	31.99	35.60	118
Recovery rate in total [%]					129

n = 5

Sample	Mean value measured in original sample [µg/l]	Spike [µg/l]	Vitamin B ₆ expected [µg/l]	Vitamin B ₆ measured [µg/l]	Recovery Rate [%]
B	9.46	10	19.46	22.99	135
		20	29.46	32.50	115
Recovery rate in total [%]					125

n = 5

Sample	Mean value measured in original sample [µg/l]	Spike [µg/l]	Vitamin B ₆ expected [µg/l]	Vitamin B ₆ measured [µg/l]	Recovery Rate [%]
C	8.855	10	18.85	18.31	95
		20	28.85	32.36	118
Recovery rate in total [%]					107

12. REFERENCES

Morris M C et al. (2004) Dietary niacin and the risk of incident Alzheimer's disease and of cognitive decline. J Neurol Neurosurg Psychiatry 75: 1093-1099

Ambrosch A et al. (2000) Relation between homocysteinaemia and diabetic neuropathy in patients with Type 2 diabetes mellitus. Diabetic Med 18; 185-192

Dierkes J et al. (2001) Vitamin supplementation can markedly reduce the homocysteine elevation induced by fenofibrate. Atherosclerosis 158; 161-164

Dierkes J et al. (2001) Homocysteine lowering effect of different multivitamin preparations in patients with end-stage renal disease. J Renal Nut 11; 67-72

Selhub J et al. (1995) Association between plasma homocysteine concentrations and extra-cranial carotid-artery stenosis. N Engl J Med 332:286-291

13. GENERAL NOTES ON THE TEST AND TEST PROCEDURE

- This assay was produced and put on the market according to the IVD guidelines of 98/79/EC.
- Test components contain organic solvents. Contact with skin or mucous membranes must be avoided.
- All reagents in the test package are for in vitro diagnostic use only.
- Reagents should not be used after the date of expiry stated on the label.
- Single components with different lot numbers should not be mixed or exchanged.
- Guidelines for medical laboratories should be observed.
- Incubation time, incubation temperature and pipetting volumes of the different components are defined by the producer. Any variations of the test procedure that are not coordinated with the producer may influence the results of the test. ifp Institute for Product Quality GmbH can, therefore, not be held reliable for any damage resulting from this.

Used Symbols:



Temperature limitation



Catalogue Number



In Vitro Diagnostic Medical Device



Contains sufficient for <n> tests



Manufacturer



Use by



Lot number



Immundiagnostik AG

Stubenwald-Allee 8a
D-64625 Bensheim

Tel.: +49 (0) 62 51/70 19 00

Fax: +49 (0) 62 51/84 94 30

info@immundiagnostik.com

www.immundiagnostik.com