

NEUGEBORENEN-SCREENING
NEWBORN SCREENING
DEPISTAGE DES NOUVEAUX-NES
SCREENING NEONATALE
ANÁLISIS DE CONTROL PARA NEONATOS



Manual de Instrução para Análise por LC-MS/MS de
**MassChrom® Aminoácidos e
Acilcarnitinas em Sangue Seco em Papel Filtro
(não derivatizado)**
com Placa de 96 Poços

somente para diagnóstico *in vitro*
Artigo No. 57000

CE 0123 IVD

**MASSCHROM® AMINO ACIDS AND ACYLCARNITINES FROM DRIED
BLOOD (NON DERIVATISED) – LC-MS/MS**
ANVISA 10350840260

A Chromsystems Instruments & Chemicals GmbH está certificada de acordo com a norma ISO 13485 (incluindo MDSAP). Os produtos são produzidos e distribuídos em conformidade com a Diretiva 98/79/CE sobre produtos sanitários para diagnóstico *in vitro*.

Você pode baixar a Declaração de Conformidade conforme a Diretiva 98/79/CE no centro de downloads do nosso site

© Este documento é protegido pelos direitos autorais. Todos os direitos reservados.

Regularizado por: BioSys Ltda.

Rua Coronel Gomes Machado, 358, Centro, Niterói, RJ
CEP: 24020-112
CNPJ: 02.220.795/0001-79

Fone: (21) 3907 2534
sac@biosys.com.br
www.biosys.com.br

Fabricante: Chromsystems Instruments & Chemicals GmbH
Am Haag 12
82166 Gräfelfing
Alemanha

Fone: +49 89 18930-0
Fax: +49 89 18930-199
www.chromsystems.com

Conteúdo.....**Página**

1	Informações sobre pedidos.....	3
2	Introdução	4
	2.1 Informações de base.....	4
	2.2 Uso pretendido.....	5
	2.3 Princípio do kit de reagentes	5
3	Sistema LC-MS/MS	6
	3.1 Parâmetros do equipamento	6
	3.2 Operação MS/MS.....	8
	3.3 Otimização dos MRMs (tuning).....	8
	3.4 Procedimento inicial	8
	3.5 Desligamento o equipamento (Shut down).....	9
4	Transições de massa dos analitos e padrões internos	9
5	Preparo da mostra.....	12
	5.1 Coleta e armazenamento de amostras de pacientes	12
	5.2 Reconstituição do Padrão Interno	13
	5.3 Manuseio dos reagentes do Conjunto de Upgrade de Succinilacetona.....	13
	5.4 Manuseio dos controles.....	14
	5.5 Procedimento de preparação da amostra.....	14
	5.5.1 ...Preparo da amostra sem succinilacetona.....	15
	5.5.2 ...Preparo da amostra com succinilacetona	15
	5.6 Estabilidade das amostras.....	16
	5.6.1 ...Amostras preparadas sem succinilacetona.....	16
	5.6.2 ...Amostras preparadas com succinilacetona	16
6	Materiais requeridos, mas não fornecidos	17
7	Resultados e avaliação.....	17
8	Qualidade Controle.....	18
9	Valores de referência / cut-off.....	19
10	Fatores de Conversão	21
11	Armazenamento dos reagentes	22
12	Descarte	22
13	Interferentes conhecidos.....	23
14	Problemas e soluções	25
15	Literatura	26
	Apêndice I: Informações de risco	28
	Apêndice II: Princípios do cálculo	30
	Apêndice III: Informações de Performance.....	31
	Apêndice IV: Símbolos.....	42

1 Informações para requisição

Nº da ordem	Produto																					
57000	<p><i>MassChrom® Kit de reagentes para análise por LC-MS/MS de Aminoácidos e Acilcarnitinas em sangue seco para triagem neonatal / não derivatizado</i></p> <p>Conteúdo para 960 análises com placa padrão de 96 poços:</p> <table> <tbody> <tr> <td>Fase móvel</td><td>2 x 1000 mL</td></tr> <tr> <td>Padrão interno, liofilizado</td><td>4 x 25 mL</td></tr> <tr> <td>Solução de limpeza</td><td>1 x 1000 mL</td></tr> <tr> <td>Solução tampão de extração</td><td>1 x 100 mL</td></tr> <tr> <td>Placa de 96 poços</td><td>6 x 5 peças</td></tr> <tr> <td>Folha de proteção para placa de 96 poços</td><td>2 x 10 peças</td></tr> <tr> <td>Vedações térmicas perfuráveis para placas de 96 poços</td><td>2 x 6 peças</td></tr> <tr> <td><i>MassCheck® Controle de Aminoácidos, Acilcarnitinas em Sangue Seco</i></td><td></td></tr> <tr> <td>Nível 1</td><td>1 x 3 spots</td></tr> <tr> <td>Nível 2</td><td>1 x 3 spots</td></tr> </tbody> </table>	Fase móvel	2 x 1000 mL	Padrão interno, liofilizado	4 x 25 mL	Solução de limpeza	1 x 1000 mL	Solução tampão de extração	1 x 100 mL	Placa de 96 poços	6 x 5 peças	Folha de proteção para placa de 96 poços	2 x 10 peças	Vedações térmicas perfuráveis para placas de 96 poços	2 x 6 peças	<i>MassCheck® Controle de Aminoácidos, Acilcarnitinas em Sangue Seco</i>		Nível 1	1 x 3 spots	Nível 2	1 x 3 spots	
Fase móvel	2 x 1000 mL																					
Padrão interno, liofilizado	4 x 25 mL																					
Solução de limpeza	1 x 1000 mL																					
Solução tampão de extração	1 x 100 mL																					
Placa de 96 poços	6 x 5 peças																					
Folha de proteção para placa de 96 poços	2 x 10 peças																					
Vedações térmicas perfuráveis para placas de 96 poços	2 x 6 peças																					
<i>MassCheck® Controle de Aminoácidos, Acilcarnitinas em Sangue Seco</i>																						
Nível 1	1 x 3 spots																					
Nível 2	1 x 3 spots																					
57111	<p>Succinilacetona (não derivatizado) Upgrade Set</p> <p>Conteúdo para 960 análises com 96 Placas de Poço, composto por:</p> <table> <tbody> <tr> <td>Padrão interno, Succinilacetona (não derivatizado)</td><td>4 x 18 mL</td></tr> <tr> <td>Tampão de extração, Succinilacetona (não derivatizado)</td><td>4 x 18 mL</td></tr> <tr> <td>Folhas de proteção para placas de 96 poços</td><td>2 x 10 peças.</td></tr> <tr> <td>Vedações térmicas perfuráveis para placas de 96 poços</td><td>1 x 6 peças.</td></tr> </tbody> </table>	Padrão interno, Succinilacetona (não derivatizado)	4 x 18 mL	Tampão de extração, Succinilacetona (não derivatizado)	4 x 18 mL	Folhas de proteção para placas de 96 poços	2 x 10 peças.	Vedações térmicas perfuráveis para placas de 96 poços	1 x 6 peças.													
Padrão interno, Succinilacetona (não derivatizado)	4 x 18 mL																					
Tampão de extração, Succinilacetona (não derivatizado)	4 x 18 mL																					
Folhas de proteção para placas de 96 poços	2 x 10 peças.																					
Vedações térmicas perfuráveis para placas de 96 poços	1 x 6 peças.																					
	<p>Componentes disponíveis separadamente:</p> <table> <tbody> <tr> <td>Fase móvel</td><td>1000 mL</td></tr> <tr> <td>Fase móvel</td><td>10 x 1000 mL</td></tr> <tr> <td>Padrão interno, liofilizado</td><td>4 x 25 mL</td></tr> <tr> <td>Padrão interno, Succinilacetona (não derivatizado)</td><td>4 x 18 mL</td></tr> <tr> <td>Solução de limpeza</td><td>1000 mL</td></tr> <tr> <td>Tampão de extração</td><td>100 mL</td></tr> <tr> <td>Tampão de extração, Succinilacetona (não derivatizado)</td><td>4 x 18 mL</td></tr> <tr> <td>Placa de 96 poços</td><td>5 peças</td></tr> <tr> <td>Folha de proteção para placa de 96 poços</td><td>10 peças</td></tr> <tr> <td>Vedações térmicas perfuráveis para placas de 96 poços</td><td>6 peças</td></tr> </tbody> </table>	Fase móvel	1000 mL	Fase móvel	10 x 1000 mL	Padrão interno, liofilizado	4 x 25 mL	Padrão interno, Succinilacetona (não derivatizado)	4 x 18 mL	Solução de limpeza	1000 mL	Tampão de extração	100 mL	Tampão de extração, Succinilacetona (não derivatizado)	4 x 18 mL	Placa de 96 poços	5 peças	Folha de proteção para placa de 96 poços	10 peças	Vedações térmicas perfuráveis para placas de 96 poços	6 peças	
Fase móvel	1000 mL																					
Fase móvel	10 x 1000 mL																					
Padrão interno, liofilizado	4 x 25 mL																					
Padrão interno, Succinilacetona (não derivatizado)	4 x 18 mL																					
Solução de limpeza	1000 mL																					
Tampão de extração	100 mL																					
Tampão de extração, Succinilacetona (não derivatizado)	4 x 18 mL																					
Placa de 96 poços	5 peças																					
Folha de proteção para placa de 96 poços	10 peças																					
Vedações térmicas perfuráveis para placas de 96 poços	6 peças																					
	<p>Acessórios</p> <table> <tbody> <tr> <td>Vedações adesivas de corte transversal para placas de 96 poços</td><td>10 peças</td></tr> <tr> <td>Capilar de restrição</td><td>1 peça</td></tr> <tr> <td>Tuning Mix, Succinilacetona (não derivatizado), Analito e Padão Interno</td><td>1 mL</td></tr> <tr> <td>Tuning Mix, Analitos e Padrões Internos</td><td>2 mL</td></tr> <tr> <td>Pré-filtro em PEEK, 2µm</td><td>5 peças</td></tr> <tr> <td>Suporte para pré-filtro em PEEK</td><td>1 peça</td></tr> <tr> <td>Seladora de Calor para 96 placas de poço (inserção adequada incluída)</td><td>1 peça</td></tr> </tbody> </table>	Vedações adesivas de corte transversal para placas de 96 poços	10 peças	Capilar de restrição	1 peça	Tuning Mix, Succinilacetona (não derivatizado), Analito e Padão Interno	1 mL	Tuning Mix, Analitos e Padrões Internos	2 mL	Pré-filtro em PEEK, 2µm	5 peças	Suporte para pré-filtro em PEEK	1 peça	Seladora de Calor para 96 placas de poço (inserção adequada incluída)	1 peça							
Vedações adesivas de corte transversal para placas de 96 poços	10 peças																					
Capilar de restrição	1 peça																					
Tuning Mix, Succinilacetona (não derivatizado), Analito e Padão Interno	1 mL																					
Tuning Mix, Analitos e Padrões Internos	2 mL																					
Pré-filtro em PEEK, 2µm	5 peças																					
Suporte para pré-filtro em PEEK	1 peça																					
Seladora de Calor para 96 placas de poço (inserção adequada incluída)	1 peça																					
	<p>Chromsystems MassCheck® Controles</p> <table> <tbody> <tr> <td>0191</td><td><i>MassCheck® Controle bi-nível (I + II) de aminoácidos e acilcarnitinas, spot</i></td><td>2 x 3 spots</td></tr> <tr> <td>0192</td><td><i>MassCheck® Controle nível I de aminoácidos e acilcarnitinas, spot</i></td><td>1 x 3 spots</td></tr> <tr> <td>0193</td><td><i>MassCheck® Controle nível II de aminoácidos e acilcarnitinas, spot</i></td><td>1 x 3 spots</td></tr> </tbody> </table>	0191	<i>MassCheck® Controle bi-nível (I + II) de aminoácidos e acilcarnitinas, spot</i>	2 x 3 spots	0192	<i>MassCheck® Controle nível I de aminoácidos e acilcarnitinas, spot</i>	1 x 3 spots	0193	<i>MassCheck® Controle nível II de aminoácidos e acilcarnitinas, spot</i>	1 x 3 spots												
0191	<i>MassCheck® Controle bi-nível (I + II) de aminoácidos e acilcarnitinas, spot</i>	2 x 3 spots																				
0192	<i>MassCheck® Controle nível I de aminoácidos e acilcarnitinas, spot</i>	1 x 3 spots																				
0193	<i>MassCheck® Controle nível II de aminoácidos e acilcarnitinas, spot</i>	1 x 3 spots																				

2 Introdução

2.1 Informação básica

O objetivo da triagem neonatal é o diagnóstico oportuno de doenças metabólicas hereditárias que não podem ser reconhecidas por sinais externos. A triagem torna possível o tratamento precoce das doenças e previne danos consequentes o mais rápido possível.

As doenças são causadas por deficiências enzimáticas hereditárias, levando ao decréscimo ou supressão da atividade enzimática. Desta maneira, os substratos não transformados acumulam-se no organismo. Dependendo do grau da doença o produto estará presente em níveis limitados ou completamente ausente no organismo. Isto leva ao acúmulo de metabólitos potencialmente tóxicos, causando defeitos em órgãos e doenças multissistêmicas (amino e organoacidopatias). Não diagnosticados, estes distúrbios metabólicos causam lesões severas e irreversíveis à criança, mesmo em poucos dias. No caso da fenilcetonúria, ocorre retardo físico e mental da criança afetada. A tirosinemia tipo 1 leva ao acúmulo de metabólitos tóxicos (especialmente succinilacetona) resultando em doenças severas do fígado durante a primeira infância.

Como são defeitos congênitos, essas doenças são incuráveis, e o tratamento se limita a aliviar os sintomas. Crianças com fenilcetonúria, por exemplo, podem levar uma vida normal seguindo uma dieta sem fenilalanina, desde que a doença seja detectada precocemente nos primeiros dias de vida. A incidência dos distúrbios metabólicos estudados varia entre 1:10.000 (fenilcetonúria) e 1:200.000 (doença da urina de xarope de bordo, MSUD); em média, aproximadamente um em cada 1.000 recém-nascidos sofre de alguma dessas doenças [1]. Para isso, coleta-se sangue do calcanhar, fazendo-o pingar em papel filtro para secar, e depois é analisado em laboratório.

Na Alemanha, o exame de 13 doenças alvo é prescrito pela lei de acordo com o Kinder-Richtlinie (versão datada de 18 de junho de 2015, última revisão entrou em vigor em 25 de março de 2020). Nove delas devem ser determinadas por espectrometria de massa em tandem, incluindo desordens do metabolismo de aminoácidos como fenilcetonúria (PKU) e doença da urina do xarope de bordo (MSUD), desordens do metabolismo de ácidos graxos (deficiência de MCAD, deficiência de LCHAD, deficiência de VLCAD), assim como as acidemias orgânicas como a isovalérica (IVA). A triagem para tirosinemia tipo 1 foi incluída na última revisão da diretriz.

Com a tecnologia da espectrometria de massa em tandem (LC-MS/MS) é possível triar um amplo espectro de doenças metabólicas em uma única corrida analítica. Esse método permite a detecção simultânea e confiável de várias moléculas alvo, assim como a determinação de suas respectivas concentrações. Devido a sua alta seletividade, esta técnica dispensa o uso de uma coluna de HPLC, permitindo corridas analíticas muito curtas (< 2 min.). Para evitar a interferência de efeitos de supressão iônica e permitir a quantificação precisa dos analitos, o uso de padrões marcados isotopicamente é essencial.

Dependendo do tipo de papel de filtro utilizado e do hematócrito da amostra, o volume de sangue no picote do disco de sangue seco varia [16]. Isto permite apenas uma determinação semi-quantitativa dos analitos, e este método de triagem não deve ser utilizado como método laboratorial para diagnóstico. A triagem neonatal por LC-MS/MS deve estar sempre apoiada por diagnósticos confirmatórios baseados em genética molecular, métodos enzimáticos ou cromatografia.

2.2 Finalidade pretendida

O kit de reagente da Chromsystems *MassChrom® Amino Acids and Acylcarnitines from dried blood* (não derivatizado) é uma ferramenta de diagnóstico *in vitro* para ser utilizada em laboratórios clínicos para a detecção semi-quantitativa dos seguintes metabólitos:

Aminoácidos e metabólitos da tirosina

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), valina (Val), succinilacetona (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).

As amostras de sangue do calcnar de recém-nascidos secas em papel filtro são analisadas por cromatografia líquida acoplada a espectrômetro de massas (LC-MS/MS). O teste é indicado como uma metodologia de triagem para a detecção precoce de desordens de amino ácidos e metabolismos de ácidos graxos.

Um método de diagnóstico deve ser usado para confirmação da presunção de perfis anormais de aminoácidos, succinilacetona e metabolismo de ácidos graxos.

2.3 Princípio do kit de reagentes

Este kit de reagentes Chromsystems foi desenvolvido para a determinação semi-quantitativa, simples e rápida, de aminoácidos, acilcarnitinas e succinilacetona em spots de sangue seco para triagem neonatal de distúrbios do metabolismo dos ácidos graxos e aminoácidos pela espectrometria de massa em tandem.

O preparo da amostra é baseado numa extração eficiente dos analitos do papel de filtro sem uma etapa adicional de butilação. Para garantir uma quantificação reproduzível dos analitos, este método utilizado padrão interno estável e marcado isotopicamente (deuterado) para a calibração e quantificação.

Para a quantificação de succinilacetona, o spot de sangue é extraído uma segunda vez usando o padrão interno para succinilacetona (material requerido separadamente) usando um reagente especial. Ele contém um agente que forma a hidrazona de succinilacetona, assim tornando possível a extração da succinilacetona do sangue seco. Um padrão interno isotopicamente marcado também é usado para quantificação de succinilacetona. Após a extração da succinilacetona, ambos os sobrenadantes são combinados, todos os analitos são medidos em uma corrida analítica.

Este kit é uma ferramenta médica de diagnóstico *in vitro* (IVD).

Este kit é um **método de triagem**, os resultados podem variar dependendo do sistema MS/MS usado e devem ser analisados em relação a outros dados laboratoriais. A interpretação clínica dos resultados obtidos com este kit deve ser feita apenas por profissional médico capacitado e habilitado ou um especialista em metabolismo. Não existem estudos clínicos sistemáticos sobre a frequência de resultados falso-positivos ou falso-negativos.

3 Sistema LC-MS/MS

Atenção:

No manuseio dos reagentes, observe atentamente as informações sobre as substâncias perigosas mencionadas no Anexo I.

3.1 Parâmetros do equipamento

A análise de aminoácidos (incluindo SUAC), acilcarnitinas e de carnitina livre requer um sistema com bomba HPLC, injetor e espectrômetro de massa tandem com sensibilidade adequada e software de avaliação especial. Para evitar alterações na composição da fase móvel esta deve ser mantida tampada mesmo durante a operação. Nenhuma coluna de HPLC ou forno de coluna é necessária. Para a conexão do sistema HPLC ao sistema MS/MS deve ser utilizado um capilar restritor (artigo 55015) com pré-filtro PEEK (artigo 55033 e 15010).

Ajustes do instrumento:

Volume de injeção:	10 µL
Tempo de corrida:	1,7 min
Gradiente de fluxo:	20 a 600 µL/min
Solução de lavagem da agulha do injetor:	Solução de lavagem

Perfil do Gradiente:

A robustez do perfil de gradiente depende fortemente da otimização do fluxo de gradiente relacionado as configurações do instrumento usado.

Devido aos diferentes volumes mortos dos sistemas de HPLC individuais e dos comprimentos dos capilares de restrição, o perfil do gradiente deve ser otimizado para se obter um cromatograma como mostrado na figura 1. O perfil de gradiente mostrado é apresentado como uma base para a otimização do sistema. Um perfil de gradiente não otimizado pode apresentar um cromatograma como mostrado na figura 2. Neste caso, é extremamente recomendado repetir o procedimento de otimização e ajustar o gradiente de fluxo até que um cromatograma como o mostrado na figura 1 seja obtido.

A janela do tempo de varredura (*scan time window*) do sistema *tandem* MS deve ser ajustada para o período no qual a intensidade do sinal alcança o nível máximo, por exemplo, avaliado no SCIEX API 4000TM acoplado ao HPLC Shimadzu em aproximadamente 0,32 a 1,51 min.

Tabela 1: Perfil de Gradiente

Tempo	0 min	0,32 min	0,33 min	1,50 min	1,51 min	1,70 min	1,71 min
Fluxo	200 µL/min	200 µL/min	20 µL/min	20 µL/min	600 µL/min	600 µL/min	200 µL/min

Caso o sistema HPLC seja incapaz de manter um fluxo constante de 20 µL/min, o método pode ser realizado com um fluxo constante de 100 µL/min. Observe, entretanto, que o método de fluxo constante causa redução sensibilidade.

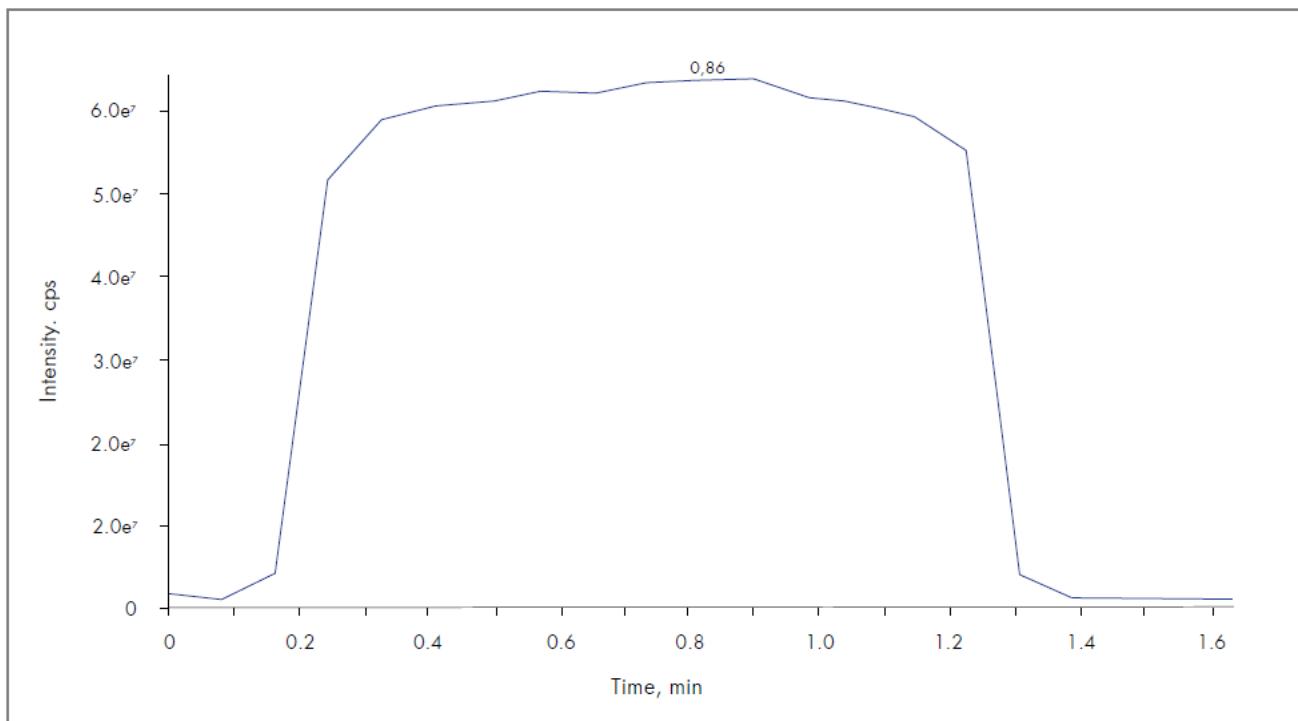


Figura 1: Cromatograma utilizando um gradiente de fluxo otimizado

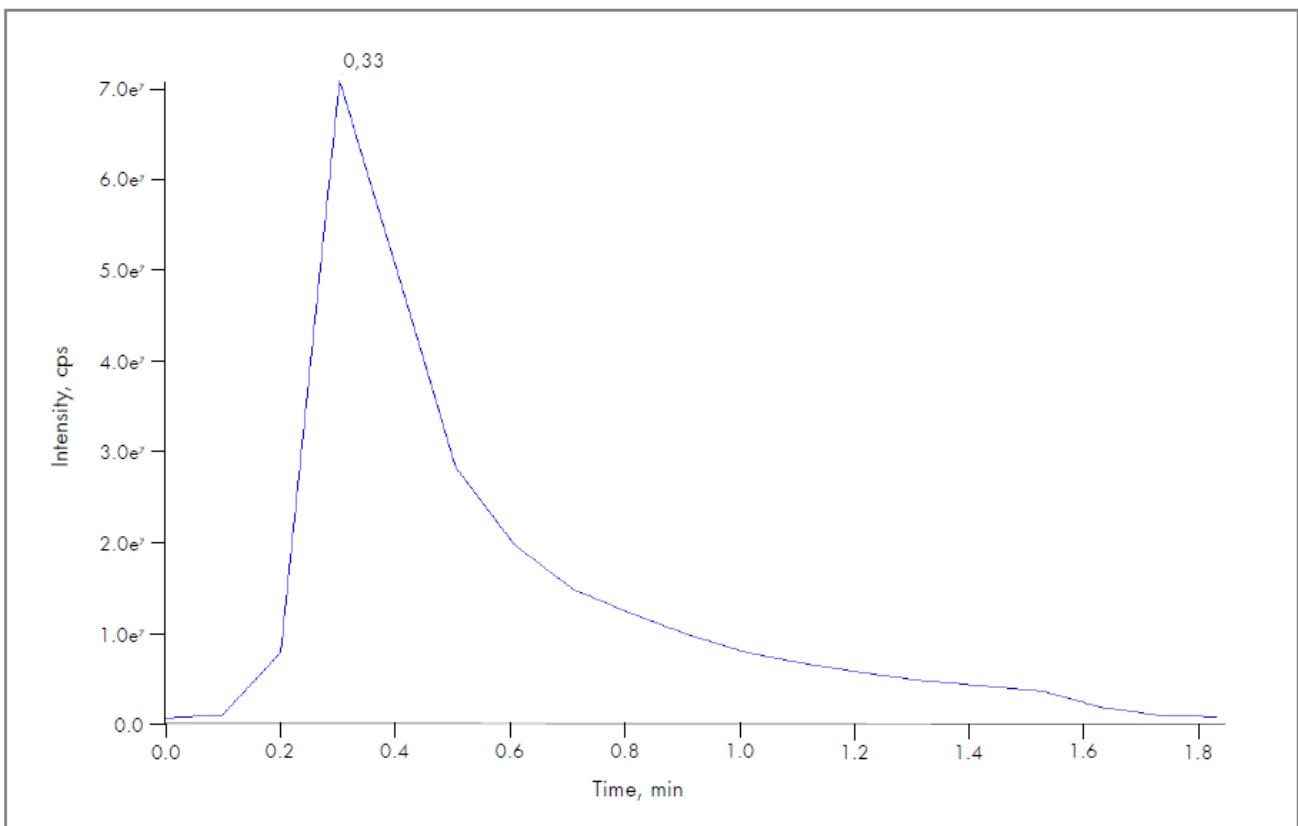


Figura 2: Cromatograma resultante de um gradiente de fluxo NÃO otimizado

Nota:

Somente use um gradiente de fluxo otimizado. O uso de um gradiente de fluxo não otimizado irá deteriorar a eficiência do kit de reagentes.

3.2 Operação do MS/MS

Princípios de operação:

Espectrômetros de massa medem as moléculas de acordo com sua relação massa e carga (m/z). Os analitos primeiro devem ser ionizados e transferidos para a fase gasosa. A ionização por eletronebulização ou *electrospray* (ESI) tem demonstrado ser um método altamente versátil e com ionização amigável para este propósito.

O método MS triplo quadripolo em tandem usa uma variedade de modos de medição. O único utilizado no ensaio apresentado aqui é o monitoramento de reações múltiplas.

Monitoramento de Reações Múltiplas (MRM):

No modo MRM, tanto o primeiro quanto o segundo filtro de massas são configurados estaticamente para uma relação massa-carga (m/z) particular. No MS 1, o íon molecular do analito é selecionado. Íons com uma taxa m/z diferente não são mostradas. O íon molecular passa por fragmentação na célula de colisão e o MS 2 detecta o íon fragmentado característico. O modo MRM permite a quantificação excepcionalmente sensível e seletiva.

3.3 Otimizando os MRMs (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. Após isso, as transições MRM dos analitos devem ser configuradas como abaixo:

1. Dilua o Tuning Mix (artigo 57099, 57098) separadamente com Fase Móvel (artigo 57001) 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. Optimize os parâmetros individuais para cada transição MRM (ex. energia de colisão)
6. Use as transições MRM otimizadas para optimizar a fonte de íon, especialmente a voltagem do capilar, a temperatura, e os fluxos de gases.

Para uma correta afinação/calibração do equipamento, é necessário ler atentamente as instruções de uso do sistema LC-MS/MS. Em caso de dúvida, consulte o fabricante do equipamento; se necessário, receba treinamento sobre o manuseio do equipamento por parte dele.

3.4 Procedimento inicial

Antes de iniciar uma análise prepare o sistema LC-MS/MS como descrito a seguir:

1. Equilibre o sistema durante cerca de 15 minutos utilizando as condições iniciais do método.
2. Nós recomendamos equilibrar o sistema realizando três injeções sem matriz (por exemplo, Fase Móvel, artigo 57001) seguidas de pelo menos três injeções do eluado do Controle de Sangue Seco Nível I (artigo 0192) até que as intensidades de sinal dos analitos e internos os padrões coincidem em injeções sucessivas.
3. A série de análises de todas as amostras preparadas pode agora ser iniciada.

Para o uso apropriado do seu sistema LC-MS/MS, leia o manual do equipamento. Em caso de quaisquer dúvidas, solicite ao fabricante do dispositivo. Um treinamento no uso do equipamento com seu fabricante pode ser requerido.

3.5 Desligando o equipamento (Shut down)

Para pausar a operação, desligue a bomba do HPLC e deixe a Fase Móvel no sistema de HPLC. É improvável que cristais de sal se acumulem nos selos do pistão das bombas de HPLC. Para proteger a fonte de ionização e a multiplicadora, o sistema MS/MS deverá ser colocado no modo de repouso (stand-by). Deixe as bombas de vácuo do sistema LC-MS/MS ligadas.

4 Transições de massa dos analitos e padrões internos

As tabelas que seguem mostram as transições de massa recomendadas e os métodos de medição para os analitos e padrões internos isotopicamente marcados. Meça os analitos e padrões internos no modo de ionização positivo (ESI).

Tabela 2: Transições recomendadas, aminoácidos e succinilacetona

Substância	Método de medição	Transição de massa
Alanina	MRM	90 > 44
Alanina-D4	MRM	94 > 48
Arginina	MRM	175 > 70
Arginina-D7	MRM	182 > 77
Ácido Aspártico	MRM	134 > 116
Ácido Aspártico-D3	MRM	137 > 119
Citrulina	MRM	176 > 113
Citrulina-D2	MRM	178 > 115
Ácido Glutâmico	MRM	148 > 130
Ácido Glutâmico-D5	MRM	153 > 135
Glicina	MRM	76 > 30

Glicina- ¹³ C ₂ - ¹⁵ N	MRM	79 > 32
Leucina	MRM	132 > 86
Leucina-D3	MRM	135 > 89
Metionina	MRM	150 > 133
Metionina-D3	MRM	153 > 136
Ornitina	MRM	133 > 70
Ornitina-D6	MRM	139 > 76
Fenilalanina	MRM	166 > 120
Fenilalanina-D5	MRM	171 > 125
Prolina	MRM	116 > 70
Prolina-D7	MRM	123 > 77
Succinilacetona	MRM	155 > 137
Succinilacetona-13C5	MRM	160 > 142
Tirosina	MRM	182 > 136
Tirosina-D4	MRM	186 > 140
Valina	MRM	118 > 72
Valina-D8	MRM	126 > 80

As massas indicadas devem ser consideradas como ponto de partida para a otimização. A posição exata das massas pode variar ligeiramente em cada sistema MS e deve ser determinada com precisão durante o ajuste do método (Tuning). Para instalar o método, recomendamos determinar a posição das massas com pelo menos uma casa decimal de precisão. Utilize para isso o Tuning Mix (nº de pedido 57098 e 57099 - ver capítulo 3.3: Otimização das transições MRM).

Tabela 3: Transições MRM recomendadas, acilcarnitinas e carnitina livre

Substância	Método de medição	Transição de massa
Carnitina	MRM	162 > 85
Carnitina-D9	MRM	171 > 85
C2-Carnitina	MRM	204 > 85
C2-Carnitina-D3	MRM	207 > 85
C3-Carnitina	MRM	218 > 85
C3-Carnitina-D3	MRM	221 > 85
C4-Carnitina	MRM	232 > 85
C4-Carnitina-D3	MRM	235 > 85
C5-Carnitina	MRM	246 > 85
C5-Carnitina-D9	MRM	255 > 85
C5DC-Carnitina	MRM	276 > 85
C5DC-Carnitina-D6	MRM	282 > 85
C6-Carnitina	MRM	260 > 85
C6-Carnitina-D3	MRM	263 > 85
C8-Carnitina	MRM	288 > 85
C8-Carnitina-D3	MRM	291 > 85
C10-Carnitina	MRM	316 > 85
C10-Carnitina-D3	MRM	319 > 85
C12-Carnitina	MRM	344 > 85
C12-Carnitina-D3	MRM	347 > 85
C14-Carnitina	MRM	372 > 85
C14-Carnitina-D3	MRM	375 > 85
C16-Carnitina	MRM	400 > 85
C16-Carnitina-D3	MRM	403 > 85
C18-Carnitina	MRM	428 > 85

A quantificação dos analitos é feita pela comparação da intensidade do sinal com o padrão interno isotopicamente marcado correspondente. Várias acilcarnitininas de interesse diagnóstico, para as quais os padrões internos isotopicamente marcados ainda não estão disponíveis, também podem ser medidas com este kit, através da comparação do sinal com padrões deuterados que apresentem o mesmo comprimento de cadeia. Acilcarnitininas com comprimento de cadeia igual mostram aproximadamente o mesmo fator de resposta. Entretanto, este kit é validado somente para aqueles analitos com padrões internos deuterados disponíveis, descritos na tabela acima.

A tabela seguinte mostra algumas acilcarnitininas 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.

Tabela 4: Transições MRM recomendadas, acilcarnitininas sem padrões explícitos

Substância	Transição de massa	Padrões internos recomendados
C3DC-Carnitina	248 > 85	C3-Carnitina-D3
C4OH-Carnitina	248 > 85	C4-Carnitina-D3
C4DC-Carnitina	262 > 85	C4-Carnitina-D3
C5:1-Carnitina	244 > 85	C5-Carnitina-D9
C5OH-Carnitina	262 > 85	C5-Carnitina-D9
C8:1-Carnitina	286 > 85	C8-Carnitina-D3
C10:2-Carnitina	312 > 85	C10-Carnitina-D3
C10:1-Carnitina	314 > 85	C10-Carnitina-D3
C12:1-Carnitina	342 > 85	C12-Carnitine-D3
C14:2-Carnitina	368 > 85	C14-Carnitina-D3
C14:1-Carnitina	370 > 85	C14-Carnitina-D3
C14OH-Carnitina	388 > 85	C14-Carnitina-D3
C16:2-Carnitina	396 > 85	C16-Carnitine-D3
C16:1-Carnitina	398 > 85	C16-Carnitina-D3
C16:1OH-Carnitina	414 > 85	C16-Carnitina-D3
C16OH-Carnitina	416 > 85	C16-Carnitina-D3
C18:2-Carnitina	424 > 85	C18-Carnitina-D3
C18:1-Carnitina	426 > 85	C18-Carnitina-D3
C18:2OH-Carnitina	440 > 85	C18-Carnitina-D3
C18:1OH-Carnitina	442 > 85	C18-Carnitina-D3
C18OH-Carnitina	444 > 85	C18-Carnitina-D3

Se você precisar de mais informações sobre a configuração do método no seu sistema LC-MS/MS, favor contatar o suporte da Chromsystems através do telefone +49 89 18930-111 ou por e-mail em support@chromsystems.com.

5 Preparo da amostra

Atenção:

Ao utilizar os reagentes, favor verificar as informações de segurança contidas no Apêndice I.

5.1 Coleta e armazenamento das amostras de pacientes

As recomendações para coletar e conservar as amostras dos pacientes variam conforme o país. É expressamente recomendado seguir as diretrizes nacionais correspondentes. Na Alemanha, por exemplo, a coleta de sangue para a triagem neonatal deve ser realizada entre 48 e 72 horas após o nascimento (conforme a diretriz alemã 'Kinder-Richtlinie'), enquanto o padrão CLSI NBS01-Ed7, 2021 [3] estabelece que a amostra deve ser preferencialmente coletada entre 24 e 48 horas após o parto.

O sangue total deve ser gotejado e seco em um cartão de papel filtro. Recomenda-se o uso de papel filtro aprovado pela FDA ou equivalente (por exemplo, Whatman 903).

A amostra de sangue deve ser coletada do calcanhar do recém-nascido. Não se pode usar sangue com EDTA ou heparina, pois isso pode levar a falsos negativos ou falsos positivos nos resultados do teste.

Descrição resumida das etapas da coleta:

1. Limpe a área do calcanhar do recém-nascido destinada à punção com antisséptico. Seque o calcanhar 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 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 temperatura de +20 a +25°C.
8. Envie as amostras secas em papel de filtro para o laboratório dentro de 24 horas.

Os fabricantes de cartões de papel filtro fornecem instruções detalhadas sobre a coleta de amostras, que também podem ser consultadas, por exemplo, na Diretriz Infantil alemã ou outras regulamentações nacionais vigentes.

Basta armazenar as amostras com baixa umidade (inferior a 30%) e em temperatura ambiente (entre +20 e +25°C) se a análise for realizada dentro de 24 a 48 horas. Recomenda-se baixa umidade e temperatura (abaixo de -18°C) se o armazenamento for superior a 48 horas [3]. **Evite temperaturas acima de 37°C!** Isso pode levar à redução da concentração de alguns aminoácidos.

Em estudos próprios, obteve-se estabilidade de todos os analitos por pelo menos 3 meses quando armazenados abaixo de -18°C, 6 semanas entre +2 e +8°C, e 10 dias entre +20 e 25°C utilizando sacos de alumínio herméticos e dessecante.

Nota:

É responsabilidade individual dos laboratórios usar todas as referências disponíveis e/ou seus próprios estudos para determinar critérios específicos de estabilidade.

5.2 Reconstituição do padrão interno

O padrão interno (artigo 57004) 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 preparo das amostras.

Antes do preparo de amostras, reconstitua o Padrão Interno (artigo 57004) com 25 mL de Tampão de Extração. Proceda como descrito:

1. Pipete 5 ml do Tampão de Extração (artigo 57008) no frasco original do Padrão Interno
2. Reconstitua por 5 min a +20 a +25 °C, mexa repetidamente
3. Transfira o conteúdo do frasco em um balão volumétrico de 25 ml
4. Lave (rinse) o frasco do Padrão Interno duas vezes com 5 ml do Tampão de Extração e transfira o líquido no balão volumétrico
5. Complete o balão volumétrico até 25 ml com o Tampão de Extração e homogeneíze

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

Estabilidade padrão interno reconstituído:

O padrão interno reconstituído no Tampão de Extração possui a seguinte estabilidade:

Tabela 5: Estabilidade do Padrão Interno após reconstituição

Temperatura de armazenamento +2 a +8 °C	Estabilidade 3 semanas	Outras condições de armazenamento Protegidos da luz, bem fechados
--	---------------------------	--

5.3 Manuseio dos reagentes do Conjunto de ampliação de Succinilacetona

O Tampão de Extração - Succinilacetona (artigo 57012) é armazenado abaixo de -18°C, resultando em segregação.

Assim, é necessário que o reagente seja aquecido completamente até a temperatura ambiente e então seja homogeneizado (vortex) antes do uso.

Estabilidade no Tampão de Extração após o primeiro descongelamento:

O reagente tem a seguinte estabilidade após o primeiro descongelamento:

Tabela 6: Estabilidade do Tampão de Extração - Succinilacetona após primeiro descongelamento

Temperatura de armazenamento +2 a +8 °C	Estabilidade 2 semanas	Outras condições de armazenamento Bem fechado
--	---------------------------	--

5.4 Manuseio dos controles

Os controles *MassCheck* em Spot de Sangue Seco (artigo no. 0192, 0193) destinam-se a monitorar a certeza e precisão de cada sequência analítica. Eles estão disponíveis em dois diferentes níveis de concentração. Os spots de sangue seco são baseados em sangue total humano. Eles são preparados da mesma maneira que uma amostra de paciente e são analisados dentro da rotina em condições análogas ao respectivo procedimento do teste.

Os papeis filtro são sensíveis a humidade e temperatura. Portanto, o pacote inclui um indicador de temperatura, pacotes dessecantes e um cartão de indicador de humidade. Verifique os Controles em Spot de Sangue Seco antes de cada uso da seguinte forma:

1. Verifique a condição do indicador de temperatura incluído: Os controles podem ser usados se todos os campos estiverem em branco. Se um campo escureceu, os papeis filtro devem ser descartados.
2. Deixe o Controle em Spot de Sangue Seco alcançar a temperatura ambiente (+20 a +25 °C), evitando luz solar direta.
3. Abra o pacote.
4. Imediatamente verifique a condição do indicador de umidade fechado. Se o indicador de umidade mudou de coloração de azul para rosa num nível de 30%, descarte o papel filtro.

Atenção:

- Quando picotar os controles, use somente a área dentro da linha pontilhada. As concentrações dos analitos podem variar dos valores especificados na área marginal.
- Uma elevada umidade tem um efeito negativo sobre a estabilidade do produto, o tempo fora da embalagem hermética deve ser minimizado.

Imediatamente após o uso, devolva o material de controle remanescente junto com o indicador de umidade e os pacotes dessecantes para o saco de armazenamento "zip-lock", feche bem e congele a -18 °C.

As concentrações do analito nos controles são dependentes de lote. Níveis individuais são fornecidos no folheto que acompanha cada controle.

Atenção:

Este produto foi fabricado a partir de pool de sangue total humano testado, fornecendo resultados negativos para infecções pelo vírus da imunodeficiência (HIV), o vírus da hepatite B (HBV), o vírus da hepatite C (HCV) e a bactéria *Treponema pallidum*. Ainda assim, um potencial risco de infecção não pode ser totalmente excluído. Considerar todos os produtos contendo material de fonte humana como potencialmente infeccioso e manipulá-lo com o mesmo cuidado destinado a amostras de pacientes potencialmente infecciosas.

5.5 Procedimento de preparo das amostras

Notas:

- Use somente os reagentes, placas de 96 poços e adesivos protetivos fornecidos para o preparo de amostras. Desvios no preparo de amostra irão alterar a performance do kit de reagentes.
- A precisão e acurácia dos analitos deve ser monitorada pela inclusão de controles adicionais em cada coluna analítica.

5.5.1 Preparo da amostra sem succinilacetona

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 (artigo 57010).

2. Extração:

Adicione 100 µL de padrão interno reconstituído (ver capítulo 5.2). Sele a placa com a folha de proteção para placa de 96 poços (artigo 55011) e agite por 20 minutos a 600 rpm, a +20 a +25°C.

3. Transferência:

Remova a folha de proteção da placa de 96 poços. Transfira o sobrenadante para uma nova placa de 96 poços (artigo 57010). Sele a placa de 96 poços com uma película de vedação (selos térmicos perfuráveis, artigo 57014; alternativamente: selos adesivos de corte transversal, artigo 57015).

4. Injeção:

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

5.5.2 Preparação da amostra com succinilacetona

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 filtrante V (artigo 57010).

2. Extração:

Adicione 100 µL de padrão interno reconstituído (ver capítulo 5.2). Sele a placa filtrante com a folha de proteção (artigo 55011) e agite ambas as placas por 20 minutos a 600 rpm, a +20 a +25°C.

3. Transferência:

Remova a folha de proteção da placa de 96 poços. Transfira o sobrenadante para uma nova placa de 96 poços (artigo 57010) e sele a placa com uma nova folha protetiva para placa de 96 poços (artigo 55011). Tome cuidado para transferir o sobrenadante da forma mais quantitativa possível e que nenhum líquido permaneça no disco de sangue seco.

4. Extração da succinilacetona

Primeiramente adicione 75 µL do Padrão Interno – Succinilacetona (artigo 57044), então 75 µL do Tampão de Extração – Succinilacetona (artigo 57012) ao disco de sangue seco restante. Sele a placa de 96 poços com a folha protetiva para placa de 96 poços (artigo 55011) e agite a 600 rpm por 30 min a 45°C.

5. Agrupando os extratos

Remova as folhas protetivas da placa de 96 poços e pipete o extrato da etapa 4 no extrato da etapa 3. Sele a placa de 96 poços de fundo em V com uma película de vedação (selos térmicos perfuráveis, artigo 57014). Então agite por 1 min a 500 rpm a +20 a +25°C.

6. Incubação:

Incube a placa de 96 poços por 20 min a +20 a +25°C antes da injeção.

7. Injeção:

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

Importante:

- O Tampão de Extração – Succinilacetona segrega durante o armazenamento em -18°C. Após descongelar, o reagente deve ser homogeneizado (vortex) para evitar agregados na solução.
- O sobrenadante na etapa 3 deve ser transferido o mais quantitativamente possível.

- Mantenha a ordem de pipetagem na etapa 4.
- Na etapa 5, a folha protetiva deve ser removida rapidamente para evitar condensação do solvente no filme.
- Não use vedações adesivas como películas de vedação final na etapa 5, mas apenas Selos Térmicos Perfuráveis (artigo 57014).

5.6 Estabilidade das amostras

5.6.1 Amostras preparadas sem succinilacetona

As amostras preparadas para análise como indicado nas seções 5.5.1

- em Placas de 96 Poço (artigo 57010), seladas com Selos Térmicos Perfuráveis (artigo 57014)
- em frascos de vidro bem fechados

possuem as seguintes estabilidades:

Tabela 7: Estabilidade das amostras preparadas em Placas de 96 Poços (artigo 57010), seladas com Selos Térmicos Perfuráveis (artigo 57014) ou em frascos de amostras bem fechados

Temperatura de armazenamento	Estabilidade	Outras condições de armazenamento
+20 a +25 °C	10 dias	Protegidas da luz, bem fechadas
+2 a +8 °C	10 dias	Protegidas da luz, bem fechadas

Nota

Uma vez perfurada a película protetora (Pierceable Heat Seal), os eluatos começarão a evaporar-se e o volume de eluato diminuirá. Isto dependerá dos ajustes e das condições do autoinjetor, por exemplo, da temperatura e ventilação. Enquanto for possível injetar um volume suficiente, os testes poderão ser analisados.

5.6.2 Amostras preparadas com succinilacetona

As amostras que foram preparadas para análise de acordo com o capítulo 5.5.2

- em Placas de 96 Poço (artigo 57010), seladas com Selos Térmicos Perfuráveis (artigo 57014)
- em frascos de vidro bem fechados

possuem as seguintes estabilidades:

Tabela 8: Estabilidade das amostras preparadas em Placas de 96 Poços (artigo 57010), seladas com Selos Térmicos Perfuráveis (artigo 57014) ou em frascos de amostras bem fechados

Temperatura de armazenamento	Estabilidade	Outras condições de armazenamento
+20 a +25 °C	10 dias	Protegidas da luz, bem fechadas
+2 a +8 °C	21 dias	Protegidas da luz, bem fechadas
Abaixo de -18 °C	21 dias	Protegidas da luz, bem fechadas

Nota

Uma vez que os Selos Térmicos Perfuráveis foram perfurados, os eluados começam a evaporar e o volume de eluato diminui. Isso depende das configurações e condições do amostrador automático, por exemplo, temperatura e ventilação. Desde que seja possível a injeção de volume suficiente, as amostras podem ser analisadas.

6 Materiais requeridos, mas não fornecidos

A determinação de aminoácidos e acilcarnitinas em gotas de sangue seco (não derivatizado) por LC-MS/MS requer adicionalmente os seguintes materiais não incluídos no kit:

- 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 mm em diâmetro;
- Agitador termoestável para placas de 96 poços para extração e derivatização das amostras, (ex. Thermo Shaker PST-60HL-4; empresa Biosan). Para a preparação da amostra com succinilacetona, recomendam-se 2 agitadores, um para extração à temperatura ambiente, o segundo para extração a 45 °C.
- Rolos de borracha (elástico) para prender as folhas de proteção às placas de 96 poços;
- Pipeta ou pipeta multicanal;
- Ponteiras;
- Balão volumétrico com capacidade para 25 mL;
- Opcional: Seladora térmica para placa de 96 poços (Seladora térmica, incluindo a peça correspondente, artigo 42740)

7 Dados de Aquisição e Avaliação

O padrão interno é usado como um calibrador individual para cada amostra, de modo que os efeitos da matriz são reduzidos ao mínimo. Para este efeito, a amostra (controle, amostra) é misturada com uma quantidade definida do padrão interno. As concentrações dos compostos isotopicamente marcados no padrão interno dependem do lote e serão encontradas no folheto informativo que acompanha os padrões.

O volume de sangue utilizado é necessário para uma quantificação bem-sucedida das amostras. O volume de sangue em um disco perfurado de sangue seco depende do diâmetro do disco, do hematócrito da amostra e do material de papel de filtro utilizado.

A norma CLSI NBS01-Ed7, 2021 [3] recomenda a utilização apenas de papel filtro destinado à análise de spots de sangue seco na triagem neonatal. Alguns papéis de filtro comerciais estão disponíveis, por ex. Whatman 903 (GE Healthcare), que atendem aos requisitos do padrão CLSI. O punch deve ter aproximadamente 3,2 mm (1/8 polegada) de diâmetro, o que corresponde a um volume assumido de 3,1 µL para todas as amostras, independentemente do hematócrito [4].

Este método de triagem é um método de determinação quantitativa, mas é significativamente influenciado pelos diferentes volumes de sangue utilizados, dependendo da amostra. Portanto, novos testes laboratoriais de diagnóstico devem sempre ser realizados para confirmar resultados positivos de triagem.

Dependendo do software utilizado, são necessários os valores dos compostos do padrão interno e do volume sanguíneo ou da concentração relacionada à amostra do padrão interno. Insira as concentrações (ver ficha informativa) do padrão interno na tabela de análise.

Se qualquer outro tamanho de perfuração do sangue seco for utilizado (volume da amostra), as concentrações de amostras relacionadas ao padrão interno devem ser corrigidas.

Para assegurar que as condições do LC-MS/MS não sofreram variações durante a corrida analítica, os controles preparados devem ser injetados durante a corrida e novamente ao final.

Para o manuseio correto do software, entre em contato com o fabricante, se necessário. Notas de cálculo manual podem ser encontradas no Apêndice II.

8 Controle de Qualidade

Monitore a precisão e a exatidão das análises incluindo controles adicionais (*MassCheck® Dried Blood Spot Controls*, artigo 0192, 0193) em cada execução analítica, pelo menos no início e no final da sequência de medição. Caso os valores estejam fora dos intervalos indicados no folheto informativo dos controles, deve-se verificar o sistema, o procedimento de preparação da amostra, bem como o cálculo dos valores de análise.

Conforme descrito na Norma CLSI NBS04-Ed2, 2017 [5], cada laboratório deve estabelecer seus próprios critérios de aceitação para resultados de amostras de cada corrida analítica. Estes critérios baseiam-se principalmente na análise dos controlos de qualidade.

9 Valores de referência / cut-off

Em um estudo piloto conduzido no Centro de Triagem Neonatal do Hospital Universitário de Dresden (Alemanha), os seguintes valores de *cut off* dados como percentil 99,9% foram determinados usando o kit de reagente 57000 (sem succinilacetona). Os dados estão diferenciados entre as semanas gestacionais (SG) e a coleta de sangue após o nascimento [a].

Tabela 9: Valores de cut-off, aminoácidos, [a]

Analito	Cut off 32-42 SG, >36 h	Cut off 38-42 SG, >36 h	Cut off todas SG, >0 h
Alanina	583 µmol/L	564 µmol/L	736 µmol/L
Arginina	52 µmol/L	49 µmol/L	55 µmol/L
Ácido Aspártico	420 µmol/L	402 µmol/L	420 µmol/L
Citrulina	50 µmol/L	51 µmol/L	50 µmol/L
Ácido Glutâmico	1074 µmol/L	1087 µmol/L	1073 µmol/L
Glicina	1003 µmol/L	962 µmol/L	1001 µmol/L
Leucina	277 µmol/L	299 µmol/L	276 µmol/L
Metionina	35 µmol/L	35 µmol/L	37 µmol/L
Ornitina	454 µmol/L	455 µmol/L	453 µmol/L
Fenilalanina	127 µmol/L	124 µmol/L	141 µmol/L
Prolina	não estabelecido	não estabelecido	não estabelecido
Tirosina	248 µmol/L	217 µmol/L	248 µmol/L
Valina	192 µmol/L	199 µmol/L	212 µmol/L

Tabela 10: Valores de cut-off, acilcarnitinas e carnitina livre, [a]:

Analito	Cut off 32-42 SG, >36 h	Cut off 38-42 SG, >36 h	Cut off todas SG, >0 h
C0-Carnitina	55,87 µmol/L	54,96 µmol/L	55,83 µmol/L
C2-Carnitina	71,17 µmol/L	73,40 µmol/L	71,08 µmol/L
C3-Carnitina	6,35 µmol/L	6,41 µmol/L	6,34 µmol/L
C4-Carnitina	1,07 µmol/L	1,18 µmol/L	1,07 µmol/L
C5-Carnitina	0,43 µmol/L	0,37 µmol/L	0,48 µmol/L
C5DC-Carnitina	0,56 µmol/L	0,58 µmol/L	0,56 µmol/L
C6-Carnitina	0,17 µmol/L	0,17 µmol/L	0,17 µmol/L
C8-Carnitina	0,24 µmol/L	0,24 µmol/L	0,24 µmol/L
C10-Carnitina	0,35 µmol/L	0,29 µmol/L	0,35 µmol/L
C12-Carnitina	0,35 µmol/L	0,31 µmol/L	0,35 µmol/L
C14-Carnitina	0,50 µmol/L	0,49 µmol/L	0,50 µmol/L
C16-Carnitina	9,90 µmol/L	10,03 µmol/L	9,89 µmol/L
C18-Carnitina	2,06 µmol/L	2,07 µmol/L	2,06 µmol/L

Em um estudo piloto com o kit de reagentes 57111 (com succinilacetona) em 1642 recém-nascidos realizado no laboratório de Triagem Neonatal e Metabolismo no Instituto do Hospital Universitário para Clínica Química e Patobioquímica da Universidade de Magdeburg, os seguintes valores de cut-off foram determinados como percentil 99,9% [b].

Tabela 11: Valores de cut-off, aminoácidos, [b]

Substância	Valores de cut-off
Alanina	544 µmol/L
Arginina	70,9 µmol/L
Ácido aspártico	não estabelecido
Citrulina	93,9 µmol/L
Ácido glutâmico	não estabelecido
Glicina	742 µmol/L
Leucina	349 µmol/L
Metionina	51,1 µmol/L
Ornитина	não estabelecido
Fenilalanina	136 µmol/L
Prolina	não estabelecido
Tirosina	335 µmol/L
Valina	276 µmol/L
Succinilacetona	1,23 µmol/L

Tabela 12: Valores de cut-off, acilcarnitinas e carnitina livre, [b]

Analito	Valores de cut-off
C0-Carnitina	55,4
C0, valor inferior (0,1% percentil)	4,76
C2-Carnitina	66,7
C3-Carnitina	7,19
C4-Carnitina	1,08
C5-Carnitina	0,58
C5DC-Carnitina	0,79
C6-Carnitina	0,24
C8-Carnitina	0,27
C10-Carnitina	0,35
C12-Carnitina	0,37
C14-Carnitina	0,56
C16-Carnitina	7,66
C18-Carnitina	2,32

Esses valores de *cut off* devem servir apenas como base, uma vez que variam de acordo com o grupo de pacientes estudados e com o sistema MS/MS utilizado. Cada laboratório deve determinar seus próprios valores de *cut-off* em estudos pilotos, sob supervisão e avaliação de especialistas.

10 Fatores de conversão

A tabela seguinte lista os fatores de conversão entre massa e concentração molar e de modo inverso.

Tabela 13: Fatores de conversão, aminoácidos e metabólito da tirosina (SUAC)

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
Ornитина	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

Tabela 14: Fatores de conversão, 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

11 Armazenamento dos reagentes

Fechados, e desde que as condições de transporte e armazenamento sejam cumpridas, os reagentes são estáveis até a data de validade determinada no rótulo. Transporte e armazene os reagentes sob as seguintes condições:

Tabela 15: Condições de transporte para o kit de reagente

Produto	Temperatura de transporte
Kit de Reagentes (artigo 57000)	+18 a +30°C
Conjunto de Upgrade Succinilacetona (artigo 57111)	+18 a +30°C

Imediatamente após o transporte, desempacote os reagentes e armazene individualmente como determinado abaixo:

Tabela 16: Condições de armazenamento dos reagentes

Produto	Condição
Fase móvel (art. 57001, 57002)	+18 a +30°C
Solução de limpeza (art. 57007)	+18 a +30°C
Tampão de extração (art. 57008)	+18 a +30°C
Tuning Mix (art. 57099)	+2 a +8°C
Padrão Interno (art. 57004)	Abaixo de -18°C
Controles nível I e nível II, DBS (arts. 0191, 0192, 0193)	Abaixo de -18°C
Padrão Interno para succinilacetona (art. 57044)	+2 a +8°C
Tampão de extração - Succinilacetona (art. 57012)	Abaixo de -18°C
Tuning Mix - Succinilacetona (art. 57098)	+2 a +8°C

Os reagentes devem ser fechados e armazenados nas condições estabelecidas tão logo sejam utilizados. Se nada tiver sido previamente determinado, a validade de um reagente em uso deverá ser de 1 ano após sua abertura, não excedendo o seu respectivo prazo de validade. Para calibradores e controles, ver os capítulos 5.2 e 5.4 deste manual.

12 Descarte

A Fase Móvel (artigo 57001, 57002), Solução de lavagem (57007), Tampão de Extração (57008 e 57012), Tuning Mix (artigo 57098 e 57099), o Padrão Interno reconstituído (57004 e 57008), e o Padrão Interno para succinilacetona (artigo 57044) contêm solventes orgânicos. Descarte os resíduos dos produtos em um recipiente de coleta 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 lixo potencialmente infeccioso.

As soluções mencionadas não devem ser descartadas junto com o lixo doméstico. Não circule no abastecimento principal de água. Descarte de acordo com a diretriz 2008/98/EC e de acordo com as exigências locais e nacionais. Os contêineres de lixo devem ser armazenados apropriadamente e o acesso só deve ser permitido a pessoas autorizadas.

13 Interferentes conhecidos

Favor notar:

- 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 recém-nascidos 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 tirosina e fenilalanina. Metionina sulfóxido é um produto da oxidação da metionina. A concentração padrão da Metionina em recém-nascidos 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 100-300 µmol/L. Desta forma, metionina sulfona não deve causar acréscimos significativos na concentração de tirosina durante análises de rotina.
- Asparagina interfere com Ornitina. A concentração máxima de asparagina em crianças é de até 140 µmol/L. Somente concentrações de asparagina maiores que 300 µmol/L geram um aumento na concentração de ornitina de 20%. A asparagina não deve causar acréscimos significativos na concentração de tirosina durante análises de rotina.
- Sarcosina interfere com alanina. A concentração de sarcosina com relação a alanina, entretanto, é insignificante. Portanto, a sarcosina não deve causar resultados de alanina falsamente aumentados.
- A creatinina, uma substância endógena que também é utilizada como suplemento dietético para aumentar o crescimento muscular, interfere com alanina e leucina.
- A 4-aminoantipirina, um metabólito do analgésico metamizol (ex. Novalgina®), interfere com C2-carnitina.
- As drogas allopurinol (uma droga para diminuir os níveis de ácido úrico), triantereno (um diurético), gabapentina (um antiepileptico) e acetilcisteína (um expectorante) interferem com a transição de massa (MRM) da succinilacetona e geram valores falsamente positivos de succinilacetona.
- As drogas azatioprina (um imunossupressor) e aloxantina/oxipurinol (metabólito do allopurinol) interfere com a transição de massa (MRM) do padrão interno da succinilacetona e geram e valores falsamente positivos de succinilacetona.
- A lidocaína interfere com a transição de massa (MRM) do padrão interno do C4-carnitina e assim pode gerar valores falsamente negativos de C4-carnitina.
- A gabapentina (um antiepileptico) interfere com a transição de massa (MRM) do padrão interno do C5DC-carnitina e pode gerar valores falsamente positivos de C5DC-carnitina.
- O leviracetam, um antiepileptico, interfere com a transição de massa (MRM) do C12-carnitina e assim pode gerar valores falsamente negativos de C12-carnitina.

- A pregabalina, um antiepileptico, interfere com a transição de massa (MRM) do padrão interno do succinilacetona e assim pode gerar valores falsamente negativos de succinilacetona.
- A prilocaina, um anestésico local, interfere com a transição de massa (MRM) do padrão interno do C3-carnitina e assim pode gerar valores falsamente negativos de C3-carnitina.
- As acilcarnitinas isobáricas com fragmentações idênticas são medidas como uma soma. Isto é aplicável para os seguintes pares de acilcarnitinas: C3DC/C4OH; C4DC/C5OH; C5DC/C6OH etc.
- Aditivos em materiais plásticos (placas de 96 poços, folhas protetivas) usadas no preparo de amostras, podem interferir consideravelmente com algumas acilcarnitinas causando resultados falsos positivos. Por isso, este kit de reagentes contém todos os reagentes e recipientes para preparo de amostras requeridos. Todos os materiais fornecidos foram testados para serem adequados para uma análise 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, pivmecilinam, pivampicilina), o ácido piválico pode ser formado por metabolização e, por processos posteriores, a pivaloilcarnitina. A pivaloilcarnitina é isobárica à isovalerilcarnitina (C5-carnitina), o que pode levar a uma sobreposição de picos que sugere acidemia isovaloriana, embora nenhum distúrbio metabólico esteja presente.

Observações gerais e internas sobre os aditivos dos materiais plásticos:

Os aditivos dos materiais plásticos utilizados antes ou durante o preparo das amostras podem interferir significativamente com algumas acilcarnitinas e provocar resultados falsos positivos. Foram observadas interferências, particularmente, com as acilcarnitinas C8, C5:1 e C5DC.

- No caso de C8 e C5:1, o cloreto de polivinilideno (PVdC) foi identificado como a principal causa dos resultados falsamente elevados.

Portanto, foi comprovada a adequação de todos os reagentes e recipientes para o preparo de amostras incluídos neste kit de reagentes. O usuário final deve assegurar-se de que não haja interferências provenientes de materiais plásticos não incluídos neste kit (por exemplo, pontas de pipeta).

A substância endógena oleamida também é utilizada em sua forma sintética como agente deslizante, lubrificante ou inibidor de corrosão na produção de artigos plásticos como pontas de pipetas, tubos de ensaio e placas de pocilhos. Portanto, alguns desses produtos podem conter resíduos de oleamida e contaminar a amostra durante seu preparo. A oleamida interfere com o padrão interno da C5DC-carnitina, pelo que foi observado esporadicamente um aumento da intensidade do sinal. Isso poderia resultar em falsos negativos na triagem. Para identificar as amostras afetadas, monitore as intensidades do padrão interno da C5DC-carnitina em busca de valores atípicos com sinais anormalmente altos. No caso de amostras de pacientes afetados, repita o preparo das amostras para obter resultados válidos.

Os seguintes compostos isobáricos, substâncias medicamentosas, drogas de abuso e metabólitos foram testadas. Nenhuma interferência nas análises foi observada.

Compostos isobáricos:

Acetilsérgica, ácido málico, ácido aminocapróico, amitriptilina, aripiprazol, atomoxetina, atropina, betametasona, budesonida, bupivacaína, carbimazol, cefalexina, cetirizina, clorprotixeno, clemastina (meclastina), clenbuterol, clomipramina, clonidina, clotrimazol, colchicina, ciclofosfamida, ciproterona, difenidramina, domperidona, etambutol, etilefrina, ácido formiminoglutâmico, fluticasona, fluvoxamina, fosfomicina, hidroxicloroquina, imipramina, irbesartan, isoniazida, lactulose, maprotilina, melperona, mepivacaína, mercaptopurina, mesalazina,

metronidazol, moxifloxacina, naproxeno, nitrofurantoína, norfloxacina, nortriptilina, ofloxacina, ondansetrona, opipramol, oxcarbazepina, oximetazolina, paliperidona, penicilamina, fenilbutazona, pipamperona, proguanil, propofol, propranolol, propiltiouracil, propifenazona, pseudoefedrina, pirazinamida, piridostigmina, piridoxina, pirimetamina, ramipril, ranitidina, reprotorel, ropivacaína, sotalol, espironolactona, sulfactam, sulfassalazina, terbinafina, teofilina, tiamazol, tiroidiazina, timolol, tolperisona, traniccipromina, trimetoprim, venlafaxina, xilometazolina, zolmitriptano, zuclopentixol

Drogas/metabólitos:

Acetazolamida, ácido acetilsalicílico, aciclovir, alprazolam, α-hidroxialprazolam, amicacina, anlodipino, amoxicilina, azitromicina, benzocaína, betaina, bisoprolol, bromazepam, 3-OH-bromazepam, brotizolam, buprenorfina, captoril, carbamazepina, carbamazepina-10,11-epóxido, carbamilglutamato, cefradina, cloranfenicol, clordiazepóxido, cloredoxina, cimetidina, ciprofloxacina, claritromicina, clobazam, clonazepam, 7-amino clonazepam, codeína, demoxepam, dexametasona, dextrometorfano, diazepam, diclofenaco, digitoxina, digoxina, dihidrocodeína, ácido 2,3-dihidroxibenzóico, disopiramida, EDDP (2-etilideno-1,5-dimetil-3,3-difenilpirrolidina), enalaprilato, eritromicina, estazolam, fentanil, norfentanil, flunitrazepam, desmetilflunitrazepam, 7-aminoflunitrazepam, flurazepam, desalkylflurazepam, furosemida, ganciclovir, gentamicina, hidroclorotiazida, ibuprofeno, isossorbidinitrato, itraconazol, cetamina, noracetamina, cetoconazol, levofloxacina, levotiroxina, lorazepam, lormetazepam, medazepam, meperidina, normeperidina, metformina HCl (1,1-dimetilbiguanida), metadona, metilciclina, metilfenidato, metilprednisolona, , metoclopramida, metoprolol, midazolam, α-hidroximidazolam, morfina, ácido micovenólico, glucuronida do ácido micovenólico, N-acetilprocainamida, nadolol, naloxona, naltrexona, benzoato de sódio, fluoreto de sódio, sódio fenilbutirato, N-desmetildiazepam, neomicina, nitrazepam, 7-aminonitrazepam, nifedipina, nitisinona, norbuprenorfina, norclobazam, norverapamil, omeprazol, oxazepam, oxicodona, paracetamol (4-acetamidofenol ou paracetamol), penicilina G, penicilina V, fenobarbital, fenitoína, prazepam, prazosina, prednisolona, prednisona, procainamida, prometazina, (±)-propranolol, propoxifeno, quetiapina, norpropoxifeno, ranitidina, rifampicina, risperidona, ácido ritalínico, salbutamol (salbutamol), ácido salicílico (ácido 2-hidroxibenzóico), sapropterina, estreptomicina, sufentanil, sulfametoxazol, tapentadol, nortapentadol, temazepam, tiopental, tilidina, nortilidina, tramadol, O-DM-tramadol, triazolam, α-hidroxitriazolam, trimetoprim, ácido valpróico, vancomicina, verapamil, zaleplon, zolpidem, zopiclona.

Drogas de abuso/metabolitos:

2C-B (4-bromo-2,5-dimetoxifeniletilamina), 2C-I (2,5-dimetoxi-4-iodofenetilamina), 2-Oxo-3-hidroxi-LSD, 6-monoacetilmorfina, acetilcodeína, alobarbital, amobarbital, anfetamina, barbital, BDB (1-(1,3-benzodioxol-5-il)-2-butilamina), benzoilecgonina, butalbital, butilon, catinona, cocaetileno, cocaína, d, I-1-nor-Δ9-THC-ácido carboxílico, hexobarbital, hidrocodona, hidromorfona, LSD (dietilamida do ácido lisérgico), MBDB (2-metilamino-1-(3,4-metilenodioxifenil)butano), MDA (3,4-metilenodioxianfetamina), MDEA (3,4-metilenodioxo-N-etylaminofetamina), MDMA (3,4-metilenodioxi-N-metilanfetamina), MDPV (metilenodioxipirovalerona), meconina, mefedrona, mescalina, metanfetamina, metaquilon, metilona, norcocaina, norcodeína, oximorfona, papaverina, PCP (fenilciclohexipilpiperidina), pentobarbital, PMA (4-metoxianfetamina), secbutabarbital, secobarbital, tebaína.

Para o esclarecimento de quaisquer outras questões envolvendo possíveis interferências, entre em contato com a assessoria científica da Biosys, através de e-mail ou telefone, ou mande um e-mail para support@chromsystems.com.

14 Problemas e Soluções

Tabela 17: Problemas e soluções

Problema	Possível causa	Solução
Gradiente de fluxo não está sendo gerado	Bomba do HPLC	Checar bomba (vazamentos, ar)
	Ar no sistema	Degaseificar o sistema de HPLC (purga)
	Fluxo inconstante	Checar a bomba
Sinais interferentes	Sistema de injeção contaminado	Limpar com metanol ou injetar fase móvel 10 vezes
	Frascos do amostrador automático contaminados	Usar frascos novos ou limpá-los com metanol
	Selos dos frascos	Usar outros selos
Perda de sinal	Defeito no injetor	Checar o injetor
	Defeito na bomba	Checar a bomba
	Sistema MS/MS não está pronto	Checar o sistema MS/MS
Diminuição da sensibilidade	Fonte de íons contaminada	Limpe a fonte de íons
	Espectrômetro de massa contaminado	Limpe o espectrômetro de massa
	Vazamento na válvula de injeção	Checar o injetor
	Multiplicadora degradada	Substitua a multiplicadora
Sinal com pouca intensidade	Massas imprecisas	Executar calibração de massa
	O amostrador automático não é preciso	Verifique a precisão
Ausência de vácuo	Defeito na bomba de vácuo	Checar todas as bombas de vácuo
	Vazamento no sistema de vácuo	Checar tubulações e conexões
Sem suprimento de gás	Defeito no gerador de nitrogênio	Checar o gerador de nitrogênio
	Defeito no compressor	Checar compressor
	Cilindro de gás vazio	Substituir o cilindro de gás
	Pressão do gás inadequada	Ajustar a pressão do gás

Para o esclarecimento de quaisquer outras questões envolvendo possíveis interferências, entre em contato com a assessoria científica da Biosys, através de e-mail ou telefone, ou mande um e-mail para support@chromsystems.com.

15 Literatura

1. Gemeinsamer Bundesausschuss: Richtlinie des Gemeinsamen Bundesausschusses über die Früherkennung von Krankheiten bei Kindern. Kinder-RL, 2021.
2. Hall EM, Flores SR, Jesús VR de: Influence of Hematocrit and Total-Spot Volume on Performance Characteristics of Dried Blood Spots for Newborn Screening. *Int J Neonatal Screen* 2015; 1:69–78.
3. Clinical Laboratory Standards Institute (CLSI): NBS01-Ed7: Dried Blood Spot Specimen Collection for Newborn Screening. Approved Standard 2021.
4. Miller IV JH: An On-card Approach for Assessment of Hematocrit on Dried Blood Spots which Allows for Correction of Sample Volume. *J Anal Bioanal Techniques* 2013; 04.
5. Clinical Laboratory Standards Institute (CLSI): NBS04: Newborn Screening by Tandem Mass Spectrometry 2017.

Apêndice I: Informações de Riscos

As seguintes informações devem ser observadas e as medidas de segurança relevantes devem ser tomadas. Mais informações podem ser obtidas a partir das respectivas fichas de segurança. Elas estão disponíveis por requisição ou podem ser obtidas no nosso site.

Tabela 18: Declaração de perigo e precaução

Produto/ Símbolos de perigo	Risco
Fase móvel (artigo 57001, 57002)	<p>Perigo</p>  <p>H225 Líquido e vapor altamente inflamáveis. H302+H312+H332 Nocivo por inalação, ingestão e contato com a pele. H319 Causa sérios danos aos olhos.</p>  <p>P210 Manter longe do calor, superfícies quentes, faíscas, chamas abertas ou outras fontes de ignição. Não fumar. P241 Usar equipamentos elétricos/de ventilação/iluminação à prova de explosão. P243 Tomar medidas de precaução contra descarga estatística. P280 Utilizar roupa de proteção, luvas adequadas, proteção nos olhos e na face.</p>
Solução de Lavagem (artigo 57005)	<p>Perigo</p>  <p>H225 Líquido e vapor altamente inflamáveis. H302+H312+H332 Nocivo por inalação, ingestão e contato com a pele. H319 Causa sérios danos aos olhos.</p>  <p>P210 Manter longe do calor, superfícies quentes, faíscas, chamas abertas ou outras fontes de ignição. Não fumar. P241 Usar equipamentos elétricos/de ventilação/iluminação à prova de explosão. P243 Tomar medidas de precaução contra descarga estatística. P280 Utilizar roupa de proteção, luvas adequadas, proteção nos olhos e na face.</p>
Tampão de extração (artigo 57008)	<p>Perigo</p>  <p>H225 Líquido e vapor altamente inflamáveis. H301+H311+H331 Tóxico se ingerido, em contato com a pele ou se inalado. H370 Causa danos ao sistema nervoso central e aos órgãos visuais.</p>   <p>P210 Manter longe do calor, superfícies quentes, faíscas, chamas abertas ou outras fontes de ignição. Não fumar. P280 Utilizar roupa de proteção, luvas adequadas, proteção nos olhos e na face. P301+P310 Se inalado: Ligue imediatamente para um centro de envenenamento/médico. P302+P352 Se em contato com a pele: Lave com bastante sabão e água. P403+P233 Armazene em um local bem ventilado. Mantenha os frascos bem fechados</p>

Produto/ Símbolos de perigo	Risco
Tampão de extração (para succinilacetona (não derivatizado) Upgrade Set, artigo 57012)	
	Perigo H225 Líquido e vapor altamente inflamáveis. H302+H312+H332 Nocivo por inalação, ingestão e contato com a pele. H319 Causa sérios danos aos olhos.
	P210 Manter longe do calor, superfícies quentes, faíscas, chamas abertas ou outras fontes de ignição. Não fumar. P241 Usar equipamentos elétricos/de ventilação/iluminação à prova de explosão. P243 Tomar medidas de precaução contra descarga estática. P280 Utilizar roupa de proteção, luvas adequadas, proteção nos olhos e na face.
Padrão interno (para succinilacetona (não derivatizado) Upgrade Set, artigo 57044)	
	Perigo H225 Líquido e vapor altamente inflamáveis. H302+H312+H332 Nocivo por inalação, ingestão e contato com a pele. H319 Causa sérios danos aos olhos.
	P210 Manter longe do calor, superfícies quentes, faíscas, chamas abertas ou outras fontes de ignição. Não fumar. P241 Use equipamentos elétricos, de ventilação e de iluminação à prova de explosão. P243 Tome medida de precaução contra descarga estática. P280 Utilizar roupa de proteção, luvas adequadas, proteção nos olhos e na face.
Tuning Mix (artigo 57099 e 57098 para succilacetona (não derivatizado) Upgrade Set)	
	Perigo H225 Líquido e vapor altamente inflamáveis. H302+H312+H332 Nocivo por inalação, ingestão e contato com a pele. H319 Causa sérios danos aos olhos.
	P210 Manter longe do calor, superfícies quentes, faíscas, chamas abertas ou outras fontes de ignição. Não fumar. P241 Use equipamentos elétricos, de ventilação e de iluminação à prova de explosão. P243 Tome medida de precaução contra descarga estática. P280 Utilizar roupa de proteção, luvas adequadas, proteção nos olhos e na face.
Esses componentes não são classificados como perigosos de acordo com a legislação da União Europeia:	
Padrão Interno (artigo 57004) Controles <i>MassCheck</i> ® em sangue seco (artigos 0191, 0192, 0193)	

Apêndice II: Princípios do Cálculo

A quantificação dos analitos é feita comparando a intensidade do sinal com os correspondentes padrões internos marcados com isotopela. Várias acilcarnitininas de interesse diagnóstico para as quais ainda não estão disponíveis padrões internos rotulados isotopicamente também podem ser medidas com este kit de reagentes. As acilcarnitininas com o mesmo comprimento de cadeia apresentam aproximadamente o mesmo fator de resposta. Recomenda-se, portanto, quantificar estes marcadores de doenças com padrões deuterados do mesmo comprimento de cadeia.

A concentração do analito de interesse na amostra é calculada de acordo com o seguinte princípio: A razão entre a intensidade do pico do analito e a do padrão interno é determinada e multiplicada pela concentração do padrão interno. Além disso, há vários outros parâmetros incluídos no cálculo (veja abaixo).

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

$$C_{\text{amostra}} (\mu\text{mol/L}) = \frac{A_{\text{amostra}} \times V_{\text{Volume}_{\text{ISTD}}}}{IS_{\text{amostra}} \times V_{\text{Volume}_{\text{sangue no disco}}} \times RRF} \times C_{\text{ISTD}}$$

- Concentração do analito A na amostra = C_{amostra}
- Intensidade do sinal do analito A na amostra = A_{amostra}
- Intensidade do sinal do padrão interno na amostra = IS_{amostra}
- Concentração relacionada à amostra C do padrão interno = C_{ISTD}
- Volume de sangue no disco de sangue seco = $V_{\text{Volume}_{\text{sangue no disco}}}$
- Volume do padrão interno = $V_{\text{Volume}_{\text{STD}}}$
- Fator de resposta relativo = RRF

O volume do sangue no disco de sangue em papel-filtro é geralmente de cerca de 3,11–3,2 µL.

Fatores de resposta relativos (RRF) podem ser usados de acordo com a norma CLSI NBS04-Ed2, 2017 [5] ao usar diferentes instrumentos de MS e aplicar os mesmos valores de corte. Desta forma, por exemplo, diferentes eficiências de ionização dos diferentes espectrômetros de massa são tidas em conta e compensadas matematicamente. Com base nos resultados de medição de amostras de referência com concentrações de analito conhecidas (por exemplo, *MassCheck® Dried Blood Spot Controls*, n° de pedido 0192 e 0193) durante vários dias de análise, os RRF são calculados para cada espectrômetro de massa de acordo com a seguinte fórmula:

$$RRF = \frac{\text{Concentração medida do analito}}{\text{Concentração alvo do analito}}$$

Recomendações para o uso de software especial na avaliação quantitativa:

Os volumes dos padrões internos 57004 e 57044 utilizados no preparo das amostras são diferentes. Caso sejam utilizados programas de avaliação que permitam apenas a inserção de um volume ISTD global para todos os analitos, é necessário multiplicar a concentração do ISTD inserida para a SUAC-¹³C5 pela razão entre o volume registrado no software e o volume realmente adicionado.

Exemplo:

Volume inserido no software = 100 µL

Volume de 57044 realmente adicionado = 75 µL

Concentração de ISTD (dependente do lote, ver folheto) = 0,141 µmol/L

Concentração a introduzir em µmol/L:

$$0,141 \mu\text{mol/L} \times \frac{75 \mu\text{L}}{100 \mu\text{L}} = 0,106 \mu\text{mol/L}$$

Apêndice III: Informações de Performance

As características de desempenho foram determinadas e verificadas nos seguintes equipamentos:

- Espectrômetro de massas SCIEX API 3200™ com sistema HPLC Shimadzu LC-20A Prominence
- Espectrômetro de massa Waters® Quattro Micro™ API com sistema HPLC Waters® AllianceTM HT 2795
- Espectrômetro de massas SCIEX API 4000™ com sistema HPLC Shimadzu LC-20A Prominence
- Espectrômetro de massa Waters® ACQUITY TQD com sistema ACQUITY™ UHPLC®

A ionização foi feita por Electrospray Ionisation (ESI+) para todas as medições.

IIIa: Preparo sem succinilacetona

Recuperação:

A recuperação analítica foi determinada a partir da inclinação da curva de calibração de amostras de sangue fortificado e soluções padrão diluídas.

Tabela 19: Taxas de recuperação, determinação com Espectrômetro de massas da Waters® Quattro Micro™ API

Substância	Taxa de recuperação	Substância	Taxa de recuperação
Alanina	79 %	C0-Carnitina	85 %
Arginina	80 %	C2-Carnitina	86 %
Ácido aspártico	88 %	C3-Carnitina	89 %
Citrulina	94 %	C4-Carnitina	88 %
Ácido glutâmico	81 %	C5-Carnitina	92 %
Glicina	81 %	C5DC-Carnitina	91 %
Leucina	86 %	C6-Carnitina	90 %
Metionina	90 %	C8-Carnitina	91 %
Ornитина	86 %	C10-Carnitina	92 %
Fenilalanina	94 %	C12-Carnitina	94 %
Prolina*	89 %	C14-Carnitina	94 %
Tirosina	93 %	C16-Carnitina	94 %
Valina	90 %	C18-Carnitina	87 %

* A determinação desses dados foi feita em uma API SCIEX 4000™.

Tabela 20: Taxas de recuperação, determinação com Espectrômetro de massa da SCIEX API 3200™

Substância	Taxa de recuperação	Substância	Taxa de recuperação
Alanina	73 %	C0-Carnitina	85 %
Arginina	64 %	C2-Carnitina	80 %
Ácido aspártico	74 %	C3-Carnitina	72 %
Citrulina	80 %	C4-Carnitina	76 %

Ácido glutâmico	68 %	C5-Carnitina	88 %
Glicina	78 %	C5DC-Carnitina	102 %
Leucina	76 %	C6-Carnitina	73 %
Metionina	73 %	C8-Carnitina	72 %
Ornитина	85 %	C10-Carnitina	70 %
Fenilalanina	77 %	C12-Carnitina	64 %
Prolina	74 %	C14-Carnitina	63 %
Tirosina	78 %	C16-Carnitina	66 %
Valina	74 %	C18-Carnitina	65 %

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

O limite de determinação e a linearidade foram determinados diluindo-se um eluato de uma amostra de sangue preparada com padrão interno.

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

Tabela 21: Limite de quantificação e linearidade, determinação com espectrômetro de massa Waters® Quattro Micro™ API, Aminoácidos

Substância	Limite de quantificação (LLOQ)	Intervalo linear até pelo menos
Alanina	15,6 µmol/L	2000 µmol/L
Arginina	7,8 µmol/L	2000 µmol/L
Ácido aspártico	15,6 µmol/L	2000 µmol/L
Citrulina	7,8 µmol/L	2000 µmol/L
Ácido glutâmico	15,6 µmol/L	2000 µmol/L
Glicina	15,6 µmol/L	2000 µmol/L
Leucina	15,6 µmol/L	2000 µmol/L
Metionina	7,8 µmol/L	2000 µmol/L
Ornithina	7,8 µmol/L	2000 µmol/L
Fenilalanina	7,8 µmol/L	2000 µmol/L
Prolina*	4,8 µmol/L	2400 µmol/L
Tirosina	15,6 µmol/L	2000 µmol/L
Valina	15,6 µmol/L	2000 µmol/L

* A determinação desses dados foi feita em um SCIEX API 4000™.

Tabela 22: Limite de quantificação e linearidade, determinação com espectrômetro de massas SCIEX API 3200™, aminoácidos

Substância	Limite de quantificação (LLOQ), ca.	Intervalo linear até pelo menos
Alanina	13,5 µmol/L	2000 µmol/L
Arginina	2,5 µmol/L	2000 µmol/L
Ácido aspártico	30,0 µmol/L	2000 µmol/L

Citrulina	2,5 µmol/L	2000 µmol/L
Ácido glutâmico	25,0 µmol/L	2000 µmol/L
Glicina	10,5 µmol/L	2000 µmol/L
Leucina	13,0 µmol/L	2000 µmol/L
Metionina	2,5 µmol/L	2000 µmol/L
Ornitina	8,0 µmol/L	2000 µmol/L
Fenilalanina	6,0 µmol/L	2000 µmol/L
Prolina	5,0 µmol/L	2400 µmol/L
Tirosina	12,0 µmol/L	2000 µmol/L
Valina	16,5 µmol/L	2000 µmol/L

Tabela 23: Limite de quantificação e linearidade, determinação com espectrômetro de massa Waters® Quattro Micro™ API, acilcarnitinas e carnitina livre

Substância	Limite de quantificação (LLOQ)	Intervalo linear até pelo menos
C0-Carnitina	1.6 µmol/L	200 µmol/L
C2-Carnitina	1.6 µmol/L	200 µmol/L
C3-Carnitina	0.2 µmol/L	50 µmol/L
C4-Carnitina	0.2 µmol/L	25 µmol/L
C5-Carnitina	0.2 µmol/L	25 µmol/L
C5DC-Carnitina	0.2 µmol/L	25 µmol/L
C6-Carnitina	0.2 µmol/L	25 µmol/L
C8-Carnitina	0.2 µmol/L	25 µmol/L
C10-Carnitina	0.2 µmol/L	25 µmol/L
C12-Carnitina	0.2 µmol/L	25 µmol/L
C14-Carnitina	0.1 µmol/L	25 µmol/L
C16-Carnitina	0.1 µmol/L	33 µmol/L
C18-Carnitina	0.1 µmol/L	33 µmol/L

Tabela 24: Limite de quantificação e linearidade, determinação com espectrômetro de massas SCIEX API 3200™, acilcarnitinas e carnitina livre

Substância	Limite de quantificação (LLOQ), ca.	Intervalo linear até pelo menos
C0-Carnitina	1.5 µmol/L	200 µmol/L
C2-Carnitina	1.0 µmol/L	200 µmol/L
C3-Carnitina	0.1 µmol/L	50 µmol/L
C4-Carnitina	0.2 µmol/L	25 µmol/L
C5-Carnitina	0.2 µmol/L	25 µmol/L
C5DC-Carnitina	0.1 µmol/L	25 µmol/L
C6-Carnitina	0.1 µmol/L	25 µmol/L
C8-Carnitina	0.2 µmol/L	25 µmol/L

C10-Carnitina	0.1 µmol/L	25 µmol/L
C12-Carnitina	0.1 µmol/L	25 µmol/L
C14-Carnitina	0.1 µmol/L	25 µmol/L
C16-Carnitina	0.1 µmol/L	33 µmol/L
C18-Carnitina	0.1 µmol/L	33 µmol/L

Precisão intra-ensaio:

A precisão intra-ensaio foi determinada em três concentrações por meio de limpeza múltipla ($n = 10$) do mesmo espécime.

Tabela 25: Precisão intra-ensaio, determinação com espectrômetro de massa SCIEX 4500MD™, aminoácidos, $n = 10$

Substância	Coeficiente de variação (concentração do analito)		
Alanina	5,2 % (281 µmol/L)	4,7 % (390 µmol/L)	4.6 % (745 µmol/L)
Arginina	4,2 % (7 µmol/L)	10,4% (12 µmol/L)	3.4 % (125 µmol/L)
Ácido aspártico	4,7% (96 µmol/L)	5,1% (147 µmol/L)	5.8 % (345 µmol/L)
Citrulina	6,8% (20 µmol/L)	7,3% (61 µmol/L)	5.0 % (256 µmol/L)
Ácido glutâmico	4,9% (218 µmol/L)	3,0% (388 µmol/L)	3.8 % (749 µmol/L)
Glicina	10,9% (241 µmol/L)	6,0% (336 µmol/L)	5.0 % (1085 µmol/L)
Leucina	6,4% (181 µmol/L)	2,9% (281 µmol/L)	2.8 % (592 µmol/L)
Metionina	6,8% (19 µmol/L)	4,0% (62 µmol/L)	2.9 % (268 µmol/L)
Ornитina	5,6% (95 µmol/L)	7,1% (217 µmol/L)	5.4 % (626 µmol/L)
Fenilalanina	4,7% (69 µmol/L)	3,4% (129 µmol/L)	3.0 % (566 µmol/L)
Prolina*	8,8% (231 µmol/L)	6,4% (525 µmol/L)	5.4 % (834 µmol/L)
Tirosina	4,7% (69 µmol/L)	2,9% (158 µmol/L)	3.5 % (488 µmol/L)
Valina	4,8 % (111 µmol/L)	2,3 % (171 µmol/L)	4.3 % (365 µmol/L)

* A determinação destes dados foi feita em uma API SCIEX 4000™.

Tabela 26: Precisão intra-ensaio, determinação com espectrômetro de massa SCIEX API 3200™, aminoácidos, $n = 10$

Substância	Coeficiente de variação (concentração do analito)		
Alanina	3.5 % (378 µmol/L)	2.6 % (411 µmol/L)	4.0 % (752 µmol/L)
Arginina	2.5 % (19 µmol/L)	1.7 % (80 µmol/L)	3.3 % (167 µmol/L)
Ácido aspártico	3.9 % (180 µmol/L)	2.5 % (231 µmol/L)	4.0 % (461 µmol/L)
Citrulina	3.8 % (26 µmol/L)	4.6 % (73 µmol/L)	3.8 % (275 µmol/L)
Ácido glutâmico	2.0 % (482 µmol/L)	3.8 % (433 µmol/L)	4.3 % (876 µmol/L)
Glicina	8.3 % (285 µmol/L)	5.9 % (389 µmol/L)	7.2 % (1032 µmol/L)
Leucina	3.4 % (348 µmol/L)	2.0 % (351 µmol/L)	4.3 % (637 µmol/L)
Metionina	4.7 % (36 µmol/L)	3.3 % (73 µmol/L)	4.3 % (238 µmol/L)

Ornitina	2.3 % (251 µmol/L)	1.9 % (220 µmol/L)	4.0 % (677 µmol/L)
Fenilalanina	1.8 % (117 µmol/L)	2.1 % (196 µmol/L)	4.2 % (572 µmol/L)
Prolina	3.5 % (332 µmol/L)	2.6 % (481 µmol/L)	4.2 % (716 µmol/L)
Tirosina	2.2 % (96 µmol/L)	1.9 % (192 µmol/L)	4.3 % (585 µmol/L)
Valina	3.1 % (221 µmol/L)	1.9 % (267 µmol/L)	4.0 % (520 µmol/L)

Tabela 27: Precisão intra-ensaio, determinação com espectrômetro de massa Waters® Quattro Micro™ API, acilcarnitinas e carnitina livre, n = 10

Substância	Coeficiente de variação (concentração do analito)		
C0-Carnitina	4,7 % (26,4 µmol/L)	3,0 % (48,0 µmol/L)	4.1 % (105 µmol/L)
C2-Carnitina	5,5 % (15,2 µmol/L)	2,7 % (39,5 µmol/L)	2.6 % (81.6 µmol/L)
C3-Carnitina	6,1 % (1,78 µmol/L)	2,7 % (6,54 µmol/L)	2.7 % (15.1 µmol/L)
C4-Carnitina	6,2 % (0,34 µmol/L)	4,9 % (1,15 µmol/L)	4.0 % (4.42 µmol/L)
C5-Carnitina	8,1 % (0,14 µmol/L)	4,0 % (0,60 µmol/L)	3.9 % (2.35 µmol/L)
C5DC-Carnitina	12,2 % (0,19 µmol/L)	12,2 % (0,66 µmol/L)	9.0 % (2.38 µmol/L)
C6-Carnitina	9,6 % (0,06 µmol/L)	3,2 % (0,48 µmol/L)	4.1 % (2.11 µmol/L)
C8-Carnitina	8,5 % (0,10 µmol/L)	3,9 % (0,57 µmol/L)	4.2 % (2.31 µmol/L)
C10-Carnitina	8,2 % (0,16 µmol/L)	3,7 % (0,63 µmol/L)	3.1 % (2.44 µmol/L)
C12-Carnitina	8,1 % (0,07 µmol/L)	3,8 % (0,52 µmol/L)	3.5 % (2.25 µmol/L)
C14-Carnitina	10,3 % (0,10 µmol/L)	4,6 % (0,50 µmol/L)	3.8 % (2.00 µmol/L)
C16-Carnitina	5,7 % (0,72 µmol/L)	4,9% (4,56 µmol/L)	3.3 % (12.2 µmol/L)
C18-Carnitina	6,6 % (0,54 µmol/L)	4,9% (2,26 µmol/L)	5.2 % (7.69 µmol/L)

Tabela 28: Precisão intra-ensaio, determinação com espectrômetro de massa SCIEX API 3200™, acilcarnitinas e carnitina livre, n = 10

Substância	Coeficiente de variação (concentração do analito)		
C0-carnitina	4.0 % (26.5 µmol/L)	3.1 % (40.7 µmol/L)	4.5 % (108 µmol/L)
C2-Carnitina	2.8 % (10.3 µmol/L)	3.2 % (28.5 µmol/L)	4.4 % (75.4 µmol/L)
C3-Carnitina	5.5 % (1.30 µmol/L)	3.1 % (5.84 µmol/L)	4.9 % (16.7 µmol/L)
C4-Carnitina	3.5 % (0.19 µmol/L)	3.3 % (1.04 µmol/L)	5.5 % (4.84 µmol/L)
C5-carnitina	6.6 % (0.09 µmol/L)	2.9 % (0.60 µmol/L)	4.9 % (2.70 µmol/L)
C5DC-carnitina	9.0 % (0.16 µmol/L)	8.7 % (0.58 µmol/L)	5.1 % (2.16 µmol/L)
C6-Carnitina	9.4 % (0.04 µmol/L)	2.5 % (0.49 µmol/L)	4.7 % (2.43 µmol/L)
C8-Carnitina	3.0 % (0.04 µmol/L)	4.6 % (0.51 µmol/L)	4.1 % (2.53 µmol/L)
C10-Carnitina	3.1 % (0.08 µmol/L)	4.9 % (0.50 µmol/L)	6.0 % (2.47 µmol/L)
C12-Carnitina	6.8 % (0.04 µmol/L)	4.1 % (0.47 µmol/L)	5.8 % (2.36 µmol/L)
C14-Carnitina	7.8 % (0.08 µmol/L)	4.6 % (0.52 µmol/L)	3.9 % (2.45 µmol/L)
C16-Carnitina	2.9 % (0.79 µmol/L)	4.2 % (4.91 µmol/L)	5.5 % (14.3 µmol/L)
C18-Carnitina	5.1 % (0.56 µmol/L)	2.8 % (2.54 µmol/L)	5.5 % (9.38 µmol/L)

Precisão inter-ensaios:

A precisão inter-ensaio foi determinada em três concentrações por meio de limpeza múltipla ($n = 10$) do mesmo corpo de prova em 10 séries de ensaios diferentes:

Tabela 29: Precisão entre ensaios, determinação com espectrômetro de massa Waters® Quattro Micro™ API, aminoácidos, $n = 100$

Substância	Coeficiente de variação (concentração da substância a analisar)		
Alanina	6,6 % (281 µmol/L)	7,9 % (390 µmol/L)	5,6 % (745 µmol/L)
Arginina	9,3% (7 µmol/L)	17,6% (12 µmol/L)	10,3% (125 µmol/L)
Ácido aspártico	6,4% (96 µmol/L)	6,7% (147 µmol/L)	6,1% (345 µmol/L)
Citrulina	11,4% (20 µmol/L)	7,6% (61 µmol/L)	5,7% (256 µmol/L)
Ácido glutâmico	6,1% (218 µmol/L)	7,0% (388 µmol/L)	5,4% (749 µmol/L)
Glicina	8,4% (241 µmol/L)	8,3% (336 µmol/L)	6,0% (1085 µmol/L)
Leucina	5,8% (181 µmol/L)	6,3% (281 µmol/L)	5,5% (592 µmol/L)
Metionina	6,7% (19 µmol/L)	6,3% (62 µmol/L)	5,4% (268 µmol/L)
Ornитина	9,4% (95 µmol/L)	8,8% (217 µmol/L)	8,6% (626 µmol/L)
Fenilalanina	5,9% (69 µmol/L)	6,6% (129 µmol/L)	5,0% (566 µmol/L)
Prolina*	7,7% (241 µmol/L)	8,2% (562 µmol/L)	7,1% (869 µmol/L)
Tirosina	5,3% (69 µmol/L)	5,8% (158 µmol/L)	4,9% (488 µmol/L)
Valina	7,3 % (111 µmol/L)	8,2 % (171 µmol/L)	5,7% (365 µmol/L)

* A determinação destes dados foi feita em um SCIEX API 4000™.

Tabela 30: Precisão entre ensaios, determinação com espectrômetro de massas SCIEX API 3200™, aminoácidos, $n = 100$

Substância	Coeficiente de variação (concentração da substância a analisar)		
Alanina	10,1% (392 µmol/L)	10,2 % (411 µmol/L)	7,7 % (752 µmol/L)
Arginina	4,2% (18 µmol/L)	3,6% (80 µmol/L)	3,5% (167 µmol/L)
Ácido aspártico	6,2% (177 µmol/L)	6,3% (231 µmol/L)	4,8% (461 µmol/L)
Citrulina	6,1% (25 µmol/L)	4,6% (73 µmol/L)	5,2% (275 µmol/L)
Ácido glutâmico	5,7% (469 µmol/L)	5,1% (433 µmol/L)	5,9% (876 µmol/L)
Glicina	12,0% (295 µmol/L)	11,9% (389 µmol/L)	10,3% (1032 µmol/L)
Leucina	5,1% (345 µmol/L)	5,5% (351 µmol/L)	5,2% (637 µmol/L)
Metionina	5,7% (35 µmol/L)	5,3% (73 µmol/L)	5,0% (238 µmol/L)
Ornитина	4,8% (236 µmol/L)	3,8% (220 µmol/L)	5,0% (677 µmol/L)
Fenilalanina	5,2% (118 µmol/L)	7,0% (196 µmol/L)	5,4% (572 µmol/L)
Prolina	6,3% (330 µmol/L)	5,3% (481 µmol/L)	5,2% (716 µmol/L)
Tirosina	6,1% (96 µmol/L)	7,3% (192 µmol/L)	5,5% (585 µmol/L)
Valina	6,2% (216 µmol/L)	5,0% (267 µmol/L)	5,4% (520 µmol/L)

Tabela 31: Precisão entre ensaios, determinação com espectrômetro de massa Waters® Quattro Micro™ API, Acilcarnitina e carnitina livre, n = 100

Substância	Coeficiente de variação (concentração do analito)		
C0-Carnitina	6,7 % (26,4 µmol/L)	7,1 % (48,0 µmol/L)	6.1 % (105 µmol/L)
C2-Carnitina	6,1 % (15,2 µmol/L)	6,5 % (39,5 µmol/L)	5.1 % (81.6 µmol/L)
C3-Carnitina	5,8 % (1,78 µmol/L)	6,8 % (6,54 µmol/L)	5.3 % (15.1 µmol/L)
C4-Carnitina	7,0 % (0,34 µmol/L)	6,8 % (1,15 µmol/L)	5.2 % (4.42 µmol/L)
C5-Carnitina	8,5 % (0,14 µmol/L)	7,0 % (0,60 µmol/L)	5.8 % (2.35 µmol/L)
C5DC-Carnitina	14,3 % (0,19 µmol/L)	11,7 % (0,66 µmol/L)	9.0 % (2.38 µmol/L)
C6-Carnitina	13,3 % (0,06 µmol/L)	7,4 % (0,48 µmol/L)	5.6 % (2.11 µmol/L)
C8-Carnitina	9,3 % (0,10 µmol/L)	7,6 % (0,57 µmol/L)	5.6 % (2.31 µmol/L)
C10-Carnitina	7,8 % (0,16 µmol/L)	7,0 % (0,63 µmol/L)	5.5 % (2.44 µmol/L)
C12-Carnitina	9,1 % (0,07 µmol/L)	6,9 % (0,52 µmol/L)	5.7 % (2.25 µmol/L)
C14-Carnitina	8,8 % (0,10 µmol/L)	7,1 % (0,50 µmol/L)	6.1 % (2.00 µmol/L)
C16-Carnitina	6,4 % (0,72 µmol/L)	6,6 % (4,56 µmol/L)	5.5 % (12.2 µmol/L)
C18-Carnitina	6,3 % (0,54 µmol/L)	6,8 % (2,26 µmol/L)	5.5 % (7.69 µmol/L)

Tabela 32: Precisão entre ensaios, determinação com espectrômetro de massas SCIEX API 3200™, acilcarnitinas e carnitina livre, n = 100

Substância	Coeficiente de variação (concentração do analito)		
C0-Carnitina	6,4 % (26,5 µmol/L)	5.0 % (40.7 µmol/L)	5.3 % (108 µmol/L)
C2-Carnitina	5,4 % (10,2 µmol/L)	5.1 % (28.5 µmol/L)	5.4 % (75.4 µmol/L)
C3-Carnitina	5,9 % (1,27 µmol/L)	5.3 % (5.84 µmol/L)	5.8 % (16.7 µmol/L)
C4-Carnitina	6,6 % (0,18 µmol/L)	5.2 % (1.04 µmol/L)	5.8 % (4.84 µmol/L)
C5-Carnitina	7,6 % (0,08 µmol/L)	5.3 % (0.60 µmol/L)	6.0 % (2.70 µmol/L)
C5DC-Carnitina	13,7 % (0,18 µmol/L)	8.9 % (0.58 µmol/L)	6.6 % (2.16 µmol/L)
C6-Carnitina	9,8 % (0,04 µmol/L)	5.6 % (0.49 µmol/L)	5.5 % (2.43 µmol/L)
C8-Carnitina	6,8 % (0,04 µmol/L)	5.8 % (0.51 µmol/L)	5.4 % (2.53 µmol/L)
C10-Carnitina	6,1 % (0,08 µmol/L)	6.1 % (0.50 µmol/L)	5.7 % (2.47 µmol/L)
C12-Carnitina	7,2 % (0,04 µmol/L)	6.0 % (0.47 µmol/L)	5.7 % (2.36 µmol/L)
C14-Carnitina	7,0 % (0,08 µmol/L)	5.9 % (0.52 µmol/L)	5.0 % (2.45 µmol/L)
C16-Carnitina	5,7 % (0,77 µmol/L)	5.1 % (4.91 µmol/L)	4.8 % (14.3 µmol/L)
C18-Carnitina	5,1 % (0,54 µmol/L)	4.8 % (2.54 µmol/L)	4.9 % (9.38 µmol/L)

Esses dados foram estabelecidos em nosso laboratório exclusivamente para verificar o desempenho do kit de reagentes e para atender aos requisitos regulamentares. Enfatizamos particularmente que esses dados não são adequados para comparar os sistemas de medição utilizados, nem para fazer qualquer afirmação sobre seu desempenho geral.

IIIb: Preparo com succinilacetona

Perdas decorrentes da preparação:

As perdas por preparo foram determinadas a partir das razões de inclinação das amostras de sangue total seco que foram cravadas antes e após o preparo da amostra.

As perdas resultantes da preparação são especificadas como taxa de recuperação absoluta.

Tabela 33: Perdas por preparação, determinação com Espectrômetro de massa da Waters® ACQUITY™ TQD

Substância	Taxa de recuperação	Substância	Taxa de recuperação
Alanina	119 %	C0-Carnitina	92 %
Arginina	74 %	C2-Carnitina	89 %
Ácido aspártico	108 %	C3-Carnitina	92 %
Citrulina	130 %	C4-Carnitina	92 %
Ácido glutâmico	113 %	C5-Carnitina	96 %
Glicina	119 %	C5DC-Carnitina	103 %
Leucina	111 %	C6-Carnitina	99 %
Metionina	102 %	C8-Carnitina	100 %
Ornитина	85 %	C10-Carnitina	98 %
Fenilalanina	114 %	C12-Carnitina	91 %
Prolina	107 %	C14-Carnitina	92 %
Tirosina	119 %	C16-Carnitina	96 %
Valina	111 %	C18-Carnitina	96 %
Succinilacetona	41 %	—	—

Recuperação:

A recuperação relativa foi determinada com a matriz de sangue total. Para este fim, amostras individuais foram fortificadas repetidamente com os analitos e amostras de sangue em papel-filtro foram produzidas. Três níveis de concentração dentro das faixas de trabalho dos analitos foram investigados para este fim. A recuperação é calculada usando a seguinte fórmula:

$$\text{Recuperação [%]} = \frac{\text{concentração medida em amostra fortificada} - \text{concentração medida em amostra simples}}{\text{concentração de referência}} \times 100$$

Quadro 34: Taxas de recuperação, determinação com espectrômetro de massa Waters® ACQUITY™ TQD, aminoácidos

Substância	Taxa de recuperação no sangue seco (concentração aumentada)		
Alanina	94 % (124 µmol/L)	96 % (243 µmol/L)	113 % (344 µmol/L)
Arginina	103 % (49,6 µmol/L)	94 % (108 µmol/L)	108 % (147 µmol/L)
Ácido aspártico	108 % (45,4 µmol/L)	94 % (106 µmol/L)	114 % (144 µmol/L)
Citrulina	107 % (44,5 µmol/L)	95 % (98,9 µmol/L)	109 % (136 µmol/L)

Ácido glutâmico	90 % (112 µmol/L)	91 % (231 µmol/L)	105 % (329 µmol/L)
Glicina	98 % (95,7 µmol/L)	99 % (195 µmol/L)	115 % (274 µmol/L)
Leucina	98 % (41,7 µmol/L)	99 % (83.4 µmol/L)	114 % (121 µmol/L)
Metionina	98 % (35,8 µmol/L)	98 % (72.2 µmol/L)	110 % (102 µmol/L)
Ornitina	110 % (37,8 µmol/L)	94 % (87.4 µmol/L)	113 % (112 µmol/L)
Fenilalanina	100 % (53,0 µmol/L)	98 % (107 µmol/L)	110 % (153 µmol/L)
Prolina	101 % (39,0 µmol/L)	96 % (81.8 µmol/L)	114 % (114 µmol/L)
Tirosina	97 % (55,3 µmol/L)	96 % (112 µmol/L)	110 % (158 µmol/L)
Valina	97 % (36,7 µmol/L)	99 % (73.3 µmol/L)	114 % (106 µmol/L)
Succinilacetona	95 % (2,31 µmol/L)	96 % (4.57 µmol/L)	105 % (6.60 µmol/L)

Quadro 35: Taxas de recuperação, determinação com espectrômetro de massa Waters® ACQUITY™ TQD, acilcarnitinas

Substântivo	Taxa de recuperação no sangue seco (concentração aumentada)		
C0-Carnitina	100 % (24.1 µmol/L)	98 % (48,6 µmol/L)	110 % (65.6 µmol/L)
C2-Carnitina	101 % (29.0 µmol/L)	97 % (58,1 µmol/L)	107 % (77.8 µmol/L)
C3-Carnitina	101 % (3.79 µmol/L)	97 % (7,71 µmol/L)	107 % (10.4 µmol/L)
C4-Carnitina	101 % (4.79 µmol/L)	97 % (9,74 µmol/L)	108 % (13.1 µmol/L)
C5-Carnitina	100 % (2.62 µmol/L)	96 % (5,34 µmol/L)	107 % (7.17 µmol/L)
C5DC-Carnitina	100 % (1.85 µmol/L)	96 % (3,77 µmol/L)	106 % (4.98 µmol/L)
C6-Carnitina	102 % (2.42 µmol/L)	96 % (4,98 µmol/L)	106 % (6.70 µmol/L)
C8-Carnitina	101 % (2.33 µmol/L)	97 % (4,76 µmol/L)	107 % (6.38 µmol/L)
C10-Carnitina	102 % (1.99 µmol/L)	98 % (4,06 µmol/L)	106 % (5.52 µmol/L)
C12-Carnitina	102 % (2.40 µmol/L)	99 % (4,88 µmol/L)	106 % (6.69 µmol/L)
C14-Carnitina	104 % (2.23 µmol/L)	99 % (4,57 µmol/L)	107 % (6.30 µmol/L)
C16-Carnitina	105 % (8.81 µmol/L)	101 % (17,8 µmol/L)	106 % (24.9 µmol/L)
C18-Carnitina	109 % (4.37 µmol/L)	103 % (8,94 µmol/L)	106 % (12.9 µmol/L)

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

A linearidade para amostras de sangue em papel-filtro foi determinada por amostras de sangue total com quantidades definidas de substâncias-padrão e diluições com matriz livre de analito. Amostras de sangue em papel-filtro foram produzidas a partir dos respectivos níveis. O limite inferior de quantificação (LLOQ) para amostras de sangue em papel-filtro foi determinado pela diluição definida das amostras 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).

Quadro 36: Limite de quantificação e linearidade, determinação com espectrômetro de massa Waters® ACQUITY™ TQD, aminoácidos

Substância	LLOQ	Intervalo linear até pelo menos
Alanina	12 µmol/L	7000 µmol/L
Arginina	7 µmol/L	2500 µmol/L

Ácido aspártico	9 µmol/L	2500 µmol/L
Citrulina	1 µmol/L	2500 µmol/L
Ácido glutâmico	7 µmol/L	7000 µmol/L
Glicina	10 µmol/L	7000 µmol/L
Leucina	4 µmol/L	2500 µmol/L
Metionina	10 µmol/L	2500 µmol/L
Ornitina	3 µmol/L	2500 µmol/L
Fenilalanina	2 µmol/L	2500 µmol/L
Prolina	6 µmol/L	2500 µmol/L
Tirosina	4 µmol/L	2500 µmol/L
Valina	3 µmol/L	2500 µmol/L
Succinilacetona	0,6 µmol/L	120 µmol/L

Quadro 37: Limite de quantificação e linearidade, determinação com espectrômetro de massa Waters® ACQUITY™ TQD, acilcarnitinas e carnitina livre

Substância	LLOQ	Intervalo linear até pelo menos
C0-Carnitina	2,0 µmol/L	120 µmol/L
C2-Carnitina	0,15 µmol/L	400 µmol/L
C3-Carnitina	0,04 µmol/L	50 µmol/L
C4-Carnitina	0,03 µmol/L	50 µmol/L
C5-Carnitina	0,02 µmol/L	25 µmol/L
C5DC-Carnitina	0,03 µmol/L	15 µmol/L
C6-Carnitina	0,01 µmol/L	25 µmol/L
C8-Carnitina	0,01 µmol/L	25 µmol/L
C10-Carnitina	0,01 µmol/L	25 µmol/L
C12-Carnitina	0,01 µmol/L	20 µmol/L
C14-Carnitina	0,02 µmol/L	20 µmol/L
C16-Carnitina	0,02 µmol/L	80 µmol/L
C18-Carnitina	0,1 µmol/L	40 µmol/L

Precisão intra-ensaio:

Os coeficientes de variação foram determinados em três diferentes concentrações por preparação repetida ($n = 21$) da mesma amostra.

Tabela 38: Precisão intra-ensaio, determinação com espectrômetro de massa Waters® ACQUITY™ TQD, aminoácidos, $n= 21$

Substância	Coeficiente de variação (concentração da substância)		
Alanina	3.3 % (614 µmol/L)	4.3 % (434 µmol/L)	5.0 % (864 µmol/L)
Arginina	3.4 % (63.7 µmol/L)	2.8 % (105 µmol/L)	5.1 % (282 µmol/L)
Ácido aspártico	6.3 % (241 µmol/L)	7.8 % (150 µmol/L)	4.3 % (393 µmol/L)
Citrulina	5.4 % (42.9 µmol/L)	8.6 % (65.1 µmol/L)	6.1 % (265 µmol/L)

Ácido glutâmico	3.4 % (644 µmol/L)	4.9 % (442 µmol/L)	6.1 % (739 µmol/L)
Glicina	3.7 % (516 µmol/L)	4.7 % (305 µmol/L)	4.2 % (842 µmol/L)
Leucina	2.5 % (281 µmol/L)	4.3 % (328 µmol/L)	5.1 % (636 µmol/L)
Metionina	4.9 % (35.6 µmol/L)	4.8 % (53.5 µmol/L)	5.3 % (201 µmol/L)
Ornitina	3.5 % (275 µmol/L)	5.1 % (178 µmol/L)	5.0 % (435 µmol/L)
Fenilalanina	2.8 % (153 µmol/L)	4.2 % (130 µmol/L)	4.8 % (537 µmol/L)
Prolina	2.4 % (283 µmol/L)	3.8 % (218 µmol/L)	4.5 % (600 µmol/L)
Tirosina	2.9 % (211 µmol/L)	4.0 % (193 µmol/L)	4.4 % (558 µmol/L)
Valina	2.7 % (212 µmol/L)	4.1 % (240 µmol/L)	4.8 % (469 µmol/L)
Succinylacetone	9.2 % (0.61 µmol/L)	6.9 % (1.59 µmol/L)	5.7 % (5.36 µmol/L)

Tabela 39: Precisão intra-ensaio, determinação com espectrômetro de massas Waters ACQUITY™ TQD, acilcarnitininas e carnitina livre, n = 21®

Substância	Coeficiente de variação (concentração da substância)		
C0-Carnitina	2.7 % (63.9 µmol/L)	3.8 % (53.1 µmol/L)	5.4 % (112 µmol/L)
C2-Carnitina	2.8 % (29.8 µmol/L)	4.2 % (19.6 µmol/L)	5.0 % (54.9 µmol/L)
C3-Carnitina	3.0 % (2.48 µmol/L)	4.0 % (4.41 µmol/L)	4.7 % (12.4 µmol/L)
C4-Carnitina	3.6 % (0.55 µmol/L)	6.1 % (0.93 µmol/L)	5.9 % (4.08 µmol/L)
C5-Carnitina	3.5 % (0.50 µmol/L)	4.3 % (0.54 µmol/L)	3.9 % (2.23 µmol/L)
C5DC-Carnitina	6.7 % (0.17 µmol/L)	6.4 % (0.45 µmol/L)	7.3 % (1.85 µmol/L)
C6-Carnitina	4.6 % (0.16 µmol/L)	4.9 % (0.43 µmol/L)	4.9 % (2.01 µmol/L)
C8-Carnitina	3.5 % (0.21 µmol/L)	4.3 % (0.46 µmol/L)	5.4 % (2.06 µmol/L)
C10-Carnitina	4.0 % (0.16 µmol/L)	5.7 % (0.41 µmol/L)	5.0 % (1.75 µmol/L)
C12-Carnitina	5.3 % (0.14 µmol/L)	5.6 % (0.45 µmol/L)	5.4 % (2.12 µmol/L)
C14-Carnitina	3.6 % (0.30 µmol/L)	5.2 % (0.47 µmol/L)	5.1 % (2.11 µmol/L)
C16-Carnitina	3.4 % (3.23 µmol/L)	5.7 % (4.75 µmol/L)	5.0 % (13.0 µmol/L)
C18-Carnitina	4.3 % (1.49 µmol/L)	5.8 % (2.58 µmol/L)	5.4 % (9.04 µmol/L)

Precisão inter-ensaios:

A determinação da precisão inter-ensaio foi feita em três concentrações diferentes por preparação repetida (n = 8) da mesma amostra com dupla injeção em 20 dias diferentes.

Tabela 40: Precisão entre ensaios, determinação com espectrômetro de massa Waters® ACQUITY™ TQD, aminoácidos, n = 320

Substância	Coeficiente de variação (concentração da substância)		
Alanina	5,5 % (603 µmol/L)	5.6 % (459 µmol/L)	5.5 % (919 µmol/L)
Arginina	6,4 % (60,4 µmol/L)	6.2 % (107 µmol/L)	7.0 % (284 µmol/L)
Ácido aspártico	7,0 % (243 µmol/L)	8.1 % (146 µmol/L)	8.0 % (390 µmol/L)
Citrulina	7,8 % (42,5 µmol/L)	7.2 % (65.4 µmol/L)	6.4 % (268 µmol/L)
Ácido glutâmico	4,9 % (623 µmol/L)	4.6 % (451 µmol/L)	5.8 % (752 µmol/L)

Glicina	5,0 % (513 µmol/L)	4.6 % (310 µmol/L)	5.2 % (854 µmol/L)
Leucina	4,6 % (277 µmol/L)	4.4 % (336 µmol/L)	5.2 % (660 µmol/L)
Metionina	6,7 % (35,4 µmol/L)	5.3 % (53.7 µmol/L)	5.4 % (205 µmol/L)
Ornitina	6,7 % (258 µmol/L)	7.1 % (190 µmol/L)	7.7 % (468 µmol/L)
Fenilalanina	4,9 % (149 µmol/L)	5.1 % (136 µmol/L)	5.5 % (564 µmol/L)
Prolina	4,3 % (280 µmol/L)	4.3 % (226 µmol/L)	5.7 % (628 µmol/L)
Tirosina	4,9 % (209 µmol/L)	4.7 % (194 µmol/L)	5.1 % (571 µmol/L)
Valina	5,7 % (210 µmol/L)	6.0 % (257 µmol/L)	6.2 % (507 µmol/L)
Succinylaceton	10,0 % (0,58 µmol/L)	6.5 % (1.55 µmol/L)	8.6 % (5.75 µmol/L)

Tabela 41: Precisão interensaio, determinação com espectrômetro de massa Waters ACQUITY™ TQD, acilcarnitinas e carnitina livre, n = 320®

Substância	Coeficiente de variação (concentração da substância)		
C0-Carnitina	4,7 % (63,0 µmol/L)	5.1 % (55.1 µmol/L)	5.9 % (118 µmol/L)
C2-Carnitina	4,3 % (29,5 µmol/L)	4.3 % (19.6 µmol/L)	5.4 % (55.9 µmol/L)
C3-Carnitina	4,6 % (2,46 µmol/L)	4.3 % (4.44 µmol/L)	5.4 % (12.7 µmol/L)
C4-Carnitina	5,0 % (0,55 µmol/L)	5.0 % (0.92 µmol/L)	5.8 % (4.11 µmol/L)
C5-Carnitina	5,5 % (0,50 µmol/L)	4.9 % (0.53 µmol/L)	5.2 % (2.22 µmol/L)
C5DC-Carnitina	10,8 % (0,17 µmol/L)	7.5 % (0.44 µmol/L)	6.7 % (1.80 µmol/L)
C6-Carnitina	6,1 % (0,16 µmol/L)	5.2 % (0.43 µmol/L)	5.5 % (2.03 µmol/L)
C8-Carnitina	6,0 % (0,21 µmol/L)	5.0 % (0.45 µmol/L)	5.4 % (2.08 µmol/L)
C10-Carnitina	5,7 % (0,16 µmol/L)	4.8 % (0.41 µmol/L)	5.8 % (1.76 µmol/L)
C12-Carnitina	6,0 % (0,14 µmol/L)	4.7 % (0.45 µmol/L)	6.1 % (2.14 µmol/L)
C14-Carnitina	5,0 % (0,31 µmol/L)	4.7 % (0.47 µmol/L)	6.1 % (2.13 µmol/L)
C16-Carnitina	4,7 % (3,24 µmol/L)	4.8 % (4.71 µmol/L)	6.1 % (13.0 µmol/L)
C18-Carnitina	5,1 % (1,48 µmol/L)	5.2 % (2.53 µmol/L)	6.6 % (8.91 µmol/L)

Robustez:

O efeito de certas modificações na preparação da amostra e na configuração do sistema HPLC foi revisado durante a verificação. O método é robusto dentro das seguintes tolerâncias, desde que a configuração específica permaneça constante ao longo de uma série de medição:

Tabela 42: Intervalos de tolerância do sistema HPLC

HPLC sistema	Range de Tolerância
Volume de Injecção	$\leq 10 \mu\text{L}$

Quadro 43: Intervalos de tolerância para a preparação da amostra

Preparação da amostra	Range de Tolerância
Extração de succinilacetona	+45 a +50 °C e
Temperatura e velocidade de agitação (cap. 5.5.2, passo 4)	500 a 700 rpm

Apêndice IV: Símbolos

Usamos símbolos EN ISO 15223-1 em nossos rótulos, especificações e embalagens. Os significados de cada símbolo são dados na tabela abaixo:

Quadro 44: Símbolos

Símbolo	Significado
	Fabricante
	Data de fabricação
	Validade
	Número do pedido
	Código do lote
	Consulte as instruções de uso
	Limite superior de temperatura: Armazenar abaixo de uma determinada temperatura
	Limite de temperatura: Armazenar dentro de uma determinada faixa de temperatura
	<i>Dispositivo médico para diagnóstico in vitro</i>
	Suficiente para <n> aparelhos
	Número de série