

Arbeitsanleitung / Manual

**Nur für den Gebrauch durch Fachpersonal /
For professional use only**

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
microtiter plate
For use in human and veterinary medicine and in research***

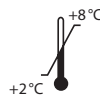
Gültig ab / Valid from 2024-05-07

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

Sicherheitshinweise

Dieses Zubehör ist ausschließlich nach der beigefügten Arbeitsanleitung zu nutzen. Wichtige Sicherheitshinweise zu diesem Produkt sind dem Kapitel 6 zu entnehmen.

Inhalt

1. ZWECKBESTIMMUNG	2
2. EINLEITUNG	2
3. TESTPRINZIP	3
4. INHALT DER TESTPACKUNG	3
5. ERFORDERLICHE LABORGERÄTE UND HILFSMITTEL	4
6. HINWEISE UND VORSICHTSMASSNAHMEN	4
7. LAGERUNG UND VORBEREITUNG DER REAGENZIEN	5
7.1 Wasser	5
7.2 Herstellung des sterilen Assay-Mediums	5
7.3 Herstellung der Enzymlösung	5
7.4 Herstellung der Kontrollen	6
7.5. Herstellung der Standardkurve	6
7.6 Mikrotiterplatte (PLATE)	6
8. PROBENLAGERUNG UND -VORBEREITUNG	7
8.1 Probenvorbehandlung	7
8.2 Probenverdünnung	7
9. TESTDURCHFÜHRUNG	7
9.1 Testvorbereitungen	7
9.2 Testansatz	8
9.3 Messung	8
10. AUSWERTUNG DER ERGEBNISSE	9
10.1 Berechnung	9
10.2 Qualitätskontrolle	9
11. EINSCHRÄNKUNGEN	9
12. TESTCHARAKTERISTIKA	10
12.1 Präzision und Reproduzierbarkeit	10
12.2 Wiederfindung	10
13. ALLGEMEINE HINWEISE ZUM TEST	11
14. LITERATUR	12
15. SYMBOLE	13

1. ZWECKBESTIMMUNG

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. 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 **46–50 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 an Vitamin B₆ ist dabei direkt proportional der Trübung.

4. INHALT DER TESTPACKUNG

Art.-Nr.	Bezeichnung	Kit-Komponenten	Menge	
			KIF006	KIF006.2
KIF006/ KIF006.2	DIL	Wasser	4 x 30 ml	5 x 30 ml
	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
	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, 30–37 °C
- Wasserbad (90 °C–100 °C)
- Mikrotiterplattenphotometer 610–630 nm (540–550 nm)
- Kalibrierte 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
- 0,2 µm-Polyethersulfon (PES)-Sterilfilter und Einwegspritze (10 ml)
- 15 ml-Zentrifugenröhrchen (z. B. Falcons)
- Biozentrifuge (10 000 g)
- Vortex-Mixer

6. HINWEISE UND VORSICHTSMASSNAHMEN

- Es handelt sich um einen mikrobiologischen Test. Kontaminationen führen zu falschen Ergebnissen.
- 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.
- Bei jedem Ansatz sind Kontrollen mitzumessen.
- Es wird die Messung in Doppelwerten empfohlen.
- Die Reagenzien dürfen nach Ablauf des Haltbarkeitsdatums nicht mehr verwendet werden.
- Gebrauchte Mikrotiterplattenstreifen sowie andere mit Patientenproben in Kontakt gekommene Materialien sind als potenziell infektiös zu behandeln und entsprechend zu entsorgen.
- Als Vorsichtsmaßnahme wird empfohlen, das verwendete Humanmaterial immer als potentiell infektiös zu betrachten.

7. 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 3 x (KIF006.2) bzw. 4 x (KIF006) je nach Probenaufkommen bis zum angegebenen Haltbarkeitsdatum verwendet werden.

7.1 Wasser

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

7.2 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 verwerfen.
- Zum Assay-Medium (**ASYMED**) 10 ml Wasser (**DIL**) zugeben, das Fläschchen gut verschließen und gut vortexen. Die Menge ist ausreichend für 6 Mikrotiterstreifen.
- Medium mit Einwegspritze (10 ml) und dem 0,2-µm-PES-Filter in ein Zentrifugenröhrchen (15 ml, z. B. Falcon) sterilfiltrieren.
- Das so hergestellte sterile Assay-Medium wird im Test verwendet.

7.3 Herstellung der Enzymlösung

- 4 ml Probenvorbereitungspuffer (**SOL**) in Fläschchen mit lyophilisiertem Enzym (**ENZ**) überführen und mittels Vortex-Mixer homogenisieren.
- Die Enzymlösung kann nicht aufbewahrt werden.

7.4 Herstellung der Kontrollen

- Die lyophilisierten Kontrollen (**CTRL1**, **CTRL2**) sind mit je **750 µl** Wasser (**DIL**) aus dem Testkit zu resuspendieren und mittels Vortex-Mixer 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.

7.5. Herstellung der Standardkurve

- Für die Herstellung des für die Standardkurve benötigten Standardkonzentrats ist der lyophilisierte Standard (**STD**) mit x ml Wasser (**DIL**) (x = siehe Quality Control Protocol) aus dem Testkit zu resuspendieren und mittels Vortex-Mixer 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

7.6 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.

8. PROBENLAGERUNG UND -VORBEREITUNG

- Die Analyse ist mit Serum durchzuführen.
- Die Haltbarkeit der Probe beträgt bei 2–8°C im Dunkeln 1 Tag. Zur längeren Lagerung kann die Probe bei -20°C bis zu 5 Monate aufbewahrt werden.
- Proben vor dem Einsatz zentrifugieren (mind. 5 min bei 10 000 g). Den resultierenden Überstand im Test einsetzen.
- Hämolytische Proben beeinflussen das Testergebnis und sollten nicht verwendet werden. Lipämische Proben vor dem Einsatz im Test bei 13 000 g für 10 min zentrifugieren, um ein möglichst fettfreies Serum zu erhalten.

8.1 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. Dann bei 95°C für 30 min erhitzen, bei 2–8°C für 10 min kühlstellen und anschließend für 10 min zentrifugieren (10 000 g).

8.2 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).

9. TESTDURCHFÜHRUNG

9.1 Testvorbereitungen

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

9.2 Testansatz

- Benötigte Mikrotiterstreifen entnehmen und in den Ersatzrahmen (**FRA**) stecken.
- 150 µl steriles Assay-Medium in jede Kavität geben.
- Je 150 µl der hergestellten Standardverdünnungen (Blank, Standard 1–5), 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 **46–50 h** im Brutschrank inkubieren.

9.3 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 **46–50 h** Inkubation kann die Mikrotiterplatte (**PLATE**) auch für max. 48 h im Kühlschrank aufbewahrt werden, um danach die Trübung zu messen.

10. AUSWERTUNG DER ERGEBNISSE

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

Der Blank dient als optische Kontrolle zum Ausschluss von Kontaminationen und wird nicht in der Berechnung berücksichtigt. Die optische Dichte muss $<$ Standard 1 haben. Ist dies nicht der Fall, muss die Analyse erneut durchgeführt werden.

10.1 Berechnung

Vitamin B₆ in $\mu\text{g/l}$ = Wert aus Standardkurve \times 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 $\mu\text{g/l}$

Anmerkung

Bei einem Probenverdünnungsfaktor von 10 ist ein Bereich von 0,9–36 $\mu\text{g/l}$ 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.

10.2 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 AG die Richtigkeit der Messergebnisse nicht gewährleisten.

11. EINSCHRÄNKUNGEN

Nur Serum kann im Test eingesetzt werden.

12. TESTCHARAKTERISTIKA

Die nachfolgenden Testcharakteristika wurden mit Humanserum erhoben.

12.1 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

12.2 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

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.
- Reagenzien nach Ablauf des Verfallsdatums nicht mehr verwenden (Verfallsdatum siehe Testpackung).
- Einzelkomponenten mit unterschiedlichen Lot-Nummern aus verschiedenen Testpackungen nicht mischen oder austauschen.
- 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 immer mitmessen.
- Die Bestimmung ist immer nach der dem Kit beigefügten Arbeitsanleitung durchzuführen.
- Schwerwiegende Vorfälle sind der Immundiagnostik AG und den nationalen Aufsichtsbehörden zu melden.

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.

15. SYMBOLE

	Temperaturbegrenzung		Bestellnummer
	In-Vitro-Diagnostikum		Zu verwenden mit
	Hersteller		Inhalt ausreichend für \leq-Prüfungen
	Chargenbezeichnung		Verwendbar bis
	Enthält Plasmoderivate oder menschliches Blut		Gebrauchsanweisung beachten
	Spezifikationsdatenblatt beachten		Nicht wiederverwenden
	eindeutige Produktidentifizierung		Enthält Material tierischen Ursprungs
	medizinische Substanz		Enthält Material humanen Ursprungs

Manual
For professional use only

ID-Vit[®] vitamin B₆

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

For use in human and veterinary medicine and in research

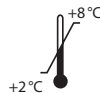
Valid from 2024-05-07

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

Safety information

These accessories are to be used exclusively in accordance with the enclosed instructions for use. Important safety information for this product can be found in chapter 6.

Table of Contents

1. INTENDED PURPOSE	17
2. INTRODUCTION	17
3. PRINCIPLE OF THE TEST	18
4. MATERIAL SUPPLIED	18
5. MATERIAL REQUIRED BUT NOT SUPPLIED	18
6. PRECAUTIONS	19
7. STORAGE AND PREPARATION OF REAGENTS	19
7.1 Water	20
7.2 Preparation of the sterile assay medium	20
7.3 Preparation of the enzyme solution	20
7.4 Preparation of the controls	20
7.5 Preparation of the standard curve	21
7.6 Microtiter plate (PLATE)	21
8. SAMPLE STORAGE AND PREPARATION	22
8.1 Sample pretreatment	22
8.2 Sample dilution	22
9. ASSAY PROCEDURE	22
9.1 Test preparations	22
9.2 Test procedure	22
9.3 Measurement	23
10. EVALUATION OF RESULTS	23
10.1 Calculation	23
10.2 Quality control	24
11. LIMITATIONS	24
12. PERFORMANCE CHARACTERISTICS	24
12.1 Precision and reproducibility	24
12.2 Recovery	25
13. GENERAL NOTES ON THE TEST AND TEST PROCEDURE	26
14. REFERENCES	27
15. SYMBOLS	28

1. INTENDED PURPOSE

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. 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 **46–50 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/ KIF006.2	DIL	Water	4 x 30 ml	5 x 30 ml
	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
	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, 30–37°C
- Water bath (90–100°C)

- Microtiter plate reader 610–630 nm (540–550 nm)
- Calibrated precision pipettors and sterile single-use 20–1 000 µl tips
- 5 ml and 10 ml pipets
- 1.5–2 ml reaction vials
- 0.2 µm sterile polyethersulfone (PES) filter with a disposable syringe
- 15 ml centrifuge tubes, (e.g. Falcon tubes)
- Biocentrifuge (10 000g)
- Vortex

6. PRECAUTIONS

- The test is based on a microbiological method. Contaminations lead to erroneous results.
- Water quality is extremely important for the test. Use only the water delivered with the test kit (**DIL**).
- For sterile filtration, only a sterile polyethersulfone filter must be used.
- It is essential to run a standard curve for each separate assay.
- Measure controls with each assay.
- We recommend measurements in duplicate.
- Do not use reagents beyond the expiration date shown on the label.
- As a precaution, it is recommended that the human material used is always considered potentially infectious.
- Used microtiter stripes and materials that have been in contact with patient samples must be handled and disposed of as potentially infectious.

7. STORAGE AND PREPARATION OF REAGENTS

- Store test kit and reagents at 2–8 °C.
- Prepare reagents freshly and use them immediately after preparation.
- 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 3 x (KIF006.2) or 4 x (KIF006) within the expiry date stated on the label.

7.1 Water

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

7.2 Preparation of the sterile assay medium

- Fresh sterile assay medium has to be prepared each time before performing a test.
- Remove the desiccant bag from the lyophilised 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 vortex well. This amount is sufficient for 6 microtiter stripes.
- Filter the medium using a disposable syringe (10 ml) and the 0.2 µm PES filter into a centrifuge tube (15 ml, e.g. Falcon).
- After this preparation, the sterile assay medium can be used in the test.

7.3 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.

7.4 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.

7.5 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 water (**DIL**) (x = see quality control protocol) 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

7.6 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.

8. 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 can be frozen and kept at -20°C for 5 months.
- Centrifuge samples prior to measurement (at least 5 min at 10 000 *g*). Use the resulting supernatant in the test.
- Hemolytic samples may give erroneous results and should not be used for analysis. Centrifuge lipemic samples at 13 000 *g* for 10 min before assaying to obtain a serum that is as fat free as possible.

8.1 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 at 2–8°C for 10 min and centrifuge for 10 min at 10 000 *g*.

8.2 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).

9. ASSAY PROCEDURE

9.1 Test preparations

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

9.2 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 each cavity.
- Add 150 µl of the prepared standard dilutions (blank, standard 1–5), 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 **46–50 h** in an incubator.

9.3 Measurement

- Press the adhesive cover foil (**FOL**) firmly down again with the hand.
- Turn the microtiter plate (**PLATE**) upside down, place 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 46–50 h incubation time, the microtiter plate (**PLATE**) may be stored for a maximum of 48 h in the refrigerator before measuring the turbidity.

10. 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 serves as a visual control to exclude contamination and is not taken into account in the calculation. The optical density must be < standard 1. If this is not the case, the analysis must be carried out again.

10.1 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.

10.2 Quality control

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

Results, generated from the analysis of control samples, should be evaluated for acceptability. The results for the samples may not be valid if within the same assay one or more values of the quality control sample or the highest standard are outside the acceptable limits.

11. LIMITATIONS

Only serum can be used for the test.

12. PERFORMANCE CHARACTERISTICS

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

12.1 Precision and reproducibility**Intraassay (n = 16)**

	Vitamin B₆ [µg/l]	CV [%]
Sample	9.87	9.17

Interassay (n = 5)

	Vitamin B₆ [µg/l]	CV [%]
Sample	10.98	6.78

12.2 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	8.85	10	18.85	18.31	95
		20	28.85	32.36	118
Recovery rate in total [%]					107

















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.
- Do not use reagents beyond the expiration date stated on the kit label.
- Do not interchange different lot numbers of any kit component within the same assay.
- Follow the guidelines for medical laboratories.
- Incubation time, incubation temperature and pipetting volumes of the components are defined by the producer. Any variation of the test procedure, which has not been consulted 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 made within 14 days after reception of the product. The product should be sent to Immundiagnostik AG along with a written complaint.
- Analyse controls with each run.
- Always perform assay according to the enclosed manual.
- Serious incidents are to be reported to Immundiagnostik AG and the national regulatory authorities.

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.

15. SYMBOLS

	Temperature limitation		Catalogue number
	<i>In Vitro</i> Diagnostic Medical Device		To be used with
	Manufacturer		Content sufficient for <n> tests
	Lot number		Use by
	Contains plasma derivatives or human blood		Consult instructions for use
	Consult specification data sheet		Do not re-use
	Unique Device Identification		Contains material of animal origin
	Medicinal substance		Contains material of human origin

Immundiagnostik AG

Stubenwald-Allee 8a
64625 Bensheim, Germany

Tel.: +49 6251 70190-0

Fax: +49 6251 70190-363

info@immundiagnostik.com

www.immundiagnostik.com

