

ID-Vit[®] Vitamin B₆

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

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

Gültig ab / Valid from 2022-07-19

REF KIF006

REF KIF006.2

Σ 96

Σ 2x 96



IVD

CE



Immundiagnostik AG, Stubenwald-Allee 8a, 64625 Bensheim, Germany

Tel.: +49 6251 70190-0

Fax: + 49 6251 70190-363

e.mail: info@immundiagnostik.com

www.immundiagnostik.com

Inhalt

1. VERWENDUNGSZWECK	2
2. EINLEITUNG	2
3. TESTPRINZIP	3
4. INHALT DER TESTPACKUNG	3
5. ERFORDERLICHE LABORGERÄTE UND HILFSMITTEL	4
6. LAGERUNG UND VORBEREITUNG DER REAGENZIEN	4
6.1 Wasser	4
6.2 Herstellung der Enzymlösung	4
6.3 Herstellung der Kontrollen	5
6.4 Herstellung der Standardkurve	5
6.5 Herstellung des sterilen Assay-Mediums	5
6.6 Mikrotiterplatte [PLATE]	6
7. PROBENLAGERUNG UND -VORBEREITUNG	6
7.1 Probenvorbehandlung	6
7.2 Probenverdünnung	7
8. TESTDURCHFÜHRUNG	7
8.1 Testvorbereitungen	7
8.2 Testansatz	7
8.3 Messung	7
9. AUSWERTUNG DER ERGEBNISSE	8
9.1 Berechnung	8
9.2 Qualitätskontrolle	8
10. TESTCHARAKTERISTIKA	9
10.1 Präzision und Reproduzierbarkeit	9
10.2 Wiederfindung	9
11. EINSCHRÄNKUNGEN	10
12. VORSICHTSMASSNAHMEN	10
13. ALLGEMEINE HINWEISE ZUM TEST	11
14. LITERATUR	11

1. VERWENDUNGSZWECK

Der ID-Vit® Vitamin B₆-Mikrotiterplattentest ist ein mikrobiologisches Verfahren zur Bestimmung des Gesamtgehaltes an Vitamin B₆ in Serum. Alle benötigten Reagenzien und der Standard sind im Test enthalten. Mit dem Test können 96 Bestimmungen inklusive 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
- Taubheit in den Gliedmaßen
- 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
- Lebererkrankungen
- Alkoholmissbrauch
- erblichen Eiweißstoffwechselkrankheiten (z. B. Homocystinurie)
- der Einnahme oraler Verhütungsmittel („Pille“) oder Medikamenten gegen Epilepsie oder Asthma
- Schwangerschaft und Stillzeit

Indikationen

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

3. TESTPRINZIP

Das Serum wird enzymatisch vorbehandelt und verdünnt in die Kavitäten einer Mikrotiterplatte gegeben, die mit *Saccharomyces cerevisiae* beschichtet sind. Nach Zugabe von Vitamin B₆ als Standard oder als in einer Serumprobe enthaltenes Vitamin wächst die Hefe so lange, bis das Vitamin aufgebraucht ist. Die Inkubation erfolgt bei **30 °C** für **48 h**. Das Wachstum des *Saccharomyces 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 Vitamins B₆ ist dabei direkt proportional der Trübung.

4. INHALT DER TESTPACKUNG

Art.-Nr.	Bezeichnung	Kit-Komponenten	Menge	
			KIF006	KIF006.2
KIF006	PLATE	Mikrotiterplatte, beschichtet mit <i>Saccharomyces cerevisiae</i>	1 x	2 x
	SOL	Probenvorbereitungspuffer	7 x 5 ml	13 x 5 ml
	ENZ	Enzym, lyoph.	7 x	13 x
	DIL	Wasser	4 x 30 ml	5 x 30 ml
	ASYMED	Vitamin-B ₆ -Assay-Medium	4 x	4 x
	STD	Vitamin-B ₆ -Standard, lyoph.	4 x	3 x
	FOL	Abklebefolie	1 x ganze 3 x halbe	3 x ganze
	FRA	Ersatzrahmen zum Umstecken der Mikrotiterstreifen	1 x	1 x
	CTRL1	Vitamin-B ₆ -Kontrolle 1, lyoph.	4 x	3 x
	CTRL2	Vitamin-B ₆ -Kontrolle 2, lyoph.	4 x	3 x

5. ERFORDERLICHE LABORGERÄTE UND HILFSMITTEL

- Inkubator mit dunkler Inkubationskammer, 30 °C
- Wasserbad (90 °C–100 °C)
- Wasserbad (37 °C) oder Thermoblock mit variabler Temperatur (37 °C, 95 °C)
- ELISA-Reader 610–630 nm (540–550 nm)
- Präzisionspipetten und sterile Pipettenspitzen für den Einmalgebrauch mit variablen Volumina von 20–1 000 µl
- 5-ml- bzw. 10-ml-Pipette
- 1,5–2 ml-Reaktionsgefäße, steril
- 0,2 µm-Polyethersulfon (PES)-Sterilfilter und Einwegspritze (10 ml)
- 15 ml-Zentrifugenröhrchen, steril (z. B. Falcons)
- Biozentrifuge (10 000 g)

6. LAGERUNG UND VORBEREITUNG DER REAGENZIEN

- Den Testkit und die Reagenzien bei 2–8 °C lagern.
- Angesetzte Reagenzien unmittelbar verwenden und nach Testansatz verwerfen.
- Bitte achten Sie bei mehrfachem Einsatz des Kits 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 4x je nach Probenaufkommen bis zum angegebenen Haltbarkeitsdatum verwendet werden.

6.1 Wasser

- Wasser [DIL] (für Medium [ASYMED], Standard [STD] und Kontrollen [CTRL1, CTRL2])
- Deckel nach oben drücken, nach hinten bis zum Glasrand abziehen und dann durch Drehen den gesamten Verschluss entfernen.

6.2 Herstellung der Enzymlösung

- 4 ml Probenvorbereitungspuffer [SOL] in Fläschchen mit lyophilisiertem Enzym [ENZ] überführen und mittels Vortex-Wirbelmischer homogenisieren.
- Die Enzymlösung kann nicht aufbewahrt werden.

6.3 Herstellung der Kontrollen

- Die lyophilisierten Kontrollen [CTRL1, CTRL2] sind mit je 750 µl Wasser [DIL] aus dem Testkit zu resuspendieren und mittels Vortex-Wirbelmischer zu homogenisieren.
- Die Kontrollen werden nach der Rekonstitution wie eine Probe behandelt.
- Die Konzentration der Kontrollen ändert sich von Charge zu Charge und ist der Produktspezifikation zu entnehmen.

6.4 Herstellung der Standardkurve

- Für die Herstellung des für die Standardkurve benötigten Standardkonzentrats ist der lyophilisierte Standard [STD] mit x ml (x = genaues Volumen bitte dem beiliegenden Quality Control Protocol entnehmen) Wasser [DIL] aus dem Testkit zu resuspendieren und mittels Vortex-Wirbelmischer zu homogenisieren.
- In 6 sterilen Reaktionsgefäßen (Fassungsvermögen 1,5–2 ml) wird mit dem Standardkonzentrat und Wasser [DIL] eine Standardkurve nach folgendem Schema hergestellt:

Vitamin B ₆ [µg/l]	Wasser [DIL] [µl]	+	Standard- konzentrat [µl]	=	Gesamt- volumen [µl]
Blank: 0	500	+	0	=	500
Standard 1: 0,09	985	+	15	=	1 000
Standard 2: 0,72	440	+	60	=	500
Standard 3: 1,5	375	+	125	=	500
Standard 4: 2,4	300	+	200	=	500
Standard 5: 3,6	200	+	300	=	500

6.5 Herstellung des sterilen Assay-Mediums

- Das sterile Assay-Medium muss vor jedem Test frisch hergestellt werden.
- Trockenmittelbeutel aus dem Fläschchen mit einer 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 im Wasserbad bei 90–100°C für 5 min erhitzen; währenddessen mindestens 2 mal gut schütteln. Es ist darauf zu achten, dass dabei die Mediumflasche immer fest verschlossen ist.
- Mediumflasche schnell auf unter 30°C abkühlen (bei 2–8°C für 10 min).
- Medium mit Einwegspritze (10 ml) und dem 0,2-µm-PES-Filter in ein steriles Zentrifugenröhrchen (15 ml, z. B. Falcon) sterilfiltrieren.
- Das so hergestellte sterile Assay-Medium wird im Test verwendet.

6.6 Mikrotiterplatte [PLATE]

- Die Mikrotiterplatte [PLATE] ist in der Aluminiumverpackung mit dem Trockenmittelbeutel bei 2–8°C zu lagern.
- Die Mikrotiterplatte [PLATE] muss vor Feuchtigkeit und Kontamination geschützt sein.
- Es ist darauf zu achten, dass die Aluminiumverpackung nicht beschädigt wird.
- Die Aluminiumverpackung nach dem Öffnen wieder sorgfältig verschließen.
- Nur die benötigten Mikrotiterstreifen unmittelbar vor Gebrauch entnehmen, um Kontaminationen zu vermeiden.

7. PROBENLAGERUNG UND -VORBEREITUNG

- Als Probe eignet sich Serum.
- 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 zentrifugiert werden (mind. 5 min bei 10 000 g). Den resultierenden Überstand im Test einsetzen.

7.1 Probenvorbehandlung

300 µl Serum/Kontrolle mit 300 µl der vorbereiteten Enzymlösung versetzen (Verhältnis 1:2), mischen und bei 37°C für 30 min im Dunkeln inkubieren. Anschließend bei 95°C für 30 min erhitzen, schnell abkühlen (bei 2–8°C für 10 min) und 10 min zentrifugieren (10 000 g).

7.2 Probenverdünnung

Vom Überstand des vorbehandelten Serums/der vorbehandelten Kontrolle 100 µl abnehmen, 400 µl Wasser [DIL] zugeben und mischen. Die Probenvorbehandlung und -verdünnung entsprechen insgesamt einer 1:10-Verdünnung (= Probenverdünnungsfaktor).

8. TESTDURCHFÜHRUNG

8.1 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.

8.2 Testansatz

- Benötigte Mikrotiterstreifen entnehmen und in den Ersatzrahmen [FRA] stecken.
- 150 µl steriles Assay-Medium in die Kavitäten geben.
- Je 150 µl der hergestellten Standardkurve, vorbereiteten Proben und Kontrollen in die jeweiligen Kavitäten pipettieren. Pipettenspitzen jeweils mit der Standard-, Proben- bzw. Kontroll-Lösung vorspülen.
- Sorgfältig die befüllten Kavitäten mit der im Kit enthaltenen Klebefolie [FOL] abkleben. Wichtig: die Kavitäten müssen durch Andrücken mit der Hand luftdicht verschlossen werden!
- Bei **30 °C** für 48 h im Brutschrank inkubieren.

8.3 Messung

- Klebefolie [FOL] nochmals mit der Hand fest andrücken
- Mikrotiterplatte [PLATE] über Kopf drehen, auf eine Tischoberfläche legen und Keime gut aufschütteln
- Mikrotiterplatte [PLATE] wieder zurückdrehen und die Abklebefolie [FOL] vorsichtig nach hinten abziehen. Mit einer Hand dabei die Streifen fest im Rahmen halten (Folie ist stark klebend!).
- Eventuell 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.

9. AUSWERTUNG DER ERGEBNISSE

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

Der Blank sollte eine optische Dichte < Standard 1 haben. Er dient als optische Kontrolle zum Ausschluss von Kontaminationen und wird nicht in der Berechnung berücksichtigt.

9.1 Berechnung

Vitamin B₆ in µg/l = Wert aus Standardkurve × Probenverdünnungsfaktor (10)

Referenzbereich für Humanserum

Anhand einer laborinternen Studie mit Serumproben von augenscheinlich Gesunden (n = 74) wurden die folgenden Werte ermittelt.

Vitamin B₆: 4,8–17,7 µg/l

Anmerkung

Bei einem Probenverdünnungsfaktor von 10 ist ein Bereich von 0,9–36 µg/l Vitamin B₆ abgedeckt.

Wir empfehlen jedem Labor, einen eigenen Referenzbereich zu etablieren, 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.

9.2 Qualitätskontrolle

Die Extinktion des höchsten Standards muss > 0,6 sein.

Die Ergebnisse der Kontrollen müssen auf Richtigkeit überprüft werden. Liegen eine oder mehrere Kontrollen oder der höchste Standard außerhalb des angegebenen

Bereiches, kann Immundiagnostik die Richtigkeit der Messergebnisse nicht gewährleisten.

10. TESTCHARAKTERISTIKA

Die nachfolgenden Testcharakteristika wurden mit Humanserum erhoben.

10.1 Präzision und Reproduzierbarkeit

Intra-Assay (n = 16)

	Vitamin B ₆ [µg/l]	VK [%]
Probe	9,87	9,17

Inter-Assay (n = 5)

	Vitamin B ₆ [µg/l]	VK [%]
Probe	10,98	6,78

10.2 Wiederfindung

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

Probe (n=5)	Mittelwert 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

Probe (n=5)	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

Probe (n=5)	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

11. EINSCHRÄNKUNGEN

Vollblut kann nicht im Test eingesetzt werden.

12. 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] verwenden.
- Bei den Sterilfiltern muss es sich um Polyethersulfon-Sterilfilter handeln.
- Bei jeder Testdurchführung muss eine Standardkurve mitgeführt werden.
- Die Kontrollen sollten bei jedem Ansatz mitgemessen werden.
- Es wird die Messung in Doppelwerten empfohlen.
- Ergibt die höhere Verdünnung einen höheren Messwert, können Hemmstoffe wie Antibiotika vorliegen.
- Die Reagenzien dürfen nach Ablauf des Haltbarkeitsdatums 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.

13. 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.
- ID-Vit® ist eine Marke der Immundiagnostik AG.
- 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 Testcharakteristika wie Inkubationszeiten, Inkubationstemperaturen und Pipettiervolumina der verschiedenen Komponenten wurden vom Hersteller festgelegt. Nicht mit dem Hersteller abgesprochene Veränderungen in der Testdurchführung können die Resultate beeinflussen. Die Firma Immundiagnostik AG übernimmt für die hierdurch entstandenen Schäden und Folgeschäden keine Haftung.
- Bei Gewährleistungsansprüchen ist das beanstandete Material mit schriftlicher Erklärung innerhalb von 14 Tagen zum Hersteller, der Immundiagnostik AG, zurückzusenden.
- Qualitätskontrollen sollten immer mitgemessen werden.
- Die Bestimmung ist immer nach der dem Kit beigefügten Arbeitsanleitung durchzuführen.

14. LITERATUR

1. Ambrosch, A. et al., 2001. Relation between homocysteinaemia and diabetic neuropathy in patients with Type 2 diabetes mellitus. *Diabetic medicine : a journal of the British Diabetic Association*, **18**(3), pp.185–92.
2. Dierkes, J. et al., 2001. Homocysteine lowering effect of different multivitamin preparations in patients with end-stage renal disease. *Journal of renal nutrition : the official journal of the Council on Renal Nutrition of the National Kidney Foundation*, **11**(2), pp.67–72.

3. Dierkes, J. et al., 2001. Vitamin supplementation can markedly reduce the homocysteine elevation induced by fenofibrate. *Atherosclerosis*, **158**(1), pp.161–4.
4. Morris, M.C. et al., 2004. Dietary niacin and the risk of incident Alzheimer's disease and of cognitive decline. *Journal of neurology, neurosurgery, and psychiatry*, **75**(8), pp.1093–9.
5. Selhub, J. et al., 1995. Association between plasma homocysteine concentrations and extracranial carotid-artery stenosis. *The New England journal of medicine*, **332**(5), pp.286–91.
6. Basheer, M.P. et al., 2016. Vitamin B complex and homocysteine status and Cognitive impairment in the elderly among Indian population. *Journal of Neuroscience and Behavioral Health*, **8**(4), pp.20–26.
7. Lindqvist, M., Hellstrom, A. & Henriksson, A.E., 2012. Abdominal aortic aneurysm and the association with serum levels of Homocysteine, vitamins B6, B12 and Folate. *Am J Cardiovasc Dis*, **2**(4), pp.318–322.
8. Loitsch, S.M. et al., 2014. Comparison of a new microbiological assay with a standard high-performance liquid chromatographic method for determination of vitamin B6 in serum. *Clinical laboratory*, **60**(6), pp.1035–41.

Verwendete Symbole:

	Temperaturbegrenzung		Bestellnummer
	In-Vitro-Diagnostikum		Zu verwenden mit
	Hersteller		Inhalt ausreichend für <n> Prüfungen
	Chargenbezeichnung		Verwendbar bis
	Achtung		Gebrauchsanweisung beachten
	Spezifikationsdatenblatt beachten		Eindeutige Produktkennung

ID-Vit[®] vitamin B₆

Microbiological test kit for the determination of vitamin B₆ in serum using a *Saccharomyces cerevisiae* coated microtitre plate

For use in human and veterinary medicine and in research

Valid from 2022-07-19

REF KIF006

REF KIF006.2

Σ 96

Σ 2x 96



IVD

CE



Immundiagnostik AG, Stubenwald-Allee 8a, 64625 Bensheim, Germany

Tel.: +49 6251 70190-0

Fax: + 49 6251 70190-363

e.mail: info@immundiagnostik.com www.immundiagnostik.com

Table of Contents

1. INTENDED USE	15
2. INTRODUCTION	15
3. PRINCIPLE OF THE TEST	16
4. MATERIAL SUPPLIED	16
5. MATERIAL REQUIRED BUT NOT SUPPLIED	16
6. STORAGE AND PREPARATION OF REAGENTS	17
6.1 <i>Water</i>	17
6.2 <i>Preparation of the enzyme solution</i>	17
6.3 <i>Preparation of the controls</i>	17
6.4 <i>Preparation of the standard curve</i>	18
6.5 <i>Preparation of the sterile assay medium</i>	18
6.6 <i>Microtiter plate [PLATE]</i>	19
7. SAMPLE STORAGE AND PREPARATION	19
7.1 <i>Sample pretreatment</i>	19
7.2 <i>Sample dilution</i>	19
8. ASSAY PROCEDURE	20
8.1 <i>Test preparations</i>	20
8.2 <i>Test procedure</i>	20
8.3 <i>Measurement</i>	20
9. EVALUATION OF RESULTS	21
9.1 <i>Calculation</i>	21
9.2 <i>Quality control</i>	21
10. PERFORMANCE CHARACTERISTICS	22
10.1 <i>Precision and reproducibility</i>	22
10.2 <i>Recovery</i>	22
11. LIMITATIONS	23
12. PRECAUTIONS	23
13. GENERAL NOTES ON THE TEST AND TEST PROCEDURE	24
14. REFERENCES	24

1. INTENDED USE

ID-Vit® Vitamin B₆ is a microtiter plate test kit based on a microbiological method which measures the vitamin B₆ content in serum. The test kit contains the standard and all reagents required to perform the test. It is sufficient for 96 determinations including standard curves. An ELISA reader is required for the evaluation of the results. For use in human and veterinary medicine and in research. 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 etc.)
- 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
- Liver diseases
- Alcohol abuse
- Homocysteinuria
- Pregnancy and lactation
- taking oral contraceptives or medication for epilepsy or asthma

3. PRINCIPLE OF THE TEST

The serum samples are enzymatically pre-treated and then transferred into the wells of a microtiter plate coated with *Saccharomyces cerevisiae*. The addition of vitamin B₆ in either standards or samples gives a vitamin B₆-dependent growth response until vitamin B₆ is consumed. After incubation at **30°C** for **48 h**, the growth of *Saccharomyces cerevisiae* is measured turbidimetrically at 610–630 nm (alternatively at 540–550 nm) in an ELISA reader and compared to a standard curve generated from the dilution series. The amount of vitamin B₆ is directly proportional to the turbidity.

4. MATERIAL SUPPLIED

Cat. No.	Label	Kit components	Quantity	
			KIF006	KIF006.2
KIF006	PLATE	<i>Saccharomyces cerevisiae</i> -precoated microtiter plate	1 x	2 x
	SOL	Sample preparation buffer	7 x 5 ml	13 x 5 ml
	ENZ	Enzyme, lyoph.	7 x	13 x
	DIL	Water	4 x 30 ml	5 x 30 ml
	ASYMED	Vitamin B ₆ assay medium	4 x	4 x
	STD	Vitamin B ₆ standard, lyoph.	4 x	3 x
	FOL	Adhesive cover foil	1 x whole 3 x half	3 x whole
	FRA	Replacement holder for microtiter strips	1 x	1 x
	CTRL1	Vitamin B ₆ control 1, lyoph.	4 x	3 x
	CTRL2	Vitamin B ₆ control 2, lyoph.	4 x	3 x

5. MATERIAL REQUIRED BUT NOT SUPPLIED

- Incubator with a dark incubation chamber, 30 °C
- Water bath (90 °C–100 °C)
- Water bath or thermoblock with variable temperatur (37 °C, 95 °C)
- ELISA reader 610–630 nm (540–550 nm)
- Calibrated precision pipettors and sterile 20–1 000 µl tips

- 5 ml and 10 ml pipets
- 1.5–2 ml reaction vials, sterile
- 0.2 µm sterile polyethersulfone (PES) filter with a sterile disposable syringe
- 15 ml centrifuge tubes, sterile (e.g. Falcon tubes)
- Biocentrifuge (10 000g)

6. STORAGE AND PREPARATION OF REAGENTS

- Store test kit and reagents at 2–8 °C.
- Prepare reagents freshly and use them immediately after preparation. Discard remaining unused reagents and waste in accordance with country, federal, state, and local regulations.
- To run the assay more than once, ensure that reagents are stored at the conditions stated on the label. Prepare only the appropriate amount necessary for each run. The kit can be used up to 4 times within the expiry date stated on the label.

6.1 Water

- Water [DIL] (for medium [ASYMED], standard [STD] and controls [CTRL1, CTRL2])
- Push the lid up and pull it back to the rim of the glass, then twist the whole cap off.

6.2 Preparation of the enzyme solution

- Add 4 ml sample preparation buffer [SOL] to a vial of lyophilised enzyme [ENZ], then homogenise using a vortex.
- Enzyme solution cannot be stored.

6.3 Preparation of the controls

- The lyophilised controls [CTRL1, CTRL2] have to be resuspended with each 750 µl water [DIL] from the test kit, then homogenise using a vortex.
- After reconstitution, the controls are treated like samples.
- The concentration of the controls changes from lot to lot and is stated in the product specification.

6.4 Preparation of the standard curve

- For the preparation of the standard curve, standard concentrate is needed. To prepare standard concentrate, resuspend the lyophilised standard [STD] with x ml (x = please see the enclosed quality control protocol for the volume needed) water [DIL] supplied with the test kit, then homogenise using a vortex.
- Prepare a standard curve in 6 sterile reaction tubes (1.5–2 ml volume) from standard concentrate and water [DIL] following the scheme depicted in the table below:

Vitamin B ₆ [µg/l]	Water [DIL] [µl]	+	Standard concentrate [µl]	=	Total volume [µl]
Blank: 0	500	+	0	=	500
Standard 1: 0.09	985	+	15	=	1 000
Standard 2: 0.72	440	+	60	=	500
Standard 3: 1.5	375	+	125	=	500
Standard 4: 2.4	300	+	200	=	500
Standard 5: 3.6	200	+	300	=	500

6.5 Preparation of the sterile assay medium

- Fresh sterile assay medium has to be prepared each time before performing a test.
- Remove lyophilised assay medium from the desiccant bag in the assay medium bottle by taking the bag with a forceps and shaking it whilst still inside the bottle. Then remove the clean desiccant bag and discard it.
- Add 10 ml water [DIL] to the assay medium bottle [ASYMED], close the bottle firmly and shake it. This amount is sufficient for 6 microtiter stripes.
- Heat the medium bottle in a water bath at 90–100 °C for 5 min, shake well at least 2 times during this incubation time. Take care that the medium bottle is always firmly closed.
- Quickly cool the medium bottle to < 30 °C (at 2–8 °C for 10 min).
- Filter the medium using a disposable syringe (10 ml) and the 0.2 µm PES filter into a sterile centrifuge tube (15 ml, e.g. Falcon).

- After this preparation, the sterile assay medium can be used in the test.

6.6 Microtiter plate [PLATE]

- Store the microtiter plate [PLATE] in the aluminium packaging containing the desiccant bag at 2–8 °C.
- The microtiter plate [PLATE] has to be protected from humidity and contamination.
- Take care that the aluminium packaging is not damaged.
- Carefully close the aluminium packaging after opening.
- Take only the microtiter stripes needed directly before usage to avoid contamination

7. SAMPLE STORAGE AND PREPARATION

- Use serum for analysis.
- Samples are stable at 2–8 °C for one day 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 *g* before assaying to obtain fat free serum as far as possible.
- Samples should be centrifuged (at least 5 min at 10 000 *g*) prior to measurement. Use the resulting supernatant in the test.

7.1 Sample pretreatment

Add 300 µl serum/control to 300 µl of prepared enzyme solution (ratio 1:2), mix, and incubate at 37 °C for 30 min in the dark. Then heat to 95 °C for 30 min, cool quickly (at 2–8 °C for 10 min) and centrifuge for 10 min at 10 000 *g*.

7.2 Sample dilution

Take 100 µl from the supernatant of the prepared sample/control, add 400 µl water [DIL] and mix. The sample treatment and dilution result in a total dilution of 1:10 (= sample dilution factor).

8. ASSAY PROCEDURE

8.1 Test preparations

Take as many microtiter strips as needed from kit. Return unused strips and any unused test kit component to the original packaging, and put in the refrigerator. Bring all necessary reagents to room temperature.

8.2 Test procedure

- Take as many microtiter strips as needed from the kit and put them in the second microtiter strip holder [FRA].
- Put 150 µl sterile assay medium into the cavities.
- Add each 150 µl of the prepared standard curve, samples and controls into the respective cavities. Pre-rinse each pipet tip with standard, control or sample solution, respectively.
- Carefully seal the plate with adhesive cover foil [FOL]. Important: the cavities must be made airtight by pressing the foil down with the hand!
- Keep at **30 °C** for 48 h in an incubator.

8.3 Measurement

- Press the adhesive cover foil [FOL] firmly down again with the hand.
- Upturn the microtiter plate [PLATE], put it onto a tabletop and shake the microbes well.
- Turn the microtiter plate [PLATE] over again and carefully remove the adhesive cover foil [FOL]. During this, fix the strips in the frame with your hand because the foil is highly adhesive.
- Remove air bubbles in the cavities using a pipet tip or a needle.
- Read turbidity in an ELISA reader at E 610–630 nm (alternatively at E 540–550 nm).

Please note

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

9. EVALUATION OF RESULTS

We recommend to use the 4 parameter algorithm to calculate the results. The sample dilution factor has to be considered for data evaluation.

The blank should have an optical density < standard 1. It serves as optical control to exclude contaminations and is not included in the calculation of results.

9.1 Calculation

Vitamin B₆ in µg/l = value from the standard curve × sample dilution factor (10)

Reference value for human serum

Based on studies of serum samples of apparently healthy persons (n = 74), the following values were estimated.

Vitamin B₆: 4.8–17.7 µg/l

Please note

A concentration range of 0.9–36 µg/l vitamin B₆ is covered at a sample dilution of 1:10.

We recommend each laboratory to develop its own normal range as normal ranges strongly depend on the choice of the patient collective. The values mentioned above are only for orientation and can deviate from other published data.

9.2 Quality control

The extinction of the highest standard has to be > 0.6.

Immundiagnostik AG recommends the use of external controls for internal quality control, if possible.

Control samples should be analysed with each run. Results generated from the analysis of control samples should be evaluated for acceptability using appropriate statistical methods. If one of the controls or the highest standard are outside the specified range Immundiagnostik AG cannot guarantee the accuracy of the measurement results.

10. PERFORMANCE CHARACTERISTICS

The following performance characteristics have been collected using human serum samples.

10.1 Precision and reproducibility

Intraassay (n = 16)

	Vitamin B ₆ [µg/l]	CV [%]
Sample	9.87	9.17

Interassay (n = 5)

	Vitamin B ₆ [µg/l]	CV [%]
Sample	10.98	6.78

10.2 Recovery

Samples from 3 patients were spiked with vitamin B₆ and analysed. The mean values are shown below.

Sample (n=5)	Mean value 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

Sample (n=5)	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

Sample (n=5)	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

11. LIMITATIONS

Whole blood cannot be used in the assay.

12. PRECAUTIONS

- As the test is based on a microbiological method, the general guidelines for sterile work should be observed as far as possible (preferably work in a sterile bench / PCR hood, use of sterile instruments or equipment).
- GLP (Good Laboratory Practice) guidelines have to be observed.
- Water quality is extremely important for the test. Only the water delivered with the test kit [DIL] should be used.
- For sterile filtration, only a sterile polyethersulfone filter must be used.
- It is essential to run a standard curve for each separate assay.
- We recommend measurements in duplicate.
- If a higher dilution results in a higher value measured, inhibitors like antibiotics might be present.
- Reagents should not be used beyond the expiration date shown on the label.
- Wear gloves during the test.
- Used microtiter stripes [PLATE] and materials that have been in contact with patient samples should be handled and disposed as potentially infectious.

13. GENERAL NOTES ON THE TEST AND TEST PROCEDURE













- This assay was produced and distributed according to the IVD guidelines of 98/79/EC.
- All reagents in the kit package are for *in vitro* diagnostic use only.
- ID-Vit® is a trademark of Immundiagnostik AG.
- Reagents should not be used beyond the expiration date stated on the kit label.
- Do not interchange different lot numbers of any kit component within the same assay.
- The guidelines for medical laboratories should be followed.
- 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. Immundiagnostik AG can therefore not be held responsible for any damage resulting from incorrect use.
- Warranty claims and complaints regarding deficiencies must be logged within 14 days after receipt of the product. The product should be sent to Immundiagnostik AG along with a written complaint.
- The assay should always be performed according to the enclosed manual.

14. REFERENCES

1. Ambrosch, A. et al., 2001. Relation between homocysteinaemia and diabetic neuropathy in patients with Type 2 diabetes mellitus. *Diabetic medicine : a journal of the British Diabetic Association*, **18**(3), pp.185–92.
2. Dierkes, J. et al., 2001. Homocysteine lowering effect of different multivitamin preparations in patients with end-stage renal disease. *Journal of renal nutrition : the official journal of the Council on Renal Nutrition of the National Kidney Foundation*, **11**(2), pp.67–72.
3. Dierkes, J. et al., 2001. Vitamin supplementation can markedly reduce the homocysteine elevation induced by fenofibrate. *Atherosclerosis*, **158**(1), pp.161–4.
4. Morris, M.C. et al., 2004. Dietary niacin and the risk of incident Alzheimer's disease and of cognitive decline. *Journal of neurology, neurosurgery, and psychiatry*, **75**(8), pp.1093–9.

5. Selhub, J. et al., 1995. Association between plasma homocysteine concentrations and extracranial carotid-artery stenosis. *The New England journal of medicine*, **332**(5), pp.286–91.
6. Basheer, M.P. et al., 2016. Vitamin B complex and homocysteine status and Cognitive impairment in the elderly among Indian population. *Journal of Neuroscience and Behavioral Health*, **8**(4), pp.20–26.
7. Lindqvist, M., Hellstrom, A. & Henriksson, A.E., 2012. Abdominal aortic aneurysm and the association with serum levels of Homocysteine, vitamins B6, B12 and Folate. *Am J Cardiovasc Dis*, **2**(4), pp.318–322.
8. Loitsch, S.M. et al., 2014. Comparison of a new microbiological assay with a standard high-performance liquid chromatographic method for determination of vitamin B6 in serum. *Clinical laboratory*, **60**(6), pp.1035–41.

Used symbols:

	Temperature limitation		Catalogue number
	In Vitro Diagnostic Medical Device		To be used with
	Manufacturer		Contains sufficient for <n> tests
	Lot number		Use by
	Attention		Consult instructions for use
	Consult specification data sheet		Unique Device Identification