

MassChrom® Amino acids and acylcarnitines from dried blood– LC-MS/MS (Derivatised)

(MassChrom-Aminoácidos e Acilcarnitinas em sangue seco por LC-MS/MS - derivativado)

Reagente diagnóstico para determinação quantitativa *in vitro* de Aminoácidos e Acilcarnitinas em sangue seco por LC-MS/MS.

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

Artigo	Apresentação
55000	Kit Reagente para Análise de Aminoácidos e acilcarnitinas em sangue seco, 960 análises

Para informações detalhadas sobre o método e procedimento, favor consultar o Manual de Instruções MassChrom® Amino acids and acylcarnitines from dried blood– LC-MS/MS (Derivatised) no site www.biosys.com.br.

SUMÁRIO

Este Kit permite a determinação semi-quantitativa, simples e rápida, de aminoácidos e acilcarnitinas em *spots* de sangue seco (DBS) para triagem neonatal de distúrbios do metabolismo dos ácidos graxos e aminoácidos por espectrometria de massas em *tandem* - LC-MS/MS. Os seguintes aminoácidos, acilcarnitinas e carnitinas livres podem ser determinados semi-quantitativamente com este kit:

Aminoácidos: alanina (Ala), arginina (Arg), ácido aspártico (Asp), citrulina (Cit), ácido glutâmico (Glu), glicina (Gly), leucina (Leu), metionina (Met), ornitina (Orn), fenilalanina (Phe), prolina (Pro), tirosina (Tyr) e valina (Val) e succil acetona (SucA).

Carnitina livre e acilcarnitinas: carnitina livre (C0), acetilcarnitina (C2), propionilcarnitina (C3), butirilcarnitina (C4), isovalerilcarnitina (C5), glutarilcarnitina (C5DC), hexanoilcarnitina (C6), octanoilcarnitina (C8), decanoilcarnitina (C10), dodecanoilcarnitina (C12), tetradecanoilcarnitina (C14), hexadecanoilcarnitina (C16) e octadecanoilcarnitina (C18).

MÉTODO

Deteção por espectrometria de massa em *tandem*.

PRINCÍPIO

O preparo de amostras é baseado em uma eficiente extração dos analitos do papel de filtro, seguido por uma derivatização do analitos à ésteres butíricos. Para garantir uma quantificação reproduzível dos analitos, este método usa padrões internos estáveis e isotopicamente marcados (deuterados) para calibração e medidas.

REAGENTES

Componentes e Composições:

Componente	Composição	Apresentação
Fase móvel (<i>Mobile Phase</i>)	Acetonitrila 50-100%	2 x 1000 mL
Padrão Interno (<i>Internal Standard</i>)	solução contendo diversos aminoácidos e acilcarnitinas	4 x 50 mL
Reagente de derivatização (<i>Derivatisation Reagent</i>)	1-butanol 50-100%, n-butil acetato 15<25% e ácido clorídrico 3<10%	2 x 30 mL
Tampão de reconstituição (<i>Reconstitution Buffer</i>)	Acetonitrila 50-100%	1 x 100 mL
Solução de lavagem (<i>Rinsing solution</i>)	Acetonitrila 50-100%	2 x 1000 mL

Tampão de Extração (<i>Extraction buffer</i>)	Metanol 55-100%	1 x 200 mL
Placa de 96 poços	-	30 unidades
Folha de proteção para placa de 96 poços		30 unidades

INSTRUÇÕES DE ARMAZENAMENTO 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 dos reagentes do kit.

Produto	Condição
Fase móvel (art. 55001)	+18 a +30°C
Solução de lavagem (art. 55007)	+18 a +30°C
Tampão de extração (art. 55008)	+18 a +30°C
Reagente de derivatização (art. 55005)	+18 a +30°C
Tampão reconstituição (art. 55006)	+18 a +30°C
Padrão Interno (art. 55004)	Abaixo de -18°C

CUIDADOS E PRECAUÇÕES

Por favor, consulte a ficha de segurança dos reagentes e tome as precauções necessárias para o manuseio de reagentes de laboratório.

GARANTIA

Estas instruções de uso devem ser lidas atentamente antes da utilização do produto e 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, Solução de Lavagem, Tampão de Extração, Tampão de Reconstituição e as soluções de Tuning Mix contêm solventes orgânicos. Descarte os resíduos destes produtos em recipientes para solventes orgânicos livres de halogênio.

O Reagente de Derivatização contém solventes orgânicos e halogênios. Descarte os resíduos destes produtos em um recipiente para solventes orgânicos contendo halogênio.

Os resíduos de amostras de pacientes e amostras preparadas, assim como os controles, devem ser coletados e descartados como lixo potencialmente infeccioso

PREPARO DOS REAGENTES

Fase Móvel: pronto para uso.

Reagente de derivatização: pronto para uso.

Tampão de reconstituição: pronto para uso.

Solução de lavagem: pronto para uso.

Tampão de extração: pronto para uso.

Tuning Mix: pronto para uso.

Padrão Interno (Iiof):

O padrão interno (artigo 55004) é utilizado como padrão de calibração para cada amostra e é rastreável a substâncias de referência isotopicamente marcadas adquiridas de fornecedor certificado. Após reconstituição, uma quantidade definida de padrão interno é adicionada a amostra e, então, submetido a todo o procedimento de preparação das amostras.

Antes do preparo de amostras, reconstitua o Padrão Interno (artigo 55004) com 50 ml do Tampão de Extração. Faça os seguintes procedimentos:

1. Pipete 5 ml do Tampão de Extração (artigo 55008) no frasco original do Padrão Interno
2. Reconstitua por aproximadamente 5 min entre +20 e +25°C, agite suavemente e repetidamente
3. Transfira o conteúdo do frasco para um balão volumétrico de 50 ml
4. Enxague o frasco do Padrão Interno duas vezes com 5 ml do Tampão de Extração e transfira o líquido para o balão volumétrico
5. Complete o volume do balão volumétrico para 50 mL com o Tampão de Extração e homogeneíze.

Evite a exposição direta à luz. A concentração atual depende do lote e poderá ser encontrada no folheto de informações que acompanha o padrão.

Estabilidade do Padrão Interno após reconstituição: se armazenado em +2 a +8°C, bem fechado e protegido da luz, o padrão interno pode ser armazenado por até 3 semanas.

MATERIAIS REQUERIDOS, MAS NÃO FORNECIDOS

- **MassCheck** Amino Acids, Acylcarnitines dried blood spot control, Bi-Level (I + II) (Chromsystems art. 0191)
- Espectrômetro de massa em *tandem* com *software* de avaliação;
- Sistema de HPLC com bomba, injetor e amostrador automático;
- Picotador automático ou manual, para picotar as amostras, 3.2 mm em diâmetro;
- Agitador de placas de 96 poços termoestáveis para extração e derivatização das amostras;
- Ventilador de ar quente para evaporação das amostras;
- Presilhas de borracha (elástico) para prender as folhas de proteção às placas de 96 poços;
- Pipeta ou pipeta multicanal, 60 - 200 µL;
- Ponteiras;
- Exaustor;
- Balão volumétrico com capacidade para 50 ml;
- Papel de filtro para coleta do sangue do calcanhar

AMOSTRA

A coleta de sangue para triagem neonatal deve ocorrer entre 48 e 72 horas após o nascimento. O sangue é coletado do calcanhar do recém-nascido por gotejamento em papel de filtro e colocada em repouso até que esteja seca. Recomenda-se que sejam utilizados papéis de filtro aprovados e específicos para o teste. Amostras com EDTA ou heparina não devem ser utilizadas pois podem levar a resultados falso-negativos ou falso-positivos.

Descrição resumida das etapas da coleta:

1. Limpe a área do calcanhar do recém-nascido destinada à punção com antisséptico. Seque com cotonete estéril.
2. Perfure o calcanhar com uma lanceta estéril. A ponta da lanceta deve ser menor que 2 mm, pois, perfurações profundas podem ferir crianças pequenas.
3. Descarte a primeira gota de sangue com um cotonete estéril.
4. Colha a próxima grande gota de sangue com o papel de filtro, aguardando até que a amostra seja adsorvida no papel e preencha totalmente o círculo delimitado. Não aplique uma gota de sangue sobre a outra e nem colha em ambos os lados do papel, pois isto altera o volume de sangue coletado por *spot* e pode produzir falsos resultados patológicos.

5. Preencha cada um dos círculos remanescentes no papel de filtro, repetindo o mesmo procedimento, com uma única gota de sangue.
6. Cuidados com o local de punção deve estar de acordo com a prática comum do hospital/laboratório
7. Deixe o sangue coletado secar por 4 horas, repousando o papel de filtro em uma superfície horizontal, não-absorvente, em +20 a +25°C.
8. Envie as amostras secas em papel de filtro para o laboratório, dentro de 24 horas.

Para instruções detalhadas da coleta da amostra, consulte o manual do fabricante do papel de filtro ou as orientações padronizadas.

O armazenamento em ambiente de baixa umidade (menor que 30%) em temperatura ambiente (+20 a +25°C) é adequado, se a análise for realizada dentro de 24 a 48 horas. Baixa umidade e baixas temperaturas (refrigerado ou abaixo de -18°C) são sugeridos para armazenamento superior a 48 horas [14]. **Evite temperaturas acima de 37°C.** Isto pode causar a diminuição de alguns aminoácidos.

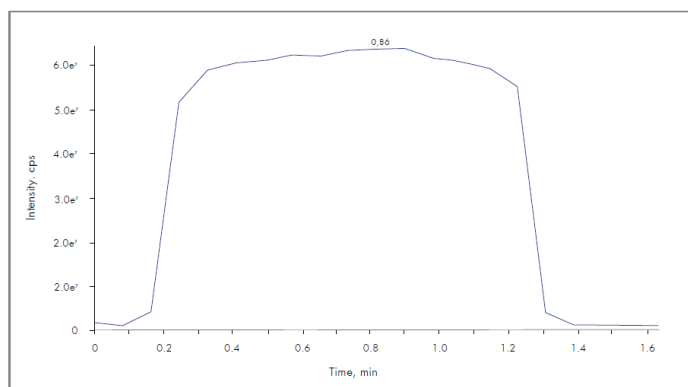
PROCEDIMENTOS DO TESTE

Ajustes do instrumento:

Amostrador automático:	Volume de injeção 10 µL
Tempo de corrida:	1,8 min
Gradiente de fluxo:	20 a 600 µL/min
Solução de lavagem para agulha do injetor:	Solução de lavagem (artigo 55007)

Devido aos diferentes volumes mortos dos sistemas individuais de HPLC e o comprimento do capilar restritor, o seguinte perfil de gradiente deve ser otimizado para obter o cromatograma mostrado abaixo. O perfil de gradiente apresentado é pretendido como a base para a otimização.

A janela do tempo de varredura (*scan time window*) do sistema *tandem* MS deve ser ajustada para o período de tempo no qual a intensidade do sinal alcança o nível máximo (aproximadamente 0,32 a 1,61 min).



Cromatograma usando um fluxo de gradiente otimizado.

Perfil de gradiente:

Tempo (min)	0	0.32	0.33	1.60	1.61	1.80	1.81
Fluxo (µl/min)	200	200	20	20	600	600	200

Se o sistema de HPLC não for capaz de manter um fluxo constante de 20 µl/min, o método pode ser rodado alternativamente com um fluxo constante de 100 a 150 µl/min. Note, entretanto, que o método de fluxo constante causa redução da sensibilidade.

Preparo da amostra sem placa filtrante

1. Picotagem da amostra:
Faça um picote no papel de filtro, de forma a retirar um disco de 3.2 mm da amostra de sangue seco e coloque dentro de um poço da placa de 96 poços.

2. Extração de aminoácidos/acilcarnitinas:
Adicione 200 µL de padrão interno reconstituído (ver capítulo 5.2). Sele a placa com a folha de proteção e agite por 20 minutos a 600 rpm, em +20 a +25°C.

3. Transferência/Evaporação:
Remova a folha de proteção da placa de 96 poços. Transfira o sobrenadante para uma nova placa de 96 poços. Evapore a 60°C e 600 rpm para secar sobre fluxo de ar.

Importante: Não pode haver umidade remanescente na placa de 96 poços. A umidade interfere na derivatização.

4. Derivatização (butilação):
Adicione 60 µL do reagente de derivatização. Sele a placa com a folha de proteção e incube a 60°C e 600 rpm por 15 minutos.

5. Evaporação
Remova a folha de proteção da placa de 96 poços. Evapore a 60°C e 600 rpm para secar sobre fluxo de ar.

Cuidado: Uma fumaça corrosiva emerge durante a evaporação do reagente de derivatização! Sempre trabalhe sob exaustor.

6. Reconstituição do eluato
Adicione 100 µL do tampão de reconstituição. Agite a 600 rpm por 1 minuto.

7. Injeção:
Injete 10 µL do eluato no sistema LC-MS/MS.

A precisão e exatidão da análise devem ser monitoradas com a inclusão de controles adicionais em cada corrida analítica.

Preparo da amostra com placa filtrante

1. Picotagem da amostra:
Coloque uma placa de 96 poços com filtro em cima de uma placa de 96 poços. Faça um picote no papel de filtro, de forma a retirar um disco de 3.2 mm da amostra de sangue seco e coloque dentro de um poço da placa filtrante.

2. Extração:
Adicione 200 µL de padrão interno reconstituído (ver capítulo 5.2) em cada disco de papel. Sele a placa filtrante com a folha de proteção (artigo 55011) e agite ambas as placas por 20 minutos a 600 rpm, em +20 a +25°C.

3. Centrifugação/ Evaporação:
Remova a folha de proteção da placa de 96 poços com filtro. Filtre o sobrenadante para a placa de 96 poços por centrifugação a 3000 x g por 2 minutos. Descarte a placa filtrante e evapore o eluato a 60°C e 600 rpm para secar sobre fluxo de ar.

Importante: Não pode haver umidade remanescente na placa de 96 poços. A umidade interfere na derivatização.

4. Derivatização (butilação):
Adicione 60 µL do reagente de derivatização. Selar a placa com a folha de proteção e incubar a 60°C e 600 rpm por 15 minutos.

5. Evaporação
Remova a folha de proteção da placa de 96 poços. Evapore a 60°C e 600 rpm para secar sobre fluxo de ar.

Cuidado: uma fumaça corrosiva emerge durante a evaporação do reagente de derivatização! Sempre trabalhe sob exaustor.

6. Reconstituição do eluato
Adicione 100 µL do tampão de reconstituição. Agite a 600 rpm por 1 minuto.

7. Injeção:
Injete 10 µL do eluato no sistema LC-MS/MS.

A precisão e exatidão da análise devem ser monitoradas com a inclusão de controles adicionais em cada corrida analítica.

Estabilidade das amostras preparadas:

Se armazenadas protegidas da luz, em frascos de vidro e bem fechadas, as amostras preparadas são estáveis por 7 dias a +20 a +25°C, por 14 dias a +2 a +8°C, e por até 3 semanas abaixo de -18°C.

As amostras descongeladas devem ser bem homogeneizadas antes da injeção.

OTIMIZANDO OS MRMS E OS EXPERIMENTOS DE PERDA NEUTRA E VARREDURA DO ÍON PRECURSOR (TUNING)

É altamente recomendado verificar a acurácia e a resolução de massa do sistema MS/MS. Se a acurácia e a resolução de massa estiverem fora das especificações do fabricante do instrumento, uma nova calibração do espectrômetro de massa é recomendada. A seguir, as transições MRM do analito assim como experimentos de Perda Neutra e Varredura do Íon Precursor devem ser ajustados como abaixo:

Otimizando os MRMs:

1. Dilua o Tuning Mix (artigo 55099, 55098) com Fase Móvel (artigo 55001) como apropriado para o dispositivo específico
2. Injete o Tuning Mix diluído ou infuse diretamente pela bomba de seringa (fluxo de 0,02 ml/min)
3. Use o Scan Q1 (MS Scan) para determinar as posições exatas do sinal máximo das massas em MS1 (precursor/íon pai) (pelo menos um decimal)
4. Determine as posições exatas do sinal máximo das massas em MS2 (produto/íon filho) pela varredura do íon produto
5. Otimize os parâmetros individuais para cada transição MRM (ex. energia de colisão)
6. Use as transições MRM otimizadas para otimizar a fonte de íon, especialmente a voltagem do capilar, a temperatura, e os fluxos de gases.

Varredura do Íon Precursor:

1. Dilua o Tuning Mix (artigo 55099) com Fase Móvel (artigo 55001) como apropriado para o dispositivo específico
2. Injete o Tuning Mix diluído ou infuse diretamente pela bomba de seringa (fluxo de 0,02 ml/min)
3. Use o Scan Q1 (MS Scan) para determinar as posições exatas do sinal máximo das massas em MS1 (precursor/íon pai), por exemplo da carnitina (m/z 218) (pelo menos um decimal)
4. Use a varredura do íon produto para determinar a posição exata do sinal máximo do fragmento característico de acilcarnitinas (m/z 85) (pelo menos uma casa decimal)
5. Programe o experimento de varredura do íon precursor de forma que a faixa de medição desejada (ex. m/z 200 a m/z 500) seja coberta. Use o valor determinado no ponto 4 como massa MS2.
6. É recomendado determinar os parâmetros individuais (ex. energia de colisão) para analitos com baixa intensidade na varredura em um experimento separado de MRM (veja acima). Use estes parâmetros como configurações globais de toda a varredura do íon precursor. Alternativamente, também é possível, dependendo do instrumento, armazenar faixas de parâmetros individuais ao invés de valores globais.

TRANSIÇÃO DE MASSA DOS ANALITOS E PADRÕES INTERNOS:

Aminoácidos e metabólitos da tirosina (SucA):

Substância	Método de Medição	Transição de massa
Alanina	Neutral Loss Scan 102	146 > 44
Alanina-D4	Neutral Loss Scan 102	150 > 48
Ácido Aspártico	Neutral Loss Scan 102	246 > 144
Ácido Aspártico-D3	Neutral Loss Scan 102	249 > 147
Ácido Glutâmico	Neutral Loss Scan 102	260 > 158
Ácido Glutâmico-D5	Neutral Loss Scan 102	265 > 163
Leucina	Neutral Loss Scan 102	188 > 86
Leucina-D3	Neutral Loss Scan 102	191 > 89
Metionina	Neutral Loss Scan 102	206 > 104
Metionina-D3	Neutral Loss Scan 102	209 > 107
Fenilalanina	Neutral Loss Scan 102	222 > 120
Fenilalanina-D5	Neutral Loss Scan 102	227 > 125
Tirosina	Neutral Loss Scan 102	238 > 136
Tirosina-D4	Neutral Loss Scan 102	242 > 140

Valina	Neutral Loss Scan 102	174 > 72
Valina-D8	Neutral Loss Scan 102	182 > 80
Arginina	MRM	231 > 70
Arginina-D7	MRM	238 > 77
Citrulina	MRM	232 > 113
Citrulina-D2	MRM	234 > 115
Glicina	MRM	132 > 76
Glicina - ¹⁸ C ₂ - ¹⁵ N	MRM	135 > 79
Ornitina	MRM	189 > 70
Ornitina-D6	MRM	195 > 76
Prolina	MRM	172 > 116
Prolina-D7	MRM	179 > 123
Succinil acetona	MRM	211 > 109
Succinil acetona - ¹³ C ₅	MRM	216 > 114

Acilcarnitinas e Carnitina livre:

Substância	Método de Medição	Transição de massa
Carnitina	Parent Ion Scan 85	218 > 85
Carnitina-D9	Parent Ion Scan 85	227 > 85
C2-Carnitina	Parent Ion Scan 85	260 > 85
C2-Carnitina-D3	Parent Ion Scan 85	263 > 85
C3-Carnitina	Parent Ion Scan 85	274 > 85
C3-Carnitina-D3	Parent Ion Scan 85	277 > 85
C4-Carnitina	Parent Ion Scan 85	288 > 85
C4-Carnitina-D3	Parent Ion Scan 85	291 > 85
C5-Carnitina	Parent Ion Scan 85	302 > 85
C5-Carnitina-D9	Parent Ion Scan 85	311 > 85
C5DC-Carnitina	Parent Ion Scan 85	388 > 85
C5DC-Carnitina-D6	Parent Ion Scan 85	394 > 85
C6-Carnitina	Parent Ion Scan 85	316 > 85
C6-Carnitina-D3	Parent Ion Scan 85	319 > 85
C8-Carnitina	Parent Ion Scan 85	344 > 85
C8-Carnitina-D3	Parent Ion Scan 85	347 > 85
C10-Carnitina	Parent Ion Scan 85	372 > 85
C10-Carnitina-D3	Parent Ion Scan 85	375 > 85
C12-Carnitina	Parent Ion Scan 85	400 > 85
C12-Carnitina-D3	Parent Ion Scan 85	403 > 85
C14-Carnitina	Parent Ion Scan 85	428 > 85
C14-Carnitina-D3	Parent Ion Scan 85	431 > 85
C16-Carnitina	Parent Ion Scan 85	456 > 85
C16-Carnitina-D3	Parent Ion Scan 85	459 > 85
C18-Carnitina	Parent Ion Scan 85	484 > 85
C18-Carnitina-D3	Parent Ion Scan 85	487 > 85

A tabela seguinte mostra algumas acilcarnitinas adicionais, com seus respectivos valores de transição de massa e padrões internos isotopicamente marcados recomendados. Tais informações são apenas uma sugestão, representando a prática corrente de muitos laboratórios de triagem. O kit de reagentes Chromsystems não é validado para esses analitos.

Acilcarnitinas adicionais sem padrão interno explícito:

Substância	Transição de massa	Padrões internos recomendados
C3DC-Carnitina	360 > 85	C3-Carnitina-D3
C4OH-Carnitina	304 > 85	C4-Carnitina-D3
C4DC-Carnitina	374 > 85	C4-Carnitina-D3
C5:1-Carnitina	300 > 85	C5-Carnitina-D9
C5OH-Carnitina	318 > 85	C5-Carnitina-D9
C8:1-Carnitina	342 > 85	C8-Carnitina-D3
C10:1-Carnitina	370 > 85	C10-Carnitina-D3
C14:2-Carnitina	424 > 85	C14-Carnitina-D3
C14:1-Carnitina	426 > 85	C14-Carnitina-D3
C14OH-Carnitina	444 > 85	C14-Carnitina-D3
C16:1-Carnitina	454 > 85	C16-Carnitina-D3
C16:1OH-Carnitina	470 > 85	C16-Carnitina-D3
C16OH-Carnitina	472 > 85	C16-Carnitina-D3
C18:1-Carnitina	482 > 85	C18-Carnitina-D3
C18:2OH-Carnitina	496 > 85	C18-Carnitina-D3
C18:1OH-Carnitina	498 > 85	C18-Carnitina-D3
C18OH-Carnitina	500 > 85	C18-Carnitina-D3

CÁLCULOS

As concentrações dos analitos nas amostras são calculadas de acordo com o seguinte princípio:

$$\begin{aligned} \text{Intensidade de sinal do analito no espectro} &= \text{Sinal}_{\text{analito}} \\ &\text{da amostra} \\ \text{Intensidade de sinal do padrão interno} &= \text{Sinal}_{\text{ISTD}} \\ \text{(ISTD) no espectro da amostra} & \\ \text{Volume de sangue no disco} &= \text{Vol}_{\text{sangue}} \\ \text{Volume de padrão interno adicionado} &= \text{Vol}_{\text{ISTD}} \\ \text{Concentração C do padrão interno} &= C_{\text{ISTD}} \end{aligned}$$

Calcule a concentração do analito A na amostra (C_{analito}) como a seguir:

$$C_{\text{Analito}} [\mu\text{mol/L}] = \frac{\text{Sinal}_{\text{analito}} \times \text{Vol}_{\text{ISTD}}}{\text{Sinal}_{\text{ISTD}} \times \text{Vol}_{\text{sangue}} \text{ IS}_{\text{Amostra}}} \times C_{\text{ISTD}}$$

FATORES DE CONVERSÃO

Aminoácidos:

Analito	$\mu\text{mol/L}$ em mg/L	mg/L em $\mu\text{mol/L}$
Alanina	x 0,0891	x 11,223
Arginina	x 0,1742	x 5,7405
Ácido Aspártico	x 0,1331	x 7,5126
Citrulina	x 0,1752	x 5,7081
Ácido Glutâmico	x 0,1471	x 6,7967
Glicina	x 0,0751	x 13,321
Leucina	x 0,1312	x 7,6237
Metionina	x 0,1492	x 6,7020
Ornitina	x 0,1322	x 7,5666
Fenilalanina	x 0,1652	x 6,0536
Prolina	x 0,1151	x 8,6858
Tirosina	x 0,1812	x 5,5191
Valina	x 0,1172	x 8,5361
Succinil acetona	x 0,1581	x 6,3231

Acilcarnitinas e Carnitina livre:

Analito	$\mu\text{mol/L}$ em mg/L	mg/L em $\mu\text{mol/L}$
C0-Carnitina	x 0,1612	x 6,2019
C2-Carnitina	x 0,2032	x 4,9203
C3-Carnitina	x 0,2172	x 4,6032
C4-Carnitina	x 0,2312	x 4,3245
C5-Carnitina	x 0,2452	x 4,0776
C5DC-Carnitina	x 0,2753	x 3,6319
C6-Carnitina	x 0,2593	x 3,8559
C8-Carnitina	x 0,2874	x 3,4789
C10-Carnitina	x 0,3154	x 3,1701
C12-Carnitina	x 0,3435	x 2,9109
C14-Carnitina	x 0,3715	x 2,6915
C16-Carnitina	x 0,3996	x 2,5023
C18-Carnitina	x 0,4276	x 2,3384

CALIBRADORES E CONTROLES

A Chromsystems disponibiliza os seguintes produtos para calibrar e monitorar a precisão e exatidão das análises:

Artigo	Produto	Apresentação
0191	MassCheck Amino Acids, Acylcarnitines dried blood spot control, Bi-Level (I + II)	2 x 3 spots

INTERFERENTES CONHECIDOS

- Isoleucina interfere com leucina. A concentração medida na amostra é um somatório das concentrações dos dois aminoácidos.
- Hidroxiprolina interfere com leucina. O valor padrão da hidroxiprolina é insignificante comparado ao da leucina.

Hidroxiprolina não deve causar qualquer falso aumento da concentração de leucina durante a análise de rotina.

- Metionina sulfona interfere com tirosina. Metionina sulfona é um produto de degradação da metionina. A concentração padrão da Metionina em crianças é de aproximadamente 20 µmol/L e as concentrações máximas esperadas de metionina sulfona estão dentro dessa faixa. O valor patológico de tirosina é de aproximadamente 300 µmol/L. Desta forma, metionina sulfona não deve causar acréscimos significativos na concentração de tirosina durante análises de rotina.
- Metionina sulfóxido interfere com metionina. Metionina sulfóxido é um produto da oxidação da metionina. In vivo, metionina sulfóxido é reduzida novamente a metionina pela ação da enzima metionina sulfóxido redutase. Logo, em condições in vivo, não devem existir concentrações patológicas de metionina causadas pelo aumento da concentração de metionina sulfóxido.
- Asparagina interfere com ornitina. A concentração máxima de asparagina em crianças é de até 140 µmol/l. Somente concentrações maiores de 300 µmol/l de asparagina geram um aumento de 20% na concentração de ornitina. Asparagina não deve causar nenhum falso aumento nas concentrações de ornitina durante análises de rotina.
- Devido à formação de éster dibutílico, o ácido glutâmico interfere com a carnitina-C2. Entretanto, os valores padrões de ácido glutâmico em crianças não gera um aumento significativo da concentração de carnitina-C2. O ácido glutâmico não deve causar nenhum falso aumento nas concentrações de carnitina-C2 durante análises de rotina.
- O ácido glutâmico-d5 leva a uma sobreposição na transição de massa da metionina-d3 (209>107), o que faz com que as concentrações de metionina em todas as amostras sejam medidas um pouco baixas demais. Desde que os valores de corte e as amostras dos pacientes sejam determinados com este ensaio, não há risco de resultados falsos.
- Aditivos em materiais plásticos (placas de microtitulação, folhas de proteção) usados na preparação das amostras, podem interferir consideravelmente com algumas acilcarnitinas, gerando resultados falso-positivos. Logo, este kit de reagentes da Chromsystems contém todos os materiais plásticos necessários para a análise, devidamente testados e classificados como livre de interferentes.
- Em pacientes com dietas parenterais, com substituição de tirosina por acetiltirosina, pode ocorrer decréscimo na concentração de tirosina. A razão elevada entre as concentrações de Fenilalanina e Tirosina (Phe/Tyr) pode indicar falsamente fenilcetonúria, mesmo com a concentração de fenilalanina em valores normais.
- Em pacientes tratados com certos antibióticos (por exemplo, pivmecillinam, pivampicilina), pode ser formado por metabolização o ácido piválico e, por outros processos, pivaloilcarnitina. A pivaloilcarnitina é isobárica à isovalerilcarnitina (C5-carnitina), o que pode levar a uma sobreposição de pico que sugere isovalerianacidemia, embora nenhum distúrbio metabólico esteja presente.

DESEMPENHO / CARACTERÍSTICAS

Salvo indicação em contrário, a determinação destes dados foi feita em um Waters Micromass Quattro micro API.

Recuperação:

A recuperação analítica foi determinada a partir do coeficiente angular da curva de calibração de amostras de sangue fortificadas e soluções padrões diluídas.

Aminoácidos:

Analito	Recuperação (%)
Alanina	85
Arginina	67
Ácido Aspártico	77
Citrulina	89
Ácido Glutâmico	72
Glicina	82

Leucina	77
Metionina	90
Ornitina	69
Fenilalanina	86
Prolina*	81
Tirosina	88
Valina	79

* a determinação deste analito foi realizada no AB Sciex API4000™

Acilcarnitinas e Carnitina livre:

Analito	Recuperação (%)
C0-Carnitina	88
C2-Carnitina	84
C3-Carnitina	81
C4-Carnitina	83
C5-Carnitina	88
C5DC-Carnitina	82
C6-Carnitina	86
C8-Carnitina	94
C10-Carnitina	87
C12-Carnitina	97
C14-Carnitina	88
C16-Carnitina	89
C18-Carnitina	92

Linearidade e limite de quantificação:

O limite de quantificação e a linearidade foram determinados por diluição de um eluato de amostras de sangue preparada com padrão interno. O método é considerado linear a partir do limite de quantificação até o limite máximo.

Aminoácidos:

Analito	Limite de quantificação aproximado (µmol/L) *	Limite máximo de linearidade (µmol/L)
Alanina	15,6	2000
Arginina	2	2000
Ácido Aspártico	15,6	2000
Citrulina	2	2000
Ácido Glutâmico	15,6	2000
Glicina	15,6	2000
Leucina	15,6	2000
Metionina	2	2000
Ornitina	2	2000
Fenilalanina	2	2000
Prolina*	4,8	2400
Tirosina	15,6	2000
Valina	15,6	2000

*A determinação deste analito foi realizada no AB Sciex API 4000™

** O limite de quantificação depende do sistema LC-MS/MS usado.

Acilcarnitinas e Carnitina livre:

Analito	Limite de quantificação aproximado (µmol/L)*	Limite máximo de linearidade (µmol/L)
C0-Carnitina	1,6	200
C2-Carnitina	1,6	200
C3-Carnitina	0,2	50
C4-Carnitina	0,2	25
C5-Carnitina	0,2	25
C5DC-Carnitina	0,2	25
C6-Carnitina	0,2	12,5
C8-Carnitina	0,2	25
C10-Carnitina	0,2	16,7
C12-Carnitina	0,2	16,7
C14-Carnitina	0,1	16,7
C16-Carnitina	0,1	33,3
C18-Carnitina	0,1	33,3

*O limite de quantificação depende do sistema LC-MS/MS usado.

Precisão intra-ensaio:

A determinação da precisão intra-ensaio foi realizada em três diferentes concentrações, a partir da média e coeficiente de variação de múltiplas análises (n=10) de uma mesma amostra.

Aminoácidos:

Analito	Coeficiente de variação (%), n=10 (concentração em µmol/L)	
Alanina	3,4 (495)	5,2 (806)
Arginina	4,9 (44)	5,6 (204)
Ácido Aspártico	8,1 (85)	5,5 (241)
Citrulina	5,8 (61)	4,1 (232)
Ácido Glutâmico	4,9 (439)	5,6 (761)
Glicina	3,4 (411)	6,6 (1120)
Leucina	3,7 (246)	5,4 (511)
Metionina	7,1 (55)	7,0 (201)
Ornitina	6,4 (214)	4,6 (445)
Fenilalanina	4,3 (120)	4,6 (464)
Prolina*	4,9 (418)	4,5 (615)
Tirosina	8,6 (178)	6,4 (500)
Valina	6,9 (293)	6,8 (515)

*A determinação deste analito foi realizada no AB Sciex API 4000™

Acilcarnitinas e Carnitina livre:

Analito	Coeficiente de variação (%), n=10 (concentração em µmol/L)	
C0-Carnitina	6,8 (53,5)	5,9 (110)
C2-Carnitina	5,2 (29,0)	6,3 (65,7)
C3-Carnitina	10,4 (5,57)	8,6 (12,3)
C4-Carnitina	14,8 (1,01)	10,9 (3,77)
C5-Carnitina	12,8 (0,66)	15,0 (2,36)
C5DC-Carnitina	13,1 (0,57)	14,7 (2,14)
C6-Carnitina	13,8 (0,46)	6,3 (1,75)
C8-Carnitina	15,6 (0,51)	6,5 (1,87)
C10-Carnitina	14,8 (0,62)	10,4 (2,00)
C12-Carnitina	13,0 (0,58)	10,4 (2,26)
C14-Carnitina	13,2 (0,54)	11,0 (2,14)
C16-Carnitina	4,8 (4,75)	5,5 (10,9)
C18-Carnitina	9,4 (2,52)	11,8 (7,44)

Precisão inter-ensaio:

A determinação da precisão inter-ensaio foi realizada em três diferentes concentrações, a partir da média e coeficiente de variação de múltiplas análises (n=10) de uma mesma amostra, em 10 diferentes séries de testes.

Aminoácidos:

Analito	Coeficiente de variação (%), n=100 (concentração em µmol/L)	
Alanina	6,5 (493)	6,9 (820)
Arginina	9,4 (41)	8,8 (201)
Ácido Aspártico	9,9 (80)	8,8 (233)
Citrulina	7,9 (58)	7,5 (233)
Ácido Glutâmico	7,9 (423)	8,2 (750)
Glicina	7,1 (404)	7,5 (1126)
Leucina	7,0 (239)	6,8 (513)
Metionina	9,6 (54)	9,0 (204)
Ornitina	8,9 (208)	8,4 (449)
Fenilalanina	7,7 (117)	7,3 (466)
Prolina*	10,4 (446)	11,0 (685)
Tirosina	8,4 (171)	7,5 (494)
Valina	9,3 (278)	8,1 (526)

*A determinação deste analito foi realizada no AB Sciex API 4000™

Acilcarnitinas e Carnitina livre:

Analito	Coeficiente de variação (%), n=10 (concentração em µmol/L)	
C0-Carnitina	8,8 (53,9)	9,6 (112)
C2-Carnitina	7,8 (27,6)	7,2 (64,7)
C3-Carnitina	9,8 (5,41)	10,7 (12,5)
C4-Carnitina	14,0 (0,97)	11,9 (3,71)
C5-Carnitina	18,0 (0,60)	13,6 (2,31)
C5DC-Carnitina	20,3 (0,57)	15,5 (2,19)

C6-Carnitina	16,1 (0,45)	10,8 (1,82)
C8-Carnitina	15,7 (0,49)	12,3 (1,89)
C10-Carnitina	15,1 (0,59)	10,8 (2,13)
C12-Carnitina	14,6 (0,61)	12,0 (2,26)
C14-Carnitina	13,5 (0,54)	11,9 (2,11)
C16-Carnitina	8,9 (4,42)	10,0 (10,5)
C18-Carnitina	11,3 (2,34)	12,0 (7,36)

VALORES DE REFERÊNCIA

Esses valores de referência são apenas para orientação e podem variar dependendo do grupo de pacientes e do sistema MS/MS utilizado. Os laboratórios devem determinar os seus próprios valores de referência.

Aminoácidos:

Analito	Cut off (µmol/L) [a]	Cut off (µmol/L) [b]
Alanina	743	561
Arginina	35	47
Ácido Aspártico	270	147
Citrulina	33	34
Ácido Glutâmico	710	800
Glicina	717	834
Leucina	270	226
Metionina	22	45
Ornitina	350	258
Fenilalanina	92	92
Prolina	-	441
Tirosina	225	197
Valina	198	191
Succinilacetona	-	1,16

Acilcarnitinas e Carnitina livre:

Analito	Cut off (µmol/L) [a]	Cut off (µmol/L) [b]
C0-Carnitina	60,3	49,8
C0, baixo cut off	5,2	8,0
C2-Carnitina	47,8	57,3
C3-Carnitina	4,72	4,88
C4-Carnitina	0,81	0,62
C5-Carnitina	0,45	0,46
C5DC-Carnitina	0,34	0,22
C6-Carnitina	0,16	0,13
C8-Carnitina	0,19	0,11
C10-Carnitina	0,26	0,21
C12-Carnitina	0,41	0,56
C14-Carnitina	0,43	0,38
C16-Carnitina	5,06	5,81
C18-Carnitina	2,59	1,58

[a] Os valores de referência dados como percentil 99.5% foram determinados em um estudo piloto com aproximadamente 1500 bebês recém-nascidos realizado no centro de triagem do Hospital Universitário de Leipzig usando o kit de reagentes 55000.

[b] Os valores de referência dados como percentil 99.5% foram determinados em um estudo piloto com aproximadamente 2500 bebês recém-nascidos realizado na Universidade Médica de Viena, Departamento de Pediatria e Medicina Adolescente usando o kit de reagentes 55000.

LITERATURA

1. Richtlinie des Gemeinsamen Bundesausschusses über die Früherkennung von Krankheiten bei Kindern (Kinder-Richtlinie) in der Fassung vom 18. Juni 2015, zuletzt geändert am 19. Oktober 2017. *BAnz AT 15.03.2018 B2*.
2. Roscher AA, Olgemöller B. (2004) Newborn screening for inborn errors of metabolism with tandem spectrometry in Bavaria, Germany. *LaboratoriumsMedizin* 28 (6): 521-4.
3. Cavedon CT, Bourdoux P, Mertens K, Thi HVV, Herreman N, de Laet C, Goyens P. (2005) Age-related variations in acylcarnitine and free carnitine concentrations measured by tandem mass spectrometry. *Clin Chem* 52(4): 745-52.
4. Chace DH, Adam BW, Smith SJ, Alexander JR, Hillman SL, Hannon WH. (1999) Validation of accuracy-based amino acid reference materials in dried-blood spots by tandem mass

- spectrometry for newborn screening assays. *Clin Chem* 45(8): 1269-77.
5. Zytkovicz TH, Fitzgerald EF, Marsden D, Larson CA, Shih VE, Johnson DM, Strauss AW, Comeau AM, Eaton RB, Grady GF. (2001) Tandem mass spectrometric analysis for amino, organic, and fatty acid disorders in newborn dried blood spots: A two-year summary from the New England Newborn Screening Program. *Clin Chem* 47(11): 1945-55.
 6. Schulze A, Lindner M, Kohlmüller D, Olgemöller K, Mayatepek E, Hoffmann GF. (2003) Expanded newborn screening for inborn errors of metabolism by electrospray ionization-tandem mass spectrometry: results, outcome, and implications. *Pediatrics* 111(6): 1399-1406.
 7. Ceglarek U, Stopsack M, Stach B, Müller P, Hübner A, Brügel M, Böhndel P, Kies W, Gahr M, Thiery J. (2003) Ergebnisse des sächsischen Neugeborenen-Screening 2001. *Arzteb Sachsen* 1: 12-15.
 8. Sander J, N. Janzen N. (2000) Fettsäureoxidationsstörungen. Frühdiagnose durch Tandem-Massenspektrometrie. *Pädiatrie hautnah* 12(4): 161-7.
 9. Gempel K, Bauer MF, Gerbitz KD. (1999) Mitochondriale Erkrankungen. *Dtsch Arztebl* 96(47): A3035-42.
 10. Knerr I, Nennstiel-Ratzel U, Röschinger W, Maier EM, Baumkötter J, von Kries R. (2005) Medium-Chain-Acyl-CoA-Dehydrogenase-Mangel: eine klinisch bedeutsame Stoffwechselstörung. *Dtsch Arztebl* 102(28): A2565-9.
 11. Chace DH, Kalas TA, Naylor EW. (2003) Use of tandem mass spectrometry for multianalyte screening of dried blood specimens from newborns. *Clin Chem* 49(11): 1797-817.
 12. Scott CR. (2006) The genetic tyrosinemias. *AM J Med Genet C Semin Med Genet* 142C(2): 121-6.
 13. Mitsubuchi H, Nakamura K, Matsumoto S, ENdo F. (2008) Inborn errors of proline metabolism. *J Nutr* 138(10): 2016S-20S.
 14. Clinical Laboratory Standards Institute. NBS01-A6, July 2013, Blood Collection on Filter Paper for Newborn Screening Programs.
 15. CDC. Newborn Screening Quality Assurance Program, Annual Summary Report 2015, volume 33b.
 16. Hall EM, Flores SR, De Jesús VR (2015) Influence of Hematocrit and Total-Spot Volume on Performance Characteristics of Dried Blood Spots for Newborn Screening. *Int J Neonatal Screen* 1(2):69-78. doi:10.3390/ijns1020069.

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 10350840263

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

www.biosys.com.br

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