

Instruções de Uso

Somente para uso diagnóstico *in vitro*

MassChrom® Cortisol, Cortisone in Saliva - LC-MS/MS

Reagente diagnóstico para determinação quantitativa *in vitro* de cortisol, cortisona em saliva por LC-MS/MS.

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

Artigo	Apresentação
73000	Kit de Reagentes LC-MS/MS MassChrom® para Análise de Cortisol, Cortisona em saliva – 400 determinações

Para informações detalhadas sobre o método e procedimentos, favor consultar o Manual de Instruções MassChrom® para análise de Cortisol, Cortisone em saliva – LC-MS/MS no site www.biosys.com.br.

SUMÁRIO

O kit de reagentes MassChrom® da Chromsystems para análise de cortisol, cortisona em saliva é um dispositivo de diagnóstico *in vitro* a ser usado em laboratórios clínicos para a determinação quantitativa de cortisol e cortisona livres em amostras de saliva humana utilizando cromatografia líquida acoplada a espectrometria de massas (LC-MS/MS). O kit é usado como um teste para pacientes para monitorar níveis de cortisol e cortisona.

MÉTODO

Cromatografia líquida acoplada a espectrometria de massas (LC-MS/MS).

PRINCÍPIO

Este kit de reagentes da Chromsystems MassChrom® Cortisol, cortisone in saliva permite a determinação confiável de cortisol livre e cortisona livre em saliva via LC-MS/MS. O teste de saliva é um método não invasivo que fornece resultados quantitativos confiáveis de forma rápida e conveniente. A preparação de amostras é simples (filtração) e os tempos de medição são curtos. Cada analito é investigado em relação a um padrão interno separado, marcado isotopicamente.

REAGENTES

Componentes e Composições:

Componente	Composição	Apresentação
Fase móvel A (Mobile Phase A)	Metanol	500 mL
Fase móvel B (Mobile Phase)	Acetonitrila	450 mL
Solução de Lavagem (Rinsing solution)	Metanol %	500 mL
Mix de Padrão Interno (Internal Standard Mix)	Analitos marcados isotopicamente Acetonitrila	4 x 5 mL
Tubos de limpeza (Clean-up tubes)	-	4 x 100 pcs

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	Temperatura
73001	Fase móvel A	+18 a +30°C
73002	Fase móvel B	+18 a +30°C
73004	Mix Padrão Interno	Abaixo - 18°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 A, Fase Móvel B, Padrão Interno Mix e a Solução de lavagem contêm solventes orgânicos. Descarte os resíduos do produto em um recipiente para solventes orgânicos livres de halogênio.

Os resíduos de amostras de pacientes e amostras preparadas, assim como controles e calibradores devem ser coletados e descartados como resíduos potencialmente infecciosos.

As soluções mencionadas não devem ser eliminadas juntamente com o lixo doméstico. Não circule no abastecimento de água principal. Descarte em conformidade com requisitos nacionais e locais. Seguir as disposições da resolução sobre o regulamento técnico para gerenciamento de resíduos de serviços de saúde, bem como outras práticas de biossegurança equivalentes em vigor. Os recipientes de resíduos devem ser armazenados de forma adequada e apenas o acesso permitido a partes autorizadas.

PREPARO DOS REAGENTES

Fase Móvel A: pronto para uso.

Fase Móvel B: pronto para uso.

Solução de Lavagem: pronto para uso.

Mix de Padrão Interno: pronto para uso.

MATERIAIS REQUERIDOS, MAS NÃO FORNECIDOS

- Sistema de cromatografia líquida acoplada a Espectrômetro de massa triplo quadrupolo com ESI (fornecido com sensibilidade suficiente)

- Autosampler com resfriamento

- Sistema de HPLC com gradiente

- Coluna cromatográfica equilibrada (Chromsystems art. 73100).

Controles e Calibradores:

- 6PLUS1® Multilevel Saliva Calibrator Set Cortisol, Cortisone (Chromsystems art. 73040)

-MassCheck® Cortisol, Cortisone Saliva Controls (Chromsystems art. 0353, 0354)

-System Check Solution MassChrom® Steroid panel 1 (Chromsystems art. 72088)

-Tuning Mix Cortisol, Cortisone MassChrom® (Chromsystems art. 73015)

Acessórios:

- Agitador tipo vórtex
- Centrifuga para 14000 x g
- Autosampler Vials, screw neck, amber glass, 1.5 ml (Chromsystems art. J0601)
- PP Screw-on caps, rubber/PTFE septa, 9 mm (Chromsystems art. J0504)
- PP Screw-on Caps, pierceable silicone/PTFE septa, 1.0 mm (Chromsystems art. J0401)
- Micro-inserts for Autosampler Vials(Chromsystems art. J0403)

Outros:

- Água tipo I ou grau HPLC.
- Metanol grau HPLC.
- Acetonitrila grau HPLC.
- Material geral de laboratório.

AMOSTRA

Deverão ser analisadas amostras de saliva. Os pacientes não devem comer ou praticar atividades físicas extenuantes por pelo menos 2 horas antes de fornecer uma amostra de saliva. Os pacientes devem enxaguar a boca com água fria 10 minutos antes da coleta da amostragem. Como os analitos não regidos pelo ritmo circadiano, anotar o tempo de amostragem [3].

Vários sistemas de coleta de saliva estabelecidos estão disponíveis (por exemplo, Salivette® Cortisol, código azul, fornecedor: Sarstedt). Para melhorar a estabilidade das amostras de pacientes, centrifugue os tubos de coleta de saliva (por exemplo, Salivette® prontamente (2 minutos a 1000 x g).

As amostras de saliva são estáveis por até 7 dias a +20 a +25°C, mas suscetíveis à colonização microbológica, associada a um odor desagradável. Amostras de saliva centrifugadas são estáveis por até 3 meses a +5°C e por até um ano a temperatura abaixo de -20°C. As amostras podem ser congeladas e descongeladas repetidamente (até 4 ciclos) [3].

Recomendamos a remixagem (vórtex) e centrifugação da amostra de saliva descongelada brevemente antes do uso.

É de responsabilidade do laboratório utilizar todas as referências disponíveis e/ou seus próprios estudos para determinar critérios específicos de estabilidade para seu laboratório.

Estabilidade das amostras preparadas (eluatoss):

As amostras preparadas podem ser mantidas por 1 semana em temperatura entre +20 e +25°C, ou por 2 semanas entre +2 e +8°C ou abaixo de -18°C.

PROCEDIMENTO DO TESTE

Ajustes do instrumento:

- Amostrador racks protegidos da luz e (autosampler) resfriados a +15°C
- Volume de injeção ≤30 µL (depende do espectrômetro de massas).
- Tempo de corrida 4,6 min
- Fluxo: 0,5 mL/min
- Temperatura da coluna: ambiente (aprox. 25°C)
- Solução de lavagem da agulha: Solução de Lavagem (Rinsing Solution - 73009)

Perfil de gradiente:

O perfil de gradiente apresentado aqui é indicado como uma base para otimização. O perfil pode precisar ser modificado devido a diferenças no volume morto entre os sistemas de HPLC.

Tabela 1: Perfil de gradiente

Tempo (minutos)	Fase Móvel A (%)	Fase Móvel B (%)	Fluxo (mL/min)
0	83	17	0,5
0,20	83	17	0,5
0,21	70	30	0,5
3,20	70	30	0,5
3,21	0	100	0,5
3,80	0	100	0,5
3,81	83	17	0,5
4,6	83	17	0,5

Perfil de alternância MS/descarte:

Uma alternância entre MS/descarte é um recurso opcional que transporta o solvente para o descarte depois que ele passa pela coluna analítica. A posição da válvula é alterada antes da eluição do analito (MS/MS)

Tabela 2: Perfil de alternância MS/Descarte

Posição da válvula	Tempo
Descarte	0,0-2,5 min
MS/MS	2,5-3,9 min
Descarte	3,9-4,6 min

Procedimento de preparo de amostras:

Para preparar amostras de pacientes, controles e calibradores para análise, execute as etapas seguintes na ordem apresentada.

Preparação:

1. Pipetar 100 µL de amostra/calibrador/controles em tubo de limpeza
2. Acrescentar 50 µL do Mix Padrão Interno (art 73004) e agitar em vórtex por 10 segundos.
3. Centrifugar por 15 minutos a 14.000 x g
4. Transferir o filtrado para o vial de autosampler (incluindo o micro-insert)
5. Fechar o vial do autosampler
6. Injetar até 30 µL da amostra preparada no sistema de LC-MS/MS

Tabela 3: Tempo de retenção esperado:

Analito	Tempo de retenção aprox. em minutos
Cortisol-d4	3,3
Cortisol	3,4
Cortisona-d8	3,5
Cortisona	3,7

Tabela 4: Transições MRMs:

Analito/IS	MRM1	MRM2	MRM3
Cortisol	363 > 121	363 > 327	363 > 97
Cortisol-d4	367 > 121	367 > 331	367 > 97
Cortisona	361 > 163	361 > 121	361 > 105
Cortisona-d8	369 > 168	369 > 124	369 > 107

As massas listadas acima servem apenas como um ponto de partida. A posição exata dos sinais pode variar de sistema MS para sistema MS e deve ser determinada individualmente e otimizada, pelo menos com uma casa decimal.

CÁLCULOS

Execute uma calibração completa do sistema de análise para cada série de medições. Use 6PLUS® Multilevel calibradores (artigo 73040). As concentrações dos vários analitos nos calibradores são dependentes do lote. Os níveis exatos são fornecidos no folheto informativo. As curvas de calibração são construídas calculando a razão da área de pico do analito para o padrão interno (ISTD) no eixo Y em relação às concentrações do calibrador no eixo X. Em seguida, trace uma curva de calibração para todos os analitos usando regressão e ponderação 1/x²

Para garantir que as condições do LC-MS/MS na medição não tenham mudado, injete os controles MassCheck® preparados

pelo menos uma vez durante e no final de uma série de amostras.

Verifique a precisão de massa e a resolução do espectrômetro de massa periodicamente e recalibre o espectrômetro de massa se notar desvios. Leia as informações no manual de instruções do seu espectrômetro de massa antes de fazê-lo e entre em contato com o fabricante do dispositivo se precisar de mais informações

A tabela a seguir lista os fatores de conversão entre a massa e as concentrações molares e inversamente.

Tabela 5: Fatores de conversão:

Analito	µg/L para nmol/L	nmol/L para µg/L
Cortisol	x 2,759	x 0,362
Cortisona	x 2,774	x 0,360

Cálculo manual: Os coeficientes das intensidades de sinal dos analitos divididos pelas intensidades de sinal do padrão interno traçado contra as concentrações do analito produzem uma curva de calibração por regressão linear, ponderada 1/X². A equação resultante é aplicada para cada substância.

$$C_{amostra} [mg/L] = \frac{A_{amostra} \times IS_{amostra} - b}{a}$$

Para o cálculo manual, são necessários os seguintes dados:

Área ou altura do pico do analito A no cromatograma MRM = amostras = A_{amostra}

Área ou altura do pico do padrão interno no cromatograma MRM = IS_{amostra}

Inclinação da curva de calibração = a

Interceptação em Y da curva de calibração = b

DESEMPENHO / CARACTERÍSTICAS

Linearidade / limite de quantificação:

Limite inferior de quantificação (LLOQ) e linearidade (limite superior de quantificação).

A linearidade foi determinada pela adição de amostras de saliva com quantidades definidas de substâncias padrão. O limite inferior de quantificação (LLOQ) foi determinado usando diluições definidas de um calibrador com matriz livre de analito.

O método é linear desde o limite inferior de quantificação (LLOQ) até o limite superior de quantificação declarado (faixa linear).

Tabela 6: Limite de quantificação e linearidade, determinação com espectrometro de massas Shimadzu LCMS-8050-Triplo Quadrupolo

Substância	LLOQ	faixa linear até pelo menos
Cortisol	0,28 µg/L	120 µg/L
Cortisona	0,31 µg/L	180 µg/L

Tabela 7: Limite de quantificação e linearidade, determinação com espectrometro de massas SCIEX QTRAP® 5500

Substância	LLOQ	faixa linear até pelo menos
Cortisol	0,27 µg/L	120 µg/L
Cortisona	0,34 µg/L	180 µg/L

Recuperação:

A recuperação relativa foi determinada em matriz saliva. A matriz foi fortificada repetidamente com os analitos para este propósito. Três níveis de concentração dentro das faixas de

trabalho dos analitos foram investigados para este propósito. A recuperação é calculada usando a seguinte fórmula:

$$\text{Recuperação}[\%] = \frac{\text{Concentração medida}_{\text{amostra fortificada}} - \text{Concentração medida}_{\text{amostra simples}}}{\text{Concentração fortificada}} \times 100$$

Tabela 8: Taxas de recuperação, determinação com espectrometro de massas Shimadzu LCMS-8050-Triplo Quadrupolo

Substância	Taxa de Recuperação em Saliva (Concentração do Analito)		
	Cortisol	100% (8,77 µg/L)	96% (27,6 µg/L)
Cortisona	105% (9,03 µg/L)	101% (28,4 µg/L)	103% (99,4 µg/L)

Tabela 9: Taxas de recuperação, determinação com espectrometro de massas SCIEX QTRAP® 5500

Substância	Taxa de Recuperação em Saliva (Concentração do Analito)		
	Cortisol	88% (10,3 µg/L)	85% (32,4 µg/L)
Cortisona	98% (10,7 µg/L)	94% (33,6 µg/L)	99% (118 µg/L)

Precisão intra-ensaio:

os coeficientes de variação foram determinados em três concentrações diferentes por preparação repetida (n=10) da mesma amostra em uma sequência.

Tabela 10: Precisão intra-ensaio, determinação com espectrometro de massas Shimadzu LCMS-8050-Triplo Quadrupolo

Substância	Coeficiente de Variação (Concentração do Analito)		
	Cortisol	5% (0,835 µg/L)	2,2% (7,88 µg/L)
Cortisona	2,5% (2,11 µg/L)	2,8% (14,5 µg/L)	1,9% (27,9 µg/L)

Tabela 11: Precisão intra-ensaio, determinação com espectrometro de massas SCIEX QTRAP® 5500

Substância	Coeficiente de Variação (Concentração do Analito)		
	Cortisol	3,2% (0,835 µg/L)	1,2% (7,88 µg/L)
Cortisona	1,1% (2,11 µg/L)	1,1% (14,5 µg/L)	1,9% (27,9 µg/L)

Precisão inter-ensaios:

A determinação da precisão inter-ensaios foi feita em três diferentes por preparação repetida (n=5) da mesma amostra de plasma, em 20 dias diferentes.

Tabela 12: Precisão inter-ensaio, determinação com espectrometro de massas Shimadzu LCMS-8050-Triplo Quadrupolo

Substância	Coeficiente de Variação (Concentração do Analito)		
	Cortisol	8,7% (0,835 µg/L)	5,0% (7,88 µg/L)
Cortisona	5,5% (2,11 µg/L)	5,3% (14,5 µg/L)	3,0% (27,9 µg/L)

Tabela 13: Precisão inter-ensaios, determinação com espectrometro de massas SCIEX QTRAP® 5500

Substância	Coeficiente de Variação (Concentração do Analito)		
	Cortisol	4,3% (0,835 µg/L)	3,0% (7,88 µg/L)
Cortisona	2,1% (2,11 µg/L)	2,3% (14,5 µg/L)	2,4% (27,9 µg/L)

Esses dados foram estabelecidos no nosso laboratório apenas para verificar o desempenho do kit de reagentes e cumprir requisitos regulamentares. Enfatizamos que estes dados não são adequados para comparar os sistemas de mediação utilizados, nem para fazer qualquer declaração relativa ao seu desempenho geral.

Drift

Para identificar qualquer desvio da concentração dos analitos ao longo do tempo, a concentração de todos os analitos nos três níveis de controle foi comparada ao longo de um período de 20 dias. Não se observou qualquer desvio para nenhum dos analitos.

VALORES DE REFERÊNCIA

Os valores de referência especificados são baseados na literatura [4]. Eles podem diferir de outros dados publicados. Como os níveis variam dependendo da população de pacientes e do método de medição, determine os valores de referência específicos para o seu laboratório. Ao determinar os valores de referência certifique-se de cumprir todas as exigências nacionais locais.

Tabela 14: Valores de Referência

Substância	Método	Hora do dia	Valor de Referência [4]
Cortisol	LC-MS/MS	Manhã	1,1-7,6 µg/L
		Noite	0,18-0,91 µg/L
Cortisona	LC-MS/MS	Manhã	3,7-15,3 µg/L
		Noite	0,54-4,7 µg/L

INTERFERENTES CONHECIDOS

A amostra de saliva foi enriquecida com os seguintes compostos isobáricos, metabólitos e substâncias medicamentosas nas concentrações mais altas esperadas e analisadas quanto a quaisquer interferências

As seguintes substâncias foram testadas e tiveram uma influência insignificante nos resultados quantitativos (desvio ≤ 15%)

Compostos isobáricos e metabólitos:

Ácido colânico, propionato de dromostanolona, prednisona, aldosterona, alodihidro cortisona, 18-hidroxicorticosterona, 20α-dihidroprednisolona, 20β-dihidroprednisolona, 20α-dihidro cortisona, 20β-dihidro cortisona

Drogas:

Acetazolamida, ampicilina, amoxicilina, ampicilina, azatioprina, azitromicina, betametasona, bisoprolol, captopril, carbamazepina, carbamazepina-10,11-epóxido, cefradina, cloranfenicol, clordiazepóxido, cimetidina, ciprofloxacina, claritromicina, cloprednol deflazacorte, dexametasona, diazepam, diclofenaco, digitoxina, digoxina, dihidrocodeína, disopiramide, enalaprilato, eritromicina, furosemida, ganciclovir, gentamicina, hidroclorotiazida, ibuprofeno, nitrato de isossorbida, itraconazol, cetoconazol, levofloxacina, levotiroxina, lidocaína, lorazepam, metimorfina, metilprednisolona, metoclopramide, metoprolol, ácido micofenólico, ácido micofenólico glicuronídeo, N-acetilprocaína, nadolol, fluoreto de sódio, N-desmetildiazepam, neomicina, nifedipina, norverapamil, omeprazol, oxazepam, oxpurinol, paracetamol, penicilina G, penicilina V, fenitoína, prazosina, prednisona, procainamida, propranolol, ranitidina, rifampicina, risperidona, salbutamol, ácido salicílico, estreptomicina, sulfametoxazol, tramadol, triancinolona, triantereno, trimetoprima, ácido valproico, vancomicina, verapamil.

Substâncias medicamentosas - administração inalatória:

Acilidínio, betametasona, budesonida, ciclesonida, cromoglicato, fenoterol, fluticasona, formoterol, glicopirrónio,

indaceterol, ipratrópio, mometasona, olodaterol, salbutamol, salmeterol, terbutalina, tiotrópio, umeclidínio.

Foram observadas interferências na presença das seguintes substâncias:

A prednisolona, um anti-inflamatório e imunossupressor, pode levar a um falso aumento dos níveis de cortisol. Ela elui pouco antes do cortisol e se separa visivelmente ao usar sistemas UHPLC (pequenas câmaras de mistura e baixo volume morto). A co-eluição de prednisolona e cortisol pode ocorrer quando se utilizam sistemas de HPLC com maior volume morto. A interferência da prednisolona pode ser reconhecida em todos os vestígios da cortisona isobárica, onde ela elui separadamente bem antes da cortisona (aprox. 0,3 minutos). Nossas investigações sugerem que a concentração máxima provável de contribuição de prednisolona no cortisol é de 1,7µg/L, assumindo uma concentração salivar máxima de prednisolona de 150µg/L, que de acordo com [5] pode ser esperada duas horas após uma alta dose oral de prednisolona (80 mg).

A fludrocortisona, um glicocorticóide sintético, co-elui com a cortisona e leva a níveis de cortisona falso-positivos.

LITERATURA

- Gröschl M. (2008) Current status of salivary hormone analysis. Clin Chem 54(11): 1759-69.
- Lee S, Kwon S, Shin HJ, Lim HS, Singh RJ, Kim YJ. (2010) Simultaneous quantitative analysis of salivary cortisol and cortisone in Korean adults using LC-MS/MS. BMB Rep 43(7): 506011.
- Hansen A M. (2008) Sources of biological and methodological variation in salivary cortisol and their impact on measurement among healthy adults: A review. The Scandinavian Journal of Clinical & Laboratory Investigation 68 (6): 448-485 .
- Antonelli G, Ceccato F, Artusi C, Marinova M, Plebani M. (2015) Salivary cortisol and cortisone by LC-MS/MS: validation, reference intervals and diagnostic accuracy in Cushing's syndrome. Clin Chim Acta 451 (Pt B):247-51.
- Ruiter AF, Teeninga N, Nauta J, Endert E, Ackermans MT. (2012) Determination of unbound prednisolone, prednisone and cortisol in human serum and saliva by on-line solid-phase extraction liquid chromatography tandem mass spectrometry and potential implications for drug monitoring of prednisolone and prednisone in saliva. Biomed Chromatogr 26(7): 789-96.
- Teeninga N, Guan Z, Freijer J, Ruiter AF, Ackermans MT, Kist-van Holthe JE, van Gelder T, Nauta J. (2013) Monitoring prednisolone and prednisone in saliva: a population pharmacokinetic approach in healthy volunteers. Ther Drug Monit 35(4): 485-92.

Símbolos Usados

-  Fabricante
-  Limites de temperatura
-  Diagnóstico in vitro
-  Cuidado, consulte documentos anexos
-  Consulte instruções de uso
-  Material Reciclável
-  Não rejeitar diretamente para o ambiente
-  Lote
-  Data de Fabricação
-  Validade
-  Risco Biológico
-  Altamente tóxico
-  Corrosivo
-  Nocivo

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 – nº10350840420

SAC: sac@biosys.com.br – (21) 3907-2534 / 0800 015 1414

www.biosys.com.br