

BIOGENE AMINE
BIOGENIC AMINES
AMINES BIOGÈNES
AMMINE BIOGENE
AMINAS BIÓGENAS



**Manual de Instruções para Análise por
HPLC de VMA, HVA, 5-HIAA em Urina**

somente para uso diagnóstico *in vitro*.

Artigo 1000/C

CE 0123 IVD

ANVISA: 10350840481

Relato de incidentes:

Qualquer incidente grave relacionado ao dispositivo deve ser relatado ao fabricante e à autoridade competente do Estado-Membro em que o usuário e/ou o paciente está estabelecido.

O resumo de segurança e desempenho exigido pelo IVDR 2017/746 Art. 29 está disponível (assim que estiver acessível) via EUDAMED ou, por enquanto, mediante solicitação à Chromsystems.

A Chromsystems Instruments & Chemicals GmbH é certificada de acordo com a ISO 13485 (incluindo MDSAP). Os produtos são produzidos e colocados em circulação de acordo com o regulamento (UE) 2017/746 sobre dispositivos médicos de diagnóstico in vitro (IVDR).

Você pode baixar a declaração de conformidade de acordo com o IVDR no centro de downloads do nosso site.

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

Importado e Distribuído por: Biosys Ltda.

Rua Coronel Gomes Machado 358
24020-112 Niterói
Brasil

Tel: +55 21 3907 2534
CNPJ:02.220.795/0001-79
www.biosys.com.br

Chromsystems Instruments & Chemicals GmbH
Am Haag 12
82166 Gräfelfing
Alemanha

Tel: +49 89 18930-0
Fax: +49 89 18930-299
www.chromsystems.com

Conteúdo Página

1	Informações para Pedidos.....	4
1.1	Kits	4
1.2	Componentes individuais.....	5
1.2.1	Componentes necessários	5
1.2.2	Componentes opcionais	6
2	Introdução	7
2.1	Informações gerais	7
2.2	Princípio do ensaio	8
2.3	Finalidade pretendida	9
2.4	Limitações clínicas	9
3	Sistema HPLC	10
3.1	Equipamentos de uso geral	10
3.2	Parâmetros do instrumento	10
3.3	Coluna HPLC	11
3.4	Ligar o sistema	11
3.5	Influência do potencial de trabalho na detecção eletroquímica	11
3.6	Otimização do potencial de trabalho	12
3.7	Cuidados e manutenção do sistema HPLC	13
3.8	Desligar o sistema	14
4	Separação cromatográfica.....	14
5	Preparo de amostra	14
5.1	Coleta e armazenamento de amostras dos pacientes.....	15
5.2	Reconstituição do Mix de Analitos	16
5.3	Reconstituição do calibrador	17
5.4	Reconstituição dos controles	18
5.5	Procedimento de preparo de amostra	19
5.5.1	Preparo de amostra manual	19
5.5.2	Preparo de amostra semi-automatizado	19
5.6	Estabilidade das amostras preparadas	21
5.7	Manipulação de amostras acima da faixa de medição analítica	23
6	Controle de qualidade	23
7	Aquisição de dados e avaliação	23
7.1	Calibração do sistema de análise	23
7.2	Exemplos de cromatogramas.....	24
7.3	Fatores de conversão	25
7.4	Cálculo manual.....	25
8	Transporte e armazenamento dos componentes do kit	25
9	Descarte dos resíduos	26
10	Intervalos de referência e valores de corte.....	27
11	Teste de interferências.....	27
11.1	Interferências detectadas.....	30
11.2	Interferências não detectadas	30
12	Solução de problemas.....	31
13	Literatura.....	32

Conteúdo	Página
Anexo I Informação de substâncias	34
Anexo II Dados de desempenho analítico	36
Anexo III Dados de desempenho clínico	40
Anexo IV Rastreabilidade do calibrador	43
Anexo V Símbolos	45
Anexo VI Histórico de versões	46

1 Informações para Pedidos

1.1 Kits

Kits de reagente

1000-C	Kit de Reagentes HPLC VMA, HVA, 5-HIAA em urina Conteúdo de kit para 100 análises: (Número de unidades de embalagem/número do pedido/nome/conteúdo por unidade de embalagem)
1 x 1011	Fase Móvel 1000 mL
1 x 1004/B	Padrão Interno VMA, HVA 100 mL
1 x 1033	Mix de Analitos 5 x 1.0 mL (liof.)
1 x 1005	Tampão de Lavagem I 300 mL
2 x 1006	Tampão de Lavagem II 300 mL
1 x 1077	Tampão de Eluição 200 mL
1 x 1013	Finalizador 10 mL
2 x 1008	Colunas de Clean Up de Amostra 50 uns.
1000/B/A1	Kit de Reagentes HPLC VMA, HVA, 5-HIAA em urina Preparo com o Gilson® ASPEC® Conteúdo de kit para 100 análises: (Número de unidades de embalagem/número do pedido/nome/conteúdo por unidade de embalagem)
1 x 1011	Fase Móvel 1000 mL
1 x 1009/T	Padrão de Calibração em Urina 5.0 mL (liof.)
1 x 1044/B/A1	Padrão Interno VMA, HVA 100 mL
1 x 1005	Tampão de Lavagem I 300 mL
1 x 1006/A	Tampão de Lavagem II 450 mL
1 x 1077	Tampão de Eluição 200 mL
1 x 1013	Finalizador 10 mL
1 x 1008/A	Colunas de Clean Up de Amostra com tampas DEC 100 uns.
1000/B/A5	Kit de Reagentes HPLC VMA, HVA, 5-HIAA em urina Preparo com o Gilson® ASPEC® Conteúdo de kit para 500 análises: (Número de unidades de embalagem/número do pedido/nome/conteúdo por unidade de embalagem)
3 x 1011	Fase Móvel 1000 mL
3 x 1009/T	Padrão de Calibração em Urina 5.0 mL (liof.)
2 x 1044/B/A5	Padrão Interno VMA, HVA 250 mL
1 x 1005/A5	Tampão de Lavagem I 1000 mL
2 x 1006/A5	Tampão de Lavagem II 1000 mL
1 x 1077/A5	Tampão de Eluição 1000 mL
1 x 1013/A5	Finalizador 50 mL
5 x 1008/A	Colunas de Clean Up de Amostra com tampas DEC 100 uns.

1000/B/A9	Kit de Reagentes HPLC VMA, HVA, 5-HIAA em urina Preparo com o Gilson® ASPEC®	
Conteúdo de kit para 1000 análises:		
(Número de unidades de embalagem/número do pedido/nome/conteúdo por unidade de embalagem)		
6 x 1011	Fase Móvel	1000 mL
1 x 1009	Padrão de Calibração em Urina	5 x 5.0 mL (lyoph.)
1 x 1044/B/A9	Padrão Interno VMA, HVA	1000 mL
2 x 1005/A5	Tampão de Lavagem I	1000 mL
4 x 1006/A5	Tampão de Lavagem II	1000 mL
2 x 1077/A5	Tampão de Eluição	1000 mL
2 x 1013/A5	Finalizador	50 mL
10 x 1008/A	Colunas de Clean Up de Amostra com tampas DEC	100 uns.

Kit Básico para preparo de amostra:

1000-BK	Kit Básico HPLC VMA, HVA, 5-HIAA em urina	
Conteúdo de kit para 100 preparos de amostra:		
(Número de unidades de embalagem/número do pedido/nome/conteúdo por unidade de embalagem)		
1 x 1004/B	Padrão Interno VMA, HVA	100 mL
1 x 1005	Tampão de Lavagem I	300 mL
2 x 1006	Tampão de Lavagem II	300 mL
1 x 1077	Tampão de Eluição	200 mL
1 x 1013	Finalizador	10 mL
2 x 1008	Colunas de Clean Up de Amostra	50 uns.

1.2 Componentes individuais

1.2.1 Componentes necessários

Para realizar a análise, os componentes da Chromsystems listados neste capítulo são necessários.

Para preparo de amostra:

Produtos CE/IVD

51303/B	Padrão Interno 5-HIAA	5 mL
1004/B	Padrão Interno VMA, HVA	100 mL
1044/B/A1	Padrão Interno VMA, HVA	100 mL
1044/B/A5	Padrão Interno VMA, HVA	250 mL
1044/B/A9	Padrão Interno VMA, HVA	1000 mL
1005	Tampão de Lavagem I	300 mL
1005/A5	Tampão de Lavagem I	1000 mL
1006	Tampão de Lavagem II	300 mL
1006/A	Tampão de Lavagem II	450 mL
1006/A5	Tampão de Lavagem II	1000mL
1077	Tampão de Eluição	200 mL
1077/A5	Tampão de Eluição	1000 mL
1013	Finalizador	10 mL
1013/A5	Finalizador	50 mL
1008	Colunas de Clean Up de Amostra	50 uns.
1008/A	Colunas de Clean Up de Amostra com tampas DEC	100 uns.

Para calibração e controle de qualidade:*Produtos CE/IVD*

1009	Padrão de Calibração em Urina	5 x 5.0 mL (liof.)
1009/T	Padrão de Calibração em Urina	1 x 5.0 mL (liof.)
0040	Controle Endócrino em Urina, Faixa Normal	10 x 8.0 mL (liof.)
0050	Controle Endócrino em Urina, Faixa Patológica	10 x 8.0 mL (liof.)

Para cromatografia:*Produtos CE/IVD*

1011	Fase Móvel	1000 mL
1012	Fase Móvel	10 x 1000 mL
1100/B	Coluna HPLC equilibrada, com cromatograma teste	1 un.

For installation and optimisation of the method:*Produtos CE/IVD*

1033	Mix de Analitos	5 x 1.0 mL (liof.)
------	-----------------	--------------------

1.2.2 Componentes opcionais

Os componentes listados neste capítulo são adequados para uso com o ensaio. No entanto, seu uso é opcional.

Acessórios

15009	Pré-filtro encapsulado em PEEK 5 µm	5 uns.
-------	-------------------------------------	--------

Equipamento geral de laboratório

15010	Carcaça para o Pré-filtro em PEEK	1 un.
33005	Frascos de Reação 1,5 mL, cor âmbar (protegidos da luz)	100 uns.
J0404	Vials de Autosampler vidro âmbar 1,5 mL	100 uns.
J0406	Tampa de Crimp com septa de borracha/PTFE 11 mm	100 uns.
J0601	Vials de Autosampler com gargalo rosqueado, cor âmbar, 1,5 mL	100 uns.
J0504	Tampas de Rosca em PP septa de borracha/PTFE, 9 mm	100 uns.
J0410	Tampas de Rosca em PP septa perfurável de silicone/PTFE, 1,0 mm	100 uns.
42616	Tubos de coleta em PP âmbar, 12 x 75 mm	250 uns.
42618	Tubos de coleta em vidro transparente, 12 x 75 mm	100 uns.

2 Introdução

2.1 Informações gerais

O **ácido vanilmandélico (VMA)** e o **ácido homovanílico (HVA)** são produtos da degradação das catecolaminas adrenalina (sin. epinefrina), noradrenalina (sin. norepinefrina) e dopamina, enquanto o **ácido 5-hidroxiindolacético (5-HIAA)** é um metabólito do neurotransmissor serotonina.

As catecolaminas adrenalina (sin. epinefrina), noradrenalina (sin. norepinefrina) e dopamina, assim como o neurotransmissor serotonina, estão entre as aminas biogênicas produzidas pela descarboxilação enzimática de aminoácidos no organismo. Como mensageiros, elas desempenham um papel fundamental na transmissão de impulsos no sistema nervoso. Ao interagirem com receptores de membrana, cada uma dessas moléculas exerce efeitos complexos, especialmente no sistema cardiovascular. A serotonina também regula a função do sistema gastrointestinal e influencia o humor ao atuar no sistema nervoso central.

Metabolismo

O aminoácido tirosina é convertido em 3,4-di-hidroxifenilalanina (L-DOPA) pela enzima tirosina hidroxilase, que, por sua vez, é convertida em dopamina pela enzima aromática-L-aminoácido descarboxilase. A dopamina é então hidroxilada em L-noradrenalina pela enzima dopamina β -hidroxilase (DBH). A feniletanolamina N-metiltransferase (PNMT) catalisa a metilação da L-noradrenalina em L-adrenalina. A degradação das catecolaminas ocorre em duas etapas: metilação pela catecolamina-O-metiltransferase (COMT) e desaminação pela monoamina oxidase (MAO).

A Figura 1 mostra os produtos de degradação clinicamente relevantes, o ácido homovanílico (HVA) e o ácido vanilmandélico (VMA).

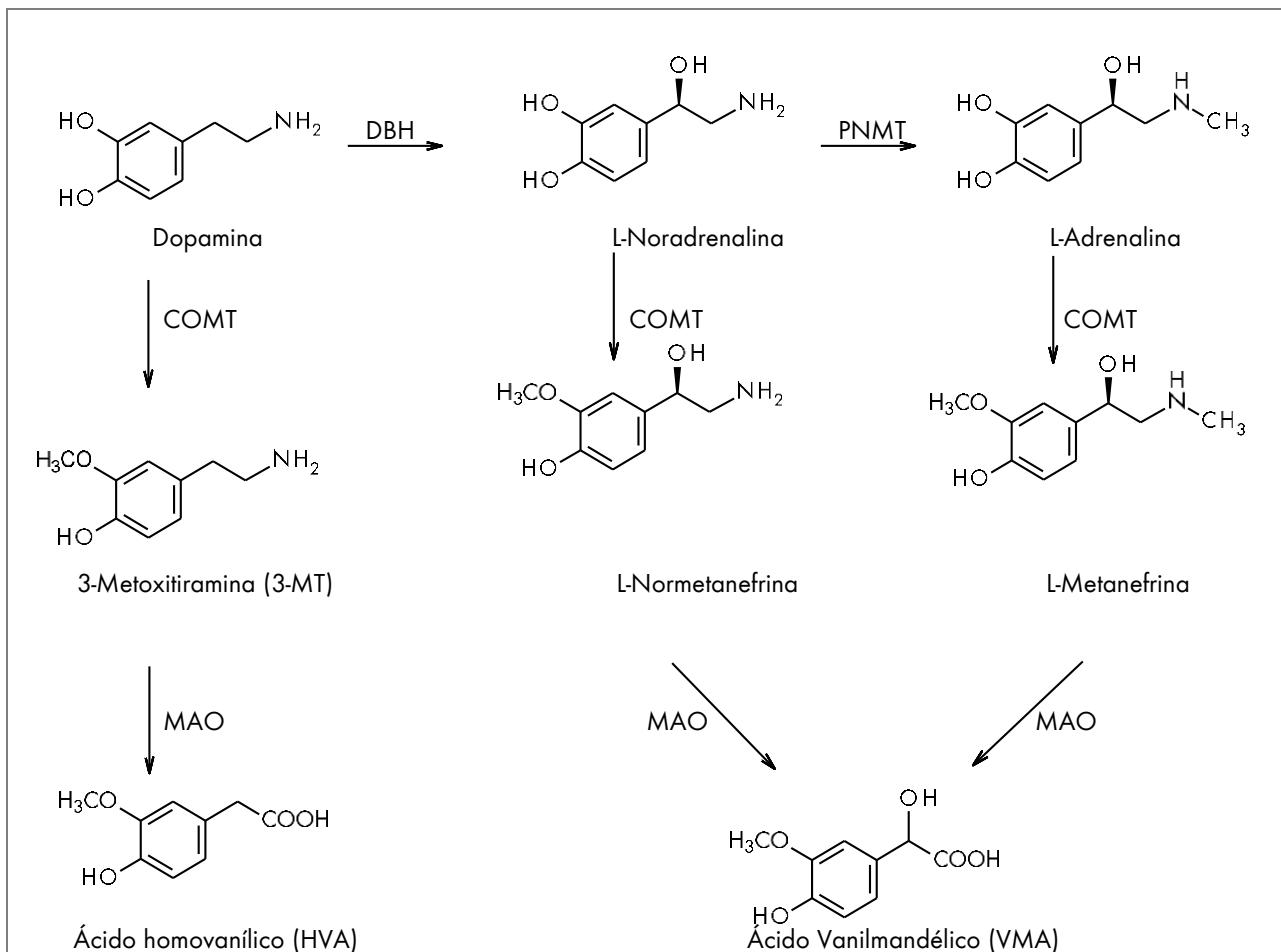


Figura 1: Metabolismo de catecolaminas para HVA e VMA, (modificado de [1])

A síntese da serotonina tem como substrato o aminoácido triptofano, que é convertido em 5-hidroxitriptofano pela enzima L-triptofano-5-hidroxilase e, em seguida, descarboxilado em serotonina pela enzima aromática L-aminoácido descarboxilase. A serotonina é desaminada enzimaticamente pela monoamina oxidase (MAO) em 5-hidroxiindoleacetaldeído e, posteriormente, oxidada pela aldeído desidrogenase (ALDH) no principal produto de excreção, o ácido 5-hidroxiindolacético (5-HIAA) (ver figura 2).

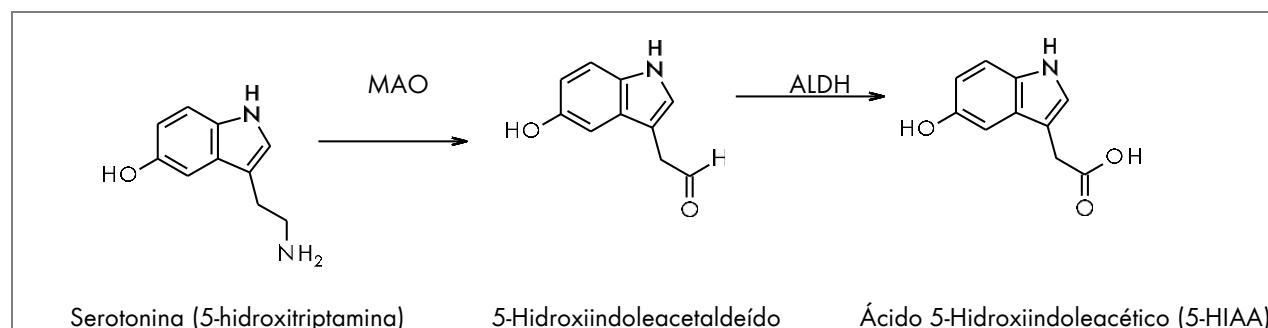


Figura 2: Metabolismo da serotonina em 5-HIAA (modificado de [2])

Importância no diagnóstico

A análise dos metabólitos descritos – ácido vanilmandélico (VMA), ácido homovanílico (HVA) e 5-HIAA – é de particular interesse para o diagnóstico de tumores neuroendócrinos, como neuroblastomas ou carcinoides, e tumores neuroendócrinos secretores de serotonina. Assim como suas células de origem, esses tumores produzem catecolaminas ou serotonina e, consequentemente, seus produtos de degradação também são eliminados em quantidades aumentadas. Sintomas como cefaleia paroxística, sudorese, hipertensão arterial e palpitações, ou rubor facial paroxístico, são diretamente atribuíveis ao aumento da produção e liberação de neurotransmissores.

Neuroblastomas

Os neuroblastomas surgem de células embrionárias do tubo neural e, portanto, são encontrados quase exclusivamente em crianças. Eles podem ocorrer dentro ou fora do rim e produzem catecolaminas [3]. Para o diagnóstico de neuroblastomas, a determinação dos seguintes parâmetros tem se mostrado clinicamente útil [4–10]:

- Normetanefrina livre no plasma e 3-metoxitiramina
- VMA e HVA na urina
- Normetanefrina livre/total e 3-metoxitiramina na urina

Carcinoides e Tumores Neuroendócrinos Secretores de Serotonina

Além disso, há um grupo de tumores neuroendócrinos do trato gastrointestinal que produzem serotonina em excesso, acompanhados por níveis elevados de seu metabólito 5-HIAA, podendo causar sintomas específicos (chamados de síndrome carcinoide). Pacientes com tumores neuroendócrinos avançados e síndrome carcinoide também podem desenvolver cardiopatia carcinoide, uma complicação cardíaca rara e complexa [11–13]. Para o diagnóstico de carcinoides e tumores neuroendócrinos secretores de serotonina, a determinação dos seguintes parâmetros tem se mostrado clinicamente útil [2,14,15]:

- serotonina no soro/plasma/sangue total
- 5-HIAA na urina

2.2 Princípio do ensaio

Este ensaio da Chromsystems permite a determinação quantitativa simultânea de ácido vanilmandélico (VMA), ácido homovanílico (HVA) e 5-HIAA na urina. A preparação da amostra consiste em uma extração em fase sólida eficiente, que pode ser realizada manualmente ou de forma semiautomatizada com um manipulador líquido Gilson® ASPEC®. Os analitos e os padrões internos são então separados cromatograficamente em uma única corrida HPLC isocrática e quantificados usando um detector eletroquímico (ECD). O uso de dois padrões internos garante alta precisão e confiabilidade na quantificação dos analitos. O Padrão Interno 1 (ISTD 1) é usado para a determinação de VMA e HVA, enquanto o Padrão Interno 2 (ISTD 2) é usado para a determinação de 5-HIAA.

Dados detalhados de avaliação de desempenho para este ensaio podem ser encontrados no Anexo II e Anexo III.

2.3 Finalidade pretendida

O ensaio da Chromsystems "VMA, HVA, 5-HIAA na urina" é um dispositivo médico de diagnóstico in vitro para uso profissional em laboratórios clínicos, destinado à determinação quantitativa do ácido vanilmandélico (VMA), ácido homovanílico (HVA) e ácido 5-hidroxiindolacético (5-HIAA) em amostras de urina humana.

A preparação da amostra é realizada manualmente ou de forma semiautomatizada no sistema ASPEC® (sistema simples de manipulação de líquidos), e a separação analítica é feita por cromatografia líquida de alta eficiência com detecção eletroquímica (HPLC-ECD).

O ensaio é destinado a pacientes em que os níveis urinários de ácido vanilmandélico (VMA) e ácido homovanílico (HVA) têm importância clínica, principalmente como auxílio no diagnóstico e monitoramento de suspeita de neuroblastoma.

Além disso, o ensaio é destinado a pacientes em que o nível urinário de ácido 5-hidroxiindolacético (5-HIAA) tem importância clínica, principalmente como auxílio no diagnóstico e monitoramento de suspeita de carcinoides e tumores neuroendócrinos secretores de serotonina.

2.4 Limitações clínicas

Não existem intervalos de referência universalmente aplicáveis para os analitos cobertos no ensaio "VMA, HVA, 5-HIAA na urina". Resultados obtidos com diferentes métodos de teste não podem ser comparados. Os laboratórios devem indicar o método utilizado para análise, a fim de permitir uma interpretação precisa dos resultados.

Os usuários devem definir seus próprios intervalos de referência com base na avaliação clínica. Fatores de conversão entre diferentes métodos de análise não devem ser usados para prever resultados para um paciente específico.

Para aumentar a confiabilidade e minimizar o risco de resultados falso-negativos, testes com resultados limítrofes devem ser repetidos [16]. Além disso, procedimentos diagnósticos de segunda e terceira ordem (por exemplo, histologia, biópsia, ressonância magnética, tomografia computadorizada, ultrassonografia, cintilografia, endoscopia etc.) são recomendados [17].

Este produto de diagnóstico in vitro (IVD) não é adequado para detectar neoplasias neuroendócrinas que são bioquimicamente silenciosas, não funcionantes ou não secretoras. Por exemplo, uma pequena porcentagem de pacientes com neuroblastoma não secreta VMA ou HVA [13].

A detecção de VMA e HVA é limitada a tumores acima do estágio III. Estágios iniciais e tumores pequenos podem não ser detectados. De acordo com a literatura, a excreção renal de VMA e HVA aumenta apenas quando tumores com mais de 5 g estão presentes [13].

O rastreamento de neuroblastoma, incluindo VMA e HVA, não é recomendado para crianças com menos de 1 ano de idade, pois a frequência de neuroblastomas de alto risco não foi reduzida com o rastreamento, e há casos de regressão espontânea [18,19].

Uma única determinação de 5-HIAA na urina pode não ser suficiente para detectar a síndrome carcinoide. Para aumentar a confiabilidade diagnóstica e minimizar o risco de resultados falso-negativos, recomenda-se a determinação múltipla para testes com resultados limítrofes e pacientes com forte evidência clínica [20].

Testes de urina pontuais para VMA podem ter menor taxa de detecção e maior taxa de falso-positivos em comparação com coletas de 24 horas, pois a quantidade de VMA liberada na urina varia ao longo do dia [13].

O 5-HIAA não é recomendado para pacientes em quem se suspeita de carcinoma neuroendócrino digestivo [21].

Pacientes com distúrbios de má absorção, incluindo enteropatia sensível ao glúten (doença celíaca), espru tropical, doença de Whipple, estase intestinal e fibrose cística (obstrução intestinal crônica), podem apresentar valores mais elevados de 5-HIAA [20,22].

Os resultados de pacientes com insuficiência renal podem ser pouco confiáveis devido à influência da função renal comprometida na eliminação urinária [16]. Especialmente para o 5-HIAA urinário, pacientes em diálise ou com insuficiência renal podem apresentar valores mais baixos [20].

Por favor, considere as informações sobre a coleta e armazenamento das amostras do paciente (consulte o capítulo 5.1) e sobre possíveis interferências (consulte o capítulo 11) ao utilizar o ensaio.

3 Sistema HPLC

Cuidado:

Ao utilizar os reagentes, siga as informações de perigo descritas no Anexo I.

3.1 Equipamentos de uso geral

Este capítulo lista todos os equipamentos de uso geral adicionais necessários ou recomendados para a análise de VMA, HVA e 5-HIAA na urina por HPLC utilizando o ensaio 1000-C.

Equipamentos essenciais

- Sistema HPLC isocrático
- Detector eletroquímico (ex. Detector Eletroquímico da Chromsystems CLC 100, no. de pedido 42100)

Para preparo manual de amostra:

- Centrífuga adequada ou manifold de vácuo para cartuchos de SPE

Para preparo semiautomatizado de amostra:

- Gilson® ASPEC® Liquid Handler com racks para entrega de solventes (4 frascos, por exemplo, 250 mL), para tubos de amostragem e rack(s) DEC para cartuchos SPE de 1 mL

Equipamentos opcionais/recomendados

- Autosampler com função de refrigeração
- Compartimento termostatizado para coluna
- Módulo de injeção direta para Gilson® ASPEC® Liquid Handler

3.2 Parâmetros do instrumento

As substâncias são separadas cromatograficamente utilizando uma coluna analítica (número do pedido 1100/B). Mantenha a fase móvel fechada ou coberta, mesmo durante o uso. O uso de um compartimento termostatizado para a coluna evitará variações de temperatura e garantirá estabilidade e reproduzibilidade ideais na separação cromatográfica.

Configurações do instrumento:

Volume de injeção:	10 a 20 µL
Tempo de corrida:	20 min
Taxa de fluxo:	1 mL/min
Temperatura da coluna:	+20 to +25 °C
Solução de limpeza da agulha para o injetor:	água/metanol, 95/5 v/v

3.3 Coluna HPLC

A coluna HPLC para a determinação de VMA, HVA e 5-HIAA é fornecida equilibrada e testada, estando pronta para uso. A pressão de retorno (backpressure) de uma coluna nova, com uma taxa de fluxo de 1,0 mL/min, é de aproximadamente 135 a 180 bar. Essa pressão pode aumentar com o envelhecimento da coluna. Contudo, desde que as separações sejam satisfatórias, um aumento na pressão de retorno não é um problema.

Observação:

Recomendamos o uso de um pré-filtro (Pré-filtro encapsulado em PEEK de 5 µm, número do pedido 15009) para aumentar a vida útil da coluna.

A coluna deve ser lavada apenas com as soluções especificadas neste manual de instruções. Outros solventes podem danificar a coluna de forma irreversível.

3.4 Ligar o sistema

Preparo do Sistema HPLC antes de iniciar uma sequência:

1. Lave o sistema com aproximadamente 15 mL de metanol a 30% sem a coluna HPLC e sem o detector. Além disso, limpe a linha de solvente do autosampler usada para a lavagem externa da agulha com a solução de lavagem (conforme especificado no capítulo 3.2)
2. Em seguida, lave o sistema com aproximadamente 15 mL da Fase Móvel (número do pedido 1011)
3. Instale a coluna (número do pedido 1100/B) e conecte o capilar da saída da coluna à entrada da célula do detector
4. Equilibre o sistema utilizando as condições iniciais do método até que a linha de base esteja estabilizada
5. Injete repetidamente o Mix de Analitos reconstituído (número do pedido 1033, consulte o capítulo 5.2) ou o Padrão de Calibração de Urina preparado (número do pedido 1009, 1009/T, consulte o capítulo 5.5) várias vezes até que os tempos de retenção e as áreas/alturas dos picos dos analitos estejam consistentes
6. Inicie a sequência

Assim que o sistema estiver equilibrado, a fase móvel pode ser recirculada. Recomendamos o uso de uma nova fase móvel após 200 injeções.

Para o uso adequado do seu sistema HPLC, leia o manual de instruções do seu sistema HPLC. Em caso de dúvidas, consulte o fabricante do dispositivo. Pode ser necessário treinamento com o fabricante do dispositivo.

3.5 Influência do potencial de trabalho na detecção eletroquímica

A seleção do potencial de trabalho adequado é extremamente importante para a seletividade da análise. Isso significa, idealmente, escolher um potencial de trabalho que produza o sinal máximo do detector para a substância desejada, mas no qual nenhuma das possíveis substâncias interferentes (substâncias normalmente presentes na matriz da amostra) seja detectada.

A relação entre o sinal do detector e o potencial no eletrodo de trabalho é mostrada na figura abaixo.

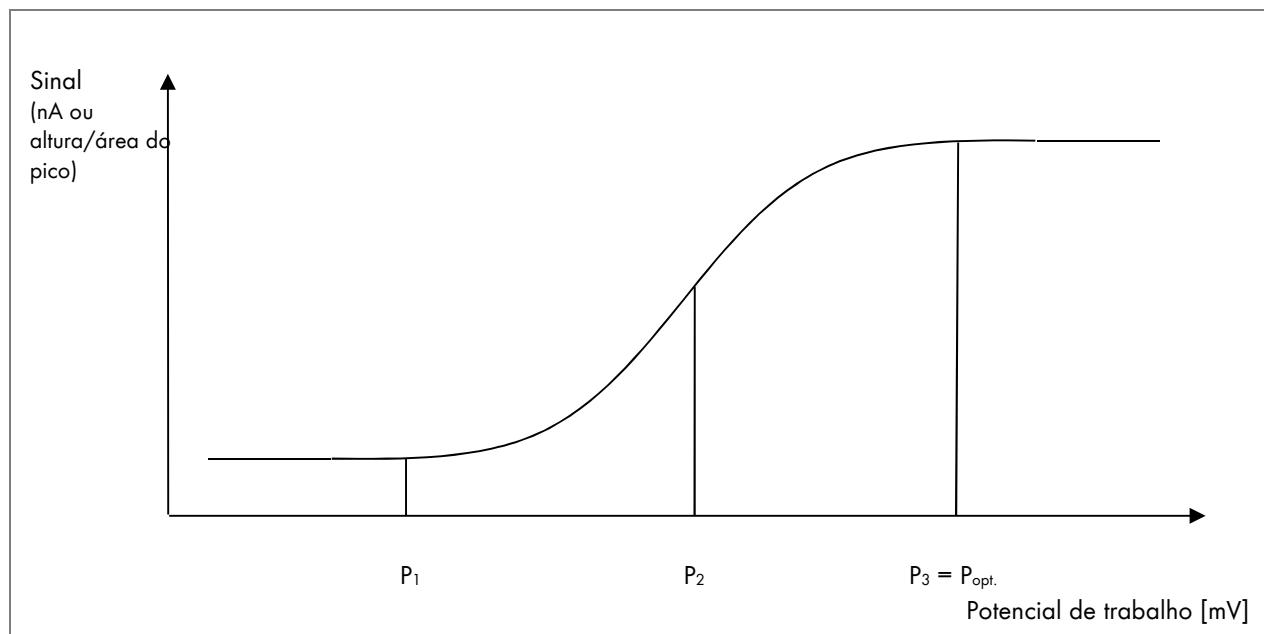


Figura 3: Correlação entre o potencial de trabalho e o sinal do detector

Em um potencial menor que P₁, há energia insuficiente para a transformação eletroquímica das moléculas na superfície do eletrodo de trabalho. Aumentar o potencial para P₂ aumenta a energia disponível, de modo que uma proporção significativa das moléculas que atingem o eletrodo de trabalho será transformada. Aumentar ainda mais o potencial para P₃ fornece energia suficiente para transformar todas as moléculas que atingem o eletrodo de trabalho.

Nenhum aumento adicional no sinal é alcançado ao aumentar o potencial além de P₃. O sinal agora depende apenas da concentração das substâncias no eletrodo (platô dependente da difusão). Como não é possível aumentar o sinal após atingir o platô, não é aconselhável medir em potenciais maiores que P₃. Pelo contrário, em potenciais mais altos, a seletividade será perdida, pois quanto maior a energia disponível, maior será o número de substâncias que serão transformadas eletroquimicamente.

3.6 Otimização do potencial de trabalho

A experiência mostra que a curva sinal/potencial de trabalho (consulte a seção 3.5) para uma determinada substância varia de detector para detector. Isso ocorre porque os sistemas de referência (eletrodos de referência) nos diferentes detectores não são completamente idênticos e, portanto, fornecem potenciais de referência diferentes. Isso significa que o potencial de trabalho ideal para um sistema HPLC com detecção eletroquímica deve ser determinado empiricamente, injetando uma mistura padrão em diferentes potenciais de trabalho. Para otimizar a análise de VMA, HVA e 5-HIAA, as áreas ou alturas dos picos de VMA e do Padrão Interno 1 (ISTD 1) – contidos no Mix de Analitos (número do pedido 1033) – são utilizadas, pois sua transformação eletroquímica requer o maior potencial de trabalho.

O seguinte procedimento é recomendado ao usar o Chromsystems ECD CLC 100:

1. Ajuste o potencial de trabalho para +680 mV e injete a Mix de Analitos (número do pedido 1033). Determine as alturas/áreas dos picos para VMA e ISTD 1.
2. Aumente o potencial de trabalho em 40 mV e injete novamente a Mix de Analitos (número do pedido 1033). Determine as alturas/áreas dos picos para VMA e ISTD 1.
3. Se a altura/área do pico para ISTD 1 for < 70% do pico de VMA → repita o passo 2.
Se a altura/área do pico para ISTD 1 for ≥ 70% do pico de VMA → o potencial de trabalho é ideal.

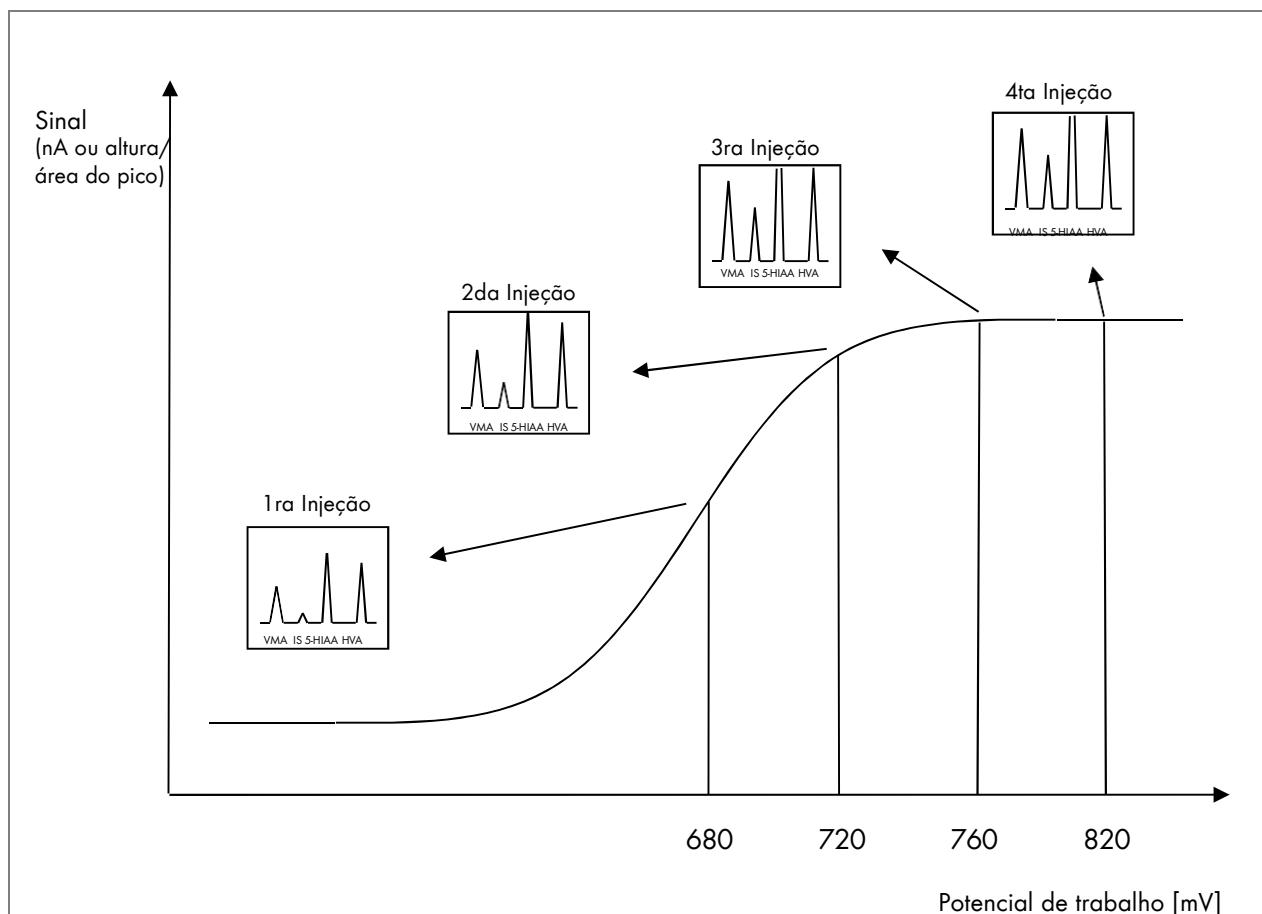


Figura 4: Otimização do potencial de trabalho

O potencial de trabalho ideal determinado por este método geralmente é de +700 a +850 mV (vs. eletrodo de referência Ag/AgCl) ao usar o Chromsystems ECD CLC 100 e não é influenciado pela manutenção rotineira da célula de medição (por exemplo, substituição da solução de KCl, ativação do eletrodo de trabalho). No entanto, após uma perturbação significativa na célula de medição (por exemplo, substituição do eletrodo de referência), a otimização do potencial de trabalho deve ser repetida. Antes de cada série de análises, o calibrador deve ser injetado e o cromatograma comparado com o cromatograma de referência. Em caso de desvio significativo, o potencial deve ser otimizado novamente.

3.7 Cuidados e manutenção do sistema HPLC

O trabalho analítico na faixa de sensibilidade necessária para essas análises requer uma limpeza minuciosa de todos os componentes. Portanto, utilize apenas reagentes e solventes com o grau de pureza apropriado. Especialmente na detecção eletroquímica, até mesmo os menores traços de substâncias eletroquimicamente ativas podem levar a aumentos significativos no ruído de fundo ou a picos adicionais. Na maioria dos casos, os problemas com a detecção eletroquímica resultam da contaminação do sistema HPLC. Para manter a estabilidade e a sensibilidade do seu sistema HPLC, é recomendável realizar manutenções regulares, como passivação, ativação do eletrodo de trabalho e limpeza do eletrodo de referência e do inserto. Consulte o manual do seu detector eletroquímico para os procedimentos relevantes.

A detecção eletroquímica é baseada em uma reação eletroquímica dos analitos na superfície do eletrodo de trabalho. A taxa de reação depende fortemente da velocidade com que os analitos são transportados até o eletrodo. Pulsações da bomba causam um fluxo descontínuo do eluente através da célula de fluxo, resultando em uma taxa de reação irregular dos analitos na superfície do eletrodo e, consequentemente, em uma linha de base muito instável. Para medições de alta sensibilidade, recomenda-se o uso de um amortecedor de pulsação.

3.8 Desligar o sistema

Para pausar a operação, bombeie a Fase Móvel (número do pedido 1011) em uma vazão baixa (por exemplo, 0,2 mL/min) em recirculação. A coluna HPLC e o detector permanecem conectados ao sistema.

Para preparar o sistema para uma mudança de ensaio ou para uma pausa mais longa, remova a coluna HPLC do sistema. A coluna não requer nenhuma medida de lavagem ou preservação. Armazene a coluna na fase móvel a uma temperatura de +20 a +25 °C. Insira uma união para substituir a coluna e lave o sistema com aproximadamente 15 mL de metanol a 30% sem a coluna HPLC.

4 Separação cromatográfica

A tabela a seguir mostra os tempos de retenção aproximados dos analitos com uma vazão de 1,0 mL/min.

Tabela 1: Tempos de retenção

Substância	Tempo de retenção (aprox.)
VMA	2,5 min
ISTD 1 (para VMA e HVA)	3,5 min
5-HIAA	8,6 min
HVA	11,7 min
ISTD 2 (para 5-HIAA)	13,0 min

Os tempos de retenção podem variar ligeiramente, por exemplo, se houver uma mudança na temperatura ambiente, se você usar um novo lote de fase móvel ou se substituir a coluna HPLC. Portanto, utilize um cromatograma de calibração para determinar os valores atuais.

5 Preparo de amostra

Cuidado:

Ao utilizar os reagentes, siga as informações de perigo descritas no Apêndice I.

Importante:

A proteção adequada contra a luz é essencial para todas as amostras, calibrador (número do pedido 1009, 1009/T), controles (número do pedido 0040, 0050), Padrão Interno 5-HIAA (número do pedido 51303/B) e Mistura de Analitos (número do pedido 1033). Nunca os exponha à luz solar direta.

Certifique-se de que o lote de reagentes (incluindo o padrão interno) utilizado para a preparação das amostras, bem como o lote do calibrador e do controle, não sejam alterados durante uma sequência. Se forem necessárias várias garrafas do padrão interno para uma sequência de preparação de amostras, misture-as antes do uso.

5.1 Coleta e armazenamento de amostras dos pacientes

O material investigado é a urina. Normalmente, a urina de 24 horas é utilizada para análise. Se isso for difícil ou impossível, a urina pontual (spot urine) também pode ser usada. Nesse caso, os resultados devem ser relacionados à creatinina.

Diferentes aminas biogênicas, como catecolaminas (adrenalina, noradrenalina e dopamina), metanefrinas (metanefrina, normetanefrina e 3-metoxitiramina) e seus metabólitos (VMA e HVA), bem como serotonina e seu metabólito 5-HIAA, são frequentemente medidos em combinação, e a coleta de urina de 24 horas é demorada e estressante para os pacientes. Consequentemente, é útil ter um procedimento universal de coleta para todos os analitos.

A interseção da faixa de pH ideal para todos os analitos mencionados acima na urina é de pH 2,5 a 5,0, que pode ser alcançada pela adição de ácido clorídrico ou acético ao recipiente de coleta antes da coleta de urina. Nesse pH, não há diferença na estabilidade entre a estabilização com ácido clorídrico ou acético. Alguns analitos também são estáveis em uma faixa de pH mais ampla. No entanto, ácidos oxidantes, como o ácido sulfúrico, não são adequados.

Alguns analitos são sensíveis à luz. Consequentemente, as amostras de urina devem ser protegidas da luz durante a coleta e o armazenamento.

Para atingir a faixa de pH ideal de 2,5 a 5,0, recomenda-se adicionar 9 mL de ácido clorídrico a 20% ao recipiente de coleta protegido da luz antes da coleta de urina, o que também é usado em sistemas comerciais de coleta de urina. Também são comumente usados 10 mL de ácido clorídrico a 10-25% ou 10-20 mL de ácido acético. O pH resultante depende fortemente do volume da urina e da capacidade de tamponamento da urina. Portanto, o pH deve ser verificado quando as amostras chegam ao laboratório.

Amostras de urina de 24 horas de crianças podem ser difíceis de obter e, portanto, podem estar incompletas. A urina pontual é uma alternativa rotineiramente utilizada [13].

A ingestão das seguintes substâncias pode influenciar os resultados da análise:

A ingestão dos seguintes alimentos pode causar níveis elevados de VMA e HVA (potencialmente levando a um diagnóstico falso-positivo de neuroblastoma):
Suco de maçã, bananas e chocolate [18].

A ingestão dos seguintes medicamentos pode causar níveis elevados de VMA (potencialmente levando a um diagnóstico falso-positivo de neuroblastoma):
Drogas psicoativas, incluindo supressores de apetite (por exemplo, cafeína e morfina), antidepressivos tricíclicos (por exemplo, imipramina), alcaloides de Rauwolfia, simpatomiméticos (por exemplo, isoproterenol), neurolépticos (por exemplo, clorpromazina) ou lírio; relaxantes musculares (por exemplo, metocarbamol), histamina, insulina, epinefrina, levodopa, nitroglicerina e sulfonamida [23].

A ingestão dos seguintes medicamentos pode causar níveis diminuídos de VMA (potencialmente levando a um diagnóstico falso-negativo de neuroblastoma):
Anti-hipertensivos (por exemplo, clonidina, guanetidina, reserpina), analgésicos/anti-inflamatórios (por exemplo, salicilatos), dissulfiram, inibidores da monoamina oxidase (MAO) e metildopa [23].

A ingestão dos seguintes alimentos pode causar níveis elevados de 5-HIAA (potencialmente levando a um diagnóstico falso-positivo de carcinoides e tumores neuroendócrinos secretores de serotonina):
Berinjelas, abacates, bananas, castanhas-do-pará, nozes, melões cantaloupe, chocolate, cocos, café e bebidas com cafeína, groselhas, tâmaras, groselhas, toranjas, nozes-pecã, kiwis, melões, ameixas mirabelle, amendoins, nozes-pecã, abacaxi, bananas-da-terra, ameixas, framboesas, chá, tomates, baunilha e nozes [13,15,22].

A ingestão dos seguintes medicamentos pode causar níveis elevados de 5-HIAA (potencialmente levando a um diagnóstico falso-positivo de carcinoides e tumores neuroendócrinos secretores de serotonina):

Drogas psicoativas, incluindo antipsicóticos, antidepressivos tricíclicos, ansiolíticos, nicotina, fenobarbital, estimulantes (por exemplo, cafeína, metanfetamina, fenmetrazina); xaropes para tosse, medicamentos para resfriado e gripe (por exemplo, anti-histamínicos, efedrina-HCl, guaifenesina); analgésicos/anti-inflamatórios, incluindo acetanilida (pró-droga do paracetamol), paracetamol (acetaminofeno), mesalazina (também conhecida como ácido 5-aminosalicílico (5-ASA)), fenacetina ou salicilatos, por exemplo, ácido acetilsalicílico (por exemplo, aspirina); anticoagulantes (por exemplo, cumarina ou varfarina); anti-hipertensivos (por exemplo, fentolamina ou reserpina); relaxantes musculares (por exemplo, mefenesina ou metocarbamol); citostáticos (por exemplo, fluorouracil ou melfalano); antimigrânosos (por exemplo, maleato de metisergida); e antieméticos [2,13,20,22].

A ingestão dos seguintes medicamentos pode causar níveis diminuídos de 5-HIAA (potencialmente levando a um diagnóstico falso-negativo de carcinoides e tumores neuroendócrinos secretores de serotonina):

Ácido acetilsalicílico, clorpromazina, corticotropina, heparina, imipramina, isoniazida, levodopa, metenamina, maleato de metenamina, metildopa, inibidores da MAO, p-clorofenilalanina, fenotiazina, prometazina, ranitidina, estreptozenocina [13,20].

O álcool também pode levar a resultados falso-negativos para 5-HIAA [20].

Os seguintes dados de estabilidade são baseados em investigações internas. Como nem uma dependência do doador na estabilidade é descrita na literatura nem foi encontrada em testes preliminares, uma pool de urina de várias pessoas saudáveis foi analisada após acidificação com ácido clorídrico (HCl) e ácido acético (HOAc), bem como sem acidificação. Em todos os casos, as amostras foram protegidas da luz e hermeticamente fechadas.

Tabela 2: Estabilidade das amostras dos pacientes para a determinação de VMA, HVA e 5-HIAA em urina

Temperatura de armazenamento	Estabilidade				
	pH 1.5 (HCl)	pH 2.5 (HCl)	pH 3.5 (HCl/HOAc)	pH 5.0 (HCl/HOAc)	pH 6.1 (sem acidificação)
+20 a +25 °C	5-HIAA: instável VMA+HVA: 2 semanas	2 semanas	2 semanas	2 semanas	5-HIAA: 5 dias VMA+HVA: 2 semanas
+2 a +8 °C	4 semanas	4 semanas	4 semanas	4 semanas	4 semanas
abaixo -18 °C	4 semanas	4 semanas	4 semanas	4 semanas	4 semanas
Ciclos de congelamento-descongelamento	3 ciclos	3 ciclos	3 semanas	3 ciclos	3 ciclos

Nota importante:

A urina com valor de pH abaixo de 1 não deve ser analisada, pois valores de pH tão baixos levam a recuperações reduzidas na preparação da amostra. Não ajuste o valor do pH com hidróxido de sódio ou outros álcalis, pois altas concentrações de sal também levam a recuperações reduzidas.

Observação:

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

5.2 Reconstituição do Mix de Analitos

O Mix de Analitos da Chromsystems (número do pedido 1033) é destinado à otimização potencial (ver capítulo 3.6) e às medições de inicialização do sistema (ver capítulo 3.4) do seu sistema de análise. Ele contém VMA, HVA, 5-HIAA e o ISTD 1, mas não contém o ISTD 2.

Reconstitua o Mix de Analitos da seguinte forma:

1. Pipete 950 µL de Tampão de Eluição (número do pedido 1077) e 50 µL de Finalizador (número do pedido 1013) no frasco original
2. Reconstitua por 5 minutos a +20 a +25 °C, agitando repetidamente

Verifique se o conteúdo do frasco está homogêneo. Se substâncias não dissolvidas ainda estiverem visíveis, estenda o tempo de reconstituição. Evite a exposição à luz solar direta.

Vida útil do Mix de Analitos após reconstituição:

O Mix de Analitos dissolvido em Tampão de Eluição e Finalizador é estável conforme indicado abaixo, mas não além da data indicada no rótulo:

Tabela 3: Estabilidade do Mix de Analitos após reconstituição

Temperatura de armazenamento	Estabilidade	Outras condições de armazenamento
+2 a +8 °C	5 dias	Protegido da luz, bem fechado

5.3 Reconstituição do calibrador

O Padrão de Calibração de Urina da Chromsystems (número do pedido 1009, 1009/T) é destinado à calibração do seu sistema de análise. O calibrador liofilizado é um calibrador de ponto único. Ele é baseado em urina humana. Após a reconstituição, ele é manuseado da mesma forma que uma amostra de paciente e é analisado sob condições de rotina, de forma análoga ao procedimento de teste respectivo.

Antes da preparação da amostra, reconstitua o calibrador de urina da seguinte forma:

1. Pipete 5,0 mL de água de alta pureza no frasco original
2. Reconstitua por 10 a 15 minutos a +20 a +25 °C, agitando repetidamente

Verifique se o conteúdo do frasco está homogêneo. Se substâncias não dissolvidas ainda estiverem visíveis, estenda o tempo de reconstituição. Evite a exposição à luz solar direta.

De acordo com a ISO 17511, a Chromsystems Instruments & Chemical GmbH sempre se esforça para utilizar o padrão mais alto comercialmente disponível para a rastreabilidade metrológica dos valores dos analitos. Para detalhes, uma cadeia completa de rastreabilidade está disponível (ver Apêndice IV). As concentrações dos analitos no calibrador dependem do lote. Os níveis individuais são fornecidos no folheto do calibrador.

Cuidado:

Este produto foi fabricado a partir de urina humana coletada. Um risco potencial de infecção não pode ser totalmente excluído. Considere todos os produtos contendo material de origem humana como potencialmente infecciosos e tenha o mesmo cuidado no manuseio deste produto como no manuseio de amostras de pacientes potencialmente infecciosas.

Vida útil dos calibradores após reconstituição:

O calibrador dissolvido em água é estável conforme indicado abaixo, mas não além da data indicada no rótulo:

Tabela 4: Estabilidade do calibrador após reconstituição

Temperatura de armazenamento	Estabilidade	Outras condições de armazenamento
+20 a +25 °C	5 dias	Protegido da luz, bem fechado
+2 a +8 °C	5 dias	Protegido da luz, bem fechado
Abaixo de -18 °C	3 meses	Protegido da luz, bem fechado
Congelamento-descongelamento	3 ciclos	—

Alíquote o calibrador reconstituído antes do primeiro congelamento para evitar ciclos desnecessários de congelamento-descongelamento. Misture bem as alíquotas imediatamente antes do uso.

5.4 Reconstituição dos controles

Os Controles de Urina da Chromsystems (número do pedido 0040, 0050) são destinados a monitorar a exatidão e a precisão de cada sequência analítica. Eles estão disponíveis em dois níveis de concentração diferentes. Os controles liofilizados são baseados em urina humana. Após a reconstituição, eles são manuseados da mesma forma que uma amostra de paciente e são analisados sob condições de rotina, de forma análoga ao procedimento de teste respectivo.

Antes da preparação da amostra, reconstitua os controles de urina da seguinte forma:

1. Pipete 8,0 mL de água de alta pureza no frasco original
2. Reconstitua por 10 a 15 minutos a +20 a +25 °C, agitando repetidamente

Verifique se o conteúdo do frasco está homogêneo. Se substâncias não dissolvidas ainda estiverem visíveis, estenda o tempo de reconstituição. Evite a exposição à luz solar direta.

As concentrações dos analitos nos controles dependem do lote. Os níveis individuais são fornecidos no folheto que acompanha cada controle.

Cuidado:

Este produto foi fabricado a partir de urina humana coletada. Um risco potencial de infecção não pode ser totalmente excluído. Considere todos os produtos contendo material de origem humana como potencialmente infecciosos e tenha o mesmo cuidado no manuseio deste produto como no manuseio de amostras de pacientes potencialmente infecciosas.

Vida útil dos controles após reconstituição:

Os controles dissolvidos em água são estáveis conforme indicado abaixo, mas não além da data indicada no rótulo:

Tabela 5: Estabilidade dos controles após reconstituição para a determinação de VMA, HVA, 5-HIAA em urina

Temperatura de armazenamento	Estabilidade	Outras condições de armazenamento
+20 a +25 °C	5 dias	Protegido da luz, bem fechado
+2 a +8 °C	5 dias	Protegido da luz, bem fechado
Abaixo de -18 °C	3 meses	Protegido da luz, bem fechado
Congelamento-descongelamento	3 ciclos	—

Alíquote os controles reconstituídos antes do primeiro congelamento para evitar ciclos desnecessários de congelamento-descongelamento. Misture bem as alíquotas imediatamente antes do uso.

5.5 Procedimento de preparo de amostra

Antes da preparação da amostra, deixe os reagentes/calibradores/controles/amostras que estão armazenados congelados ou refrigerados atingirem a temperatura ambiente e misture bem.

Pode ocorrer precipitação no Wash Buffer II (nº de pedido 1006, 1006/A e 1006/A5) se ele for armazenado a uma temperatura abaixo da indicada (inferior a +18 °C). Esse processo é reversível quando o tampão é reaquecido, permitindo que seja utilizado sem restrições.

5.5.1 Preparo de amostra manual

Para preparar amostras de pacientes, controles e calibradores para análise, siga os seguintes passos na ordem mencionada:

Tamponamento da amostra de urina/calibrador/controle

1. Transfira 50 µL amostra/calibrador/controle em um frasco adequado (ex. Frascos de Reação, no. de pedido 33005)
2. Adicione 1,0 mL de Padrão Interno VMA, HVA (no. de pedido 1004/B, contém ISTD 1)
3. Adicione 50 µL de Padrão Interno 5-HIAA (no. de pedido 51303/B, contém ISTD 2) *
4. Agite brevemente

Extração de amostra com Colunas de Clean Up de Amostra

5. Aplique todo o volume da amostra/calibrador/controle tamponado em uma Coluna de Clean Up de Amostra (número do pedido 1008), centrifugue (1 minuto a 700 x g) ou aspire, e descarte o efluente
6. Aplique 3,0 mL do Tampão de Lavagem I (número do pedido 1005) na Coluna de Clean Up de Amostra, centrifugue (1 minuto a 700 x g) ou aspire, e descarte o efluente
7. Aplique 3,0 mL do Tampão de Lavagem II (número do pedido 1006) na Coluna de Clean Up de Amostra, centrifugue (1 minuto a 700 x g) ou aspire, e descarte o efluente.
8. Repita o passo 7
9. Aplique 2 mL do Tampão de Eluição (número do pedido 1077) na Coluna de Clean Up de Amostra, centrifugue (1 minuto a 700 x g) ou aspire, e colete o eluato

Preparação contínua da amostra antes da injeção

10. Adicione 100 µL do Finalizador (número do pedido 1013) ao eluato, misture brevemente
11. Injete 10 a 20 µL no sistema de HPLC

* O uso do Padrão Interno 5-HIAA (número do pedido 51303/B) é necessário apenas para a determinação de 5-HIAA. O passo 3 pode ser omitido se apenas VMA e/ou HVA forem determinados.

5.5.2 Preparo de amostra semi-automatizado

As informações a seguir podem não ser suficientes para instalar o método no Gilson® ASPEC®. Consulte o manual de operação do seu sistema. Em caso de dúvidas, entre em contato com o fabricante do instrumento. Pode ser necessário treinamento fornecido pelo fabricante.

Posicione o Gilson® ASPEC® em uma área bem ventilada, pois vapores perigosos podem escapar de recipientes de reagentes abertos.

Para o preparo semi-automatizado de amostras com o Gilson® ASPEC®, os seguintes volumes de reagentes **por amostra** são necessários:

Tabela 6: Volumes de reagentes necessários

Reagente	Quantidade
Padrão Interno VMA, HVA (no. de pedido 1044/B/A1, 1044/B/A5, 1044/B/A9)	1,0 mL

Padrão Interno 5-HIAA (no. de pedido 51303/B)*	50 µL
Tampão de Lavagem I (no. de pedido 1005, 1005/A5)	2,0 mL

Reagente	Quantidade
Tampão de Lavagem II (no. de pedido 1006/A, 1006/A5)	4.0 mL
Tampão de Eluição (no. de pedido 1077, 1077/A5)	2.0 mL
Finalizador (no. de pedido 1013, 1013/A5)	100 µL

* O uso do Padrão Interno 5-HIAA (número do pedido 51303/B) é necessário apenas para a determinação de 5-HIAA.

Cada frasco de solvente deve conter volume suficiente para o número de amostras a serem preparadas, além de um volume adicional, dependendo do recipiente utilizado.

Atenção:

Cada tipo de manipulador de líquidos Gilson® ASPEC® é diferente em relação ao recipiente utilizado. Portanto, o usuário deve verificar individualmente a quantidade de transbordo necessária para o recipiente utilizado. Recomendamos o uso de recipientes com aberturas pequenas para minimizar a evaporação.

Para preparar amostras de pacientes, calibradores e controles para análise, o manipulador de líquidos deve realizar as seguintes etapas na ordem indicada:

Tamponamento da amostra de urina/calibrador/controle

1. Pipetar 1,0 mL do Padrão Interno VMA, HVA (número do pedido 1044/B/A1, 1044/B/A5, 1044/B/A9, contém ISTD 1) em um frasco protegido da luz* adequado
2. Adicionar 50 µL do Padrão Interno 5-HIAA (número do pedido 51303/B, contém ISTD 2)**
3. Adicionar 50 µL da amostra/calibrador/controle
4. Misturar

Extração da amostra com Colunas de Clean Up de Amostra

5. Transferir as amostras/calibradores/controle tamponados (1,1 mL) para uma Coluna de Limpeza de Amostra (número do pedido 1008/A), empurrar através (pressão positiva), descartar o efluente
6. Aplicar 2,0 mL do Tampão de Lavagem I (número do pedido 1005, 1005/A5) na Coluna de Limpeza de Amostra, empurrar através (pressão positiva), descartar o efluente
7. Aplicar 2,0 mL do Tampão de Lavagem II (número do pedido 1006/A, 1006/A5) na Coluna de Limpeza de Amostra, empurrar através (pressão positiva), descartar o efluente
8. Repetir o passo 7
9. Aplicar 2,0 mL do Tampão de Eluição (número do pedido 1077, 1077/A5) na Coluna de Limpeza de Amostra, empurrar através (pressão positiva), coletar o eluato em um tubo protegido da luz*** adequado (por exemplo, Tubos de Coleta, número do pedido 42616)

Preparação contínua da amostra antes da injeção

10. Adicionar 100 µL do Finalizador (número do pedido 1013, 1013/A5) ao eluato, misturar brevemente
11. Injetar 20 µL do eluato no sistema de HPLC.

* A proteção contra a luz nesta etapa é obrigatória se 5-HIAA for determinado.

** O uso do Padrão Interno 5-HIAA (número do pedido 51303/B) é necessário apenas para a determinação de 5-HIAA. A etapa 2 pode ser omitida se apenas VMA e/ou HVA forem determinados.

*** A proteção contra a luz nesta etapa é necessária apenas se os eluatos não forem injetados diretamente no sistema de HPLC pelo manipulador de líquidos.

Tabela 7: Estabilidade dos reagentes/amostras de pacientes/calibradores/controles se armazenados abertos no manipulador de líquidos Gilson® ASPEC®

Produto/amostra	Estabilidade de +20 a +25°C	Outras condições de armazenamento
-----------------	--------------------------------	-----------------------------------

Padrão Interno VMA, HVA (no. de pedido 1044/B/A1, 1044/B/A5, 1044/B/A9)	72 hours	—
Padrão Interno 5-HIAA (order no. 51303/B)	72 hours	Proteção da luz obrigatória

Produto/amostra	Estabilidade de +20 a +25°C	Outras condições de armazenamento
Tampão de Lavagem I (no. de pedido 1005, 1005/A5)*	24 hours	—
Tampão de Lavagem II (no. de pedido 1006/A, 1006/A5)	72 hours	—
Tampão de Eluição (no. de pedido 1077, 1077/A5)	72 hours	—
Finalizador (no. de pedido 1013, 1013/A5)	72 hours	—
Amostras de paciente	18 hours	Proteção da luz obrigatória
Padrão de Calibração em Urina (no. de pedido 1009, 1009/T)	18 hours	Proteção da luz obrigatória
Controles Endócrinos em Urina (no. de pedido 0040, 0050)	18 hours	Proteção da luz obrigatória

* Sempre descarte os resíduos do Tampão de Lavagem I antes de reabastecer o reservatório.

5.6 Estabilidade das amostras preparadas

As amostras preparadas para análise, conforme indicado no capítulo 5.5, têm a seguinte vida útil:

Tabela 8: Estabilidade das amostras preparadas

Temperatura de armazenamento	Estabilidade	Outras condições de armazenamento
+20 a +25°C	7 dias	Protegido da luz, bem fechado, vials de vidro
+2 a +8 °C	7 dias	Protegido da luz, bem fechado, vials de vidro

Se as amostras preparadas de forma semiautomática não forem injetadas diretamente, elas podem ser transferidas para frascos de vidro protegidos da luz e bem fechados imediatamente após o preparo. Nesse caso, elas permanecem estáveis conforme indicado na Tabela 8.

Amostras preparadas de forma semiautomática que são armazenadas abertas no sistema Gilson® ASPEC® por até 24 ou 48 horas têm a seguinte vida útil após a remoção:

Tabela 9: Estabilidade das amostras preparadas semi-automaticamente

Condições antes da remoção do Gilson® ASPEC®	Vida útil restante após a remoção do Gilson® ASPEC® na temperatura especificada e sob as condições especificadas
48 horas a +20 a +25°C Proteção contra luz, abertas em tubos de polipropileno âmbar*	48 horas a +20 a +25°C ou 48 horas a +2 a +8°C Proteção contra luz, vials de vidro bem fechados
24 horas a +20 a +25°C Sem proteção contra luz, abertas em tubos de vidro transparentes **	48 horas a +20 a +25°C ou 48 horas a +2 a +8°C Proteção contra luz, vials de vidro bem fechados
48 horas a +20 a +25°C Sem proteção contra luz, abertas em tubos de vidro	24 horas a +20 a +25°C ou 24 horas a +2 a +8°C Proteção contra luz, vials de vidro bem fechados

transparentes **

- * Tubos de Coleta, PP âmbar (número do pedido 42616)
- ** Tubos de Coleta, vidro transparente (número do pedido 42618)

Importante: Não congele as amostras preparadas.

5.7 Manipulação de amostras acima da faixa de medição analítica

Amostras de pacientes cujas concentrações de analito estejam acima da faixa de medição analítica devem ser tratadas da seguinte forma:

Antes do preparo da amostra, dilua a amostra original do paciente com água em uma proporção de até 1:15, de modo que o resultado da análise, independentemente do fator de diluição, esteja dentro da faixa de medição do método. Em seguida, prepare as amostras conforme descrito no capítulo 5.5.

Ao calcular as concentrações dos analitos nas amostras, o fator de diluição deve ser levado em consideração.

6 Controle de qualidade

Monitore a exatidão e a precisão das análises incluindo controles (número do pedido 0040, 0050) em cada execução analítica, pelo menos uma vez durante e no final de uma série de amostras. Se a análise desses controles apresentar valores fora da faixa indicada na folha de informações do produto, verifique o sistema e tome as medidas apropriadas. Se a discrepância persistir, recalibre o sistema.

Monitore a qualidade da separação cromatográfica comparando os tempos de retenção e os formatos dos picos cromatográficos dos analitos e padrões internos com o cromatograma do certificado da coluna ou com o cromatograma de exemplo (capítulo 7.2). No caso de uma coluna em uso, compare com execuções analíticas anteriores do mesmo ensaio (por exemplo, durante a inicialização do sistema, capítulo 3.4). Desvios significativos podem ser devidos à diminuição do desempenho da coluna analítica. Indicadores típicos seriam o alargamento ou cauda dos picos.

Para mais informações, consulte o capítulo 12 – Solução de problemas.

7 Aquisição de dados e avaliação

7.1 Calibração do sistema de análise

Execute uma calibração do sistema de análise para cada série de medições. Use o Padrão de Calibração de Urina (número do pedido 1009, 1009/T) para esse fim. As concentrações dos analitos no calibrador são dependentes do lote. Os níveis exatos são fornecidos na folha de instruções do produto.

As curvas de calibração são construídas calculando a razão entre a área ou altura do pico do analito e do padrão interno (ISTD) no eixo y, em relação à concentração do calibrador no eixo x. Em seguida, plote uma curva de calibração passando pela origem para todos os analitos (calibração de ponto único).

Selecione o método de padrão interno para calibração no seu sistema de análise e defina a concentração dos padrões internos como "1".

7.2 Exemplos de cromatogramas

Os gráficos a seguir fornecem exemplos de cromatogramas gerados usando este método.

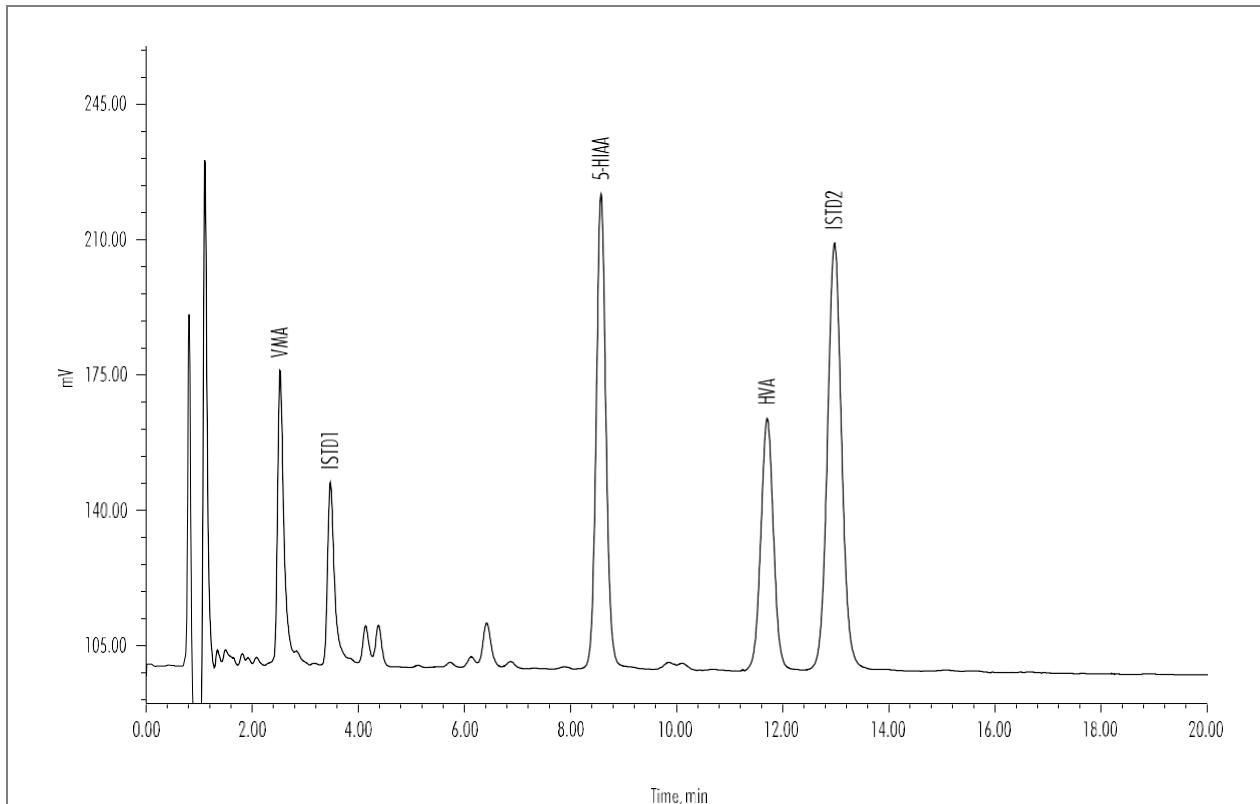


Figura 5: Cromatograma de um Padrão de Calibração de Urina (número do pedido 1009)
Concentração dos analitos: VMA 9,80 mg/L; 5-HIAA 6,35 mg/L; HVA 8,71 mg/L

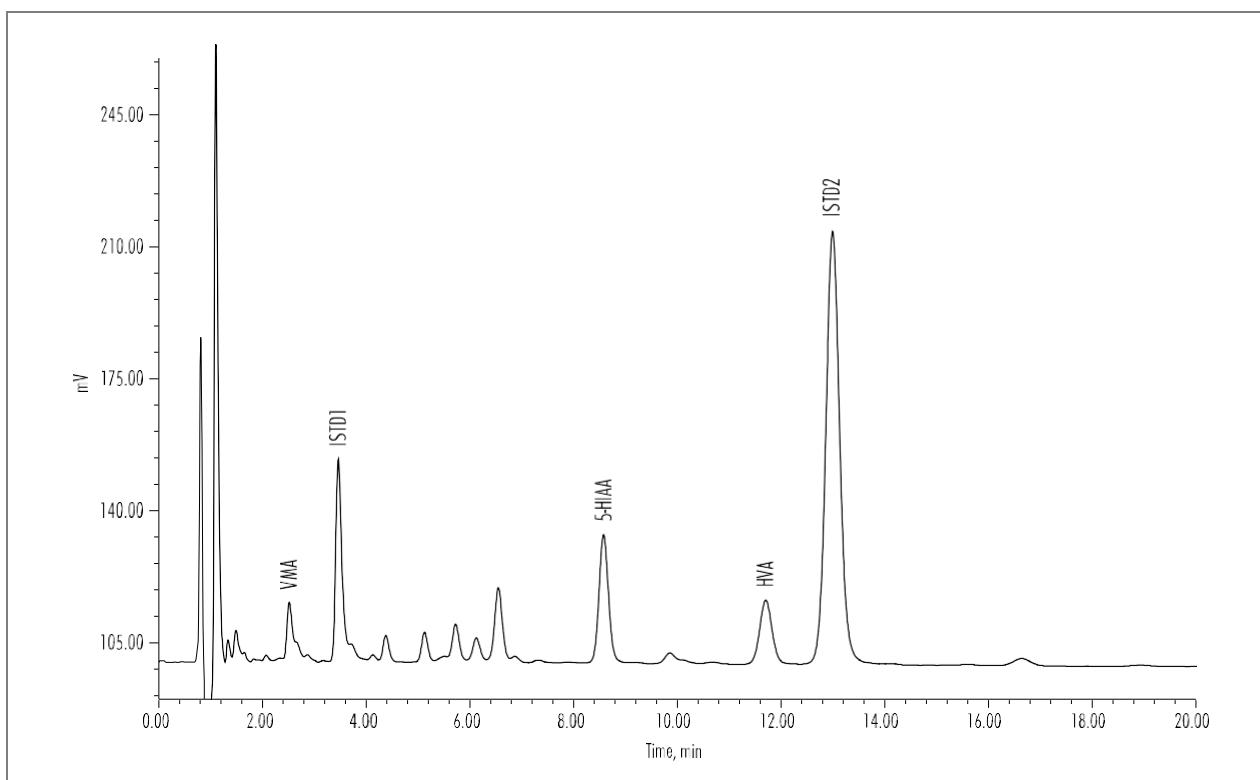


Figura 6: Cromatograma da amostra de paciente
Concentração dos analitos: VMA 1,76 mg/L; 5-HIAA 1,70 mg/L; HVA 2,00 mg/L

7.3 Fatores de conversão

A tabela a seguir lista os fatores de conversão entre concentrações de massa e molar e vice-versa.

Tabela 10: Fatores de conversão

Substância	mg/L a µmol/L mg/24h a µmol/24 h	µmol/L a mg/L mg/24 h µmol/24 h a mg/24 h
VMA	x 5,046	x 0,1982
HVA	x 5,489	x 0,1822
5-HIAA	x 5,231	x 0,1912

Para a conversão de dados com referência à creatinina, aplicam-se os seguintes fatores de conversão.

Tabela 11: Fatores de conversão com referência à creatinina

Substância	mg/g creatinina a µmol/mol creatinina	µmol/mol creatinina a mg/g creatinina
VMA	x 0.5708	x 1.752
HVA	x 0.6209	x 1.610
5-HIAA	x 0.5917	x 1.690

7.4 Cálculo manual

Para o cálculo manual, os seguintes dados são necessários:

- Área/altura do pico da substância A no cromatograma da amostra $=A_{amostra}$
- Área/altura do pico do padrão interno no cromatograma da amostra $=IS_{amostra}$
- Inclinação da curva de calibração $=a$

Calcule a concentração da substância A na amostra (Camostra) da seguinte forma:

$$C_{amostra} = \frac{(A_{amostra} / IS_{amostra})}{a}$$

8 Transporte e armazenamento dos componentes do kit

Fechados e desde que as condições de transporte e armazenamento sejam atendidas, os componentes do ensaio são estáveis até a data de validade indicada no rótulo. Transporte e armazene os componentes sob as seguintes condições:

Tabela 12: Condições de transporte para os kits e componentes individuais

Produto	Temperatura de transporte
Kits de Reagentes (nº de pedido 1000-C, 1000/B/A1, 1000/B/A5, 1000/B/A9)	ambiente
Kit Básico (order no. 1000-BK)	ambiente
Todos os outros componentes listados no capítulo 1	ambiente

Desembale os componentes imediatamente após o transporte e armazene-os individualmente conforme indicado abaixo:

Tabela 13: Condições de armazenamento para os componentes individuais

Produto	Temperatura de armazenamento
Fase Móvel (nº de pedido 1011, 1012)	+18 a +30 °C
Padrão de Calibração em Urina (nº de pedido 1009, 1009/T)	+2 a +8 °C
Padrão Interno VMA, HVA (nº de pedido 1004/B, 1044/B/A1, 1044/B/A5, 1044/B/A9)	+2 a +8 °C
Padrão Interno 5-HIAA (nº de pedido 51303/B)	+2 a +8 °C
Tampão de Lavagem I (nº de pedido 1005, 1005/A5)	+18 a +30 °C
Tampão de Lavagem II (nº de pedido 1006, 1006/A, 1006/A5)	+18 a +30 °C
Tampão de Eluição (nº de pedido 1077, 1077/A5)	+18 a +30 °C
Finalizador (nº de pedido 1013, 1013/A5)	+18 a +30 °C
Controles em Urina (nº de pedido 0040, 0050)	+2 a +8 °C
Mix de Analitos (nº de pedido 1033)	+2 a +8 °C

Feche os reagentes imediatamente após o uso e armazene-os na temperatura especificada. A vida útil dos produtos líquidos em uso é de um ano, mas não se estende além da data de validade indicada. Detalhes sobre a estabilidade da mistura de analitos, calibrador e controles após a reconstituição são fornecidos nos capítulos 5.2, 5.3 e 5.4. Detalhes sobre a estabilidade dos reagentes armazenados abertos no manipulador de líquidos Gilson® ASPEC® são fornecidos no capítulo 5.5.2.

A coluna analítica, colunas de limpeza de amostras, pré-filtro e materiais de laboratório não listados aqui podem ser armazenados a +18 a +30 °C.

A estabilidade em uso da coluna analítica e do pré-filtro depende das condições individuais sob as quais esses componentes são utilizados (por exemplo, frequência de uso, número de amostras, tipo de amostras, volume de injeção). Considere medidas de controle de qualidade (capítulo 6) para identificar a diminuição do desempenho cromatográfico.

9 Descarte dos resíduos

Resíduos perigosos

A Fase Móvel (nº de pedido 1011, 1012) contém solventes orgânicos. Descarte os resíduos do produto em um recipiente de coleta para solventes orgânicos livres de halogênios.

O Tampão de Lavagem II (nº de pedido 1006, 1006/A, 1006/A5) contém uma substância potencialmente prejudicial à fertilidade ou ao feto e deve ser coletado e descartado como resíduo perigoso.

O Finalizador (nº de pedido 1013, 1013/A5) contém uma base forte, e o Tampão de Eluição (nº de pedido 1077, 1077/A5) contém um ácido forte. Neutralize os resíduos desses produtos e descarte-os em um recipiente de coleta para soluções salinas.

Resíduos de amostras de pacientes, amostras preparadas, controles (nº de pedido 0040, 0050) e calibradores (nº de pedido 1009, 1009/T), bem como materiais de laboratório contaminados com material humano, devem ser coletados e descartados como resíduos potencialmente infecciosos.

Resíduos perigosos não devem ser descartados junto com o lixo doméstico. Não descarte na rede de abastecimento de água. O descarte deve ser feito em conformidade com a Diretiva 2008/98/EC sobre Resíduos e com as exigências nacionais e locais. Os recipientes de resíduos devem ser armazenados de forma adequada, e apenas pessoas autorizadas devem ter acesso a eles.

Resíduos não perigosos

O Mix de Analitos (nº de pedido 1033), o Padrão Interno VMA, HVA (nº de pedido 1004/B, 1044/B/A1, 1044/B/A5, 1044/B/A9), o Padrão Interno 5-HIAA (nº de pedido 51303/B), o Tampão de Lavagem I (nº de pedido 1005, 1005/A5), bem como materiais de laboratório não contaminados, não são classificados como perigosos. Descarte-os em conformidade com a Diretiva 2008/98/EC sobre Resíduos e com as exigências nacionais e locais.

10 Intervalos de referência e valores de corte

Os intervalos de referência para as aminas biogênicas variam consideravelmente e são altamente dependentes da idade e do gênero. Recomendamos estabelecer um intervalo de referência específico para cada laboratório. Ao determinar os intervalos, certifique-se de cumprir os requisitos regionais e nacionais..

Nota:

Dados de desempenho clínico, incluindo níveis de decisão e/ou valores esperados ou detectados em pessoas afetadas e não afetadas, podem ser encontrados no Apêndice III. Intervalos de referência e valores de corte da literatura também estão listados neste apêndice.

11 Teste de interferências

Metabólitos, compostos estruturalmente relacionados e fármacos foram adicionados a amostras de urina ou a amostras de urina preparadas nas concentrações mais altas esperadas (consulte a tabela abaixo) e testados para verificar interferências.

Tabela 14: Substâncias testadas e suas concentrações

Substância	Concentração do teste [mg/L] (em amostra de urina)
Adrenalina/epinefrina	0,469
Acetaminofeno/paracetamol	600
Ácido acetilsalicílico	30,0
Alopurinol	240

Substância	Concentração do teste [mg/L] (em amostra de urina)
Alprazolam	2,40
Anlodipino	3,00
Amoxicilina	12060
Anfetamina/dexanfetamina	18,0
Apixabana	14,3
Atenolol	135
Azitromicina	180
Bisoprolol	27,0
Cafeína	108
Candesartana	25,0
Captopril	2,64
Carvedilol	6,00
Cefuroxima	1500
Clorpromazina	3,30
Citalopram	27,6
Clonazepam	0,780
Dexametasona	12,0
Ácido 3,4-di-hidroximandélico (DOMA)	3,05
Ácido 3,4-di-hidroxifenilacético (DOPAC)	194
3,4-Di-hidroxifenilglicol (DHPG)	13,0
Dissulfiram	1,14
Dopamina	1278
Doxorrubicina	0,060
Edoxabana	90,0
Empagliflozina	20,3
Enalaprilato	24,0
Fluorouracil	90,0
Fluoxetina	1,50
Formoterol	0,0144
Furosemida	180
Gabapentina	3564
Glipizida	6,00
Guaifenesina	4,5
Heparina	3300
Hexametilenotetramina	6,00
Ácido homogentísico	194
Homovanilina (3-metoxi-4-hidroxifenilacetaldéido)	Diferentes concentrações de até 192 mg/L
Hidroclorotiazida	200
Hidrocodona	52,5

Iobenguano	0,00000750
Brometo de ipratrópio	0,120
Isoniazida	60,0
Levodopa/L-dopa	7,50
Levotiroxina	0,576
Lisinopril	60,0
Losartana	18,0
Melfalano	4,50
Mefenesina	30,0
Metamizol (como 4-metilaminoantipirina)	313
Metanfetamina	3,00
Metanefrina	5,04
Metformina	4860
Metocarbamol	123
3-Metoxi-4-hidroxifenilglicol (MHPG)	19,0
5-Metoxiindolacetato	226
3-Metoxitiramina	4,65
Metildopa	22,5
Metoclopramida	18,0
Metoprolol	28,5
Minoxidil	0,600
Naloxona	0,252
Nifedipina	0,588
Noradrenalina/norepinefrina	1000
Normetanefrina	4466
Fenprocumon	4,05
Pravastatina	4,08
Pregabalina	1587
Ranitidina	270
Reserpina	0,00900
Rivaroxabana	30,0
Rosuvastatina	6,00
Salbutamol/albuterol	8,10
Ácido salicílico	28,6
Serotonina	194
Sitagliptina	206
Sotalol	12,0
Sulfametoxazol	600
Tansulosina	0,104
Teniposídeo	6,85
Tilidina (como nortilidina)	92,5

Substância	Concentração do teste [mg/L] (em amostra de urina)
Torasemida	144
Tramadol	360
Trimetoprim	42.0
Valsartana	100
Venlafaxina	56.3

11.1 Interferências detectadas

Na presença das seguintes substâncias, foram observadas interferências:

A presença das interferências mencionadas pode afetar a precisão dos resultados dos testes em mais de 15%. Isso pode ser causado por interferência cromatográfica que não afeta o analito e o padrão interno na mesma proporção.

O 5-Metoxiindolacetato, um metabólito do 5-HIAA, causa um pico de eluição tardia após aproximadamente 80 a 90 minutos. Isso pode causar interferência em uma execução cromatográfica subsequente.

A homovanilina (3-metoxi-4-hidroxifenilaldeído), precursora do HVA, produz um pico adicional aproximadamente 0,4 minutos após o 5-HIAA. Concentrações de homovanilina superiores a 10 mg/L podem afetar a precisão dos resultados do teste para 5-HIAA.

11.2 Interferências não detectadas

As seguintes substâncias foram testadas e nenhuma interferência significativa foi observada; os resultados quantitativos não foram afetados (desvio ≤ 15%):

Adrenalina/epinefrina, acetaminofeno/paracetamol, ácido acetilsalicílico, allopurinol, alprazolam, anlodipino, amoxicilina, anfetamina/dexanfetamina, apixabana, atenolol, azitromicina, bisoprolol, cafeína, candesartana, captopril, carvedilol, cefuroxima, clorpromazina, citalopram, clonazepam, dexametasona, ácido 3,4-dihidroximandélico (DOMA), ácido 3,4-di-hidroxifenilacético (DOPAC), 3,4-di-hidroxifenilglicol (DHPG), dissulfiram, dopamina, doxorrubicina, edoxabana, empagliflozina, enalaprilato, fluorouracil, fluoxetina, formoterol, furosemida, gabapentina, glipizida, guaifenesina, heparina, hexametilenotetramina, ácido homogentísico, hidroclorotiazida, hidrocodona, iobenguano, brometo de ipratrópio, isoniazida, levodopa/L-dopa, levotiroxina, lisinopril, losartana, melfalano, mefenesina, metamizol (como 4-metilaminoantipirina), metanfetamina, metanefrina, metformina, metocarbamol, 3-metoxi-4-hidroxifenilglicol (MHPG), 3-metoxitiramina, metildopa, metoclopramida, metoprolol, minoxidil, naloxona, nifedipina, noradrenalina/norepinefrina, normetanefrina, fenprocumon, pravastatina, pregabalina, ranitidina, reserpina, rivaroxabana, rosuvastatina, salbutamol/albuterol, ácido salicílico, serotonina, sitagliptina, sotalol, sulfametoxazol, tansulosina, teniposídeo, tilidina (como nortilidina), torasemida, tramadol, trimetoprim, valsartana, venlafaxina.

Se você tiver alguma dúvida sobre interferências, entre em contato com o representante local da Chromsystems ou com nossa equipe de suporte da Chromsystems diretamente, ligando para nosso telefone +49 89 18930-111 ou por e-mail em support@chromsystems.com.

12 Solução de problemas

Tabela 15: Solução de problemas

Problema	Possível causa	Solução
Linha de base instável	Eletrodo de trabalho contaminado com substâncias eletroquimicamente ativas	Reativar ou trocar o eletrodo de trabalho
	Sistema de HPLC contaminado com substâncias eletroquimicamente ativas	Lavar o sistema conforme descrito no capítulo 3.4 e renovar a fase móvel em seguida. Para contaminações mais persistentes, passivar a bomba, capilar e sistema de injeção com ácido nítrico
	Trincas ou depósitos no diafragma	Substituir o insert do eletrodo de referência
A linha de base flutua ritmicamente	Danos (por exemplo, juntas quebradas) nas unidades de bomba do sistema HPLC	Verificar vazamentos na bomba; chamar o serviço técnico, se necessário
	Superfície do eletrodo de trabalho contaminada	Limpar o eletrodo de trabalho
	Danos à parede interna da célula do detector	Substituir o corpo da célula ou enviar para manutenção
	Vazamentos na célula do detector	Verificar vazamentos: apertar o parafuso com cuidado ou substituir a junta
	Bolhas de ar na bomba	Verificar a bomba, remover bolhas de ar do sistema, degaseificar a fase móvel
A linha de base apresenta desvios	O sistema não está equilibrado	Reciclar a fase móvel por um período mais longo
	Mudanças na temperatura ambiente	Manter a temperatura ambiente constante; termostatizar a coluna se houver grandes variações de temperatura frequentes
A corrente de fundo está alta	Fase móvel contaminada	Substituir por uma fase móvel nova
	Coluna de HPLC contaminada	Substituir a coluna
	Superfície do eletrodo de trabalho contaminada	Limpar/substituir o eletrodo de trabalho
	Sistema contaminado com substâncias eletroquimicamente ativas	Passivar a bomba, capilar e sistema de injeção com ácido nítrico
Sensibilidade reduzida, perda de sinal	Superfície do eletrodo de trabalho contaminada	Limpar/substituir o eletrodo de trabalho
	Potencial de trabalho diminuiu	Verificar o potencial entre o eletrodo de trabalho e o de referência; se estiver muito baixo, fazer manutenção no eletrodo de referência
Picos fantasma no cromatograma	Sistema de injeção contaminado	Lavar o sistema de injeção com água, depois com isopropanol; para limpar injetores manuais, alternar as válvulas com frequência durante a fase de lavagem. Para lavar um autosampler, ativar o processo de injeção

Problema	Possível causa	Solução
Seringa de injeção contaminada	Seringa de injeção contaminada	várias vezes; seguir as informações detalhadas de limpeza no manual do autosampler
	Coluna contaminada	Lavar a seringa abundantemente com isopropanol e água. Se necessário, substituir a seringa.
	Sistema contaminado com substâncias eletroquimicamente ativas	Substituir a coluna
		Passivar a bomba, capilar e sistema de injeção com ácido nítrico
Mudanças no tempo de retenção	Mudanças na temperatura ambiente	Garantir uma temperatura ambiente constante para a coluna; termostatizar a coluna
	Fluxo irregular	Medir o fluxo. Se o fluxo da bomba estiver irregular, verificar a presença de bolhas de ar no sistema; chamar o serviço técnico, se necessário
Picos duplos	Volume morto na coluna de HPLC	Substituir a coluna de HPLC
	Volume morto nas conexões	Substituir as conexões
Picos largos, cauda	Capacidade da coluna esgotada	Substituir a coluna
Pressão alta	Acúmulo de partículas na coluna analítica ou pré-filtro	Substituir a coluna ou o pré-filtro
	Sistema de injeção obstruído	Limpar o injetor

Se você tiver alguma dúvida sobre solução de problemas, entre em contato com o representante local da Chromsystems ou com nossa equipe de suporte da Chromsystems diretamente, ligando para nossa hotline +49 89 18930-111 ou por e-mail em support@chromsystems.com.

13 Literatura

- 1 Gressner AM, Arndt T (ed): Lexikon der Medizinischen Laboratoriumsdiagnostik. Springer, Berlin, Heidelberg, 2019.
- 2 Fanciulli G, Ruggeri RM, Grossrubatscher E, Lo Calzo F, Wood TD, Faggiano A, et al.: Serotonin pathway in carcinoid syndrome: Clinical, diagnostic, prognostic and therapeutic implications. Rev Endocr Metab Disord 2020; 21:599–612.
- 3 Lattke P, Peitzsch M, Därr R, Siegert G, Eisenhofer G: Labordiagnostik Katecholamin-produzierender Tumoren. LaboratoriumsMedizin 2013; 37:187–197.
- 4 Verly IRN, van Kuilenburg ABP, Abeling NGGM, Goorden SMI, Fiocco M, Vaz FM, et al.: Catecholamines profiles at diagnosis: Increased diagnostic sensitivity and correlation with biological and clinical features in neuroblastoma patients. Eur J Cancer 2017; 72:235–243.
- 5 Candito M, Thyss A, Albertini M, Deville A, Politano S, Mariani R, et al.: Methylated catecholamine metabolites for diagnosis of neuroblastoma. Med Pediatr Oncol 1992; 20:215–220.
- 6 Monsaingeon M, Perel Y, Simonnet G, Corcuff JB: Comparative values of catecholamines and metabolites for the diagnosis of neuroblastoma. Eur J Pediatr 2003; 162:397–402.
- 7 Lam L, Woollard GA, Teague L, Davidson JS: Clinical validation of urine 3-methoxytyramine as a biomarker of neuroblastoma and comparison with other catecholamine-related biomarkers. Ann Clin Biochem 2017; 54:264–272.

- 8 Barco S, Gennai I, Reggiardo G, Galleni B, Barbagallo L, Maffia A, et al.: Urinary homovanillic and vanillylmandelic acid in the diagnosis of neuroblastoma: report from the Italian Cooperative Group for Neuroblastoma. *Clin Biochem* 2014; 47:848–852.
- 9 Barco S, Verly I, Corrias MV, Sorrentino S, Conte M, Tripodi G, et al.: Plasma free metanephrides for diagnosis of neuroblastoma patients. *Clin Biochem* 2019; 66:57–62.
- 10 Peitzsch M, Butch ER, Lovorn E, Mangelis A, Furman WL, Santana VM, et al.: Biochemical testing for neuroblastoma using plasma free 3-O-methyldopa, 3-methoxytyramine, and normetanephrine. *Pediatr Blood Cancer* 2020; 67:e28081.
- 11 Das S, Stockton SS, Hassan SA: Carcinoid Heart Disease Management: A Multi-Disciplinary Collaboration. *Oncologist* 2023; 28:575–583.
- 12 Grozinsky-Glasberg S, Davar J, Hofland J, Dobson R, Prasad V, Pascher A, et al.: European Neuroendocrine Tumor Society (ENETS) 2022 Guidance Paper for Carcinoid Syndrome and Carcinoid Heart Disease. *J Neuroendocrinol* 2022; 34:e13146.
- 13 Thomas L: Clinical Laboratory Diagnostics. Chapter 32 Pheochromocytoma, paraganglioma, neuroblastoma. <https://www.clinical-laboratory-diagnostics.com/k32.html>, accessed November 11, 2024.
- 14 Padelli M, Bruno C, Lemarchand J, Vourc'h P, Andres C, Blasco H, et al.: Quelles valeurs de référence pour la concentration de la sérotonine plaquettaire et du 5-HIAA urinaire pour le diagnostic des tumeurs neuroendocrines digestives ? *Ann Biol Clin (Paris)* 2019; 77:161–168.
- 15 Subash N, Papali MM, Bahadur KP, Avanthika C, Jhaveri S, Thannir S, et al.: Recent Advances in the Diagnosis and Management of Carcinoid Syndrome. *Dis Mon* 2022; 68:101304.
- 16 Eisenhofer G, Pamporaki C, Lenders JWM: Biochemical Assessment of Pheochromocytoma and Paraganglioma. *Endocr Rev* 2023; 44:862–909.
- 17 Fishbein L, Del Rivero J, Else T, Howe JR, Asa SL, Cohen DL, et al.: The North American Neuroendocrine Tumor Society Consensus Guidelines for Surveillance and Management of Metastatic and/or Unresectable Pheochromocytoma and Paraganglioma. *Pancreas* 2021; 50:469–493.
- 18 Simon T: Simon 2019_S1-Leitlinie Neuroblastom. AWMF 2019.
- 19 Berthold F, Spix C, Erttmann R, Hero B, Michaelis J, Treuner J, et al.: Neuroblastoma Screening at 1 Year of Age: The Final Results of a Controlled Trial. *JNCI Cancer Spectr* 2021; 5.
- 20 Rinke A., Wiedenmann B., Auernhammer C., Bartenstein P., Bartsch D.K., Begum, N., Faiss S. et al.: S2k-Leitlinie Neuroendokrine Tumore. *Z Gastroenterol* 2018; 56:583–681.
- 21 Sorbye H, Grande E, Pavel M, Tesselaar M, Fazio N, Reed NS, et al.: European Neuroendocrine Tumor Society (ENETS) 2023 guidance paper for digestive neuroendocrine carcinoma. *J Neuroendocrinol* 2023; 35:e13249.
- 22 Oberg K, Couvelard A, Delle Fave G, Gross D, Grossman A, Jensen RT, et al.: ENETS Consensus Guidelines for Standard of Care in Neuroendocrine Tumours: Biochemical Markers. *Neuroendocrinology* 2017; 105:201–211.
- 23 Hanna Lee: Vanillylmandelic Acid (VMA), 2020. <https://emedicine.medscape.com/article/2089620-overview%23a4#a4>, accessed August 30, 2024.
- 24 Shen Y, Li H, Lu J, Luo X, Guan Q, Cheng L: Analytical validation and clinical application of urinary vanillylmandelic acid and homovanillic acid by LC-MS/MS for diagnosis of neuroblastoma. *Biomed Chromatogr* 2019; 33:e4484.

Anexo I Informação de substâncias

Substâncias perigosas

Ao utilizar os reagentes, observe as seguintes informações de perigo e tome as medidas de segurança relevantes. Mais informações podem ser obtidas nas nossas fichas de dados de segurança. Essas fichas podem ser baixadas do nosso site www.chromsystems.com ou estão disponíveis mediante solicitação.

Tabela 16: Declarações de perigo e precauções

Pictogramas	Declarações de perigo e precauções
	Fase Móvel (no. de pedido 1011, 1012) Componentes: 3-10 % metanol, < 2 % ácido fórmico
 	Aviso H302+H312+H332: Nocivo se ingerido, em contato com a pele ou se inalado. H371: Pode causar danos ao sistema nervoso central e aos órgãos visuais. P280: Use luvas de proteção/roupa protetora/proteção para os olhos/proteção facial. P301+P312: SE INGERIDO: Ligue para um CENTRO DE INTOXICAÇÃO/médico se sentir mal-estar. P302+P352: SE NA PELE: Lave com bastante água e sabão. P403+P233: Armazene em local bem ventilado. Mantenha o recipiente bem fechado.
	Tampão de Lavagem II (no. de pedido 1006, 1006/A, 1006/A5) Componentes: 2.5-10 % ácido bórico
	Perigo H360FD: Pode prejudicar a fertilidade. Pode prejudicar o feto. P201: Obtenha instruções especiais antes do uso. P280: Use luvas de proteção/roupa protetora/proteção para os olhos/proteção facial. P308+P313: SE exposto ou preocupado: Procure orientação/atenção médica.
	Tampão de Eluição (no. de pedido 1077, 1077/A5) Componentes: 2.5-10 % ácido fórmico
	Aviso H315: Causa irritação na pele. H319: Causa irritação grave nos olhos. P280: Use luvas de proteção/roupa protetora/proteção para os olhos/proteção facial. P305+P351+P338: SE NOS OLHOS: Lave cuidadosamente com água por vários minutos. Remova as lentes de contato, se estiver usando e for fácil de fazer. Continue lavando.
	Finalizador (no. de pedido 1013, 1013/A5) Componentes: 10-25 % hidróxido de sódio
	Perigo H290: Pode ser corrosivo para metais. H314: Causa queimaduras graves na pele e danos aos olhos. P280: Use luvas de proteção/roupa protetora/proteção para os olhos/proteção facial. P301+P330+P331: SE INGERIDO: Enxágue a boca. NÃO induza o vômito. P305+P351+P338: SE NOS OLHOS: Lave cuidadosamente com água por vários minutos. Remova as lentes de contato, se estiver usando e for fácil de fazer. Continue lavando. P309+P311: SE exposto ou se sentir mal-estar: Ligue para um CENTRO DE INTOXICAÇÃO ou médico.

Pictogramas	Declarações de perigo e precauções
Esses componentes não são classificados como perigosos de acordo com a legislação da União Europeia:	
Mix de Analitos (no. de pedido 1033)	Componentes: solução aquosa
Padrão Interno VMA, HVA (no. de pedido 1004/B, 1044/B/A1, 1044/B/A5, 1044/B/A9)	Componentes: solução aquosa
Padrão Interno 5-HIAA (no. de pedido 51303/B)	Componentes: solução aquosa
Tampão de Lavagem I (no. de pedido 1005, 1005/A5)	Componentes: solução aquosa
Padrão de Calibração em Urina (order no. 1009, 1009/T)	Componentes: urina humana
Controle Endócrino em Urina (order no. 0040, 0050)	Componentes: urina humana

Ingredientes ativos:

Tabela 17: Ingredientes ativos

No. de pedido	Descrição	Componente ativo	Especificação
1011		Metanol	≥ 3 - < 10 %
1012	Fase Móvel	Ácido fórmico	< 2 %
		Água	> 88 - ≤ 95 %
1033	Mix de Analitos	Analitos (VMA, HVA, 5-HIAA) e derivado de VMA	conc. conforme bula
1009			
1009/T	Padrão de Calibração em Urina	Analitos (VMA, HVA, 5-HIAA)	conc. conforme bula
1004/B	Padrão Interno VMA, HVA	Derivado de VMA	< 0.1 %
1044/B/A1			
1044/B/A5	Padrão Interno VMA, HVA	Derivado de VMA	< 0.1 %
1044/B/A9			
51303/B	Padrão Interno 5-HIAA	Derivado de 5-HIAA Ácido cítrico	< 0.1 % ≤ 2.5 %
1005			
1005/A1	Tampão de Lavagem I	Solução de amônia	< 1 %
1006			
1006/A	Tampão de Lavagem II	Ácido bórico	≥ 2.5 - < 10 %
1006/A5			
1077			
1077/A5	Tampão de Eluição	Ácido fórmico	≥ 2.5 - < 10 %
1013			
1013/A5	Finalizador	Hidróxido de sódio	≥ 10 - < 25 %
1100/B	Coluna HPLC	Polímero baseado em sílica	> 90 %
0040	Controle Endócrino em Urina, Faixa Normal	Analitos e metabólitos (conforme bula)	conc. conforme bula
0050	Controle Endócrino em Urina, Faixa Patológica	Analitos e metabólitos (conforme bula)	conc. conforme bula

Anexo II Dados de desempenho analítico

As características de desempenho para a preparação manual e semiautomatizada de amostras foram determinadas com os seguintes equipamentos:

- Detector eletroquímico Chromsystems CLC 100 (faixa de 50 nA)

Para a preparação semiautomatizada de amostras, foram utilizados os seguintes equipamentos:

- Gilson® GX-271 ASPEC® Liquid Handler
com Bomba de Seringa Dupla (10 mL e 250 µL)
com duas estações de lavagem (para lavagem estática externa e lavagem interna)
com o Módulo de Injeção Direta GX (loop de 20 µL, opcional)
com as seguintes racks:
 - o Rack de Amostras com 108 posições, código 28
 - o Rack de Solventes com 4 posições, código 61
 - o 2x Mobile DEC Rack Assemblies para cartuchos SPE de 1 mL com 36 posições, código 371

A seguinte atribuição de racks foi utilizada para a avaliação do desempenho analítico:

Tabela 18: Atribuição de racks

Reagente	Rack	Posição
Calibrador/controles/amostras de urina em tubos de amostra*	Rack de Amostra	1-51
Tubos de amostra vazios*	Rack de Amostra	55-105 (same number as samples)
Padrão interno (nº do pedido 51303/B) em tubo de amostra*	Rack de Amostra	106
Finalizador (nº do pedido 1013, 1013/A5) em tubos de amostra*	Rack de Amostra	107-108
Padrão interno (nº do pedido 1044/B/A1, 1044/B/A5, 1044/B/A9) em frasco HDPE de 250 mL	Rack de Solvente	1
Tampão de Lavagem I (nº do pedido 1005, 1005/A5) em frasco HDPE de 250 mL	Rack de Solvente	2
Tampão de Lavagem II (nº do pedido 1006/A, 1006/A5) em frasco HDPE de 250 mL	Rack de Solvente	3
Tampão de Eluição (nº do pedido 1077, 1077/A5) em frasco HDPE de 250 mL	Rack de Solvente	4
Colunas de Clean Up de Amostra (nº de pedido 1008/A)	DEC Rack(s) Suporte DEC móvel	1-51 (mesmo número de amostras)
Tubos Coletores Vazios**	DEC Rack(s) Posição traseira	1-51 (mesmo número de amostras)
Água de alto grau de pureza	Reservatório	—

* Tubos de amostra, vidro âmbar, 10 x 75 mm

**Tubos de coleta, PP âmbar, 12 x 75 mm (nº do pedido 42616)

Para mais detalhes sobre o método utilizado para gerar os dados deste anexo, entre em contato diretamente com nossa equipe de suporte da Chromsystems, ligando para nossa hotline +49 89 18930-111 ou por e-mail em support@chromsystems.com.

Usuários que desejam utilizar o ensaio HPLC "VMA, HVA, 5-HIAA na urina" com um sistema diferente do especificado aqui devem validar o método nesse dispositivo.

As áreas dos picos foram utilizadas para calcular os resultados durante a avaliação do desempenho analítico.

Rastreabilidade metrológica e exatidão:

Para o Padrão de Calibração de Urina (nº do pedido 1009, 1009/T), a rastreabilidade metrológica foi demonstrada e está disponível como cadeia de rastreabilidade (ver Anexo IV).

A exatidão da medição foi demonstrada durante o processo de avaliação do desempenho analítico com base nas seguintes estratégias:

- Participação em esquemas de proficiência (disponível no centro de downloads de nossa página inicial: www.chromsystems.com/downloadcenter.html)
- Determinação da recuperação relativa

Faixa de medição analítica

O limite inferior de quantificação (LLOQ) foi determinado por diluições definidas de amostras de urina com matriz livre de analitos. O limite superior de quantificação (ULOQ) foi determinado pela adição de quantidades definidas de substâncias padrão em amostras de urina. A preparação das amostras foi feita manualmente e de forma semiautomatizada, com condição de pior caso para o volume de injeção (LLOQ 10 µL, ULOQ 20 µL).

Tabela 19: Limites de quantificação

Substância	LLOQ	ULOQ
VMA	0,32 mg/L	80 mg/L
HVA	0,35 mg/L	100 mg/L
5-HIAA	0,30 mg/L	60 mg/L

Repetibilidade intra-ensaio

Os coeficientes de variação foram determinados em três concentrações diferentes pela preparação repetida (n=10) da mesma amostra de urina em uma única sequência. A preparação das amostras foi feita manualmente.

Tabela 20: Repetibilidade intra-ensaio

Substância	Coeficiente de variação (concentration of analyte)		
VMA	1,7 % (4,74 mg/L)	1,7 % (10,1 mg/L)	1,6 % (16,8 mg/L)
HVA	1,8 % (4,67 mg/L)	1,7 % (8,84 mg/L)	1,3 % (14,3 mg/L)
5-HIAA	2,8 % (4,46 mg/L)	2,6 % (8,46 mg/L)	2,3 % (15,1 mg/L)

Repetibilidade inter-ensaio

A determinação da repetibilidade inter-ensaio foi realizada em duas concentrações diferentes pela preparação repetida ($n = 4$) da mesma amostra de urina em 20 dias diferentes. A preparação das amostras foi feita manualmente.

Tabela 21: Repetibilidade inter-ensaio

Substância	Coeficiente de variação (concentração de analito)	
VMA	5,0 % (4,54 mg/L)	3,9 % (15,9 mg/L)
HVA	5,5 % (4,30 mg/L)	5,0 % (13,1 mg/L)
5-HIAA	8,3 % (3,98 mg/L)	6,2 % (12,3 mg/L)

Precisão (reprodutibilidade)

Os dados de desempenho foram determinados em 3 locais com base em quatro amostras de urina diferentes, processadas 5 vezes em 5 dias diferentes. O procedimento é baseado no CLSI EP05-A3 e corresponde a um desenho de teste $3 \times 5 \times 5$. A preparação das amostras foi feita manualmente em dois locais e de forma semiautomatizada no terceiro local.

Tabela 22: Precisão (reprodutibilidade)

Substância	Concentração média	Reprodutibilidade	
		Coeficiente de variação	Intervalo de confiança de 95 %
VMA	0,851 mg/L	17,4 %	11,3-37,9 %
	20,3 mg/L	8,1 %	5,8-13,1 %
	41,4 mg/L	6,6 %	4,5-12,6 %
	72,1 mg/L	14,3 %	8,5-42,7 %
HVA	0,813 mg/L	8,8 %	7,4-10,9 %
	21,2 mg/L	8,6 %	5,7-17,5 %
	42,9 mg/L	9,2 %	7,2-12,7 %
	86,0 mg/L	11,4 %	7,5-24,0 %
5-HIAA	0,912 mg/L	11,1 %	8,1-17,5 %
	24,8 mg/L	9,8 %	7,3-15,1 %
	48,3 mg/L	9,7 %	7,0-15,6 %
	85,3 mg/L	9,5 %	7,0-14,6 %

Desvio (Drift)

Para identificar qualquer deriva na concentração dos analitos ao longo do tempo, a concentração de todos os analitos em duas amostras de urina foi comparada durante um período de 20 dias. Nenhuma deriva foi observada para nenhum dos analitos.

Carry-over (Arrasto)

Uma amostra de urina preparada com concentrações de analitos na faixa do limite superior de quantificação foi analisada entre várias amostras em branco. As concentrações dos analitos nas amostras em branco antes e depois da amostra de alta concentração foram comparadas. Em caso de carry-over significativo, a quantidade foi calculada em porcentagem em relação à amostra anterior.

Revisão dos dados determinados em um sistema HPLC Shimadzu LC-20 com detector eletroquímico Chromsystems CLC 100 mostrou que não há efeitos de carry-over para todos os analitos quando a preparação manual da amostra é aplicada. Em todos os casos, a concentração medida da amostra em branco ficou abaixo do limite de quantificação.

Revisão dos dados determinados em um sistema HPLC Waters Alliance com detector eletroquímico Chromsystems CLC 100 em combinação com o Gilson® GX-271 Liquid Handler com módulo de injeção direta mostrou carry-over para todos os analitos quando a preparação semiautomatizada da amostra é aplicada. As seguintes taxas de carry-over foram determinadas:

Tabela 23: Taxas de carry-over

Substância	Taxas de carry-over	
	Preparo manual de amostra	Preparo Semi-automatizado de amostra
VMA	< LLOQ	0,48 %
HVA	< LLOQ	0,44 %
5-HIAA	< LLOQ	0,49 %

Robustez:

A influência de certas modificações na preparação da amostra e no sistema HPLC foi investigada. O método é robusto dentro das seguintes tolerâncias, desde que as configurações permaneçam constantes dentro de uma série de medições:

Tabela 24: Faixas de tolerância do sistema HPLC

Sistema HPLC	Faixa de tolerância
Taxa de fluxo	0,8 a 1,0 mL/min

Tabela 25: Faixas de tolerância na preparação da amostra

Preparo de amostra (conforme capítulo 5.5.1)	Faixa de tolerância
Passos 5 a 9: ...centrifugar (1 min a 700 x g)centrifugar (1 min a 350 x g) ...centrifugar (2 min a 1000 x g)
Passos 5 a 9: ...aspirar...	...aspirar por até 10 min a 12 mbar (secagem excessiva)...

Anexo III Dados de desempenho clínico

O método do ensaio da Chromsystems "VMA, HVA, 5-HIAA na urina" e o método da literatura apresentada abaixo são equivalentes, conforme comprovado por comparações internas de métodos realizadas na Chromsystems.

VMA = ácido vanilmandélico; HVA = ácido homovanílico; 5-HIAA = ácido 5-hidroxiindolacético

Tabela 26: Dados de desempenho clínico em relação ao neuroblastoma para VMA e HVA combinados [8]. Os dados são baseados em diferentes grupos de pacientes com neuroblastoma de acordo com o Sistema Internacional de Estadiamento de Neuroblastoma (INSS) ou idade do paciente. Os valores são indicados em mg/g de creatinina (Cr)

		Estágio do Neuroblastoma (INSS)				Idade do paciente		
		1+2	3	4	4S	Todos os estágios tumorais	< 18 months	> 18 months
Limiar (cut-off superior) [mg/g Cr]	VMA	9,9	12,6	15,4	20,4	13,7	20,1	9,7
	HVA	22,5	21,5	25,7	29,2	22,5	26,5	15,9
Sensibilidade diagnóstica*		74,5%	87,5%	85,3%	100,0%	81,9%	86,8%	87,9%
Especificidade diagnóstica		94,8%	98,8%	96,3%	99,7%	96,3%	98,9%	88,2%
Valor preditivo positivo		56,8%	74,5%	72,1%	87,9%	85,5%	99,0%	66,5%
Valor preditivo negativo		97,6%	99,5%	98,3%	100,0%	95,2%	85,6%	96,5%
Razão de verossimilhança positiva		14,3	72,9	23,1	333,3	22,1	78,9	7,4
Razão de verossimilhança negativa		0,3	0,1	0,2	0,0	0,2	0,1	0,1
VMA [mediana (intervalos – 10º a 90º percentil)]								
Valores esperados na população normal		0-3 meses: 10,90 (5,64-15,92) 3-6 meses: 10,85 (7,83-16,85) 6-12 meses: 9,95 (6,26-16,62) 1-2 anos: 7,40 (5,18-12,05) 2-5 anos: 6,30 (4,41-11,87) 5-10 anos: 4,60 (2,90-8,40) 10-15 anos: 3,70 (2,40-9,16) 15-20 anos: 3,10 (2,14-7,85)						
	[mg/g Cr]	HVA [mediana (intervalos – 10º a 90º percentil)]						
		0-3 meses: 19,60 (13,04-28,60) 3-6 meses: 21,85 (14,38-33,43) 6-12 meses: 15,40 (11,40-25,30) 1-2 anos: 13,70 (9,85-21,85) 2-5 anos: 11,50 (8,20-18,62) 5-10 anos: 7,25 (4,91-10,70) 10-15 anos: 5,05 (3,15-9,35) 15-20 anos: 3,40 (2,60-6,24)						
	Valores esperados na população afetada [mg/g Cr]	Valores observados em pacientes (0-20 anos)						
		VMA: 1,5-477 HVA: 0,8-387						

* É suficiente para um diagnóstico positivo proposto se apenas um analito estiver acima do ponto de corte.

Tabela 27: Dados de desempenho clínico em relação a carcinoides e tumores neuroendócrinos secretores de serotonina para 5-HIAA [14].

Limiar (cut-off superior)	3.60 µmol/mmol de creatinina ex. 6.08 mg/g de creatinina*
Sensibilidade diagnóstica	100.0%
Especificidade diagnóstica	90.2%
Valor preditivo positivo	42.9%
Valor preditivo negativo	100.0%
Razão de verossimilhança positiva	10.2
Razão de verossimilhança negativa	0.0
Valores esperados na população normal (valores observados: 44 a 67 anos)	0.1–1.4 µmol/mmol de creatinina ex. 0.17–2.4 mg/g de creatinina*
Valores esperados na população afetada (valores observados: 55 a 79 anos)	0.2–4.6 µmol/mmol de creatinina ex. 0.34–7.8 mg/g de creatinina*

*Os valores em mg/g de creatinina não foram incluídos na literatura original, mas foram posteriormente calculados usando os fatores de conversão apresentados na seção 7.3

Intervalos de referência

Nota:

Os intervalos de referência listados abaixo representam os níveis encontrados em uma proporção de uma população saudável/sem doença. Consequentemente, eles não necessariamente coincidem com níveis de decisão clinicamente relevantes ou valores de corte em relação ao propósito pretendido deste dispositivo. Para dados de desempenho clínico, incluindo níveis de decisão e/ou valores esperados ou detectados em pessoas afetadas e não afetadas, consulte as tabelas acima neste apêndice. Esses dados de desempenho clínico referem-se apenas ao método atual da Chromsystems.

Como os níveis variam dependendo da população de pacientes e do método de medição, determine intervalos de referência específicos para o seu laboratório. Ao determinar os intervalos, certifique-se de cumprir os requisitos regionais e nacionais.

Tabela 28: Intervalos de referência para VMA e HVA

Coletivo de pacientes	Intervalos de referência expressos por 24 horas [24]	
Idade	VMA	HVA
4 meses – 18 anos	1,86–39,32 µmol/24 h ex. 0,37–7,79 mg/24 h*	5,50–36,11 µmol/24 h ex. 1,00–6,58 mg/24 h*

*Os valores em mg/24 h não foram incluídos na literatura original, mas foram posteriormente calculados usando os fatores de conversão apresentados na seção 7.3

Tabela 29: Intervalos de referência para ácido 5-hidroxiindolacético (5-HIAA)

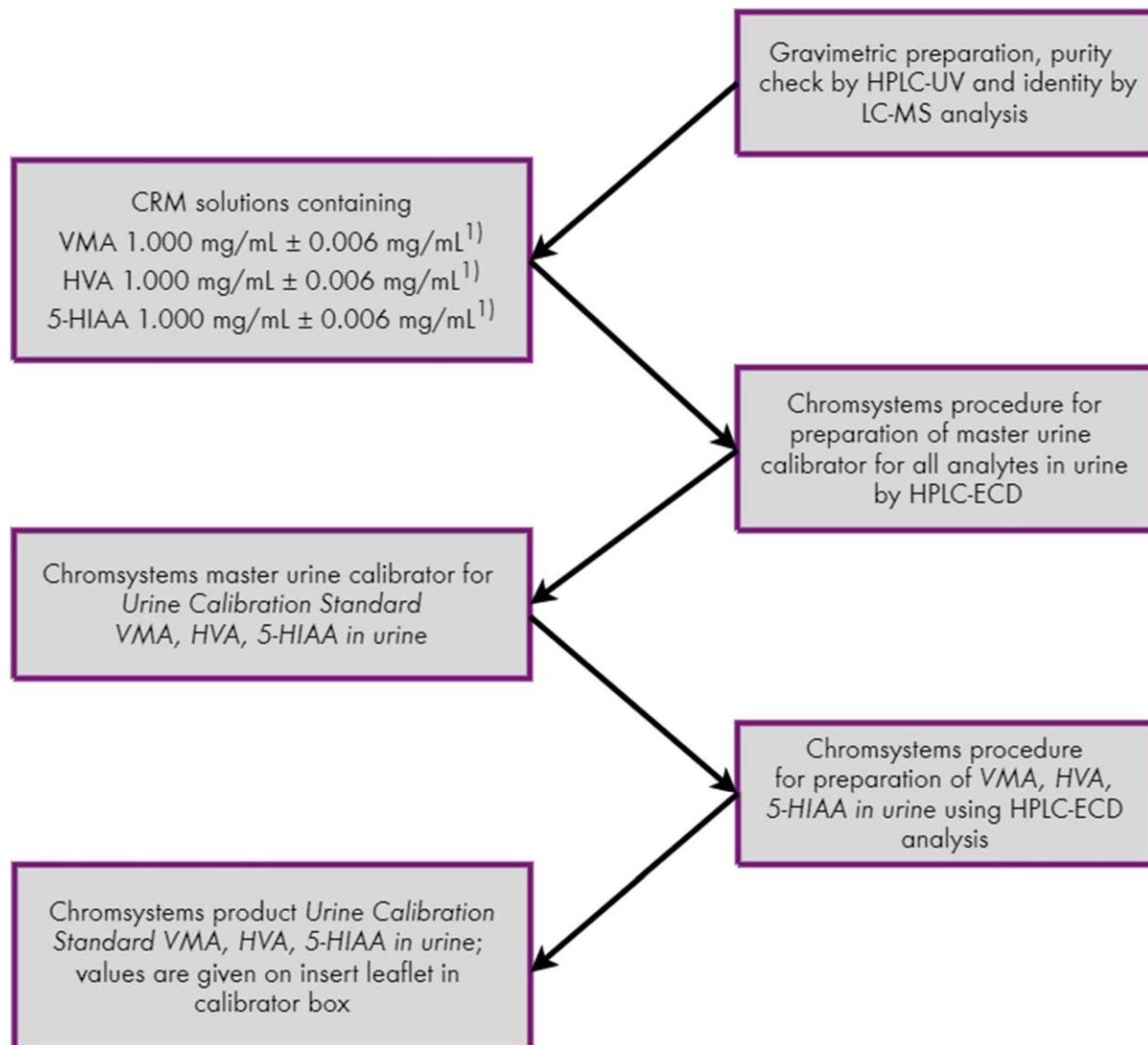
Coletivo de pacientes	Intervalos de referência expressos por 24 horas [12]
Não especificado*	2–9 mg/24h 10,4–46,8 µmol/24h

* O coletivo de pacientes (por exemplo, idade, gênero ou estado de saúde) utilizado para estabelecer esses intervalos não foi especificado na fonte. Portanto, esses intervalos de referência devem ser interpretados com cautela.

Anexo IV Rastreabilidade do calibrador

Versão 4.0

VMA, HVA, 5-HIAA em urina
Padrão de Calibração em Urina (no. de pedido 1009, 1009/T)



O calibrador mestre de urina foi preparado gravimetricamente pela adição de ácido vanilmandélico (VMA), ácido homovanílico (HVA) e ácido 5-hidroxiindolacético (5-HIAA), obtidos de um fornecedor comercial. As concentrações foram determinadas no laboratório do fabricante utilizando o ensaio de VMA, HVA, 5-HIAA na urina com Materiais de Referência Certificados (CRMs, na sigla em inglês) obtidos de um fornecedor certificado conforme as normas ISO 17025 e ISO 17034 (as concentrações são fornecidas no gráfico acima). As concentrações dos CRMs foram determinadas pelo fornecedor certificado utilizando os métodos apresentados no gráfico.

A metodologia para o calibrador mestre de urina utiliza o ensaio da Chromsystems para VMA, HVA, 5-HIAA na urina por análise de HPLC-ECD (Cromatografia Líquida de Alta Eficiência com Detecção Eletroquímica).

O produto da Chromsystems Urine Calibration Standard VMA, HVA, 5-HIAA in urine (calibrador de trabalho) possui uma concentração conforme indicado no folheto interno de cada lote, determinada pelo laboratório do fabricante utilizando o ensaio da Chromsystems para VMA, HVA, 5-HIAA na urina como referência. O ensaio foi calibrado utilizando o calibrador mestre de urina da Chromsystems com concentração conhecida (incluindo incerteza). A metodologia para o calibrador de trabalho utiliza o ensaio da Chromsystems para VMA, HVA, 5-HIAA na urina por análise de HPLC-ECD (Cromatografia Líquida de Alta Eficiência com Detecção Eletroquímica).

A homogeneidade é verificada para cada lote por meio de análises múltiplas de várias alíquotas, com base na lógica estatística da Chromsystems para o tamanho da amostra (baseada na norma ISO 13528, com um mínimo de 10 repetições e duas execuções).

Os valores atribuídos e as incertezas correspondentes são fornecidos no folheto interno de cada calibrador.

¹⁾A incerteza da concentração é expressa como uma "incerteza expandida" em um intervalo de confiança aproximado de 95%, utilizando um fator de abrangência de k=2.

A disponibilidade de material de referência padrão (SRM) e material de referência certificado (CRM) é verificada periodicamente, no máximo antes da produção de um novo lote-mestre, com o objetivo de garantir a rastreabilidade dos calibradores e controles da Chromsystems a materiais de referência de ordem superior. Portanto, a cadeia de rastreabilidade atual do calibrador e dos controles pode diferir ligeiramente da cadeia de rastreabilidade apresentada aqui. A cadeia de rastreabilidade atualmente válida está disponível no centro de downloads de nosso site. A cadeia de rastreabilidade apresentada aqui (V4.0) representa a situação em 11-08-2025.

Anexo V Símbolos

Utilizamos os símbolos da norma EN ISO 15223-1 em nossos rótulos, especificações e embalagens. Os significados de cada símbolo são fornecidos na tabela abaixo:

Tabela 30: Símbolos

Símbolo	Significado
	Fabricante
	Data de fabricação
	Data de validade
	Número de 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 faixa de temperatura específica
	Dispositivo médico de diagnóstico in vitro
	Suficiente para <n> dispositivos
	Cuidado
	Número de série
	Marcação CE de conformidade com a legislação relevante da UE
	Marcação CE de conformidade com a legislação relevante da UE (com afixo 0123 - para o organismo notificado: TÜV Süd Product Service GmbH)

Anexo VI Histórico de versões

Tabela 31: Histórico de versões

Versão	Data de lançamento (DD-MM-AAAA)	Descrição
1.0 _{IVDR}	16-12-2024	Criação inicial IVDR
1.1 _{IVDR}	11-08-2025	Capítulo 5.5: Nota sobre possível precipitação do Wash Buffer II Capítulo 7.3: Correção da unidade de conversão Capítulo 11: Adição de novas substâncias testadas: homovanilina como substância interferente, ácido homogentísico como substância não interferente Apêndice IV: Nota sobre o estado da cadeia de rastreabilidade