

VMA, HVA E 5-HIAA EM URINA POR HPLC

Reagente diagnóstico para determinação quantitativa *in vitro* de ácido vanilmandélico, homovanílico e 5-hidroxiindol acético por HPLC.

Nº de lote, data de fabricação e validade: vide rótulos dos frascos e da embalagem.

Artigo	Apresentação
1000/B	Kit Reagente para Análise de VMA, HVA e 5-HIAA em Urina (100 análises)

Para informações detalhadas sobre o método e procedimentos, favor consultar o Manual de Instruções para análise de VMA, HVA e 5-HIAA em Urina por HPLC no site www.biosys.com.br.

SUMÁRIO

Este Kit de reagentes foi desenvolvido para análises de VMA, HVA e 5-HIAA em amostras de urina empregando um sistema isocrático de HPLC com detector eletroquímico. Os analitos são extraídos da amostra através da adsorção em colunas de preparação antes da análise por HPLC. A preparação da amostra é simples e garante a reprodutibilidade e confiabilidade dos resultados. A determinação dos níveis de VMA e HVA, metabólitos das catecolaminas, tem importância clínica no diagnóstico de neuroblastoma, o terceiro tipo de câncer mais comum em crianças. A determinação dos níveis de 5-HIAA na urina, por sua vez, auxilia o diagnóstico da síndrome carcinóide.

MÉTODO

Cromatografia líquida de alta eficiência (HPLC) com detecção eletroquímica.

PRINCÍPIO

A técnica de detecção eletroquímica mais empregada na cromatografia líquida é a amperométrica, com potencial de trabalho constante. Os detectores amperométricos convencionais utilizam uma célula com três eletrodos, sendo um eletrodo de trabalho, um eletrodo de referência e um terceiro eletrodo que atua na manutenção do potencial e previne a flutuação de corrente elétrica no eletrodo de referência. O potencial necessário para as reações de oxidação ou redução (potencial de polarização), é aplicado entre o eletrodo de referência (geralmente Ag/AgCl) e o eletrodo de trabalho. Qualquer substância eletroquimicamente ativa que passe através da célula de detecção será oxidada ou reduzida. As transformações por oxidação ou redução de tal substância geram uma perda ou ganho de elétrons, resultando em uma corrente elétrica que pode ser detectada e medida pelo instrumento, amplificada e registrada como um sinal cromatográfico. Uma vez que somente um número limitado de grupos funcionais e estruturas químicas são susceptíveis a processos de oxi-redução, em um determinado potencial de trabalho, a detecção eletroquímica é caracterizada por sua alta sensibilidade e sua elevada seletividade.

REAGENTES

Componentes e Composições:

Produto	Composição	Apresentação
Fase Móvel (Mobile Phase)	Solução metanólica	1 x 1000 mL
Padrão de Calibração (Iiof) (Calibration Standard)	Solução aquosa de VMA, HVA e 5-HIAA	5 x 1 mL
Padrão Interno (iso-VMA) (Internal Standard)	Solução aquosa de iso-VMA	1 x 100 mL
Tampão de Lavagem I (Wash Buffer I)	Hidróxido de amônio	1 x 300 mL

Tampão de Lavagem II (Wash Buffer II)	Solução de ácido bórico	2 x 300 mL
Tampão de Eluição (Elution Buffer)	Solução de ácido fórmico	1 x 200 mL
Solução Finalizadora (Finisher)	Hidróxido de sódio 10-25%	1 x 10 mL
Colunas de preparação (Sample Clean Up colums)	Dióxido de sílica gel	2 x 50 unidades

INSTRUÇÕES DE ARMAZENAGEM E ESTABILIDADE DOS REAGENTES

Os reagentes não abertos são estáveis até a data de validade indicada no rótulo, desde que as condições de armazenamento estabelecidas sejam obedecidas.

A tabela abaixo mostra a temperatura de armazenagem para os reagentes do kit:

Artigo	Produto	Armazenamento
1011	Fase Móvel	18 – 30°C
1003/B	Padrão de calibração	2 – 8°C
1004/B	Padrão Interno (iso-VMA)	2 – 8 °C
1005	Tampão de Lavagem 1	18 – 30°C
1006	Tampão de Lavagem 2	18 – 30°C
1077	Tampão de Eluição	18 – 30°C
1013	Solução Finalizadora	18 – 30°C
1008	Colunas de Preparação	18 – 30°C

CUIDADOS E PRECAUÇÕES

Favor consultar a ficha de segurança dos reagentes e adotar as precauções necessárias para o manuseio de reagentes de laboratório.

GARANTIA

Estas instruções de uso devem ser lidas atentamente antes da utilização do produto. As instruções nela contidas devem ser rigorosamente cumpridas. A confiabilidade dos resultados do ensaio não poderá ser garantida em caso de desvio às instruções.

DESCARTE

A Fase Móvel contém solventes orgânicos e deve ser descartada como resíduo livre de halogênios. O Finalizador é uma base forte, e o Tampão de Eluição é um ácido forte. Neutralize os resíduos dos produtos e descarte em um recipiente para soluções salinas.

Os resíduos de amostras de pacientes e amostras preparadas, assim como controles e calibradores, devem ser coletados e descartados como lixo potencialmente infeccioso. Descarte de acordo com as diretrizes e regulamentos locais em vigor.

PREPARAÇÃO DOS REAGENTES

Fase Móvel: pronto para uso.

Padrão Interno: pronto para uso.

Tampão de Lavagem 1: pronto para uso.

Tampão de Lavagem 2: pronto para uso.

Tampão de Eluição: pronto para uso.

Solução Finalizadora: pronto para uso.

Padrão de Calibração (liofilizado):

O calibrador (art. 1003/B) é rastreável a substância de referência adquirida de fornecedor certificado.

Para reconstituir o calibrador liofilizado, pipetar exatamente 1,0 ml de solução de HCl 0,2 M no frasco.

Deixar repousar em temperatura ambiente por cerca de 10 minutos, para permitir a completa reconstituição.

Agitar ocasional e gentilmente até que o conteúdo esteja homogêneo. O calibrador reconstituído com HCl deve ser preparado fresco diariamente, pois o 5-HIAA é instável em pH baixo. O armazenamento do calibrador só é possível se o liofilizado for **reconstituído com água** e conservado a -20°C. Frações congeladas devem ser ajustadas para uma concentração de 0,2 M de HCl antes da cromatografia.

Exemplo de armazenamento a -20°C:

1. Reconstitua o padrão com 800 µl de água;
2. Divida em 5 alíquotas de 160 µl cada;
3. Congele a -20°C;
4. Após descongelar, adicione 40 µl de HCl 1 M;
5. Alternativamente você pode reconstituir o padrão com tampão de eluição (950 µl + 50 µl do Finalizador), assim, este mix pode ser armazenado por 5 dias entre 2 a 8 °C.

MATERIAIS REQUERIDOS, MAS NÃO FORNECIDOS

Coluna cromatográfica equilibrada (Chromsystems art. 1100/B).

Padrão de Calibração em Urina, liofilizado (Chromsystems art. 1009).

Controle Endócrino em Urina Nível Normal (Chromsystems art. 0040).

Controle Endócrino em Urina Nível Patológico (Chromsystems art. 0050)

Água tipo I ou grau HPLC.

Centrífuga.

Metanol grau HPLC

HCl

Material geral de laboratório.

AMOSTRA

Normalmente a urina de 24h é utilizada para análise. Se for difícil ou impossível, a urina espontânea pode ser testada. Nestes casos os resultados devem ser baseados na creatinina.

Determinação de VMA/HVA [4]:

Para a determinação de VMA e HVA, a urina de 24 horas deve ser coletada em um frasco adequado contendo 10 ml de 10-25 por cento de solução de ácido clorídrico. Protegida da luz, a urina coletada dessa maneira é estável a temperatura ambiente por 7 dias, em +2 a +8°C por 14 dias, e abaixo de -18°C por pelo menos 3 meses.

Determinação de 5-HIAA [6]:

Para a determinação de 5-HIAA, a urina de 24 horas deve ser coletada em um frasco adequado e armazenado a +2 a +8°C protegido da luz. A acidificação da urina só é necessária para remessa postal ou para coleta em temperatura ambiente. Neste caso, o frasco de coleta deve conter 10 a 20 ml de ácido acético glacial.

A urina coletada dessa maneira deve ter um valor de pH de 4.0. Protegida da luz, ela é estável em +2 a +8°C por até 2 semanas.

Nota: A urina de coleta com ácido clorídrico deve ser ajustada com hidróxido de sódio para um pH de 4 a 6 e analisada assim que possível.

O valor de pH ótimo para as urinas coletadas deve ser 4.0. Entretanto, as altas concentrações de cloro em urina fortemente acidificada (pH < 1.0) pode gerar a recuperações reduzidas no preparo da amostra.

É de responsabilidade individual do laboratório usar todos as referências disponíveis e/ou seus próprios estudos para determinar critérios específicos de estabilidade para o laboratório.

Estabilidade das amostras preparadas: As amostras preparadas são estáveis por 3 dias se armazenadas em temperatura de +2 a +8°C, protegidas da luz, bem fechadas e em frascos de vidro. É fortemente recomendável não armazenar amostras preparadas por períodos prolongados mesmo congeladas (abaixo de -18°C).

PROCEDIMENTOS DO TESTE

Ajustes do instrumento:

Amostrador:	Volume de injeção de 10 a 20µl, tempo de corrida 20 min.
Detector eletroquímico:	+700 a +850mV
Fluxo:	0,8 a 1,3 ml/min
Temperatura da coluna:	Ambiente (aprox. 25 °C)

Procedimento de preparo de amostras:

Tamponamento das amostras de urina

Somente iso-VMA como Padrão Interno:

1. Transfira 50 µl de amostra de urina em um frasco adequado (ex. vial de 1.5 ml)
2. Adicione 1.0 ml de Padrão Interno (isso-VMA, artigo 1004/B)
3. Misture brevemente

Iso-VMA e HICA como Padrão Interno:

1. Transfira 50 µl de amostra de urina em um frasco adequado (ex. vial de 1.5 ml)
2. Adicione 1.0 ml de Padrão Interno (iso-VMA, artigo 1004/B)
3. Adicione 50 µl de Padrão Interno (HICA, artigo 51303/B)

Misture brevemente

Não é necessário ajuste de pH.

Etapa de Aplicação da Amostra de Urina:

Aplicar completamente a amostra de urina diluída na coluna de preparação. Eluir por vácuo ou através de centrifugação (1 min a 2000 rpm).

Descartar o efluente.

Extração de amostras com Colunas de Preparo de Amostras

Para preparar amostras de pacientes, controles e calibradores para análises, trabalhe com as seguintes etapas na ordem apresentada:

1. Aplique o volume inteiro de urina tamponada (ver capítulo 5.6.1) em uma coluna de preparo de amostras, elua por sucção ou centrifugação (até no máximo 700 x g), descarte o efluente
2. Aplique 3.0 ml do Tampão de Lavagem I à coluna de preparo de amostras, elua por sucção ou centrifugue (até no máximo 700 x g), descarte o efluente
3. Aplique 3.0 ml do Tampão de Lavagem II à coluna de preparo de amostras, elua por sucção ou centrifugue (até no máximo 700 x g), descarte o efluente
4. Repita a etapa 3
5. Aplique 2 ml do Tampão de Eluição à coluna de preparo de amostras, elua por sucção ou centrifugue (1 min a 700 x g), colete o eluato
6. Adicione 100 µl do Finalizador ao eluato, misture brevemente
7. Injete 10-20 µl no sistema de HPLC

Atenção:

As altas concentrações de cloro em urinas coletadas fortemente acidificadas (pH < 1.0) resultam em uma redução na capacidade de ligação (overload) da coluna de preparo de amostras. Neste caso dilua a espécime de urina em 1:1 com água ultrapura (grau HPLC).

Tempo de retenção esperado:

Análito	Tempo de retenção aprox. em minutos (1ml/min)
VMA	3.0
Padrão Interno (iso-VMA)	4.0
5-HIAA	9.4
HVA	13.4
Padrão Interno (HICA)	14.8

CÁLCULOS

Para o cálculo manual, os seguintes dados são requeridos:

Área ou altura do pico de:	Abreviação
Substância A (ex. VMA) no cromatograma da amostra	= A _{Amostra}
Substância A (ex. VMA) no cromatograma do padrão de calibração	= A _{Padrão}
Padrão Interno (ex. iso-VMA) no cromatograma da amostra	= IS _{Amostra}
Padrão Interno (ex. iso-VMA) no cromatograma do padrão de calibração	= IS _{Padrão}

A concentração C_{Análise,Amostra} na amostra é então calculada como a seguir:

$$C_{\text{Análise,Amostra}} \text{ (mg/L)} = \frac{A_{\text{Amostra}} \times IS_{\text{Padrão}}}{A_{\text{Padrão}} \times IS_{\text{Amostra}}} \times \text{fator} \times 40$$

Sendo os fatores das substâncias (art. 1003/B):

VMA: 0,25
HVA: 0,25
5-HIAA: 0,25
HICA: 0,25

Cálculo da recuperação (%):

$$\text{Recuperação} = \frac{\text{área ou altura do pico Iso-VMA no cromatograma da amostra} \times 100}{\text{área ou altura do pico Iso-VMA no cromatograma do calibrador}}$$

*Concentrações utilizando o padrão de calibração em urina art. 1009:

A concentração dos analitos individuais depende do lote e será encontrada no folheto de informações que acompanha o produto.

Cálculo da excreção de 24 horas (mg/24h)

Multiplique a concentração encontrada (mg/l) pelo volume da urina (l).

OBS: A avaliação quantitativa do 5-HIAA requer recuperação melhor que 50%.

Fatores de conversão:

Análito	mg/l para µmol/l	µmol/l para mg/l
VMA	5.04	0.198
HVA	5.49	0.182
5-HIAA	5.23	0.191

CALIBRADORES E CONTROLES

A Chromsystems disponibiliza os seguintes produtos para calibrar e monitorar a precisão e exatidão das análises de VMA, HVA e 5-HIAA:

Artigo	Produto	Apresentação
1009	Padrão de Calibração em Urina (liofilizado)	5 x 5 ml
0040	Controle Endócrino em Urina, Nível Normal	10 x 8 ml
0050	Controle Endócrino em Urina, Nível Patológico	10 x 8 ml

DESEMPENHO / CARACTERÍSTICAS

Linearidade e limite de quantificação

O método é linear a partir do limite de quantificação (LLOQ) designado até o limite superior (faixa linear):

Tabela 19: Limite de quantificação e linearidade

Análito	LLOQ, aprox.*	Limite de quantificação (até pelo menos)
VMA	0.2 mg/l	78 mg/l
HVA	0.2 mg/l	51 mg/l
5-HIAA	0.2 mg/l	76 mg/l

*O limite de quantificação depende das condições do eletrodo de trabalho.

Recuperação:

A recuperação foi determinada a partir do slope das curvas de calibração de amostras de urina e soluções padrões diluídas:

Tabela 18: Taxas de recuperação

Substância analisada	Recuperação
VMA	70%
HVA	82%
5-HIAA	66%
Padrão Interno (iso-VMA)	78%
Padrão Interno (HICA)	72%

Precisão:

Precisão intra-ensaio

A determinação da precisão intra-ensaio foi realizada a partir de múltiplos preparos (n = 10) e determinação das concentrações dos analitos de mesmo espécime em 3 concentrações diferentes:

Tabela 20: Precisão intra-ensaio

Substância analisada	Coeficiente de variação (concentração do analito)		
	n = 10	n = 10	n = 10
VMA	0.6% (4,56 mg/l)	0.8% (16.0 mg/l)	1.3% (9.79 mg/l)
HVA	1.1% (4,49 mg/l)	1.0% (13.5 mg/l)	1.3% (8.98 mg/l)
5-HIAA	3.8% (3.34 mg/l)	1.7 (11.4 mg/l)	3.0% (6.84 mg/l)

Precisão inter-ensaio

A determinação da precisão inter-ensaio foi realizada a partir de 4 preparos e da determinação das concentrações dos analitos em pool de urina (níveis normais e patológicos) em 20 séries de testes em duplicata.

Substância analisada	Coeficiente de variação (concentração do analito)	
	n = 80	n = 80
VMA	2.1% (4.51 mg/l)	2.0 % (15.5 mg/l)
HVA	1.9 % (4.38 mg/l)	1.8 % (13.1mg/l)
5-HIAA	4.5 % (3.98 mg/l)	4.2 % (12.3 mg/l)

VALORES DE REFERÊNCIA

As faixas de referência para aminas biogênicas variam consideravelmente e são altamente dependentes da idade e do gênero. Nós recomendamos a determinação de faixas específicas de referência para cada laboratório.

Tabela 7: Faixas de referência do ácido vanilmandélico (VMA)

Coletivo de paciente	Faixa de Referência	
Crianças	[4]	[6]
0-2 semanas	0-850 µg/24h	-
2-8 semanas	0-1300 µg/24h	-
2-6 meses	0-1500 µg/24h	-
7-12 meses	0-1700 µg/24h	-
1-5 anos	0-2200 µg/24h	-
6-10 anos	0-3600 µg/24h	-
11-15 anos	0-4800 µg/24h	-

0-1 ano	-	≤ 18800 µg/g creatinina
2-4 anos	-	≤ 11000 µg/g creatinina
5-9 anos	-	≤ 8300 µg/g creatinina
10-19 anos	-	≤ 8300 µg/g creatinina
	[4]	[6]
Adultos	1600-7300 µg/24h	≤ 5500 µg/g creatinina

Tabela 8: Faixas de referência do ácido homovanílico (VMA)

Coletivo de paciente	Faixa de Referência	
Crianças	[4]	[6]
0-2 semanas	0-1500 µg/24h	-
2-8 semanas	0-2000 µg/24h	-
2-6 meses	0-2900 µg/24h	-
7-12 meses	0-3400 µg/24h	-
1-5 anos	0-4800 µg/24h	-
6-10 anos	0-6900 µg/24h	-
11-15 anos	0-8800 µg/24h	-
0-1 ano	-	≤ 32600 µg/g creatinina
2-4 anos	-	≤ 22000 µg/g creatinina
5-9 anos	-	≤ 15100 µg/g creatinina
10-19 anos	-	≤ 12800 µg/g creatinina
	[4]	[6]
Adultos	1800-6900 µg/24h	≤ 7600 µg/g creatinina

Tabela 9: Faixas de referência do ácido 5-hidroxi-indolacético (5-HIAA)

Coletivo de paciente	Faixa de Referência
Adultos	
[4]	< 8200 µg/24h
[6]	2000-8000 µg/24h

Nota: As faixas de referência citadas aqui são retiradas da literatura e são somente consultivas. Favor notar que não há faixas de referência universais para aminas biogênicas em urina. Os resultados obtidos usando diferentes métodos de testes não podem ser comparados. Os laboratórios devem indicar o método usado para análises para permitir a interpretação acurada dos resultados.

INTERFERENTES CONHECIDOS

Os seguintes alimentos possuem altas concentrações de serotonina. O consumo resulta em um aumento da excreção urinária de 5-HIAA. Os pacientes devem evitar esses alimentos nos 3 a 4 dias anteriores e durante a coleta de urina:

Berinjelas	Melões
Abacates	Mirabelle
Bananas	Abacaxis
Groselha-preta	Groselha-vermelha
Ameixa Damson	Tomates
Groselhas	Noz

As seguintes drogas e medicamentos podem influenciar os níveis de HVA na urina:

Aumentos do resultado analítico por: acetanilida, cafeína, cumarina, efedrina-HCl, mefenesina, metanfetamina, metocarbamol, nicotina, paracetamol, fenacetina, fenobarbital, fetolamina.

Diminuição do resultado analítico por: aspirina, clorpromazina, isoniazida, levodopa, metanamina, prometazina, estreptozocina.

LITERATURA

- Lattke P, Peitzsch M, Därr R, Siegert G, Eisenhofer G. (2013) Labordiagnostik Katecholamproduzierender Tumoren. *J Lab Med* **37**(4): 187-97.
- Klöppel G, Perren A, Heitz PU. (2003) Vom Karzinoid zum neroendokrinen Tumor. *Dtsch Arztebl* 100:A 1932-42.
- Eisenhofer G, Peitzsch M. (2014) Laboratory evaluation of pheochromocytoma and paraganglioma. *Clin Chem* **60**(12): 1486-99.
- Gressner AM, Arndt T (Hrsg.) Lexikon der Medizinischen Laboratoriumsdiagnostik. 2. Aufl, Band 1, Springer Medizin Verlag Heidelberg (2013).
- Grouzmann E, Lamine F. (2013) Determination of catecholamines in plasma and urine. *Best Pract Res Clin Endocrinol Metab* **27**(5): 713-23.
- Thomas L (Hrsg.) Labor und Diagnose. 8. Aufl, Verlag TH-Books Frankfurt/Main (2012).
- Feldman JM. (1986) Urinary serotonin in the diagnosis of carcinoid tumors. *Clin Chem* **32**(5):840-4.

Símbolos Usados



Fabricado por: Chromsystems Instruments & Chemicals GmbH
 Importado e Distribuído por: BioSys Ltda
 Rua Coronel Gomes Machado, 358, Centro, Niterói, RJ
 Cep: 24020-112
 CNPJ: 02.220.795/0001-79
 MS – nº 10350840115
 SAC: sac@biosys.com.br – (21) 3907-2534 / 0800 015 1414
www.biosys.com.br