



VB6 Enzymatic

Vitamin B6 Enzymatic Assay

KK-VB6
100 tests

Revision date: 2013-01-02

ENGLISH

INTENDED USE

The BÜHLMANN Vitamin B6 enzymatic assay (KK-VB6) is intended for the quantitative determination of Pyridoxal 5'-Phosphate (PLP, vitamin B6) in EDTA plasma. The BÜHLMANN Vitamin B6 enzymatic assay allows for detection of potential vitamin B6 deficiency or overdose.

PRINCIPLE OF THE ASSAY

L-Tyrosine is decarboxylated by a vitamin B6 (PLP)-dependent enzyme, tyrosine-apo-decarboxylase to tyramine. The activity of the apo-enzyme is directly proportional to the amount of PLP present in the reaction mixture. Tyramine is then oxidized to p-hydroxybenzyl aldehyde and hydrogen peroxide (H₂O₂) by the action of tyramine oxidase. The H₂O₂ reacts with 4-aminoantipyrine and N-ethyl-N-(2-hydroxy-3-sulfo-propyl)-m-toluidine (TOOS) in the presence of horseradish peroxidase to obtain a quinoneimine (purple dye) whose absorbance is measured at 546 nm (520-595 nm).

REAGENTS SUPPLIED AND PREPARATION

Reagents ¹⁾		Quantity	Code	Reconstitution
Dilution Buffer		1 vial 60 ml	B-KVB6-DB	Ready to use
Enzyme Buffer		1 vial 13 ml	B-KVB6-EB	Ready to use
Substrate	R1	1 vial lyophilized	B-KVB6-SUB	Add 5 ml of Dilution Buffer
Apo-Enzyme	R2	1 vial lyophilized	B-KVB6-APOE	Add 5 ml of Dilution Buffer
Enzyme	R3	2x 1 vial lyophilized	B-KVB6-E	Add 5 ml of Enzyme Buffer
Calibrators ²⁾		3x 1 vial lyophilized	B-KVB6-CASET	Add 2 ml of Dilution Buffer
Controls Low and Normal		2x 1 vial lyophilized	B-KVB6-CONSET	Add 2 ml of Dilution Buffer

Table 1

¹⁾ Reconstitute the lyophilized reagents as indicated in chapter Procedural Notes.

²⁾ After reconstitution the PLP concentration of the Calibrators is **0 (Blank), 20, and 200 nmol/L**. The samples must be diluted 1:40 for the measurement in the enzyme assay. The indicated concentrations of the reconstituted calibrators are taking this dilution factor into account and contain the following effective concentrations: 0, 0.5, and 5 nmol/L.

STORAGE AND SHELF LIFE OF REAGENTS

Unopened Reagents	
All reagents are stable at 2-8°C until expiration date	
Opened / Reconstituted Reagents	
Substrate	Stable for 2 months at 2-8°C
Dilution Buffer	
Enzyme Buffer	
Enzyme	
Apo-Enzyme	Stable at ≤-20 °C for 2 months; Store in aliquots, if reagent is needed for more than 3 runs.
Calibrators	
Controls Low and Normal	

Table 2

WARNINGS AND PRECAUTIONS

Plasma samples may be potentially infectious and should be handled according to good laboratory practice using appropriate precautions.

MATERIALS REQUIRED BUT NOT PROVIDED

- 25 µl, 50 µl, 500 µl, 1000 µl precision pipettes and multipipette with disposable tips for 50 µl and 100 µl.
- 5 ml volumetric pipette
- Disposable 2 ml polypropylene screw-cap microtube
- Microtiter plate MaxiSorp F8 (NUNC, Code: 468667) or equivalent
- Microtiter plate reader with filter between 520 and 595 nm (maximum absorbance at 546 nm)
- Microtiter plate incubator set at 37 °C
- Microtiter plate shaker

SPECIMEN COLLECTION AND STORAGE

EDTA plasma samples:

Minimum volume of 0.5 ml of blood is recommended for duplicate determination. Draw blood into an EDTA venipuncture tube. Centrifuge for 15 minutes at 1000 x g at 2-8 °C immediately after collection or after storage at 2-8 °C for up to 12 hours protected from light. **Avoid long exposure to light.** After centrifugation, collect the plasma in polypropylene tubes and store at ≤-20 °C if not assayed immediately. PLP in plasma will remain stable for at least 3 months if stored at ≤-20°C. Avoid repeated freeze-thaw cycles.

LIMITATIONS

Avoid lipemic and hemolytic plasma. **Lipemic plasma:** Samples should be taken from fasting individuals because interferences occur in the photometric determination otherwise. **Hemolytic plasma:** Slightly hemolytic samples can be used. Refer to Table 14.

Specimens other than EDTA plasma have not been validated.

Apo-Enzyme, Calibrators, and Controls must be stored at -20° C after reconstitution. They are stable at ≤-20 °C for 2 months; Store in aliquots, if reagent is needed for more than 3 runs.

PROCEDURAL NOTES

Reconstitution of reagents:

Let the dilution buffer adjust to reach **room temperature**. Reconstitute the lyophilized reagents as indicated, vortex the vials for 30 seconds and leave them for at least 15 minutes at room temperature or use a suspension mixer for 15 minutes. Mix well (vortex) the reagents before use. **Important:** The Apo-Enzyme reagent (B-KVB6-APOE) must be constantly mixed until the lyophilized enzyme has completely dissolved.

ASSAY PROCEDURE

Preparation of samples and controls:

Samples and controls have to be diluted 1:40 with dilution buffer. Diluted samples and controls are not stable. Thus prepare dilution immediately before usage. E.g. pipet 25 µl of patient sample or control into a disposable polypropylene microtube, add 975 µl of Dilution Buffer and mix well (vortex).

In order to avoid temperature effects within the microtiter plate, leave the first and last strip of the test and the first and last well of each strip empty.

The test should be carried out **in duplicates**.

1. Pipet 50 µl of Substrate into wells of microtiter plate.
2. Pipet 50 µl of
 - a. Calibrator 0 nmol/L (Blank)
 - b. Calibrator 20 nmol/L
 - c. Calibrator 200 nmol/L
 - d. Control Low (diluted)

- e. Control Normal (diluted)
 - f. diluted patient samples
- into the respective wells of microtiter plate.
3. Add 50 µl of Apo-Enzyme to each well.
 4. Mix shortly (10-15 seconds) with a microtiter plate shaker.
 5. Incubate the microtiter plate for 30 minutes at 37 °C (+ 5 minutes) in a plate incubator.
 6. Pipet 100 µl of Enzyme with a multipipette (with disposable tips) into wells of microtiter plate.
 7. Shake the plate gently (5-10 seconds) with a microtiter plate shaker.
 8. Incubate the microtiter plate for 15 minutes at 37 °C (+ 3 minutes) in a plate incubator.
 9. Read the OD at 546 nm (or at 520-595 nm) in a microtiter plate reader within 3-5 minutes.

CALCULATION OF RESULTS

Calibration curve

Use endpoint mode with two calibrators (20 and 200 nmol/L). Calibrator 0 is used as Blank. Read absorbances (OD) for Calibrator 0 (Blank), calibrators, controls and samples. Have the duplicates averaged for each calibrator, control, and sample and subtract the average Blank. Have a standard curve created by using linear curve-fitting. Refer to the instrument manual for further details.

Assay range: 9 - 250 nmol/L.

Calculation of results

If samples have been diluted higher than 1:40, the additional dilution factor must be factored in. Samples exceeding 250 nmol/L can be diluted with NaCl 0.9% or dilution buffer e.g. 1:3 and assayed again according to the assay procedure. The respective dilution factor must be factored in the calculation of results.

Refer to Table 11 and Figure 1 for typical results and standard curve. *These results and standard curve are provided for demonstration purposes only. A standard curve must be generated for each set of samples to be assayed.*

Conversion factor: $\text{nmol/L} = \text{ng/mL} \times 4.046$

STANDARDIZATION

The VB6 Calibrators have been calibrated with UV/VIS spectrometry using the molar absorbance coefficient $\epsilon_{389 \text{ nm}}: 6666.7 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$ (substrate: PLP in 0.1 N NaOH).

QUALITY CONTROL

The values of the Low and Normal Controls provided with the kit must be within the lot specific range indicated on the corresponding QC data sheet. Otherwise, the assay has to be repeated.

It is good laboratory practice (GLP) to record the following data for each assay: kit lot number, reconstitution dates of kit components, concentration value of controls, concentration value of internal pool samples.

INDICATORS OF DETERIORATION

A yellow coloration of the reconstituted Substrate reagent will not influence performance.

Visible signs of microbial growth and gross turbidity in the reagents may indicate degradation and warrant discontinuation of use.

PERFORMANCE CHARACTERISTICS

Limit of Blank (LoB): <7 nmol/L. The LoB has been established by repeated measurements of blank values (0.9% NaCl, 1:40 in dilution buffer, n= 60) in accordance with CLSI protocol EP17-A.

Limit of Detection (LoD): <7 nmol/L. The LoD has been established by repeated measurements of two samples containing 6 and 12 nmol/L PLP (n= 60) in accordance with CLSI protocol EP17-A.

Limit of Quantification (LoQ): Lower LoQ: ≤10 nmol/L. The LoQ was determined by repeated measurements of samples at concentrations between 6.3 and 298 nmol/L (n= 40). A limit of 10 % CV was applied.

Precision: Repeatability: <10 % CV; Total precision: <15 % CV. The precision has been determined in accordance with CLSI protocol EP5-A2 by repeated measurements in 2 runs per day over a period of 20 work days (Table 12).

Linearity: 9.0 - 250 nmol/L. Two samples with elevated PLP concentration have been diluted with low PLP samples in accordance with CLSI protocol EP6-A (refer to Figure 3).

Recovery: 81 - 105 %. Three samples have been spiked with increasing amounts of PLP and analyzed in 3 runs (Table 13).

Specificity: The substances listed in Table 14 have been analyzed between 30 and 10'000 nmol/L alone or in combination with 40 nmol/L PLP in order to determine the enzyme specificity.

INTERFERING SUBSTANCES

Interference substances were evaluated in accordance with CLSI protocol EP7-A2 by measurement of two samples.

No interference is detected with the following substances up to the listed concentrations: **triglycerides** (Intralipid® 200 mg/dL; equivalent to 5.6 mmol/L triglycerides), **conjugated bilirubin** (360 µmol/L; 30 mg/dL), **unconjugated bilirubin** (214 µmol/L; 12.5 mg/dL) or **haemoglobin** (3.2 mmol/L; 500 mg/dL).

Other substances and/or factors have not been investigated in this study. Interferences cannot be excluded.

EXPECTED VALUES

Vitamin B6 normal values:

We recommend each laboratory should develop its own normal range. The values mentioned below are only indicative.

The following reference range for plasma has been determined from normal donors (n= 60 adults):

2.5 Percentile nmol/L	97.5 Percentile nmol/L	Median nmol/L
23.0	172.5	57.5

CORRELATION

EDTA plasma samples from subjects tested for vitamin B6 deficiency were used for correlation between HPLC and the two BÜHLMANN assays, the Radio-Enzymatic (RK-VB6) and the Enzymatic Assays (KK-VB6). The following correlations were established (refer to Figure 4 and Table 15).

DEUTSCH

ANWENDUNGSZWECK

Der BÜHLMANN Vitamin B6 enzymatic Assay (KK-VB6) wurde zur direkten und quantitativen Bestimmung von Pyridoxal 5'-Phosphate (PLP, Vitamin B6) in EDTA Plasma entwickelt. Der Assay ermöglicht die Bestimmung eines Vitamin B6 Mangels oder einer Überdosierung.

PRINZIP DER METHODE

L-Tyrosin wird durch das Vitamin B6 (PLP) abhängige Enzym Tyrosine-apo-Decarboxylase zu Tyramin decarboxyliert. Die Aktivität des Apo-Enzyms korreliert direkt proportional zur PLP Konzentration im Reaktionsansatz. Tyramin wird anschliessend durch Tyraminoxidase zu p-Hydroxybenzylaldehyd und Wasserstoffperoxid (H₂O₂) oxidiert. H₂O₂ reagiert mit 4-Aminoantipyrine und N-ethyl-N-(2-hydroxy-3-sulfo-propyl)-m-Toluidin (TOOS) in Gegenwart von Meerrettichperoxidase. Es entsteht ein Quinonimin (violetter Farbstoff), dessen Extinktion bei 546 nm (bzw. 520-595 nm) gemessen wird.

GELIEFERTE REAGENZIEN UND VORBEREITUNG

Reagenzien ¹⁾	Anzahl	Code	Rekonstitution
Verdünnungspuffer	1 Flasche 60 ml	B-KVB6-DB	Gebrauchsfertig
Enzym Buffer	1 Fläschchen 13 ml	B-KVB6-EB	Gebrauchsfertig
Substrat	R1 1 Fläschchen lyophilisiert	B-KVB6-SUB	5 ml Verdünnungs- puffer zugeben
Apo-Enzym	R2 1 Fläschchen lyophilisiert	B-KVB6-APOE	5 ml Verdünnungs- puffer zugeben
Enzym	R3 2x 1 Fläschchen lyophilisiert	B-KVB6-E	5 ml Enzympuffer zugeben
Kalibratoren ²⁾	3x Fläschchen lyophilisiert	B-KVB6-CASET	2 ml Verdünnungs- puffer zugeben
Kontrollen Low und Normal	2x Fläschchen lyophilisiert	B-KVB6-CONSET	2 ml Verdünnungs- puffer zugeben

Table 3

¹⁾ Rekonstituieren Sie die lyophilisierten Reagenzien wie im Abschnitt Procedural Notes beschrieben.

²⁾ Nach Rekonstitution betragen die PLP Konzentrationen der Kalibratoren **0 (Blank), 20, und 200 nmol/L**. Die Proben müssen für die Messung im Enzyme Assay 1:40 verdünnt werden. Die auf den Fläschchen angegebenen Konzentrationen berücksichtigen diesen Faktor. Die effektiven Konzentrationen betragen: 0, 0,5, und 5 nmol/L.

LAGERUNG UND HALTBARKEIT DER REAGENZIEN

Ungeöffnete Reagenzien	
Alle Reagenzien sind bei 2-8°C stabil bis zum Verfallsdatum	
Geöffnete / Rekonstituierte Reagenzien	
Substrate	Geöffnete Reagenzien sind für zwei Monate bei 2-8 °C stabil
Verdünnungspuffer	
Enzympuffer	
Enzyme	
Apo-Enzyme	Stabil bei ≤-20 °C für 2 Monate; In Aliquots lagern, wenn das Reagenz in mehr als 3 Läufen eingesetzt wird.
Kalibratoren ²⁾	
Kontrollen Low und Normal	

Table 4

WARNHINWEISE UND VORSICHTSMASSNAHMEN

- Plasmaproben enthalten Komponenten humanen Ursprungs. Deshalb kann das Risiko einer Übertragung von Erregern bekannten oder unbekanntem Ursprungs nicht ausgeschlossen werden. Sie müssen mit größter Vorsicht und nach den Vorgaben der Guten Labor Praxis verarbeitet werden.

ERFORDERLICHE LABORGERÄTE UND HILFSMITTEL

- Präzisionspipetten (25 µl, 50 µl, 500 µl, 1000 µl)
- Multipipette mit Einsätzen für 50 und 100 µl
- 2 ml Polypropylenmikrotubes mit Schraubverschluss.
- Mikrotiterplatte MaxiSorp F8 (NUNC, Code: 468667) oder Entsprechendes
- Mikrotiterplatten Reader mit Filter zwischen 520 und 595 nm (Maximale Extinktion bei 546 nm)
- Mikrotiterplatten Inkubator bei 37 °C
- Mikrotiterplatten Schüttler

UNTERSUCHUNGSMATERIAL UND LAGERUNG

EDTA Plasmaproben:

Ein Mindestvolumen von 0,5 ml wird für eine Doppelbestimmung empfohlen. Blut mit einem EDTA Röhrchen abnehmen. Danach sofort 15 Minuten bei 1000 x g bei 2-8 °C zentrifugieren oder bis zu 12 Stunden gekühlt und lichtgeschützt lagern und dann zentrifugieren. **Längere Lichtexposition vermeiden.** Nach der Zentrifugation wird das Plasma in ein Polypropylen Röhrchen dekantiert und bei ≤ -20 °C gelagert, sofern es nicht sofort getestet wird. Bei ≤ -20°C ist PLP im Plasma mindestens drei Monate stabil. Wiederholte Einfrier- und Auftauzyklen sind zu vermeiden.

EINSCHRÄNKUNGEN

Lipämische und hämolytische Plasmaproben sollten nicht verwendet werden. **Lipämisches Plasma:** Proben sollten von nüchternen Patienten gewonnen werden, da ansonsten Interferenzen in der photometrischen Messung auftreten. **Hämolytisches Plasma:** Leicht hämolytische Proben können eingesetzt werden. Es wurde nur EDTA Plasma als Probenmatrix validiert.

Apo-Enzym, Kalibratoren und Kontrollen müssen nach dem Auflösen bei -20 °C gelagert werden. Sie sind so 2 Monate stabil; Frieren Sie die Reagenzien in Aliquots ein, wenn, sie für mehr als 3 Ansätze gebraucht werden.

HINWEISE ZUM ABLAUF

Auflösen der Reagenzien:

Lassen Sie den Verdünnungspuffer auf Raumtemperatur äquilibrieren. Lösen Sie die lyophilisierten Reagenzien wie beschrieben auf, vortexen Sie die Fläschchen 30 Sekunden und lassen Sie sie mindestens 15 Minuten bei Raumtemperatur stehen oder lassen Sie sie 15 Minuten auf einem Rollenmischer. Mischen Sie die Reagenzien vor Gebrauch gut (vortexen). **Wichtig:** Das Apo-Enzym (B-KVB6-APOE, Lyophilisat) muss unter ständigem Mischen vollständig aufgelöst werden.

ARBEITSANLEITUNG

Vorbereitung der Proben und Kontrollen:

Proben und Kontrollen müssen 1:40 mit Verdünnungspuffer verdünnt werden. Verdünnte Proben und Kontrollen sind nicht stabil. Deshalb sollte die Verdünnung erst unmittelbar vor dem Test angesetzt werden. Für die Verdünnung pipettieren Sie z.B. 25 µl der Probe oder Kontrolle in ein Polypropylen Mikrotube und geben Sie 975 µl Verdünnungspuffer dazu und mischen Sie gut (vortexen).

Um Temperatureffekte innerhalb der Mikrotiterplatte zu vermeiden, lassen Sie den ersten und letzten Streifen sowie das erste und das letzte Well des Streifens leer.

Der Test sollte in Doppelbestimmung durchgeführt werden.

1. Pipettieren Sie 50 µl Substrat in die Wells der Mikrotiterplatte.
2. Pipettieren Sie 50 µl
 - a. Kalibrator 0 nmol/L (Blank)
 - b. Kalibrator 20 nmol/L
 - c. Kalibrator 200 nmol/L
 - d. Kontrolle Low (verdünnt)
 - e. Kontrolle Normal (verdünnt)
 - f. Verdünnte Proben

in die Wells der Mikrotiterplatte.

3. 50 µl of Apo-Enzyme in jedes Well pipettieren.
4. Kurz (10-15 Sekunden) auf einem Mikrotiterplattenschüttler mischen.
5. IMikrotiterplatte 30 (+ 5) Minuten bei 37 °C in einem Mikrotiterplatteninkubator inkubieren.
6. 100 µl Enzyme mit einer Multipette in die Wells geben.
7. Die Platte leicht (10-15 Sekunden) auf einem Mikrotiterplattenschüttler mischen.
8. IMikrotiterplatte 15 (+ 3) Minuten bei 37 °C in einem Mikrotiterplatteninkubator inkubieren.
9. OD bei 546 nm (oder bei 520-595 nm) in einem Mikrotiterplatten Reader innerhalb von 3-5 Minuten messen.

BERECHNUNG DER ERGEBNISSE

Standardkurve

Endpunkt Modus mit zwei Kalibratoren (20 und 200 nmol/L) wählen. Der Kalibrator 0 wird als Blank eingesetzt. Messen Sie die Extinktion (OD) für Kalibrator 0 (Blank), die übrigen Kalibratoren, Kontrollen und Proben. Von den gemittelten Doppelwerten von Kalibratoren, Kontrollen und Proben wird der Mittelwert des Blanks abgezogen. Die Standardkurve wird mit linearer Regression erstellt. Weitere Details entnehmen Sie dem Gerätehandbuch.

Assay Bereich: 9 - 250 nmol/L.

Berechnung der Ergebnisse

Wenn die Probenverdünnung grösser als 1:40 ist, muss der zusätzliche Faktor berücksichtigt werden. Proben, deren Konzentration > 250 nmol/L können mit 0.9% NaCl oder Verdünnungspuffer z.B. 1:3 verdünnt und erneut gemessen werden. Der entsprechende Verdünnungsfaktor muss bei der Berechnung der Ergebnisse berücksichtigt werden.

Table 11 und Figure 1 zeigen Ergebnisse und eine typische Standardkurve. *Die Ergebnisse und die Standardkurve sollen nur als Beispiel dienen. Eine Standardkurve muss für jeden Ansatz erstellt werden.*

Umrechnungsfaktor: $\text{nmol/L} = \text{ng/mL} \times 4.046$

STANDARDISIERUNG

Die VB6 Kalibratoren wurden mit UV/VIS Spektrometrie unter Verwendung des molaren Extinktionskoeffizienten $\epsilon_{389 \text{ nm}}: 6666.7 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$ (Substrate: PLP in 0.1 N NaOH) kalibriert.

QUALITÄTSKONTROLLE

- Die Werte der im Kit enthaltenen Low und Normal Kontrolle müssen innerhalb der auf dem Kontrollblatt angegebenen Lot-spezifischen Bereiche liegen. Andernfalls muss der Test wiederholt werden.
- Es entspricht Good Laboratory Practice, die folgenden Angaben für jeden Testlauf zu dokumentieren: Lotnummer des Kits, Rekonstitutionsdatum der Reagenzien, Ergebnisse von Kalibratoren, Kontrollen und internen Serum Pools, falls vorhanden.

INDIKATOREN FÜR VORZEITIGEN VERFALL

Eine Gelbfärbung des aufgelösten Substrates hat keinen Einfluss auf die Qualität des Testes.

Sichtbare Zeichen mikrobiellen Wachstums und starke Trübung der Reagenzien kann einen vorzeitigen Verfall der Reagenzien anzeigen und es empfiehlt sich, die Reagenzien nicht mehr zu verwenden.

LEISTUNGSMERKMALE

Limit of Blank (LoB): <7 nmol/L. Der LoB wurde bestimmt durch wiederholte Messungen des Blanks (0.9% NaCl, 1:40 in Verdünnungspuffer, n= 60) gemäss CLSI EP17-A.

Limit of Detection (LoD): <7 nmol/L. Der LoD wurde gemäss CLSI EP17-A bestimmt durch wiederholte Messungen von zwei Proben, die 6 bzw. 12 nmol/L PLP enthielten (n= 60).

Limit of Quantification (LoQ): Unterer LoQ: $\leq 10 \text{ nmol/L}$; oberer LoQ: $> 200 \text{ nmol/L}$. Der LoQ wurde bestimmt durch wiederholte Messungen von Proben, deren PLP Konzentrationen zwischen 6.3 und 298 nmol/L lagen (n= 40). Als Grenze wurde 10 % CV definiert.

Präzision:

Repeatability: <10 % CV; Total Präzision: <15 % CV. Die Präzision wurde gemäss CLSI EP5-A2 durch wiederholte Messungen von Proben in 2 Läufen/Tag über einen Zeitraum von 20 Arbeitstagen bestimmt (Table 12).

Linearität: 9.0 - 250 nmol/L. 2 Proben mit erhöhten PLP Konzentrationen wurden verdünnt mit Proben mit niedrigen PLP Konzentrationen gemäss CLSI EP6-A (siehe Figure 3).

Wiederfindung: 81 - 105 %. Drei Proben wurden mit steigenden PLP Konzentrationen gespikkt und in 3 Läufen analysiert (Table 13).

Spezifität: Die in Table 14 aufgeführten Substanzen wurden zwischen 30 und 10'000 nmol/L analysiert, allein oder in Kombination mit 40 nmol/L PLP, um die Enzymspezifität zu bestimmen.

INTERFERENZEN

Interferierende Substanzen wurden gemäss CLSI EP7-A2 unter Verwendung von 2 Proben evaluiert.

Keine Interferenz wurde festgestellt bis zu den aufgeführten Konzentrationen: **Triglyzeride (Intralipid® 200 mg/dL;** äquivalent zu 5.6 mmol/L Triglyzeride), **Konjugiertes Bilirubin** (360 µmol/L; 30 mg/dL), **unkonjugiertes Bilirubin** (214 µmol/L; 12.5 mg/dL) oder **Hämoglobin** (3.2 mmol/L; 500 mg/dL).

Andere Substanzen oder Faktoren wurden in dieser Studie nicht getestet. Interferenzen können deshalb nicht ausgeschlossen werden.

NORMALWERTE**Vitamin B6 normal values:**

Wir empfehlen, dass jedes Labor seine eigenen Normalwerte erstellt. Die unten aufgeführten Werte sollen nur zur Orientierung dienen.

Der folgende Normalbereich wurde für EDTA Plasma von Blutspendern erstellt. (n= 60 Erwachsene):

2.5 Percentile nmol/L	97.5 Percentile nmol/L	Median nmol/L
23.0	172.5	57.5

KORRELATION

EDTA-Plasma von Probanden, die auf Vitamin B6 Mangel untersucht wurden, wurden für den Vergleich zwischen HPLC und den zwei BÜHLMANN Tests, den Radio-Enzymatischen (RK-VB6) und den Enzymatischen Assay (KK-VB6) verwendet. Folgende Korrelation wurde ermittelt (siehe Figure 4 und Table 15).

DOMAINE D'UTILISATION

Le dosage enzymatique de la vitamine B6, VB6 Enzymatic de BÜHLMANN (KK-VB6), est destiné à la mesure quantitative du Pyridoxal 5'-Phosphate (PLP), également appelé vitamine B6, dans le plasma traité à l'EDTA. Le dosage enzymatique de la vitamine B6 de BÜHLMANN permet de détecter les éventuels surdosages ou carences en vitamine B6.

PRINCIPE DU DOSAGE

La L-tyrosine est décarboxylée en tyramine par une enzyme dépendant de la vitamine B6 ou PLP, la tyrosine-apo-décarboxylase. L'activité de l'apo-enzyme est directement proportionnelle à la quantité de PLP présente dans le milieu réactionnel. La tyramine est ensuite oxydée en p-hydroxybenzyl aldéhyde et en peroxyde d'hydrogène (H₂O₂) sous l'action de la tyramine oxydase. H₂O₂ réagit avec la 4-aminoantipyrine et la N-éthyl-N-(2-hydroxy-3-sulfo-propyl)-m-toluidine (TOOS) en présence de peroxydase de raifort pour obtenir une quinoneimine (colorant violet) qui absorbe à 546 nm (520-595 nm).

RÉACTIFS FOURNIS ET PRÉPARATION

Réactifs ¹⁾		Quantité	Code	Reconstitution
Tampon de dilution		1 flacon 60 ml	B-KVB6- DB	Prêt à l'emploi
Tampon de l'Enzyme		1 flacon 13 ml	B-KVB6- EB	Prêt à l'emploi
Substrat	R1	1 flacon lyophilisé	B-KVB6- SUB	Ajouter 5 ml de tampon de dilution
Apo-Enzyme	R2	1 flacon lyophilisé	B-KVB6- APOE	Ajouter 5 ml de tampon de dilution
Enzyme	R3	2x 1 flacon lyophilisé	B-KVB6-E	Ajouter 5 ml de tampon enzymatique
Calibrateurs ²⁾		3 x 1 flacon lyophilisé	B-KVB6- CASET	Ajouter 2 ml de tampon de dilution
Contrôles Bas et Normal		2x 1 flacon lyophilisé	B-KVB6- CONSET	Ajouter 2 ml de tampon de dilution

Table 5

¹⁾ Reconstituer les réactifs lyophilisés comme décrit dans le chapitre « Remarques Techniques ».

²⁾ Après reconstitution, la concentration en PLP des calibrateurs est respectivement de **0 (blanc), 20 et 200 nmol/L**. Pour le dosage enzymatique, les échantillons doivent être dilués au 1/40e. Les concentrations indiquées pour les calibrateurs reconstitués prennent en compte ce facteur de dilution. Les concentrations effectives sont les suivantes : 0, 0,5 et 5 nmol/L.

STOCKAGE ET DURÉE DE CONSERVATION DES RÉACTIFS

Réactifs non reconstitués	
Tous les réactifs sont stables à une température de 2 à 8 °C jusqu'à leur date de péremption.	
Réactifs ouverts/reconstitués	
Substrat	Tous les réactifs ouverts ou reconstitués sont stables pendant 2 mois à une température de 2 à 8 °C.
Tampon de dilution	
Tampon de l'Enzyme	
Enzyme	
Apo-Enzyme	Stable à une température au dessous de -20 °C pendant 2 mois; Portionner en aliquots si le réactif sera utilisé plus de 3 fois.
Calibrateurs ¹⁾	
Contrôles, Bas et Normal	

Table 6

AVERTISSEMENTS ET PRÉCAUTIONS D'EMPLOI DES RÉACTIFS

Les échantillons de plasma sont potentiellement infectieux. Les manipuler conformément aux Bonnes Pratiques de Laboratoire en respectant les précautions appropriées.

MATÉRIEL REQUIS MAIS NON FOURNI

- Pipettes de précision de 25 µl, 50 µl, 500 µl, 1000 µl et multipipette à pointes jetables de 50 µl et 100 µl
- Pipette volumétrique de 5 ml
- Microtubes jetables en polypropylène à capuchon à vis de 2 ml
- Plaques de microtitration MaxiSorp F8 (NUNC, Code : 468667) ou équivalent
- Lecteur de plaques de microtitration à filtre entre 520 et 595 nm (l'absorbance maximale se situe à 546 nm)
- Incubateur de plaques de microtitration réglé sur 37 °C
- Agitateur de plaques de microtitration

PRÉLÈVEMENT ET STOCKAGE DES ÉCHANTILLONS Échantillons de plasma-EDTA :

Le volume minimal recommandé de prélèvement sanguin est de 0,5 ml, ce qui permet de doubler la mesure. Prélever le sang dans un tube de ponction veineuse contenant de l'EDTA. Centrifuger pendant 15 minutes à 1000 x g à une température comprise entre 2 et 8 °C immédiatement après le prélèvement, ou conserver au réfrigérateur et à l'abri de la lumière pendant un maximum de 12 heures et centrifuger. **Éviter toute exposition prolongée à la lumière.** Après centrifugation, recueillir le plasma dans des tubes de polypropylène et conserver à une température maximale de -20 °C en cas de dosage différé. La concentration en PLP dans le plasma reste constante pendant au moins 3 mois lorsque les échantillons sont conservés à une température maximale de -20 °C. Éviter les cycles de décongélation/recongélation.

LIMITES

Éviter les prélèvements de plasma lipémique et hémolysé. **Plasma lipémique :** prélever les échantillons chez des patients à jeun pour éviter toute interférence dans la mesure photométrique. **Plasma hémolysé :** les échantillons légèrement hémolysés peuvent être utilisés. Se référer au table 14.

Le seul type d'échantillon validé est le plasma traité par EDTA.

L'apoenzyme, les calibrateurs et contrôles doivent être conservés à -20 °C après reconstitution. Ils sont stables 2 mois à -20°C ; conserver en aliquots si le réactif doit être utilisé plus de 3 fois.

REMARQUES TECHNIQUES

Reconstitution des réactifs :

Laisser le tampon de dilution s'équilibrer à la **température ambiante**. Reconstituer les réactifs lyophilisés conformément aux instructions. Mélanger les flacons au vortex pendant 30 secondes et les laisser pendant au moins 15 minutes à température ambiante, ou utiliser un mélange en suspension pendant 15 minutes. Mélanger vigoureusement au vortex les réactifs avant utilisation. **Important :** le réactif apo-enzyme (B-KVB6-APOE) doit être mélangé jusqu'à ce que l'enzyme lyophilisée soit entièrement dissoute.

PROCÉDURE DE DOSAGE

Préparation des échantillons et contrôles :

Diluer impérativement les échantillons et contrôles au 1/40e avec le tampon de dilution. Les échantillons et contrôles dilués sont instables. Préparer les dilutions immédiatement avant utilisation. Par exemple, pipeter 25 µl d'échantillon ou contrôle prélevé chez un patient dans un microtube jetable en polypropylène. Ajouter 975 µl de tampon de dilution. Mélanger vigoureusement au vortex.

Pour éviter les effets de température au sein de la microplaque, ne pas remplir la première et la dernière barrette, ainsi que le premier et le dernier puits de chaque barrette.

Nous recommandons de **doubler** chaque test.

1. Pipeter 50 µl de substrat dans les puits d'une plaque de microtitration.
2. Pipeter 50 µl de
 - a. Calibrateur 0 nmol/L (blanc)
 - b. Calibrateur 20 nmol/L
 - c. Calibrateur 200 nmol/L
 - d. Contrôle Bas dilué
 - e. Contrôle Normal dilué
 - f. Échantillon de patient diluédans les puits de la plaque de microtitration.
3. Ajouter 50 µl d'Apo-Enzyme à chaque puits.
4. Mélanger brièvement, pendant 10 à 15 secondes, dans un agitateur de plaques de microtitration.
5. Incuber la plaque de microtitration pendant 30 minutes à 37 °C (+ 5 minutes) dans un incubateur de plaques.
6. Pipeter 100 µl d'Enzyme à la multipipette (dotée de pointes jetables) dans les puits de la plaque de microtitration.
7. Agiter doucement la plaque pendant 5 à 10 secondes dans un agitateur de plaques de microtitration.
8. Incuber la plaque de microtitration pendant 15 minutes à 37 °C (+ 3 minutes) dans un incubateur de plaques.
9. Lire la DO à 546 nm (ou entre 520 et 595 nm) sur un lecteur de plaques de microtitration dans les 3 à 5 minutes.

CALCUL DES RÉSULTATS

Courbe d'étalonnage

Utiliser un mode en point final avec deux calibrateurs, 20 et 200 nmol/L. Le calibrateur 0 sert de blanc. Lire les absorbances (DO) du calibrateur 0 (blanc), des calibrateurs, des contrôles et des échantillons. Calculer la moyenne des deux valeurs d'absorbance obtenues. Soustraire la moyenne des blancs. Générer une courbe d'étalonnage par régression linéaire. Veuillez vous référer au manuel de votre appareil pour de plus amples informations.

Plage de dosage : 9 - 250 nmol/L.

Calcul des résultats

En cas de dilution des échantillons à plus de 1/40, le facteur de dilution supplémentaire doit être pris en compte. Les échantillons dépassant 250 nmol/L peuvent être dilués avec du NaCl à 0,9 % ou le tampon de dilution, par exemple au 1/3, avant d'être à nouveau dosés en suivant le mode opératoire de dosage. Le facteur de dilution correspondant doit être pris en compte pour le calcul des résultats.

Se reporter à la Table 11 et la Figure 1 pour les résultats caractéristiques et la courbe d'étalonnage. Ces résultats et cette courbe d'étalonnage ne sont fournis qu'à titre

d'exemple. Tracer une courbe d'étalonnage pour chaque nouveau jeu d'échantillons à doser.

Facteur de conversion : $\text{nmol/L} = \text{ng/mL} \times 4,046$

NORMALISATION

Les calibrateurs VB6 sont étalonnés par spectrométrie UV/VIS en utilisant le coefficient d'absorbance molaire $\epsilon_{389 \text{ nm}} : 6666,7 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$ (substrat : PLP dans NaOH 0,1 N).

CONTRÔLE DE QUALITÉ

Les valeurs des contrôles bas et normal fournis dans le kit doivent se situer dans l'intervalle spécifique au lot mentionné sur la fiche de QC. Dans le cas contraire, le dosage doit être répété.

Les Bonnes Pratiques de Laboratoire recommandent d'enregistrer les informations suivantes pour chaque dosage : n° de lot du kit, dates de reconstitution des réactifs utilisés, concentrations des contrôles, concentration des échantillons du pool interne.

INDICATEURS DE DÉGRADATION

Une coloration jaune du substrat reconstitué ne perturbe pas les performances.

Les signes visibles de croissance microbienne ou la turbidité générale des réactifs peuvent indiquer une dégradation et rendent les réactifs impropres à l'utilisation.

CARACTÉRISTIQUES DE PERFORMANCE

Limite de blanc (LoB) : $< 7 \text{ nmol/L}$. La LOB est calculée par des mesures répétées de valeur de blanc (0.9% NaCl, 1:40 dilués par le tampon de dilution, n= 60) selon le protocole CLSI EP17-A.

Limite de détection (LoD) : $< 7 \text{ nmol/L}$. La LOD est calculée par des mesures répétées de deux échantillons contenant respectivement 6 et 12 nmol/L de PLP (n = 60) selon le protocole CLSI EP17-A.

Limite de quantification (LoQ) : LoQ inférieure : $\leq 10 \text{ nmol/L}$. La LOQ est calculée par des mesures répétées d'échantillons à des concentrations comprises entre 6,3 et 298 nmol/L (n = 40). Une limite de 10 % de CV est appliquée.

Précision : Répétabilité : $< 10 \%$ de CV ; Précision totale : $< 15 \%$ de CV. La précision est calculée selon le protocole CLSI EP5-A2 par des mesures répétées à raison de 2 analyses par jour sur une durée de 20 jours ouvrés (Table 12).

Linéarité : 9,0 - 250 nmol/L. Deux échantillons de plasma-EDTA de concentration en PLP élevée sont dilués avec un échantillon de plasma-EDTA à faible concentration en PLP, conformément au protocole CLSI EP6-A. Consulter la Figure 3.

Récupération : 81 - 105 %. Trois échantillons sont additionnés de quantités croissantes de PLP avant d'être analysés dans 3 analyses (Table 13).

Spécificité : les substances répertoriées dans la Table 14 de concentration entre 30 et 10 000 nmol/L sont analysées, seules ou associées à 40 nmol/L de PLP pour déterminer la spécificité enzymatique.

SUBSTANCES INTERFÉRENTES

Les substances interférentes sont évaluées selon le protocole CLSI EP7-A2 en mesurant deux échantillons.

Aucune interférence n'est observée avec les substances suivantes à la concentration indiquée : **triglycérides (Intralipid® 200 mg/dL ; équivalent à 5,6 mmol/L de triglycérides), bilirubine conjuguée (360 $\mu\text{mol/L}$;**

30 mg/dL), **bilirubine non conjuguée (214 $\mu\text{mol/L}$; 12,5 mg/dL) ou hémoglobine (3,2 mmol/L ; 500 mg/dL).**

Les autres substances et/ou facteurs n'ont pas été testés dans l'étude. Toute interférence ne peut donc être exclue.

VALEURS ATTENDUES

Valeurs normales pour la vitamine B6 :

Nous recommandons à chaque laboratoire de déterminer sa propre plage de valeurs normales. Les valeurs mentionnées ci-après ne le sont qu'à titre indicatif.

La plage de référence suivante pour le plasma a été déterminée chez des donneurs normaux (n = 60 adultes) :

2,5e centile nmol/L	97,5e centile nmol/L	Médiane nmol/L
23,0	172,5	57,5

CORRÉLATION

Des échantillons de plasma-EDTA prélevés chez des sujets chez qui on a recherché une carence en vitamine B6 sont utilisés pour la corrélation entre la HPLC et les deux dosages BÜHLMANN, radio-enzymatique (RK-VB6) et enzymatique (KK-VB6). Les corrélations suivantes ont été déterminées (consulter la Figure 4 et la Table 15).

ITALIANO

USO PREVISTO

Il dosaggio enzimatico BÜHLMANN della vitamina B6 (KK-VB6) è utilizzato per la determinazione quantitativa del piridossal-5'-fosfato (PLP, vitamina B6) nel plasma EDTA. Il dosaggio enzimatico BÜHLMANN della vitamina B6 consente la rilevazione di potenziali carenze o dosi eccessive della vitamina B6.

PRINCIPIO DEL DOSAGGIO

La L-tirosina è decarbossilata in tiramina attraverso un enzima dipendente dalla vitamina B6 (PLP), la tirosina-apo-decarbossilasi. L'attività dell'apoenzima è direttamente proporzionale alla quantità di PLP presente nella miscela di reazione. La tiramina viene quindi ossidata a p-idrossibenzil aldeide e perossido di idrogeno (H₂O₂) mediante l'azione della tiramina ossidasi. L'H₂O₂ reagisce con la 4-amminoantipirina e la N-etil-N-(2-idrossi-3-solfopropil)-m-toluidina (TOOS) in presenza di perossidasi di rafano, formando una chinoneimina (colorante porpora), la cui assorbanza viene misurata a 546 nm (o 520-595 nm).

REAGENTI FORNITI E PREPARAZIONE

Reagenti ¹⁾		Quantità	Codice	Ricostituzioni
Tampone di diluizione		1 flaconcino 60 ml	B-KVB6- DB	Pronto per l'uso
Tampone enzimatico		1 flaconcino 13 ml	B-KVB6- EB	Pronto per l'uso
Substrato	R1	1 flaconcino liofilizzato	B-KVB6- SUB	Aggiungere 5 ml di Tampone di diluizione
Apoenzima	R2	1 flaconcino liofilizzato	B-KVB6- APOE	Aggiungere 5 ml di Tampone di diluizione
Enzima	R3	2 x 1 flaconcino liofilizzato	B-KVB6-E	Aggiungere 5 ml di Tampone enzimatico
Calibratori ²⁾		3 x 1 flaconcino liofilizzato	B-KVB6- CASET	Aggiungere 2 ml di Tampone di diluizione
Controlli Basso e Normale		2 x 1 flaconcino liofilizzato	B-KVB6- CONSET	Aggiungere 2 ml di Tampone di diluizione

Tabella 7

1) Ricostituire i reagenti liofilizzati come indicato al paragrafo Note procedurali.

2) Dopo ricostituzione, la concentrazione di PLP dei Calibratori è di **0 (Blank), 20 e 200 nmol/l**. I campioni devono essere diluiti 1:40 per la misurazione nel dosaggio enzimatico. Le concentrazioni indicate dei calibratori ricostituiti tengono conto di questo fattore di diluizione e contengono le seguenti concentrazioni effettive: 0, 0,5 e 5 nmol/l.

CONSERVAZIONE E TEMPO DI CONSERVAZIONE DEI REAGENTI

Reagenti non aperti	
Tutti i reagenti sono stabili a 2-8 °C fino alla data di scadenza	
Reagenti aperti / Ricostituiti	
Tutti i reagenti aperti / ricostituiti sono stabili per 2 mesi a 2-8 °C	
Substrate	stabile per 2 mesi a 2-8 °C C
Tampone di diluizione	
Tampone enzimatico	
Enzima	
Apo-Enzyme	Stabile a <_di 20°C per 2 mesi;

Calibratori ²⁾	conservare in aliquote se il reagente è richiesto per più di 3 runs.
Controlli Basso e Normale	

Tabella 8

AVVERTENZE E PRECAUZIONI

I campioni di plasma sono potenzialmente infetti e dovrebbero essere maneggiati seguendo le idonee precauzioni dettate dalla buona pratica di laboratorio.

MATERIALI RICHIESTI MA NON FORNITI

- Pipette di precisione da 25 µl, 50 µl, 500 µl e 1000 µl e multipipette con puntali monouso per 50 µl e 100 µl.
- Pipetta volumetrica da 5 ml
- Microprovetta monouso in polipropilene con tappo a vite da 2 ml
- Micropiastra MaxiSorp F8 (NUNC, Codice: 468667) o equivalente
- Lettore per micropiastra con filtro tra 520 e 595 nm (massima assorbanza a 546 nm)
- Incubatore per micropiastre regolato a 37 °C
- Agitatore per micropiastre

PRELIEVO E CONSERVAZIONE DEI CAMPIONI

Campioni di plasma EDTA:

È consigliato un volume minimo di 0,5 ml di sangue per la determinazione in doppio. Eseguire un prelievo di sangue in una provetta EDTA per venipuntura. Centrifugare per 15 minuti a 1000 x g a 2-8 °C immediatamente dopo il prelievo, o dopo conservazione a 2-8 °C fino a un massimo di 12 ore al riparo dalla luce.

Evitare una lunga esposizione alla luce. Dopo centrifugazione, raccogliere il plasma in provette di polipropilene e conservare a temperatura ≤ -20 °C se non viene analizzato immediatamente. Il PLP nel plasma rimarrà stabile per almeno 3 mesi se conservato a temperatura ≤ -20 °C. Evitare ripetuti cicli di congelamento-scongelo.

LIMITAZIONI

Evitare il plasma lipemico ed emolitico. Plasma lipemico: I campioni devono essere prelevati da individui a digiuno perché altrimenti si verificano interferenze nella determinazione fotometrica.

Plasma lipemico: I campioni devono essere prelevati da pazienti a digiuno perché in caso contrario si verificano interferenze nella determinazione fotometrica.

Plasma emolitico: possono essere utilizzati campioni leggermente emolitici. Vedere la tabella 14.

Non sono stati convalidati campioni diversi dal plasma EDTA.

Prelievi diversi dal plasma EDTA non sono stati validati.

Apo-Enzima, Calibratori e Controlli devono essere conservati a -20 °C una volta ricostituiti. Questi sono stabili a < -20 °C per 2 mesi, conservare in aliquote se il reagente è richiesto per più di 3 runs.

NOTE PROCEDURALI

Ricostituzione dei reagenti:

Far equilibrare il tampone di diluizione a **temperatura ambiente**. Ricostituire i reagenti liofilizzati secondo le indicazioni, vortexare i flaconcini per 30 secondi e lasciarli per almeno 15 minuti a temperatura ambiente o utilizzare un miscelatore per sospensioni per 15 minuti. Miscelare bene (vortexare) i reagenti prima dell'uso. **Importante:** il reagente Apoenzima (B-KVB6-APOE) deve essere mescolato continuamente fino alla completa dissoluzione dell'enzima liofilizzato.

PROCEDURA DEL TEST

Preparazione dei campioni e controlli:

Diluire i campioni e i controlli 1:40 con il Tampone di diluizione. I campioni e controlli diluiti non sono stabili. Occorre quindi preparare la diluizione subito prima dell'uso. Ad esempio, pipettare 25 µl di campione di paziente o controllo in una microprovetta di polipropilene monouso, aggiungere 975 µl di Tampone di diluizione e mescolare bene (vortexare).

Al fine di evitare gli effetti della temperatura all'interno della micropiastra, lasciare vuota la prima e l'ultima striscia del test e il primo e l'ultimo pozzetto di ogni striscia.

Il test deve essere effettuato **in duplicato**.

1. Pipettare 50 µl di substrato nei pozzetti della micropiastra.
2. Pipettare 50 µl di
 - a. Calibratore 0 nmol/L (Bianco)
 - b. Calibratore 20 nmol/l
 - c. Calibratore 200 nmol/L
 - d. Controllo Basso (diluito)
 - e. Controllo Normale (diluito)
 - f. Campioni diluiti di pazientinei pozzetti della micropiastra.
3. Aggiungere 50 µl di Apoenzima a ciascun pozzetto.
4. Mescolare brevemente (10-15 secondi) con un rotatore per micropiastra.
5. Incubare la micropiastra per 30 minuti a 37 °C (+ 5 minuti) in un incubatore per micropiastra.
6. Pipettare 100 µl di Enzima con una multipipetta (con puntali monouso) nei pozzetti della micropiastra.
7. Agitare delicatamente la piastra (per 5-10 secondi) con un agitatore per micropiastra.
8. Incubare la micropiastra per 15 minuti a 37 °C (+ 3 minuti) in un incubatore per micropiastra.
9. Leggere la densità ottica (DO) a 546 nm (o a 520-595 nm) in un lettore per micropiastra entro 3-5 minuti.

CALCOLO DEI RISULTATI

Curva di taratura

Utilizzare la modalità endpoint con due calibratori (20 e 200 nmol/l). Il Calibratore 0 viene utilizzato come Bianco. Leggere le assorbanze (densità ottica; DO) per il Calibratore 0 (Bianco), calibratori, controlli e campioni. Fare la media dei valori in duplicato per ogni calibratore, controllo e campione e sottrarre la media dei pozzetti del Bianco. Creare una curva standard mediante interpolazione lineare della curva. Consultare il manuale dello strumento per ulteriori dettagli.

Intervallo rilevabile del dosaggio: 9 - 250 nmol/l.

Calcolo dei risultati

Se i campioni sono stati diluiti con un rapporto superiore a 1:40, occorre tenere conto del fattore di diluizione aggiuntivo. I campioni con concentrazioni superiori a 250 nmol/l possono essere diluiti con NaCl 0,9% o Tampone di diluizione, ad esempio 1:3, e analizzati nuovamente con la procedura prevista per il dosaggio. Nel calcolo dei risultati occorre tenere conto del rispettivo fattore di diluizione.

Fare riferimento a Table 11 e Figure 1 per i risultati tipici e la curva standard. *Questi risultati e la curva standard sono forniti unicamente a scopo dimostrativo. Occorre*

generare una curva standard per ciascun set di campioni da dosare.

Fattore di conversione: $\text{nmol/l} = \text{ng/ml} \times 4,046$

STANDARDIZZAZIONE

I Calibratori VB6 sono stati tarati con spettrometria UV/VIS utilizzando il coefficiente di assorbanza molare $\epsilon_{389 \text{ nm}}: 6666.7 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$ (substrato: PLP in NaOH 0,1 N).

CONTROLLO DI QUALITÀ

I valori dei controlli interni Basso e Normale forniti con il kit devono essere compresi nell'intervallo specifico del lotto, indicato sulla corrispondente scheda tecnica CQ. In caso contrario, il dosaggio deve essere ripetuto.

È buona pratica di laboratorio (BPL) registrare i seguenti dati per ciascun dosaggio: numero di lotto del kit, date di ricostituzione dei componenti, valori di concentrazione dei controlli, valori di concentrazione del campione del pool interno.

INDICATORI DI DETERIORAMENTO

Una colorazione gialla del reagente Substrato ricostituito non influirà sulle prestazioni.

Segni visibili di crescita microbica e l'evidente torbidità nei reagenti possono essere indicativi di una degradazione e giustificare l'interruzione del loro impiego.

CARATTERISTICHE PRESTAZIONALI

Limite del Bianco (LoB): < 7 nmol/l. Il LoB è stato determinato mediante misurazioni ripetute di valori di bianco con NaCl 0,9% (n= 60) in conformità con il protocollo CLSI EP17-A.

Limite di rilevabilità (LoD): <7 nmol/l. Il LoD è stato determinato mediante misurazioni ripetute di due campioni contenenti 6 e 12 nmol/l di PLP (n= 60) in conformità con il protocollo CLSI EP17-A.

Limite di Quantificazione (LoQ): LoQ inferiore: ≤10 nmol/l. Il LoQ è stato determinato mediante misurazioni ripetute di campioni a concentrazioni comprese tra 6,3 e 298 nmol/l (n= 40). È stato applicato un limite del 10% di CV.

Precisione: Riproducibilità: <10% CV; Precisione totale: <15% CV. La precisione è stata determinata in conformità con il protocollo CLSI EP5-A2 mediante misurazioni ripetute in 2 run per giorno, per un periodo di 20 giorni lavorativi (Table 12).

Linearità: 9,0 - 250 nmol/l. Due campioni di plasma EDTA con concentrazioni di PLP elevate sono stati diluiti con campione di plasma EDTA a bassa concentrazione di PLP in conformità con il protocollo CLSI EP6-A (fare riferimento a Figure 3).

Recupero: 81 - 105 %. Tre campioni sono stati addizionati con quantità crescenti di PLP e analizzati in 3 run (Table 13).

Specificità: le sostanze elencate nella Table 14 sono state analizzate in concentrazioni comprese tra 30 e 10000 nmol/l, da sole o in combinazione con 40 nmol/l di PLP per determinare la specificità dell'enzima.

SOSTANZE INTERFERENTI

Le sostanze interferenti sono state valutate in conformità con il protocollo CLSI EP7-A2 mediante misurazione di due campioni.

Non è stata rilevata alcuna interferenza con le seguenti sostanze fino alle concentrazioni elencate: **trigliceridi (Intralipid® 200 mg/dl; equivalenti a 5,6 mmol/l di**

trigliceridi), **bilirubina coniugata** (360 µmol/l; 30 mg/dl), **bilirubina non coniugata** (214 µmol/l; 12,5 mg/dl) o **emoglobina** (3,2 mmol/l; 500 mg/dl).

Non sono state indagate altre sostanze e/o fattori nello studio di specificità. Interferenze non possono essere escluse.

VALORI ATTESI

Valori normali della vitamina B6:

È consigliabile che ciascun laboratorio sviluppi il suo range normale. I valori citati di seguito sono solo indicativi.

È stato determinato il seguente range di normalità per il plasma da donatori di sangue normali (n= 60 adulti):

Percentile 2,5 nmol/l	Percentile 97,5 nmol/l	Mediana nmol/l
23,0	172,5	57,5

CORRELAZIONE

Campioni di plasma EDTA provenienti da soggetti analizzati per la carenza di vitamina B6 sono stati utilizzati per la correlazione tra HPLC e i due dosaggi BÜHLMANN, i dosaggi radioenzimatici (RK-VB6) e i dosaggi enzimatici (KK-VB6). Sono state trovate le seguenti correlazioni (fare riferimento a Figure 4 e Table 15).

ESPAÑOL

USO PREVISTO

El ensayo enzimático para vitamina B6 de BÜHLMANN (KK-VB6) está previsto para la determinación cuantitativa de 5'-fosfato de piridoxal (PLP, vitamina B6) en plasma con EDTA. Permite detectar posibles deficiencias o sobredosis de vitamina B6.

PRINCIPIO DEL ENSAYO

La L-tirosina resulta descarboxilada por acción de un enzima dependiente de la vitamina B6 (PLP), la tirosin-apodescarboxilasa, para formar tiramina. La actividad del apoenzima esta directamente proporcional a la cantidad de PLP presente en la mezcla de reacción. La tiramina se oxida entonces para dar p-hidroxibencilaldehído y peróxido de hidrógeno (H₂O₂) por acción de la tiraminoxidasa. El H₂O₂ reacciona con 4-aminoantipirina y N-etil-N-(2-hidroxi-3-sulfopropil)-m-toluidina (TOOS) en presencia de peroxidasa de rábano picante para obtener una quinoneimina (tinte púrpura) cuya absorbancia se mide a 546 nm (520-595 nm).

REACTIVOS SUMINISTRADOS Y PREPARACIÓN

Reactivos ¹⁾	Cantidad	Código	Reconstitución
Tampón de dilución	1 vial 60 ml	B-KVB6-DB	Listo para su uso
Tampón de enzima	1 vial 13 ml	B-KVB6-EB	Listo para su uso
Substrato	R1 1 vial liofilizado	B-KVB6-SUB	Añada 5 ml de tampón de dilución
Apo-Enzima	R2 1 vial liofilizado	B-KVB6-APOE	Añada 5 ml de tampón de dilución
Enzima	R3 2 viales liofilizados	B-KVB6-E	Añada 5 ml de tampón de enzima
Calibradores ²⁾	3 viales liofilizados	B-KVB6-CASET	Añada 2 ml de tampón de dilución
Controles Bajo y Normal	2 viales liofilizados	B-KVB6-CONSET	Añada 2 ml de tampón de dilución

Tabla 9

¹⁾ Reconstituya los reactivos liofilizados tal como se indica en el capítulo Notas de procedimiento.

²⁾ Tras la reconstitución, la concentración de PLP de los calibradores es **0 (blanco), 20 y 200 nmol/L**. Las muestras deben diluirse en proporción 1:40 para su determinación en el ensayo enzimático. Las concentraciones indicadas para los calibradores reconstituidos ya tienen en cuenta ese factor de dilución, siendo las concentraciones efectivas las siguientes: 0, 0,5 y 5 nmol/L.

ALMACENAMIENTO Y VIDA ÚTIL DE LOS REACTIVOS

Reactivos sin abrir	
Todos los reactivos son estables a 2-8 °C hasta la fecha de caducidad	
Reactivos abiertos / reconstituidos	
Todos los reactivos abiertos / reconstituidos son estables durante 2 meses a 2-8 °C	
Substrato	Reactivos abiertos / reconstituidos son estables durante 2 meses a 2-8 °C
Tampón de dilution	
Tampón de enzima	
Enzima	
Apo-Enzima	Estable a ≤-20 ° C por dos meses; congelar en aliquots, cuando el reactivo esta usado mas que tres veces
Calibradores ¹⁾	
Controles Bajo y Normal	

Tabla 10

ADVERTENCIAS Y PRECAUCIONES

Las muestras de plasma pueden ser potencialmente infecciosas y se deben manipular siguiendo buenas prácticas de laboratorio y tomando las precauciones apropiadas.

MATERIALES REQUERIDOS PERO NO SUMINISTRADOS

- Pipetas de precisión de 25 µl, 50 µl, 500 µl y 1000 µl, y multipipeta con puntas desechables para 50 µl y 100 µl
- Pipeta volumétrica de 5 ml
- Microtubo de polipropileno desechable de 2 ml con tapón de rosca
- Placa de microtitulación MaxiSorp F8 (NUNC, Código: 468667) o equivalente
- Lector de placas de microtitulación con filtro entre 520 y 595 nm (absorbancia máxima a 546 nm)
- Incubador de placas de microtitulación configurado en 37 °C
- Agitador de placas de microtitulación

EXTRACCIÓN Y ALMACENAMIENTO DE LAS MUESTRAS

Muestras de plasma con EDTA:

Se recomienda un volumen mínimo de 0,5 ml de sangre para determinación por duplicado. Extraiga la sangre a un tubo de venopunción con EDTA. Centrifugue el tubo durante 15 minutos a 1000 x g y 2-8 °C inmediatamente después de la extracción o después de almacenarlo refrigerado durante hasta 12 horas; protéjalo de la luz.

Evite exposiciones prolongadas a la luz. Tras la centrifugación, pase el plasma a tubos de polipropileno y almacenelo a ≤ -20 °C si no se va a proceder inmediatamente al ensayo. El PLP del plasma se mantendrá estable durante al menos 3 meses si se almacena a ≤ -20 °C. Evite proceder a ciclos repetidos de congelación y descongelación.

LIMITACIONES

Evite el plasma lipémico y hemolítico. **Plasma lipémico:** Las muestras se deben tomar de pacientes en ayunas, ya que de lo contrario se producirían interferencias en la determinación fotométrica. **Plasma hemolítico:** Plasma ligeramente hemolítico puede ser utilizado. Referirse a table 14.

El ensayo no ha sido validado para muestras que no sean de plasma con EDTA.

Apo-Enzima, Calibradores y Controles se mantendrán estable durante 2 meses si se almacena a ≤ -20 °C después de la reconstitución. Conservare en alícuotas si el reactivo esta requerido para más que 3 runs.

NOTAS DE PROCEDIMIENTO

Reconstitución de los reactivos:

Deje que el tampón de dilución alcance la **temperatura ambiente**. Reconstituya los reactivos liofilizados según lo indicado, someta a vórtex los viales durante 30 segundos y déjelos durante al menos 15 minutos a temperatura ambiente o utilice un mezclador de suspensión durante 15 minutos. Mezcle bien los reactivos (sométalos a vórtex) antes de su uso.

Importante: El reactivo apoenzima (B-KVB6-APOE) debe mezclarse constantemente hasta la completa disolución del enzima liofilizado.

PROCEDIMIENTO DE ENSAYO

Preparación de las muestras y controles:

Las muestras deben ser diluidas en proporción 1:40 con tampón de dilución. Las muestras y controles diluidos no son estables. Por lo tanto, prepare la dilución inmediatamente antes de su uso. P.ej.: pipetee 25 μ l de muestra del paciente o control en un microtubo de polipropileno desechable, añada 975 μ l de tampón de dilución y mezcle bien (someta el tubo a vórtex).

Con el fin de evitar efectos de temperatura dentro de la placa de microtitulación, deje vacías la primera y la última tira de la prueba así como el primer y el último pocillo de cada tira.

La prueba debería llevarse a cabo **en duplicados**.

1. Pipetee 50 μ l de sustrato en pocillos de una placa de microtitulación.
2. Pipetee 50 μ l de
 - a. Calibrador de 0 nmol/L (blanco)
 - b. Calibrador de 20 nmol/L
 - c. Calibrador de 200 nmol/L
 - d. Control bajo diluido
 - e. Control normal diluido
 - f. Muestras de pacientes diluidas

en los pocillos de la placa de microtitulación.

3. Añada 50 μ l de apoenzima a cada pocillo.
4. Mezcle brevemente (10-15 segundos) con un rotador de placas de microtitulación.
5. Incube la placa de microtitulación durante 30 minutos a 37 °C (+ 5 minutos) en un incubador de placas.
6. Pipetee 100 μ l de enzima con una multipipeta (con puntas desechables) en los pocillos de la placa de microtitulación.
7. Agite la placa suavemente (5-10 segundos) con un agitador de placas de microtitulación.
8. Incube la placa de microtitulación durante 15 minutos a 37 °C (+ 3 minutos) en un incubador de placas.
9. Lea la DO a 546 nm (o a 520-595 nm) en un lector de placas de microtitulación en el plazo de 3-5 minutos.

CÁLCULO DE LOS RESULTADOS

Curva de calibración

Utilice el modo de punto final con dos calibradores (20 y 200 nmol/L). El calibrador 0 se utiliza como blanco. Lea las absorbancias (DO) correspondientes al blanco (calibrador 0), los calibradores, los controles y las muestras. Obtenga el promedio de los duplicados correspondientes a cada calibrador, control y muestra, y résteles el promedio del blanco. Cree una curva patrón utilizando un ajuste de curva lineal. Consulte los detalles en el manual del instrumento.

Rango de ensayo: 9 - 250 nmol/L.

Cálculo de los resultados

Si las muestras tienen una dilución superior a 1:40, será preciso tomar en cuenta ese factor de dilución adicional. Las muestras con resultado por encima de 250 nmol/L pueden diluirse con NaCl al 0,9% o tampón de dilución, p.ej. en proporción 1:3, y ensayarse de nuevo conforme al procedimiento de ensayo. En el cálculo de los resultados habrá que tomar en cuenta el factor de dilución correspondiente.

Consulte la Table 11 y la Figure 1 para ver ejemplos típicos de resultados y una curva patrón. *Dichos resultados y curva patrón se ofrecen únicamente a efectos de demostración. Se debe generar una curva patrón para cada conjunto de muestras que se vayan a ensayar.*

Factor de conversión: $\text{nmol/L} = \text{ng/mL} \times 4,046$

ESTANDARIZACIÓN

Los calibradores para VB6 han sido calibrados con espectrometría UV/VIS utilizando el coeficiente de absorbancia molar $\epsilon_{389 \text{ nm}}: 6666,7 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$ (sustrato: PLP en NaOH 0,1 N).

CONTROL DE CALIDAD

Los valores obtenidos para los controles bajo y normal suministrados con el kit deben caer dentro del rango específico del lote indicado en la correspondiente hoja de datos de CC. De lo contrario, será preciso repetir el ensayo.

Entra dentro de las buenas prácticas de laboratorio (BPL) registrar los datos siguientes para cada ensayo: número de lote del kit, fechas de reconstitución de los componentes del kit, valores de concentración de los

controles, valores de concentración de la muestra agregada interna.

INDICADORES DE DETERIORO

Una coloración amarilla del reactivo substrato reconstituido no tiene ningún efecto en la eficiencia del ensayo.

Signos visibles de desarrollo microbiano o una turbidez apreciable en los reactivos pueden ser indicativos de degradación y son motivo para dejar de utilizarlos.

CARACTERÍSTICAS DE EFICIENCIA

Límite para el blanco (LoB): <7 nmol/L. El LoB se ha establecido mediante medidas repetidas de los valores del blanco (0.9% NaCl, diluidos 1:40 con tampón de dilución, n= 60) conforme al protocolo CLSI EP17-A.

Límite de detección (LoD): <7 nmol/L. El LoD se ha establecido mediante medidas repetidas de los valores de dos muestras que contenían 6 y 12 nmol/L de PLP (n= 60) conforme al protocolo CLSI EP17-A.

Límite de cuantificación (LoQ): LoQ inferior: ≤10 nmol/L. El LoQ se determinó mediante medidas repetidas de muestras con concentraciones de entre 6,3 y 298 nmol/L (n= 40). Se aplicó un límite del 10% de CV.

Precisión: Repetibilidad: <10% de CV; Precisión total: <15% de CV. La precisión se determinó de conformidad con el protocolo CLSI EP5-A2 mediante medidas repetidas en 2 tandas al día durante un período de 20 días de trabajo (Table 12).

Linealidad: 9,0 - 250 nmol/L. Dos muestras de plasma con EDTA con concentraciones elevadas de PLP se diluyeron con una muestra de plasma con EDTA con baja concentración de PLP de conformidad con el protocolo CLSI EP6-A (véase la Figure 3).

Recuperación: 81 - 105 %. Se analizaron en tres tandas tres muestras a las que se habían añadido cantidades crecientes de PLP (Table 13).

Especificidad: Para determinar la especificidad enzimática se analizaron las sustancias recogidas en la Table 14 entre 30 y 10.000 nmol/L, solas o en combinación con 40 nmol/L de PLP.

SUSTANCIAS INTERFERENTES

Las sustancias interferentes se evaluaron de conformidad con el protocolo CLSI EP7-A2 mediante la determinación de dos muestras.

No se detectaron interferencias con las sustancias siguientes hasta las concentraciones indicadas: **triglicéridos (Intralipid®)** 200 mg/dL; equivalente a 5,6 mmol/L de triglicéridos), **bilirrubina conjugada** (360 µmol/L; 30 mg/dL), **bilirrubina no conjugada** (214 µmol/L; 12,5 mg/dL) o **hemoglobina** (3,2 mmol/L; 500 mg/dL).

En el estudio de especificidad no se investigaron otras sustancias y/o factores. No es posible excluir interferencias.

VALORES ESPERADOS

Valores normales de vitamina B6:

Recomendamos que cada laboratorio obtenga su propio rango normal. Los valores mencionados a continuación son sólo indicativos.

Se ha determinado el rango de referencia siguiente para plasma procedente de donantes normales (n= 60 adultos):

Percentil nmol/L	2,5	Percentil nmol/L	97,5	Mediana nmol/L
	23,0		172,5	57,5

CORRELACIÓN

Se utilizaron muestras de plasma con EDTA procedentes de sujetos analizados por posibles deficiencias de vitamina B6 para correlacionar el ensayo mediante HPLC y los dos ensayos de BÜHLMANN, el ensayo radioenzimático (RK-VB6) y el enzimático (KK-VB6). Se encontraron las correlaciones siguientes (véanse la Figure 4 y la Table 15).

TABLES/ TABELLEN/ TABLES/ TABELLE/ TABLAS

Figure 1: Example of Standard Curve

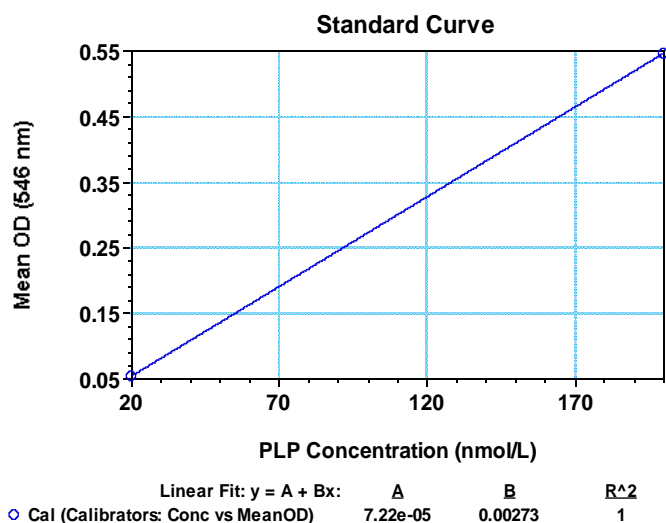


Table 11: Example of Results

Calibrator [nmol/L]	Netto OD*	Mean OD	CV (%)
20	0.054 0.057	0.056	3.8
200	0.556 0.561	0.559	0.7

OD_{brutto} Blank (Calibrator 0) = 0.183

Sample	Netto OD*	Result nmol/L	Mean Result nmol/L	CV (%)
Con Low	0.0987	35.3	36.8	5.5
	0.1067	38.2		
Con Normal	0.2696	96.5	100.1	5.1
	0.2897	103.7		
S1	0.0523	18.7	17.6	8.6
	0.0463	16.6		
S2	0.0657	24.0	24.7	4.2
	0.0698	25.5		
S3	0.1128	39.8	39.9	0.1
	0.1130	39.9		
S4	0.2934	104.3	106.0	2.4
	0.3033	107.8		
S5	0.4964	176.7	177.6	0.8
	0.5019	178.6		

* Netto OD: Brutto OD - Blank (Calibrator 0).

Table 12: Precision (% CV)

Sample	nmol/L	Repeatability (Within Run)	Between Run	Between Day	Total
Con Low	34.6	3.5%	9.1%	0.0%	9.8%
Con Normal	99.3	2.9%	6.2%	0.0%	6.8%
S1	15.7	6.0%	10.1%	0.0%	11.8%
S2	25.6	5.1%	7.2%	4.9%	10.0%
S3	39.5	2.7%	9.7%	0.0%	10.1%
S4	106.7	1.9%	5.2%	1.4%	5.7%
S5	170.6	1.6%	5.1%	0.0%	5.4%

Table 13: Recovery

Sample spiked with [nmol/L]	S1		S2	
	Obs [nmol/L]	O/E [%]	Obs [nmol/L]	O/E [%]
200	202.7	100	203.4	90
180	184.3	100	206.3	99
120	129.5	104	152.3	104
60	66.5	103	91.7	105
40	46.2	104	69.8	104
30	36.2	105	59.7	105
22.5	26.4	98	49.9	101
13.5	16.3	91	40.6	100
9.0	13.5	100	35.9	100
7.0	11.1	96	35.2	104
4.5	7.2	81	31.4	100
0	4.5	100	27.0	90
Mean		98.5 ± 6.75 %		100.2 ± 5.2%

Table 14: Specificity of Tyrosine-apo-decarboxylase

Component	Maximal tested concentration [nmol/L]	Interaction
Pyridoxal (PL)	< 10'000	≤ 0.1%
Pyridoxine (PN)		
Pyridoxamine (PM)		
4-pyridoxic acid (PA)		
Pyridoxamine 5'-phosphate (PMP)	< 1'200	≤ 0.2%
	< 10'000	≤ 0.8%

Figure 2: Precision profile for EDTA plasma

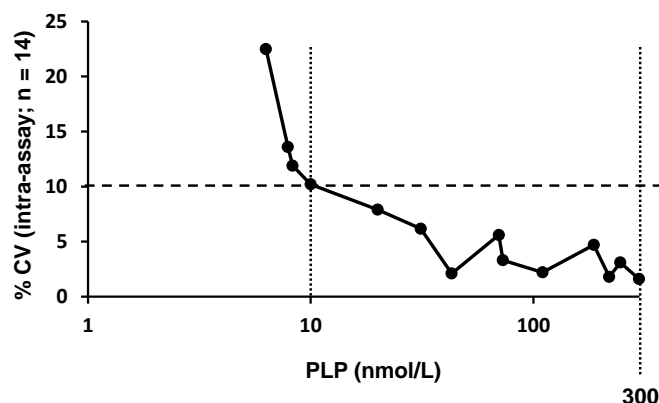


Figure 3

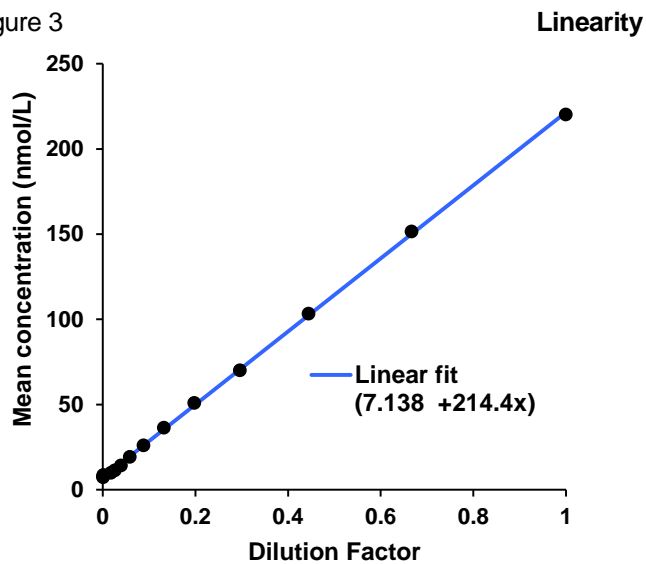


Table 15: Correlation

Correlation	n	R ²	Bias	Slope
KK-VB6 vs. HPLC	44	0.99	-0.06	0.92
KK-VB6 vs. RK-VB6	41	0.95	4.35	0.90
RK-VB6 vs. HPLC	44	0.97	-7.92	1.11

RK-VB6: BÜHLMANN Vitamin B6 Radio-Enzymatic Assay (REA)
HPLC: High-Performance Liquid Chromatography.

Table description: "Calculation of Results" (pg. 4),
"Performance Characteristics" (pg. 4).

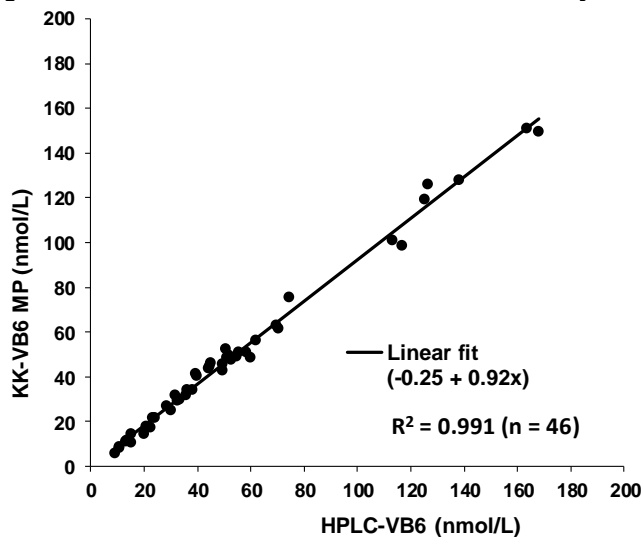
Tabellenbeschreibung: siehe "Leistungsmerkmale" (Seite 6) und "Berechnung der Ergebnisse" (6).

Explications relatives aux tableaux: voir "Calcul des résultats" (page 8), "Caractéristiques de Performance" (page 9).

Descrizione tavola: "Caratteristiche di Prestazione" (pagina 11) e "Calcolo dei risultati" (pagina 11).

Explicaciones relativas a las Tablas: ver "Características de Eficiencia" (página 14) y "Cálculo de los resultados" (13).

Figure 4 Correlation with Vitamin B6 HPLC assay

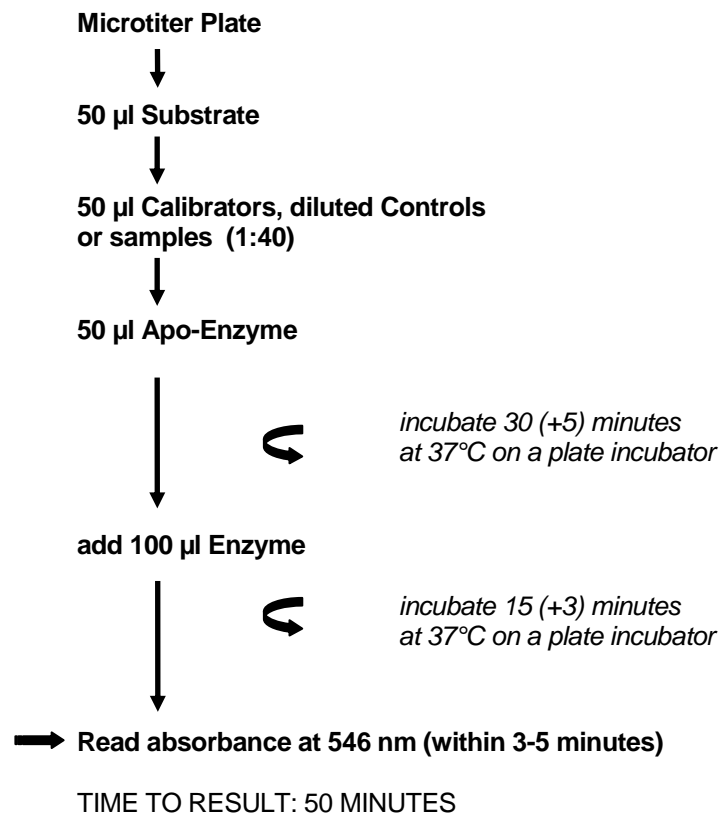


APPENDIX II





REFERENCES/ LITERATURREFERENZEN/ REFERENCES/ RIFERIMENTI/ REFERENCIAS

- Leklem JE.: *Vitamin B6: a status report*. J Nutr. 1990; **120**:1503-7.
- Lui A, Lumeng L, Aronoff GR, Li TK.: *Relationship between body store of vitamin B6 and plasma pyridoxal-P clearance: metabolic balance studies in humans*. J Lab Clin Med. 1985; **106**:491-7
- IOM (Institute of Medicine). 1998. *Dietary Reference Intakes for Thiamin, Riboflavin, Niacin, Vitamin B6, Folate, Vitamin B12, Pantothenic Acid, Biotin, and Choline*. Washington, DC: National Academy Press.
- McNulty H, Pentieva K, Hoey L, Ward M. *Homocysteine, B-vitamins and CVD*. Proc Nutr Soc. 2008 May; **67**(2):232-7. Review.
- Shimizu H, Taniguchi K, Sugiyama M, Kanno T. *Rapid Enzymatic Analysis of Plasma for Tyrosine*. Clin Chem. 1990; **36**(1):32-5.
- BÜHLMANN RK-VB6 Vitamin B6 Radio-enzymatic Assay.
- Bates CJ. *Vitamin analysis*. Ann Clin Biochem. 1997; **34**(6): 599-626. Review.
- Reynolds T, Brain A. *A simple internally standardised isocratic HPLC assay for vitamin B6 in human serum*. J Liq Chromatogr. 1992; **15**:897-914.

Vitamin B6 enzymatic



APPENDIX II
SYMBOLS/ SYMBOLE/ SYMBOLES/ SIMBOLI/ SIMBOLOS

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
	Temperature limitation Zulässiger Temperaturbereich Limites de température Limiti di temperatura Límites 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

Symbol	Explanation
CONTROL L	Control Low Kontrolle tief Contrôle bas Controllo basso Control bajo
CONTROL N	Normal Control Normalkontrolle Contrôle Normal Controllo normale Control Normal
CAL A	Calibrator A Kalibrator A Calibreur A Calibratore A Calibrador A
CAL B	Calibrator B Kalibrator B Calibreur B Calibratore B Calibrador B
CAL 0	Calibrator 0 Kalibrator 0 Calibreur 0 Calibratore 0 Calibrador 0
SUB	Substrate Substrat Substrat Substrato Substrato
APOE	Apo-Enzyme Apo-Enzym Apo-Enzyme Apo-Enzima Apo-Enzima
E	Enzyme Enzym Enzyme Enzima Enzima
DB	Dilution Buffer Verdünnungs-Puffer Tampon de dilution Tampone per diluzione Tampón de dilución
EB	Enzyme Buffer Enzym-Puffer Tampon de l'enzyme Tampone di enzima Tampón de enzima



Patent pending