

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

CHROMSYSTEMS



Manual de Instrução para Análise por MS/MS

MassScreen®

Aminoácidos, Acilcarnitinas ESTENDIDO
em sangue seco
(não-derivatizado)

somente para uso diagnóstico *in vitro*
57075

Comunicação de incidentes:

Qualquer incidente grave relacionado ao dispositivo deverá ser comunicado ao fabricante e à autoridade competente do Estado-Membro onde o utilizador e/ou o paciente está estabelecido.

O Resumo de Segurança e Desempenho, exigido pelo Artigo 29 do IVDR 2017/746, está disponível (assim que acessível) através do EUDAMED ou, temporariamente, mediante solicitação à Chromsystems.

Chromsystems Instruments & Chemicals GmbH é certificada de acordo com a ISO 13485 (incluindo MDSAP). Os produtos são fabricados e comercializados em conformidade com o Regulamento (UE) 2017/746 sobre dispositivos médicos de diagnóstico *in vitro* (IVDR).

A Declaração de Conformidade conforme o IVDR pode ser descarregada no centro de downloads do nosso website.

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

Regularizado por: Biosys Ltda.

Rua Coronel Gomes Machado 358
24020112 Niterói
Brasil

Tel: +55 21 3907 2534
sac@biosys.com.br
www.biosys.com.br

Fabricado por: 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 Pedido 4
1.1	Kits..... 4
1.2	Componentes individuais 6
1.2.1	Componentes necessários 6
1.2.2	Componentes opcionais..... 7
2	Introdução 8
2.1	Informações Básicas..... 8
2.2	Princípio do ensaio 8
2.3	Finalidade pretendida 9
2.4	Limitações Clínicas 13
3	Sistema LC-MS/MS 14
3.1	Equipamento de uso geral 14
3.2	Parâmetros do instrumento HPLC 14
3.3	Operação MS/MS 15
3.4	Otimização dos MRMs (Tuning) 16
3.5	Faixa de Medição Analítica 16
3.6	Inicialização do Sistema 17
3.7	Desligamento do Sistema 17
4	Transições MRM 17
5	Preparo da amostra..... 21
5.1	Coleta e armazenamento de amostras de pacientes 21
5.2	Padrões Internos 22
5.2.1	Reconstituição individual do Internal Standard Mix 57074 23
5.2.2	Reconstituição combinada dos Mixes de Padrão Interno 57074/57474 23
5.2.3	Vida útil dos Padrões Internos após a reconstituição 24
5.3	Manipulação do Tampão de Extração Succinilacetona 57013 25
5.4	Manipulação dos controles..... 25
5.5	Manipulação dos conjuntos de linearidade..... 26
5.6	Procedimento de preparação de amostra 26
5.6.1	Preparo de amostra com Placa de Filtro de 96 Poços 27
5.6.2	Preparo de amostras com Placa de 96 Poços 28
5.7	Vida útil das amostras preparadas 28
5.8	Manipulação de amostras acima do intervalo de medição analítico 29
6	Aquisição de dados e avaliação 30
6.1	Calibração do sistema de análise 30
6.2	Spot de sangue seco - volume de sangue 30
6.3	Exemplo do cromatograma..... 31

Conteúdo	Página
6.4 Quantificação de resultados	31
6.5 Fatores de conversão	33
7 Controle de qualidade	35
8 Armazenamento e transporte dos componentes do kit	35
9 Descarte de resíduos	36
10 Intervalos de referência	37
11 Teste de interferências	41
11.1 Interferências detectadas	43
11.2 Interferências potenciais	45
11.3 Nenhuma interferência detectada	47
12 Solução de Problemas	48
13 Literatura	50
Anexo I Informação de substância	52
Anexo II Dados de desempenho analítico	56
Anexo III Dados de desempenho clínico	73
Anexo IV Erros inatos do metabolismo e seus marcadores	79
Anexo V Rastreabilidade dos padrões internos (calibrador) e controles	88
Anexo VI Símbolos	93
Anexo VII Histórico de versões	94

1 Informações para Pedido

1.1 Kits

Kits de Reagente

57075	Kit de Reagente MS/MS MassScreen® Aminoácidos, Acilcarnitinas EXTENDED em sangue seco (não-derivatizado) com Placas de 96 Poços Conteúdo do kit para 960 análises: <i>(Número de unidades de embalagem / número do pedido / nome / conteúdo por unidade de embalagem)</i>	
2 x 57001	Fase Móvel	1000 mL
1 x 57074	Mix de Padrão Interno	4 x 50,0 mL (liof.)
1 x 57044	Padrão Interno Succinilacetona (não-derivatizado)	4 x 18 mL
2 x 57078	Tampão de Extração	100 mL
4 x 57013	Tampão de Extração Succinilacetona	18 mL
1 x 57007	Solução de Lavagem	1000 mL
5 x 57010	Placa de 96 Poços	5 uns.
4 x 55011	Selos de Proteção para placas de 96 Poços	10 uns.
1 x 0195	MassCheck® Aminoácidos, Acilcarnitinas EXTENDED Controle Nível I em Spot de Sangue Seco	1 x 3 spots
1 x 0196	MassCheck® Aminoácidos, Acilcarnitinas EXTENDED Controle Nível II em Spot de Sangue Seco	1 x 3 spots
1 x 0197	MassCheck® Aminoácidos, Acilcarnitinas EXTENDED Controle Nível III em Spot de Sangue Seco	1 x 3 spots
57075-F	Kit de Reagente MS/MS MassScreen® Aminoácidos, Acilcarnitinas EXTENDED em sangue seco (não-derivatizado) com Placas Filtrantes de 96 Poços Conteúdo do kit para 960 análises: <i>(Número de unidades de embalagem / número do pedido / nome / conteúdo por unidade de embalagem)</i>	
2 x 57001	Fase Móvel	1000 mL
1 x 57074	Mix de Padrão Interno	4 x 50,0 mL (liof.)
1 x 57044	Padrão Interno Succinilacetona (não-derivatizado)	4 x 18 mL
2 x 57078	Tampão de Extração	100 mL
4 x 57013	Tampão de Extração Succinilacetona	18 mL
1 x 57007	Solução de Lavagem	1000 mL
2 x 57055	Placas Filtrantes de 96 Poços	5 uns.
3 x 57010	Placas de 96 Poços	5 uns.
4 x 55011	Selos de Proteção para placas de 96 poços	10 uns.
1 x 0195	MassCheck® Aminoácidos, Acilcarnitinas EXTENDED Controle Nível I em Spot de Sangue Seco	1 x 3 spots
1 x 0196	MassCheck® Aminoácidos, Acilcarnitinas EXTENDED Controle Nível II em Spot de Sangue Seco	1 x 3 spots
1 x 0197	MassCheck® Aminoácidos, Acilcarnitinas EXTENDED Controle Nível III em Spot de Sangue Seco	1 x 3 spots

57075-ADO Kit de Reagente MS/MS**MassScreen® Aminoácidos, Acilcarnitinas EXTENDED**

em sangue seco (não-derivatizado)

incl. Ado, dAdo com Placas de 96 Poços

Conteúdo do kit para 960 análises:

(Número de unidades de embalagem / número do pedido / nome / conteúdo por unidade de embalagem)

2 x	57001	Fase Móvel	1000 mL
1 x	57074	Mix de Padrão Interno	4 x 50,0 mL (liof.)
1 x	57474	Mix de Padrão Interno Ado, dAdo	4 x 50,0 mL (liof.)
1 x	57044	Padrão Interno Succinilacetona (não derivatizado)	4 x 18 mL
2 x	57078	Tampão de Extração	100 mL
4 x	57013	Tampão de Extração Succinilacetona	18 mL
1 x	57007	Solução de Lavagem	1000 mL
5 x	57010	Placas de 96 Poços	5 uns.
4 x	55011	Selos de Proteção para placas de 96 poços	10 uns.
1 x	0295	MassCheck® Aminoácidos, Acilcarnitinas EXTENDED incl. Ado, dAdo Controle Nível I em Spot de Sangue Seco	1 x 3 spots
1 x	0296	MassCheck® Aminoácidos, Acilcarnitinas EXTENDED incl. Ado, dAdo Controle Nível II em Spot de Sangue Seco	1 x 3 spots
1 x	0297	MassCheck® Aminoácidos, Acilcarnitinas EXTENDED incl. Ado, dAdo Controle Nível III em Spot de Sangue Seco	1 x 3 spots

57075-F-ADO MS/MS Reagent Kit**MassScreen® Amino Acids, Acylcarnitines EXTENDED**

em sangue seco (não-derivatizado)

incl. Ado, dAdo com Placas Filtrantes de 96

Poços Conteúdo do kit para 960 análises:

(Número de unidades de embalagem / número do pedido / nome / conteúdo por unidade de embalagem)

2 x	57001	Fase Móvel	1000 mL
1 x	57074	Mix de Padrão Interno	4 x 50,0 mL (liof.)
1 x	57474	Mix de Padrão Interno Ado, dAdo	4 x 50,0 mL (liof.)
1 x	57044	Padrão Interno Succinilacetona (não derivatizado)	4 x 18 mL
2 x	57078	Tampão de Extração	100 mL
4 x	57013	Tampão de Extração Succinilacetona	18 mL
1 x	57007	Solução de Lavagem	1000 mL
2 x	57055	Placas Filtrantes de 96 Poços	5 uns.
3 x	57010	Placas de 96 Poços	5 uns.
4 x	55011	Selos de Proteção para placas de 96 poços	10 uns.
1 x	0295	MassCheck® Aminoácidos, Acilcarnitinas EXTENDED incl. Ado, dAdo Controle Nível I em Spot de Sangue Seco	1 x 3 spots
1 x	0296	MassCheck® Aminoácidos, Acilcarnitinas EXTENDED incl. Ado, dAdo Controle Nível II em Spot de Sangue Seco	1 x 3 spots
1 x	0297	MassCheck® Aminoácidos, Acilcarnitinas EXTENDED incl. Ado, dAdo Controle Nível III em Spot de Sangue Seco	1 x 3 spots

1.2 Componentes individuais

1.2.1 Componentes necessários

Para realizar o ensaio, são necessários os componentes da Chromsystems listados neste capítulo.

Para preparo de amostra:

Produtos CE/IVD

57074	Mix de Padrão Interno	4 x 50,0 mL (liof.)
57044	Padrão Interno Succinilacetona (não derivatizado)	4 x 18 mL
57078	Tampão de Extração	100 mL
57013	Tampão de Extração Succinilacetona	18 mL
57010	Placas de 96 Poços	5 uns.
55011	Selos de Proteção para placas de 96 poços	10 uns.
57014	Selos Térmicos Perfuráveis para placas de 96 poços	6 uns.

Para preparo de amostra com Placas Filtrantes de 96 Poços:

57055	Placas Filtrantes de 96 Poços	5 uns.
-------	-------------------------------	--------

Para preparo de amostra em caso de co-determinação de adenosina e 2'-deoxiadenosina, em combinação com 57074:

57474	Mix de Padrão Interno Ado, dAdo	4 x 50,0 mL (liof.)
-------	---------------------------------	---------------------

Equipamento geral de laboratório

55016	Adaptador para centrifugação	2 uns.
42740	Selador Térmico	1 un.

Para controle de qualidade:

Produtos CE/IVD

0195	MassCheck® Aminoácidos, Acilcarnitinas EXTENDED Controle Nível I em Spot de Sangue Seco	1 x 3 spots
0196	MassCheck® Aminoácidos, Acilcarnitinas EXTENDED Controle Nível II em Spot de Sangue Seco	1 x 3 spots
0197	MassCheck® Aminoácidos, Acilcarnitinas EXTENDED Controle Nível III em Spot de Sangue Seco	1 x 3 spots

Em caso de co-determinação de adenosina e 2'-deoxyadenosine, em vez de 0195, 0196, 0197:

0295	MassCheck® Aminoácidos, Acilcarnitinas EXTENDED incl. Ado, dAdo Controle Nível I em Spot de Sangue Seco	1 x 3 spots
0296	MassCheck® Aminoácidos, Acilcarnitinas EXTENDED incl. Ado, dAdo Controle Nível II em Spot de Sangue Seco	1 x 3 spots
0297	MassCheck® Aminoácidos, Acilcarnitinas EXTENDED incl. Ado, dAdo Controle Nível III em Spot de Sangue Seco	1 x 3 spots

Para análise instrumental:*Produtos CE/IVD*

57001	Fase Móvel	1000 mL
57002	Fase Móvel	10 x 1000 mL
57007	Solução de Lavagem	1000 mL
57016	Pré-filtro de PEEK 2 µm	5 uns.

Acessórios

55018	Capilar Restritor	1 un.
-------	-------------------	-------

Equipamento Geral de Laboratório

15017	Suporte do Pré-filtro de PEEK	1 un.
-------	-------------------------------	-------

Para a primeira instalação e otimização do método:*Produtos CE/IVD*

57097-1	Tuning Mix 1 Analitos e Padrões Internos	1 x 1 mL
57097-2	Tuning Mix 2 Analitos e Padrões Internos	1 x 1 mL
57098	Tuning Mix Succinilacetona (não derivatizado) Analito e Padrão Interno	1 x 1 mL
57080	Conjunto de Linearidade Multinível para spot de sangue seco	6 x 1 spot

Em caso de co-determinação de adenosina and 2'-deoxiadenosina, em vez de 57080:

57090	Conjunto de Linearidade Multinível para spot de sangue seco incl. Ado, dAdo	6 x 1 spot
-------	--	------------

1.2.2 Componentes opcionais

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

57059	Selos Adesivos com Fendas Cruzadas para placas de 96 poços	6 uns.
-------	---	--------

Caso você utilize os Selos Adesivos com Fendas Cruzadas em vez dos Selos Térmicos Perfuráveis, não será necessário o Seladora Térmica listada no capítulo 1.2.1.

2 Introdução

2.1 Informações Básicas

O objetivo da triagem neonatal (teste do pezinho) é o diagnóstico oportuno de erros inatos do metabolismo (EIM), idealmente antes do aparecimento de sintomas. A triagem possibilita o tratamento precoce das doenças e previne danos consequentes na medida do possível.

O primeiro teste de triagem para recém-nascidos foi o teste para fenilcetonúria, introduzido em alguns países europeus e nos EUA na década de 1960 [1,2]. Desde então, o número de doenças testadas aumentou constantemente, e a introdução da espectrometria de massas em tandem (MS/MS), que permitiu a triagem de mais de 40 doenças a partir de uma única amostra de sangue seco, representou um grande avanço [1].

Na maioria dos casos, a causa de um erro inato do metabolismo é um defeito em um único gene que codifica uma enzima. Como resultado, sua atividade é reduzida ou completamente suprimida. Consequentemente, o substrato da reação enzimática, que não é mais convertido, acumula-se no organismo e, dependendo da extensão do distúrbio, o produto da reação é produzido de forma insuficiente ou não é produzido. Algumas doenças também levam ao acúmulo de metabólitos tóxicos que podem danificar órgãos ou desencadear doenças multissistêmicas (ex.: aminoacidopatias, acidemias orgânicas). Outras doenças são causadas por uma mutação em genes codificadores de transportadores, de modo que o transporte através de certas membranas é prejudicado. Na adrenoleucodistrofia, por exemplo, o substrato não é transportado para os peroxissomos e acumula-se por não ser metabolizado.

Se não forem diagnosticados e, portanto, não tratados, muitos desses distúrbios metabólicos podem levar a danos irreversíveis graves no recém-nascido nos primeiros meses de vida, enquanto outros só se manifestam no início da idade adulta. Por serem defeitos genéticos, essas doenças ainda não têm cura na maioria dos casos, mas, com a terapia adequada, os sintomas de muitas delas podem ser amplamente ou mesmo completamente prevenidos.

A triagem para essas doenças é realizada medindo as substâncias marcadoras (que podem estar elevadas ou diminuídas) no sangue dos recém-nascidos. Para isso, o sangue é preferencialmente coletado do calcanhar, pingado em papel de filtro, seco e analisado em laboratório.

Por meio da espectrometria de massas em tandem, é possível triar um amplo espectro de distúrbios metabólicos em uma única análise, determinando simultaneamente muitos marcadores. Devido à alta seletividade da espectrometria de massas em tandem, esta análise não requer uma coluna de HPLC, resultando em um tempo de análise muito curto, inferior a 2 minutos. O uso de padrões marcados com isótopos é essencial para compensar os efeitos de supressão iônica interferentes e para alcançar uma quantificação precisa dos analitos.

No Apêndice IV você pode encontrar um resumo dos marcadores descritos na literatura para distúrbios-alvo da triagem neonatal baseada em análise por injeção de fluxo-espectrometria de massas em tandem (FIA-MS/MS).

2.2 Princípio do ensaio

Este ensaio da Chromsystems permite a análise rotineira confiável de aminoácidos, succinilacetona, carnitina livre, acilcarnitinas, lisofosfolípidios, nucleosídeos, creatina e metabólitos relacionados à creatina em sangue seco em papel filtro (DBS) para a triagem neonatal de distúrbios metabólicos, como aminoacidopatias, acidúrias orgânicas, distúrbios da oxidação de ácidos graxos e distúrbios do metabolismo de purinas ou

creatina, por MS/MS.

O preparo da amostra baseia-se em um procedimento simples e eficiente. O sangue seco no papel de filtro é perfurado (picotado), e os analitos são extraídos em placas de 96 poços. A butilação não é necessária. Se forem utilizadas placas de filtro, os extratos podem ser transferidos com segurança e conveniência para a placa de coleta por meio de uma breve centrifugação.

Para a medição da succinilacetona, cada picote de sangue é extraído uma segunda vez após a extração dos outros analitos. Para viabilizar a extração, a succinilacetona é convertida em seu derivado de pirazol.

Após a combinação de ambos os extratos, todos os analitos são medidos na mesma corrida analítica.

Para garantir uma determinação quantitativa de alta qualidade dos analitos, este método utiliza padrões internos marcados isotopicamente para calibração e medição. Informações sobre o uso dos diferentes padrões internos podem ser encontradas no capítulo 5.2.

Este produto é um dispositivo médico para diagnóstico *in vitro*.

Atenção: Observe as limitações clínicas no capítulo 2.4.

2.3 Finalidade pretendida

O ensaio da Chromsystems "**MassScreen®** Aminoácidos e Acilcarnitinas ESTENDIDO" é um dispositivo médico para diagnóstico *in vitro*, projetado para usuários profissionais em laboratórios clínicos para a determinação quantitativa dos analitos listados abaixo em amostras de sangue de recém-nascidos secas em papel de filtro.

O preparo da amostra é realizado manualmente, e as amostras são analisadas por espectrometria de massas em tandem (MS/MS).

O kit é destinado à triagem de recém-nascidos para distúrbios metabólicos hereditários nos primeiros dias de vida. Uma lista dos distúrbios metabólicos associados aos analitos determinados é fornecida abaixo.

Analito (<i>sinônimo</i>)	Abreviação	Erro Inato do Metabolismo Associado**
Aminoácidos		
Alanina	Ala	PDHxD, PC, MSUD, OH-PRO, NKHG, ARG, CIT I, CIT II, ASA,
Sarcosina*	Sar*	CPS, OTC
Arginina	Arg	ARG, CIT II, ASA, CIT I, PC
Ácido argininosuccínico	Asa	ASA
Citrulina	Cit	ASA, CIT I, CIT II, OTC, CPS, NAGS, PC, CUD, HHH, GACR, HCY, TYR I, MET/MAT, TYR II, TYR III, HYRPRO1/HP-I, HYRPRO2/HP-II, ARG, Cbl E, Cbl G, Cbl D v1, MTHFR, 3MCC (mat), GA 1 (mat)
Glutamina‡	Gln‡	OTC‡, CPS ‡, NAGS‡, PC#, LYS#, DE RED#, CIT I‡
Lisina#*	Lys#*	
Ácido glutâmico	Glu	OTC, CPS, CIT I, CIT II, PC
Glicina	Gly	NKHG, PA/PROP, MUT, Cbl A, B
Leucina‡	Leu‡	MSUD (‡#), OH-PRO, PDHxD(#), HCY‡#, PKU, H-PHE, BIOPT
Isoleucina#	Ile#	(BS), BIOPT (REG), MET/MAT‡#, Cbl E‡#, Cbl G‡#, Cbl D
Allo-Isoleucina	Allo-Ile	v1 ‡#, MTHFR‡#, TYR I, TYR II, TYR III
Hidroxiprolina*	Hyp*	
Metionina	Met	HCY, MET/MAT, CIT II, MTHFR, Cbl E, Cbl G, Cbl D v1, GNMT, SAHH, CIT I, TYR I, TYR II, TYR III, CUD, PA/PROP, MUT, Cbl A,B, Cbl C,D, OTC, CPS, B12 def (mat), PC
Ornitina	Orn	HHH, GACR, ARG, CIT II, CPS, OTC

Fenilalanina	Phe	PKU, H-PHE, BIOPT (BS), BIOPT (REG), MET/MAT, HCY, MSUD, ASA, CIT I, CIT II, OH-PRO, TYR I, TYR II, TYR III, ARG, OTC, CPS, PC, MTHFR, Cbl C,D, Cbl E, Cbl G, Cbl D v1, VAL, PDHxD, HHH, GACR, HYRPRO1/HP-I, HYRPRO2/HP-II
Prolina	Pro	HYRPRO1/HP-I, HYRPRO2/HP-II, PDHxD, PC
Serina	Ser	SER, HHH, GACR
Tirosina	Tyr	TYR I, TYR II, TYR III, Tyr (trans), PKU, H-PHE, BIOPT (BS), BIOPT (REG), HCY, MSUD, MET/MAT, Cbl E, Cbl G, Cbl D v1, MTHFR, PDHxD, ASA, CIT I, CIT II, PC, OTC, CPS
Valina	Val	MSUD, VAL, PDHxD, TYR I, TYR II, TYR III
3-O-Metildopa (3-O-metil-DOPA, 3-metoxitirosina)	3-OMD	AADCDC
Carnitinas		
Carnitina livre	C0	CUD, CPT Ia, CPT II, 3MCC, GA 1, PA/PROP, VLCAD, SCD, CACT, BKT, HMG, GA 2, IVA, 2M3HBA, 2MBG, MUT, MCD, Cbl A,B, Cbl C,D, MCAD, EE, 3MGA, SUCLA2
Acetilcarnitina	C2	CUD, CPT II, CACT, M/SCHAD, MCAD, VLCAD, CPT Ia, MCKAT, SCAD, IVA, PA/PROP, 2MBG, IBG/IBDD, MUT, Cbl A,B, Cbl C,D, SUCLA2, MCD, GA 2, LCHAD, TFP, B12 def (mat), EE, 3MCC (mat), GA 1 (mat), BIOT, Cbl F, ECHS1D, TCN2
Propionilcarnitina	C3	PA/PROP, MCD, MUT, Cbl A,B, Cbl C,D, CUD, SUCLA2, BIOT, B12 def (mat), Cbl F, TCN2, 2MBG, IBG/IBDD, SCAD, IVA, CPT Ia, CPT II, CACT, MET/MAT, HCY, MTHFR, Cbl E, Cbl G, EE, GA 2, MAL, 3MCC (mat), GA 1 (mat)
Malonilcarnitina	C3DC†	M/SCHAD#, MAL†, BKT#, HIBCHD#, ECHS1D, HADH, GA 1†, ‡2M3HBA#, MCKAT†
3-Hidroxiobutirilcarnitina / 3-Hidroxisobutirilcarnitina*	C4OH#*	
Butirilcarnitina# / Isobutirilcarnitina†*	C4*	SCAD#, IBG/IBDD†, EE#, GA 2, GA 1, M/SCHAD, MCD, B12 def (mat), Cbl C,D, MUT, Cbl A,B, PA/PROP, MCKAT, MAL, IVA, VLCAD
Metilmalonilcarnitina / Succinilcarnitina	C4DC†	3MCC#, HMG#, BKT#, 2M3HBA#, 3MGA#, MCD#, BIOT#, SUCLA2†, Cbl C,D, MUT†, Cbl A,B†, GA 1#, GA 2#, MCAD 3-
Hydroxyisovalerilcarnitina / 2-Metil-3-hidroxiobutirilcarnitina*	C5OH#*	
Isovalerilcarnitina# / Metilbutirilcarnitina†*	C5*	IVA#, 2MBG†, EE#, GA 2, MCD, B12 def (mat), MUT, Cbl 2-A,B, PA/PROP, VLCAD
Tigililcarnitina† / 3-Metilcrotonilcarnitina#*	C5:1*	BKT†, 2M3HBA†, 3MCC#, ECHS1D†
Glutarilcarnitina	C5DC†	GA 1†, GA 2†, M/SCHAD#, MCKAT#, MAL†, MCAD†, HMG#
3-Hidroxihexanoilcarnitina*	C6OH#*	
Hexanoilcarnitina	C6	MCAD, GA 2
Adipilcarnitina / 3-Metilglutarilcarnitina*	C6DC*	HMG
Octanoilcarnitina	C8	MCAD, MCKAT, GA 2, SCAD, 3MCC, HMG, BKT, GA 1, 2M3HBA, 3MGA, IBG/IBDD, MCD, M/SCHAD, EE, IVA, 2MBG, VLCAD
Octenoilcarnitina	C8:1	MCKAT, GA 2, MCAD
Decanoilcarnitina	C10	MCAD, MCKAT, GA2, DE RED, MAL
Decenoilcarnitina	C10:1	MCAD, GA 2, MCKAT
Decadienoilcarnitina	C10:2	DE RED
Dodecanoilcarnitina (lauroilcarnitina)	C12	VLCAD, GA 2, CPT II, CACT, MCKAT, GA 1
Dodecenoilcarnitina	C12:1	VLCAD, GA 2, LCHAD
Tetradecanoilcarnitina (miristoilcarnitina)	C14	VLCAD, LCHAD, TFP, CPT II, CACT, GA 2
Tetradecenoilcarnitina	C14:1	VLCAD, LCHAD, TFP, GA 2
Tetradecadienoilcarnitina	C14:2	VLCAD, GA 2, LCHAD, TFP
3-Hidroxitetradecanoilcarnitine	C14OH	LCHAD, TFP
Hexadecanoilcarnitina (palmitoilcarnitina)	C16	CUD, LCHAD, TFP, VLCAD, CPT Ia, CPT II, CACT, GA 2, GA 1, PA/PROP, MUT, Cbl A,B, Cbl C,D, B12 def (mat), MCD, M/SCHAD, 3MCC (mat), SUCLA2, Cbl F
Hexadecenoilcarnitina	C16:1	CPT II, CACT, CPT Ia, VLCAD, GA 2, LCHAD, TFP

3-Hidroxihexadecanoilcarnitina (3-hidroxi palmitoilcarnitina)	C16OH	LCHAD, TFP
3-Hidroxihexadecanoilcarnitina Heptadecanoilcarnitina*	C16:1OH# C17†*	LCHAD#, TFP#, PA/PROP†/#, MUT†/#, Cbl A,B†/#, Cbl C,D†, B12 def (mat), TCN2†
Octadecanoilcarnitina (estearoilcarnitina)	C18	CUD, CPT Ia, CPT II, CACT, LCHAD, TFP, VLCAD, GA 2, GA 1, 3MCC (mat)
Octadecenoilcarnitina (oleoilcarnitina)	C18:1	CUD, CPT Ia, CPT II, CACT, LCHAD, TFP, VLCAD, GA 2, GA 1, 3MCC (mat)
Octadecadienoilcarnitina (linoleoilcarnitina)	C18:2	CPT Ia, CPT II, CACT, LCHAD, VLCAD, TFP, GA 2, CUD
3-Hidroxi octadecanoilcarnitina (3-hidroxi estearoilcarnitina)	C18OH	LCHAD, TFP, CACT
3-Hidroxi octadecenoilcarnitina (3-hidroxi oleoilcarnitina)	C18:1OH	LCHAD, TFP
3-Hidroxi octadecadienoilcarnitina (3-hidroxi linoleoilcarnitina)	C18:2OH	LCHAD, TFP
Eicosanoilcarnitina (arachidoylcarnitina)	C20	VLCAD
Docosanoilcarnitina (behenoylcarnitina)	C22	ALD, AGS1 - AGS 8
Tetracosanoilcarnitina (lignoceroilcarnitina)	C24	ALD
Hexacosanoilcarnitina (cerotoilcarnitina)	C26	ZS/PBD-ZSS, ALD, AGS1 - AGS 8
Cetonas		
Succinilacetona	SUAC	TYR I
Nucleosídeos		
Adenosina ***	Ado	ADA-SCID
2'-Deoxiadenosina ***	dAdo	ADA-SCID
Lisofosfolídeos		
1-Arachidoyl-2-hidroxy-sn-glicero-3-fosfo colina (C20:0 lysophosphatidylcholine)	C20:0 LPC	ZS/PBD-ZSS, Single PED, DDCH/CADDS, RDLKD, EMPF 1/EMPF 2, AGS1 - AGS 8, ALD
1-Behenoyl-2-hidroxy-sn-glicero-3-fosfo colina (C22:0 lysophosphatidylcholine)	C22:0 LPC	ZS/PBD-ZSS, Single PED, DDCH/CADDS, RDLKD, EMPF 1/EMPF 2, AGS1 - AGS 8, ALD
1-Lignoceroil-2-hidroxi-sn-glicero-3-fosfo colina (C24:0 lisofosfatidilcolina)	C24:0 LPC	ZS/PBD-ZSS, Single PED, DDCH/CADDS, RDLKD, EMPF 1/EMPF 2, AGS1 - AGS 8, ALD
1-Hexacosanoil-2-hidroxi-sn-glicero-3-fosfo colina (C26:0 lisofosfatidilcolina)	C26:0 LPC	ALD, ZS/PBD-ZSS, Single PED, DDCH/CADDS, RDLKD, AGS1 - AGS 8, EMPF 1/EMPF 2
Creatina e metabólitos relacionados		
Creatina	CRE	GAMT, GSD II
Creatinina	CRN	GSD II
Ácido Guanidinoacético	GAA	GAMT

*: Isômeros ou isóbaros; com este método, eles não podem ser distinguidos no experimento de espectrometria de massa em tandem; portanto, uma estimativa somada (ou uma estimativa pela soma dos isômeros) é fornecida nesses casos; as abreviações correspondem ao isóbaro/isômero na mesma linha, enquanto as doenças associadas correspondem a todos os isômeros/isóbaros na linha da tabela, a menos que indicado o contrário (veja † e # abaixo).

**: Erros Inatos do Metabolismo (EIMs) em negrito são descritos como aqueles para os quais se deve rastrear usando o analito indicado como um marcador primário, enquanto os outros são descritos como marcadores secundários ou parte de razões informativas.

Tirosinemia transitória e deficiências secundárias de carnitina podem estar associadas a EIMs, mas, elas próprias, não são alvos do rastreamento.

***: Ado e dAdo só podem ser determinados quando se utiliza o "Mix de Padrão Interno Ado, dAdo" e os controles de qualidade de sangue seco correspondentes

† or #: Apenas o isômero/isóbaros rotulado correspondentemente é relevante para a doença indicada; nos casos em que apenas algumas, mas não todas as publicações, associam especificamente um dos isômeros/isóbaros ao EIM, o rótulo correspondente está entre colchetes.

Abreviações dos Erros Inatos do Metabolismo (códigos OMIM entre parênteses): Informações detalhadas sobre os erros inatos do metabolismo podem ser encontradas buscando pelos códigos OMIM no site OMIM.org (Online Mendelian Inheritance in Man):

2M3HBA (300438): Acidúria/acidemia 2-metil-3-hidroxibutírica; **2MBG** (610006): 2-Metilbutirilglicinúria; **3MCC** (210200; 210210): Deficiência de 3-metilcrotonil-CoA carboxilase (pode incluir o tipo materno (**mat**)); **3MCC (mat)**: Deficiência materna de 3-metilcrotonil-CoA carboxilase; **3MGA** (250950): Acidúria/acidemia 3-metilglutacônica tipo I; **AADCD** (608643): Deficiência de aromática L-aminoácido descarboxilase; **ADA-SCID** (102700): Imunodeficiência combinada severa por deficiência de adenosina deaminase; **AGS1 - AGS 8** (225750; 610181; 610329; 610333; 612952; 615010, 615846, 619486, 619487): Síndrome de Aicardi-Goutières; **ALD** (300100): Adrenoleucodistrofia ligada ao X; **ARG** (207800): Argininemia; **ASA** (207900): Acidúria argininosuccínica; **B12 def (mat)**: Deficiência de B12 (materna); **BIOPT (BS)** (261640): Defeitos na biossíntese da biopterina (cofator); **BIOPT (REG)** (261630): Defeito na regeneração da biopterina (cofator); **BIOT** (253260): Deficiência de biotinidase; **BKT** (203750): Deficiência de beta-cetotilase / deficiência de 3-oxotilase; **CACT** (212138): Deficiência do transportador de carnitina-acilcarnitina; **Cbl A,B** (251100; 251110): Acidemia metilmalônica (distúrbios cbl A, B); **Cbl C,D** (277400; 277410): Acidemia metilmalônica (Cbl C,D) / Acidemia metilmalônica com homocistinúria (metilmalonil-CoA mutase e homocisteína: metiltransferase MTHF / proteína MMADHC); **Cbl D v1** (277410): Deficiência de metilcobalamina tipo cblDv1; **Cbl E** (236270): Deficiência de metilcobalamina tipo cblE; **Cbl F** (277380): Acidemia metilmalônica com homocistinúria, tipo cblF; **Cbl G** (250940): Deficiência de metilcobalamina tipo cblG; **CIT I** (215700): Citrulinemia tipo I; **CIT II** (605814): Citrulinemia tipo II; **CPS** (608307; 237300): Deficiência de carbamoil fosfato sintetase; **CPT Ia** (255120): Deficiência de carnitina palmitoiltransferase tipo Ia; **CPT II** (255110; 608836; 600649): Deficiência de carnitina palmitoiltransferase tipo II; **CUD** (212140): Defeito de captação/transporte de carnitina (pode incluir o tipo materno); **DDCH/CADDS** (300475): Síndrome de deleção contígua ABCD1 DXS1357E; **DE RED** (616034): Deficiência de 2,4-dienoil-CoA redutase / deficiência de dienoil-CoA redutase causada por deficiência de NAD kinase 2 mitocondrial; **ECHS1D** (616277): Deficiência de enoil-CoA hidratase de cadeia curta; **EE** (602473): Encefalopatia etilmalônica; **EMPF 1/EMPF 2** (614388; 617086): Defeitos de fissão peroxissomal / encefalopatia por fissão mitocondrial e peroxissomal defeituosa; **GA 1** (231670): Acidemia glutárica tipo I (pode incluir o tipo materno); **GA 1 (mat)**: Acidemia glutárica tipo I materna; **GA 2** (231680): Deficiência de múltiplas acil-CoA desidrogenases (MAD) / acidemia glutárica tipo II; **GACR** (258870): Atrofia girata da coróide e retina / deficiência de ornitina aminotransferase; **GAMT** (612736): Deficiência de guanidinoacetato metiltransferase / síndrome de deficiência cerebral de creatina 2; **GNMT** (606664): Deficiência de glicina N-metiltransferase; **GSD II** (232300): Doença de depósito de glicogênio tipo II / Doença de Pompe; **HCY** (236200): Homocistinúria (CBS); **HADH** (231530): Deficiência de curta cadeia 3-hidroxiacil-CoA desidrogenase; **HHH** (238970): Síndrome de hiperornitinemia-hiperamoniemia-homocitrulinúria; **HIBCHD** (250620): Deficiência de 3-hidroxiisobutiril-CoA hidrolase; **HMG** (246450): Acidúria 3-hidroxi-3-metilglutárica; **HPHE** (261600): Hiperfenilalaninemia (benigna); **HYRPRO1/HP-I** (239500): Hiperprolinemia tipo I; **HYRPRO2/HP-II** (239510): Hiperprolinemia tipo II; **IBG/IBDD** (611283): Deficiência de isobutiril-CoA desidrogenase / Isobutirilglicinúria; **IVA** (243500): Acidemia isovalérica; **LCHAD** (609016): Deficiência de longa cadeia L-3-hidroxi acil-CoA desidrogenase; **LYS** (238700): Hiperlisinemia; **M/SCHAD** (601609): Deficiência de média/curta cadeia L-3-hidroxi acil-CoA desidrogenase; **MAL** (248360): Acidúria/acidemia malônica; **MCAD** (201450): Deficiência de média cadeia acil-CoA desidrogenase; **MCD** (253270): Deficiência de holocarboxilase sintetase / deficiência múltipla de carboxilase; **MCKAT** (602199): Deficiência de medium-chain ketoacyl-CoA dehidrogenase/tiolase; **MET/MAT** (250850; 613752; 606664): Hipermetioninemia incl. Deficiência de metionina adenosiltransferase; **MSUD** (248600): Doença da urina de xarope de bordo; **MTHFR** (236250): Deficiência de metilenetetrahidrofolato redutase; **MUT** (251000): Acidemia metilmalônica; **NAGS** (237310): Deficiência de N-acetilglutamato sintase; **NKHG** (605899): Hiperiglicinemia não cetótica (sinônimo: encefalopatia glicínica, GCE); **OH-PRO** (237000): Hidroxiprolinemia / deficiência de 4-hidroxi-L-prolina oxidase; **OTC** (300461; 311250): Deficiência de ornitina transcarbamilase; **PA/PROP** (606054): Acidemia propiônica; **PC** (266150): Deficiência de piruvato carboxilase; **PDHxD** (245348, 245349, 246900, 312170, 608782, 614111): Deficiência do complexo da piruvato desidrogenase, incluindo deficiência de piruvato desidrogenase E2, deficiência de piruvato desidrogenase E3, deficiência de diidrolipoamida desidrogenase, deficiência de piruvato desidrogenase E1-alfa, deficiência de piruvato desidrogenase fosfatase, deficiência de piruvato desidrogenase E1-beta; **PKU** (261600): Fenilcetonúria clássica; **RDLD** (618863): Deficiência da Proteína 5 com Domínio de Ligação a Acil-CoA / distrofia retinal com leucodistrofia; **SAHH** (613752): Deficiência de S-adenosilhomocisteína hidrolase; **SCAD** (201470): Deficiência de curta cadeia acil-CoA desidrogenase; SCD: Deficiências secundárias de carnitina (ex., em acidemias orgânicas e distúrbios de oxidação de ácidos graxos); **SER** (614023, 610992, 601815, 256520, 616038): Síndrome da deficiência de serina (incl. Síndrome de Neu-Laxova) causada por deficiência de 3-fosfoglicerato desidrogenase, deficiência de 3-fosfoserina fosfatase ou deficiência de fosfoserina aminotransferase; **Single PED**: Deficiências de Enzimas Peroxissomais Isoladas, inclui deficiência da proteína D-bifuncional (DBP) (261515) e deficiência de acil-CoA oxidase peroxissomal (ACOX1) (264470); **SUCLA2** (603921): Deficiência de succinil-CoA sintetase; **TCN2** (275350): Deficiência de transcobalamina II; **TFP** (609015): Deficiência da proteína trifuncional; **Tyr (trans)** (ORPHA:3402): Tirosinemia transitória; **TYR I** (276700): Tirosinemia tipo I; **TYR II** (276600): Tirosinemia tipo II; **TYR III** (276710): Tirosinemia tipo III; **VAL** (277100): Valinemia; **VLCAD** (201475): Deficiência de muito longa cadeia acil-CoA desidrogenase; **ZS/PBD-ZSS** (214100; 214110; 614859; 614862; 614866; 614870; 614872; 614876; 614882; 614883; 614886): Síndrome de Zellweger / Distúrbios da biogênese peroxissomal.

2.4 Limitações Clínicas

Este teste é destinado à triagem. Nenhum diagnóstico pode ser feito com base exclusiva nos resultados obtidos. Recém-nascidos identificados com achados presuntivos exigem testes adicionais e avaliação clínica para confirmar sua condição como afetados ou não afetados. Além disso, os usuários devem seguir as diretrizes locais em relação aos testes confirmatórios.

A interpretação médica dos resultados adquiridos com este ensaio deve ser realizada apenas por pessoal com treinamento médico apropriado ou por um especialista em metabolismo.

Não existem intervalos de referência e valores de corte universalmente aplicáveis para os analitos cobertos por este ensaio. Resultados obtidos usando métodos diferentes não podem ser transferidos. Fatores de conversão entre diferentes métodos de análise não devem ser usados para prever resultados para um paciente em particular. Os laboratórios devem indicar o método utilizado para análise para permitir uma interpretação precisa dos resultados. Os usuários devem especificar seus próprios intervalos de referência e valores de corte com base na avaliação clínica. Diferentes pontos de corte podem ser necessários para diferentes sistemas de MS/MS (espectrometria de massa em tandem), mesmo ao usar o mesmo ensaio.

Devido a diretrizes específicas de cada país e região, a coleta de sangue para a triagem neonatal pode ser realizada em vários momentos (horas) após o nascimento. Uma vez que a concentração de analitos específicos é influenciada pelo momento da coleta de sangue, pode ser necessário implementar intervalos de referência e valores de corte específicos para a idade, a fim de interpretar os resultados com precisão. Além disso, cada laboratório deve seguir os regulamentos locais correspondentes. Observe que recém-nascidos afetados só podem ser identificados se os níveis dos analitos estiverem anormais no momento da amostragem. Dependendo do tempo estabelecido para a amostragem em sua população, alguns distúrbios-alvo podem não ser detectáveis ainda.

É importante notar que alguns compostos isoméricos ou isobáricos não podem ser distinguidos usando este método (análise por injeção de fluxo-espectrometria de massa em tandem). Assim, nestes casos particulares, é fornecida uma estimativa somada de múltiplos isômeros/isóbaros. Portanto, testes de acompanhamento devem ser realizados para identificar o(s) analito(s) que levaram ao resultado anormal.

Embora este seja um teste quantitativo, a amostragem de spots de sangue seco em papel de filtro pode afetar os resultados da triagem, por exemplo, com base em diferenças no hematócrito (o hematócrito é reconhecido como um fator significativo que afeta as características de uma amostra de spot de sangue seco). Certifique-se de aderir às diretrizes locais e internacionais aplicáveis em relação à coleta de espécimes (por exemplo, Norma CLSI NBS01-Ed7, 2021 [3]).

Por favor, considere as informações sobre coleta e armazenamento da amostra do paciente (ver capítulo 5.1) e sobre possíveis interferências (ver capítulo 11) ao utilizar o ensaio.

3 Sistema LC-MS/MS

Cuidado:

Ao utilizar os reagentes, cumprir com as informações de perigo no Anexo I.

Para a utilização correta do seu sistema de LC-MS/MS, leia o manual de instruções correspondente. Se tiver alguma dúvida, contacte o fabricante do instrumento. Pode ser necessário treinamento pelo fabricante.

3.1 Equipamento de uso geral

Este capítulo lista todo o equipamento adicional de uso geral não listado no capítulo 1 que é necessário ou recomendado para a análise FIA-MS/MS de aminoácidos, succinilacetona, carnitina livre, acilcarnitinas, lisofosfolípidios, nucleosídeos, creatina e metabolitos relacionados à creatina em sangue seco, utilizando os ensaios 57075, 57075-ADO, 57075-F e 57075-F-ADO.

Equipamento essencial

- Espectrômetro de massa tandem de triplo quadrupolo com fonte ESI (desde que forneça sensibilidade suficiente)
- Sistema HPLC incluindo amostrador automático (autosampler)
- Software especial de avaliação
- Picotador manual ou automático para perfurar a amostra, com diâmetro de 1/8 de polegada (3,2 mm)
- Agitador termostaticado para placas de 96 poços:
- Recomenda-se a utilização de 2 agitadores separados, um para a extração à temperatura ambiente e outro para a extração/incubação a 45 °C.
- Rolo de borracha para selar as placas de 96 poços com folhas de proteção
- Balão volumétrico de 50,0 mL

Para preparação de amostra com Placas de Filtro de 96 Poços:

- Centrifuga para placa filtrante de 96 poços (velocidade: mínimo de 2200 x g; 3000 x g recomendado)

Equipamento opcional/recomendado

- Função de refrigeração no amostrador automático

3.2 Parâmetros do instrumento HPLC

As substâncias são introduzidas no MS/MS por injeção de fluxo (flow injection) usando um gradiente de fluxo. Manter a fase móvel fechada ou tampada, mesmo durante a utilização. Não é necessária coluna HPLC nem forno de colunas. Conectar o sistema HPLC ao sistema MS/MS através do Pré-filtro PEEK (nº de pedido 57016) e do Capilar Restritor (nº de pedido 55018).

Nota:

A utilização de um pré-filtro (Pré-filtro PEEK 2 µm, nº de pedido 57016) é obrigatória para garantir o desempenho analítico do ensaio.

Configurações do instrumento:

Amostrador automático:	Refrigeração recomendada, ver capítulo 5.7
Volume de injeção:	10 µL
Tempo de análise:	1,7 min
Gradiente de fluxo:	20 a 600 µL/min
Solução de lavagem da agulha para o injetor:	Solução de Lavagem (no. de pedido 57007)

Perfil do Gradiente:

O perfil de gradiente mostrado abaixo e o exemplo de um cromatograma no capítulo 6.3 destinam-se a servir como base para otimização. Devido aos diferentes volumes mortos de sistemas HPLC individuais, o perfil de gradiente pode ter que ser modificado. Se o sistema capilar ou o volume de injeção forem alterados, o gradiente deve ser verificado e ajustado conforme necessário.

Tabela 1: Perfil do Gradiente

Tempo	0,01 min	0,20 min	0,21 min	1,21 min	1,22 min	1,70 min
Fluxo	200 µL/min	200 µL/min	20 µL/min	20 µL/min	600 µL/min	600 µL/min

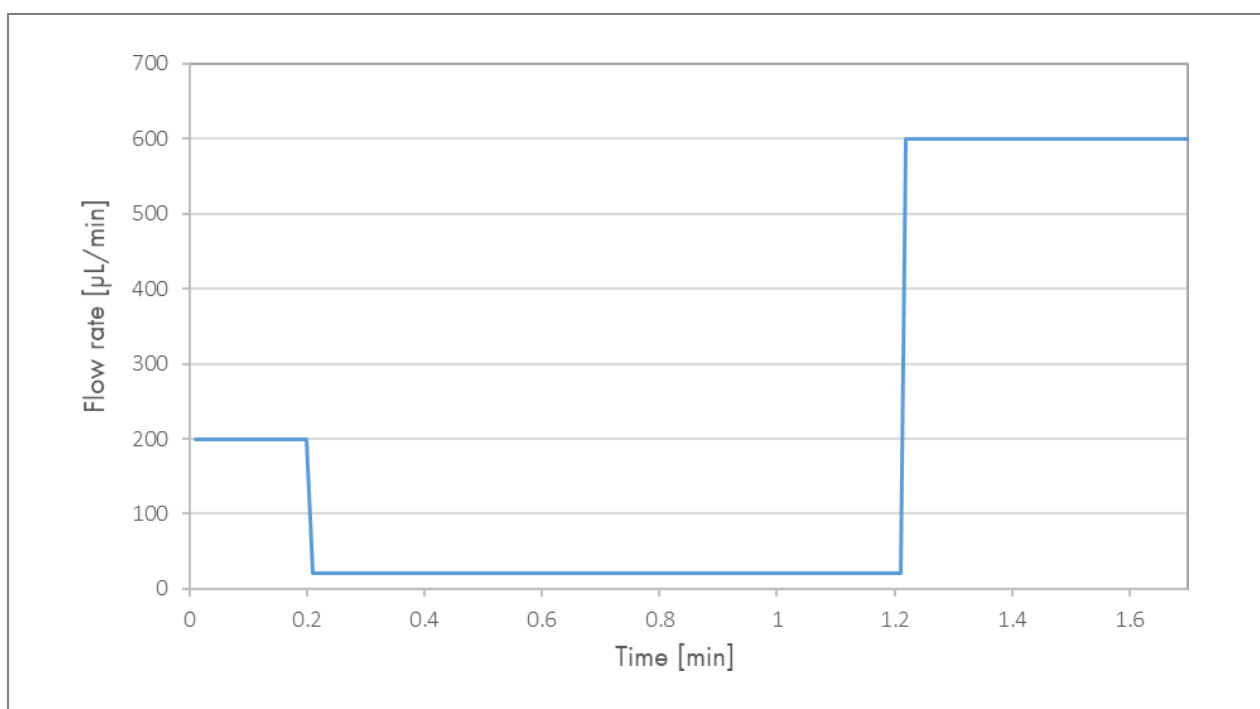


Figura 1: Diagrama do perfil de gradiente

3.3 Operação MS/MS

Princípio de Funcionamento:

Espectrômetros de massa medem moléculas de acordo com sua razão massa-carga (m/z). Os analitos primeiro precisam ser ionizados e transferidos para a fase gasosa. A ionização por electrospray (ESI) mostrou-se um método de ionização altamente versátil e de fácil utilização para este propósito.

O método de espectrometria de massa em tandem de triplo quadrupolo utiliza vários modos de medição. O único utilizado para o ensaio aqui apresentado é o monitoramento de reações múltiplas.

Monitoramento de reações múltiplas (MRM):

No modo MRM, ambos os filtros de massa, o primeiro e o segundo são configurados estaticamente para uma razão massa-carga (m/z) específica. No MS 1, o íon molecular do analito é geralmente selecionado. Íons com uma razão massa-carga diferente não são detectados. O íon molecular sofre fragmentação na célula de colisão (Q2) e o MS 2 detecta o íon fragmento característico. Todas as transições MRM são fornecidas no capítulo 4. O modo MRM permite uma quantificação excecionalmente sensível e seletiva.

3.4 Otimização dos MRMs (Tuning)

Antes de iniciar o tuning, é altamente recomendável verificar a precisão e a resolução de massa do sistema MS/MS. Se a precisão e a resolução de massa estiverem fora das especificações do fabricante do instrumento, uma nova calibração do espectrômetro de massa é recomendada. Após isso, as transições MRM do analito devem ser ajustadas da seguinte forma:

1. Dilua os Tuning Mixes (n°s de pedido 57097-1, 57097-2 e 57098) com a Fase Móvel (n° de pedido 57001) de forma apropriada para o dispositivo específico (por exemplo, 1:50 para instrumentos da série SCIEX 4500 ou Waters Xevo TQ-S micro).
2. Injete o Tuning Mix diluído ou infunda-o diretamente usando uma bomba de seringa (fluxo de 0,02 mL/min).
3. Use o Q1 Scan (Varredura MS) para determinar as posições exatas do sinal máximo das massas no MS1 (íons precursores/pai) (com pelo menos uma casa decimal).
4. Determine as posições exatas do sinal máximo das massas no MS2 (íons produto/filho) por meio de uma varredura de íon produto (product ion scan) (com pelo menos uma casa decimal).
5. Otimize os parâmetros individuais para cada transição MRM (por exemplo, energia de colisão).
6. Use as transições MRM otimizadas para otimizar os parâmetros da fonte de íons, especialmente a voltagem do capilar, a temperatura e os fluxos de gases.

3.5 Faixa de Medição Analítica

A determinação do limite inferior da faixa de medida analítica pode ser realizada de acordo com diretrizes conhecidas.

A determinação do limite superior da faixa de medida analítica pode ser necessária, especialmente ao utilizar espectrômetros de massa com faixas dinâmicas lineares baixas. Para este fim, os Conjuntos de Linearidade de Spot de Sangue Seco Multinível (n°s de pedido 57080 e 57090) podem ser usados da seguinte forma:

1. Prepare todos os 6 níveis do Conjunto de Linearidade de Spot de Sangue Seco Multinível (n° de pedido 57080) ou do Conjunto de Linearidade de Spot de Sangue Seco Multinível incl. Ado, dAdo (n° de pedido 57090) de acordo com o capítulo 5.6.
2. Injete as amostras preparadas em ordem crescente (do nível mais baixo para o mais alto).
3. Calcule as concentrações de todos os níveis de acordo com o capítulo 6.4.
4. Verifique se as concentrações determinadas possuem uma correlação linear com suas concentrações enriquecidas declaradas na folha de informações do produto:
 - a) Se não houver correlação linear, remova os níveis mais altos sucessivamente do conjunto de dados para os analitos em questão e repita o cálculo até que uma correlação linear possa ser demonstrada.
 - b) O nível mais alto resultante, com sua concentração de analito obtida (=medida), é definido como o limite superior da faixa dinâmica linear no sistema utilizado.

Nota

As concentrações declaradas na bula de informações do produto dos Conjuntos de Linearidade são valores enriquecidos e não devem ser usadas para calibrar o sistema de análise para a quantificação de amostras de pacientes.

3.6 Inicialização do Sistema

Antes de iniciar uma sequência, prepare o sistema LC-MS/MS da seguinte forma:

1. Lave a linha de solvente com Fase Móvel (nº de pedido 57001) e enxague todo o sistema HPLC por aproximadamente 5 minutos usando as condições iniciais do método. Além disso, lave a linha de solvente do amostrador automático (autosampler) para lavagem externa da agulha com Solução de Lavagem (nº de pedido 57007).
2. Monte a Capilar Restritora (nº de pedido 55015) incluindo o Pré-filtro PEEK (nº de pedido 55033) e equilibre o sistema por cerca de 15 minutos, usando as condições iniciais do método.
3. Realize três injeções sem matriz (matrix-free) (por exemplo, com Fase Móvel, nº de pedido 57001), seguidas de pelo menos três injeções do eluato do Controle de Mancha de Sangue Seco Nível I (nºs de pedido 0195 ou 0295) até que as intensidades do sinal dos analitos e dos padrões internos estejam consistentes e estáveis.
4. Inicie a sequência

Nota:

Verifique a precisão de massa e a resolução do espectrômetro de massa periodicamente e recalibre o espectrômetro de massa se notar desvios.

3.7 Desligamento do Sistema

Para pausar a operação, desligue a bomba HPLC e deixe a fase móvel dentro do sistema HPLC. É pouco provável que se formem cristais de sal nas vedações dos pistões das bombas HPLC. Para proteger a fonte de íons e o multiplicador (detector), coloque o sistema MS/MS em modo de espera (standby mode). Deixe as bombas de vácuo do sistema MS/MS ligadas.

Para preparar o sistema para uma troca de ensaio, desmonte o Capilar Restritor incluindo o Pré-filtro PEEK do sistema. Uma lavagem do sistema com metanol 50% é possível.

Para uma parada mais longa, desligue a bomba HPLC e coloque o sistema MS/MS em modo de espera.

4 Transições MRM

A tabela a seguir inclui todas as transições MRM para os analitos e seus padrões internos marcados com isótopos estáveis. Meça os analitos e os padrões internos no modo de ionização positiva (ESI positivo).

Tabela 2: Transições MRM recomendadas para aminoácidos, succinilacetona, carnitina livre, acilcarnitinas, lisofosfolipídios, nucleosídeos, creatina e metabólitos relacionados à creatina

Substância	Abreviação	Transição de massa (MRM)
Aminoácidos		
* Alanina/sarcosina	Ala/Sar	90 > 44
Alanina-D4	Ala-D4	94 > 48
Arginina	Arg	175 > 70
Arginina-13C6	Arg-13C6	181 > 74
Ácido argininosuccínico	Asa	291 > 70
Ácido argininosuccínico-13C6,15N4	Asa-13C6,15N4	301 > 75

Substância	Abreviação	Transição de massa (MRM)
Citrulina	Cit	176 > 113
Citrulina-D4	Cit-D4	180 > 117
*Glutamina/lisina	Gln/Lys	147 > 84
Glutamina-13C5	Gln-13C5	152 > 88
Ácido glutâmico	Glu	148 > 130
Ácido glutâmico-D3	Glu-D3	151 > 133
Glicina	Gly	76 > 30
Glicina-13C2, 15N	Gly-13C2, 15N	79 > 32
*Leucina/isoleucina/alo-isoleucina/hidroxiprolina	XLeu	132 > 86
Leucina-D3	Leu-D3	135 > 89
Metionina	Met	150 > 133
Metionina-D3	Met-D3	153 > 136
Ornitina	Orn	133 > 70
Ornitina-D6	Orn-D6	139 > 76
Fenilalanina	Phe	166 > 120
Fenilalanina-13C6	Phe-13C6	172 > 126
Prolina	Pro	116 > 70
Prolina-D7	Pro-D7	123 > 77
Serina	Ser	106 > 60
Serina-D3	Ser-D3	109 > 63
Tirosina	Tyr	182 > 136
Tirosina-D4	Tyr-D4	186 > 140
Valina	Val	118 > 72
Valina-D8	Val-D8	126 > 80
3-O-metil-DOPA	3-OMD	212 > 153
3-O-metil-DOPA-D3	3-OMD-D3	215 > 156
Carnitinas		
Carnitina livre	C0	162 > 85
Carnitina livre-D9	C0-D9	171 > 85
Acetilcarnitina	C2	204 > 85
Acetilcarnitina-D3	C2-D3	207 > 85
Propionilcarnitina	C3	218 > 85
Propionilcarnitina-D3	C3-D3	221 > 85
*Butirilcarnitina/isobutirilcarnitina	C4	232 > 85
Butirilcarnitina-D3	C4-D3	235 > 85
*(Metilmalonilcarnitina/succinilcarnitina) / (3-Hidroxiisovalerilcarnitina/2-metil-3-hidroxi-butirilcarnitina)	C4DC/C5OH	262 > 85
3-Hidroxiisovalerilcarnitina-D3	C5OH-D3	265 > 85
*Isovalerilcarnitina/2-metilbutirilcarnitina	C5	246 > 85
Isovalerilcarnitina-D9	C5-D9	255 > 85
*Glutarilcarnitina/3-hidroxi-hexanoilcarnitina	C5DC/C6OH	276 > 85
Glutarilcarnitina-D6	C5DC-D6	282 > 85
Hexanoilcarnitina	C6	260 > 85
Hexanoilcarnitina-D3	C6-D3	263 > 85
Octanoilcarnitina	C8	288 > 85
Octanoilcarnitina-D3	C8-D3	291 > 85
Decanoilcarnitina	C10	316 > 85

Substância	Abreviação	Transição de massa (MRM)
Decanoilcarnitina-D3	C10-D3	319 > 85
Dodecanoilcarnitina	C12	344 > 85
Dodecanoilcarnitina-D3	C12-D3	347 > 85
Tetradecanoilcarnitina	C14	372 > 85
Tetradecanoilcarnitina-D3	C14-D3	375 > 85
Hexadecanoilcarnitina	C16	400 > 85
Hexadecanoilcarnitina-D3	C16-D3	403 > 85
3-Hidroxihexadecanoilcarnitina	C16OH	416 > 85
3-Hidroxihexadecanoilcarnitina-D3	C16OH-D3	419 > 85
Octadecanoilcarnitina	C18	428 > 85
Octadecanoilcarnitina-D3	C18-D3	431 > 85
Hexacosanoilcarnitina	C26	540 > 85
Hexacosanoilcarnitina-D3	C26-D3	543 > 85
Cetonas		
Succinilacetona	SUAC	155 > 137
Succinilacetona-13C5	SUAC-13C5	160 > 142
Nucleosídeos		
Adenosina	Ado	268 > 136
Adenosina-13C5	Ado-13C5	273 > 136
2'-Deoxiadenosina	dAdo	252 > 136
2'-Deoxiadenosina-13C5	dAdo-13C5	257 > 136
Lisofosfolipídeos		
1-Hexacosanoil-2-hidroxi-sn-glicero-3-fosfocolina	C26:0 LPC	636 > 104
1-Hexacosanoil-2-hidroxi-sn-glicero-3-fosfocolina-D4	C26:0 LPC-D4	640 > 104
Creatina e metabólitos relacionados		
Creatina	CRE	132 > 90
Creatina-D5	CRE-D5	137 > 95
Creatinina	CRN	114 > 44
Creatinina-D3	CRN-D3	117 > 47
Ácido guanidinoacético	GAA	118 > 101
Ácido guanidinoacético-13C2, 15N	GAA-13C2, 15N	121 > 104

* Os seguintes analitos são isômeros ou isóbaros e não podem ser distinguidos no experimento de espectrometria de massa em tandem:

- Alanina/sarcosina (Ala/Sar)
- Leucina/isoleucina/alo-isoleucina/hidroxiprolina (*XLeu* = leucina/isoleucina/alo-isoleucina/hidroxiprolina)
- Glutamina/lisina (Gln/Lis)
- Butirilcarnitina/isobutirilcarnitina (C4)
- Isovalerilcarnitina/2-metilbutirilcarnitina (C5)
- Metilmalonilcarnitina/succinilcarnitina (C4DC)/3-hidroxiisovalerilcarnitina/2-metil-3-hidroxibutirilcarnitina (C5OH)
- Glutarilcarnitina/3-hidroxihexanoilcarnitina (C5DC/C6OH)

As massas nominais especificadas são pontos de partida para otimização. A posição das massas exatas pode variar ligeiramente de um sistema de MS para outro e precisa ser determinada com precisão durante a calibração (tuning) do método. Para configurar o método, recomendamos especificar as posições de massa com pelo menos uma casa decimal. Use os Tuning Mixes para este fim (números de pedido 57097-1, 57097-2 e 57098, ver capítulo 3.4).

A tabela a seguir mostra acilcarnitinas e lisofosfolípidios sem padrões internos próprios, suas transições de massa e os padrões internos marcados isotopicamente estáveis recomendados.

Tabela 3: Transições MRM recomendadas para acilcarnitinas e lisofosfolípidios sem padrões internos próprios (ISTD)

Substância	Abreviação	MRM	ISTD Recomendado
* Malonylcarnitine/(3-hydroxybutyrylcarnitine/ 3-hydroxyisobutyrylcarnitine)	C3DC/C4OH	248 > 85	C4-D3
* Tiglylcarnitine/3-methylcrotonylcarnitine	C5:1	244 > 85	C5-D9
* Adipylcarnitine/3-methylglutaryl carnitine	C6DC	290 > 85	C5DC-D6
Octenoylcarnitine	C8:1	286 > 85	C8-D3
Decenoylcarnitine	C10:1	314 > 85	C10-D3
Decadienoylcarnitine	C10:2	312 > 85	C10-D3
Dodecenoylcarnitine	C12:1	342 > 85	C12-D3
Tetradecenoylcarnitine	C14:1	370 > 85	C14-D3
Tetradecadienoylcarnitine	C14:2	368 > 85	C14-D3
3-Hydroxytetradecanoylcarnitine	C14OH	388 > 85	C14-D3
Hexadecenoylcarnitine	C16:1	398 > 85	C16-D3
* 3-Hydroxyhexadecenoylcarnitine/ heptadecanoylcarnitine	C16:1OH/C17	414 > 85	C16-D3
Octadecenoylcarnitine	C18:1	426 > 85	C18-D3
Octadecadienoylcarnitine	C18:2	424 > 85	C18-D3
3-Hydroxyoctadecanoylcarnitine	C18OH	444 > 85	C18-D3
3-Hydroxyoctadecenoylcarnitine	C18:1OH	442 > 85	C18-D3
3-Hydroxyoctadecadienoylcarnitine	C18:2OH	440 > 85	C18-D3
Eicosanoylcarnitine	C20	456 > 85	C26-D3
Docosanoylcarnitine	C22	484 > 85	C26-D3
Tetracosanoylcarnitine	C24	512 > 85	C26-D3
1-Arachydoyl-2-hydroxy-sn-glycero-3- phosphocholine	C20:0 LPC	552 > 104	C26:0 LPC-D4
1-Behenoyl-2-hydroxy-sn-glycero-3-phosphocholine	C22:0 LPC	580 > 104	C26:0 LPC-D4
1-Lignoceroyl-2-hydroxy-sn-glycero-3- phosphocholine	C24:0 LPC	608 > 104	C26:0 LPC-D4

* Os seguintes analitos são isômeros ou isóbaros e não podem ser distinguidos no experimento de espectrometria de massa em tandem:

- Malonilcarnitina (C3DC)/3-hidroxibutirilcarnitina/3-hidroxiisobutirilcarnitina (C4OH)
- Tigililcarnitina/3-metilcrotonilcarnitina (C5:1)
- Adipilcarnitina/3-metilglutarylcaritina (C6DC)
- 3-hidroxihexadecenoilcarnitina/heptadecanoilcarnitina (C16:1OH/C17)

Se necessitar de mais informações para configurar o método no seu sistema de LC-MS/MS, por favor, contacte a equipa de suporte da Chromsystems através da nossa linha direta +49 89 18930-111 ou por e-mail para support@chromsystems.com.

5 Preparo da amostra

Cuidado:

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

Assegure-se de que, dentro de uma sequência, o lote de reagentes (incluindo os padrões internos) utilizado para a preparação da amostra, bem como o lote dos controles, não sejam alterados.

Cuidado:

Todos os reagentes e materiais de laboratório estão em risco de contaminação por substâncias endógenas. Evite o contacto com a pele. Use sempre luvas novas e certifique-se de que as luvas não entram em contacto com fluidos corporais, especialmente suor. Se isso acontecer, troque de luvas.

5.1 Coleta e armazenamento de amostras de pacientes

Para a colheita e armazenamento de espécimes de pacientes, existem recomendações diferentes dependendo do país. É fortemente recomendado o cumprimento das regulamentações nacionais. Por exemplo, na Alemanha, a colheita de sangue para o rastreio neonatal deve ser realizada entre 36 e 72 horas após o nascimento (ver as diretrizes alemãs "Kinder-Richtlinie" [4]), enquanto de acordo com a Norma CLSI NBS01-Ed7, 2021 [3] "alguns programas de rastreio neonatal preferem que a colheita inicial seja feita após 24 horas do nascimento. O momento da colheita é um compromisso e a maioria dos programas de rastreio neonatal recomenda atualmente que a colheita inicial seja feita entre as 24 e as 48 horas de idade".

O sangue é pingado num papel de filtro e seco. Recomenda-se a utilização de papéis de filtro aprovados pela FDA ou equivalentes (por exemplo, papel de filtro grau 903 ou 226). A amostra de sangue deve preferencialmente ser colhida do calcanhar do recém-nascido. Não deve ser utilizado sangue com EDTA ou heparina, pois podem ser obtidos resultados falsamente negativos ou falsamente positivos!

Descrição sumária do procedimento de colheita de sangue:

1. Limpe o local designado para a picada no calcanhar do recém-nascido com um antisséptico. Seque o calcanhar com uma compressa estéril.
2. Puncione o calcanhar do bebê com uma lanceta estéril. A ponta da lanceta deve ser menor que 2 mm; punções mais profundas podem lesionar recém-nascidos pequenos.
3. Remova a primeira gota de sangue com uma compressa estéril.
4. Toque na próxima gota grande de sangue com o papel de filtro. Aguarde até que o sangue tenha impregnado totalmente o papel e preenchido completamente o círculo designado. Não sobreponha gotas de sangue nem as aplique em ambos os lados do papel de filtro. Isso alteraria o volume de sangue aplicado por mancha, podendo indicar falsamente resultados patológicos.
5. Preencha cada um dos círculos restantes no papel de filtro com uma única gota de sangue.
6. Os cuidados com a ferida devem ser de acordo com a prática comum do hospital.
7. Secar as manchas de sangue durante 4 horas numa superfície seca, horizontal e não absorvente, a +20 a +25 °C.
8. Envie os papéis de filtro secos para o laboratório no prazo de 24 horas.

Instruções detalhadas para a colheita de espécimes podem ser encontradas no manual do fabricante do papel de filtro e nas diretrizes alemãs "Kinder-Richtlinie" [4] ou noutras regulamentações nacionais aplicáveis. Além disso, a Norma CLSI NBS01-Ed7, 2021 [3] fornece informações detalhadas sobre a aceitabilidade e qualidade do espécime, referindo-se tanto a aspetos qualitativos (características macroscópicas da impregnação de sangue no papel de filtro) como quantitativos (volume) do sangue aplicado no papel de filtro. A diretriz afirma: "A qualidade do espécime é um fator importante na definição da sua aceitabilidade, porque a qualidade do espécime pode afetar os resultados analíticos obtidos e, consequentemente, o resultado do rastreio neonatal. A colheita de um espécime de má qualidade é uma das razões pelas quais

um espécime pode ser rejeitado como inaceitável".

O armazenamento em ambiente de baixa humidade (inferior a 30%) à temperatura ambiente (+20 a +25 °C) é adequado se a análise for antecipada nas 24 a 48 horas seguintes. Humidade baixa e temperaturas baixas (refrigerado ou abaixo de -18 °C) são sugeridas para armazenamento para além de 48 horas [3]. Evite temperaturas acima de +25 °C, uma vez que temperaturas elevadas podem levar à degradação de alguns analitos.

Os seguintes dados de estabilidade baseiam-se em investigações internas.

Devido à indisponibilidade de quantidades suficientes de sangue residual e recentemente colhido de recém-nascidos, foi utilizado sangue total humano de adultos para este estudo.

Para analitos presentes em concentrações suficientemente elevadas no sangue de dadores, foi utilizado sangue de 10 adultos saudáveis diferentes. Para os analitos restantes, que não estão naturalmente presentes em concentrações suficientes no sangue, foi utilizado um pool de sangue total humano de adultos, fortificado com os respetivos analitos. Além disso, para alguns analitos, foram utilizados inibidores enzimáticos para simular condições patológicas em que a atividade enzimática é reduzida ou está ausente. Caso contrário, não seria possível obter informações sobre a estabilidade no sangue humano devido à degradação enzimática imediata.

Após a aplicação do sangue no papel de filtro, as manchas foram secas e armazenadas em sacos de alumínio herméticos contendo sacos dessecantes e cartões indicadores de humidade.

Tabela 4: Estabilidade de amostras de DBS de sangue adulto humano, armazenadas em sacos herméticos com umidade abaixo de 30%.

Temperatura de Armazenamento	Vida Útil
+30 °C	C20:0 LPC, C22:0 LPC, C24:0 LPC and C26:0 LPC: 3 dias Orn, CRN e C6DC: 7 dias Todos os outros analitos: 14 dias
+20 °C	14 dias
+2 a +8 °C	4 semanas
abaixo -18 °C	3 meses
Ciclos de congelamento-descongelamento (temperatura de congelamento abaixo de -18 °C)	1 ciclo

Nota:

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

5.2 Padrões Internos

Estão disponíveis três diferentes produtos padrão interno:

- O Mix de Padrão Interno básico (nº de pedido 57074) contém os padrões internos para todos os analitos, exceto para succinilacetona, adenosina e 2'-desoxiadenosina. Ele precisa ser reconstituído antes do preparo da amostra (ver capítulo 5.2.1 ou 5.2.2)
- O Padrão Interno Succinilacetona (nº de pedido 57044) contém o padrão interno para succinilacetona. Ele está pronto para uso e não precisa ser reconstituído.
- O Mix de Padrão Interno Ado, dAdo (nº de pedido 57474) contém os padrões internos para adenosina e 2'-desoxiadenosina e deve ser reconstituído em conjunto com o Mix de Padrão Interno básico (nº de pedido 57074) antes do preparo da amostra (ver capítulo 5.2.2)

Os kits 57075 e 57075-F incluem o Mix de Padrão Interno básico (nº de pedido 57074) e o Padrão Interno Succinilacetona (nº de pedido 57044). Para a determinação de adenosina e 2'-desoxiadenosina, você precisa adicionalmente do Mix de Padrão Interno Ado, dAdo (nº de pedido 57474).

5.2.1 Reconstituição individual do Internal Standard Mix 57074

O Mix de Padrão Interno (n° de pedido 57074) é utilizado como calibrador para cada amostra. Todos os padrões internos são rastreáveis a material de referência de ordem superior (ver Anexo V Cadeia de rastreabilidade). Após a reconstituição, uma quantidade definida da solução de padrão interno é adicionada à amostra e submetida a todo o preparo da amostra.

Antes do preparo da amostra, reconstitua o Mix de Padrão Interno com exatamente 50,0 mL de Tampão de Extração (n° de pedido 57078). Proceda da seguinte forma:

1. Remova a selagem e a tampa de borracha do frasco

A tampa de borracha deve ser removida com cuidado, para que sua parte interna não entre em contato com outros objetos. Se houver vestígios do produto liofilizado em sua superfície, nenhuma ação adicional é necessária; prossiga conforme descrito abaixo.

2. Adicione lentamente, com pipeta, 5 mL de Tampão de Extração (n° de pedido 57078) no frasco original do Mix de Padrão Interno (n° de pedido 57074).
3. Tampe o frasco com a tampa de borracha e reconstitua por 10 min a +20 a +25°C (sem agitar durante a etapa de reconstituição de 10 min).
4. Remova a tampa de borracha e, em seguida, usando uma pipeta, misture o conteúdo do frasco aspirando e dispensando-o três vezes e, depois, transfira-o para um balão volumétrico de 50,0 mL.
5. Pipete 5 mL de Tampão de Extração (n° de pedido 57078) para dentro do frasco original do Mix de Padrão Interno e tampe-o com a tampa de borracha. Misture bem o conteúdo do frasco (vórtex) e, em seguida, transfira o líquido para o balão volumétrico.
6. Repita a etapa 5 mais duas vezes.
7. Complete o volume do balão volumétrico até 50,0 mL com Tampão de Extração e misture bem o conteúdo do balão

Para armazenamento, a solução dos padrões internos reconstituídos pode ser transferida para um frasco de vidro âmbar livre de substâncias interferentes. Recomendamos utilizar o frasco e a tampa originais, completamente vazios, do Tampão de Extração (n° de pedido 57078). Certifique-se de identificar este frasco de forma inequívoca.

A solução dos padrões internos reconstituídos possui as mesmas propriedades de perigo que o Tampão de Extração (n° de pedido 57078, ver Anexo I) e as medidas de precaução apropriadas devem ser seguidas.

Evite a exposição à luz solar direta. As concentrações dos padrões internos são dependentes do lote e são fornecidas no folheto informativo do produto do Mix de Padrão Interno.

5.2.2 Reconstituição combinada dos Mixes de Padrão Interno 57074/57474

Se a determinação adicional de Ado e dAdo for realizada, ambos os Mixes de Padrão Interno (n° de pedido 57074 e 57474) são usados como calibrador para cada amostra. Todos os padrões internos são rastreáveis a material de referência de ordem superior (ver Anexo V). Após a reconstituição e unificação de ambos os Mixes de Padrão Interno, uma quantidade definida da solução de padrão interno resultante é adicionada à amostra e submetida a todo o preparo da amostra.

Antes do preparo da amostra, reconstitua e unifique os Mixes de Padrão Interno com exatamente 50,0 mL de Tampão de Extração (n° de pedido 57078). Proceda da seguinte forma:

1. Remova as selagens e as tampas de borracha dos frascos

A tampa de borracha deve ser removida com cuidado, para que sua parte interna não entre em contato com outros objetos. Se houver vestígios do produto liofilizado em sua superfície, nenhuma ação adicional é necessária; prossiga conforme descrito abaixo.

2. Adicione lentamente, com pipeta, 5 mL de Tampão de Extração (n° de pedido 57078) no frasco original do Mix de Padrão Interno (n° de pedido 57074)
3. Adicione lentamente, com pipeta, 5 mL de Tampão de Extração (n° de pedido 57078) no frasco original do Mix de Padrão Interno Ado, dAdo (n° de pedido 57474)
4. Tampe cada frasco com a tampa de borracha correspondente e reconstitua o Mix de Padrão Interno por 10 min a +20 a +25 °C (sem agitar durante a etapa de reconstituição de 10 min)
5. Remova a tampa de borracha e, em seguida, usando uma pipeta, misture o conteúdo de cada frasco aspirando e dispensando-o três vezes e, depois, combine ambos os conteúdos os transferindo para um único balão volumétrico de 50,0 mL
6. Pipete 5 mL de Tampão de Extração (n° de pedido 57078) em cada frasco original dos Mixes de Padrão Interno e tampe-os com as tampas de borracha correspondentes. Misture bem o conteúdo de cada frasco (vórtex) e, em seguida, transfira o líquido para o balão volumétrico
7. Repita a etapa 6 mais duas vezes
8. Complete o volume do balão volumétrico até 50,0 mL com Tampão de Extração e misture bem o conteúdo do balão

Para armazenamento, a solução dos padrões internos reconstituídos pode ser transferida para um frasco de vidro âmbar livre de substâncias interferentes. Recomendamos utilizar o frasco e a tampa originais, completamente vazios, do Tampão de Extração (n° de pedido 57078). Certifique-se de identificar este frasco de forma inequívoca.

A solução dos padrões internos reconstituídos possui as mesmas propriedades de perigo que o Tampão de Extração (n° de pedido 57078, ver Apêndice I) e as medidas de precaução apropriadas devem ser seguidas.

Evite a exposição à luz solar direta. As concentrações dos padrões internos são dependentes do lote e são fornecidas nos folhetos informativos dos produtos dos Mixes de Padrão Interno.

5.2.3 Vida útil dos Padrões Internos após a reconstituição

Após a reconstituição com Tampão de Extração de

- Mix de Padrão Interno (n° de pedido 57074) individualmente,
- ambos os Internal Standard Mixes (n° de pedido 57074 e 57474) em combinação

todos os padrões internos contidos são estáveis conforme a seguir, mas não além da data indicada no rótulo:

Tabela 5: Vida útil dos Mixes de Padrão Interno (n° de pedido 57074 e 57474) após reconstituição

Temperatura de Armazenamento	Vida útil	Outras condições de armazenamento
+20 a +25 °C	3 dias	Proteção da luz, bem fechado
+2 a +8 °C	2 semanas	Proteção da luz, bem fechado
abaixo de -18 °C	1 mês	Proteção da luz, bem fechado
Ciclos de congelamento/descongelamento	1 ciclo	–

5.3 Manipulação do Tampão de Extração Succinilacetona 57013

Após o transporte em temperatura ambiente, o Tampão de Extração Succinilacetona (nº de pedido 57013) é armazenado abaixo de -18°C . Isto resulta em segregação (separação de componentes).

Portanto, deixe este reagente atingir a temperatura ambiente e misture-o bem (vórtex) antes de usar. Uma vez que o reagente foi descongelado após armazenamento abaixo de -18°C , armazene-o a $+2$ a $+8^{\circ}\text{C}$ e evite recongelá-lo.

Prazo de validade do Tampão de Extração Succinilacetona após o descongelamento:

Após o descongelamento, o Tampão de Extração Succinilacetona é estável conforme a seguir, mas não além da data indicada no rótulo:

Tabela 6: Prazo de validade do Tampão de Extração Succinilacetona após o descongelamento e a primeira abertura

Temperatura de armazenamento	Vida útil	Outras condições de armazenamento
$+2$ a $+8^{\circ}\text{C}$	2 semanas	Proteção da luz, bem fechado
Ciclos de congelamento/descongelamento	1 ciclo	—

5.4 Manipulação dos controles

Os *MassCheck®* Dried Blood Spot Controls (nº de pedido 0195, 0196, 0197 e 0295, 0296, 0297) destinam-se a monitorar a exatidão e a precisão de cada sequência analítica e são usados em combinação com os padrões internos para garantir a rastreabilidade da concentração individual da amostra até padrões comercialmente disponíveis da mais alta ordem (ver Anexo V). Estão disponíveis em três níveis de concentração diferentes. Os spots de sangue seco são baseados em sangue total humano. Eles são manuseados da mesma maneira que uma amostra de paciente e são analisados em condições de rotina, de forma análoga ao respectivo procedimento de teste.

Os cartões de filtro são sensíveis à humidade e à temperatura. Por isso, a embalagem inclui um indicador de temperatura, pacotes de dessecante (sílica gel) e um cartão indicador de humidade. Verifique os controles antes de cada utilização da seguinte forma:

1. Verifique o estado do indicador de temperatura colado: Os controles só podem ser utilizados se todos os campos estiverem brancos. Se um campo ficou preto, o cartão de filtro deve ser descartado.
2. Deixe os controles atingirem a temperatura ambiente ($+20$ a $+25^{\circ}\text{C}$), evitando luz solar direta.
3. Abra a embalagem.
4. Verifique imediatamente o estado do indicador de humidade incluído: Se o indicador de humidade mudou de cor de azul para rosa no nível de 30 %, descarte o cartão de filtro

Cuidado:

- Ao picotar os controles, use apenas a área dentro da linha pontilhada. As concentrações dos analitos podem desviar-se dos valores especificados na área marginal.
- Como o aumento da humidade tem um efeito negativo na estabilidade do produto, o tempo fora da embalagem hermética deve ser minimizado.

Imediatamente após o uso, coloque o material de controle restante de volta no saco de armazenamento com fecho de correr, sele hermeticamente e congele abaixo de -18°C .

As concentrações dos analitos nos controles são dependentes do lote. Os valores individuais são fornecidos nas bulas informativas do produto que acompanham cada controle. Também pode baixar os valores em formato de tabela Excel no centro de downloads do nosso website.

Cuidado:

Este produto é fabricado a partir de um *poo*/de sangue total humano, que foi testado pelo fabricante e apresentou resultados negativos para infecções pelo vírus da imunodeficiência humana (HIV), pelo vírus da hepatite B (HBV), pelo vírus da hepatite C (HCV) e pela bactéria *Treponema pallidum*. No entanto, um risco potencial de infecção não pode ser totalmente excluído. Considere todos os produtos que contêm 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.

Prazo de validade dos controles de spot de sangue seco após a primeira abertura:

Após a primeira abertura, os controles de spot de sangue seco são estáveis conforme a seguir, mas não além da data indicada no rótulo:

Tabela 7: Estabilidade dos controles de spot de sangue seco após a primeira abertura

Temperatura de armazenamento	Vida útil	Outras condições de armazenamento
abaixo de -18 °C	3 meses	Em saco com fecho com dessecante, bem fechado
Ciclos de congelamento/descongelamento	9 ciclos	—

5.5 Manipulação dos conjuntos de linearidade

Os Conjuntos de Linearidade para Spot de Sangue Seco Multinível Chromsystems (nº de pedido 57080, 57090) destinam-se a verificar o extremo superior do intervalo linear dinâmico do seu sistema de LC-MS/MS (ver capítulo 3.5). O conjunto contém spots de sangue seco em seis níveis de concentração diferentes. Os spots de sangue seco são baseados em sangue total humano. Elas são manuseadas da mesma maneira que uma amostra de paciente e são analisadas em condições de rotina, de forma análoga ao respectivo procedimento de teste.

Os cartões de filtro dos conjuntos de linearidade são manuseados da mesma forma que os dos controles. Siga as instruções do capítulo 5.4 e tome nota das precauções ali descritas:

Prazo de validade dos Conjuntos de Linearidade para Spot de Sangue Seco Multinível após a primeira abertura:

Após a primeira abertura, os Conjuntos de Linearidade para Spot de Sangue Seco Multinível são estáveis conforme a seguir, mas não além da data indicada no rótulo

Tabela 8: Estabilidade dos Conjuntos de Linearidade para Spot de Sangue Seco Multinível após a primeira abertura

Temperatura de armazenamento	Vida útil	Outras condições de armazenamento
abaixo de -18 °C	3 meses	Em saco com fecho com dessecante, bem fechado
Ciclos de congelamento/descongelamento	9 ciclos	—

5.6 Procedimento de preparação de amostra

Antes da preparação da amostra, deixe que os reagentes/controles/amostras armazenados congelados ou refrigerados atinjam a temperatura ambiente. Misture bem os produtos líquidos.

A preparação da amostra é robusta dentro de certos limites. Para detalhes, consulte os dados de robustez no Anexo II.

5.6.1 Preparo de amostra com Placa de Filtro de 96 Poços

Para preparar as amostras de pacientes e os controles de qualidade para análise, execute os seguintes passos na ordem indicada:

1. Picotagem da amostra:

Coloque uma Placa de Filtro de 96 Poços (n° de pedido 57055) sobre uma Placa de 96 Poços (n° de pedido 57010). Perfure um disco de mancha de sangue seco de 1/8 de polegada (3,2 mm) do cartão de filtro para um poço da Placa de Filtro de 96 Poços.

2. Extração:

Adicione 200 µL do Mix de Padrão Interno reconstituído (n° de pedido 57074) ou, no caso de determinação adicional de Ado e dAdo, 200 µL da combinação reconstituída dos Mixes de Padrão Interno (n° de pedido 57074 e 57474) (ver capítulo 5.2) a cada amostra. Sele a Placa de Filtro de 96 Poços com uma Lâmina Protetora (n° de pedido 55011) e agite ambas as placas, uma sobre a outra, a 600 rpm por 20 min a +20 a +25 °C.

3. Centrifugação:

Remova a Lâmina Protetora da Placa de Filtro de 96 Poços.

Antes da centrifugação, verifique os níveis de líquido nos poços da placa superior (Placa de Filtro de 96 Poços) sem levantar a placa da placa de coleta. Se poços individuais contiverem obviamente menos líquido ou nenhum líquido, as amostras afetadas devem ser excluídas desta medição e a preparação da amostra deve ser repetida para essas amostras.

Transfira o sobrenadante para a Placa de 96 Poços por centrifugação a 3000 x g por 5 min. Retire a Placa de Filtro de 96 Poços com os discos de spot de sangue seco. Em seguida, sele a Placa de 96 Poços que contém o eluato com uma nova Lâmina Protetora (n° de pedido 55011).

4. Extração de succinilacetona:

Adicione primeiro 75 µL de Tampão de Extração Succinilacetona (n° de pedido 57013) e, em seguida, 75 µL do Padrão Interno Succinilacetona (n° de pedido 57044) ao disco de spot de sangue seco restante. Sele suavemente a Placa de Filtro de 96 Poços com uma Lâmina Protetora (n° de pedido 55011) e agite por 30 min a 45 °C e 400 rpm.

Verifique se houve algum vazamento. Se poços individuais contiverem obviamente menos líquido ou nenhum líquido, as amostras afetadas devem ser excluídas desta medição e a preparação da amostra deve ser repetida para essas amostras.

5. Agrupamento dos extratos / Centrifugação:

Remova as Lâminas Protetoras da Placa de Filtro de 96 Poços e da Placa de 96 Poços. Agrupe os extratos do passo 3 e do passo 4, centrifugando a Placa de Filtro de 96 Poços (contendo o extrato do passo 4) para dentro da Placa de 96 Poços (contendo o extrato do passo 3) durante 2 min a 3000 x g.

Posteriormente, sele a Placa de 96 Poços que contém o eluato combinado com uma Selo Térmico Perfurável (n° de pedido 57014) ou um Selo Adesivo com Corte em Cruz (n° de pedido 57059).

6. Incubação:

Incube a Placa de 96 Poços por 45 min a +45 °C e 400 rpm antes da injeção.

7. Injeção:

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

Importante

- O Tampão de Extração Succinilacetona (n° de pedido 57013) segrega-se durante o armazenamento abaixo de -18 °C. Após o descongelamento, este reagente deve ser misturado completamente (vórtex) antes do uso, para evitar inhomogeneidades na solução.
- Respeite a ordem de pipetagem descrita no passo 4.
- No passo 5, as Lâminas Protetoras da Placa de Filtro de 96 Poços (n° de pedido 57055) devem ser removidas imediatamente após a extração para evitar a condensação de solvente no filme.
- Em caso de falhas nas etapas de filtração, consulte o capítulo 12.

5.6.2 Preparo de amostras com Placa de 96 Poços

Para preparar as amostras de pacientes e os controlos de qualidade para análise, execute os seguintes passos na ordem indicada:

1. **Picotagem da amostra:**
Picote um disco de spot de sangue seco de 1/8 de polegada (3,2 mm) do cartão de filtro para um poço da Placa de 96 Poços (nº de pedido 57010).
2. **Extração:**
Adicione 200 µL do Mix de Padrão Interno reconstituído (nº de pedido 57074) ou, no caso de determinação adicional de Ado e dAdo, 200 µL da combinação reconstituída dos Mixes de Padrão Interno (nº de pedido 57074 e 57474) (ver capítulo 5.2) a cada amostra. Sele a Placa de 96 Poços com uma Lâmina Protetora (nº de pedido 55011) e agite a 600 rpm por 20 min a +20 a +25 °C.
3. **Transferência:**
Remova a Lâmina Protetora da Placa de 96 Poços. Transfira o sobrenadante para uma nova Placa de 96 Poços (nº de pedido 57010) e sele-a com uma nova Lâmina Protetora (nº de pedido 55011). Tome cuidado para transferir o sobrenadante de forma mais completa possível, de modo a que não reste líquido nos discos de spot de sangue seco.
4. **Extração da succinilacetona:**
5. Adicione primeiro 75 µL do Padrão Interno Succinilacetona (nº de pedido 57044) e, em seguida, 75 µL de Tampão de Extração Succinilacetona (nº de pedido 57013) ao disco de spot de sangue seco restante. Sele a Placa de 96 Poços com uma Lâmina Protetora (nº de pedido 55011) e agite por 30 min a 45 °C e 400 rpm.
6. **Agrupamento dos extratos:**
Remova as Lâminas Protetoras de ambas as Placas de 96 Poços e pipete o extrato do passo 4 para o extrato do passo 3. Sele a Placa de 96 Poços com um Selo Térmico Perfurável (nº de pedido 57014) ou um Selo Adesivo com Corte em Cruz (nº de pedido 57059).
7. **Incubação:**
Antes da injeção, agite a Placa de 96 Poços por 45 min a +45 °C e 400 rpm.
8. **Injeção:**
Injete 10 µL do eluato no sistema de LC-MS/MS.

Importante

- O Tampão de Extração Succinilacetona (nº de pedido 57013) segrega-se durante o armazenamento abaixo de -18 °C. Após o descongelamento, este reagente deve ser misturado completamente (vórtex) antes do uso, para evitar inhomogeneidades na solução.
- No passo 5, as Lâminas Protetoras da Placa de 96 Poços (nº de pedido 57010) devem ser removidas imediatamente após a extração para evitar a condensação de solvente no filme.

5.7 Vida útil das amostras preparadas

As amostras preparadas para análise de acordo com o capítulo 5.6 têm a seguinte estabilidade quando seladas com Selos Térmicos Perfuráveis (nº de pedido 57014), desde que o selo térmico não tenha sido perfurado:

Tabela 9: Prazo de validade das amostras preparadas em Placas de 96 Poços seladas com Selos Térmicos Perfuráveis (nº de pedido 57014)

Temperatura de armazenamento	Vida útil	Outras condições de armazenamento
+20 a +25 °C	Asa, GAA: 12 horas Todos os outros: 3 dias	Proteção da luz, bem fechado
+2 a +8 °C	5 dias	Proteção da luz, bem fechado
abaixo -18 °C	7 dias	Proteção da luz, bem fechado
Ciclos de congelamento/descongelamento	1 ciclo	—

Nota:

Devido a efeitos de evaporação, o prazo de validade das amostras é consideravelmente reduzido assim que os Selos Térmicos Perfuráveis (nº de pedido 57014) são perfurados. Neste caso, a determinação correta das concentrações pode já não ser possível. A extensão da redução do prazo de validade depende fortemente das configurações do autosampler.

Tabela 10: Prazo de validade das amostras preparadas em Placas de 96 Poços seladas com Selos Térmicos Perfuráveis (nº de pedido 57014) após perfuração da película

Temperatura de armazenamento	Vida útil	Outra condição de armazenamento
+20 a +25 °C	6 horas	Proteção da luz
+2 a +8 °C	GAA: 6 horas	Proteção da luz
	C26, C26:0 LPC: 8 horas	
	Todos os outros analitos: 12 horas	

As amostras preparadas para análise de acordo com o capítulo 5.6 têm o seguinte prazo de validade quando seladas com Selos Adesivos com Corte em Cruz (nº de pedido 57059), desde que a película não tenha sido perfurada:

Tabela 11: Prazo de validade das amostras preparadas em Placas de 96 Poços seladas com Selos Adesivos com Corte em Cruz (nº de pedido 57059):

Temperatura de armazenamento	Vida útil	Outra condição de armazenamento
+20 a +25 °C	GAA: 3 horas Todos os outros analitos: 8 horas	Proteção da luz
+2 a +8 °C	GAA: 6 horas Todos os outros analitos: 24 horas	Proteção da luz

Nota:

Devido a efeitos de evaporação, o prazo de validade das amostras é consideravelmente reduzido assim que os Selos Adesivos com Corte em Cruz (nº de pedido 57059) são perfurados. Neste caso, a determinação correta das concentrações pode já não ser possível. A extensão da redução do prazo de validade depende fortemente das configurações do autosampler.

Tabela 12: Prazo de validade das amostras preparadas em Placas de 96 Poços seladas com Selos Adesivos com Corte em Cruz (nº de pedido 57059) após perfuração da película

Temperatura de armazenamento	Vida útil	Outra condição de armazenamento
+20 a +25 °C	GAA: 3 horas Todos os outros analitos: 8 horas	Proteção da luz
+2 a +8 °C	GAA, C26, C26:0 LPC: 6 horas Todos os outros analitos: 12 horas	Proteção da luz

5.8 Manipulação de amostras acima do intervalo de medição analítico

As concentrações dos analitos são quantificáveis apenas até ao extremo superior do intervalo linear dinâmico, conforme determinado, por exemplo, de acordo com o capítulo 3.5. Concentrações acima do intervalo de medição analítico não são abrangidas por uma pré-diluição verificada da amostra processada.

6 Aquisição de dados e avaliação

6.1 Calibração do sistema de análise

O padrão interno é utilizado como um calibrador individual para cada amostra, de modo que os efeitos de matriz sejam reduzidos ao mínimo. Para este fim, a amostra (controle, espécime) é misturada com uma quantidade definida dos produtos de Padrão Interno (números de pedido 57074, 57474, 57044). As concentrações dos compostos marcados isotopicamente nos produtos de Padrão Interno dependem do lote e são fornecidas na folha de informações do produto.

O nosso conceito para a exatidão e a rastreabilidade metrológica para amostras de pacientes baseia-se adicionalmente na correção dos resultados de medição com fatores de resposta relativa (RRF, Relative Response Factors), que são definidos individualmente para cada analito em cada sistema de análise (ver capítulo 6.4). Estes valores de RRF corrigem diferenças específicas do sistema na resposta entre os analitos e os seus padrões internos correspondentes.

Esta abordagem completa a cadeia de rastreabilidade entre a concentração da amostra individual e o material de referência utilizado para a atribuição de valor dos padrões internos e dos controles (para mais informações, consulte o Anexo V).

6.2 Spot de sangue seco - volume de sangue

Conhecer o volume de sangue utilizado é necessário para a análise quantitativa bem-sucedida das amostras. O volume de sangue num disco recortado de mancha de sangue seca depende do diâmetro do disco, do hematócrito da amostra e do material do papel de filtro utilizado.

A Norma CLSI NBS01-Ed7, 2021 [3] fornece a recomendação de que deve ser utilizado apenas papel de filtro destinado à análise de manchas de sangue secas para a triagem neonatal. Alguns papéis de filtro que cumprem os requisitos do Apêndice C da Norma CLSI estão comercialmente disponíveis, por exemplo, papel de filtro grau 903 ou 226. O furador utilizado deve ter 1/8 de polegada (3,2 mm) de diâmetro.

O volume de sangue num disco de spot de sangue seco depende do valor do hematócrito. Na Norma CLSI NBS01-Ed7, 2021 [3], é especificado sangue de doador ajustado para um valor de hematócrito de 0,55, e o CDC (Centers for Disease Control and Prevention) utiliza sangue total de doador com um valor de hematócrito de 0,50 [5].

Dependendo do valor do hematócrito, o volume de sangue varia entre 3,42 µL para um hematócrito de 0,55 [6] e 2,86 µL para um hematócrito de 0,5 [5].

No entanto, assume-se e é geralmente aceito que o volume de sangue num disco de spot de sangue seco com um diâmetro de 3,2 mm (1/8 de polegada) é de aproximadamente 3,1 µL [7].

Como o volume de sangue utilizado varia de amostra para amostra, um procedimento de rastreio que utiliza spots de sangue secos para a determinação da concentração é algo limitado. Para confirmar resultados positivos de triagem, é essencial realizar testes de diagnóstico adicionais.

6.3 Exemplo do cromatograma

O gráfico seguinte fornece um exemplo de um cromatograma criado utilizando este método.

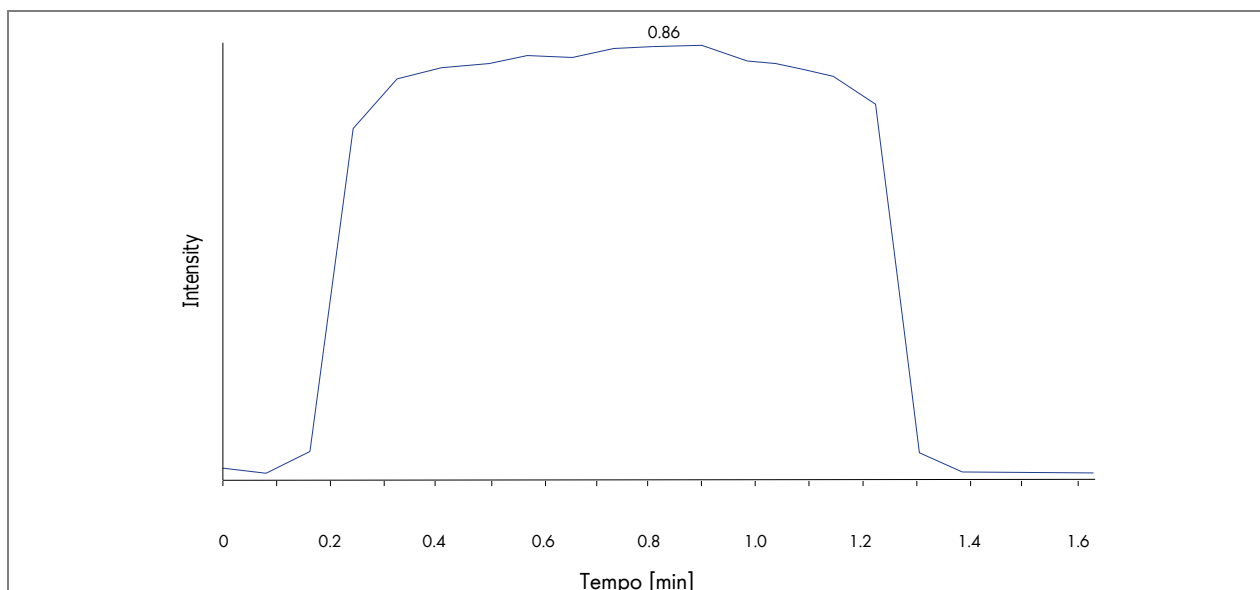


Figura 2: Cromatograma de um **MassCheck®** Controle Nível II em Sangue Seco em Papel Filtro

6.4 Quantificação de resultados

A quantificação dos analitos é feita pela comparação da intensidade do sinal com a dos correspondentes padrões internos marcados isotopicamente. Várias acilcarnitinas com relevância diagnóstica, para as quais ainda não estão disponíveis padrões internos marcados isotopicamente, ainda podem ser medidas com este ensaio. Acilcarnitinas com comprimentos de cadeia iguais apresentam aproximadamente o mesmo fator de resposta. Recomenda-se quantificar esses marcadores de doença com os padrões internos marcados isotopicamente indicados na tabela 3.

A concentração do analito de interesse na amostra é calculada de acordo com o seguinte princípio: a razão entre a intensidade do pico do analito e a do padrão interno é determinada e multiplicada pela quantidade do correspondente padrão interno (concentração no produto, conforme especificado na bula do produto, multiplicada pelo volume utilizado no preparo da amostra) para determinar a quantidade do analito na amostra. Para obter a concentração do analito na amostra de sangue, esse valor é então dividido pelo volume de sangue na amostra preparada e corrigido usando um fator de resposta relativa (RRF) para normalização específica do sistema de análise.

O fator de resposta relativa (RRF) é calculado com base na análise dos Controles **MassCheck®** de Spot de Sangue Seco (números de pedido 0195, 0196, 0197 ou 0295, 0296, 0297), conforme descrito abaixo. Se qualquer outra amostra for usada para o cálculo do RRF, a exatidão dos resultados quantitativos pode ficar comprometida.

O valor final do RRF a ser usado para outros cálculos é representado pela média dos valores de RRF determinados para cada nível de controle de qualidade. Para cada analito, deve-se verificar se os três valores de RRF específicos de cada nível são uniformes. Se esse não for o caso, os parâmetros de ajuste (tuning)/condições de medição correspondentes devem ser verificados e otimizados de acordo (consultar também o capítulo 12).

Não use amostras de controle preparadas para determinação do RRF para fins de controle de qualidade.

Por favor, note que para analitos que não estão incluídos nos Controles **MassCheck®** de Mancha de Sangue Seca, recomenda-se o uso de RRF baseados, por exemplo, nas medianas da população, para garantir resultados estáveis ao longo do tempo e em diferentes sistemas de medição.

Recomendamos realizar o cálculo inicial do RRF com base em medições em dias diferentes para levar em conta a variação dia a dia do sistema de análise utilizado.

Utilize o procedimento descrito no capítulo 7 para monitorar a adequação do RRF em uso. O cálculo do RRF pode precisar ser repetido regularmente, especialmente após alterações no sistema de análise.

Por favor, note que usar um RRF baseado apenas em nossas amostras de Controle *MassCheck*[®] de Spot de Sangue Seco pode não ser suficiente para harmonizar diferentes sistemas de medição ou para alcançar resultados consistentes por longos períodos no mesmo sistema em seu laboratório. O ajuste contínuo do RRF com base, por exemplo, na mediana da população, pode ser necessário para alcançar um viés suficientemente baixo entre instrumentos e ao longo do tempo, permitindo o uso do mesmo ponto de corte (cut-off). Isso está de acordo com uma sugestão no capítulo "Comparação de Múltiplos Instrumentos" do Norma CLSI NBS04-Ed2, 2017 [8], no caso de uso de múltiplos instrumentos. Alternativamente, pontos de corte específicos por instrumento e ajustes de pontos de corte ao longo do tempo podem ser aplicados.

Calcule a concentração de um analito na amostra de sangue seco (C_{Analito}) da seguinte forma:

$$C_{\text{Analito}} [\mu\text{mol/L}] = \frac{I_{\text{Analito}} \times V_{\text{ISTD}}}{I_{\text{ISTD}} \times V_{\text{sangue no picote DBS}} \times \text{RRF}} \times C_{\text{ISTD}}$$

- | | |
|---|-------------------------------------|
| – Concentração do analito na amostra de sangue | = C_{Analito} |
| – Intensidade do sinal do analito no eluato da amostra | = I_{Analito} |
| – Intensidade do sinal do padrão interno no eluato da amostra | = I_{ISTD} |
| – Concentração do padrão interno na solução de ISTD | = C_{ISTD} |
| – Volume de sangue contido no picote de DBS* | = $V_{\text{sangue no picote DBS}}$ |
| – Volume da solução do padrão interno usado para o preparo da amostra | = V_{ISTD} |
| – Fator de resposta relativa [#] | = RRF |

* É geralmente aceito que o volume de sangue em um disco de 1/8 de polegada (3,2 mm) de spot de sangue seco é de aproximadamente 3,1 μL .

Para cada nível de controle de qualidade de spot de sangue seco:

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

Nota:

O cálculo e a aplicação do RRF dependem do software de análise neonatal utilizado. Em alguns casos (por exemplo, Waters IonLynx), a fórmula fornecida abaixo deve ser aplicada:

$$C_{\text{Analito}} [\mu\text{mol/L}] = \frac{I_{\text{Analito}} \times C_{\text{ISTD sample}} \times \text{RRF}^{\#}}{I_{\text{ISTD}}}$$

A concentração do padrão interno na amostra ($C_{\text{ISTD amostra}}$) é fornecida na bula do produto.

$$C_{\text{ISTD amostra}} [\mu\text{mol/L}] = \frac{V_{\text{ISTD}}}{V_{\text{sangue em picote DBS}}} \times C_{\text{ISTD}}$$

Para cada nível de controle de qualidade de spot de sangue seco:

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

Nota sobre o uso de software especial para avaliação quantitativa:

Os volumes dos Padrões Internos 57074 (ou da combinação dos Padrões Internos 57074 e 57474) e 57044 utilizados no preparo da amostra são diferentes entre si. Ao utilizar programas de avaliação que permitem inserir apenas um volume de PI (Padrão Interno) globalmente para todos os analitos, a concentração do PI inserida para o SUAC-13C5 deve ser multiplicada pelo quociente entre o volume inserido no software e o volume realmente adicionado.

Exemplo:

Volume inserido no software = 200 µL

Volume de 57044 realmente adicionado = 75 µL

Concentração de exemplo do PI (dependente do lote, consulte a bula do produto) = 0,141 µmol/L

Concentração exemplo a ser inserida em µmol/L:

$$0.141 \text{ µmol/L} \times \frac{75 \text{ µL}}{200 \text{ µL}} = 0.053 \text{ µmol/L}$$

Para o manuseio correto do software de análise, contate o fabricante do seu sistema de MS, se necessário.

Se você precisar de mais informações sobre a configuração do método em seu sistema LC-MS/MS, entre em contato com nossa equipe de suporte da Chromsystems ligando para nossa central +49 89 18930-111 ou por e-mail em support@chromsystems.com.

6.5 Fatores de conversão

A tabela a seguir lista os fatores de conversão entre concentrações massais e molares, e vice-versa.

Tabela 13: Fatores de conversão

Substância	µmol/L a mg/L	mg/L a µmol/L
Aminoácidos		
Ala	x 0,08909	x 11,22
Arg	x 0,1742	x 5,740
Asa	x 0,2903	x 3,445
Cit	x 0,1752	x 5,708
Gln	x 0,1461	x 6,843
Glu	x 0,1471	x 6,797
Gly	x 0,07507	x 13,32
Leu	x 0,1312	x 7,624
Met	x 0,1492	x 6,702
Orn	x 0,1322	x 7,567
Phe	x 0,1652	x 6,054
Pro	x 0,1151	x 8,686
Ser	x 0,1051	x 9,515
Tyr	x 0,1812	x 5,5191
Val	x 0,1171	x 8,536
3-OMD	x 0,2112	x 4,735
Carnitinas		
C0	x 0,1612	x 6,204
C2	x 0,2032	x 4,920
C3	x 0,2173	x 4,603

Substância	µmol/L a mg/L	mg/L a µmol/L
C4OH	x 0,2473	x 4,044
C4	x 0,2313	x 4,324
C5OH	x 0,2613	x 3,827
C5	x 0,2453	x 4,076
C5:1	x 0,2433	x 4,110
C5DC	x 0,2753	x 3,632
C6	x 0,2593	x 3,856
C6DC	x 0,2893	x 3,456
C8	x 0,2874	x 3,480
C8:1	x 0,2854	x 3,504
C10	x 0,3154	x 3,170
C10:1	x 0,3134	x 3,190
C10:2	x 0,3114	x 3,211
C12	x 0,3435	x 2,911
C12:1	x 0,3415	x 2,928
C14	x 0,3716	x 2,691
C14:1	x 0,3695	x 2,706
C14:2	x 0,3675	x 2,721
C14OH	x 0,3876	x 2,580
C16	x 0,3996	x 2,502
C16:1	x 0,3976	x 2,515
C16OH	x 0,4156	x 2,406
C16:1OH	x 0,4136	x 2,418
C18	x 0,4277	x 2,338
C18:1	x 0,4256	x 2,349
C18:2	x 0,4236	x 2,361
C18OH	x 0,4437	x 2,254
C18:1OH	x 0,4416	x 2,264
C18:2OH	x 0,4396	x 2,275
C20	x 0,4557	x 2,194
C22	x 0,4838	x 2,067
C24	x 0,5118	x 1,954
C26	x 0,5399	x 1,852
Cetonas		
SUAC	x 0,1582	x 6,323
Nucleosídeos		
Ado	x 0,2672	x 3,742
dAdo	x 0,2512	x 3,980
Lisofosfolipídeos		
C20:0 LPC	x 0,5517	x 1,812
C22:0 LPC	x 0,5798	x 1,725
C24:0 LPC	x 0,6078	x 1,645
C26:0 LPC	x 0,6359	x 1,573
Creatina e metabólitos relacionados		
CRE	x 0,1311	x 7,626
CRN	x 0,1131	x 8,840
GAA	x 0,1171	x 8,539

7 Controle de qualidade

Monitore a exatidão e a precisão das análises incluindo os controles de qualidade *MassCheck*[®] (números de pedido 0195, 0196, 0197 ou 0295, 0296, 0297) em cada rodada analítica. Execute os três níveis idealmente no início e no final de cada placa de 96 poços, conforme recomendado na Norma CLSI NBS04-Ed2, 2017 [8], mas pelo menos no início e no final da sequência de medição. Se a análise desses controles apresentar concentrações fora dos intervalos indicados na bula do produto, recalcule os valores do Fator de Resposta Relativo (RRF) (ver capítulo 6.4).

Se as concentrações dos controles continuarem fora da faixa especificada após a aplicação dos valores RRF recalculados, verifique o sistema, o procedimento de preparo da amostra, bem como o cálculo das concentrações do analito (ver capítulo 12).

Conforme descrito na Norma CLSI NBS04-Ed2, 2017 [8], cada laboratório deve estabelecer critérios para aceitar os resultados das amostras de cada rodada analítica. Esses critérios são baseados principalmente na análise dos controles de qualidade.

8 Armazenamento e transporte dos componentes do kit

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

Tabela 14: Condições de transporte

Produto	Condições de transporte
Mix de Padrão Interno (artigo no. 57074)	em gelo seco
Controles de DBS (n° de pedido 0195, 0196, 0197 e 0295, 0296, 0297)	em gelo seco
Todos os outros componentes listados no capítulo 1	temperatura ambiente

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

Tabela 15: Condições de armazenamento

Produto	Condições de armazenamento
Fase Móvel (n° de pedido 57001, 57002)	+18 a +30 °C
Solução de Enxágue (n° de pedido 57007)	+18 a +30 °C
Tampão de Extração (n° de pedido 57078)	+18 a +30 °C
Tampão de Extração para Succinilacetona (n° de pedido 57013)	abaixo de -18 °C
Mix de Padrão Interno (n° de pedido 57074)	abaixo de -18 °C
Mix de Padrão Interno Ado, dAdo (n° de pedido 57474)	abaixo de -18 °C
Padrão Interno Succinilacetona (n° de pedido 57044)	+2 a +8 °C
Tuning Mix 1 (n° de pedido 57097-1)	abaixo de -18 °C

Produto	Condições de transporte
Tuning Mix 2 (n° de pedido 57097-2)	abaixo de -18 °C
Tuning Mix Succinilacetona (n° de pedido 57098)	+2 a +8 °C
Conjunto Multinível de Linearidade para DBS (n° de pedido 57080, 57090)	abaixo de -18 °C
Controles de DBS (n° de pedido 0195, 0196, 0197 e 0295, 0296, 0297)	abaixo de -18 °C

Feche os reagentes imediatamente após o uso e armazene-os na temperatura especificada. A vida útil em uso de produtos líquidos é de um ano, mas não se estende além da data de validade declarada. Detalhes sobre a estabilidade dos Mix de Padrão Interno após a reconstituição, do Tampão de Extração para Succinilacetona após o descongelamento, bem como dos Controles de Amostra de Sangue Seco *MassCheck*[®] e dos Conjuntos Multinível de Linearidade para Amostra de Sangue Seco após a primeira abertura são fornecidos nos capítulos 5.2 a 5.5.

Materiais de laboratório não listados aqui podem ser armazenados a +18 a +30 °C.

A estabilidade em uso do pré-filtro depende das condições individuais sob as quais este componente é utilizado (ex. frequência de uso). Considere as medidas listadas no capítulo 12 para identificar a diminuição do desempenho.

9 Descarte de resíduos

Resíduos perigosos

A Fase Móvel (n° de pedido 57001, 57002), a Solução de Lavagem (n° de pedido 57007), os Tampões de Extração (n° de pedido 57078 e 57013), o Padrão Interno Succinilacetona (n° de pedido 57044), o Tuning Mix 2 (n° de pedido 57097-2), o Tuning Mix para Succinilacetona (n° de pedido 57098) e os Padrões Internos reconstituídos (n° de pedido 57074 e 57074/57474 em Tampão de Extração, n° de pedido 57078) contêm solventes orgânicos. Descarte os resíduos do produto em um coletor para solventes orgânicos isentos de halogênio.

O Tuning Mix 1 (n° de pedido 57097-1) contém uma substância sensibilizante para a pele e deve ser coletada e descartada como resíduo perigoso. Resíduos de amostras de pacientes e amostras preparadas, bem como dos Controles de Amostra de Sangue Seco *MassCheck*[®] (n° de pedido 0195, 0196, 0197, 0295, 0296, 0297) e componentes dos Conjuntos Multinível de Linearidade para Amostra de Sangue Seco (n° de pedido 57080, 57090), além de materiais de consumo 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. Faça o descarte em conformidade com a Diretiva 2008/98/EC sobre Resíduos e com as exigências nacionais e locais. Os coletores de resíduos devem ser armazenados de forma apropriada e o acesso permitido apenas a pessoal autorizado.

Resíduos não perigosos

As Misturas de Padrão Interno (n° de pedido 57074, 57474) e os materiais de consumo 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

Em um estudo piloto realizado em dois centros alemães e uma investigação adicional na Chromsystems, os seguintes percentis foram determinados usando os ensaios 57075-F e 57075-F-ADO, respectivamente.

Por favor, note que, embora os pontos de corte (cut-offs) possam ser inicialmente baseados em percentis, um ajuste pode ser necessário para otimizar a sensibilidade e a especificidade diagnóstica. Os valores mostrados abaixo são específicos para a população investigada (recém-nascidos triados de acordo com a "Kinderrichtlinie" alemã [4]) e para o laboratório. Cada laboratório deve determinar seus próprios intervalos de referência/percentis, dependendo da população investigada e dos sistemas utilizados para a medição. Recomendamos um monitoramento contínuo da distribuição populacional, bem como do desempenho clínico, para permitir os ajustes necessários nos valores de corte.

Consulte o Apêndice III para obter dados de desempenho clínico, incluindo os valores de corte definidos.

Tabela 16: Concentrações de analitos determinadas em amostras de sangue seco de triagem neonatal de rotina (idade de 36 a 72 h). Os dados são baseados em 7798 amostras individuais (5261 para os analitos Asa, 3-OMD, C5:1, C22, C20:0 LPC) medidas com o ensaio 57075-F em um sistema de triagem Waters RenataDX™ no Dietmar-Hopp-Stoffwechselzentrum Heidelberg e em um sistema Waters Xevo™ TQD IVD no Screening-Labor Hannover.

Analito	Percentil [$\mu\text{mol/L}$]			
	0.1°	0.5°	99.5°	99.9°
Aminoácidos				
Ala/Sar	93,9	111	499	688
Arg	1,44	1,80	27,1	40,9
Asa	0,109	0,135	0,694	0,877
Cit	4,80	5,69	33,2	58,9
Gln/Lys	233	353	1088	1232
Glu	140	175	582	671
Gly	199	230	857	1198
XLeu	49,2	55,6	212	275
Met	9,20	10,6	34,6	48,9
Orn	43,8	49,2	221	298
Phe	22,6	27,1	88,0	101
Pro	76,0	88,6	301	414
Ser	78,8	94,4	911	1451
Tyr	25,4	32,3	210	318
Val	42,1	48,1	216	264
3-OMD	0,503	0,563	1,97	2,39
Carnitinas				
C0	5,92	7,26	51,0	63,6
C2	6,51	8,57	57,1	66,4
C3	0,430	0,582	4,48	5,51
C3DC/C4OH	0,048	0,059	0,503	0,599
C4	0,060	0,076	0,775	1,25
C4DC/C5OH	0,105	0,122	0,625	0,858
C5	0,029	0,035	0,287	0,712
C5:1	0,002	0,004	0,034	0,051
C5DC/C6OH	0,043	0,052	0,300	0,363
C6	0,018	0,022	0,140	0,193
C6DC	0,016	0,022	0,266	0,316
C8	0,016	0,020	0,144	0,244
C8:1	0,012	0,015	0,169	0,228
C10	0,018	0,023	0,249	0,393
C10:1	0,015	0,019	0,093	0,117
C10:2	0,018	0,022	0,067	0,080

Analito	Percentil [μmol/L]			
	0.1°	0.5°	99.5°	99.9°
C12	0,015	0,019	0,262	0,317
C12:1	0,012	0,015	0,275	0,335
C14	0,054	0,076	0,449	0,536
C14:1	0,028	0,036	0,325	0,395
C14:2	0,009	0,011	0,047	0,057
C14OH	0,003	0,004	0,041	0,047
C16	0,744	1,23	7,25	8,66
C16:1	0,054	0,074	0,496	0,598
C16OH	0,006	0,007	0,060	0,071
C16:1OH/C17	0,016	0,019	0,101	0,120
C18	0,274	0,364	1,72	2,14
C18:1	0,529	0,684	3,09	3,49
C18:2	0,038	0,044	0,464	0,616
C18OH	0,005	0,006	0,047	0,054
C18:1OH	0,008	0,010	0,041	0,048
C18:2OH	0,003	0,004	0,021	0,025
C20	0,009	0,011	0,074	0,091
C22	0,002	0,002	0,010	0,012
C24	0,003	0,004	0,025	0,032
C26	0,002	0,002	0,017	0,021
Cetonas				
SUAC	0,448	0,477	1,04	1,13
Lisofosfolípeidos				
C20:0 LPC	0,042	0,058	0,425	0,532
C22:0 LPC	0,064	0,078	0,479	0,606
C24:0 LPC	0,309	0,363	1,51	1,69
C26:0 LPC	0,111	0,135	0,538	0,621
Creatina e metabólitos relacionados				
CRE	137	243	1000	1236
CRN	33,5	38,5	112	140
GAA	0,238	0,349	3,35	8,72

Tabela 17: Concentrações de analitos determinadas em amostras de sangue seco de rotina do teste do pezinho (idade de 36 a 72 horas). Os dados são baseados em 1758 amostras individuais medidas com o ensaio 57075-F-ADO em um equipamento Waters Xevo™ TQ-S micro em um estudo interno na Chromsystems.

Analito	Percentil [μmol/L]			
	0.1°	0.5°	99.5°	99.9°
Aminoácidos				
Ala/Sar	185	210	1035	1167
Arg	1,87	2,51	35,8	48,0
Asa	0,067	0,091	0,590	0,844
Cit	6,08	6,50	30,1	43,7
Gln/Lys	261	360	1158	1287
Glu	112	145	564	653
Gly	150	192	841	1024
XLeu	62,8	70,3	237	265
Met	10,4	11,3	41,5	66,1
Orn	49,6	53,6	200	263
Phe	21,2	29,7	83,8	97,6
Pro	75,4	88,0	336	514

Analito	Percentil [µmol/L]			
	0.1°	0.5°	99.5°	99.9°
Ser	82,6	96,6	986	1417
Tyr	20,8	31,1	256	512
Val	41,6	49,6	223	250
3-OMD	0,511	0,580	1,53	1,89
Carnitina livre e acilcarnitinas				
C0	5,97	6,82	55,9	79,3
C2	6,60	9,04	63,3	79,3
C3	0,390	0,534	4,65	6,25
C3DC/C4OH	0,067	0,076	0,552	0,649
C4	0,063	0,079	0,924	1,95
C4DC/C5OH	0,130	0,147	0,615	0,720
C5	0,033	0,041	0,445	2,56
C5:1	0,008	0,010	0,031	0,036
C5DC/C6OH	0,044	0,056	0,296	0,327
C6	0,029	0,033	0,155	0,179
C6DC	0,043	0,050	0,262	0,337
C8	0,019	0,022	0,155	0,240
C8:1	0,018	0,021	0,203	0,291
C10	0,016	0,023	0,300	0,419
C10:1	0,015	0,019	0,108	0,126
C10:2	0,017	0,018	0,043	0,077
C12	0,015	0,022	0,350	0,746
C12:1	0,018	0,020	0,308	0,380
C14	0,042	0,069	0,505	0,709
C14:1	0,027	0,035	0,370	0,433
C14:2	0,011	0,013	0,055	0,062
C14OH	0,005	0,006	0,050	0,066
C16	0,285	0,510	7,09	8,61
C16:1	0,025	0,041	0,533	0,646
C16OH	0,007	0,009	0,066	0,081
C16:1OH/C17	0,011	0,017	0,098	0,112
C18	0,128	0,235	1,63	1,94
C18:1	0,430	0,560	3,05	3,84
C18:2	0,039	0,045	0,549	0,763
C18OH	0,006	0,008	0,056	0,067
C18:1OH	0,009	0,011	0,044	0,053
C18:2OH	0,006	0,006	0,026	0,032
C20	0,009	0,010	0,075	0,090
C22	0,003	0,003	0,010	0,012
C24	0,004	0,004	0,020	0,023
C26	0,003	0,003	0,011	0,014
Cetonas				
SUAC	0,389	0,410	0,913	1,02
Nucleosídeos				
Ado	0,204	0,284	1,68	2,25
dAdo	0,008	0,009	0,030	0,039
Lisofosfolípidos				
C20:0 LPC	0,051	0,055	0,328	0,409
C22:0 LPC	0,055	0,062	0,227	0,295
C24:0 LPC	0,257	0,289	1,06	1,26
C26:0 LPC	0,136	0,149	0,604	0,702

Analito	Percentil [μmol/L]			
	0.1°	0.5°	99.5°	99.9°
Creatina e metabólitos relacionados				
CRE	113	157	1063	1270
CRN	22,2	29,9	115	157
GAA	0,354	0,434	2,85	3,68

Tabela 18: Concentrações de analitos determinadas em amostras de sangue seco de rotina do teste do pezinho (idade de 36 a 72 horas). Os dados são baseados em 1754 amostras individuais medidas com o ensaio 57075-F-ADO em um equipamento Sciex Triple Quad™ como parte de um estudo interno na Chromsystems

Analito	Percentil [μmol/L]			
	0,1°	0,5°	99,5°	99,9°
Aminoácidos				
Ala/Sar	97,2	111	451	554
Arg	1,31	1,54	23,3	27,9
Asa	0,185	0,212	0,623	0,724
Cit	6,02	6,65	33,7	51,0
Gln/Lys	178	338	1225	1298
Glu	139	175	566	680
Gly	163	210	809	1018
XLeu	63,7	72,7	256	294
Met	7,81	8,55	33,2	51,4
Orn	45,9	54,3	162	200
Phe	26,7	35,0	100	127
Pro	79,9	99,7	361	464
Ser	73,1	96,0	764	1166
Tyr	27,8	33,9	232	316
Val	50,6	57,8	251	291
3-OMD	0,355	0,438	1,08	1,54
Carnitina livre e acilcarnitinas				
C0	6,85	8,40	55,9	84,4
C2	4,94	8,06	59,3	64,4
C3	0,370	0,521	4,34	4,91
C3DC/C4OH	0,092	0,105	0,503	0,610
C4	0,062	0,087	0,707	1,04
C4DC/C5OH	0,129	0,143	0,680	0,879
C5	0,098	0,105	0,451	0,992
C5:1	0,007	0,008	0,025	0,041
C5DC/C6OH	0,056	0,070	0,309	0,352
C6	0,029	0,032	0,139	0,172
C6DC	0,065	0,082	0,318	0,363
C8	0,031	0,034	0,160	0,211
C8:1	0,030	0,034	0,187	0,219
C10	0,021	0,031	0,243	0,350
C10:1	0,018	0,020	0,097	0,118
C10:2	0,019	0,020	0,043	0,052
C12	0,026	0,032	0,277	0,588
C12:1	0,025	0,029	0,264	0,320
C14	0,071	0,090	0,492	0,585
C14:1	0,035	0,041	0,271	0,340
C14:2	0,010	0,012	0,045	0,052
C14OH	0,012	0,014	0,058	0,069
C16	0,479	0,794	7,96	8,98
C16:1	0,038	0,050	0,503	0,597
C16OH	0,011	0,012	0,066	0,073
C16:1OH/C17	0,019	0,023	0,104	0,134
C18	0,137	0,295	1,81	2,08
C18:1	0,379	0,648	3,19	3,64

C18:2	0,073	0,079	0,463	0,628
C18OH	0,009	0,010	0,044	0,050
C18:1OH	0,011	0,014	0,041	0,046
C18:2OH	0,011	0,014	0,042	0,048
C20	0,017	0,022	0,103	0,123
C22	0,006	0,007	0,027	0,033
C24	0,007	0,008	0,025	0,032
C26	0,005	0,006	0,017	0,022
Cetonas				
SUAC	0,496	0,547	1,08	1,33
Nucleosídeos				
Ado	0,145	0,236	2,36	2,95
dAdo	0,025	0,026	0,045	0,064
Lisofosfolídeos				
C20:0 LPC	0,063	0,075	0,357	0,499
C22:0 LPC	0,089	0,095	0,279	0,324
C24:0 LPC	0,341	0,393	0,981	1,10
C26:0 LPC	0,124	0,143	0,383	0,414
Creatina e metabólitos relacionados				
CRE	112	195	804	901
CRN	22,8	31,1	115	134
GAA	0,310	0,367	2,57	7,42

11 Teste de interferências

Drogas, metabólitos e compostos isobáricos, bem como interferentes conhecidos na literatura, foram adicionados nas concentrações máximas esperadas (ver tabela abaixo) em amostras de sangue seco (DBS) preparadas ou em sangue total, que foi então aplicado em cartões de papel filtro e testado para interferências usando um espectrômetro de massa SCIEX Triple Quad™ 4500MD.

Tabela 18: Substâncias testadas e suas concentrações

Substância	Concentração testada no sangue (mg/L)
Isobaric substances	
beta-Alanina (isobárica de Ala)	53,5
Ácido 5-Aminolevulínico (isobárico de Leu, CRE)	0,173
7-Metilguanina (isobárica de Phe)	0,0760
Acetilglicina (isobárico de Val, GAA)	68,5
ADP (isobárico de C18)	223
Citidina (isobárico de C5:1)	3,03
Deoxiguanosina (isobárico de Ado)	16,0
D-Maltose (isobárico de C12:1)	1741
Epianandrosterona (isobárica de Asa)	3,65
Epicatequina (isobárica de Asa)	0,717
Epiteticolanolona (isobárica de Asa)	0,00400
Eucaliptol (isobárico de SUAC)	3,41
Ácido Formiminoglutâmico (FIGLU) (isobárico de Arg)	62,2
Ácido Fólico (isobárico de C18:1OH)	0,0450
Frutose 6-fosfato (isobárico de C6)	9,52
Ácido Guanidinosuccínico (isobárico de Cit)	29,7
Guanosine difosfato (isobárico de C18OH)	34,6
Ácido Indolacético (isobárico de Cit)	13,8
Isomaltose (isobárico de C12:1)	95,7
Kaempferol (isobárico de C8:1)	0,142
Lactulose (isobárico de C12:1)	0,811
L-Asparagina (isobárica de Orn)	39,2

Metionina sulfóxido (isobárica de Phe)	2,48
Metionina sulfona (isobárica de Tyr)	120
Ácido N-Acetil-L-aspartico (isobárico de Cit)	720
Ácido Protocatecuico (isobárico de SUAC)	1,05
Piridoxal 5'-fosfato (isobárico de C4OH)	1,18
Ácido Chiquímico (isobárico de Arg)	0,0370
Sacarose (isobárico de C12:1)	3,08
Tiamina pirofosfato (isobárico to C18:1)	0,0840
Trimetilamina N-óxido (isobárico to Gly)	29,7
Turanose (isobárico to C12:1)	1,03
Drogas	
Acetaminofen/paracetamol	156
4-Aminoantipirina	147
Acetilcisteína	150
Ácido acetilsalicílico	30,0
Alopurinol	60,0
Aloxantina/oxipurinol	45,6
Alprazolam	0,258
Anlodipino	0,0750
Amoxicilina	54,0
Anfetamina/dexanfetamina	0,330
Apixabã	0,315
Atenolol	9,00
Atorvastatina	0,750
Azatioprina	2,58
Azitromicina	11,1
Bisoprolol	0,258
Bupropiona	0,396
Candesartana	0,551
Carvedilol	0,233
Cefuroxima	543
Citalopram	5,43
Clonazepam	0,300
Clopidogrel	0,00169
Ciclobenzaprina	0,102
Diclofenaco	24,0
Duloxetina	0,162
Edoxabã	1,01
Empagliflozina	0,930
Enalaprilato	0,819
Fenoterol	0,00358
Fluoxetina	1,42
Fluticasona	0,00126
Formoterol	0,000273
Furosemida	15,9
Gabapentina	26,7
Glimepirida	1,64
Glipizida	3,00
Hidroclorotiazida	1,13
Hidrocodona	0,0720
Ibuprofeno	219
Brometo de ipratrópio	0,00300
Levodopa (L-DOPA)	7,50
Lercanidipino	0,0407
Levetiracetam	270
Levotiroxina	0,429
Lidocaína	15,0
Lisinopril	0,246

Lorazepam	0,720
Losartana	0,836
Meloxicam	6,00
Metamizol/dipirona (como 4-metilaminoantipirina)	206
Metformina	12.0
Metocarbamol	123
Metilfenidato	0.108
Metoclopramida	2.25
Metoprolol	1.50
Montelukaste	1.65
Nebivolol	0.0300
Noscapina	0.810
Omeprazol/esomeprazol	8.40
Pantoprazol	30.0
Fenprocumon	15.0
Pravastatina	0.207
Prednisolona	1.200
Prednisona	0.0990
Pregabalina	22.5
Prilocaína	360
Propranolol	1.01
Ramipril	0.156
Ranitidina	10.5
Rivaroxabã	2.70
Rosuvastatina	0.111
Salbutamol/albuterol	0.0450
Sertralina	0.927
Sinvastatina	1.68
Sitagliptina	1.15
Espironolactona	0.555
Tansulosina	0.0338
Tilidina (como nortilidina)	0.368
Torasemida	83.1
Tramadol	3.14
Trazodona	14.7
Triantereno	0.585
Valsartana	11.7
Venlafaxina	0.696
Vitamina K1 (fitomenadiona)	1.332
Zolpidem	0.816

Além disso, diferentes condições de amostra foram simuladas e sua influência no teste foi examinada usando um espectrômetro de massa SCIEX Triple Quad™ 4500MD.

Ademais, realizamos testes de concentração-dependente para diferentes substâncias e determinamos sua influência no teste usando um espectrômetro de massa SCIEX Triple Quad™ 4500MD, bem como um espectrômetro de massa Waters Xevo™ TQ-S micro.

11.1 Interferências detectadas

Na presença das seguintes substâncias, foram observadas interferências:

A presença das interferências declaradas e das condições de amostra pode afetar a precisão dos resultados dos testes dos analitos em suas concentrações clinicamente relevantes em > 20%.

- D-Maltose, um metabólito da icodextrina, que é um agente osmótico usado em soluções de diálise

peritoneal, interfere com o padrão interno C14-d3, levando ao aumento das intensidades do sinal de C14-d3 e, consequentemente, à diminuição das concentrações determinadas de C14, C14:1, C14:2 e C14OH (todos quantificados com o padrão interno C14-d3) e, assim, a resultados de triagem falsos negativos.

- Pregabalina, um antiepiléptico, interfere com a transição de massa (MRM) do padrão interno da succinilacetona e pode, assim, levar a concentrações falsamente baixas de succinilacetona e, consequentemente, a resultados de triagem falsos negativos.
- Torasemida, um diurético, interfere com a transição de massa (MRM) do C6DC, levando ao aumento das concentrações detectadas de C6DC e, assim, a resultados de triagem falsos positivos.
- 4-aminoantipirina, um metabólito do analgésico metamizol, interfere com a C2-carnitina, levando ao aumento das concentrações determinadas e a resultados de triagem falsos.
- 4-Metilaminoantipirina, um produto de degradação do analgésico metamizol, interfere com a transição de massa (MRM) da C3-carnitina, levando ao aumento das concentrações determinadas e a resultados de triagem falsos.
- Metionina sulfona, um produto de degradação da metionina, que está elevado sob condições de estresse oxidativo, interfere com a transição de massa (MRM) da tirosina. Assim, pode levar ao aumento das concentrações determinadas de Tyr e a resultados de triagem falsos.

Testes de concentração-dependente de substância:

As substâncias potencialmente interferentes foram adicionadas (spiked) em sangue total antes da produção do DBS nas concentrações listadas abaixo. As concentrações de analitos determinadas para esses DBS foram comparadas ao longo da faixa crescente de concentração de teste.

Tabela 19: Teste de interferência concentração-dependente

Analito afetado			Substância interferente	
Analito	Concentração(ões) alvo	Desvio da concentração alvo	Interferente	Concentração de teste no sangue
Ala	414 µmol/L	≤ 20 % 29–304 %	CRE	125 µmol/L 250–2000 µmol/L
Glu	181 µmol/L	≤ 20 % 21–27 %	Gln	125–1000 µmol/L 1500–2000 µmol/L
Pro	254 µmol/L	≤ 20 % 25–58 %	Orn	125–500 µmol/L 1000–2000 µmol/L
C6DC	0,096 µmol/L	≤ 20 % 24–182 %	Asp	75 µmol/L 150–1200 µmol/L
C14OH	0,0415 µmol/L	≤ 20 % 23 %	Intralipid	0,67–2,5 g/L 10 g/L
	0,0617 µmol/L	≤ 20 %		0,67–10 g/L
C18:1OH	0,0316 µmol/L	≤ 20 % 20,3 %	Intralipid	0,67–2,5 g/L 10 g/L
	0,0780 µmol/L	≤ 20 %		0,67–10 g/L
C22	0,0097 µmol/L	≤ 20 % 38 %	Intralipid	0,67–2,5 g/L 10 g/L
		< 20 %		0,67–2,5 g/L
	0,0241 µmol/L	21 %		10 g/L
C20:0 LPC	0,404 µmol/L	≤ 20 % 46 %	Intralipid	0,67–2,5 µg/L 10 µg/L
	0,638 µmol/L	≤ 20 % 22 %		0,67–2,5 µg/L 10 µg/L
		≤ 20 %		0,67–2,5 µg/L
C26:0 LPC	0,554 µmol/L	≤ 20 % 36 %	Intralipid	10 µg/L 0,67–2,5 µg/L
	0,918 µmol/L	≤ 20 % 21 %		0,67–2,5 µg/L 10 µg/L

Creatina (CRE):

Com o aumento dos níveis de CRE adicionada artificialmente a uma amostra contendo 414 µmol/L de Ala endógena, foi observada uma interferência crescente e, consequentemente, concentrações elevadas de Ala. Quando 250–2000 µmol/L de CRE foram adicionadas a uma amostra nativa contendo 122 µmol/L de CRE, as concentrações de Ala aumentaram em 29–304 % (533–1673 µmol/L). Por favor, leve em consideração as concentrações de CRE ao avaliar amostras de pacientes que apresentam concentrações elevadas de Ala, pois estas podem estar falsamente elevadas em casos raros com altas concentrações de CRE.

Glutamina (Gln):

Com o aumento dos níveis de Gln adicionada artificialmente a uma amostra contendo 181 µmol/L de Glu endógeno, foi observada uma interferência crescente e, consequentemente, concentrações elevadas de Glu. Quando 1500–2000 µmol/L de Gln foram adicionadas a uma amostra nativa contendo 271 µmol/L de Gln, as concentrações de Glu aumentaram em 21–27 % (219–230 µmol/L). Leve em consideração as concentrações de Gln ao avaliar amostras de pacientes que apresentam concentrações elevadas de Glu, pois estas podem estar falsamente elevadas em casos raros com concentrações altamente aumentadas de Gln.

Ornitina (Orn):

Com o aumento dos níveis de Orn adicionada artificialmente a uma amostra contendo 254 µmol/L de Pro endógena, foi observada uma interferência crescente e, consequentemente, concentrações elevadas de Pro. Quando 1000–2000 µmol/L de Orn foram adicionadas a uma amostra nativa contendo 194 µmol/L de Orn, as concentrações de Pro aumentaram em 25–58 % (317–401 µmol/L). Essa interferência é causada pela sobreposição da transição de massa entre um fragmento da Orn formado na fonte de íons e a Pro. Considere as concentrações de Orn ao avaliar amostras de pacientes que apresentam concentrações elevadas de Pro, pois estas podem estar falsamente elevadas em casos raros com altas concentrações de Orn.

Ácido aspártico (Asp):

Com o aumento dos níveis de Asp adicionado artificialmente a uma amostra contendo 0,096 µmol/L de C6DC endógeno, observamos interferência crescente e, portanto, concentrações falsamente elevadas de C6DC. Quando 150–1200 µmol/L de Asp foram adicionados a uma amostra nativa de 260 µmol/L de Asp, as concentrações de C6DC aumentaram em 24–182 % (0,119–0,271 µmol/L). Portanto, em casos raros de níveis altamente elevados de Asp, um resultado falso positivo para C6DC é possível.

Triglicerídeos:

Concentrações de intralipídios superiores a 2,5 g/L afetam os resultados quantitativos de algumas acilcarnitinas em níveis de concentração clinicamente relevantes. Como as concentrações fisiológicas de triglicerídeos em recém-nascidos (0-14 dias) variam de aproximadamente 0,0082–0,0259 g/L no soro (o que corresponde a aproximadamente 0,004–0,013 g/L no sangue total), é muito improvável que ocorra um grau relevante de interferência em testes de rotina [9]. Embora a levodopa (L-DOPA) não interfira na determinação analítica de qualquer analito neste método (desvio ≤ 20 %), bebês nascidos de mães tratadas com este medicamento ainda podem apresentar níveis elevados de 3-OMD, uma vez que este é um produto de metilação do fármaco [10].

11.2 Interferências potenciais

As seguintes interferências foram relatadas para ensaios de triagem neonatal baseados em FIA-MS/MS:

Tabela 20: Interferências conhecidas na literatura

Fonte da interferência	Analitos Afetados
Diretriz CLSI NBS04 [8]	
Nutrição Parenteral Total (NPT)	Concentrações elevadas de múltiplos aminoácidos (e.g. Met, Phe, Val, Leu, Arg), que podem levar a resultados falso-positivos, podem ser determinadas se o DBS for contaminado com a solução de NPT devido a uma coleta inadequada.

Fonte da interferência	Analitos Afetados
	Algumas soluções de NPT são enriquecidas apenas em aminoácidos de cadeia ramificada, resultando em um padrão sugestivo de MSUD. A NPT frequentemente não contém carnitina; portanto, após administração prolongada, pode resultar em uma baixa concentração de carnitina livre. Outros componentes nos fluidos intravenosos podem ter massas dentro de uma ou duas unidades de uma acilcarnitina específica, por exemplo, picos de interferência em m/z 343 e m/z 399 podem causar elevações falsas de C8 (m/z 344.1) e C12 (m/z 400.1).
Ácido valproico	Aumento dos níveis de C8 é esperado em caso de tratamento com ácido valproico; sugestivo de Deficiência de MCAD.
Administração de Carnitina	Resulta em níveis aumentados de acilcarnitinas de cadeia curta e média. Resultados falso-positivos são esperados.
Administração de Pivalato (ésteres de pivalato de antibióticos ou corticosteroides) a mães ou recém-nascidos	Elevação falsa de C5-carnitina devido à formação de pivaloilcarnitina. Pode levar à depleção de carnitina.
Neopentanoato em pomada para fissuras mamárias	Causa potencial de resultados falso-positivos para C5-carnitina.
Óleo de triglicerídeos de cadeia média (MCT) para recém-nascidos de baixo peso	O uso deste aditivo alimentar, que contém ácidos graxos com cadeia de 6, 8, 10 e 12 átomos de carbono, pode resultar em concentrações aumentadas de C6, C8, C10 e C12 no DBS.
Doenças Maternas	Perfil anormal de analitos na amostra do recém-nascido para: – Defeito na captação de carnitina – Deficiência de 3-metilcrotonil-CoA carboxilase – Acidemia glutárica tipo I – Deficiência de vitamina B12
Efeitos Ambientais	Concentrações de analitos falsamente elevadas ou reduzidas devido a calor ou umidade excessivos.
Desconhecida	Um interferente isobárico não identificado para C26:0 LPC foi observado em amostras de triagem para X-ALD no modo de íons positivos. Neste caso, são esperadas concentrações falsamente aumentadas de C26:0 LPC, levando a resultados falso-positivos.
Association of Public Health Laboratories - "Newborn Screening Analyte Interference List" [11]	
Tratamento da Amostra	
Uso de benzocaína na pele antes da coleta	Pode resultar em Phe elevada e, consequentemente, em resultados falso-positivos na triagem.
Uso de Sani-Wipes	Pode levar a concentrações aumentadas de Malonilcarnitina (C3DC) e, assim, a resultados falso-positivos.
Agentes antiestáticos, ex.: Staticide	Spray de ar comprimido com produtos antiestáticos (ex.: Staticide) pode interferir com C4, C6, C8, C10, C6DC, causando elevações falsas. Consequentemente, podem ser determinados resultados falso-positivos na triagem.
Condição Materna	
Fígado gorduroso da gravidez ou síndrome HELLP (hemólise, enzimas hepáticas elevadas, baixa contagem de plaquetas).	Condições maternas que levam ao aumento dos níveis de acilcarnitinas de cadeia par e, consequentemente, a resultados falso-positivos. (Presume-se a transferência do analito da mãe para o bebê através do cordão umbilical).
Fenilcetonúria (PKU) materna ou hiperfenilalaninemia moderada não controlada por dieta ou medicação	Concentrações aumentadas de fenilalanina podem ser determinadas e, assim, um resultado de triagem falso-positivo. (Presume-se a transferência do analito da mãe para o bebê através do cordão umbilical).

Fonte da interferência	Analitos Afetados
Infant condition	
Deficiência de Vitamina C	Pode resultar em elevações transitórias de tirosina devido à deficiência de vitamina C ou à imaturidade das enzimas hepáticas em decorrência de nascimento prematuro. É uma condição transitória, que persiste até que a vitamina C seja suplementada.
Hiperbilirrubinemia	Concentrações elevadas de C3 são esperadas nas duas primeiras semanas de vida devido à hiperbilirrubinemia, podendo levar a resultados falso-positivos na triagem.
Imaturação das enzimas hepáticas ou doença hepática	Elevações transitórias de tirosina, metionina e galactose, e ocasionalmente de outros aminoácidos, levando a resultados falso-positivos na triagem.
Fator Ambiental	
Causa da contaminação desconhecida	Pode ocorrer uma elevação falsa inexplicada de citrulina e/ou arginina no teste inicial; um resultado que não se reproduz quando a amostra é reanalisada; CV > 35%
Neonatologia/Pediatria - Diretrizes sobre Nutrição Parenteral, Capítulo 13 [12]	
Nutrição parenteral	Em recém-nascidos sob nutrição parenteral, a substituição da tirosina por N-acetil-tirosina (um análogo hidrossolúvel da tirosina com baixa biodisponibilidade em neonatos) pode resultar em concentrações de tirosina ainda diminuídas. Consequentemente, o quociente Phe/Tyr elevado pode indicar falsamente fenilcetonúria, embora a concentração de fenilalanina esteja dentro da faixa normal

Observações Gerais e Internas sobre Aditivos de Materiais Plásticos:

Aditivos provenientes de materiais plásticos utilizados antes ou durante a preparação da amostra podem interferir consideravelmente com algumas acilcarnitinas, causando resultados falso-positivos. Foram observadas interferências principalmente nas acilcarnitinas C8, C5:1, C5DC e C6DC.

- No caso de C8 e C5:1, o policloreto de vinilideno (PVdC) foi identificado como a causa raiz para resultados falsamente elevados.
- Outras interferências desconhecidas provenientes de aditivos podem levar a concentrações aumentadas de C6DC e, consequentemente, a resultados falso-positivos na triagem.

Portanto, todos os reagentes necessários e os recipientes para preparação de amostra fornecidos neste kit de reagentes foram testados quanto à sua adequação. A ausência de interferências de material plástico não fornecido neste kit (por exemplo, ponteiras de pipeta) deve ser garantida pelo usuário final.

A substância endógena oleamida também é utilizada em sua forma sintética como agente de deslizamento, lubrificante ou inibidor de corrosão na produção de artigos de plástico, como ponteiras de pipeta, tubos de ensaio e placas de microtitulação. Alguns desses produtos podem, portanto, conter oleamida residual e contaminar a amostra durante a preparação. A oleamida interfere com o padrão interno da C5DC-carnitina, e um aumento da intensidade do sinal tem sido observado esporadicamente. Isso pode levar a resultados falso-negativos na triagem. Para identificar amostras afetadas, monitore as intensidades do padrão interno da C5DC-carnitina em busca de outliers com sinais anormalmente altos. Para amostras de pacientes afetadas, repita a preparação da amostra para obter resultados válidos.

11.3 Nenhuma interferência detectada

As seguintes substâncias foram testadas e tiveram influência negligenciável nos resultados quantitativos (desvio $\leq 20\%$).

Substâncias isóbaricas

Beta-alanina, ácido 5-aminolevulínico, 7-metilguanina, acetilglicina, ADP, citidina, deoxiguanosina, epiandrosterona, epicatequina, epieticolanolona, eucaliptol, ácido fólico, ácido formiminoglutâmico, frutose 6-fosfato, ácido guanidinosuccínico, difosfato de guanosina, ácido indolacético, isomaltose, kaempferol, lactulose, L-asparagina, metionina sulfóxido, ácido N-acetil-L-aspartico, ácido protocatecuico, piridoxal 5'-fosfato, ácido chiquímico, sacarose, pirofosfato de tiamina, óxido de trimetilamina, turanose.

O ácido formiminoglutâmico não interfere na determinação de C4 neste ensaio. Portanto, em contraste com métodos que utilizam derivatização (os quais apresentam essa interferência), não é possível detectar a Acidúria Formiminoglutâmica (também conhecida como Deficiência de Formiminotransferase ciclodeaminase, código OMIM 229100) com o método não derivatizado [8,13,14].

Fármacos

Acetaminofeno/paracetamol, acetilcisteína, ácido acetilsalicílico, alopurinol, aloxantina/oxipurinol, alprazolam, anlodipino, amoxicilina, anfetamina/dexanfetamina, apixabana, atenolol, atorvastatina, azatioprina, azitromicina, bisoprolol, bupropiona, candesartana, carvedilol, cefuroxima, citalopram, clonazepam, clopidogrel, ciclobenzaprina, diclofenaco, duloxetina, edoxabana, empagliflozina, enalaprilato, fenoterol, fluoxetina, fluticasona, fumarato de formoterol, furosemida, gabapentina, glimepirida, glipizida, hidroclorotiazida, hidrocodona, ibuprofeno, brometo de ipratrópio, lercanidipina, levetiracetam, levodopa, levotiroxina, lidocaína, lisinopril, lorazepam, losartana, meloxicam, metformina, metocarbamol, metilfenidato, metoclopramida, metoprolol, montelucaste, nebivolol, noscapina, omeprazol/esomeprazol, pantoprazol, fenprocumon, pravastatina, prednisolona, prednisona, prilocaína, propranolol, ramipril, ranitidina, rivaroxabana, rosuvastatina, salbutamol, sertralina, sinvastatina, sitagliptina, espironolactona, tansulosina, tilidina (como nortilidina), tramadol, trazodona, triantereno, valsartana, venlafaxina, vitamina K1 (fitomenadiona), zolpidem.

Análise sem interferência é possível nas seguintes condições de amostra:

Icterícia

Amostras de sangue total foram fortificadas separadamente com bilirrubina não conjugada e conjugada (0,4 g/L) antes da aplicação em papel de filtro. As concentrações dos analitos determinadas nestas amostras de DBS foram comparadas com as de DBS não modificadas preparadas a partir das mesmas amostras de sangue: Nenhuma interferência significativa ocorreu (desvio $\leq 20\%$).

Em caso de dúvidas sobre interferências, entre em contato com o representante local da Chromsystems ou com nossa equipe de suporte diretamente pelo telefone +49 89 18930-111 ou por e-mail: support@chromsystems.com.

12 Solução de Problemas

A tabela a seguir fornece informações sobre como proceder em caso de erros durante a análise ou avaliação.

Tabela 21: Solução de Problemas

Problema	Causa Possível	Solução
Preparo da Amostra		
Poços individuais da Placa de Filtro de 96 poços vazam durante a etapa 4 da preparação da amostra, "Extração da succinilacetona" (ver capítulo 5.6.1)	A Folha de Proteção (n° do pedido 55011) é aplicada na Placa de Filtro de 96 poços (n° do pedido 57055) com pressão excessiva.	Sele a Placa de Filtro de 96 poços com cuidado especial.
	Centrifugação incompleta do eluato após a primeira etapa de extração (ver capítulo 5.6.1, etapa 3: Centrifugação)	Verifique e ajuste a força g da centrífuga

Problema	Causa Possível	Solução
Sistema de análise		
Não é possível gerar o perfil de gradiente	Bomba HPLC	Verificar a bomba (ar, vazamentos)
	Ar no sistema	Desgaseificar o sistema HPLC (purga)
	Vazão não constante	Verificar a bomba
Cromatograma inadequado*	Volume morto do sistema HPLC não considerado ou alterado	Ajustar o gradiente
Platô instável	Platô instável	Pressão de retorno do sistema muito baixa
	Pré-filtro PEEK entupido	Trocar o pré-filtro PEEK
Sinais de interferência	Sinais de interferência	Sistema de injeção contaminado
Nenhum sinal	Nenhum sinal	Injeção incorreta
	Injetor com defeito	Verificar o injetor
	Bomba com defeito	Verificar a bomba
	Sistema MS/MS não pronto	Verificar o sistema MS/MS
Sensibilidade diminuindo	Sensibilidade diminuindo	Pré-filtro PEEK entupido
	Posição inadequada ou mau estado do capilar de electrospray	Verificar o capilar de electrospray
	Fonte de íons contaminada	Limpar a fonte de íons
	Espectrômetro de massa contaminado	Limpar o espectrômetro de massa
	Válvula de injeção com vazamento	Verificar o injetor
	Multiplicador gasto	Substituir o multiplicador ou aumentar a voltagem
Baixa intensidade do sinal	Baixa intensidade do sinal	Massas imprecisas
	Autosampler impreciso	Verificar a precisão
Sem vácuo	Sem vácuo	Bomba de vácuo com defeito
	Vazamentos no sistema de vácuo	Verificar tubulações e conexões de vácuo
Falta suprimento de gás	Falta suprimento de gás	Gerador de nitrogênio com defeito
	Compressor com defeito	Verificar o compressor
	Cilindro de gás vazio	Trocar o cilindro de gás
	Pressão do gás fora da faixa especificada	Ajustar a pressão do gás
Avaliação de Dados		
Valores de RRF inconsistentes (dependentes do nível)	Configurações de MS inadequadas	Verificar a sintonia dos parâmetros específicos do analito e do padrão interno Verificar a sintonia dos parâmetros da fonte
Controle de qualidade fora da faixa aceitável	Preparação de amostra incorreta	Verificar a reprodutibilidade dos resultados incorretos
	Valores de RRF inadequados	Verificar ou recalcular os valores de RRF
	CV inaceitavelmente alto	Verificar a sintonia dos parâmetros específicos do analito e do padrão interno

*Exemplos de cromatogramas inadequados:

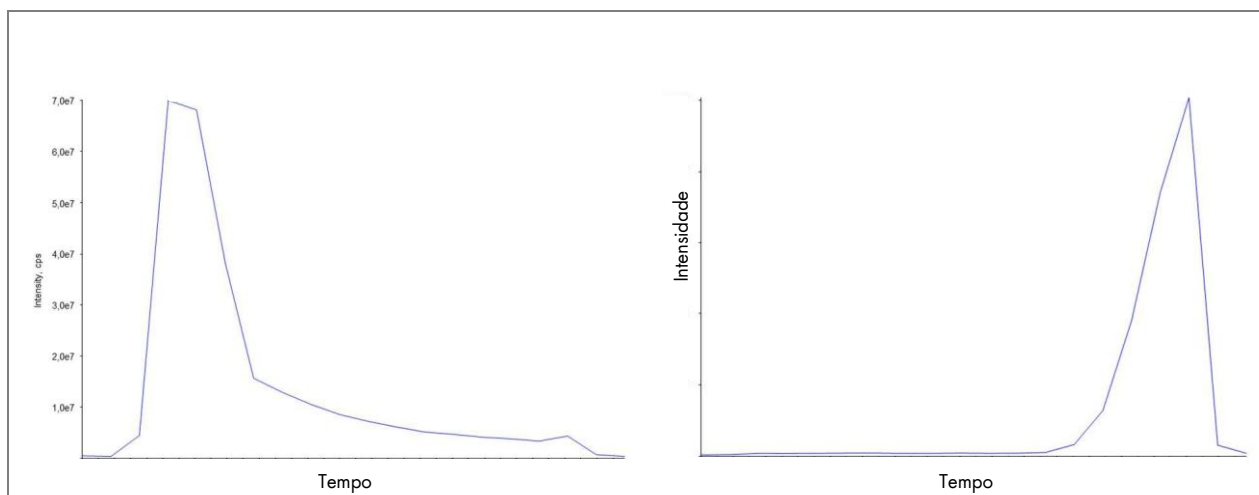


Figura 3: Cromatogramas inadequados

Em caso de dúvidas relacionadas à solução de problemas, entre em contato com o representante local da Chromsystems ou com nossa equipe de suporte diretamente pelo telefone +49 89 18930-111 ou por e-mail: support@chromsystems.com

13 Literatura

- 1 Loeber JG, Platis D, Zetterström RH, Almashanu S, Boemer F, Bonham JR, et al.: Neonatal Screening in Europe Revisited: An ISNS Perspective on the Current State and Developments Since 2010. Int J Neonatal Screen 2021; 7.
- 2 Watson MS, Mann MY, Lloyd-Puryear MA, Rinaldo P, Howell RR: Newborn screening: toward a uniform screening panel and system 2006.
- 3 Clinical Laboratory Standards Institute (CLSI): NBS01-Ed7: Dried Blood Spot Specimen Collection for Newborn Screening. Approved Standard 2021.
- 4 Gemeinsamer Bundesausschuss: Richtlinie des Gemeinsamen Bundesausschusses über die Früherkennung von Krankheiten bei Kindern. Kinder-Richtlinie, 2024.
- 5 Centers for Disease Control and Prevention (CDC): Newborn Screening Quality Assurance Program. Annual Summary Report 2015. Atlanta, GA, 2015.
- 6 Clinical Laboratory Standards Institute (CLSI): NBS01-A6: Blood Collection on Filter Paper for Newborn Screening Programs. Approved Standard 2013.
- 7 Carling RS, Whyte E, John C, Garstone R, Goddard P, Greenfield T, et al.: Improving Harmonization and Standardization of Expanded Newborn Screening Results by Optimization of the Legacy Flow Injection Analysis Tandem Mass Spectrometry Methods and Application of a Standardized Calibration Approach. Clinical Chemistry 2022; 68:1075–1083.
- 8 Clinical Laboratory Standards Institute (CLSI): NBS04-Ed2: Newborn Screening by Tandem Mass Spectrometry 2017.
- 9 Wong EC, Brugnara C, Straseski J, Kellogg M, Adeli K: Pediatric reference intervals. Academic Press, Amsterdam, 2021.
- 10 Burlina A, Giuliani A, Polo G, Gualdi D, Gagnaniello V, Cazzorla C, et al.: Detection of 3-O-methyldopa in dried blood spots for neonatal diagnosis of aromatic L-amino-acid decarboxylase deficiency: The northeastern Italian experience. Mol Genet Metab 2021; 133:56–62.
- 11 Association of Public Health Laboratories: Newborn Screening Analyte Interference List, 2023. https://www.aphl.org/programs/newborn_screening/Pages/NBS%20Interference%20List.aspx#, accessed April 29, 2025.

- 12 Fusch C, Bauer K, Böhles HJ, Jochum F, Koletzko B, Krawinkel M, et al.: Neonatology/Paediatrics - Guidelines on Parenteral Nutrition, Chapter 13. Ger Med Sci 2009; 7:Doc15.
- 13 Ahrens-Nicklas RC, Ganetzky RD, Rush PW, Conway RL, Ficicioglu C: Characteristics and outcomes of patients with formiminoglutamic aciduria detected through newborn screening. J Inherit Metab Dis 2019; 42:140–146.
- 14 Majumdar R, Yori A, Rush PW, Raymond K, Gavrillov D, Tortorelli S, et al.: Allelic spectrum of formiminotransferase-cyclodeaminase gene variants in individuals with formiminoglutamic aciduria. Mol Genet Genomic Med 2017; 5:795–799.
- 15 Arbeitsgemeinschaft für Pädiatrische Stoffwechselstörungen (APS) der Deutschen Gesellschaft für Kinderheilkunde und Jugendmedizin: Diagnostik und Therapie von Harnstoffzyklusstörungen - S3 Leitlinie. AWMF 027-006 2018.
- 16 3MCC prevalence. <https://www.babysfirsttest.org/newborn-screening/conditions/3-methylcrotonyl-coa-carboxylase-deficiency>, accessed October 28, 2024.
- 17 AADC Deficiency. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK595821/>, accessed October 28, 2024.
- 18 ASA prevalence. <https://www.babysfirsttest.org/newborn-screening/conditions/argininosuccinic-aciduria>, accessed October 28, 2024.
- 19 CPT I prevalence. <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S2214426923000782>, accessed October 28, 2024.
- 20 CPT II and CACT prevalence. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK1253/>, accessed October 28, 2024.
- 21 CUD prevalence. <https://www.orpha.net/en/disease/detail/158?name=158&mode=orpha>, accessed October 28, 2024.
- 22 GA1 prevalence. https://register.awmf.org/assets/guidelines/027_D_Ges_fuer_Kinderheilkunde_und_Jugendmedizin/027-018eng_S3_Glutaric-Aciduria_Type_I_2019-09.pdf, accessed October 28, 2024.
- 23 GA2 prevalence. <https://pmc.ncbi.nlm.nih.gov/articles/PMC8913008/>, accessed October 28, 2024.
- 24 LCHAD and TFP prevalence. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK583531/>, accessed October 28, 2024.
- 25 MCAD prevalence. <https://www.orpha.net/en/disease/detail/42?name=42&mode=orpha>, accessed October 28, 2024.
- 26 orpha.net: ORPHA:511 Maple syrup urine disease. <https://www.orpha.net/en/disease/detail/511?name=MSUD&mode=name>, accessed April 9, 2025.
- 27 PA/PROP prevalence. <https://www.orpha.net/en/disease/detail/35?name=35&mode=orpha>, accessed October 28, 2024.
- 28 PKU and H-PHE prevalence. <https://www.egms.de/static/de/meetings/dkvf2019/19dkvf502.shtml#ref1>, accessed October 28, 2024.
- 29 TYR I prevalence. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK1515/>, accessed October 28, 2024.
- 30 TYR II prevalence. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK608431/>, accessed October 28, 2024.
- 31 TYR III prevalence. <https://www.orpha.net/en/disease/detail/69723?name=ORPHA:69723&mode=orpha>, accessed October 28, 2024.
- 32 VLCAD prevalence. <https://www.orpha.net/en/disease/detail/26793?name=ORPHA:26793&mode=orpha>, accessed October 28, 2024.

Anexo I Informação de substância

Substâncias Perigosas

Ao utilizar os reagentes, observe as informações de perigo abaixo e tome as medidas de segurança relevantes. Mais informações podem ser obtidas em nossas Fichas de Dados de Segurança (FDS), disponíveis para download em nosso site www.chromsystems.com ou mediante solicitação.

Tabela 22: Frases de Perigo e de Precaução

Pictogramas	Frases de Perigo e Precaução
Fase Móvel (nºs 57001, 57002)	
Componentes: 50–100 % acetonitrila	
 	Perigo H225 Líquido e vapores extremamente inflamáveis. H302+H312+H332 Nocivo em caso de ingestão, contacto com a pele ou inalação. H319 Provoca irritação ocular grave. Precaução P210 Manter afastado do calor, superfícies quentes, faíscas, chamas abertas e outras fontes de ignição. Não fumar. P241 Utilizar equipamento elétrico/de ventilação/de iluminação à prova de explosão. P243 Tomar medidas de precaução contra descargas eletrostáticas. P280 Usar luvas de proteção/vestuário de proteção/proteção ocular/proteção facial.
Solução de Limpeza (nº. 57007)	
Componentes: 50–100 % acetonitrila	
 	Perigo H225 Líquido e vapor altamente inflamáveis. H302+H312+H332 Nocivo por ingestão, em contacto com a pele ou por inalação. H319 Provoca irritação ocular grave. Precaução P210 Manter afastado do calor, superfícies quentes, faíscas, chamas abertas e outras fontes de ignição. Não fumar. P241 Utilizar equipamento elétrico/de ventilação/de iluminação à prova de explosão. P243 Tomar medidas de precaução contra descargas eletrostáticas. P280 Usar luvas de proteção/vestuário de proteção/proteção ocular/proteção facial.
Tampão de Extração (nº. 57078)	
Componentes: 50–100 % metanol	
  	Perigo H225 Líquido e vapor altamente inflamáveis. H301+H311+H331 Tóxico por ingestão, em contacto com a pele ou por inalação. H370 Provoca danos no sistema nervoso central e nos órgãos visuais. Precaução P210 Manter afastado do calor, superfícies quentes, faíscas, chamas abertas e outras fontes de ignição. Não fumar. P280 Usar luvas de proteção/vestuário de proteção/proteção ocular/proteção facial. P301+P310 EM CASO DE INGESTÃO: Contacte imediatamente um CENTRO DE INFORMAÇÃO ANTIVENENOS/médico. P302+P352 EM CASO DE CONTACTO COM A PELE: Lavar com muita água. P403+P233 Armazenar em local bem ventilado. Manter o recipiente bem fechado.

Pictogramas	Frases de Perigo e Precaução
Tampão de Extração Succinilacetona (n°. 57013)	
Componentes: 50–100 % acetonitrila	
 	Perigo H225 Líquido e vapor altamente inflamáveis. H302+H312+H332 Nocivo por ingestão, em contacto com a pele ou por inalação. H319 Provoca irritação ocular grave. P210 Manter afastado do calor, superfícies quentes, faíscas, chamas abertas e outras fontes de ignição. Não fumar. P241 Utilizar equipamento elétrico/de ventilação/de iluminação à prova de explosão. P243 Tomar medidas de precaução contra descargas eletrostáticas. P280 Usar luvas de proteção/vestuário de proteção/proteção ocular/proteção facial.
Padrão Interno Succinilacetona (n°. 57044)	
Componentes: 50–100 % acetonitrila	
 	Perigo H225 Líquido e vapor altamente inflamáveis. H302+H312+H332 Nocivo por ingestão, em contacto com a pele ou por inalação. H319 Provoca irritação ocular grave. P210 Manter afastado do calor, superfícies quentes, faíscas, chamas abertas e outras fontes de ignição. Não fumar. P241 Utilizar equipamento elétrico/de ventilação/de iluminação à prova de explosão. P243 Tomar medidas de precaução contra descargas eletrostáticas. P280 Usar luvas de proteção/vestuário de proteção/proteção ocular/proteção facial.
Tuning Mix 1 (n°. 57097-1)	
Componentes: 0.0015–0.025 % 2-metil-2H-isotiazol-3-ona	
	Atenção H317 Pode provocar uma reação alérgica cutânea.
Tuning Mix 2 (n°. 57097-2)	
Componentes: 50–100 % metanol	
  	Perigo H225 Líquido e vapor altamente inflamáveis. H301+H311+H331 Tóxico por ingestão, em contacto com a pele ou por inalação. H370 Provoca danos no sistema nervoso central e nos órgãos visuais. P210 Manter afastado do calor, superfícies quentes, faíscas, chamas abertas e outras fontes de ignição. Não fumar. P280 Usar luvas de proteção/vestuário de proteção/proteção ocular/proteção facial. P301+P310 EM CASO DE INGESTÃO: Contacte imediatamente um CENTRO DE INFORMAÇÃO ANTIVENENOS/médico. P302+P352 EM CASO DE CONTACTO COM A PELE: Lavar com muita água. P403+P233 Armazenar em local bem ventilado. Manter o recipiente bem fechado.

Pictogramas	Frases de Perigo e Precaução
Tuning Mix Succinilacetona (n°. 57098)	
Componentes: 50–100 % acetonitrila	
 	Perigo H225 Líquido e vapor altamente inflamáveis. H302+H312+H332 Nocivo por ingestão, em contacto com a pele ou por inalação. H319 Provoca irritação ocular grave. P210 Manter afastado do calor, superfícies quentes, faíscas, chamas abertas e outras fontes de ignição. Não fumar. P241 Utilizar equipamento elétrico/de ventilação/de iluminação à prova de explosão. P243 Tomar medidas de precaução contra descargas eletrostáticas. P280 Usar luvas de proteção/vestuário de proteção/proteção ocular/proteção facial.
MassCheck® Dried Blood Spot Controls (order nos. 0195, 0196, 0197, 0295, 0296, 0297)	
Componentes: 0,0015–0,025 % 2-metil-2H-isotiazol-3-ona	
	Atenção H317 Pode provocar uma reação alérgica cutânea.
Conjuntos de Linearidade de Spots de Sangue Seco Multinível (n°. 57080, 57090)	
Componentes: 0,0015–0,025 % 2-metil-2H-isotiazol-3-ona	
	Atenção H317 Pode provocar uma reação alérgica cutânea.
Estes componentes não são classificados como perigosos de acordo com a legislação da União Europeia:	
Mix de Padrão Interno (n°. 57074)	Componentes: liofilizado
Mix de Padrão Interno Ado, dAdo (n°. 57474)	Componentes: liofilizado

Tabela 23: Ingredientes ativos

Nº. de pedido	Descrição	Componente Ativo	Especificação
0195-0197/ 0295-0297	MassCheck® Aminoácidos, Acilcarnitinas Controles ESTENDIDOS de Spots de Sangue Seco	Analitos (conforme fornecido na bula)	conc. ver bula
57080/ 57090	Conjunto de Linearidade de Spots de Sangue Seco Multinível		
57001	Fase Móvel	Acetonitrila Água Ácido fórmico	50-100 % 0-50 % < 2 %
57007	Solução de Lavagem	Acetonitrila Água Ácido fórmico	50-100 % 0-50 % <2 %
57013	Tampão de Extração Succinilacetona	Acetonitrila Água Derivado de pirazol	50-100 % 0-50 % < 1 %
57078	Tampão de Extração	Metanol Água	50-100 % 0-50 %
57044	Padrão Interno Succinilacetona (não derivatizado)	Analito isotopicamente marcado (conforme fornecido na bula)	< 0,1 %
57074	Mix de Padrão Interno	Analito isotopicamente marcado (conforme fornecido na bula)	< 0,1 %
57474	Mix de Padrão Interno Ado, dAdo	Analitos isotopicamente marcados (conforme fornecido na bula)	< 0.1 %
57097-1	Tuning Mix 1	Analitos e analitos isotopicamente marcados (conforme fornecido na bula)	< 0.1 %
57097-2	Tuning Mix 2	Analitos e analitos isotopicamente marcados (conforme fornecido na bula)	< 0.1 %
57098	Tuning Mix Succinilacetona (não derivatizado)	Analitos e analitos isotopicamente marcados (conforme fornecido na bula)	< 0.1 %

Anexo II Dados de desempenho analítico

As características de desempenho foram determinadas no seguinte equipamento:

- Espectrômetro de massa SCIEX Triple Quad™ 4500MD com sistema Shimadzu Nexera UHPLC
- Espectrômetro de massa Waters Xevo™ TQ-S micro com sistema ACQUITY™ UPLC® H-Class UHPLC

Os usuários do ensaio “*MassScreen®* Aminoácidos, Acilcarnitinas ESTENDIDO” devem garantir que o desempenho do método seja suficiente no espectrômetro de massa utilizado, em relação aos critérios de aceitação definidos pela legislação aplicável, diretrizes e regras internas de seu laboratório.

Rastreabilidade metrológica e veracidade

Para todos os Mixes de Padrão Interno

Mix de Padrão Interno, (n°. 57074);

Mix de Padrão Interno Ado, dAdo (n°. 57474);

Padrão Interno Succinilacetona (não derivatizado) (n°. 57044) em

combinação com os Níveis de Controle de Spots de Sangue Seco

MassCheck® Aminoácidos, Acilcarnitinas ESTENDIDO Controle de Spots de Sangue Seco Nível I-III (n°. 0195, 0196, 0197) e

MassCheck® Aminoácidos, Acilcarnitinas ESTENDIDO incl. Ado, dAdo Controle de Spots de Sangue Seco Nível I-III (n°. 0295, 0296, 0297)

a rastreabilidade metrológica a uma referência através de uma cadeia ininterrupta documentada de calibrações foi demonstrada e está disponível como cadeia de rastreabilidade (ver Anexo V).

A veracidade da medição foi avaliada dentro do processo de desempenho analítico com base nas seguintes estratégias:

- Comparação com método CE/IVD disponível comercialmente
- Análise de amostras de esquemas de ensaios de proficiência
- Medição de material de controle externo
- Determinação da recuperação relativa (usando material de referência certificado, se disponível)

Taxa de recuperação

A recuperação relativa foi determinada usando diferentes amostras de sangue total de adultos. Para este fim, cada uma das amostras individuais foi enriquecida com os analitos antes da produção de DBS. Três níveis de concentração próximos aos valores de corte foram investigados. A recuperação é calculada usando a seguinte fórmula:

$$\text{Recuperação [\%]} = \frac{\text{Concentração medida na amostra enriquecida} - \text{Concentração medida na amostra não enriquecida} \times 100}{\text{Concentração de enriquecimento}}$$

Tabela 24: Taxas de recuperação DBS

Substância	Faixa de concentração testada [µmol/L]	Taxa média de recuperação relativa em DBS (faixa)	
		Determinação com espectrômetro de massas SCIEX 4500MD™	Determinação com espectrômetro de Waters Xevo™ TQ-S micro
Aminoácidos			
Ala	355-711	59 % (58-60 %)	50 % (49-52 %)
Arg	21,6-43,3	60 % (59-61 %)	62 % (61-64 %)
Asa	0,514-1,03	58 % (56-60 %)	59 % (58-60 %)
Cit	23,4-46,9	65 % (64-66 %)	67 % (66-68 %)
Gln	503-1509	77 % (76-78 %)	58 % (58-59 %)
Glu	533-1065	58 % (56-61 %)	58 % (57-60 %)
Gly	744-1488	57 % (56-57 %)	30 % (29-31 %)
Leu	138-275	64 % (62-66 %)	68 % (66-70 %)

Substância	Faixa de concentração testada [µmol/L]	Taxa média de recuperação relativa em DBS (faixa)	
		Determinação com espectrômetro de massas SCIEX 4500MD™	Determinação com espectrômetro de massas Waters Xevo™ TQ-S micro
Met	25,3-50,5	65 % (64-66 %)	66 % (64-67 %)
Orn	164-327	52 % (51-52 %)	55 % (55-56 %)
Phe	57,2-114	69 % (67-70 %)	68 % (66-69 %)
Pro	236-472	65 % (64-66 %)	62 % (61-64 %)
Ser	460-1382	59 % (58-60 %)	57 % (56-59 %)
Tyr	192-383	69 % (68-70 %)	69 % (68-70 %)
Val	145-289	66 % (64-68 %)	64 % (63-65 %)
3-OMD	0,917-2,75	73 % (71-75 %)	70 % (69-72 %)
Carnitinas			
C0	53,8-108	79 % (76-82 %)	79 % (75-82 %)
C2	21,4-64,1	78 % (74-81 %)	77 % (74-79 %)
C3	2,25-6,76	71 % (70-73 %)	72 % (71-74 %)
C4OH	0,439-0,878	82 % (81-84 %)	86 % (84-87 %)
C4	0,873-1,75	73 % (70-75 %)	73 % (70-75 %)
C5OH	0,436-0,873	92 % (90-94 %)	94 % (91-95 %)
C5	0,827-1,65	65 % (62-66 %)	66 % (63-68 %)
C5:1	0,025-0,050	81 % (76-84 %)	81 % (79-83 %)
C5DC	0,246-0,492	85 % (83-87 %)	89 % (87-91 %)
C6	0,391-0,782	78 % (75-81 %)	85 % (81-88 %)
C6DC	0,099-0,198	58 % (55-61 %)	71 % (71-72 %)
C8	0,353-0,705	69 % (66-72 %)	68 % (65-70 %)
C8:1	0,537-1,07	68 % (67-70 %)	70 % (69-72 %)
C10	0,321-0,642	86 % (83-89 %)	87 % (83-89 %)
C10:1	0,489-0,978	73 % (72-75 %)	75 % (73-76 %)
C10:2	0,038-0,076	50 % (46-53 %)	52 % (48-55 %)
C12	0,148-0,443	70 % (67-71 %)	71 % (68-72 %)
C12:1	0,224-0,673	75 % (73-76 %)	72 % (70-73 %)
C14	0,136-0,410	79 % (76-81 %)	82 % (78-84 %)
C14:1	0,207-0,622	74 % (72-75 %)	72 % (71-73 %)
C14:2	0,417-0,834	33 % (32-34 %)	30 % (29-30 %)
C14OH	0,038-0,076	62 % (60-63 %)	39 % (38-39 %)
C16	3,45-10,4	88 % (86-90 %)	87 % (86-89 %)
C16:1	0,193-0,578	74 % (73-76 %)	67 % (66-69 %)
C16OH	0,027-0,081	88 % (87-90 %)	83 % (81-85 %)
C16:1OH	0,087-0,174	61 % (59-62 %)	49 % (47-50 %)
C18	0,474-0,948	81 % (78-84 %)	82 % (78-86 %)
C18:1	0,720-1,44	66 % (63-67 %)	65 % (62-67 %)
C18:2	0,362-0,723	46 % (45-47 %)	35 % (34-36 %)
C18OH	0,042-0,083	121 % (118-125 %)	115 % (112-118 %)
C18:1OH	0,032-0,065	64 % (63-66 %)	47 % (46-47 %)
C18:2OH	0,014-0,028	43 % (42-46 %)	31 % (30-32 %)
C20	0,068-0,135	109 % (93-117 %)	133 % (129-139 %)
C22	0,014-0,036	109% (94-117%)	120% (103-130%)
C24	0,016-0,032	113 % (112-115 %)	116 % (112-118 %)
C26	0,012-0,042	84% (82-88%)	86% (80-89%)
Cetonas			
SUAC	0,719-1,44	37 % (35-39 %)	36 % (33-39 %)
Nucleosídeos			
Ado	0,851-2,55	76 % (75-76 %)	77 % (75-78 %)
dAdo	0,034-0,102	89 % (87-91 %)	84 % (82-88 %)
Lisofosfolídeos			
C20:0 LPC	0,550-1,65	120 % (116-123 %)	123 % (118-128 %)
C22:0 LPC	0,319-0,637	139 % (137-142 %)	139 % (135-142 %)

Substância	Faixa de concentração testada [µmol/L]	Taxa média de recuperação relativa em DBS (faixa)	
		Determinação com espectrômetro de massas SCIEX 4500MD™	Determinação com espectrômetro de Waters Xevo™ TQ-S micro
C24:0 LPC	1,28-2,56	143 % (142-144 %)	140 % (137-142 %)
C26:0 LPC	0,363-0,762	94 % (92-98 %)	80 % (77-83 %)
Creatina e metabólitos relacionados			
CRE	461-1383	64 % (57-71 %)	72 % (70-73 %)
CRN	89,3-179	86 % (85-87 %)	82 % (81-84 %)
GAA	2,65-5,29	35 % (32-42 %)	42 % (41-44 %)

Faixa de medição analítica

Limite inferior de quantificação (LLOQ) e limite superior de quantificação (ULOQ)

A linearidade e o limite superior de quantificação (ULOQ) foram determinados pela adição de quantidades definidas de substâncias padrão ao sangue total adulto, antes da produção dos DBS (manchas de sangue seco) e da análise subsequente. O limite inferior de quantificação (LLOQ) foi determinado por meio de diluições definidas de amostras de matriz (ou matriz substituta) fortificadas, derivadas de sangue adulto, antes da produção das manchas de matriz seca e da análise subsequente.

Tabela 25: Limites de quantificação, determinados com o espectrômetro de massa SCIEX 4500MD™

Substância	LLOQ [µmol/L]	ULOQ [µmol/L]
Aminoácidos		
Ala	15,8	3245
Arg	6,37	902
Asa	0,196	119
Cit	4,17	1291
Gln	23,3	4309
Glu	10,4	2311
Gly	73,4	2727
Leu	5,19	704
Met	2,84	979
Orn	8,29	1151
Phe	2,33	782
Pro	3,61	1492
Ser	11,5	2919
Tyr	4,55	1695
Val	7,77	1430
3-OMD	0,449	70,6
Carnitinas		
C0	0,338	593
C2	0,122	164
C3	0,022	50,2
C4OH	0,028	14,4
C4	0,008	12,3
C5OH	0,012	18,1
C5	0,007	15,1
C5:1	0,021	16,4
C5DC	0,033	14,3
C6	0,027	5,11
C6DC	0,044	14,6
C8	0,005	11,2
C8:1	0,007	11,7
C10	0,007	15,3
C10:1	0,012	17,6
C10:2	0,048	10,4
C12	0,005	10,6

Substância	LLOQ [µmol/L]	ULOQ [µmol/L]
C12:1	0,009	14,5
C14	0,027	13,5
C14:1	0,020	14,5
C14:2	0,014	5,67
C14OH	0,009	12,1
C16	0,043	47,3
C16:1	0,006	15,8
C16OH	0,006	15,1
C16:1OH	0,004	9,75
C18	0,032	27,4
C18:1	0,023	19,7
C18:2	0,022	8,03
C18OH	0,007	19,4
C18:1OH	0,011	6,81
C18:2OH	0,007	4,57
C20	0,010	18,1
C22	0,022	18,0
C24	0,012	15,9
C26	0,015	9,56
Cetonas		
SUAC	0,485	59,4
Nucleosídeos		
Ado	0,029	70,3
dAdo	0,018	71,8
Lisofosfolídeos		
C20:0 LPC	0,279	27,1
C22:0 LPC	0,306	32,4
C24:0 LPC	0,329	36,2
C26:0 LPC	0,129	11,7
Creatina e metabólitos relacionados		
CRE	1,87	1112
CRN	4,72	528
GAA	1,36	27,8

Tabela 26: Limites de quantificação, determinação com o espectrômetro de massa Waters Xevo™ TQ-S micro

Substância	LLOQ [µmol/L]	ULOQ [µmol/L]
Aminoácidos		
Ala	26,4	2785
Arg	6,00	967
Asa	0,173	126
Cit	4,00	1300
Gln	18,6	3153
Glu	22,4	1435
Gly	215	2213
Leu	6,09	1921
Met	2,37	968
Orn	16,2	1397
Phe	2,51	1651
Pro	4,27	1889
Ser	12,3	2876
Tyr	4,60	1695
Val	8,10	1997
3-OMD	0,436	75,3

Substância	LLOQ [µmol/L]	ULOQ [µmol/L]
Carnitinas		
C0	0,300	585
C2	0,068	429
C3	0,014	50,2
C4OH	0,014	14,7
C4	0,005	12,4
C5OH	0,010	17,6
C5	0,005	15,2
C5:1	0,021	16,9
C5DC	0,012	15,2
C6	0,006	5,73
C6DC	0,019	18,0
C8	0,014	11,7
C8:1	0,005	13,8
C10	0,005	15,7
C10:1	0,012	8,53
C10:2	0,028	5,45
C12	0,003	11,7
C12:1	0,006	17,4
C14	0,004	14,2
C14:1	0,025	14,1
C14:2	0,007	6,99
C14OH	0,001	6,19
C16	0,013	71,0
C16:1	0,004	15,8
C16OH	0,002	17,4
C16:1OH	0,002	6,72
C18	0,009	32,5
C18:1	0,006	21,6
C18:2	0,003	8,40
C18OH	0,003	21,3
C18:1OH	0,002	4,61
C18:2OH	0,002	3,15
C20	0,004	35,0
C22	0,005	29,9
C24	0,009	22,1
C26	0,008	10,3
Cetonas		
SUAC	0,271	132
Nucleosídeos		
Ado	0,029	72,0
dAdo	0,016	79,9
Lisofosfolipídeos		
C20:0 LPC	0,349	37,0
C22:0 LPC	0,124	39,7
C24:0 LPC	0,152	39,9
C26:0 LPC	0,079	11,9
Creatina e metabólitos relacionados		
CRE	1,69	4424
CRN	12,2	500
GAA	0,450	17,3

Precisão (repeatabilidade & precisão intralaboratorial)

Os dados de desempenho foram determinados com base em pelo menos 3 amostras diferentes, processadas em duplicata, ao longo de 20 dias diferentes, com 2 análises por dia. O procedimento é baseado no documento CLSI EP05-A3 e corresponde a um desenho experimental de $20 \times 2 \times 2$.

Tabela 27: Precisão (repeatabilidade & precisão intralaboratorial) para amostras de sangue seco, determinação com espectrômetro de massa SCIEX 4500MD™

Substância	Amostra	Concentração media [μmol/L]	Repetibilidade		Precisão Intralaboratorial	
			Coeficiente de variação	Intervalo de 95% de confiança	Coeficiente de variação	Intervalo de 95% de confiança
Aminoácidos						
Ala	Nível 1	347	4,1 %	3,4-5,3 %	4,9 %	4,2-5,9 %
	Nível 2	712	5,8 %	4,8-7,4 %	6,2 %	5,3-7,4 %
	Nível 3	1107	4,9 %	4,0-6,3 %	5,6 %	4,8-6,7 %
Arg	Nível 1	19,7	4,9 %	4,0-6,3 %	6,5 %	5,5-8,0 %
	Nível 2	29,4	4,4 %	3,6-5,6 %	5,4 %	4,6-6,6 %
	Nível 3	43,1	4,7 %	3,8-6,0 %	4,8 %	4,1-5,6 %
	Nível 4	54,0	4,3 %	3,5-5,5 %	4,9 %	4,2-6,0 %
Asa	Nível 1	0,507	7,3 %	6,0-9,3 %	10,9 %	9,0-13,7 %
	Nível 2	0,726	5,2 %	4,3-6,7 %	7,2 %	6,0-8,8 %
	Nível 3	1,27	6,1 %	5,0-7,8 %	6,1 %	5,3-7,2 %
Cit	Nível 1	18,2	8,6 %	7,0-11,0 %	8,9 %	7,7-10,6 %
	Nível 2	29,7	5,6 %	4,6-7,1 %	6,1 %	5,3-7,3 %
	Nível 3	54,8	4,8 %	3,9-6,1 %	5,3 %	4,5-6,3 %
	Nível 4	70,2	4,2 %	3,4-5,4 %	5,0 %	4,2-6,1 %
Gln	Nível 1	650	5,0 %	4,1-6,4 %	5,9 %	5,0-7,1 %
	Nível 2	1225	5,0 %	4,1-6,4 %	5,4 %	4,6-6,4 %
	Nível 3	1737	5,2 %	4,3-6,7 %	5,8 %	5,0-6,9 %
Glu	Nível 1	363	4,1 %	3,4-5,3 %	5,0 %	4,3-6,1 %
	Nível 2	604	4,9 %	4,1-6,3 %	5,3 %	4,6-6,3 %
	Nível 3	1101	4,8 %	3,9-6,1 %	5,7 %	4,8-6,9 %
Gly	Nível 1	625	4,1 %	3,4-5,3 %	5,1 %	4,4-6,1 %
	Nível 2	1311	5,8 %	4,7-7,4 %	6,5 %	5,6-7,8 %
	Nível 3	1701	4,5 %	3,7-5,8 %	5,1 %	4,4-6,0 %
Leu	Nível 1	168	4,1 %	3,4-5,2 %	4,6 %	3,9-5,5 %
	Nível 2	367	4,9 %	4,0-6,3 %	5,4 %	4,7-6,5 %
	Nível 3	432	3,8 %	3,1-4,8 %	4,4 %	3,8-5,4 %
Met	Nível 1	15,1	4,2 %	3,4-5,3 %	4,8 %	4,1-5,7 %
	Nível 2	28,5	4,4 %	3,6-5,7 %	4,9 %	4,2-5,9 %
	Nível 3	57,1	4,8 %	3,9-6,2 %	5,5 %	4,7-6,6 %
	Nível 4	73,8	4,0 %	3,3-5,1 %	4,9 %	4,1-5,9 %
Orn	Nível 1	194	2,9 %	2,4-3,8 %	3,9 %	3,3-4,8 %
	Nível 2	345	6,4 %	5,2-8,2 %	7,2 %	6,1-8,7 %
	Nível 3	423	8,0 %	6,6-10,2 %	8,3 %	7,1-10,1 %
Phe	Nível 1	84,9	4,6 %	3,7-5,8 %	5,0 %	4,3-6,0 %
	Nível 2	143	5,7 %	4,7-7,3 %	6,3 %	5,4-7,5 %
	Nível 3	177	4,5 %	3,7-5,8 %	5,3 %	4,5-6,4 %
Pro	Nível 1	199	4,2 %	3,4-5,4 %	4,9 %	4,2-5,9 %
	Nível 2	419	4,9 %	4,0-6,2 %	5,4 %	4,6-6,4 %
	Nível 3	638	4,3 %	3,5-5,5 %	5,0 %	4,3-6,1 %
Ser	Nível 1	124	6,2 %	5,1-7,9 %	6,3 %	5,5-7,5 %
	Nível 2	1025	5,3 %	4,4-6,8 %	5,6 %	4,9-6,7 %
	Nível 3	1465	5,6 %	4,6-7,2 %	6,1 %	5,3-7,4 %
	Nível 4	1993	4,5 %	3,7-5,7 %	5,2 %	4,4-6,2 %

Substância	Amostra	Concentração media [µmol/L]	Repetibilidade		Precisão Intralaboratorial	
			Coeficiente de variação	Intervalo de 95% de confiança	Coeficiente de variação	Intervalo de 95% de confiança
Tyr	Nível 1	142	4,9 %	4,0-6,3 %	5,6 %	4,8-6,7 %
	Nível 2	332	5,0 %	4,1-6,4 %	5,4 %	4,7-6,5 %
	Nível 3	439	4,2 %	3,5-5,4 %	4,9 %	4,2-5,8 %
Val	Nível 1	158	4,1 %	3,4-5,3 %	5,1 %	4,3-6,3 %
	Nível 2	304	5,0 %	4,1-6,4 %	5,7 %	4,9-6,9 %
	Nível 3	454	4,3 %	3,5-5,4 %	4,9 %	4,2-5,9 %
3-OMD	Nível 1	1,13	4,6 %	3,8-5,9 %	5,5 %	4,7-6,6 %
	Nível 2	2,07	4,2 %	3,5-5,4 %	4,5 %	3,9-5,3 %
	Nível 3	4,05	4,0 %	3,3-5,1 %	4,6 %	3,9-5,6 %
Carnitinas						
C0	Nível 1	21,5	3,9 %	3,2-5,0 %	4,5 %	3,8-5,4 %
	Nível 2	39,4	5,4 %	4,4-6,9 %	6,6 %	5,6-8,0 %
	Nível 3	62,8	5,5 %	4,5-7,0 %	6,0 %	5,1-7,1 %
	Nível 4	99,3	5,0 %	4,1-6,4 %	5,8 %	4,9-6,9 %
C2	Nível 1	24,2	5,0 %	4,1-6,4 %	5,5 %	4,7-6,5 %
	Nível 2	53,6	5,8 %	4,8-7,5 %	6,2 %	5,4-7,4 %
	Nível 3	77,5	6,0 %	4,9-7,7 %	6,8 %	5,8-8,1 %
	Nível 4	94,8	4,3 %	3,5-5,5 %	5,3 %	4,5-6,5 %
C3	Nível 1	0,138	9,4 %	7,8-12,1 %	10,1 %	8,7-12,0 %
	Nível 2	1,85	5,1 %	4,2-6,5 %	5,8 %	5,0-7,0 %
	Nível 3	4,04	5,3 %	4,3-6,8 %	5,8 %	5,0-6,9 %
	Nível 4	5,93	5,7 %	4,7-7,3 %	6,8 %	5,8-8,3 %
C4OH	Nível 1	0,272	4,1 %	3,4-5,3 %	5,1 %	4,4-6,2 %
	Nível 2	0,632	4,8 %	4,0-6,2 %	5,8 %	4,9-7,1 %
	Nível 3	0,870	4,3 %	3,5-5,5 %	5,1 %	4,30-6,2 %
C4	Nível 1	0,650	5,4 %	4,4-6,9 %	5,8 %	5,0-6,9 %
	Nível 2	0,925	5,7 %	4,7-7,3 %	6,5 %	5,6-7,8 %
	Nível 3	1,15	4,5 %	3,7-5,7 %	5,3 %	4,5-6,4 %
C5OH	Nível 1	0,462	3,9 %	3,2-5,0 %	4,8 %	4,1-5,9 %
	Nível 2	0,906	5,2 %	4,2-6,6 %	5,8 %	5,0-7,0 %
	Nível 3	1,07	4,4 %	3,6-5,6 %	5,2 %	4,4-6,3 %
C5	Nível 1	0,364	5,6 %	4,6-7,1 %	6,0 %	5,1-7,1 %
	Nível 2	0,519	5,1 %	4,2-6,6 %	6,0 %	5,1-7,2 %
	Nível 3	0,646	5,1 %	4,2-6,6 %	6,1 %	5,2-7,4 %
C5:1	Nível 1	0,052	4,9 %	4,0-6,3 %	8,9 %	7,2-11,6 %
	Nível 2	0,072	4,7 %	3,9-6,1 %	7,0 %	5,8-8,8 %
	Nível 3	0,089	3,5 %	2,9-4,5 %	7,5 %	6,0-9,9 %
C5DC	Nível 1	0,159	8,1 %	6,7-10,4 %	8,3 %	7,1-9,9 %
	Nível 2	0,356	6,3 %	5,1-8,0 %	6,9 %	6,0-8,3 %
	Nível 3	0,430	5,5 %	4,5-7,0 %	6,6 %	5,6-8,0 %
C6	Nível 1	0,092	5,4 %	4,5-7,0 %	6,1 %	5,2-7,3 %
	Nível 2	0,192	5,5 %	4,5-7,1 %	6,5 %	5,5-7,9 %
	Nível 3	0,230	4,8 %	4,0-6,2 %	5,6 %	4,7-6,7 %
C6DC	Nível 1	0,204	6,8 %	5,6-8,7 %	7,2 %	6,2-8,6 %
	Nível 2	0,350	6,4 %	5,2-8,2 %	7,0 %	6,0-8,3 %
	Nível 3	0,437	4,8 %	3,9-6,1 %	6,4 %	5,4-7,9 %
C8	Nível 1	0,129	3,0 %	2,5-3,9 %	4,5 %	3,8-5,7 %
	Nível 2	0,230	3,3 %	2,7-4,2 %	4,40%	3,7-5,5 %
	Nível 3	0,271	3,5 %	2,9-4,4 %	5,2 %	4,4-6,4 %
C8:1	Nível 1	0,102	4,6 %	3,8-5,9 %	5,2 %	4,5-6,2 %
	Nível 2	0,225	6,0 %	4,9-7,7 %	6,5 %	5,6-7,8 %
	Nível 3	0,309	5,2 %	4,3-6,6 %	6,1 %	5,2-7,5 %

Substância	Amostra	Concentração media [µmol/L]	Repetibilidade		Precisão Intralaboratorial	
			Coeficiente de variação	Intervalo de 95% de confiança	Coeficiente de variação	Intervalo de 95% de confiança
C10	Nível 1	0,198	5,4 %	4,4-6,8 %	6,4 %	5,5-7,8 %
	Nível 2	0,368	6,1 %	5,0-7,9 %	6,8 %	5,8-8,1 %
	Nível 3	0,439	5,2 %	4,3-6,7 %	6,3 %	5,4-7,8 %
C10:1	Nível 1	0,076	5,2 %	4,3-6,6 %	6,0 %	5,1-7,2 %
	Nível 2	0,122	6,5 %	5,4-8,3 %	7,0 %	6,0-8,3 %
	Nível 3	0,166	5,5 %	4,6-7,1 %	6,5 %	5,5-7,8 %
C10:2	Nível 1	0,057	5,0 %	4,1-6,4 %	6,9 %	5,8-8,4 %
	Nível 2	0,088	6,4 %	5,2-8,2 %	7,5 %	6,4-9,1 %
	Nível 3	0,110	4,8 %	3,9-6,1 %	5,8 %	4,9-7,1 %
C12	Nível 1	0,140	5,5 %	4,5-7,0 %	6,0 %	5,1-7,1 %
	Nível 2	0,370	5,2 %	4,3-6,7 %	5,8 %	5,0-7,0 %
	Nível 3	0,453	4,6 %	3,7-5,8 %	5,3 %	4,6-6,5 %
C12:1	Nível 1	0,159	5,6 %	4,6-7,1 %	5,9 %	5,1-7,1 %
	Nível 2	0,372	5,9 %	4,8-7,6 %	6,7 %	5,7-8,1 %
	Nível 3	0,514	4,6 %	3,7-5,8 %	5,5 %	4,7-6,7 %
C14	Nível 1	0,374	4,8 %	4,0-6,2 %	5,3 %	4,5-6,2 %
	Nível 2	0,533	6,1 %	5,0-7,8 %	6,5 %	5,6-7,7 %
	Nível 3	0,654	4,7 %	3,8-6,0 %	5,5 %	4,7-6,7 %
C14:1	Nível 1	0,168	4,5 %	3,7-5,7 %	4,9 %	4,2-5,8 %
	Nível 2	0,370	6,1 %	5,0-7,8 %	6,5 %	5,6-7,8 %
	Nível 3	0,505	4,8 %	4,0-6,2 %	5,9 %	5,0-7,2 %
C14:2	Nível 1	0,031	4,9 %	4,1-6,3 %	5,6 %	4,8-6,7 %
	Nível 2	0,063	5,6 %	4,6-7,1 %	6,2 %	5,3-7,4 %
	Nível 3	0,092	4,6 %	3,8-5,9 %	5,5 %	4,7-6,7 %
C14OH	Nível 1	0,028	5,6 %	4,6-7,1 %	6,1 %	5,3-7,3 %
	Nível 2	0,043	5,6 %	4,6-7,1 %	6,2 %	5,3-7,4 %
	Nível 3	0,072	4,5 %	3,7-5,8 %	5,3 %	4,5-6,3 %
C16	Nível 1	0,406	4,6 %	3,8-5,9 %	5,7 %	4,9-6,9 %
	Nível 2	3,18	6,1 %	5,0-7,8 %	6,4 %	5,5-7,6 %
	Nível 3	6,72	5,6 %	4,6-7,2 %	6,3 %	5,4-7,5 %
	Nível 4	9,73	6,3 %	5,1-8,0 %	6,7 %	5,8-7,9 %
C16:1	Nível 1	0,260	5,6 %	4,6-7,2 %	6,4 %	5,5-7,6 %
	Nível 2	0,501	5,1 %	4,2-6,5 %	6,1 %	5,2-7,2 %
	Nível 3	0,922	4,8 %	3,9-6,1 %	5,7 %	4,9-7,0 %
C16OH	Nível 1	0,032	4,8 %	3,9-6,1 %	5,7 %	4,9-6,8 %
	Nível 2	0,084	6,3 %	5,1-8,0 %	6,6 %	5,7-7,8 %
	Nível 3	0,105	4,5 %	3,7-5,7 %	5,1 %	4,3-6,1 %
C16:1OH	Nível 1	0,048	5,8 %	4,8-7,4 %	5,8 %	5,0-6,9 %
	Nível 2	0,107	6,8 %	5,5-8,7 %	7,3 %	6,3-8,7 %
	Nível 3	0,146	5,3 %	4,3-6,7 %	6,0 %	5,1-7,2 %
C18	Nível 1	0,398	4,8 %	3,9-6,1 %	6,6 %	5,6-8,0 %
	Nível 2	0,969	6,4 %	5,3-8,2 %	7,3 %	6,3-8,7 %
	Nível 3	2,31	5,8 %	4,8-7,5 %	6,2 %	5,3-7,3 %
	Nível 4	2,80	5,1 %	4,2-6,5 %	5,9 %	5,1-7,1 %
C18:1	Nível 1	0,699	4,7 %	3,8-6,0 %	5,9 %	5,1-7,1 %
	Nível 2	2,00	5,7 %	4,7-7,3 %	6,7 %	5,7-8,0 %
	Nível 3	3,36	4,9 %	4,0-6,3 %	6,2 %	5,4-7,5 %
	Nível 4	5,76	4,8 %	3,9-6,1 %	5,9 %	5,0-7,1 %
C18:2	Nível 1	0,227	4,6 %	3,8-5,9 %	5,3 %	4,6-6,4 %
	Nível 2	0,399	5,7 %	4,7-7,3 %	6,5 %	5,6-7,7 %
	Nível 3	0,579	5,5 %	4,5-7,1 %	6,3 %	5,4-7,5 %
	Nível 4	0,692	6,0 %	4,9-7,8 %	6,8 %	5,8-8,2 %

Substância	Amostra	Concentração media [µmol/L]	Repetibilidade		Precisão Intralaboratorial	
			Coeficiente de variação	Intervalo de 95% de confiança	Coeficiente de variação	Intervalo de 95% de confiança
C18OH	Nível 1	0,056	6,2 %	5,1-7,9 %	6,5 %	5,6-7,7 %
	Nível 2	0,073	5,3 %	4,3-6,8 %	5,9 %	5,0-7,0 %
	Nível 3	0,099	4,9 %	4,0-6,2 %	5,5 %	4,7-6,6 %
C18:1OH	Nível 1	0,028	4,2 %	3,4-5,4 %	6,4 %	5,4-7,9 %
	Nível 2	0,043	5,3 %	4,3-6,7 %	5,7 %	4,9-6,8 %
	Nível 3	0,072	4,8 %	3,9-6,1 %	5,5 %	4,7-6,7 %
C18:2OH	Nível 1	0,011	7,7 %	6,3-9,8 %	7,7 %	6,7-9,1 %
	Nível 2	0,024	5,7 %	4,7-7,3 %	6,8 %	5,8-8,1 %
	Nível 3	0,036	4,6 %	3,8-5,9 %	5,2 %	4,5-6,2 %
C20	Nível 1	0,031	5,3 %	4,3-6,8 %	6,6 %	5,6-8,0 %
	Nível 2	0,065	6,6 %	5,4-8,5 %	8,6 %	7,3-10,3 %
	Nível 3	0,125	6,8 %	5,5-8,7 %	7,7 %	6,6-9,2 %
C22	Nível 1	0,021	4,7 %	3,8-6,0 %	5,7 %	4,9-6,9 %
	Nível 2	0,030	5,5 %	4,5-7,0 %	6,9 %	5,9-8,3 %
	Nível 3	0,041	5,4 %	4,4-6,9 %	6,9 %	5,9-8,3 %
C24	Nível 1	0,026	4,9 %	4,0-6,2 %	6,8 %	5,7-8,4 %
	Nível 2	0,031	5,7 %	4,7-7,3 %	6,6 %	5,7-7,9 %
	Nível 3	0,050	5,6 %	4,6-7,2 %	6,2 %	5,4-7,4 %
C26	Nível 1	0,017	7,9 %	6,5-10,1 %	9,5 %	8,1-11,4 %
	Nível 2	0,028	6,5 %	5,4-8,4 %	7,8 %	6,7-9,3 %
	Nível 3	0,040	5,4 %	4,4-6,9 %	7,3 %	6,2-8,8 %
Cetonas						
SUAC	Nível 1	1,00	5,8 %	4,7-7,4 %	6,9 %	5,9-8,4 %
	Nível 2	1,68	6,6 %	5,5-8,5 %	7,5 %	6,4-8,9 %
	Nível 3	2,23	6,8 %	5,6-8,8 %	7,9 %	6,7-9,5 %
Nucleosídeos						
Ado	Nível 1	1,65	3,1 %	2,6-4,0 %	3,4 %	3,0-4,1 %
	Nível 2	2,42	3,5 %	2,9-4,5 %	4,1 %	3,5-4,9 %
	Nível 3	3,30	3,1 %	2,5-4,0 %	3,6 %	3,1-4,3 %
dAdo*	Nível 1	0,015	9,4 %	7,2-13,6 %	10,6 %	8,6-13,7 %
	Nível 2	0,051	4,8 %	3,6-6,9 %	6,4 %	5,0-8,8 %
	Nível 3	0,083	4,1 %	3,2-6,0 %	5,4 %	4,2-7,3 %
Lisofosfolídeos						
C20:0 LPC	Nível 1	0,463	8,3 %	6,8-10,6 %	11,6 %	9,8-14,2 %
	Nível 2	0,572	10,6 %	8,7-13,5 %	11,2 %	9,7-13,3 %
	Nível 3	0,707	9,3 %	7,6-11,9 %	10,4 %	9,0-12,4 %
C22:0 LPC	Nível 1	0,417	9,7 %	7,9-12,3 %	11,0 %	9,5-13,0 %
	Nível 2	0,691	10,5 %	8,7-13,5 %	10,7 %	9,3-12,7 %
	Nível 3	1,17	9,2 %	7,5-11,7 %	9,5 %	8,2-11,2 %
C24:0 LPC	Nível 1	0,439	7,3 %	6,0-9,4 %	8,7 %	7,5-10,4 %
	Nível 2	1,10	8,4 %	6,9-10,7 %	9,0 %	7,8-10,7 %
	Nível 3	1,87	6,2 %	5,1-8,0 %	7,3 %	6,3-8,7 %
C26:0 LPC	Nível 1	0,405	14,2 %	11,6-18,1 %	14,3 %	12,4-16,9 %
	Nível 2	0,583	12,4 %	10,2-15,8 %	12,8 %	11,0-15,1 %
	Nível 3	0,907	12,7 %	10,4-16,3 %	12,8 %	11,0-15,1 %
Creatina e metabólitos relacionados						
CRE	Nível 1	73,3	4,1 %	3,4-5,3 %	4,5 %	3,9-5,4 %
	Nível 2	440	4,5 %	3,7-5,8 %	5,4 %	4,6-6,5 %
	Nível 3	744	4,3 %	3,5-5,5 %	4,7 %	4,1-5,7 %
	Nível 4	1124	2,9 %	2,4-3,7 %	4,7 %	3,8-5,9 %

Substância	Amostra	Concentração media [µmol/L]	Repetibilidade		Precisão Intralaboratorial	
			Coeficiente de variação	Intervalo de 95% de confiança	Coeficiente de variação	Intervalo de 95% de confiança
CRN	Nível 1	82,3	4,4 %	3,6-5,7 %	5,4 %	4,6-6,5 %
	Nível 2	130	4,4 %	3,6-5,6 %	4,8 %	4,1-5,7 %
	Nível 3	231	4,0 %	3,3-5,1 %	5,0 %	4,2-6,2 %
GAA	Nível 1	1,02	6,6 %	5,4-8,4 %	11,9 %	9,6-15,6 %
	Nível 2	2,58	7,1 %	5,8-9,1 %	8,3 %	7,1-10,1 %
	Nível 3	4,16	6,3 %	5,1-8,0 %	8,0 %	6,7-9,7 %
	Nível 4	7,10	4,3 %	3,6-5,5 %	7,2 %	6,0-8,9 %

* n=40, correspondendo a um desenho experimental de $10 \times 2 \times 2$.

Os seguintes dados de desempenho foram determinados com base em pelo menos 3 amostras diferentes, processadas em duplicata, ao longo de 10 dias diferentes, com 2 análises por dia. O procedimento corresponde a um desenho experimental de $10 \times 2 \times 2$.

Tabela 28: Precisão (repetibilidade & precisão intralaboratorial) para amostras de sangue seco, determinação com espectrômetro de massa Waters Xevo™ TQ-S micro

Substância	Amostra	Concentração media [μmol/L]	Repetibilidade		Precisão Intralaboratorial	
			Coeficiente de variação	Intervalo de 95% de confiança	Coeficiente de variação	Intervalo de 95% de confiança
Aminoácidos						
Ala	Nível 1	338	4,1 %	3,1–5,9 %	4,9 %	3,9–6,6 %
	Nível 2	677	4,0 %	3,1–5,8 %	5,8 %	4,5–8,0 %
	Nível 3	1044	3,9 %	3,0–5,7 %	7,8 %	5,9–11,4 %
Arg	Nível 1	16,3	4,8 %	3,6–6,9 %	4,8 %	3,9–6,1 %
	Nível 2	29,0	3,4 %	2,6–5,0 %	4,5 %	3,6–6,2 %
	Nível 3	41,9	4,9 %	3,7–7,1 %	5,0 %	4,1–6,7 %
	Nível 4	55,8	2,6 %	2,0–3,7 %	3,9 %	3,1–5,2 %
Asa	Nível 1	0,507	14,4 %	11,0–20,7 %	15,0 %	12,2–19,3 %
	Nível 2	0,817	12,6 %	9,6–18,2 %	12,8 %	10,5–16,5 %
	Nível 3	1,12	13,2 %	10,1–19,1 %	13,5 %	11,0–17,3 %
Cit	Nível 1	17,7	5,1 %	3,9–7,3 %	5,4 %	4,4–7,0 %
	Nível 2	31,6	4,7 %	3,6–6,7 %	5,8 %	4,6–7,8 %
	Nível 3	58,7	3,9 %	3,0–5,6 %	4,2 %	3,4–5,4 %
	Nível 4	71,1	3,9 %	3,0–5,7 %	4,2 %	3,4–5,4 %
Gln	Nível 1	625	3,1 %	2,3–4,4 %	4,6 %	3,5–6,7 %
	Nível 2	1119	3,7 %	2,8–5,3 %	4,3 %	3,5–5,6 %
	Nível 3	1601	3,6 %	2,7–5,2 %	4,2 %	3,4–5,4 %
Glu	Nível 1	210	4,8 %	3,7–7,0 %	5,5 %	4,4–7,3 %
	Nível 2	684	3,6 %	2,8–5,2 %	4,1 %	3,3–5,2 %
	Nível 3	1256	3,7 %	2,9–5,4 %	4,2 %	3,4–5,5 %
Gly	Nível 1	567	16,4 %	12,5–23,6 %	16,4 %	13,4–21,1 %
	Nível 2	838	12,0 %	9,2–17,3 %	13,5 %	10,9–17,6 %
	Nível 3	973	12,6 %	9,6–18,1 %	13,9 %	11,3–17,9 %
Leu	Nível 1	168	4,2 %	3,2–6,1 %	4,7 %	3,8–6,1 %
	Nível 2	320	3,4 %	2,6–4,9 %	4,2 %	3,4–5,4 %
	Nível 3	463	3,4 %	2,6–4,9 %	4,1 %	3,2–5,5 %

Substância	Amostra	Concentração media [μmol/L]	Repetibilidade		Precisão Intralaboratorial	
			Coeficiente de variação	Intervalo de 95% de confiança	Coeficiente de variação	Intervalo de 95% de confiança
Met	Nível 1	17,2	4,1 %	3,2-6,0 %	4,6 %	3,7-6,0 %
	Nível 2	33,5	3,1 %	2,4-4,5 %	4,7 %	3,7-6,7 %
	Nível 3	50,1	3,7 %	2,8-5,3 %	4,3 %	3,5-5,6 %
	Nível 4	80,9	3,6 %	2,8-5,2 %	3,9 %	3,2-5,0 %
Orn	Nível 1	178	3,6 %	2,8-5,2 %	4,5 %	3,6-5,9 %
	Nível 2	331	4,5 %	3,5-6,5 %	4,9 %	4,0-6,3 %
	Nível 3	502	4,0 %	3,1-5,8 %	4,8 %	3,8-6,4 %
Phe	Nível 1	59,8	3,6 %	2,7-5,2 %	4,0 %	3,2-5,3 %
	Nível 2	153	3,3 %	2,5-4,8 %	4,0 %	3,3-5,3 %
	Nível 3	182	3,6 %	2,7-5,2 %	4,0 %	3,2-5,2 %
Pro	Nível 1	213	3,8 %	2,9-5,4 %	4,3 %	3,5-5,6 %
	Nível 2	333	2,7 %	2,1-3,9 %	4,6 %	3,5-7,0 %
	Nível 3	567	3,1 %	2,3-4,4 %	3,9 %	3,1-5,2 %
Ser	Nível 1	137	4,8 %	3,7-6,9 %	5,7 %	4,6-7,6 %
	Nível 2	613	3,4 %	2,6-4,9 %	4,8 %	3,7-6,6 %
	Nível 3	1551	3,9 %	3,0-5,7 %	4,3 %	3,5-5,5 %
	Nível 4	1958	3,8 %	2,9-5,5 %	4,4 %	3,6-5,9 %
Tyr	Nível 1	156	2,8 %	2,1-4,0 %	4,2 %	3,3-5,9 %
	Nível 2	259	3,3 %	2,5-4,7 %	3,9 %	3,2-5,1 %
	Nível 3	456	3,9 %	3,0-5,7 %	4,3 %	3,5-5,7 %
Val	Nível 1	171	4,2 %	3,2-6,0 %	4,7 %	3,8-6,1 %
	Nível 2	251	2,8 %	2,2-4,1 %	5,6 %	4,1-8,9 %
	Nível 3	402	3,3 %	2,5-4,7 %	4,4 %	3,5-5,9 %
3-OMD	Nível 1	1,28	10,9 %	8,4-15,8 %	11,1 %	9,1-14,2 %
	Nível 2	2,29	7,4 %	5,7-10,7 %	8,7 %	7,0-11,4 %
	Nível 3	4,31	6,5 %	5,0-9,4 %	6,5 %	5,3-8,4 %
Carnitinas						
C0	Nível 1	23,3	4,5 %	3,5-6,5 %	4,9 %	4,0-6,5 %
	Nível 2	45,0	2,6 %	2,0-3,7 %	4,7 %	3,6-6,6 %
	Nível 3	65,2	3,8 %	2,9-5,4 %	3,9 %	3,2-5,1 %
	Nível 4	87,4	3,6 %	2,8-5,2 %	4,2 %	3,4-5,6 %
C2	Nível 1	28,8	3,2 %	2,4-4,6 %	4,6 %	3,6-6,5 %
	Nível 2	55,1	3,4 %	2,6-4,9 %	4,8 %	3,9-6,4 %
	Nível 3	84,9	3,3 %	2,5-4,7 %	5,0 %	3,9-6,9 %
	Nível 4	122	3,4 %	2,6-4,9 %	4,6 %	3,7-6,4 %
C3	Nível 1	2,22	2,3 %	1,8-3,4 %	4,6 %	3,5-6,8 %
	Nível 2	4,15	3,6 %	2,7-5,2 %	4,3 %	3,5-5,7 %
	Nível 3	6,34	3,7 %	2,8-5,3 %	4,6 %	3,7-6,0 %
	Nível 4	9,02	3,5 %	2,7-5,0 %	4,3 %	3,5-5,7 %
C4OH	Nível 1	0,296	4,6 %	3,5-6,7 %	5,2 %	4,2-6,7 %
	Nível 2	0,523	3,9 %	3,0-5,6 %	4,4 %	3,6-5,7 %
	Nível 3	0,778	3,1 %	2,3-4,4 %	4,6 %	3,6-6,5 %
C4	Nível 1	0,662	3,9 %	3,0-5,7 %	4,8 %	3,9-6,3 %
	Nível 2	0,975	3,5 %	2,6-5,0 %	4,7 %	3,7-6,2 %
	Nível 3	1,37	3,7 %	2,9-5,4 %	4,2 %	3,4-5,5 %
C5OH	Nível 1	0,538	3,2 %	2,5-4,7 %	5,4 %	4,2-7,4 %
	Nível 2	0,962	3,4 %	2,6-4,9 %	4,4 %	3,5-5,7 %
	Nível 3	1,25	4,0 %	3,0-5,7 %	4,8 %	3,8-6,4 %
C5	Nível 1	0,220	4,1 %	3,1-5,9 %	5,7 %	4,5-7,9 %
	Nível 2	0,567	4,9 %	3,7-7,0 %	5,5 %	4,5-7,1 %
	Nível 3	0,795	2,9 %	2,2-4,2 %	4,5 %	3,4-6,4 %

Substância	Amostra	Concentração media [µmol/L]	Repetibilidade		Precisão Intralaboratorial	
			Coefficiente de variação	Intervalo de 95% de confiança	Coefficiente de variação	Intervalo de 95% de confiança
C5:1	Nível 1	0,028	10,5 %	8,0-15,2 %	12,8 %	10,4-16,7 %
	Nível 2	0,051	8,1 %	6,2-11,6 %	8,9 %	7,2-11,6 %
	Nível 3	0,077	6,3 %	4,8-9,1 %	7,1 %	5,7-9,2 %
C5DC	Nível 1	0,161	7,6 %	5,8-11,0 %	9,4 %	7,6-12,4 %
	Nível 2	0,381	7,2 %	5,5-10,4 %	7,5 %	6,1-9,6 %
	Nível 3	0,531	5,6 %	4,3-8,0 %	6,6 %	5,3-8,8 %
C6	Nível 1	0,079	6,6 %	5,0-9,5 %	7,7 %	6,3-10,0 %
	Nível 2	0,188	4,6 %	3,5-6,7 %	5,7 %	4,5-7,7 %
	Nível 3	0,262	5,6 %	4,3-8,1 %	5,6 %	4,6-7,2 %
C6DC	Nível 1	0,209	8,1 %	6,2-11,7 %	9,3 %	7,6-12,1 %
	Nível 2	0,290	7,1 %	5,4-10,2 %	7,1 %	5,8-9,2 %
	Nível 3	0,386	8,6 %	6,6-12,4 %	9,0 %	7,3-11,6 %
C8	Nível 1	0,126	4,8 %	3,7-6,9 %	5,9 %	4,6-8,0 %
	Nível 2	0,244	4,9 %	3,8-7,1 %	5,9 %	4,8-7,7 %
	Nível 3	0,320	4,9 %	3,7-7,0 %	5,6 %	4,5-7,5 %
C8:1	Nível 1	0,126	4,8 %	3,7-7,0 %	6,9 %	5,4-9,7 %
	Nível 2	0,215	5,1 %	3,9-7,4 %	5,2 %	4,2-6,7 %
	Nível 3	0,316	4,7 %	3,6-6,7 %	5,2 %	4,2-6,7 %
C10	Nível 1	0,218	3,1 %	2,4-4,5 %	5,0 %	3,9-6,9 %
	Nível 2	0,403	4,1 %	3,1-5,9 %	4,9 %	3,9-6,5 %
	Nível 3	0,525	3,9 %	3,0-5,6 %	4,6 %	3,7-6,2 %
C10:1	Nível 1	0,082	4,9 %	3,8-7,1 %	5,5 %	4,4-7,1 %
	Nível 2	0,134	4,0 %	3,1-5,8 %	4,8 %	3,9-6,2 %
	Nível 3	0,192	4,3 %	3,3-6,2 %	5,2 %	4,2-6,9 %
C10:2	Nível 1	0,054	5,5 %	4,2-8,0 %	6,1 %	5,0-7,9 %
	Nível 2	0,094	4,7 %	3,6-6,7 %	5,2 %	4,2-6,9 %
	Nível 3	0,118	4,4 %	3,3-6,3 %	5,1 %	4,1-6,8 %
C12	Nível 1	0,162	4,0 %	3,1-5,8 %	5,3 %	4,2-7,2 %
	Nível 2	0,277	4,0 %	3,1-5,8 %	4,7 %	3,8-6,1 %
	Nível 3	0,407	4,4 %	3,4-6,4 %	4,7 %	3,9-6,1 %
C12:1	Nível 1	0,165	4,3 %	3,3-6,2 %	5,2 %	4,2-6,9 %
	Nível 2	0,292	4,1 %	3,1-5,9 %	4,8 %	3,9-6,2 %
	Nível 3	0,433	3,7 %	2,8-5,4 %	4,2 %	3,5-5,5 %
C14	Nível 1	0,386	3,4 %	2,6-4,9 %	5,2 %	4,1-7,0 %
	Nível 2	0,578	5,3 %	4,1-7,7 %	5,5 %	4,5-7,2 %
	Nível 3	0,813	4,5 %	3,5-6,5 %	4,7 %	3,8-6,0 %
C14:1	Nível 1	0,189	2,9 %	2,2-4,2 %	5,0 %	3,8-7,0 %
	Nível 2	0,456	4,4 %	3,4-6,4 %	4,7 %	3,9-6,1 %
	Nível 3	0,609	4,1 %	3,1-5,9 %	4,3 %	3,5-5,5 %
C14:2	Nível 1	0,030	5,5 %	4,2-8,0 %	5,9 %	4,8-7,6 %
	Nível 2	0,061	4,5 %	3,4-6,4 %	5,3 %	4,3-6,8 %
	Nível 3	0,098	4,8 %	3,6-6,9 %	4,8 %	4,0-6,2 %
C14OH	Nível 1	0,019	7,2 %	5,5-10,0 %	8,2 %	6,6-10,8 %
	Nível 2	0,048	6,7 %	5,1-9,6 %	7,1 %	5,8-9,2 %
	Nível 3	0,064	5,6 %	4,3-8,1 %	5,7 %	4,6-7,3 %
C16	Nível 1	0,423	4,7 %	3,6-6,9 %	5,0 %	4,1-6,4 %
	Nível 2	3,74	4,3 %	3,3-6,2 %	5,6 %	4,4-7,6 %
	Nível 3	6,84	3,7 %	2,8-5,3 %	5,7 %	4,5-7,6 %
	Nível 4	10,3	6,0 %	4,6-8,6 %	6,0 %	4,9-7,7 %
C16:1	Nível 1	0,289	3,9 %	3,0-5,7 %	5,5 %	4,3-7,6 %
	Nível 2	0,542	3,8 %	2,9-5,5 %	5,5 %	4,4-7,3 %
	Nível 3	0,814	5,4 %	4,1-7,8 %	5,8 %	4,7-7,4 %

Substância	Amostra	Concentração media [μmol/L]	Repetibilidade		Precisão Intralaboratorial	
			Coeficiente de variação	Intervalo de 95% de confiança	Coeficiente de variação	Intervalo de 95% de confiança
C16OH	Nível 1	0,059	6,0 %	4,6-8,7 %	6,4 %	5,2-8,3 %
	Nível 2	0,087	4,7 %	3,6-6,8 %	5,8 %	4,7-7,7 %
	Nível 3	0,125	5,2 %	4,0-7,6 %	5,6 %	4,5-7,2 %
C16:1OH	Nível 1	0,045	4,5 %	3,4-6,5 %	5,3 %	4,2-7,0 %
	Nível 2	0,109	4,5 %	3,4-6,5 %	5,0 %	4,1-6,5 %
	Nível 3	0,146	4,0 %	3,0-5,7 %	4,7 %	3,7-6,3 %
C18	Nível 1	0,409	3,9 %	3,0-5,6 %	4,9 %	4,0-6,4 %
	Nível 2	1,11	5,1 %	3,9-7,4 %	6,3 %	5,1-8,4 %
	Nível 3	2,50	7,6 %	5,8-10,9 %	7,6 %	6,2-9,7 %
	Nível 4	3,37	5,4 %	4,1-7,7 %	6,5 %	5,3-8,5 %
C18:1	Nível 1	0,757	3,7 %	2,8-5,3 %	4,2 %	3,4-5,5 %
	Nível 2	2,26	4,1 %	3,1-5,8 %	5,6 %	4,4-7,9 %
	Nível 3	3,70	3,9 %	3,0-5,6 %	5,5 %	4,4-7,2 %
	Nível 4	5,25	5,1 %	3,9-7,4 %	5,7 %	4,7-7,4 %
C18:2	Nível 1	0,222	5,0 %	3,8-7,2 %	5,6 %	4,5-7,4 %
	Nível 2	0,408	3,5 %	2,7-5,1 %	5,6 %	4,3-8,2 %
	Nível 3	0,584	4,0 %	3,1-5,8 %	5,5 %	4,5-7,3 %
	Nível 4	0,771	4,5 %	3,4-6,4 %	5,3 %	4,3-6,9 %
C18OH	Nível 1	0,057	4,3 %	3,3-6,2 %	6,4 %	5,1-8,5 %
	Nível 2	0,084	7,8 %	5,9-11,2 %	8,3 %	6,8-10,6 %
	Nível 3	0,112	5,3 %	4,0-7,6 %	6,4 %	5,1-8,5 %
C18:1OH	Nível 1	0,022	6,8 %	5,2-9,9 %	7,4 %	6,0-9,5 %
	Nível 2	0,048	5,8 %	4,5-8,4 %	6,5 %	5,3-8,4 %
	Nível 3	0,063	5,2 %	4,0-7,5 %	6,1 %	4,9-8,1 %
C18:2OH	Nível 1	0,014	7,0 %	5,4-10,2 %	7,8 %	6,3-10,2 %
	Nível 2	0,025	5,2 %	4,0-7,5 %	7,1 %	5,7-9,5 %
	Nível 3	0,031	5,8 %	4,5-8,4 %	7,3 %	5,8-10,1 %
C20	Nível 1	0,027	5,9 %	4,5-8,5 %	6,8 %	5,5-8,8 %
	Nível 2	0,063	6,1 %	4,7-8,8 %	8,0 %	6,3-10,9 %
	Nível 3	0,103	4,8 %	3,7-7,0 %	7,5 %	6,0-10,1 %
C22	Nível 1	0,011	7,4 %	5,7-10,7 %	7,8 %	6,3-10,0 %
	Nível 2	0,021	6,8 %	5,2-9,8 %	7,2 %	5,9-9,3 %
	Nível 3	0,033	4,8 %	3,6-6,9 %	6,9 %	5,5-9,2 %
C24	Nível 1	0,021	5,8 %	4,4-8,4 %	6,8 %	5,5-8,9 %
	Nível 2	0,033	5,5 %	4,2-8,0 %	7,9 %	6,3-10,7 %
	Nível 3	0,049	6,5 %	5,0-9,4 %	7,5 %	6,1-9,7 %
C26	Nível 1	0,014	10,1 %	7,8-14,6 %	10,9 %	8,9-14,1 %
	Nível 2	0,025	5,8 %	4,5-8,4 %	6,2 %	5,1-8,0 %
	Nível 3	0,038	5,8 %	4,4-8,4 %	7,5 %	6,1-9,9 %
Cetona						
SUAC	Nível 1	0,451	4,6 %	3,5-6,6 %	6,7 %	5,1-9,7 %
	Nível 2	1,23	4,7 %	3,6-6,8 %	6,1 %	4,9-8,2 %
	Nível 3	2,04	5,0 %	3,8-7,2 %	5,4 %	4,4-6,9 %
Nucleosídeos						
Ado	Nível 1	1,79	4,3 %	3,3-6,2 %	4,7 %	3,8-6,1 %
	Nível 2	2,65	6,5 %	4,9-9,3 %	6,6 %	5,3-8,7 %
	Nível 3	3,43	5,5 %	4,2-7,9 %	6,4 %	5,1-8,6 %
dAdo	Nível 1	0,016	21,2 %	16,3-30,7 %	23,9 %	19,5-30,9 %
	Nível 2	0,046	11,0 %	8,4-15,9 %	14,8 %	11,9-19,5 %
	Nível 3	0,076	9,5 %	7,3-13,0 %	11,7 %	9,3-15,9 %

Substância	Amostra	Concentração media [μmol/L]	Repetibilidade		Precisão Intralaboratorial	
			Coefficiente de variação	Intervalo de 95% de confiança	Coefficiente de variação	Intervalo de 95% de confiança
Lisofosfolídeos						
C20:0 LPC	Nível 1	0,405	8,3 %	6,3–11,9 %	8,3 %	6,8–10,8 %
	Nível 2	0,521	6,3 %	4,8–9,1 %	8,3 %	6,5–11,6 %
	Nível 3	0,785	8,6 %	6,6–12,4 %	8,7 %	7,1–11,2 %
C22:0 LPC	Nível 1	0,386	8,8 %	6,8–12,8 %	11,0 %	8,7–15,1 %
	Nível 2	0,657	6,9 %	5,3–9,9 %	7,8 %	6,4–10,1 %
	Nível 3	0,909	6,5 %	5,0–9,4 %	7,3 %	5,9–9,6 %
C24:0 LPC	Nível 1	0,608	8,5 %	6,5–12,2 %	9,3 %	7,5–12,1 %
	Nível 2	1,23	4,7 %	3,6–6,7 %	6,6 %	5,1–9,4 %
	Nível 3	2,01	5,8 %	4,4–8,3 %	6,1 %	5,0–7,9 %
C26:0 LPC	Nível 1	0,333	9,6 %	7,3–13,9 %	10,3 %	8,4–13,2 %
	Nível 2	0,570	7,3 %	5,6–10,5 %	8,0 %	6,5–10,5 %
	Nível 3	0,966	7,3 %	5,6–10,5 %	7,8 %	6,4–10,0 %
Creatina e metabólitos relacionados						
CRE	Nível 1	79,4	3,8 %	2,9–5,6 %	4,3 %	3,5–5,7 %
	Nível 2	433	2,6 %	2,0–3,8 %	4,6 %	3,5–6,8 %
	Nível 3	1136	3,3 %	2,6–4,8 %	4,2 %	3,4–5,5 %
	Nível 4	1470	3,6 %	2,8–5,2 %	4,0 %	3,2–5,2 %
CRN	Nível 1	91,3	2,5 %	1,9–3,7 %	4,0 %	3,1–5,7 %
	Nível 2	140	3,2 %	2,5–4,6 %	3,9 %	3,2–5,1 %
	Nível 3	189	3,9 %	2,9–5,6 %	4,3 %	3,5–5,5 %
GAA	Nível 1	1,04	17,9 %	13,7–25,9 %	20,2 %	16,5–26,2 %
	Nível 2	2,69	6,5 %	5,0–9,3 %	6,6 %	5,4–8,5 %
	Nível 3	4,42	5,9 %	4,5–8,6 %	6,1 %	5,0–7,8 %
	Nível 4	7,43	5,3 %	4,1–7,7 %	6,4 %	5,1–8,4 %

Desvio

Para identificar qualquer desvio na concentração do analito ao longo do tempo, as concentrações de todos os analitos nas amostras de DBS investigadas foram comparadas durante todo o período do estudo. Nenhum desvio foi observado para nenhum analito.

Carry-over

Uma amostra de sangue total adulto preparada foi fortificada com concentrações de analito próximas ao limite superior de quantificação antes da produção do DBS e analisada entre vários picotes de papel de filtro em branco já processadas. As concentrações do analito nas amostras em branco, coletadas antes e depois da amostra de alta concentração, foram comparadas. No caso de carry-over significativo (> LLOQ), o valor foi calculado com base percentual em relação à amostra precedente. Foi observado carry-over para os seguintes analitos:

Tabela 29: Taxas de Carry-over

Substância	Taxa de Carry-over	
	Sistema Shimadzu Nexera UHPLC em combinação com SCIEX 4500MD™	Sistema ACQUITY™ UPLC® I-Class em combinação com Waters Xevo™ TQ-S micro
Aminoácidos		
Ala	< LLOQ	0,46 %
Arg	0,51 %	3,65 %
Asa	0,63 %	1,79 %
Cit	< LLOQ	0,28 %

Substância	Taxa de Carry-over	
	Sistema Shimadzu Nexera UHPLC em combinação com SCIEX 4500MD™	Sistema ACQUITY™ UPLC® I-Class UHPLC em combinação com Waters Xevo™ TQ-S micro
Gln	< LLOQ	0,43 %
Glu	< LLOQ	<LLOQ
Gly	< LLOQ	<LLOQ
Leu	< LLOQ	0,29 %
Met	< LLOQ	0,23 %
Orn	42,3 %*	26,9 %*
Phe	< LLOQ	0,32 %
Pro	0,24 %	2,03 %
Ser	< LLOQ	0,42 %
Tyr	< LLOQ	0,24 %
Val	< LLOQ	0,29 %
3-OMD	< LLOQ	<LLOQ
Carnitinas		
C0	0,25 %	0,19 %
C2	0,70 %	0,19 %
C3	0,33 %	0,18 %
C4OH	0,57 %	0,29 %
C4	< LLOQ	0,17 %
C5OH	0,55 %	0,17 %
C5	0,10 %	0,20 %
C5:1	0,19 %	0,19 %
C5DC	0,21 %	0,19 %
C6	0,29 %	0,25 %
C6DC	0,27 %	0,17 %
C8	0,13 %	0,22 %
C8:1	0,14 %	0,22 %
C10	0,14 %	0,17 %
C10:1	0,09 %	0,20 %
C10:2	< LLOQ	0,19 %
C12	0,08 %	0,15 %
C12:1	0,11 %	0,16 %
C14	0,11 %	0,13 %
C14:1	0,09 %	0,13 %
C14:2	< LLOQ	0,15 %
C14OH	0,09 %	0,15 %
C16	0,10 %	0,13 %
C16:1	0,05 %	0,14 %
C16OH	0,09 %	0,12 %
C16:1OH	0,08 %	0,15 %
C18	< LLOQ	0,12 %
C18:1	< LLOQ	0,13 %
C18:2	< LLOQ	0,14 %
C18OH	0,06 %	0,13 %
C18:1OH	0,11 %	0,15 %
C18:2OH	0,09 %	0,15 %
C20	0,05 %	<LLOQ
C22	0,04 %	<LLOQ
C24	0,04 %	0,18 %
C26	< LLOQ	0,24 %

Substância	Taxa de Carry-over	
	Sistema Shimadzu Nexera UHPLC em combinação com SCIEX 4500MD™	Sistema ACQUITY™ UPLC® I-Class UHPLC em combinação com Waters Xevo™ TQ-S micro
Cetonas		
SUAC	< LLOQ	0,36 %
Nucleosídeos		
Ado	< LLOQ	0,23 %
dAdo	0,09 %	0,21 %
Lisofosfolídeos		
C20:0 LPC	< LLOQ	<LLOQ
C22:0 LPC	< LLOQ	<LLOQ
C24:0 LPC	< LLOQ	<LLOQ
C26:0 LPC	< LLOQ	<LLOQ
Creatina e metabólitos relacionados		
CRE	0,09 %	0,22 %
CRN	< LLOQ	<LLOQ
GAA	< LLOQ	1,79 %

***Nota importante:**

Devido à alta taxa de carry-over da ornitina, pode ser necessário reinjetar amostras analisadas após aquelas com altas concentrações de ornitina, pois, caso contrário, estas poderiam apresentar falsos aumentos de concentração.

Robustez

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

Tabela 30: Intervalos de tolerância do sistema HPLC – volume de injeção

Sistema HPLC	Intervalo de tolerância
Volume de injeção*	5 a 15 µL

* Dependendo do volume de injeção, o gradiente de fluxo deve ser otimizado de acordo.

Tabela 31: Faixas de tolerância do sistema HPLC - gradiente

Sistema de HPLC – gradiente				
Tempo**	0,01 min a 0,20 min	0,21 min a 1,21 min	1,22 min a 1,69 min	1,70 min
Taxa de fluxo	200 µL/min	20 µL/min	600 µL/min	600 µL/min
Faixas de tolerância	—	15 µL/min	600 µL/min	-
		25 µL/min	1000 µL/min	

** Devido aos diferentes volumes mortos de cada sistema HPLC, o perfil do gradiente pode precisar ser modificado. O ajuste do tempo é indicado caso o cromatograma apresente picos inadequados ou um platô (para um exemplo, ver o capítulo 12).

Tabela 32: Faixas de tolerância para o preparo da amostra

Preparo de Amostra	Faixa de tolerância
1º Extração (capítulos 5.6.1/5.6.2, passo 2)	
Tempo de incubação	15 a 25 min
Velocidade de agitação	500 a 700 rpm
1º Extração (capítulos 5.6.1, passo 3)	
Velocidade de centrifugação	2200 x g por 10 min 2500 x g a 3000 x g por 5 min
2º Extração (Succinilacetona) (capítulos 5.6.1/5.6.2, passo 4)	
Temperatura de extração	40 a 50 °C
Tempo de incubação	25 a 35 min
Velocidade de agitação	300 a 500 rpm
2º Extração (Succinilacetona) (capítulos 5.6.1, passo 5)	
Velocidade de centrifugação	2200 x g por 5 min 2500 x g a 3000 x g por 2 min
Incubação (capítulos 5.6.1/5.6.2, passo 6)	
Condições de incubação	45 a 60 min a 45°C e 400 rpm 8 h a +20 a +25 °C sem agitação 8 h a +2 a +8 °C sem agitação

Os dados de desempenho analítico apresentados neste apêndi foram estabelecidos em nosso laboratório unicamente para verificar o desempenho do ensaio e atender aos requisitos regulatórios. Salientamos, de forma particular, que estes dados não são adequados para comparar os sistemas de medição utilizados, nem para fazer qualquer declaração sobre o seu desempenho em geral.

Anexo III Dados de desempenho clínico

Os parâmetros de desempenho clínico foram estabelecidos durante testes de rotina no Screening-Labor Hannover utilizando o ensaio 57075-F-ADO, de acordo com a sua finalidade pretendida. A população-alvo consistiu em recém-nascidos da Alemanha, que foram avaliados em conformidade com os regulamentos locais [4] em um esquema de triagem expandida, como parte de um estudo de viabilidade.

Com base na experiência de testes de rotina anteriores e nos percentis determinados para recém-nascidos não afetados no mesmo laboratório, utilizando o ensaio 57075-F-ADO, os seguintes valores de corte foram definidos e as regras de classificação foram estabelecidas.

Tabela 33: Resumo dos Valores de Corte e Regras Aplicadas na Nossa Avaliação de Desempenho Clínico

Analito ou Razão	Cut-off	Regra de Classificação: repetição acionada/classificação positiva...
Asa	0,756 µmol/L	alterado como parâmetro único
Cit	56,9 µmol/L	alterado como parâmetro único†
XLeu	347 µmol/L	alterado como parâmetro único
Met	52,9 µmol/L	alterado como parâmetro único + teste de 2ª etapa
Met _{baixo}	7,86 µmol/L	alterado como parâmetro único + teste de 2ª etapa
Phe	147 µmol/L	alterado como parâmetro único
Tyr	284 µmol/L	alterado como parâmetro único
Val	262 µmol/L	alterado somente se o XLeu também estiver alterado
3-OMD	2,41 µmol/L	alterado como parâmetro único
SUAC	1,21 µmol/L	alterado como parâmetro único
Phe/Tyr	2,90	alterado como parâmetro único
XLeu/Phe	4,28	alterado somente se o XLeu também estiver alterado
C0	61,7 µmol/L	somente se Cxtotal + C0/(C16+C18) estiverem alteradas
C0 _{baixo}	6,70 µmol/L	como parâmetro único (+ potencialmente teste de 2ª etapa)
C2	70,0 µmol/L	apenas informativo
C3	5,30 µmol/L	como parâmetro único (+ potencialmente teste de 2ª etapa)
C3DC&C4OH	0,622 µmol/L	como parâmetro único (+ potencialmente teste utilizado)
C4	1,27 µmol/L	alterado como parâmetro único
C4DC&C5OH	0,944 µmol/L	alterado como parâmetro único (+ potentially butylated test)
C5	0,539 µmol/L	alterado como parâmetro único + 2nd tier test
C5DC&C6OH	0,370 µmol/L	alterado como parâmetro único (+ potentially butylated test)
C5:1	0,051 µmol/L	somente se C5OH estiver alterado
C6	0,192 µmol/L	somente se C8 estiver alterado
C6DC	0,340 µmol/L	apenas informativo
C8	0,252 µmol/L	alterado como parâmetro único
C10	0,433 µmol/L	somente se C8 estiver alterado
C10:1	0,121 µmol/L	somente se C8 estiver alterado
C12	0,312 µmol/L	somente se C14:1 estiver alterado
C12:1	0,331 µmol/L	apenas informativo
C14	1,01 µmol/L	apenas se as razões que incluam C14, C14:1, C14:2 ou um dos compostos entre C12 e C16 estiverem anormais
C14:1	0,404 µmol/L	alterado como parâmetro único
C14:2	0,059 µmol/L	alterado como parâmetro único
C14OH	0,043 µmol/L	somente se C16OH estiver alterado
C16	8,59 µmol/L	apenas informativo
C16 _{baixo}	1,32 µmol/L	somente se C0/(C16+C18) estiver alterado
C16OH	0,144 µmol/L	alterado como parâmetro único
C18	2,12 µmol/L	apenas informativo
C18 _{baixo}	0,311 µmol/L	somente se C0/(C16+C18) estiver aumentado

Analito ou Razão	Cut-off	Regra de Classificação: repetição acionada/classificação positiva...
C18:1	3,59 µmol/L	apenas informativo
C18:1 _{low}	0,587 µmol/L	somente se C0/(C16+C18) estiver aumentado
C18:2	0,424 µmol/L	apenas informativo
C18:2 _{low}	0,036 µmol/L	somente se C0/(C16+C18) estiver aumentado
C18OH	0,105 µmol/L	alterado como parâmetro único
C18:1OH	0,039 µmol/L	alterado como parâmetro único
C18:2OH	0,024 µmol/L	apenas informativo
total Cx*	142 µmol/L	somente se C0/(C16+C18) estiver aumentado
total Cx _{low} *	20,6 µmol/L	apenas informativo
C3/C2	0,212	somente se C3 estiver alterado
C3/C16	1,48	somente se C3 estiver alterado
C4DC&C5OH/C0	0,057	apenas informativo
C4DC&C5OH/C2	0,048	apenas informativo
C4DC&C5OH/Xleu	0,009	apenas informativo
C5/C2	0,037	somente se C5 estiver alterado
C5DC&C6OH/C0	0,027	somente se C5DC estiver alterado
C5DC&C6OH/C2	0,020	somente se C5DC estiver alterado
C5DC&C6OH/C8	6,39	somente se C5DC estiver alterado
C5DC&C6OH/C16	0,113	somente se C5DC estiver alterado
C8/C2	0,012	somente se C8 estiver alterado
C8/C10	1,35	somente se C8 estiver alterado
C8/C12	2,00	somente se C8 estiver alterado
C14:1/C2	0,021	somente se C14:1 estiver alterado
C14:1/C4	2,17	somente se C14:1 estiver alterado
C14:1/C6	7,36	somente se C14:1 estiver alterado
C14:1/C8	6,25	somente se C14:1 estiver alterado
C0/(C16+C18)	48,0	alterado como parâmetro único
(C16+C18:1)/C2	1,09	alterado como parâmetro único
C14:1/C12:1	4,04	somente se C14:1 estiver alterado

* total Cx = C0 + C2 + C3 + C3DC&C4OH + C4 + C4DC&C5OH + C5 + C5DC&C6OH + C5:1 + C6 + C6DC + C8 + C10 + C10:1 + C12 + C12:1 + C14 + C14OH + C14:1 + C14:2 + C16 + C16OH + C16:1 + C18 + C18:1 + C18:2

†Por favor, note que a utilização de níveis diminuídos de Cit como parâmetro único para a triagem de distúrbios do ciclo da ureia (NAGS, OTC, CPS) foi descrita como tendo baixa especificidade e provavelmente baixa sensibilidade, pelo menos para a OTC de início tardio [15].

A Tabela 34 resume o número de resultados de triagem verdadeiros negativos, falsos negativos, verdadeiros positivos e falsos positivos para todos os marcadores de triagem investigados, combinados. Os parâmetros de desempenho clínico do ensaio Chromsystems são apresentados na Tabela 35.

Tabela 34: Classificação das amostras de recém-nascidos triados.

	Recém-nascidos não afetados	Recém-nascidos afetados	Total
Triagem Final Negativa	1485 (verdadeiro negativo)	0 (falso negativo)	1485
Triagem Final Positiva	93 (falso positivo)	67 (verdadeiro positivo*)	160
Total	1578	67	1645#

Das 1645 amostras, 179 foram inicialmente positivas na triagem após avaliação da primeira amostra de sangue seco (DBS) (o que corresponde a uma taxa de repetição teórica de 10,9%). Não foi possível repetir a medida para 86 delas devido à falta de material. Estas foram consideradas positivas na triagem final. Das 93 amostras restantes, uma segunda amostra de DBS foi processada. 19 destas foram negativas na triagem final e 74 foram positivas na triagem final.

* ver tabela 36 para os distúrbios-alvo identificados

Tabela 35: Parâmetros de desempenho clínico do ensaio Chromsystems 57075-F-ADO. Dados combinados para todos os alvos e analitos investigados.

Parâmetro de Desempenho Clínico	Valor
Sensibilidade	100.00%
Especificidade	94.11%

Além da avaliação geral do desempenho clínico, o desempenho para distúrbios-alvo individuais foi avaliado quando amostras positivas foram obtidas. A tabela a seguir mostra os marcadores específicos para Erros Inatos do Metabolismo (EIM), os pontos de corte e as regras de classificação aplicados, bem como os parâmetros relevantes selecionados para esses distúrbios.

Tabela 36: Sumário dos parâmetros de desempenho clínico para a triagem específica de EIM.

FP: falso positivo; **TN:** verdadeiro negativo; **TP:** verdadeiro positivo; **FN:** falso negativo; *: os valores dependem da prevalência da doença; **Note** que a prevalência da doença fornecida é a da população geral, não a da população investigada, na qual as amostras positivas foram enriquecidas. **3MCC:** Deficiência de 3-metilcrotonil-CoA carboxilase; **AC:** Acilcarnitina(s); **ASA:** Acidúria argininosuccínica; **AADCD:** Deficiência de aromática L-aminoácido descarboxilase; **CACT:** Deficiência de translocase carnitina-acilcarnitina; **CPT I:** Deficiência de carnitina palmitoiltransferase tipo I; **CPT II:** Deficiência de carnitina palmitoiltransferase tipo II; **CUD:** Defeito de captação/transporte de carnitina; **GA 1:** Acidemia glutéica tipo I; **GA 2:** Deficiência de múltiplas acil-CoA desidrogenases (MAD) / Acidemia glutéica tipo II; **HPHE:** Hiperfenilalaninemia (benigna); **EIM:** Erro Inato do Metabolismo; **LCHAD:** Deficiência de hidroxilacil-CoA desidrogenase de cadeia longa; **MCAD:** Deficiência de acil-CoA desidrogenase de cadeia média; **MUT:** Acidemia metilmalônica; **PKU:** Fenilcetonúria clássica; **PA/PROP:** Acidemia propiônica; **TFP:** Deficiência da proteína trifuncional (mitocondrial); **TYR III:** Tirosinemia tipo III; **VLCAD:** Deficiência de acil-CoA desidrogenase de cadeia muito longa.

EIM Alvo	Marcadores/Regras Aplicadas	Classificação	Desempenho Clínico Específico do EIM
3MCC	C5OH deve estar aumentado (C5:1 e C0 baixo apenas informativos)	FP: 3	Sensibilidade: 100.00 %
		TN: 1640	Especificidade: 99.82 %
		TP: 5	Prevalência da Doença: 0.0023 % [16]
		FN: 0	Valor Preditivo Positivo*: 1.24 %
AADCD	3-OMD deve estar aumentado	FP: 13	Sensibilidade: 100.00 %
		TN: 1635	Especificidade: 99.21 %
		TP: 1	Prevalência da Doença: 0.000077 % [17]
		FN: 0	Valor Preditivo Positivo*: 0.01 %
ASA	Asa e Cit devem estar aumentados	FP: 0	Sensibilidade: 100.00 %
		TN: 1647	Especificidade: 100.00 %
		TP: 2	Prevalência da Doença: 0.0014 % [18]
		FN: 0	Valor Preditivo Positivo*: 100.00 %
CPT I	C0/(C16+C18) deve estar acima do ponto de corte alto e pelo menos um dos seguintes abaixo do ponto de corte baixo: C16 baixo , C18 baixo , C18:1 baixo , C18:2 baixo	FP: 4	Sensibilidade: 100.00 %
		TN: 1644	Especificidade: 99.76 %
		TP: 1	Prevalência da Doença: 0.00013 % [19]
		FN: 0	Valor Preditivo Positivo*: 0.05 %
CPT II e CACT	(C16+C18:1)/C2 deve estar acima do ponto de corte alto e C6-C8 devem ser normais	FP: 14	Sensibilidade: 100.00 %
		TN: 1628	Especificidade: 99.15 %
		TP: 1	Prevalência da Doença: 0.0000065 % [20]
		FN: 0	Valor Preditivo Positivo*: 0.00 %

EIM Alvo	Marcadores/Regras Aplicadas	Classificação	Desempenho Clínico Específico do EIM	
CUD	C0 baixo (Cx total ^{baixo} só é considerado positivo em combinação com C0 baixo)	FP: 3	Sensibilidade:	100.00 %
		TN: 1644	Prevalência da Doença:	99.82 %
		TP: 1	Sensibilidade:	0.0022 % [21]
		FN: 0	Especificidade:	1.19 %
GA 1	C5DC deve estar acima do ponto de corte	FP: 0	Prevalência da Doença:	100.00 %
		TN: 1646	Valor Preditivo Positivo*:	100.00 %
		TP: 3	Sensibilidade:	0.00083 % [22]
		FN: 0	Especificidade:	100.00 %
GA 2	Pelo menos uma acilcarnitina de cadeia curta ou média (C4, C5, C8) e uma de cadeia mais longa (C14:1 ou C14:2) devem estar aumentadas	FP: 0	Prevalência da Doença:	100.00 %
		TN: 1648	Sensibilidade:	100.00 %
		TP: 1	Prevalência da Doença:	0.00040 % [23]
		FN: 0	Especificidade:	100.00 %
LCHAD e TFP	Pelo menos dois dos seguintes analitos devem estar alterados: C16OH, C14, C18OH, C18:1OH, C14:1 (2x o ponto de corte), C14:2 (2x o ponto de corte)	FP: 0	Prevalência da Doença:	100.00 %
		TN: 1642	Sensibilidade:	100.00 %
		TP: 4	Prevalência da Doença:	0.00053 % [24]
		FN: 0	Especificidade:	100.00 %
MCAD	C8 deve estar aumentado (C6, C10, C10:1 só são considerados positivos se C8 estiver alterado)	FP: 3	Prevalência da Doença:	100.00 %
		TN: 1628	Sensibilidade:	99.82 %
		TP: 17	Prevalência da Doença:	0.020 % [25]
		FN: 0	Valor Preditivo Positivo*:	9.81 %
MSUD	XLeu deve estar acima do ponto de corte alto	FP: 4	Sensibilidade:	100.00 %
		TN: 1644	Especificidade:	99.76 %
		TP: 1	Prevalência da Doença:	0.00067 % [26]
		FN: 0	Valor Preditivo Positivo*:	0.28 %
PA/PROP	C3 deve estar aumentado	FP: 5	Sensibilidade:	100.00 %
		TN: 1640	Especificidade:	99.70 %
		TP: 4	Prevalência da Doença:	0.0010 % [27]
		FN: 0	Valor Preditivo Positivo*:	0.33 %
PKU e HPHE	Pelo menos um dos seguintes deve estar alterado: Phe ou a razão Phe/Tyr	FP: 10	Sensibilidade:	100.00 %
		TN: 1621	Prevalência da Doença:	98.96 %
		TP: 17	Valor Preditivo Positivo*:	0.014 % [28]
		FN: 0	Sensibilidade:	1.33 %
TYR I	SUAC deve estar acima do ponto de corte	FP: 7	Especificidade:	100.00 %
		TN: 1639	Prevalência da Doença:	99.57 %
		TP: 3	Valor Preditivo Positivo*:	0.00091 % [29]
		FN: 0	Sensibilidade:	0.21 %

EIM Alvo	Marcadores/Regras Aplicadas	Classificação	Desempenho Clínico Específico do EIM	
TYR II e TYR III	Tyr deve estar aumentado e SUAC deve estar normal	FP: 12	Sensibilidade:	100.00 %
		TN: 1633	Prevalência da Doença:	99.27 %
		TP: 1	Valor Preditivo Positivo*:	0.00040 % [30,31]
		FN: 0	Sensibilidade:	0.05 %
VLACD	C14:1 ou C14:2 deve estar pelo menos 2x acima do ponto de corte	FP: 0	Especificidade:	100.00 %
		TN: 1645	Valor Preditivo Positivo*:	100.00 %
		TP: 3	Sensibilidade:	0.0020 % [32]
		FN: 0	Especificidade:	100.00 %

A tabela a seguir resume os valores dos marcadores determinados em recém-nascidos afetados e não afetados em nosso estudo de avaliação de desempenho clínico.

Tabela 37: Resumo das concentrações dos marcadores em $\mu\text{mol/L}$ e razões em $[(\mu\text{mol/L})/(\mu\text{mol/L})]$ determinadas para recém-nascidos afetados e não afetados. EIM: Erro Inato do Metabolismo; Min: mínimo, Max: máximo, conc: concentração.

EIM Alvo	Marcador	Afetados				Não afetados			
		Conc. min	Conc. max	Conc. mediana	Conc. média	Conc. min	Conc. max	Conc. mediana	Conc. média
3MCC	C0	5,20	102	15,4	31,6	3,98	207	20,4	23,3
	C5OH	5,34	17,3	10,6	10,2	0,024	1,89	0,272	0,291
	C5:1	0,004	0,069	0,017	0,030	0,000	0,092	0,013	0,014
AADCD	3OMD	11,3	11,3	11,3	11,3	0,401	14,1	1,09	1,18
ASA	Asa	72,9	190	161	141	0,105	3,93	0,334	0,356
	Cit	91,7	187	92,0	124	1,06	85,7	12,7	14,1
CPT I	C16	0,074	0,074	0,074	0,074	0,118	10,1	3,41	3,48
	C18	0,077	0,077	0,077	0,077	0,087	2,85	0,796	0,835
	C18:1	0,116	0,116	0,116	0,116	0,128	4,32	1,50	1,57
	C18:2	0,063	0,063	0,063	0,063	0,013	0,665	0,111	0,134
	C0/(C16+C18)	53,1	53,1	53,1	53,1	1,74	98,3	4,74	6,70
CPT II e CACT	(C16+C18:1)/ C2	15,3	15,3	15,3	15,3	0,047	15,4	0,233	0,290
	C6	0,023	0,023	0,023	0,023	0,006	3,14	0,054	0,076
	C8	0,030	0,030	0,030	0,030	0,004	27,6	0,047	0,166
CUD	C0	4,98	4,98	4,98	4,98	3,980	207	20,4	23,4
	Cxtotal	8,68	8,68	8,68	8,68	6,818	278	51,3	55,7
GA 1	C5DC	1,30	1,88	1,73	1,64	0,013	0,430	0,119	0,126
GA 2	C4	0,668	0,668	0,668	0,668	0,007	2,08	0,203	0,237
	C5	0,949	0,949	0,949	0,949	0,008	14,2	0,091	0,147
	C8	0,759	0,759	0,759	0,759	0,004	27,6	0,047	0,165
	C14:1	0,534	0,534	0,534	0,534	0,010	5,11	0,102	0,126
	C14:2	0,054	0,054	0,054	0,054	0,004	0,313	0,020	0,022

EIM Alvo	Marcador	Afetados				Não afetados			
		Conc. min	Conc. max	Conc. mediana	Conc. média	Conc. min	Conc. max	Conc. mediana	Conc. min
LCHAD e TFP	C14	0,099	1,33	0,534	0,714	0,015	0,900	0,211	0,229
	C16OH	0,149	3,53	0,247	1,30	0,002	0,099	0,024	0,026
	C18OH	0,120	3,07	0,257	0,855	0,000	0,068	0,019	0,020
	C18:1OH	0,067	1,16	0,093	0,395	0,002	0,050	0,020	0,020
	C14:1	0,042	1,46	0,592	0,657	0,010	0,805	0,102	0,121
	C14:2	0,022	0,192	0,058	0,077	0,004	0,106	0,020	0,021
MCAD	C6	0,397	3,14	1,50	1,62	0,006	0,352	0,054	0,059
	C8	1,82	27,6	8,82	10,1	0,004	0,601	0,046	0,053
	C10	0,250	2,88	1,27	1,19	0,008	0,980	0,075	0,088
	C10:1	0,146	1,41	0,645	0,623	0,008	0,165	0,041	0,044
MSUD	Xleu	539	539	539	539	25,1	447	110	118
PA/ PROP	C3	5,75	27,2	8,17	11,1	0,027	7,22	1,52	1,65
PKU e HPHE	Phe	172	974	328	372	18,5	169	51,2	53,2
	Phe/Tyr	0,969	22,2	3,48	7,42	0,083	5,06	0,663	0,707
TYR I	SUAC	2,22	15,0	12,0	9,72	0,404	1,35	0,738	0,744
TYR II e TYR III	TYR	711	711	711	711	10,4	1090	77,8	89,3
	SUAC	0,907	0,907	0,907	0,907	0,404	15,0	0,738	0,758
VLACD	C14:1	1,27	5,11	1,51	2,63	0,010	0,805	0,102	0,122
	C14:2	0,137	0,313	0,155	0,202	0,004	0,106	0,020	0,021

Por favor, note que os erros inatos do metabolismo que são detectados por este teste de triagem neonatal são extremamente raros e considerados doenças raras (doenças órfãs). Portanto, não foi possível incluir amostras positivas de todos os erros inatos do metabolismo alvo em nossa avaliação de desempenho clínico neste momento. Consulte a página 1 deste manual de instruções para obter informações sobre como e onde relatar incidentes. Para reclamações ou para relatar experiências clínicas com o uso do nosso teste em recém-nascidos com uma doença rara, entre em contato pelo e-mail support@chromsystems.com.

Anexo IV Erros inatos do metabolismo e seus marcadores

Na tabela a seguir, resumimos os possíveis marcadores dos distúrbios-alvo da triagem neonatal baseada em FIA-MS/MS descritos na literatura.

As fontes dos dados fornecidos estão listadas diretamente abaixo da tabela. Por favor, note que, em alguns casos, a literatura não usou especificamente os termos "primário", "secundário" ou "informativo" para distinguir os marcadores. Nesses casos, atribuímos a classificação dos marcadores com base nas informações fornecidas nas publicações.

Tabela 38: Erros inatos do metabolismo e seus marcadores

Abreviação (OMIM*)	Alvo da Triagem	Marcador Primário/razão	Marcador secundário ou Informativo/razão
2M3HBA (300438)	Acidúria/acidemia 2-metil-3-hidroxibutírica	C5OH ¹⁻¹² , C5:1 ^{2,4,5,8,10-12}	C5OH/C8 ^{1,2,5,6,8,11} , C5OH/C0 ^{2,5,8} , C4OH ¹¹
2MBG (610006)	2-Metilbutirilglicínúria/ Deficiência de Acil-CoA desidrogenase de cadeia curta/ ramificada	C5 ^{1-6,8-14}	C5/C0 ^{1,2,5,6,8,11,14} , C5/C2 ^{1,2,5,6,8,11} , C5/C3 ^{1,2,5,6,8,11} , C5/C8 ⁸
3MCC (210200; 210210)	Deficiência de carboxilase do 3- Metilcrotonil-CoA (pode incluir o materno)	C5OH ^{9-12,14} , C0 ¹¹ , C5:1 ⁴	C5OH/C8 ¹¹ , C5OH/C0 ^{11,14} , (C0+C2+C3+C16+C18:1+C18)/Cit ⁸ tipo
3MGA (250950)	Acidúria/Acidemia 3- Metilglutacônica tipo I	C5OH ¹⁻¹⁴	C5OH/C8 ^{1,2,5,6,8,11} , C5OH/C0 ^{2,5,8,14}
AADCD (608643)	Deficiência de descarboxilase de Laminoácidos aromáticos	3-OMD ¹⁵	
ADA-SCID (102700)	Imunodeficiência combinada severa por deficiência de adenosina deaminase	Ado ⁷ , dAdo ⁷	
AGAT (612718)	Deficiência de arginina:glicina amidinotransferase	GAA ^{low/lownormal} ¹⁶	
AGS1 - AGS8 610181; 610329; 610333; 612952; 615010; 615846; 619486; 619487)	Síndrome de Aicardi-Goutières	C26:0 LPC ¹⁷⁻¹⁹	C24:0 LPC ¹⁷ , C22:0 LPC ¹⁷ , C20:0 LPC ¹⁷ , C26:0 (25750; LPC/C20:0 LPC ¹⁸ , C26 ^{18,19} , C26/C22 ¹⁹ , C26:1 ¹⁹
ALD (300100)	Adrenoleucodistrofia ligada ao X	C26:0 LPC ^{17,20}	C24:0 LPC ¹⁷ , C22:0 LPC ¹⁷ , C20:0 LPC ¹⁷ , C26:0 LPC/C20:0 LPC ¹⁸ , C26 ^{18,20} , C2420, C26/C2220, C24/C2220
ARG (207800)	Argininemia	Arg ^{1,2,5-9,11-14}	Arg/Orn ^{2,8,12,14} , Arg/Ala ⁵ , Arg/Phe ^{5,8,14} , Cit/Arg ^{low} 5,11
ASA (207900)	Acidemia argininosuccínica	Cit ^{1,2,5,6,9-14,21} , Asa ^{2,5,7,8,11,12}	Cit/Arg ^{1,2,5,6,8,11} , Cit/Phe ^{2,5,8} , Asa/Arg ^{2,5,8,11} , Cit ⁷ , Cit/Tyr ⁸ , Ala/Cit ^{low} ¹⁴
B12 def (mat)	Deficiência de B12 (materna)	C3 ^{2,5} , C17 ²	C3/C2 ^{2,5} , C3/C16 ^{2,5} , C3/Met ^{2,5} , C4/C3 ^{low} ⁵ , C5/C3 ^{low} ⁵

Abreviação (OMIM*)	Alvo da Triagem	Marcador Primário/ razão	Marcador secundário ou Informativo/razão
BIOPT (BS) (261640)	Defeitos na Biopterina na Biossíntese do Cofator	Phe ^{1,2,5-11,13,14}	Phe/Tyr ^{1,2,5-8,11,13,14} , Phe/XLeu ² , Tyr _{low/n} ⁷
BIOPT (REG) (261630)	Defeito na Biopterina na Regeneração do Cofator	Phe ^{1,2,5-11,13,14}	Phe/Tyr ^{1,2,5-8,11,13,14} , Phe/XLeu ² , Tyr _{low/n} ⁷
BIOT (253260)	Deficiência de Biotinidase	C5OH ³⁻⁵ , C3 ⁴	C3/C2 ⁴
BKT (203750)	Deficiência de beta-Cetotilase/ Deficiência de 3-oxotilase	C5:1 ¹⁻¹⁴ , C5OH ^{1-6,8-14} , C4OH ^{2,5,11}	C5OH/C8 ^{1,2,5,6,8,11} , C5OH/C0 ^{2,5,8} , C5OH _{high/n} ⁷
CACT (212138)	Deficiência da Translocase carnitine-acilcarnitina	C16 ^{1-12,14} , C18:2 ^{1-6,8,10,12} , C18:1 ^{1-6,8,10,12} , C14 ^{2,4,5,8,11} , C16:1 ^{2,4,8,12} , C2 _{low} ² , C12 ⁵ , C18OH ⁵	C0/(C16+C18) ^{1,2,6,8} , (C16+C18:1)/C2 ^{2,4,5,14} , C3/C16 _{low} ² , C0/(C16+C18) _{low} ^{4,5,14} , C18/C3 ⁸
Cbl A,B (251100; 251110)	Acidemia Metilmalônica (distúrbios Cbl A,B)	C3 ^{1,2,5-12,14} , C17 ² , C16:1OH ⁵ , C4DC ⁸	C3/C2 ^{1,2,5,6,8,11,12,14} , C3/C16 ^{1,2,5-8,11,12} , C3/C0 ^{2,7,8} , C3/Met ^{2,5} , C4/C3 _{low} ⁵ , C5/C3 _{low} ⁵ , Gly ⁷ , C3/C4 ⁷
Cbl C,D (277400; 277410)	Acidemia Metilmalônica com Homocistinúria (Cbl C, D)/ acidemia metilmalônica (mutase metilmalonil-CoA e proteína metiltransferase homocisteína: MTHF/ MMADHC)	C3 ^{1,2,5-14} , C17 ² , C4DC ⁸	C3/C2 ^{1,2,5,6,8,11,12,14} , C3/C16 ^{1,2,5-8,11,12} , C3/Met ^{1,2,5,6,8} , C4/C3 _{low} ⁵ , Met ^{7,8} , C16:1OH ⁷ , C3/C0 ^{7,8} , C3/C4 ⁷ , Met/Phe ⁸ 277410)
Cbl D v1 (277410)	Deficiência de Metilcobalamina tipo cblDv1	Met ¹¹	Met/Cit _{low} ⁵ , Met/Tyr _{low} ⁵ , Met/XLeu _{low} ⁵ , Met/Phe ¹¹
Cbl E (236270)	Deficiência de Metilcobalamina tipo cblE	Met _{low} ^{5,8,11}	Met/Cit _{low} ⁵ , Met/Phe _{low} ^{5,8,11} , Met/Tyr _{low} ⁵ , Met/XLeu _{low} ^{5,8} , C3/Met ⁵
Cbl F (277380)	Acidemia Metilmalônica com homocistinúria, tipo cblF	C3 ^{2,13,14}	C3/C16 ² , C3/C2 ^{2,14}
Cbl G (250940)	Deficiência de Metilcobalamina tipo cblG	Met _{low} ^{5,8,11}	Met/Cit _{low} ⁵ , Met/Phe _{low} ^{5,8,11} , Met/Tyr _{low} ⁵ , Met/XLeu _{low} ^{5,8} , C3/Met ⁵
CIT I (215700)	Citrulinemia tipo I	Cit ^{1,2,5-11,13,14,21}	Cit/Arg ^{1,2,5,6,8,11} , Cit/Phe ^{2,5,8} , Met/Cit _{low} ² , Gln/Cit _{low} ⁵ , Glu/Cit _{low} ⁵ , Cit/Tyr ⁸ , Ala/Cit _{low} ¹⁴
CIT II (605814)	Citrulinemia tipo II	Cit ^{1,2,5-11} , Arg ^{8,11} , Met ¹¹ , Thr ^{8,11}	Cit/Arg ^{1,2,5,6,8} , Cit/Phe ^{2,5,8} , Met/Cit _{low} ² , Orn/Cit _{low} ² , Glu/Cit _{low} ⁵ , Arg/Phe ⁸ , Cit/Tyr ⁸ , Ala/Cit _{low} ¹⁴
CPS (608307; 237300)	Deficiência da Sintetase do carbamoil fosfato	Cit _{low} ^{2,5,8,9,14} , Gln ⁵ , Glu ⁵ , Arg _{low} ⁵	Glu/Cit ^{2,5} , Met/Cit ^{2,5} , Ala/Cit ² , Gln/Cit ^{2,5} , Cit/Phe _{low} ^{2,5,8,14} , Cit/Arg _{low} ^{5,8} , ACs/Cit ⁵ , Cit/Tyr ⁸ , Orn/Cit ⁸ , ácido orótico ²
CPT Ia (255120)	Deficiência da Carnitina Palmitoil-transferase tipo Ia	C0 ^{1-6,8,10,11,14} , C16 _{low} ^{1-9,11} , C18 _{low} ^{1-8,11} , C18:1 _{low} ^{2,4,5,8} , C18:2 _{low} ^{2,4,5,8} , C16:1 _{low} ⁴	C0/(C16+C18) ^{1,2,4,5,7,8,11,14} (dentro dos 10 dias de vida), C3/C16 ^{2,5} , (C16+C18:1)/C2 _{low} ^{2,5,14} , C0 _{high/n} ⁷ , C0/C16 ⁸ , C0/C18 ⁸

Abreviação (OMIM*)	Alvo da Triagem	Marcador Primário/ razão	Marcador secundário ou Informativo/razão
CPT II (255110; 608836; 600649)	Deficiência de carnitina Palmitoil-transferase tipo II	C16 ^{1-11,13,14} , C18:2 ^{1-6,8,10} , C18:1 ^{1-8,10} , C18 ^{1-6,8,10,11,13} , C14 ^{2,4,5,8,11} , C16:1 ^{2,4,8} , C2 _{low} ^{2,5} , C12 ⁵ , C0 _{low} ¹³	C0/(C16+C18) ^{1,2,6,8} , (C16+C18:1)/C2 ^{2,4,5,7,11,14} (dentro dos 10 dias de vida ⁷), C3/C16 _{low} ² , C0/(C16+C18) _{low} ^{4,5,14} , C2 _{low} ⁷ , C18/C3 ⁸
CUD (212140)	Defeito de captação/transporte de carnitina (pode incluir tipo materno)	C0 ^{1,6-11} , C0 _{low} ^{2-5,13,14} , C2 _{low} ^{2,4,5,8} , C3 _{low} ^{2,5} , C16 _{low} ^{2,5,8,13} , C18 _{low} ^{2,5,8,13} , C18:1 _{low} ^{2,5,8} , outras espécies de AC geralmente baixas ⁴ , C18:2 ⁸	(C0+C2+C3+C16+C18:1)/Cit ^{1,6,11} , C3/Met _{low} ^{2,5} , ACs/Cit _{low} ⁵ , Ctot _{low} ⁷ , (C0+C2+C3+C16+C18:1+C18)/Cit _{low} ^{2,8,11,14} , C3+C16 ⁸
DDCH/CADDS (300475)	Síndrome de Deleção Contígua ABCD1 DXS1357E	C26:0 LPC ¹⁷	C24:0 LPC ¹⁷ , C22:0 LPC ¹⁷ , C20:0 LPC ¹⁷
DE RED (616034)	Deficiência de 2,4-dienoil-CoA redutase/deficiência de dienoil-CoA redutase causada por deficiência de NAD kinase 2 mitocondrial	C10:2 ^{1,2,4-6,8,9,11,12}	C10:2/C10 ^{1,6} , Lys ^{8,11}
ECHS1D (616277)	Deficiência de hidratase enoil-CoA de cadeia curta	C5:1 ²² , C4OH/C3DC ²²	C2 _{low} ²²
EE (602473)	Encefalopatia etilmalônica	C4 ^{1-6,8,9,14} , C5 ^{1-6,8,9}	Todas as razões são aplicáveis aos marcadores primários ^{1,6} , C4/C3 ^{2,5,8,14} , C4/C2 ^{2,5,8,14} , C5/C3 ^{2,5,8} , C4/C8 ^{5,8} , C5/C0 ^{5,8} , C5/C2 ^{5,8} , C5/C8 ⁸
EMPF 1/EMPF 2 (617086)	Defeitos de fissão peroxissomal/ encefalopatia por fissão mitocondrial e peroxissomal defeituosa	-	C26:0 LPC ¹⁷ , C24:0 LPC ¹⁷ , C22:0 LPC ¹⁷ , C20:0 (614388; LPC ¹⁷
GA 1 (231670)	Acidemia glutárica tipo I (pode tipo materno)	C5DC ^{1-14,21} , C0 _{low} ^{5,8,11} , C18:1 _{low} ⁵ , C18 _{low} ⁵ , Trp ⁸	C5DC/C5OH ^{1,2,5,6,11,14} , C5DC/C8 ^{1,2,5-8,11} , C5DC/C16 ^{1,5,6,8,11,12} , C5DC/C3DC ^{2,7,14} , C5DC/C0 ² , C5DC/C4 ⁷ , C5DC/C12 ⁷ , C5DC+C10OH ⁸ , (C5DC+C10OH)/C5OH ⁸ , incluir o (C5DC+C10OH)/C4 ⁸ , (C5DC+C10OH)/C8 ⁸ , (C5DC+C10OH)/C16 ⁸ , (C0+C2+C3+C16+C18:1+C18)/Cit ⁸
GA 2 (231680)	Deficiência múltipla de acil-CoA desidrogenase (MAD)/ Acidemia glutárica tipo II	C4-C18 saturado e insaturado ^{1,2,6,7,9,10} , C4 ^{3-5,8,11,14} , C5 ^{3-5,8,11,14} , espécies de cadeia longa ³ , C8:1 ⁴ , C10 ^{4,8} , C12 ^{4,5} , C14:2 ^{4,5} , C14:1 ^{4,5} ,	Todas as razões são aplicáveis aos marcadores primários ^{1,2,6,11} , a razão C14:1/C12:1 varia de normal-alta para elevada ⁴ , a razão (C16+C18:1)/C2 varia de normal-alta para elevada ⁴ , C4/C2 ^{5,8} , C4/C3 ^{5,8} , C5/C0 ^{5,8} , C5/C2 ^{5,8} , C5/C3 ^{5,8} , C8/C2 ^{5,8} , C5DC/C5OH ⁵ , C14:1/C2 ⁵ , C14:1/C16 ⁵ , C5DC+C10OH ⁸ , (C5DC+C10OH)/C5OH ⁸ , (C5DC+C10OH)/C4 ⁸

Abreviação (OMIM*)	Alvo da Triagem	Marcador Primário/ razão	Marcador secundário ou Informativo/razão
		C14 ^{4,5,11} , C16:1 ⁴ , C16 ^{4,11} , C18:2 ⁴ , C18:1 ⁴ , C18 ⁴ , C6 ⁵ , C8 ^{5,8,11} , C10 ⁵ , C5DC ^{5,11} , C12:1 ⁵ , várias acilcarnitinas ¹³ , C10:1 ⁸ , C6 ⁸	
GACR (258870)	Atrofia girata das coroides e retina/ deficiência da ortinina aminotransferase	Om ⁷ , Cit _{low} ¹⁴	Asn+Om ⁸ , (Asn+Om)/Phe ⁸ , (Asn+Om)/Ser ⁸ , Om/Cit ⁸ , Cit/Phe _{low} ¹⁴
GAMT (612736)	Deficiência de guanidinoacetato metiltransferase/ Síndrome da deficiência cerebral de creatina 2	GAA ^{2,9}	GAA/CRE ²
GNMT (606664)	Deficiência de glicina N-metiltransferase	Met ¹⁰	
GSD II (232300)	Doença de acúmulo de glicocênio tipo II/Doença de Pompe	(CRE/CRN) ²³	
HCY (236200)	Homocistinúria (CBS)	Met ^{1,2,5-14,21}	Met/Phe ^{1,2,5,6,8,11,14} , Met/XLeu ^{2,5,8} , Met/Tyr ^{2,5} , Met/Cit ^{2,5} , C3/Met _{low} ⁵
HHH (238970)	Síndrome de hiperornitinemia-hiperamônia-homocitrulinúria	Om ^{7,9,14} (Om não é informativo de acordo com ²), Homocit ^{8,9}	Asn+Om ⁸ , (Asn+Om)/Phe ⁸ , (Asn+Om)/Ser ⁸ , Om/Cit ^{8,14}
HIBCHD (250620)	Deficiência de 3-hidroxiisobutiril-CoA hidrolase	C4OH ⁴	
HMG (246450)	Acidúria 3-Hidroxi-3-metilglutárica	C5OH ^{1-14,21} , C6DC ^{1-6,8,10-13}	C5OH/C8 ^{1,2,5,6,8,11} , C5OH/C0 ^{2,5,8,11,14} , C6DC _{high/n} ⁷ , C6OH ¹²
HPHE (261600)	Hiperfenilalaninemia (Benigna)	Phe ^{2,9-11,14}	Phe/Tyr ^{2,11,14} , Phe/XLeu ²
HYRPRO1/HP-I (239500)	Hiperprolinemia tipo I	Pro ^{2,8,9,14}	Pro/Cit ² , Pro/Phe ⁸
HYRPRO2/HP-II (239510)	Hiperprolinemia tipo II	Pro ^{2,8,9}	Pro/Cit ² , Pro/Phe ⁸
HADH (231530)	Deficiência de 3-hidroxiacil-CoA de cadeia curta desidrogenase	C4OH ^{4,7}	
IBG/IBDD (611283)	Deficiência de Isobutiril-CoA desidrogenase/ Isobutirilglicinúria	C4 ^{1-12,14}	C4/C2 ^{1,2,5,6,8,11,14} , C4/C3 ^{1,2,5,6,8,11,14} , C4/C8 ^{1,2,5,6,8,11}
IVA (243500)	Acidemia isovalérica	C5 ^{1-14,21}	C5/C0 ^{1,2,5,6,8,11,14,21} , C5/C2 ^{1,2,5,6,8,11,21} , C5/C3 ^{1,2,5-8,11} , C5/C4 ⁷ , C5/C8 ^{7,8}
Keto	Cetose (NÃO é um EIM, mas uma causa potencial para o aumento dos níveis dos analitos)	C2 ⁴ , C12:1 ⁴ , C12 ⁴ , C14:2 ⁴ , C14:1 ⁴ , C14 ⁴ , C16:1 ⁴ , C16 ⁴ , C18:2 ⁴ , C18:1 ⁴ , C18 ⁴ , C4OH ⁴	A razão C14:1/C12:1 varia de normal-alta a elevada ⁴
LCHAD (609016)	Deficiência de 3-hidroxiacil-CoA de cadeia longa desidrogenase	C16:1OH ^{1-3,5,6,8,10,11} , C16OH ¹⁻	C16OH/C16 ^{1,2,5,6,8,11,14} , C18OH/C18 ^{2,5} , C16OH/C14 ² , a razão C14:1/C12:1 varia

Abreviação (OMIM*)	Alvo da Triagem	Marcador Primário/ razão	Marcador secundário ou Informativo/razão
		$C18:1OH^{1-3,5-14}$, $C18OH^{1-6,8,10-14}$, $C14OH^{2,4,8}$, $C18:2OH^{2,8}$, $C16^{4,8}$, $C18:2^{4,8}$, $C18:1^{4,8}$, $C18^{4,8}$, $C14:2^5$, $C14:1^{5,8}$, $C14^5$, $C10:1OH^8$, $C12OH^8$, $C16:1^8$, $C12:1OH^8$, $C14:2OH^8$, $C14:1OH^8$	de normal-alta a elevada ⁴ , razão $(C16+C18:1)/C2$ varia de normal-alta a elevada ⁴ , $C14:1/C2^5$, $C14:1/C16^5$
LYS (238700)	Hiperlisinemia	Lys ¹¹	
M/SCHAD (601609)	Deficiência de desidrogenase de L-3-hidroxiacil-CoA de cadeia média/curta	$C4OH^{1-3,5,6,8-13}$, $C6OH^{2,5,8}$, $C10OH^3$, $C2^8$, $C8^{12}$, $C8OH^{12}$	$C4OH/C16^2$, $C4OH/C8^2$, $C4OH/C4^2$
MAL (248360)	Acidúria/acidemia malônica	$C3DC^{1-12,14}$, $C3^{12}$	$C3DC/C10^{1,2,5,6,8,11,14}$, $C5DC/C3DC_{low}^{2,8}$, $C8OH+C3DC^8$, $(C8OH+C3DC)/C4^8$, $(C8OH+C3DC)/C10^8$
MCAD (201450)	Deficiência de desidrogenase de acil-CoA de cadeia média (pode incluir tipo materno)	$C8^{9-12,14}$, $C6^{10-12,14}$, $C10:1^{10-12}$, $C10^{10-}$ ¹²	$C8/C2^{11,14}$, $C8/C10^{11}$, $(C4DC+C5OH)/C8_{low}^{14}$, $C0_{low}^5$, acilcarnitinas de cadeia média ²⁴
MCD (253270)	Deficiência da holocarboxilase sintetase/deficiência múltipla de carboxilase	$C5OH^{1-3,5-14}$, $C3^{2,5,8,9,11-13}$	$C5OH/C8^{1,2,5,6,8}$, $C5OH/C0^{2,5,8,14}$, $C3/C2^{5,8}$, $C3/C16^{5,8}$, $C4/C3_{low}^5$, $C5/C3_{low}^5$, $C3_{high/n}^7$, $C3/C0^8$, razões relacionadas aos marcadores primários ¹¹
MCKAT (602199)	Deficiência de cetoacil-CoA de cadeia média desidrogenase/ Deficiência de tiolase	$C8^{1,2,6,8,9,11}$, $C10^{2,8,12}$, $C10OH^{3,9}$, $C12^{12}$, $C10:1OH^8$, $C6OH^8$, $C10:1^8$, $C8:1^8$, $C8OH+C3DC^8$, $C8OH^{9,11}$	$C8/C2^{1,6,8}$, $C8/C10^{1,6,8}$, $C3DC/C10^{11}$, $(C8OH+C3DC)/C4^8$, $(C8OH+C3DC)/C10^8$
MET/MAT (250850; 613752; 606664)	Hipermetioninemia incl. Deficiência de metionina adenosiltransferase	Met ^{1,2,5-12,14}	Met/Phe ^{1,2,5,6,8,11,14} , Met/Cit ^{2,5} , Met/XLeu ^{2,5,8} , Met/Tyr ^{2,5} , C3/Met _{low} ⁵
MSUD (248600)	Urina de xarope de bordo	Val ^{1,2,5-14,21} , XLeu ^{1,2,5-14,21}	Val/Phe ^{1,2,5,6,8,11} , XLeu/Phe ^{1,2,5,6,8,11,14} , XLeu/Ala ^{1,2,5,6,8,11} , XLeu/Tyr ² , (XLeu+Val)/(Phe+Tyr) ⁸
MTHFR (236250)	Deficiência de metilenotetrahydrofolato redutase	Met _{low} ^{2,5,7,8,10}	Met/Phe _{low} ^{2,5,8} , Met/Cit _{low} ⁵ , Met/Tyr _{low} ⁵ , Met/XLeu _{low} ^{5,8} , C3/Met ⁵

Abreviação (OMIM*)	Alvo da Triagem	Marcador Primário/ razão	Marcador secundário ou Informativo/razão
MUT (251000)	Acidemia metilmalonônica /deficiência de metilmalonil-CoA mutase (incl. MMA por defeito no receptor de transcobalamina/TcblR)	C3 ¹⁻¹⁴ , C17 ² , C16:1OH ⁵ , C4DC ⁸	C3/C2 ^{1,2,4-6,8,11,12,14} , C3/C16 ^{1,2,5-8,11,12} , C3/C0 ^{2,7,8} , C3/Met ^{2,5} , nível de C4DC varia de normal-alta a elevada ⁴ , C4/C3 _{low} ⁵ , C5/C3 _{low} ⁵ , Gly ⁷ , C3/C4 ⁷
NAGS (237310)	Deficiência de N-acetilglutamato sintase	Gln ²⁵ , Cit _{low} ^{25,27} , Arg _{low} ²⁵	
NKHG (605899)	Hiperglicinemia não-cetótica (Sinônimo: encefalopatia glicina, GCE)	Gly ^{1,5,6,8,9,11,14} (não informativa segundo ²)	Gly/Ala ^{1,6}
OH-PRO (237000)	Hidroxiprolinemia/deficiência da 4-hidroxi-L-prolina oxidase	XLeu ^{8,11}	XLeu/Ala ⁸ , XLeu/Phe ⁸
OTC (300461; 311250)	Deficiência de ornitina transcarbamilase	Cit _{low} ^{2,5,8,9,14} , Gln ⁵ , Glu ⁵ , Arg _{low} ⁵	Glu/Cit ^{2,5} , Met/Cit ^{2,5} , Ala/Cit ² , Gln/Cit ^{2,5} , Cit/Phe _{low} ^{2,5,8,14} , Cit/Arg _{low} ^{5,8} , ACs/Cit ⁵ , Cit/Tyr ⁸ , Orn/Cit ⁸ , ácido orótico ²
PA/PROP (606054)	Acidemia propiônica	C3 ^{1-14,21} , C17 ² , C16:1OH ⁵ , C0 ⁸	C3/C2 ^{1,2,4-6,8,11,12,14,21} , C3/C16 ^{1,2,5-8,11,12} , C3/Met ^{2,5} , C4/C3 _{low} ⁵ , C5/C3 _{low} ⁵ , Gly ⁷ , C3/C0 ^{7,8} , C3/C4 ⁷
PC (266150)	Deficiência de piruvato carboxilase	Cit ^{1,2,5,6,8} , Ala/bAla/Sar ⁸ , Pro ⁸	Cit/Arg ^{1,2,5,6,8} , Cit/Phe ^{2,5,8} , Met/Cit _{low} ² , Glu/Cit _{low} ² , Cit/Tyr ⁸ , Lys ⁸
PDHxD (245348, 245349, 246900, 312170, 608782, 614111)	Deficiência do Complexo Piruvato Desidrogenase (inclui deficiência de piruvato desidrogenase E2, deficiência de piruvato desidrogenase E3, deficiência de DIIDROLIPOAMIDA DESIDROGENASE, deficiência de piruvato desidrogenase E1-alfa, deficiência de piruvato desidrogenase fosfatase, deficiência de piruvato desidrogenase E1-beta)	Ala/bAla/Sar ⁸ , XLeu ^{8,11} , Pro ⁸ , Val ^{8,11}	(XLeu+Val)/(Phe+Tyr) ⁸ , Xel/Ala ⁸ , XLeu/Phe ⁸ , Pro/Phe ⁸ , Val/Phe ⁸
PKU (261600)	Fenilcetonúria clássica	Phe ^{1,2,5-13,21}	Phe/Tyr ^{1,2,5-8,11-13} , Phe/XLeu ² , Tyr ¹² , Tyr _{low/n} ⁷
RDLKD (618863)	Deficiência da Proteína 5 Contendo o Domínio de Ligação a Acil-CoA/distrofia retinal com leucodistrofia	C26:0 LPC ¹⁷	C24:0 LPC ¹⁷ , C22:0 LPC ¹⁷ , C20:0 LPC ¹⁷
SAHH (613752)	Deficiência da S-adenosilhomocisteína hidrolase	Met ¹⁰	
SCAD (201470)	Deficiência da acil-CoA Desidrogenase de cadeia curta	C4 ¹⁻¹⁴	C4/C2 ^{1,2,5,6,8,11,14} , C4/C3 ^{1,2,5,6,8,11} , C4/C8 ^{1,2,5,6,8,11}
SCD	Deficiência de carnitina secundária (ex., em acidemias orgânicas e distúrbios de oxidação dos ácidos graxos)	C0 _{low} ³	
SER (614023, 610992, 601815, 256520, 616038)	Síndrome de deficiência de serina, incl. Síndrome de Neu-Laxova (NLS); causado por deficiência 3-na 3-fosfoglicerato desidrogenase, deficiência da 3-fosfoserina	Ser _{low} ^{28,29}	

Abreviação (OMIM*)	Alvo da Triagem	Marcador Primário/ razão	Marcador secundário ou Informativo/razão
	fosfatase, ou deficiência da fosfoerina aminotransferase		
Single PED (incl. 261515, 264470)	Deficiências da Enzima Peroxissomal Única (inclui deficiência de proteína D-bifuncional (DBP) e deficiência da acil-CoA oxidase peroxissomal)	C26:0 LPC ^{17,18}	C24:0 LPC ¹⁷ , C22:0 LPC ¹⁷ , C20:0 LPC ¹⁷
SUCLA2 (603921)	Deficiência da succinil-CoA sintetase (SUCLA2)	C3 _{3,4,8} , C4DC ^{3,4,8}	C3/C2 ^{4,8} , C3/C0 ⁸ , C3/C16 ⁸
Sup. MCT	Suplementação com triglicerídeos de cadeia-média (NÃO é um EIM, mas uma causa potencial de níveis elevados dos analitos)	C6 ⁴ , C8 ⁴ , C10 ⁴ , C10:1 ⁴	
TCN2 (275350)	Deficiência de transcobalamina II	C3 ² , C17 ²	C3/C2 ²
TFP (609015)	Deficiência de proteína trifuncional	C16:1OH ¹⁻ 3,5,6,8,10,11, C16OH ¹⁻ 3,5-12,14, C18:1OH ¹⁻ 3,5-12,14, C18OH ¹⁻ 3,5,6,8,10-12,14, C14OH ^{2,8} , C18:2OH ^{2,8} , C14:2 ⁵ , C14:1 ^{5,8,12} , C14 ^{5,12} , C10:1OH ⁸ , C12OH ⁸ , C12:1OH ⁸ , C18:1 ⁸ , C16:1 ⁸ , C16 ^{8,12} , C18 ⁸ , C18:2 ⁸ , C14:2OH ⁸ , C14:1OH ⁸	C16OH/C16 ^{1,2,5,6,8,11,14} , C18OH/C18 ^{2,5} , C16OH/C14 ² , C14:1/C2 ⁵ , C14:1/C16 ⁵
Tyr (trans) (ORPHA:3402)	Tirosinemia transiente	Tyr ⁵	
TYR I (276700)	Tirosinemia tipo I	Tyr ^{1,2,5,6,8-10,12,13,21} , Suac ^{1,2,5-8,11,12,14}	Tyr/Cit ^{1,6} , , Tyr ^{high/n} ⁷ , (XLeu+Val)/(Phe+Tyr) ⁸ , SUAC/Phe ¹⁴ , Met ¹²
TYR II (276600)	Tirosinemia tipo II	Tyr ^{1,2,5-14}	Tyr/Cit ^{1,6} , Phe/Tyr ^{low} ^{2,14} , Met/Tyr ^{low} ² , (XLeu+Val)/(Phe+Tyr) ⁸ , XLeu/Tyr ^{low} ¹⁴
TYR III (276710)	Tirosinemia tipo III	Tyr ^{1,2,5,6,8-12,14}	Tyr/Cit ^{1,6} , Phe/Tyr ^{low} ^{2,14} , Met/Tyr ^{low} ² , (XLeu+Val)/(Phe+Tyr) ⁸ , XLeu/Tyr ^{low} ¹⁴
VAL (277100)	Valinemia	Val ^{8,11}	Val/Phe ⁸
VLCAD (201475)	Deficiência de acil-CoA desidrogenase de cadeia longa	C14:2 ^{1-6,8,10,11,13,30} , C14:1 ^{1-14,21,30} , C14 ^{1-6,8,10-13,30} , C12:1 ^{2,5,8} , C12 ^{2,5,8,30} , C16:1 ^{4,8,12,30} , C16 ^{4,8,12} , C18:2 ^{4,30} , C18:1 ^{4,12} , C18 ^{4,30} , CO ^{low} ¹³	C14:1/C16 ^{1,2,5,6,8,11,14} , C14:1/C2 ^{2,5,8,11,14} , C14:1/C12:1 ^{2,4,5,8} , nível de (C16+C18:1)/C2 varia de normal-alta a elevada ⁴ , C14 ^{high/n} ⁷ , C16 ^{high/n} ⁷ , C18:1 ^{high/n} ⁷ , C14:1/C4 ⁷ , C14:1/C5 ⁷ , C14:1/C8 ⁷ , C14:1/C14 ⁸ , C20 ³⁰

Abreviação (OMIM*)	Alvo da Triagem	Marcador Primário/razão	Marcador secundário ou Informativo/razão
ZS/PBD-ZSS (214100; 214110; 614859; 614862; 614866; 614870; 614872; 614876; 614882; 614883; 614886)	Síndrome de Zellweger/ Distúrbios da biogênese dos peroxissomos	C26:0 LPC ¹⁸	C20:0 LPC ^{17,18} , C26 ¹⁸ , C22:0 LPC ¹⁷ , C24:0 LPC ¹⁷

*OMIM (Online Mendelian Inheritance in Man) entre parênteses: informações detalhadas sobre os EIM podem ser encontradas pesquisando os códigos OMIM no site OMIM.org.

Observação: Marcadores em cinza não podem ser quantificados (em níveis relevantes) usando os kits 57075(-F)(-ADO)

- Bennett MJ. National Academy of Clinical Biochemistry Laboratory Medicine Practice Guidelines: Follow-Up Testing For Metabolic Diseases Identified By Expanded Newborn Screening Using Tandem Mass Spectrometry. 2009.
- Clinical Laboratory Standards Institute (CLSI). NBS04-Ed2: Newborn Screening by Tandem Mass Spectrometry. 2017;(2nd edition).
- Rinaldo P, Cowan TM, Matern D. Acylcarnitine profile analysis. Genetics in medicine : official journal of the American College of Medical Genetics. 2008;10(2):151-156.
- Miller MJ, Cusmano-Ozog K, Oglesbee D, Young S. Laboratory analysis of acylcarnitines, 2020 update: a technical standard of the American College of Medical Genetics and Genomics (ACMG). Genetics in medicine : official journal of the American College of Medical Genetics. 2021;23(2):249-258. Published October 19, 2020.
- McHugh DMS, Cameron CA, Abdenur JE, et al. Clinical validation of cutoff target ranges in newborn screening of metabolic disorders by tandem mass spectrometry: a worldwide collaborative project. Genetics in medicine : official journal of the American College of Medical Genetics. 2011;13(3):230-254.
- Lehotay DC, Hall P, Lepage J, Eichhorst JC, Etter ML, Greenberg CR. LC-MS/MS progress in newborn screening. Clinical Biochemistry. 2011;44(1):21-31. Published August 13, 2010.
- La Marca G. Mass spectrometry in clinical chemistry: the case of newborn screening. Journal of pharmaceutical and biomedical analysis. 2014;101:174-182. Published April 28, 2014.
- National Library of Medicine. Newborn Screening Coding and Terminology Guide. <https://nlmncbc.nlm.nih.gov/newbornscreeningcodes/nb/sc/analyte-report.html?> Accessed February 27, 2023.
- Sweetman L, Millington DS, Therrell BL, et al. Naming and counting disorders (conditions) included in newborn screening panels. Pediatrics. 2006;117(5 Pt 2):S308-14.
- Messina M, Arena A, Fiumara A, Iacobacci R, Meli C, Raudino F. Neonatal Screening on Tandem Mass Spectrometry as a Powerful Tool for the Reassessment of the Prevalence of Underestimated Diseases in Newborns and Their Family Members: A Focus on Short Chain Acyl-CoA Dehydrogenase Deficiency. International journal of neonatal screening. 2020;6(3). Published July 28, 2020.
- Rinaldo P, Matern D, Hoffmann GF, Zschocke J, Nyhan WL. Inherited metabolic diseases - A clinical approach: Chapter Newborn Screening for Inherited Metabolic Disease. Heidelberg: Springer; 2010.
- Watson MS, Mann MY, Lloyd-Puryear MA, Rinaldo P, Howell RR. Newborn screening: toward a uniform screening panel and system. 2006.
- Ozben T. Expanded newborn screening and confirmatory follow-up testing for inborn errors of metabolism detected by tandem mass spectrometry. Clinical Chemistry and Laboratory Medicine. 2013;51(1):157-176.
- Li X, He J, He L, et al. Spectrum Analysis of Inherited Metabolic Disorders for Expanded Newborn Screening in a Central Chinese Population. Frontiers in genetics. 2021;12:763222. Published January 12, 2022.
- Burlina A, Giuliani A, Polo G, et al. Detection of 3-O-methyldopa in dried blood spots for neonatal diagnosis of aromatic L- amino-acid decarboxylase deficiency: The northeastern Italian experience. Molecular genetics and metabolism. 2021;133(1):56-62. Published March 13, 2021.
- Carducci C, Santagata S, Leuzzi V, et al. Quantitative determination of guanidinoacetate and creatine in dried blood spot by flow injection analysis-electrospray tandem mass spectrometry. Clinica chimica acta; international journal of clinical chemistry. 2006;364(1-2):180-187. Published September 28, 2005.
- Clinical Laboratory Standards Institute (CLSI). NBS09-Ed1: NBS for X-linked Adrenoleukodystrophy. 2021;(1st edition).
- Biase I de, Tortorelli S, Kratz L, J Steinberg S, Cusmano-Ozog K, Braverman N. Laboratory diagnosis of disorders of peroxisomal biogenesis and function: a technical standard of the American College of Medical Genetics and Genomics (ACMG). Genetics in medicine : official journal of the American College of Medical Genetics. 2020;22(4):686-697. Published December 11, 2019.
- Tise CG, Morales JA, Lee AS, et al. Aicardi-Goutières syndrome may present with positive newborn screen for X-linked adrenoleukodystrophy. American journal of medical genetics. Part A. 2021;185(6):1848-1853. Published March 8, 2021.
- Tian G-L, Xu F, Jiang K, Wang Y-M, Ji W, Zhuang Y-P. Evaluation of a panel of very long-chain lysophosphatidylcholines and acylcarnitines for screening of X-linked adrenoleukodystrophy in China. Clinica chimica acta; international journal of clinical chemistry. 2020;503:157-162. Published January 21, 2020.
- Khan AR, Alothaim A, Alfares A, et al. Cut-off values in newborn screening for inborn errors of metabolism in Saudi Arabia. Annals of Saudi medicine. 2022;42(2):107-118. Published April 7, 2022.

22. Pajares S, López RM, Gort L, et al. An incidental finding in newborn screening leading to the diagnosis of a patient with ECHS1 mutations. *Molecular genetics and metabolism reports*. 2020;22:100553. Published January 2, 2020.
23. Tortorelli S, Eckerman JS, Orsini JJ, et al. Moonlighting newborn screening markers: the incidental discovery of a second-tier test for Pompe disease. *Genetics in medicine : official journal of the American College of Medical Genetics*. 2018;20(8):840-846. Published November 2, 2017.
24. Gesellschaft für Neonatologie und Pädiatrische Intensivmedizin (GNPI), et al. Neugeborenen-Screening auf angeborene Stoffwechselstörungen, Endokrinopathien, schwere kombinierte Immundefekte (SCID), Sichelzellkrankheit, 5q-assoziierte spinale Muskelatrophie (SMA) und Mukoviszidose: AWMF 024-012. 2019.
25. Arbeitsgemeinschaft für Pädiatrische Stoffwechselstörungen (APS) der Deutschen Gesellschaft für Kinderheilkunde und Jugendmedizin. Diagnostik und Therapie von Harnstoffzyklusstörungen - S3 Leitlinie: AWMF 027-006. 2018.
26. ACMG. Decreased Citrulline Newborn Screening ACT Sheet: 28.05.2022. 2022.
27. ACMG. Decreased Citrulline Newborn Screening Algorithm: 28.05.2022. 2022.
28. Shaheen R, Rahbeeni Z, Alhashem A, et al. Neu-Laxova syndrome, an inborn error of serine metabolism, is caused by mutations in PHGDH. *American journal of human genetics*. 2014;94(6):898-904. Published May 15, 2014.
29. van der Crabben SN, Verhoeven-Duif NM, Brilstra EH, et al. An update on serine deficiency disorders. *Journal of inherited metabolic disease*. 2013;36(4):613-619. Published March 6, 2013.
30. Kottnerus SJG, Pras-Raves ML, van der Ham M, et al. Prediction of VLCAD deficiency phenotype by a metabolic fingerprint in newborn screening bloodspots. *Biochimica et biophysica acta. Molecular basis of disease*. 2020;1866(6):165725. Published February 19, 2020.

Anexo V Rastreabilidade dos padrões internos (calibrador) e controles

Versão 1.1

MassScreen® Aminoácidos, Acilcarnitinas ESTENDIDO

Mix de Padrão Interno (no. de pedido 57074)

Padrão Interno de Succinilacetona (não derivatizado) (no. de pedido 57044)

Mix de Padrão Interno Ado, dAdo (no. de pedido 57474)

MassCheck® Aminoácidos, Acilcarnitinas ESTENDIDO

Controle em Spot de Sangue Seco Nível I, II e III (nos. de pedido 0195, 0196, 0197)

MassCheck® Aminoácidos, Acilcarnitinas ESTENDIDO incl. Ado, dAdo

Controle em Spot de Sangue Seco Nível I, II e III (order nos. 0295, 0296, 0297)

Uma solução padrão de referência principal foi preparada gravimetricamente pela adição de material de referência dos analitos da mais alta ordem disponível e do padrão interno. Para os analitos alanina, arginina, glicina, leucina, metionina, fenilalanina, prolina, serina, tirosina e valina, foi utilizado material obtido como NIST SRM 2389a; para ácido argininosuccínico, ornitina, 3-O-metildopa, citrulina, glutamina, ácido glutâmico, carnitina livre, acetilcarnitina, butirilcarnitina, isovaleril carnitina, glutarilcarnitina, hexanoilcarnitina, octanoilcarnitina, decanoilcarnitina, decenoilcarnitina, dodecanoilcarnitina, tetradecanoilcarnitina, tetradecenoilcarnitina, hexadecanoilcarnitina, octadecanoilcarnitina, octadecenoilcarnitina, succinilacetona, adenosina, creatina, creatinina e ácido guanidinoacético, foram utilizados materiais obtidos como Materiais de Referência Certificados (CRMs) e Materiais de Referência (RMs). Já para propanoilcarnitina, 3-hidroxi butirilcarnitina, tiglicarnitina, 3-hidroxiisovaleril carnitina, adipilcarnitina, decadieno ilcarnitina, 3-hidroxi hexadecanoilcarnitina, 3-hidroxi octadecanoilcarnitina, hexacosanoilcarnitina, 2'-desoxiadenosina e 1-hexacosanoil-2-hidroxi-sn-glicero-3-fosfocolina, foram utilizadas substâncias puras obtidas de fornecedores comerciais. Essa solução padrão de referência principal foi utilizada para definir as concentrações dos padrões internos dos produtos "Master Internal Standard".

A definição das concentrações do padrão interno principal e dos produtos subsequentes de padrão interno (números de pedido 57074, 57474, 57044) foi realizada no laboratório do fabricante utilizando o ensaio Chromsystems *MassScreen*® Aminoácidos, Acilcarnitinas ESTENDIDO MS/MS. Por meio desse procedimento, assegurou-se a rastreabilidade aos CRMs obtidos de fornecedores certificados segundo as normas ISO 17025 e ISO 17034, aos RMs de fornecedores certificados segundo ISO 17025, e às substâncias puras provenientes de fornecedores certificados segundo ISO 9001, bem como ao material de referência NIST SRM (ver gráfico abaixo). A pureza e/ou as concentrações dos materiais NIST, CRMs e RMs foram determinadas por fornecedores certificados, utilizando os métodos apresentados no gráfico.

Os produtos da Chromsystems – Internal Standard Mix, Internal Standard Succinylacetone (não derivatizado) e Internal Standard Mix Ado, dAdo (padrões internos de trabalho, utilizados como calibradores de trabalho) – possuem concentrações especificadas na bula de cada lote, determinadas pelo laboratório do fabricante usando o ensaio Chromsystems *MassScreen*® Aminoácidos, Acilcarnitinas ESTENDIDO MS/MS como referência. O ensaio foi calibrado utilizando as misturas-padrão internas principais da Chromsystems, com concentração conhecida (incluindo a incerteza, indicada no gráfico abaixo).

A homogeneidade é verificada para cada lote por meio de múltiplas análises de várias alíquotas, baseando-se na justificativa estatística da Chromsystems para o tamanho amostral (com base na norma ISO 13528, com um mínimo

de 10 repetições em duas corridas). Os valores atribuídos e as respectivas incertezas são fornecidos na bula de cada padrão interno (utilizado como calibrador).

Para a definição das concentrações dos controles-mestre de sangue e dos produtos subsequentes da Chromsystems – *MassCheck*[®] Aminoácidos, Acilcarnitinas ESTENDIDO Controle em Spot de Sangue Seco Níveis I-III e *MassCheck*[®] Aminoácidos, Acilcarnitinas ESTENDIDO incl. Ado, dAdo Controle em Spot de Sangue Seco Níveis I-III (controles de qualidade de trabalho) – são utilizados, respectivamente, o padrão interno principal e os produtos de padrão interno como calibradores. Para os analitos que não possuem um padrão interno isotopicamente marcado correspondente, mas cuja definição é realizada com base no padrão interno de outro analito, a determinação das concentrações nos controles segue o mesmo procedimento, uma vez que a solução padrão de referência principal também inclui esses analitos, os quais, por sua vez, foram relacionados aos padrões internos utilizados.

Os controles de qualidade de trabalho apresentam concentrações especificadas na bula de cada lote, determinadas pelo laboratório do fabricante utilizando o ensaio Chromsystems *MassScreen*[®] Aminoácidos, Acilcarnitinas ESTENDIDO MS/MS, incluindo os Mixes de Padrões Internos da Chromsystems.

A homogeneidade é verificada para cada lote por meio de múltiplas análises de várias amostras de sangue seco, baseando-se na justificativa estatística da Chromsystems para o tamanho amostral (com base na norma ISO 13528, com um conjunto mínimo de 10 repetições em duas corridas analíticas).

Os valores atribuídos são fornecidos na bula de cada controle *MassCheck*[®] Aminoácidos, Acilcarnitinas ESTENDIDO Controle de Spot de Sangue Seco, sendo utilizados para a harmonização de valores por meio de fatores de resposta relativa específicos de cada sistema.

Gravimetric preparation of NIST material, CRMs and RMs used for value assignment; Purity and identity are checked by methods provided in the table

NIST SRM 2389a					
Analyte	Certified value	Uncertainty U	k	Purity	Identity
Alanine	2.50 mmol/L	0.07 mmol/L	2	LC-MS, sec. methods ¹	-
Arginine	2.51 mmol/L	0.07 mmol/L	2	LC-MS, sec. methods ¹	-
Glycine	2.52 mmol/L	0.07 mmol/L	2	LC-MS, sec. methods ¹	-
Leucine	2.44 mmol/L	0.11 mmol/L	2	LC-MS, sec. methods ¹	-
Methionine	2.51 mmol/L	0.07 mmol/L	2	LC-MS, sec. methods ¹	-
Phenylalanine	2.55 mmol/L	0.09 mmol/L	2	LC-MS, sec. methods ¹	-
Proline	2.46 mmol/L	0.11 mmol/L	2	LC-MS, sec. methods ¹	-
Serine	2.44 mmol/L	0.11 mmol/L	2	LC-MS, sec. methods ¹	-
Tyrosine	2.54 mmol/L	0.08 mmol/L	2	LC-MS, sec. methods ¹	-
Valine	2.51 mmol/L	0.1 mmol/L	2	LC-MS, sec. methods ¹	-
Certified Reference Material (CRM)					
Argininosuccinic acid	73.1%	± 2.2%	3.2	qNMR	-
Citrulline	99.6%	± 2.2%	2.8	qNMR	-
Glutamine	99.8%	± 0.4%	2	qNMR	-
Glutamic acid	99.6%	± 0.2%	2	qNMR	-
Free carnitine	10.0 mg/mL	± 0.1 µg/mL	2	LC-MS	LC-MS, 1H-NMR
Acetylcarnitine	10.0 mg/mL	± 0.2 µg/mL	2	LC-MS	LC-MS, 1H-NMR
Butyrylcarnitine	99.9 µg/mL	± 3.5 µg/mL	2	Chromatography [†]	LC-MS
Isovalerylcarnitine	100.0 µg/mL	± 4.3 µg/mL	2	Chromatography [†]	LC-MS
Glutaryl carnitine	100.0 µg/mL	± 3.9 µg/mL	2	LC-MS	LC-MS, 1H-NMR
Hexanoylcarnitine	100.0 µg/mL	± 1.4 µg/mL	2	Chromatography [†]	LC-MS
Octanoylcarnitine	99.9 µg/mL	± 1.9 µg/mL	2	Chromatography [†]	LC-MS
Decanoylcarnitine	99.9 µg/mL	± 2.7 µg/mL	2	Chromatography [†]	LC-MS
Decenoylcarnitine	100 µg/mL	± 3 µg/mL	2	LC-MS	-
Dodecanoylcarnitine	100.0 µg/mL	± 2.8 µg/mL	2	Chromatography [†]	LC-MS
Tetradecanoylcarnitine	100.0 µg/mL	± 3.0 µg/mL	2	Chromatography [†]	LC-MS
Tetradecenoylcarnitine	100 µg/mL	± 1 µg/mL	2	LC-MS	-
Hexadecanoylcarnitine	5.000 mg/mL	± 0.172 mg/mL	2	LC-MS	LC-MS, 1H-NMR
Octadecanoylcarnitine	199.9 µg/mL	± 3.4 µg/mL	2	Chromatography [†]	LC-MS
Octadecenoylcarnitine	200 µg/mL	± 3 µg/mL	2	LC-MS	-
Succinylacetone***	99.7%	± 1.2%	2.8	qNMR	-
Adenosine**	99.8%	± 0.4%	2.0	HPLC-UV, sec. methods ²	IR
Creatinine	2.00 mg/mL	± 0.01 mg/mL	2	HPLC-UV, LC-MS	LC-MS, 1H-NMR
Reference Material (RM)					
Ornithine	98.9%	± 1.0%	2	1H-NMR	EA, NMR, RT, IR, LC-MS
3-O-Methylidopa	98.25%	± 0.43%	2	HPLC-UV, sec. methods ³	1H-NMR, 13C-NMR, LC-MS, IR
Creatine	99.1%	± 1.0%	2	1H-NMR	NMR, EA, LC-MS, IR
Guanidinoacetic acid	99.5%	± 2.0%	2	EA	EA, NMR, RT, IR, LC-MS, UV

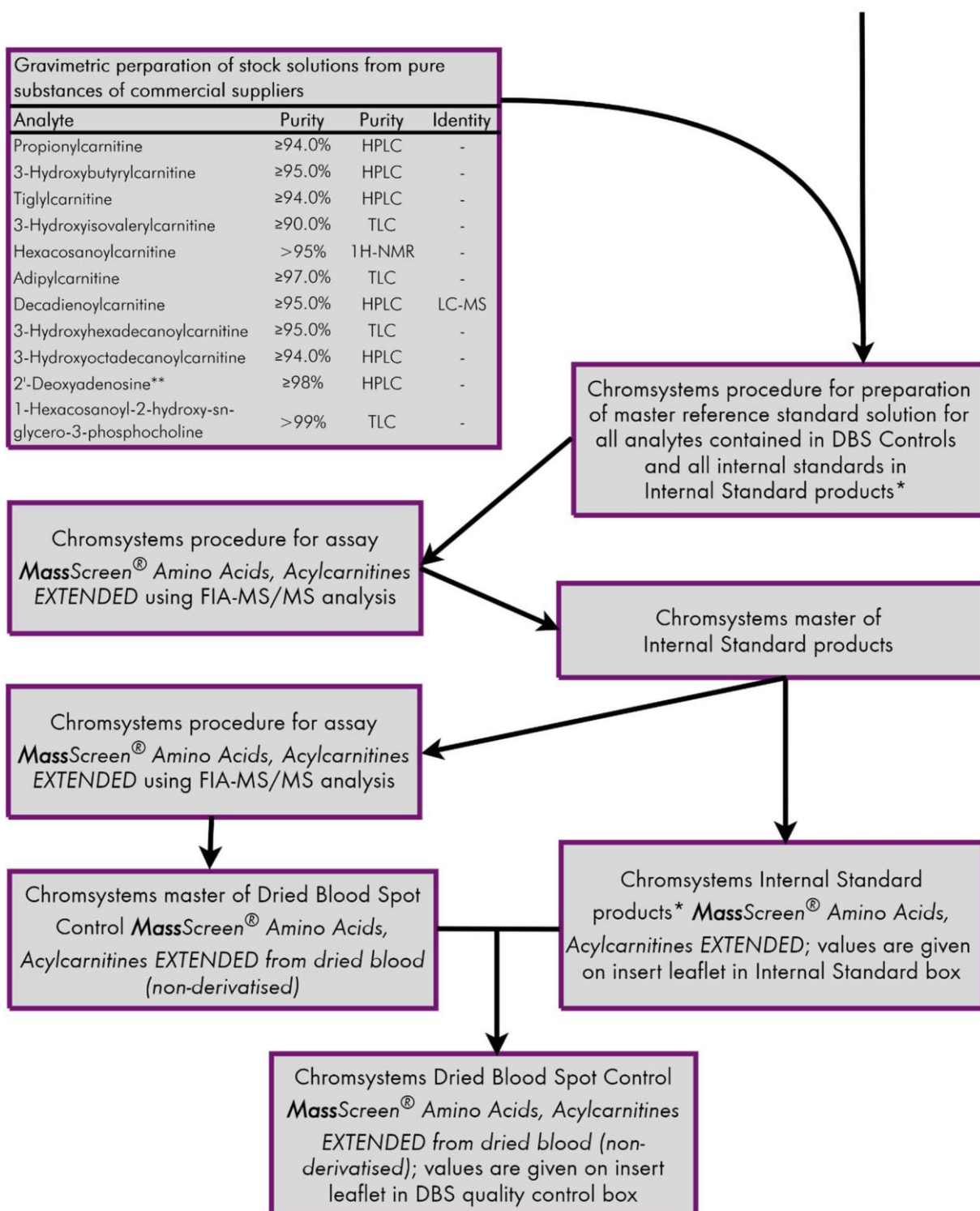
See next page

¹⁾ métodos secundários: análise elementar, umidade residual por titulação KF

²⁾ métodos secundários: determinação de solventes residuais, perda por secagem/voláteis, análise de resíduos

³⁾ métodos secundários: teor de voláteis, solventes residuais, resíduos inorgânicos

[†] não especificado em maior detalhe



Legenda: (¹H-/¹³C-/q)/NMR: ressonância magnética nuclear (de próton/carbono/quantitativa); EA: análise elementar; HPLC-UV: cromatografia líquida de alta eficiência com detector ultravioleta-visível; FIA-MS/MS: espectrometria de massas em tandem por injeção em fluxo; IR: espectroscopia no infravermelho; LC-MS: cromatografia líquida acoplada à espectrometria de massas; RT: tempo de retenção; TLC: cromatografia em camada delgada.

- * Esta cadeia aplica-se aos Mixes de padrão interno com os seguintes nos de pedido: 57074, 57044, 57474
- ** Aplica-se apenas a parte do Mix de padrão interno Ado, dAdo (nº de pedido 57474) e, nos controles, aos números de pedido 0295, 0296 e 0297
- *** Aplica-se apenas a parte do Mix de padrão interno Succinilacetona (não derivatizado) (nº de pedido 57044)

A disponibilidade de materiais de referência padrão (SRM) e materiais de referência certificados (CRM) é verificada regularmente, no máximo antes da produção de um novo lote principal (master lot), a fim de garantir a rastreabilidade dos calibradores e controles da Chromsystems a materiais de referência de ordem superior. Portanto, a cadeia de rastreabilidade atual dos calibradores e controles pode diferir ligeiramente daquela apresentada neste documento. A cadeia de rastreabilidade atualmente válida está disponível no centro de downloads do nosso site. A cadeia de rastreabilidade apresentada aqui (versão V1.1) representa o status em 24/06/2025.

Anexo VI Símbolos

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

Tabela 39: Símbolos

Símbolo	Significado
	Fabricante
	Data de fabricação
	Validade
	Número do pedido
	Código do lote / código da fabricação
	Consultar as instruções de uso
	Limite superior de temperatura: Armazenar abaixo de determinada temperatura
	Faixa de temperatura: Armazenar dentro de uma faixa específica de temperatura
	Dispositivo médico para diagnóstico <i>in vitro</i>
	Suficiente para <n> testes
	Atenção
	Número de série
	Marcação CE de conformidade com a legislação europeia aplicável
	Marcação CE de conformidade com a legislação europeia aplicável (com o sufixo 0123 – referente ao organismo notificado: TÜV Süd Product Service GmbH)

Anexo VII Histórico de versões

Tabela 40: Histórico de versões

Versão	Data de lançamento (AAAA-MM-DD)	Descrição
1.0 _{IVDR}	24-06-2025	Criação Inicial
1.1 _{IVDR}	24-10-2025	Mudança dos seguintes números de pedido: Pré-filtro em PEEK: antes 55033, agora 57016 Suporte de Pré-filtro em PEEK: antes 15010, agora 15017 Capilar Restritor: antes 55015, agora 55018
2.0 _{IVDR}	02-12-2025	Capítulo 5.2.3: Correção da informação nos ciclos de congelamento Capítulo 5.3: Tabela 6 se refere à estabilidade e após a primeira abertura Capítulo 10: Adição de mais intervalos de referência