

VITAMINSTATUS
VITAMIN PROFILING
DOSAGE DE VITAMINES
PROFILO DELLE VITAMINE
PERFIL DE VITAMINAS



Manual de Instrução para Análise em HPLC

Vitaminas A e E em soro/plasma

Somente para uso diagnóstico *in vitro*
34400

VITAMINAS A/E EM SORO OU PLASMA - HPLC ANVISA 10350840453

Comunicação de incidentes:

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

Chromsystems Instruments & Chemicals GmbH é certificada de acordo com a ISO 13485 (incluindo MDSAP). Os produtos são fabricados e colocados no mercado em conformidade com o Regulamento (UE) 2017/746 sobre dispositivos médicos de diagnóstico in vitro (IVDR).

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

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

Regularizado por: BioSys Ltda.

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

SAC: (21) 3907 2534
0800 015 1414
www.biosys.com.br

Fabricado por: Chromsystems Instruments & Chemicals GmbH

Am Haag 12
82166 Gräfelfing
Alemanha

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

Conteúdo

Página

1	Informações para requisição	4
1.1	Kits	4
1.2	Componentes individuais.....	5
2	Introdução.....	6
2.1	Informação básica	6
2.2	Princípio do Ensaio.....	7
2.3	Finalidade Pretendida	7
2.4	Limitações clínicas	7
3	Sistema HPLC.....	8
3.1	Equipamento adicional requerido	8
3.1.1.	Equipamento essencial.....	8
3.1.2.	Equipamento opcional/recomendado.....	8
3.2.	Parâmetros do equipamento	9
3.3.	Coluna HPLC.....	9
3.4.	Ligar o Sistema	10
3.5.	Shut down.....	10
4	Separação cromatográfica	10
5	Preparo da amostra	11
5.1	Coleta e armazenamento das amostras de pacientes	11
5.2	Reconstituição do calibrador.....	12
5.3	Reconstituição dos controles	12
5.4	Procedimento de preparo das amostras.....	13
5.4.1.	Preparo de amostra com Vials de Reação	13
5.4.2.	Preparo de amostra com Placas de 96 Poços Fundos.....	14
5.5	Estabilidade das amostras preparadas	14
5.6	Tratamento das amostras acima do intervalo de medição analítica	15
6	Controle de Qualidade.....	15
7	Resultados e avaliação.....	16
7.1	Calibração do sistema de análise	16
7.2	Exemplos de cromatogramas	17
7.2.1	A temperatura da coluna a 35 °C	17
7.2.2	A temperatura ambiente da coluna.....	18
8	Armazenamento e validade dos reagentes	19
9	Descarte de resíduos.....	20
10	Valores de referência	21
11	Testes de Interferência	23
11.1	Interferentes detectados	23
11.2	Nenhuma interferência detectada	24
12	Problemas e Soluções	28
13	Literatura.....	30

Conteúdo	Página
Apêndice I Informações de substância.....	32
Apêndice II Dados de desempenho analítico	34
Apêndice III Dados de desempenho clínico.....	37
Apêndice IV Rastreador do calibrador	39
Apêndice V Símbolos.....	41
Apêndice VI Histórico de versão.....	42

1 Informações para requisição

1.1 Kits

Kits de reagente para a análise de vitaminas A e E

34400	Kit reagente para HPLC Vitaminas A e E em soro/plasma com frascos de reação Conteúdo do kit para 200 análises: Fase Móvel Padrão de Calibração em Soro Reagente de Precipitação Padrão Interno Frascos de reação, cor âmbar (protegidos da luz)	1000 mL 5 x 1,0 mL (liof.) 40 mL 40 mL 2 x 100 unidades
34400-DWP	Kit reagente para HPLC Vitaminas A e E em soro/plasma com placas de 96 Poços Fundos Conteúdo do Kit para 200 análises: Fase Móvel Padrão de Calibração em Soro (liofilizado) Padrão Interno Reagente de Precipitação Placas de 96 Poços Selos Adesivos com Fenda cruzada Para placa de 96 poços	1000 mL 5 x 1,0 mL (liof.) 40 mL 40 mL 6 unidades 3 unidades

Os seguintes produtos CE/IVD não estão incluídos nos kits 34400 e 34400-DWP, mas são necessários para a aplicação do método:

34300	Coluna HPLC (equilibrada, com cromatograma teste)	1 unidade
15012	Pré-filtro em PEEK 0,5 µm	5 unidades
0036	Controle em Soro Nível I	5 x 2,0 mL (liof.)
0037	Controle em Soro Nível II	5 x 2,0 mL (liof.)

Kits básicos para preparo de amostra

34400-BK	Kit Básico de Vitamina A e E em soro/plasma por HPLC Com Frascos de Reação Conteúdo do Kit para 200 preparos de amostra: Padrão Interno Reagente de Precipitação Frascos de Reação 1,5 mL, cor âmbar (protegidos da luz)	40 mL 40 mL 2 x 100 unidades
34400-DWP-BK	Kit Básico de Vitamina A e E em soro/plasma por HPLC Com Placas de 96 Poços Conteúdo do Kit para preparo de 200 amostras: Padrão Interno	40 mL

Reagente de Precipitação	40 mL
Placas de 96 Poços	6 unidades
Selos adesivos com fenda cruzada Para placa de 96 poços	3 unidades

Os seguintes produtos CE/IVD não estão incluídos nos kits 34400-BK e 34400-DWP-BK, mas são necessários para a aplicação do método:

34300	Coluna HPLC (equilibrada, com cromatograma teste)	1 unidade
15012	Pré-filtro em PEEK 0,5 µm	5 unidades
34001	Fase Móvel	1000 mL
34004	Padrão de Calibração em Soro	5 x 1,0 mL (liof.)
0036	Controle em Soro Nível I	5 x 2,0 (liof.)
0037	Controle em Soro Nível II	5 x 2,0 (liof.)

1.2 Componentes individuais

Produtos CE/IVD

Para preparo de amostra:

34404	Padrão Interno	40 mL
34405	Reagente de Precipitação	40 mL
34456	Placas de 96 Poços Fundos	6 unidades
34459	Selos Adesivos com fenda cruzada pra placas de 96 poços	3 unidades
34760	Selos Térmicos Perfuráveis para placas de 96 poços	6 unidades

Para cromatografia:

34001	Fase Móvel	1000 mL
34002	Fase Móvel	10 x 1000 mL
34300	Coluna HPLC (equilibrada, com cromatograma teste)	1 unidade
15012	Pré-filtro em PEEK 0,5 µm	3 unidades

Para calibração e controle de qualidade:

34004	Padrão de Calibração em Soro	5 x 1,0 mL (liof.)
0032	Controle Bi-Nível (I+II) em Soro	2 x 5 x 2,0 mL (liof.)
0036	Controle Nível I em Soro	5 x 2,0 mL (liof.)
0037	Controle Nível II em Soro	5 x 2,0 mL (liof.)

Produtos sem CE/IVD

33005	Vials de Reação 1,5 mL, cor âmbar (protegidos da luz)	100 unidades
J0505	Micro-Inserts para Vials em Autosampler, vidro transparente, fundo chato, 6 x 31 mm, 0,4 mL	100 unidades
42740	Selador Térmico	1 unidade
15070	Carcaça de Pré-filtro de aço inoxidável	1 unidade

2 Introdução

2.1 Informação básica

Vitamina A

O nutriente essencial Vitamina A não é uma substância única, mas é um grupo de compostos semelhantes, insaturados orgânicos que incluem retinol, retinal, ácido retinóico e outros carotenoides com atividade de provitamina A (significando que podem ser convertidos em retinal), como o beta-caroteno, alfa-caroteno, gama-caroteno e beta-criptoxantina. Provitamina A é encontrada em diversas plantas (ex: vegetais vermelhos, laranjas, amarelos e com folhagem verde), enquanto a vitamina A pré-formada na forma de ésteres de retinil pode ser encontrada em produtos de origem animal (ex: leite, fígado, ovos).

A forma ativa da vitamina A é o ácido retinóico (RA) que tem um papel importante na divisão celular, crescimento e maturação dos ossos e dos órgãos, fortalecimento do sistema imune, reprodução e desenvolvimento assim como a manutenção da saúde dos olhos e visão noturna. Afeta assim, vários sistemas, incluindo o nervoso, digestivo, imune e serotoninérgico.

A suficiência de Vitamina A é especialmente crucial em mulheres grávidas e crianças em desenvolvimento. Durante a gravidez, a vitamina A é essencial para o crescimento e maturação óssea e dos órgãos, manutenção do sistema imune materno, desenvolvimento da visão no feto e a manutenção da saúde materna dos olhos e visão noturna.

A deficiência da Vitamina A está associada com maior morbidade e mortalidade. Crianças com deficiência de vitamina A estão num risco maior de deficiência intelectual, baixa estatura, complicações perinatais, distúrbios no desenvolvimento e imunidade com elevada morbidade e mortalidade devido a infecções associadas. A deficiência de vitamina A é uma das deficiências de micronutrientes mais prevalentes no mundo.

Não somente a deficiência de vitamina A, mas também o excesso pode ter efeitos negativos na saúde. A toxicidade da vitamina A pode ocorrer quando quantidades excessivas de retinol são ingeridas. A toxicidade da vitamina A pode se apresentar em formas agudas ou crônicas e tem sido associada com uma variedade de sintomas afetando o sistema nervoso, ósseo, pele, tecidos conjuntivos, rins e fígado. Em casos raros, hipercalcemia é uma complicação do excesso de vitamina A.

Vitamina E

O termo coletivo vitamina E engloba um conjunto de oito compostos químicos lipossolúveis, os tocoferóis e tocotrienóis, sendo o α -tocoferol o que tem atividade biológica mais alta e é a forma predominante no sangue. É exclusivamente obtido da dieta. A vitamina E pode ser encontrada em diversos alimentos, por exemplo em carnes, grãos de cereal, frutas e vegetais e, em quantidades maiores, em óleos como os de girassol, cártamo e gérmen de trigo.

A ingestão da vitamina E e armazenamento se assemelham aos da vitamina A. É armazenada principalmente no fígado também, e pode ser liberada na corrente sanguínea nas quantidades requeridas. α -tocoferol pode ser encontrado nas membranas celulares, onde age como antioxidante que protege as membranas do dano da peroxidação lipídica e, portanto, melhora a condução nervosa, ajuda a manter a integridade estrutural da membrana da hemoglobina e, junto com a vitamina A, tem um papel importante na visão. α -tocoferol portanto, assegura uma resposta imune apropriada a infecções e é, um protetor contra o dano de radicais livres, associado com doenças crônicas, incluindo diabetes, aterosclerose, doença cardíaca isquêmica, Alzheimer, catarata, Parkinson e câncer.

Os distúrbios relacionados com a deficiência da vitamina E afetam bastante o sistema nervoso. Eles incluem, mas não estão limitados a ataxia cerebelar, neuropatia periférica, fraqueza muscular, dano retinal levando à perda de

visão. Neuropatia sensorial motora que se manifesta como perda de reflexos e fraqueza generalizada. A deficiência da vitamina E pode se manifestar também como deficiência cognitiva e anemias hemolíticas.

Muitos dos grupos de risco para vitamina A também apresentam com frequência níveis insuficientes de vitamina E.

2.2 Princípio do Ensaio

Este kit de reagentes permite a determinação quantitativa simultânea de vitamina A (retinol) e vitamina E (α -tocoferol) em soro ou plasma. O rápido e fácil preparo pode ser realizado com Vials de Reação ou Placas de 96 Poços Fundos. Os analitos são liberados da sua proteína carreadora ou lipoproteínas por precipitação. Subsequentemente, as substâncias são separadas cromatograficamente em uma corrida isocrática de HPLC e quantificada usando um detector UV.

2.3 Finalidade Pretendida:

O kit de reagentes da Chromsystems para “Vitaminas A e E em soro/plasma” é uma ferramenta de diagnóstico *in vitro* para ser usada em laboratórios clínicos para a detecção quantitativa de Vitamina A e Vitamina E em amostras de soro humano e plasma. O preparo da amostra é feito manualmente, e a separação analítica é realizada através de cromatografia líquida de alta eficiência (HPLC).

O kit é pretendido para ser usado para determinação dos níveis de vitamina A e E quando indicado

- para triagem em pacientes com suspeita de deficiência de vitamina A/E;
- para triagem em pacientes com suspeita de excesso de vitamina A/E;
- para monitoramento de pacientes sob suplementação de vitamina A/E.

2.4 Limitações clínicas:

Não há valores de referência aplicáveis universais para retinol e α -tocoferol. Resultados obtidos usando métodos de teste diferentes não podem ser transferidos. Laboratórios devem indicar o método usado para análise para permitir a correta interpretação dos resultados. Usuários devem especificar seus próprios valores de referência baseados na assessoria clínica. Fatores de conversão entre os diferentes métodos de análise não devem ser usados para prever o resultado para um paciente específico.

Concentrações de retinol no soro são homeostaticamente controladas por uma ampla gama de reservas no fígado e, portanto, somente fornecem informação significativa sobre as reservas no organismo em casos de depleção severa [1-3].

Do mesmo modo, a concentração de α -tocoferol plasmático não necessariamente reflete consumo ou reservas teciduais, porque apenas aproximadamente 1% do α -tocoferol do organismo está presente no sangue e a quantidade na circulação é fortemente influenciada por lipídeos circulantes [4].

Múltiplos fatores podem levar a níveis de retinol elevados; esses incluem infecção e inflamação (níveis de proteína C-reativa), albumina, e proteína ligante de retinol (ex: no caso de deficiência de zinco). Portanto, esses níveis de retinol não devem ser considerados isoladamente. Infecção e inflamação podem também afetar os níveis de α -tocoferol [2,5,6].

Por favor considere informação sobre coleta e armazenamento de amostra de paciente (ver capítulo 5.1) e sobre possíveis interferências (ver capítulo 11) quando usar o ensaio.

3 Sistema HPLC

Atenção:

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

3.1 Equipamento adicional requerido

Além do conteúdo incluído no kit de reagentes da Chromsystems (artigo no. 34400), a análise por HPLC das vitaminas A e E em soro/plasma requer os seguintes materiais:

3.1.1. Equipamento essencial

Produtos diretamente associados com o kit, disponíveis na Chromsystems:

Necessários para a aplicação do método:

34300	Coluna HPLC (equilibrada, com cromatograma teste)
0032	Controle Bi-Nível (I+II)
0036	Controle Nível I
0037	Controle Nível II

Acessórios (produtos CE/IVD), disponível na Chromsystems:

15012	Pré-filtro em PEEK 0,5 µm
-------	---------------------------

Equipamentos de laboratório, disponíveis parcialmente na Chromsystems:

- Sistema HPLC isocrático (opcional com forno de coluna, ver capítulo 3.2)
- Autosampler
- Detector UV
- Vórtex
- Centrífuga adequada

3.1.2. Equipamento opcional/recomendado

Insumo geral de laboratório (produto CE/IVD), disponível na Chromsystems:

34760	Selos térmicos perfuráveis para placa de 96 poços
-------	---

Insumos gerais de laboratório (produtos sem CE/IVD), disponíveis na Chromsystems:

J0505	Micro-Inserts para Vials de Autosampler, vidro transparente, fundo chato, 6 x 31 mm, 0,4 mL
42740	Selador Térmico
15070	Cartucho de Pré-filtro de Aço Inoxidável

O cartucho de pré-filtro de Aço Inoxidável (artigo no. 15070) destina-se para uso combinado com o Pré-filtro em PEEK 0,5 µm (artigo no. 15012).

3.2. Parâmetros do equipamento

As substâncias são separadas cromatograficamente usando uma coluna analítica (artigo no. 34300). Mantenha as fases móveis fechadas ou cobertas mesmo quando estiverem em uso. O uso de um forno de coluna vai evitar variações de temperatura e assegurar ótima estabilidade e reprodutibilidade da separação cromatográfica. Alternativamente, a separação também pode acontecer a temperatura ambiente.

Como a absorção máxima de retinol e α -tocoferol são diferentes, a detecção do comprimento de onda tem de mudar após o retinol ter sido eluído da coluna-HPLC para detectar o α -tocoferol, que elui depois. Portanto, o uso de um detector-UV programável que troque automaticamente a detecção do comprimento de onda é obrigatório.

Ajustes do instrumento:

Amostrador:	Módulo protegido da luz ou uso de frascos cor âmbar é recomendado
Volume de injeção:	5 a 20 μ L
Razão de fluxo:	0,8 mL/min
Temperatura da coluna:	35°C
Temperatura alternativa da coluna:	20 a 25°C
Tempo de execução a temperatura da coluna de 35 °C:	2,9 min
Detector UV:	
Tempo de execução a temperatura da coluna ambiente:	3,7 min
Detector UV:	Iniciar em $\lambda^{\max} = 325$ nm, após aprox. 1,15 a 1,40 min (dependendo da temperatura da coluna) mudar para 295 nm.
Solução de limpeza da agulha (injetor):	Metanol

Perfil gradiente:

A separação das substâncias é realizada por eluição isocrática usando Fase Móvel (artigo no. 34001).

3.3. Coluna HPLC

A coluna HPLC para análise de vitaminas A e E é fornecida equilibrada e testada, e está pronta para o uso. Pode ser usada diretamente. A contrapressão de uma coluna nova na razão de fluxo de 0,8 mL/min é de cerca de 80 ($\pm$ 10) bar a +35°C e cerca de 110 ($\pm$ 10) bar a 20°C. Valor que pode elevar com a idade e/ou uso da coluna. Enquanto as separações estiverem satisfatórias, a contrapressão elevada não tem importância.

Nota:

O uso de um pré-filtro (Pré-filtro encapsulado em PEEK 0,5 μ m, n° do pedido 15012) é necessário para garantir a vida útil exigida da coluna analítica.

A coluna só deve ser lavada com as soluções especificadas neste manual de instruções. Outros solventes podem danificar a coluna irreversivelmente.

3.4. Ligar o Sistema

Antes de iniciar uma sequência de testes, prepare o sistema HPLC da seguinte maneira:

1. Lave o sistema com aprox. 30 mL de Fase Móvel antes de instalar a coluna HPLC
2. Instale a coluna e equilibre o sistema num fluxo de 0,8 mL/min por cerca de 15-20 min com Fase Móvel, até a linha de base estabilizar
3. Injete o calibrador preparado diversas vezes até os tempos de retenção e áreas/alturas dos picos estejam consistentes
4. Compare o cromatograma com aquele do capítulo 7.2
5. Inicie a sequência

Depois disso, a fase móvel pode ser recirculada. Nós recomendamos o uso de uma nova Fase Móvel após 200 injeções.

Para uso apropriado do seu sistema HPLC, leia o manual de instrução do seu sistema HPLC. Se você tiver dúvidas, pergunte ao fabricante do equipamento. Treinamento do fabricante do equipamento pode ser requerido.

3.5. Shut down

Para interrupções na operação de até 3 dias, bombear a fase móvel a uma vazão baixa (0,1 mL/min). A coluna HPLC permanece conectada no sistema. Para proteger a lâmpada, desligue o detector.

Para longos períodos de desuso, a coluna HPLC deve ser desconectada. Limpeza ou conservação não é necessária. Armazenar a coluna na fase móvel a temperatura ambiente de +18°C a +30°C. A coluna deve ser substituída por uma união e o sistema HPLC limpo com cerca de 30 ml de água ultrapura (grau HPLC)/ H₂O/metanol (80/20 vol/vol).

4 Separação cromatográfica

A tabela a seguir mostra os tempos de retenção aproximados do analito e do padrão interno com razão de fluxo de 0,8 mL/min:

Tabela 1 Tempos de retenção

Substância	Tempo de Retenção (aprox.)	
	Temperatura da coluna: +35 °C	Temperatura da coluna: +20 °C
Retinol	0,9 min	1,0 min
Padrão Interno	1,5 min	1,9 min
α -tocoferol	2,5 min	3,3 min

Pequenas variações nos tempos de retenção podem ocorrer, por exemplo, devido a flutuações na temperatura ambiente. Se um novo lote de fase móvel é utilizado ou a coluna HPLC é substituída, o tempo de retenção pode mudar levemente, e deve ser atualizado.

5 Preparo da amostra

Atenção:

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

Assegure-se que com uma sequência o lote de reagentes usado (incluindo padrão interno) para o preparo da amostra, assim como o lote do calibrador e controle não mudem. Se necessário, junte a quantidade necessária de padrão interno de diversos vials.

5.1 Coleta e armazenamento das amostras de pacientes

A amostra a ser utilizada deve ser soro, plasma EDTA ou plasma em heparina para análise.

Notas importantes:

O sangue deve ser coletado pela manhã em jejum e antes de qualquer medicação. De outra forma, as amostras podem não representar o estado clinicamente relevante do paciente.

Baseado na experiência de diferentes grupos de trabalho, as recomendações para a coleta são as seguintes [7]:

- Coletar 1 – 2 ml de sangue.
- Após a centrifugação (2000 x g, 5 min) o soro/plasma obtido deve ser separado o mais rápido possível e armazenado em temperatura abaixo de -18 °C. Proteger a amostra da luz.

Estabilidade da amostra

Estabilidade do retinol e α -tocoferol foi determinada em soro, plasma com EDTA e heparina.

Tabela 2 Vida útil de armazenamento das amostras de paciente

Temperatura de armazenamento	Vida útil de armazenamento	Outras condições de armazenamento
+20 a +25 °C	1 semana	Protegido da luz, bem fechado
+2 a +8 °C	2 semanas	Protegido da luz, bem fechado
Abaixo de -18 °C	3 meses	Protegido da luz, bem fechado
Ciclos de congelamento-descongelamento	1 ciclo	Protegido da luz, bem fechado

Nota:

As seguintes condições da amostra produzem falsos resultados diminuídos e portanto, devem ser excluídos:

- Amostras hemolisadas de plasma e soro para a análise de α -tocoferol
- Amostras hemolisadas de soro para análise de retinol
- Amostras ictericas de plasma e soro para a análise de retinol, em caso de que a bilirrubina não conjugada e conjugada exceda 0,14 g/L

Para mais informação ver capítulo 11.

Nota:

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

5.2 Reconstituição do calibrador

O Padrão de Calibração em Soro da Chromsystems (artigo no. 34004) destina-se para a calibração do seu sistema de análise. O calibrador liofilizado é um calibrador pontual. É baseado em soro humano. Após a reconstituição, é preparado da mesma maneira que uma amostra de paciente e é analisado dentro da rotina em condições análogas ao respectivo procedimento do teste.

Antes da preparação da amostra, reconstitua o calibrador em soro (artigo 34004) como descrito a seguir:

1. Pipete 1,0 mL de água purificada no frasco
2. Reconstituir durante 10 a 15 min a +20 a +25 °C, agitar repetidamente

Confira que o conteúdo esteja homogêneo. Caso substâncias não dissolvidas estejam visíveis, aumente o tempo de reconstituição.

Os níveis do calibrador são rastreáveis a um material de referência padrão certificado do National Institute of Standards and Technology (NIST, Gaithersburg, MD, EUA). As concentrações do analito no calibrador são dependentes do lote. Os níveis individuais são indicados no folheto do calibrador.

Atenção: Este produto é fabricado a partir de um pool de soro humano que foi testado pelo fabricante e considerado negativo para infecções pelo vírus da imunodeficiência humana (HIV), vírus da hepatite B (HBV), vírus da hepatite C (HCV) e bactéria *Treponema pallidum*. No entanto, um risco potencial de infecção não pode ser totalmente excluído. Considere todos os produtos que contenham material de origem humana como potencialmente infecciosos e tenha o mesmo cuidado no manuseamento deste produto e no manuseamento de amostras de pacientes potencialmente infecciosas.

Estabilidade do calibrador reconstituído:

O calibrador reconstituído em água é estável nas seguintes condições, mas não além da data indicada no rótulo:

Tabela 3 Estabilidade do calibrador (artigo no. 34004) após reconstituição

Temperatura de Armazenamento	Estabilidade (vida útil)	Outras condições de armazenamento
+20 a +25 °C	3 dias	Proteção contra a luz, bem fechado
+2 a +8 °C	1 semana	Proteção contra a luz, bem fechado
Abaixo de -18 °C	2 meses	Proteção contra a luz, bem fechado
Ciclos de congelamento-descongelamento	3 ciclos	Proteção contra a luz, bem fechado

5.3 Reconstituição dos controles

Os Controles em Soro da Chromsystems (artigo no. 0036, 0037) destinam-se a monitorar a acurácia e precisão de cada sequência analítica. Eles estão disponíveis em dois níveis de concentração diferentes. Os controles liofilizados são baseados em soro humano. Após a reconstituição, eles são preparados da mesma maneira que uma amostra de paciente e são analisados dentro da rotina em condições análogas ao respectivo procedimento do teste.

Antes da preparação da amostra, reconstitua os controles em soro (artigo 0032, 0036, 0037) como descrito a seguir:

1. Pipete 2,0 mL de água purificada no frasco
2. Reconstituir durante 10 a 15 min a +20 a +25 °C, agitar repetidamente

Confira que o conteúdo esteja homogêneo. Caso substâncias não dissolvidas estejam visíveis, aumente o tempo de repouso.

As concentrações do analito no calibrador são dependentes do lote. Os níveis individuais são indicados no folheto do calibrador.

Atenção: Este produto é fabricado a partir de um pool de soro humano que foi testado pelo fabricante e considerado negativo para infecções pelo vírus da imunodeficiência humana (HIV), vírus da hepatite B (HBV), vírus da hepatite C (HCV) e bactéria *Treponema pallidum*. No entanto, um risco potencial de infecção não pode ser totalmente excluído. Considere todos os produtos que contenham material de origem humana como potencialmente infecciosos e tenha o mesmo cuidado no manuseamento deste produto e no manuseamento de amostras de pacientes potencialmente infecciosas.

Estabilidade do controle reconstituído:

O calibrador reconstituído em água é estável nas seguintes condições:

Tabela 4 Estabilidade dos controles (artigo no. 0036, 0037) após reconstituição

Temperatura de Armazenamento	Estabilidade (vida útil)	Outras condições de armazenamento
+20 a +25 °C	3 dias	Protegido da luz, bem fechado
+2 a +8 °C	1 semana	Protegido da luz, bem fechado
Abaixo de -18 °C	2 meses	Protegido da luz, bem fechado
Ciclos de congelamento-descongelamento	3 ciclos	Protegido da luz, bem fechado

5.4 Procedimento de preparo das amostras

Antes do preparo de amostra, deixe reagentes/calibradores/controles/amostras que são armazenados congelados ou refrigerados atingirem temperatura ambiente e homogeneíze.

5.4.1. Preparo de amostra com Vials de Reação

Para preparar amostras de paciente, controles e calibradores para análise, trabalhe seguindo os seguintes passos nesta ordem:

1. Pipete 100 µL de amostra/calibrador/controle em um Frasco de Reação 1,5 mL, cor âmbar (protegido da luz) (artigo no. 33005)
2. Adicione 200 µL de Padrão Interno (artigo no.34404), agitar por 30 s (vórtex).
3. Centrifugue 10 min a 9000 x g
4. Adicione 200 µL de Reagente de Precipitação (artigo no. 34405), agitar por 30 s (vórtex)
5. Centrifugue 2 min a 9000 x g
6. Transfira o sobrenadante em um vial de vidro para autosampler
7. Injete de 5 a 20 µL do sobrenadante no sistema HPLC

5.4.2. Preparo de amostra com Placas de 96 Poços Fundos

Para preparar amostras de paciente, controles e calibradores para análise, trabalhe seguindo os seguintes passos nesta ordem:

1. Pipete 100 µL de amostra/calibrador/controle em uma Placa de 96 Poços Fundos (artigo no. 34456)
2. Adicione 200 µL de Padrão Interno (artigo no. 34404), agitar 1 min a 1000 rpm
3. Centrifugue 5 min a 2000 x g
4. Adicione 200 µL de Reagente de Precipitação (artigo no. 34405), agitar 1 min a 1000 rpm
5. Centrifugue 5 min a 2000 x g
6. Transfira o sobrenadante em uma nova Placa de 96 Poços Fundos (artigo no. 34456) e sele com um Selo Adesivo com Fendas Cruzadas* (artigo no. 34459) ou com um Selo Térmico Perfurável (artigo no. 34760).
7. Injete de 5 a 20 µL do sobrenadante no sistema HPLC

*Uso dos filmes seladores "Selos Adesivos com Fendas Cruzadas para placas de 96 poços" (artigo no. 34459):

1. Remova a película protetora inferior na marcação vermelha
2. Cole o filme com o lado adesivo voltado para baixo
3. Remova a película protetora superior

5.5 Estabilidade das amostras preparadas

As amostras preparadas para análise

- de acordo com o capítulo 5.4.1 em vials de vidro para autosampler ou
- de acordo com o capítulo 5.4.2 em Placas de 96 Poços Fundos (artigo no. 34456) selados com Selos Adesivos com Fendas Cruzadas para placas de 96 poços (artigo no. 34459) ou Selos Térmicos Perfuráveis, (artigo no. 34760), desde que as vedações térmicas não tenham sido perfuradas

têm a seguinte duração de conservação:

Tabela 5 Tempo de vida útil de armazenamento das amostras preparadas em vials para autosampler com inserts de vidro (artigo no. J0505)/ Placas de 96 Poços Fundos selados com Selos Térmicos Perfuráveis (artigo no. 34760)

Temperatura de Armazenamento	Estabilidade (vida útil)	Outras condições de armazenamento
+20 a +25 °C	3 dias	protegido da luz, bem fechado
+2 a +8 °C	1 semana	protegido da luz, bem fechado
Abaixo -18 °C	2 semanas	protegido da luz, bem fechado
Ciclos de congelamento-descongelamento	1 ciclo	protegido da luz, bem fechado

Nota:

Quando forem usados os Selos Térmicos Perfuráveis, a estabilidade das amostras é consideravelmente reduzida se o filme tiver sido perfurado. A informação na tabela é pode ser usada como guia para a vida útil de armazenamento, levando em conta as quantidades do eluato, que depende fortemente das configurações do autosampler.

Tabela 6 Estabilidade das amostras preparadas em Placas de 96 Poços Fundos selados com Selos Adesivos de Fenda Cruzada (artigo no. 34459)

Temperatura de armazenamento	Estabilidade (vida útil)	Outras condições de armazenamento
+20 a +25 °C	3 dias	Protegido da luz, bem fechado
+2 a +8 °C	3 dias	Protegido da luz, bem fechado

5.6 Tratamento das amostras acima do intervalo de medição analítica

Amostras de pacientes cujas concentrações do analito estejam acima da faixa de medição analítica (ver Apêndice II) devem ser tratadas da seguinte maneira:

Antes do preparo da amostra, dilua a amostra do paciente com solução salina isotônica (9,0g/L NaCl) numa proporção de até 1:3 para que o resultado da análise independente do fator de diluição esteja dentro da faixa de medição do método.

Quando calculadas as concentrações dos analitos das amostras dos pacientes, o fator de diluição deve ser levado em conta.

6 Controle de Qualidade

A precisão e exatidão podem ser monitoradas pela adição de controles adicionais em cada corrida analítica (Chromsystems de vitaminas A e E em soro, artigos 0036 e 0037). Caso a análise desses controles mostre resultados fora do intervalo fornecido nos folhetos de informação, o sistema deve ser avaliado, e, se necessário, recalibrado.

Monitore a qualidade da separação cromatográfica pela comparação de tempos de retenção e formas dos picos cromatográficos dos analitos e dos padrões internos com o cromatograma do certificado de coluna ou com o cromatograma de exemplo (capítulo 7.2). Em caso de uma coluna em uso, compare com as corridas analíticas anteriores do mesmo ensaio (ex: enquanto é ligado o sistema, capítulo 3.4). Desvios significativos podem ocorrer devido à diminuição de desempenho do pré-filtro e/ou da coluna analítica. Indicadores típicos podem ser a formação de cauda nos picos ou formação de picos duplos.

Para mais informação ver capítulo 12 Problemas e Soluções.

7 Resultados e avaliação

7.1 Calibração do sistema de análise

Para calibrar seu sistema de análise e verificar o desempenho de separação do sistema HPLC, realize uma série de testes antes de analisar amostras de pacientes. Use o calibrador de soro (número de ordem 34004) para isso. As concentrações dos analitos no calibrador são dependentes do lote. Os níveis exatos são indicados no folheto informativo que acompanha.

Curvas de calibração são feitas calculando a razão entre a área do pico do analito e o padrão interno (ISTD) ou razão da altura do pico no eixo y em relação à concentração do calibrador no eixo x. Em seguida, trace uma curva de calibração desde a origem para todos os analitos (calibração pontual).

Selecione o método de padrão interno para calibração do seu sistema de análise e coloque a concentração do padrão interno como "1".

7.2 Exemplos de cromatogramas

Os seguintes gráficos fornecem diversos exemplos de cromatogramas criados usando este método detector-UV: λ (Início) = 325 nm; depois 1,15 minutos: λ = 295 nm).

7.2.1 A temperatura da coluna a 35 °C

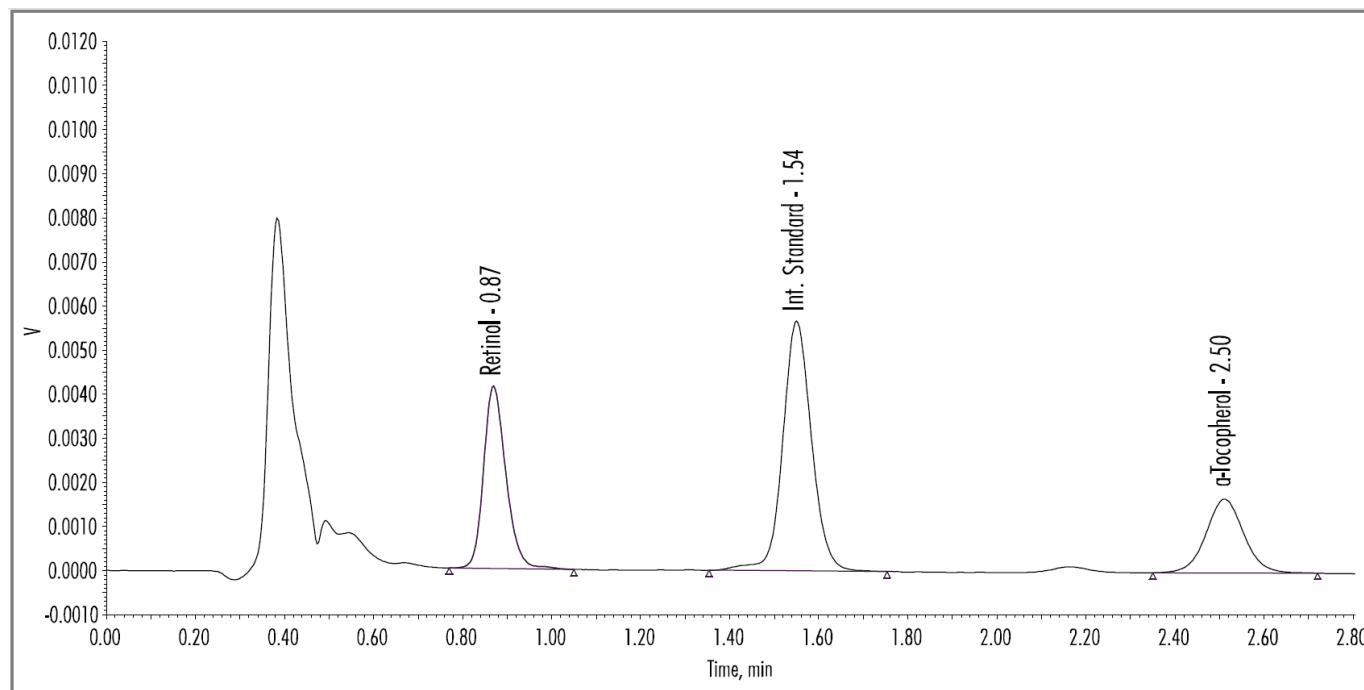


Figura 1: Cromatograma de um Padrão de Calibração em Soro (artigo no. 34004)
Concentração dos analitos: retinol 0,541 mg/L, α - tocoferol: 10,4 mg/L

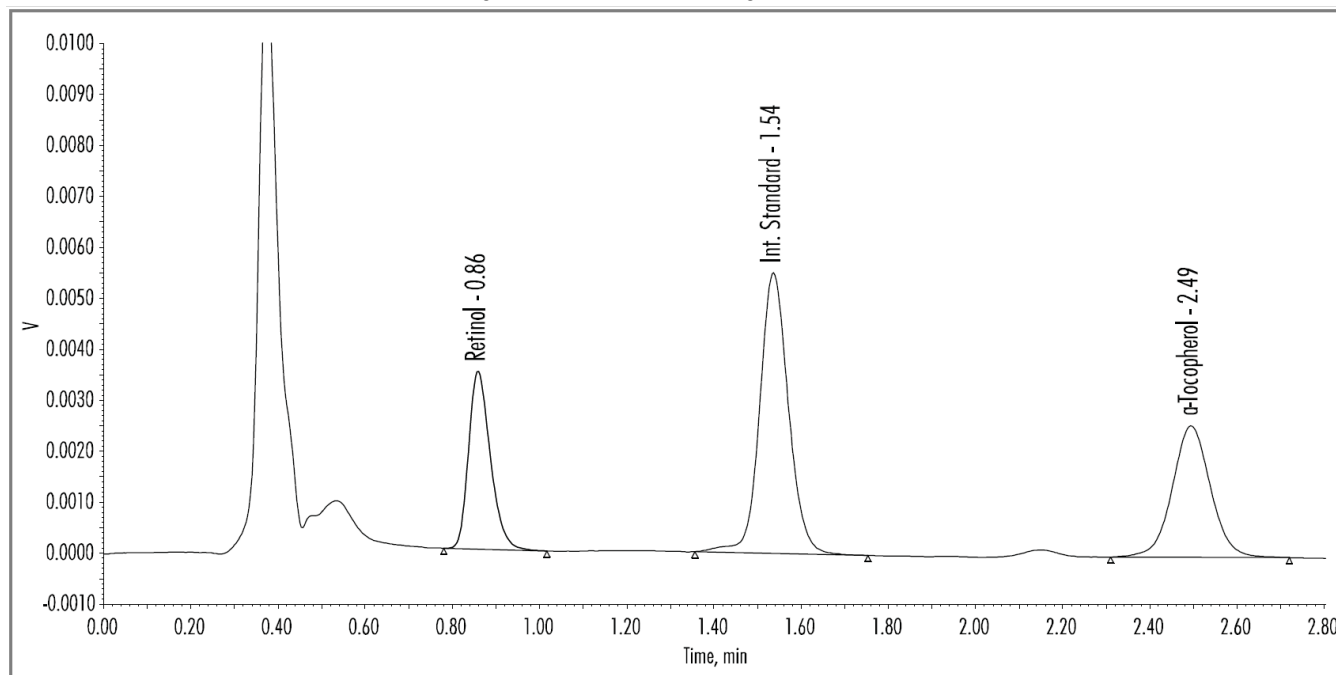


Figura 2: Cromatograma da amostra de um paciente em soro
Concentração dos analitos: retinol 0,475 mg/L, α - tocoferol: 16,9 mg/L

7.2.2 A temperatura ambiente da coluna

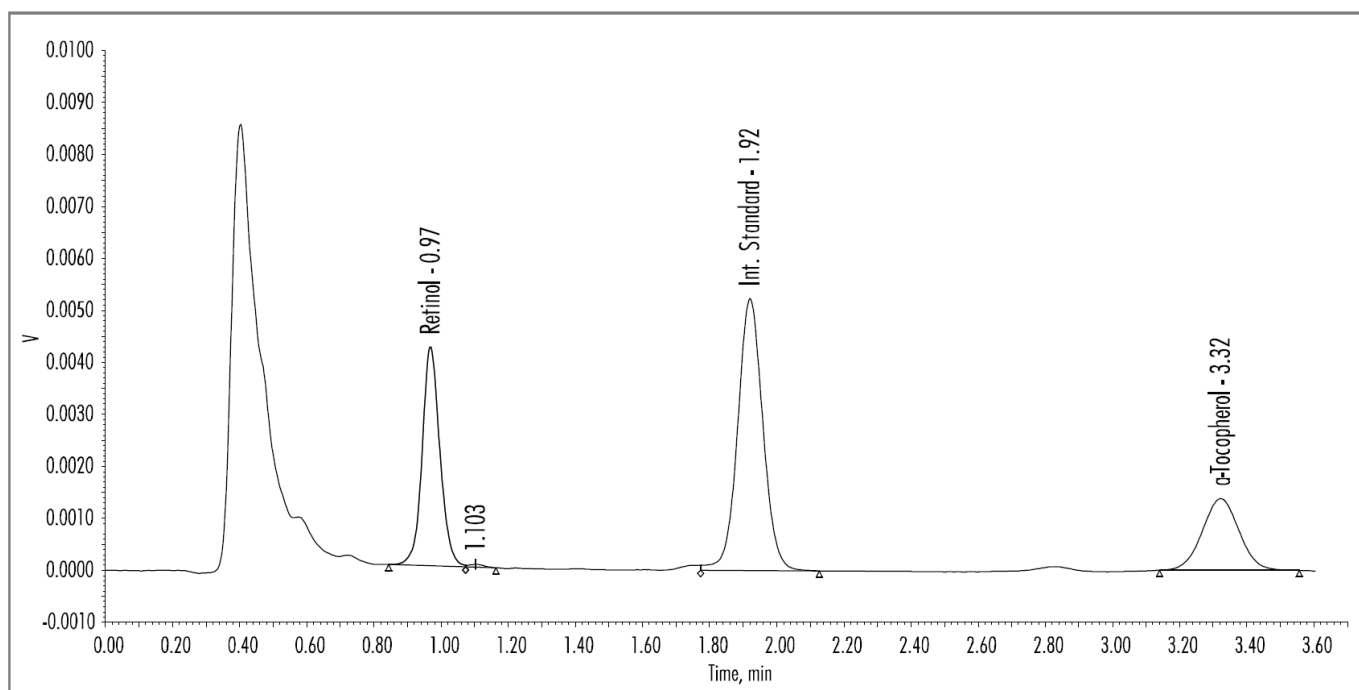


Figura 3: Cromatograma de um Padrão de Calibração em Soro (artigo no. 34004)
Concentração dos analitos: retinol 0,541 mg/L, α- tocoferol: 10,4 mg/L

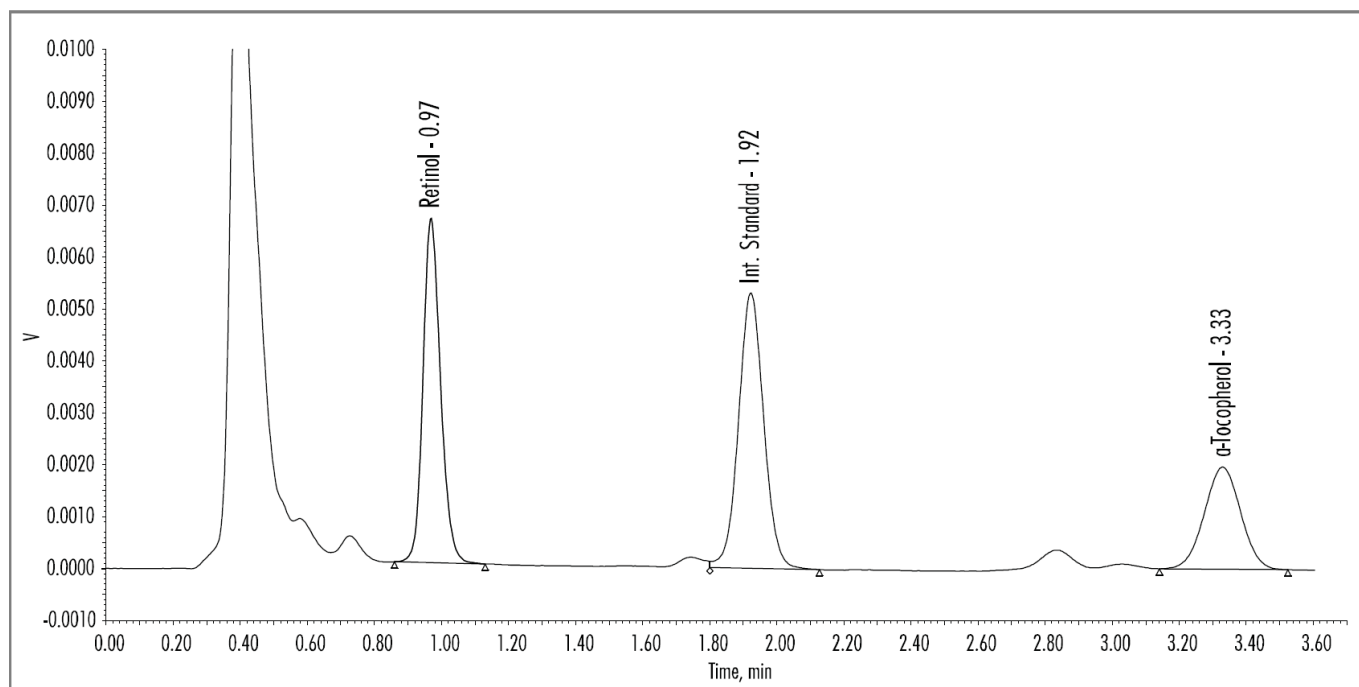


Figura 4: Cromatograma de uma amostra de paciente em soro
Concentração dos analitos: retinol 0,820 mg/L, α- tocoferol: 14,2 mg/L

7.3. Fatores de conversão

A seguinte tabela lista os fatores de conversão entre concentrações de massa e molares e vice-versa.

Tabela 7 Fatores de conversão

Substância	mg/L a $\mu\text{mol/L}$	$\mu\text{mol/L}$ a mg/L
Retinol	x 3,491	x 0,2865
α -Tocopherol	x 2,322	x 0,4307

7.4. Cálculo manual

Calibre o sistema de análise de acordo com o capítulo 7.1. Para cálculo manual os seguintes dados são necessários:

- Área/altura do pico da substância A no cromatograma da amostra = A_{amostra}
- Área/altura do pico do padrão interno no cromatograma da amostra = IS_{amostra}
- Desvio da curva de calibração ($A_{\text{calibrador}} / IS_{\text{calibrador}} / C_{\text{calibrador}}$) = a

Calcule a concentração do analito A na amostra C_{amostra} da seguinte maneira:

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

8 Armazenamento e validade dos reagentes

Reagentes não abertos podem ser utilizados até a data de validade estabelecida no rótulo, desde que as condições de estocagem indicadas no rótulo sejam obedecidas. Transporte e armazene os componentes nas seguintes condições:

Tabela 8 Condições de transporte para kit de reagentes e seus componentes

Produto	Temperatura
Kit de reagentes (artigo no. 34400, 34400-DWP)	+ 18 a + 30 °C
Kits básicos (artigo no. 34400-BK, 34400-DWP-BK)	+18 a + 30 °C
Todos os outros componentes listados no capítulo 1	+18 a +30 °C

Imediatamente após o transporte, abra o kit e armazene os produtos individualmente como descrito abaixo.

Tabela 9 Condições de armazenamento para os reagentes, calibrador e controles

Produto	Armazenamento
Fase móvel (artigo no. 34001)	+ 18 a + 30 °C
Padrão Interno (artigo no. 34404)	+2 a +8 °C
Reagente de Precipitação (artigo no. 34405)	+ 18 a + 30 °C
Soro Calibrador (artigo no. 34004)	abaixo de -18 °C
Controles em soro (artigo no. 0032, 0036, 0037)	abaixo de -18 °C

Os reagentes devem ser adequadamente fechados e armazenados nas condições estabelecidas imediatamente após o uso. Desde que nada além tenha sido estipulado, a estabilidade será de 1 ano após a data da abertura, mas, não excederá o prazo de validade. Para calibradores e controles, ver os capítulos 5.2 e 5.3.

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

A vida útil em uso da coluna HPLC e pré-filtro dependem das condições individuais em que eles são usados (ex: frequência de uso, número de amostras, tipo de amostras, volume de injeção). Considere dosagens de controle de qualidade (capítulo 6) para identificar diminuição do desempenho cromatográfico.

9 Descarte de resíduos

Resíduos perigosos

Fase Móvel (artigo no. 34001), o Padrão Interno (artigo no. 34404) e o Reagente de Precipitação (artigo no. 34405) contêm solventes orgânicos. Descarte os resíduos do produto em um recipiente de coleta para solventes orgânicos livres de halogênio.

Resíduos de amostras de pacientes e amostras preparadas, bem como controles e calibradores devem ser coletados e descartados como resíduos potencialmente infectantes.

As soluções mencionadas não devem ser eliminadas juntamente com os resíduos domésticos. Não circule na fonte principal de água. Eliminar em conformidade com a Diretriz 2008/98/CE relativa aos resíduos e com os requisitos nacionais e locais. Os contentores de resíduos devem ser armazenados de forma adequada e só é permitido o acesso a entidades autorizadas.

Resíduos não perigosos

Consumíveis não contaminados de laboratório não são classificados como perigosos. Descarte em conformidade com a Diretriz 2008/98/EC relativa aos resíduos e com os requisitos nacionais e locais.

10 Valores de referência

Os intervalos de referência citados são guias baseados na literatura. Eles podem diferir de outros dados publicados. Como os níveis variam dependendo da população de pacientes e do método de medição, determine intervalos de referência específicos para seu laboratório. Ao determinar intervalos, certifique-se de que cumpre os requisitos nacionais locais.

Por gentileza note que os níveis circulantes de retinol são controlados homeostaticamente por uma ampla gama de reserva no fígado e podem, portanto, não representar adequadamente as reservas totais no organismo de uma pessoa [1,3].

Níveis de retinol no soro, entretanto, tendem a ser mais baixos em infantes e crianças e valores de referência levando a idade em consideração aplicam, especialmente em infantes com menos de 6 meses de idade [2].

Tabela 10 Valores de referência de retinol: adultos

Detalhes	Retinol em soro		Fonte
Valor de referência	1,05 - 2,45 $\mu\text{mol/L}$	0,3 - 0,7 mg/L	[8]
Faixa tóxica	A partir de 4,9 $\mu\text{mol/L}$	A partir de 1,4 mg/L	[9]
Deficiência	Início: 0,35 - 0,66 $\mu\text{mol/L}$ Severa: <0,35 $\mu\text{mol/L}$	Início: 0,1 - 0,19 mg/L Severa: <0,1 mg/L	[9]
	< 0,70 $\mu\text{mol/L}$	< 0,20 mg/L	[10,11]

Tabela 11 Valores de referência de retinol: recém-nascidos, crianças e adolescentes

Substância/matriz	Faixa etária	Faixa de referência	Fonte
Retinol em soro/plasma	Adolescentes	1,0 - 2,1 $\mu\text{mol/l}$ 0,3 - 0,6 mg/l	[9]
Retinol em soro/plasma	Crianças (até 10 anos)	0,66 - 1,7 $\mu\text{mol/l}$ 0,2 - 0,5 mg/l	[9]
Retinol em soro/plasma	Bebês (até um ano)	0,53 - 1,4 $\mu\text{mol/l}$ 0,15 - 0,4 mg/l	[9]
Retinol em soro/plasma	Recém-nascidos	0,35 - 1,0 $\mu\text{mol/l}$ 0,1 - 0,3 mg/l	[9]
Retinol em soro/plasma	Ao nascimento	0,49 - 1,81 $\mu\text{mol/l}$ 0,14 - 0,52 mg/l	[12]
Retinol em soro	1-6 anos	0,7 - 1,5 $\mu\text{mol/l}$ 0,20 - 0,43 mg/l	[12]
Retinol em soro	7-12 anos	0,9 - 1,7 $\mu\text{mol/l}$ 0,26 - 0,49 mg/l	[12]
Retinol em soro	13-19 anos	0,9 - 2,5 $\mu\text{mol/l}$ 0,26 - 0,72 mg/l	[12]
Retinol em soro/plasma	Neonatos a termo (>37 semanas)	0,63 - 1,75 $\mu\text{mol/l}$ 0,18 - 0,50 mg/l	[12]
Retinol em soro/plasma	Neonatos pré-termo (<36,6 semanas)	0,46 - 1,61 $\mu\text{mol/l}$ 0,13 - 0,46 mg/l	[12]

Níveis de Vitamina E circulante devem ser interpretados com cautela, visto que o α -tocoferol no plasma ou soro somente é uma pequena parte das reservas do organismo e, portanto, podem não refletir adequadamente o consumo e as reservas teciduais. Além disso, α -tocoferol é ligado a lipoproteínas, então uma avaliação mais precisa do estado deve feita usando a proporção de α -tocoferol para lipídios totais ou colesterol [3,4,13,14].

Tabela 12 Valores de referência de α -tocoferol: adultos

Detalhes	Níveis de α -tocoferol	Fonte
Valor de referência em plasma	23 – 46 $\mu\text{mol/L}$ 9,9 – 19,8 mg/L	[13]
Valor de referência em soro	18,6 – 34,8 $\mu\text{mol/L}$ 8 – 15 mg/L	[15]
Manifestações agudas de deficiência	<11, 15 $\mu\text{mol/L}$ <4,8 mg/L	[16]
Deficiência associada com risco cardiovascular	<20 $\mu\text{mol/L}$ <8,6 mg/L	[16]
Excesso	>80 $\mu\text{mol/L}$ >34,5 mg/L	[13]

Tabela 13 Valores de referência para α -tocoferol normalizado por lipídio

Detalhes	Níveis de α -tocoferol normalizados por lipídio	Fonte
Razão normal em adultos	> 0,8 mg α -tocoferol por g total de lipídio	[13]
Razão normal em crianças	> 0,6 mg α -tocoferol por g total de lipídio	[13]
Deficiência de vitamina E	< 2,22 μmol α -tocoferol por mmol de colesterol	[17]
Deficiência de vitamina E	< 1,11 μmol α -tocoferol por mmol de lipídio	[17]
Deficiência de vitamina E	< 6,79 μmol α -tocoferol por mmol de triglicerídeos	[17]

Tabela 14 Valores de referência de α -tocoferol: recém-nascidos, crianças e adolescentes

Detalhe	Faixa etária	Faixa de referência	Fonte
α -tocoferol em soro/plasma	Adolescentes (13-19 anos)	14 – 23 $\mu\text{mol/l}$ 6 – 10 mg/l	[9]
α -tocoferol em soro/plasma	Crianças (1-12 anos)	7 – 21 $\mu\text{mol/l}$ 3 – 9 mg/l	[9]
α -tocoferol em soro/plasma	Neonatos pré-termo	2,3 – 11,6 $\mu\text{mol/l}$ 1 – 5 mg/l	[9]
α -tocoferol em soro	1-6 anos	7 – 21 $\mu\text{mol/l}$ 3,0 – 9,0 mg/l	[12]
α -tocoferol em soro	7-12 anos	10 – 21 $\mu\text{mol/l}$ 4,0 – 9,0 mg/l	[12]
α -tocoferol em soro	13-19 anos	13 – 24 $\mu\text{mol/l}$ 6,0 – 10,1 mg/l	[12]
α -tocoferol em soro/plasma	Prematuro	1 – 8 $\mu\text{mol/l}$ 0,5 – 3,5 mg/l	[12]
α -tocoferol em soro/plasma	Termo completo	2 – 8 $\mu\text{mol/l}$ 1,0 – 3,5 mg/l	[12]
α -tocoferol em soro/plasma	2 – 5 meses	5 – 14 $\mu\text{mol/l}$ 2,0 – 6,0 mg/l	[12]
α -tocoferol em soro/plasma	6 – 24 meses	8 – 19 $\mu\text{mol/l}$ 3,5 – 8,0 mg/l	[12]
α -tocoferol em soro/plasma	2 – 12 anos	13 – 21 $\mu\text{mol/l}$ 5,5 – 9,0 mg/l	[12]

11 Testes de Interferência

Amostras de soro humano ou amostras de soro preparadas foram enriquecidas com metabólitos, compostos estruturalmente relacionados e fármacos nas concentrações especificadas nas tabelas abaixo e, em seguida, testadas quanto à interferência.

Além disso, diferentes condições das amostras foram simuladas e sua influência no teste foi examinada. Diferentes sistemas de amostragem foram também testados para interferências.

11.1 Interferentes detectados

Este capítulo lista substâncias para as quais foi observada uma influência significativa nos resultados quantitativos (> 15% de desvio) ou outros tipos de interferências. A tabela a seguir mostra as substâncias em questão, suas concentrações de teste e os efeitos observados na análise

Tabela 15: Metabólitos interferentes

Substância	Conc. [μmol/L]	Analito afetado	Efeito na análise
All-trans-13,14-diidro retinol	> 1	Vitamina A (retinol)	Aumenta os níveis determinados de vitamina A (retinol)
7-Desidrocolesterol	> 608	Vitamina E (α-tocoferol)	Aumenta os níveis determinados de vitamina E (α-tocoferol)

Tabela 16: Fármacos interferentes

Substância	Conc. [μmol/L]	Analito afetado	Efeito na análise
Ranitidina (antagonista H2)	10,5	Vitamina A (retinol)	Aumenta os níveis determinados de vitamina A (retinol)
Trazodona (antidepressivo)	14,7	Vitamina A (retinol)	Aumenta os níveis determinados de vitamina A (retinol)

Hemólise

Amostras de soro e plasma foram enriquecidas com hemoglobina (10 g/L) e as concentrações dos analitos medidas foram comparadas com as da amostra original.

A medição de amostras hemolisadas pode levar a resultados falsamente baixos. Todas as amostras hemolisadas (soro e plasma) devem ser excluídas da análise de α-tocoferol. Da análise de retinol, amostras de soro hemolisadas devem ser excluídas.

Icterícia

Amostras de soro e plasma foram enriquecidas com bilirrubina não conjugada e conjugada (0,4 g/L) e as concentrações dos analitos medidas foram comparadas com as da amostra original.

A medição de amostras ictericas pode levar a resultados falsamente baixos. Amostras ictericas (plasma e soro) devem ser excluídas da análise de retinol, caso as concentrações de bilirrubina não conjugada e conjugada excedam 0,14 g/L.

Tabela 17: Resumo do uso de amostras hemolíticas, ictericas e lipêmicas

Condição da amostra	α -tocoferol		Retinol	
	Soro	Plasma	Soro	Plasma
Hemolítica	Não mensurável	Não mensurável	Não mensurável	Totalmente mensurável
Ictérica	Totalmente mensurável	Totalmente mensurável	Mensurável até 0,14g/L de bilirrubina	Mensurável até 0,14g/L de bilirrubina
Lipêmica	Totalmente mensurável	Totalmente mensurável	Totalmente mensurável	Totalmente mensurável

Sistemas de coleta de soro

Os sistemas de coleta foram preenchidos até um terço de seu volume nominal com amostras de soro e incubados por 24 horas a +2 a +8 °C no escuro. As concentrações dos analitos foram medidas e comparadas com as da amostra original.

Ocorreram interferências para os seguintes sistemas de coleta (desvio > 15%):

Tabela 18: Sistema de coleta de soro causador de interferências

Tipo	Fabricante	Nº do pedido	Volume [mL]	Descrição
Ativador de Coágulo Sanguíneo	Greiner	456073	5	Vacurette CAT Serum Separator Clot Activator

Ao utilizar este tipo de sistema de amostragem de soro, foram observados picos de interferência imediatamente antes da eluição do α -tocoferol. A interferência é suficientemente separada do pico do analito. Com a integração correta, a determinação precisa dos níveis de α -tocoferol não é afetada.

11.2 Nenhuma interferência detectada

As seguintes substâncias foram testadas e apresentaram influência desprezível sobre os resultados quantitativos (desvio $\leq$ 15%). A tabela abaixo mostra as substâncias em questão e suas concentrações de teste.

Tabela 19 Substâncias testadas e suas concentrações - metabolitos

Substância	Concentração do teste em matriz [μ mol/L]
8-Deidrocolesterol	676
All-trans retinal	0,387
All-trans ácido retinóico	0,38
4-Ceto retinol	2,5
All-trans-13, 14-dihidro retinol	2,5
Acetato retinil	2,5
Palmitato retinil	0,214
α -Tocotrienol	4,93
β -Tocoferol	0,2
γ -Tocoferol	66,36
δ -Tocoferol	27,6
α -Carboxi-etil-hidroxi-croman (α CEHC)	0,0273

Tabela 20 Substâncias testadas e suas concentrações - drogas

Substância	Concentração do teste em matriz [mg/L]
25-OH-vitamina D ₃	0,10
Acetaminofeno	156
Ácido acetilsalicílico	30,0
Alopurinol	60,0
Alprazolam	0,258
Amlodipina	0,0750
Amoxicilina	54,0
Anfetamina/ dexamfetamina	0,330
Apixaban	0,315
Atenolol	9,00
Atorvastatina	0,750
Azitromicina	11,1
Bisoprolol	0,258
Bupropion	0,396
Candesartan	0,551
Carvedilol	0,233
Cefuroxim	543
Citalopram	5,43
Clonazepam	0,300
Clopidogrel	0,00169
Ciclobenzaprina	0,102
Diclofenaco	24,0
Duloxetina	0,162
Edoxaban	1,01
Empagliflozin	0,929
Enalapril	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
Ipratropium	0,00300
Lercanidipina	0,0407

Levotiroxina	0,429
Lisinopril	0,246
Lorazepam	0,720
Losartana	0,836
Meloxicam	6,00
Metamizola	206
Metformina	12,0
Metocarbamol	123
Metilfenidato	0,108
Metilprednisolona	0,480
Metoprolol	2,25
Montelukast	1,50
Nebivolol	1,65
Noscapina	0,0300
Omeprazol/ esomeprazol	0,810
Pantoprazol	8,40
Fenprocumon	30,0
Pravastatina	15,0
Prednisolona	1,20
Pregabalina	0,0990
Propanolol	1,01
Ramipril	0,156
Ranitidina	10,5
Rivaroxaban	2,70
Rosuvastatina	0,111
Salbutamol/ albuterol	0,0450
Sertralina	0,927
Simvastatina	0,0831
Sitagliptina	1,15
Espironolactona	0,555
Tamsulosina	0,0338
Tilidina	0,368
Torasemida	83,1
Tramadol	3,14
Trazodona	14,7
Triamcinolona	0,322
Valsartan	11,7
Venlafaxina	0,696
Zolpidem	0,816

Condições simuladas das amostras:

Hemólise

Amostras de plasma e soro foram enriquecidas com hemoglobina (10 g/L) e as concentrações dos analitos dosadas foram comparadas com aqueles da amostra original.

Nenhuma interferência significativa foi observada para EDTA hemolítico e plasma heparina para retinol (desvio $\leq 15\%$).

Lipemia

Amostras de plasma e soro foram enriquecidas com uma emulsão de lipídios (em uma concentração de 0,67 a 10 g/L). e as concentrações dos analitos dosadas foram comparadas com aqueles da amostra original.

Nenhuma interferência significativa foi observada para amostras lipêmicas de soro e plasma para ambos analitos (desvio $\leq 15\%$).

Icterícia

Amostras de plasma e soro foram enriquecidas com bilirrubina não conjugada e conjugada (0,4 g/L cada) e as concentrações dos analitos dosadas foram comparadas com aqueles da amostra original.

A análise de retinol é possível para todas as amostras ictericas (soro e plasma) em caso de que as concentrações de bilirrubina não conjugadas e conjugadas não excedam 0,14 g/L.

Nenhuma interferência significativa foi observada para amostras ictericas de soro e plasma para α -tocoferol (desvio $\leq 15\%$).

Sistemas de coleta

Sistemas de coleta foram preenchidos até um terço de seu volume nominal com amostras de soro ou plasma e incubados por 24 horas de +2 a +8°C no escuro. Concentrações do analito foram dosadas e comparadas com aquelas da amostra original.

Os seguintes sistemas de amostragem foram testados sem nenhuma interferência significativa; os resultados quantitativos não foram afetados (desvio $\leq 15\%$):

Tabela 21: Sistemas de amostragem que não causam interferências

Tipo	Fabricante	Artigo no.	Volume [mL]	Descrição
Soro Gel	Sarstedt	01.1602	7,5	S-Monovette® Serum Gel
Soro CAT	BD	368032	4	Vacutainer CAT
Soro SST	BD	367957	3,5	Vacutainer SST II advance
Ativador de Coagulação em Soro*	Greiner	456073	5	Vacurette CAT Serum Separator Clot Activator

* se pico interferente for considerado, ver tabela 18.

Tabela 22 Sistemas de amostragem de plasma que não causam interferências

Tipo	Fabricante	Artigo no.	Volume [mL]	Descrição
EDTA (K3E)	Sarstedt	01.1605.001	7,5	S-Monovette ® 1,6 mg K3-EDTA/mL, spray-dried
EDTA (K3E)	Greiner	454036	4	Vacurette ® 1,6 mg K3-EDTA/mL, spray-dried
EDTA (K2E)	Greiner	454209	4	Vacurette ® 1,6 mg K2-EDTA/mL, spray-dried
K2-EDTA (K2E)	BD	368861	4	Vacutainer ® 7,2 mg K2-EDTA/mL, spray-dried
heparina-Li (LH)	BD	368886	6	Vacutainer ® 102 I.U./ML Li-heparin, spray-dried
heparina-Na (NH)	Sarsted	01.1613.100	7,5	S-Monovette ® 16 I.U./mL Na-heparin, granulate

Se houver dúvidas concernentes a interferências, contate seu representante local Chromsystems ou nosso staff de suporte da Chromsystems ligando no telefone +49 89 18930-111 ou por e-mail a support@chromsystems.com.

12 Problemas e Soluções

Tabela 23 Solução de problemas

Problema	Possível causa	Solução
Flutuações na linha de base	Lâmpada do detector ainda não aquecida	Aguardar
	Lâmpada do detector velha	Substituir a lâmpada
	Sistema ainda não equilibrado	Repetir a injeção do padrão até que dois cromatogramas consecutivos sejam quase idênticos
	Fluxo inconstante	Verificar a bomba do HPLC
	Variações de temperatura	Use forno de coluna
Linha de base instável	Bomba do HPLC	Verificar a bomba do HPLC (ar, selos)
	Ar no sistema	Degaseificar a fase móvel
	Célula do detector contaminada	Limpar a célula
	Fase móvel contaminada	Renove a fase móvel
Picos interferentes	Ar no sistema	Degaseificar a fase móvel
	Injetor contaminado	Limpar o injetor
	Frascos do amostrador automático contaminados	Usar frascos novos ou limpá-los com metanol

	Seringa de injeção contaminada	Limpar a seringa com metanol
	Coluna HPLC contaminada	Substituir a coluna
	Amostras não armazenadas adequadamente	Utilizar amostras recentes
	Interferências	Verifique a amostra para interferências conhecidas
Alargamento de picos, cauda	Coluna HPLC velha	Substituir a coluna
	Pré-filtro contaminado	Substitua o pré-filtro
Picos duplicados	Volume morto nas conexões	Substituir as conexões
	Volume morto na coluna HPLC	Substituir a coluna
Sem picos	Vazamento no sistema	Verificar o injetor, pressão
	Conexão com integrador ou impressora defeituosa ou interrompida	Verificar o sinal do cabo e as conexões
Sem sinal	Lâmpada do detector	Verificar a voltagem da lâmpada, substituir se necessário
	Lâmpada do detector velha	Substituir a lâmpada
Sensibilidade diminuindo	Célula do detector contaminada	Limpar a célula
	Válvula de injeção defeituosa	Avaliar o injetor
Mudanças no tempo de retenção	Variações de temperatura	Usar forno de coluna
	Razão de fluxo instável pulsção da bomba	Avaliar bomba do HPLC
	Sistema não está equilibrado	Repetir a injeção do padrão até que dois cromatogramas consecutivos sejam quase idênticos
	Interferência	Verifique o cromatograma para interferência
Controle de qualidade fora da faixa aceitável	Incorreto preparo de amostra	Verifique a reprodutibilidade dos resultados incorretos
	Insuficiente proteção da luz	Use vials âmbar

Se você tiver dúvidas a respeito de solução de problemas, contate seu representante local Chromsystems ou nosso staff de suporte da Chromsystems ligando diretamente para +49 89 18930-111 ou por e-mail a support@chromsystems.com.

13 Literatura

- 1 Rajwar E, Parsekar SS, Venkatesh BT, Sharma Z: Effect of vitamin A, calcium and vitamin D fortification and supplementation on nutritional status of women: an overview of systematic reviews. *Syst Rev* 2020; 9:248.
- 2 Tanumihardjo SA, Russell RM, Stephensen CB, Gannon BM, Craft NE, Haskell MJ, et al.: Biomarkers of Nutrition for Development (BOND)-Vitamin A Review. *J Nutr* 2016; 146:1816S-48S.
- 3 Lindkvist B, Phillips ME, Domínguez-Muñoz JE: Clinical, anthropometric and laboratory nutritional markers of pancreatic exocrine insufficiency: Prevalence and diagnostic use. *Pancreatol* 2015; 15:589–597.
- 4 Malik A, Eggersdorfer M, Trilok-Kumar G: Vitamin E status in healthy population in Asia: A review of current literature. *Int J Vitam Nutr Res* 2021; 91:356–369.
- 5 Lewis C-A, Jersey S de, Hopkins G, Hickman I, Osland E: Does Bariatric Surgery Cause Vitamin A, B1, C or E Deficiency? A Systematic Review. *Obes Surg* 2018; 28:3640–3657.
- 6 Vries JJ de, Chang AB, Bonifant CM, Shevill E, Marchant JM: Vitamin A and beta (β)-carotene supplementation for cystic fibrosis. *Cochrane Database Syst Rev* 2018; 8:CD006751.
- 7 Spilker M (ed): Mineralstoffe, Spurenelemente und Vitamine. Klinische Aspekte und chemische Analyse. Verl. Bertelsmann-Stiftung, Gütersloh, 1997.
- 8 Chang SW, Kim MB, Kang JW: High serum folate level is positively associated with pulmonary function in elderly Korean men, but not in women. *Sci Rep* 2022; 12:4523.
- 9 Gressner AM, Arndt T: Lexikon der Medizinischen Laboratoriumsdiagnostik. Springer Berlin Heidelberg, Berlin, Heidelberg, 2019.
- 10 West KP: Vitamin A deficiency disorders in children and women. *Food Nutr Bull* 2003; 24:S78-90.
- 11 WHO: Serum retinol concentrations for determining the prevalence of vitamin A deficiency in populations. A field guide to detection and control, ed 3. World Health Organization, Geneva, 2011.
- 12 Soldin SJ (ed): Pediatric reference intervals, ed 7. AACC Press, Washington, DC, 2011.
- 13 Okebukola PO, Kansra S, Barrett J: Vitamin E supplementation in people with cystic fibrosis. *Cochrane Database Syst Rev* 2020; 9:CD009422.
- 14 Koekkoek WACK, van Zanten ARH: Antioxidant Vitamins and Trace Elements in Critical Illness. *Nutr Clin Pract* 2016; 31:457–474.
- 15 Boltshauser E, Weber KP: Laboratory investigations. *Handb Clin Neurol* 2018; 154:287–298.
- 16 Ford ES, Sowell A: Serum alpha-tocopherol status in the United States population: findings from the Third National Health and Nutrition Examination Survey. *Am J Epidemiol* 1999; 150:290–300.
- 17 Thurnham DI, Davies JA, Crump BJ, Situnayake RD, Davis M: The use of different lipids to express serum tocopherol: lipid ratios for the measurement of vitamin E status. *Ann Clin Biochem* 1986; 23 (Pt 5):514–520.
- 18 Kerver JM, Holzman CB, Tian Y, Bullen BL, Evans RW, Scott JB: Maternal Serum Antioxidants in Mid Pregnancy and Risk of Preterm Delivery and Small for Gestational Age Birth: Results from a Prospective Pregnancy Cohort. *J Womens Health (Larchmt)* 2021; 30:1233–1242.
- 19 Zhang X, Goel V, Attarwala H, Sweetser MT, Clausen VA, Robbie GJ: Patisiran Pharmacokinetics, Pharmacodynamics, and Exposure-Response Analyses in the Phase 3 APOLLO Trial in Patients With Hereditary Transthyretin-Mediated (hATTR) Amyloidosis. *J Clin Pharmacol* 2020; 60:37–49.
- 20 Al-Saleh I, Alrushud N, Alnuwaysir H, Elkhatib R, Shoukri M, Aldayel F, et al.: Essential metals, vitamins and antioxidant enzyme activities in COVID-19 patients and their potential associations with the disease severity. *Biometals* 2022; 35:125–145.
- 21 Lourenço BH, Silva LL, Fawzi WW, Cardoso MA: Vitamin D sufficiency in young Brazilian children: associated factors and relationship with vitamin A corrected for inflammatory status. *Public Health Nutr* 2020; 23:1226–1235.
- 22 Castillo-Valenzuela O, Duarte L, Arredondo M, Iñiguez G, Villarroel L, Pérez-Bravo F: Childhood Obesity and Plasma Micronutrient Deficit of Chilean Children between 4 and 14 Years Old. *Nutrients* 2023; 15.
- 23 Ottone T, Faraoni I, Fucci G, Divona M, Travaglini S, Bellis E de, et al.: Vitamin C Deficiency in Patients With Acute Myeloid Leukemia. *Front Oncol* 2022; 12:890344.

- 24 Biswas P, Dellanoce C, Vezzoli A, Mrakic-Spota S, Malnati M, Beretta A, et al.: Antioxidant Activity with Increased Endogenous Levels of Vitamin C, E and A Following Dietary Supplementation with a Combination of Glutathione and Resveratrol Precursors. *Nutrients* 2020; 12.
- 25 Colsohl M-L, Goderniaux N, Onorati S, Dupuis S, Jamart J, Vanpee D, et al.: Biological effect of cigarette smoking in endothelial dysfunction: Study of biomarkers of endothelial function, oxidative stress, inflammation, and lipids. *EUR J ENV PUBLIC HLT* 2023; 7:em0136.
- 26 Colsohl M-L, Goderniaux N, Onorati S, Dupuis S, Jamart J, Vanpee D, et al.: Changes in biomarkers of endothelial function, oxidative stress, inflammation and lipids after smoking cessation: A cohort study. *Eur J Clin Invest* 2023; e13996.
- 27 Cruz NRC, Valente TNS, Ferreira FO, Macedo LR de, Rocha AdSB, Nascimento DP, et al.: Lipid profile and nutritional status of a pediatric population with sickle cell anemia: differences between gender and association with severity markers. *RSD* 2021; 10:e344101018934.
- 28 Laimer J, Höller A, Pichler U, Engel R, Neururer SB, Egger A, et al.: Nutritional Status in Patients with Medication-Related Osteonecrosis of the Jaw (MRONJ). *Nutrients* 2021; 13.
- 29 Rodrigues CZ, Correia TC, Neves PAR, Malta MB, Cardoso MA, Lourenço BH: Predictors of 25-hydroxyvitamin D concentrations during pregnancy: A longitudinal analysis in the Brazilian Amazon. *Eur J Clin Nutr* 2022; 76:1281–1288.

Apêndice I Informações de substância

As seguintes informações devem ser observadas e as respectivas medidas de segurança deverão ser adotadas. Maiores informações podem ser obtidas nas respectivas fichas de segurança dos materiais ou mediante solicitação. Estas podem ser baixadas dos sites www.grupokovalent.com.br; www.chromsystems.com.

Tabela 24: Declarações de perigo e precauções

Pictogramas	Declarações de perigo e precauções
Fase móvel (artigo 34001)   	Componentes: 50-100% metanol Perigo H225 Líquido e vapor altamente inflamáveis. H301+H311+H331 Tóxico por inalação, ingestão e contato com a pele. H370 Pode causar danos aos órgãos. P210 Manter longe de aquecimento, superfícies quentes, faíscas, chamas, ou outras fontes de ignição. Não fumar. P280 Utilizar roupa de proteção, luvas adequadas, proteção nos olhos e na face. P301+P310 Em caso de ingestão: ligue imediatamente para um centro de intoxicação ou médico. P302+P352 Em caso de contato com a pele: lave abundantemente com sabão e água. P403+P233 Armazenar em local bem ventilado. Manter bem fechado.
Reagente de Precipitação (artigo 34005)  	Componentes: 50- 100 % propano-2-ol, ≤ 2,5 % metanol Perigo H225 Líquido e vapor altamente inflamáveis. H319 Causa danos severos aos olhos. H336 Pode causar sonolência e vertigem. P210 Manter longe de aquecimento, superfícies quentes, faíscas, chamas, ou outras fontes de ignição. Não fumar. P241 Usar equipamento a prova de explosão/eletricidade P243 Tome ação para prevenir descargas estáticas P261 Evite inalar fumaças/vapores/spray P305+P351+P338 Em caso de contato com os olhos: Lave cautelosamente com água por vários minutos. Remova lentes de contato, se presentes e de fácil remoção. Continue lavando. P403+P233 Armazene em um lugar bem ventilado. Mantenha o recipiente bem fechado.
Padrão Interno (artigo 34404)  	Componentes: 50-100% propan-2-ol Perigo H225 Líquido e vapor altamente inflamáveis. H319 Causa danos severos aos olhos. H336 Pode causar sonolência e vertigem. P210 Manter longe de aquecimento, superfícies quentes, faíscas, chamas, ou outras fontes de ignição. Não fumar. P241 Usar equipamento a prova de explosão/eletricidade

P243 Tome ação para prevenir descargas estáticas
P261 Evite inalar fumaças/vapores/spray
P305+P351+P338 Em caso de contato com os olhos: Lave cautelosamente com água por vários minutos. Remova lentes de contato, se presentes e de fácil remoção. Continue lavando.
P403+P233 Armazene em um lugar bem ventilado. Mantenha o recipiente bem fechado.

Esses componentes não são classificados como perigosos de acordo com a legislação da União Europeia:

Soro padrão de calibração (artigo 34004) Componentes: soro humano

Soros controles (artigos 0032, 0036, 0037) Componentes: soro humano

Apêndice II Dados de desempenho analítico

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

- Shimadzu LC-20 com detector UV Shimadzu SPD-20AV
- Shimadzu LC-30 com detector UV Shimadzu SPD-20AV
- Shimadzu LC-40 com detector UV Shimadzu SPD-40V

Usuários que desejarem usar o ensaio HPLC “Vitaminas A e E em plasma/soro” (artigo no. 34400 e 34400-DWP) com um sistema HPLC diferente dos especificados aqui devem validar o método.

Áreas dos picos foram usados para calcular os resultados ao longo da avaliação do desempenho clínico.

Rastreabilidade metrológica e confiabilidade:

Para o Padrão de Calibração no Soro (artigo no. 34004) a rastreabilidade metrológica foi demonstrada e está disponível como cadeia de rastreabilidade (ver Apêndice IV).

Confiabilidade da dosagem foi demonstrada dentro do processo de avaliação de desempenho analítico baseado nas seguintes estratégias devido à ausência de um método de referência ou material de referência:

- Determinação da recuperação relativa
- Medição dos materiais padrões de referência e participação no esquema de proficiência (disponível no centro de downloads de nosso site: www.chromsystems.com/downloadcenter.html)

Faixa de medição analítica

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

Limite superior de quantificação (ULOQ) foi determinado enriquecendo amostras de plasma e soro com quantidades definidas de substâncias padrão. O limite inferior de quantificação (LLOQ) foi determinado usando diluições definidas de amostras de plasma e soro com matriz livre de analitos.

Tabela 25 Limite inferior e superior de quantificação, determinação com Shimadzu LC-30 + SPD-20AV (LLOQ) e com Shimadzu LC-40 + SPD-40V (ULOQ)

Substância (matriz)	LLOQ	ULOQ
Retinol (plasma)	0,011 mg/L	5,00 mg/L
Retinol (soro)	0,019 mg/L	5,01 mg/L
α-Tocoferol (plasma)	0,49 mg/L	45,0 mg/L
α-Tocoferol (soro)	0,27 mg/L	45,0 mg/L

Precisão (repetibilidade e precisão intra-laboratorial)

Os dados de desempenho foram determinados com base em 3 diferentes amostras por matriz em processamento duplo em 20 dias diferentes com 2 corridas por dia. O procedimento é baseado no CLSI EP05-A3 e corresponde a um teste 20 x 2 x 2.

Tabela 26 Precisão (repetibilidade & precisão intra-laboratorial), determinação com Shimadzu LC-20 + SPD-20AV

Substância	Amostra	Média [mg/L]	Repetibilidade		Precisão intra-laboratorial	
			Coeficiente de variação	Intervalo de 95% de confiança	Coeficiente de variação	Intervalo de 95% de confiança
Retinol	Plasma baixo	0,132	2,2	1,8-2,8	3,7	3,1-4,8
	Plasma médio	0,535	1,4	1,2-1,8	3,6	3,0-4,7
	Plasma alto	0,829	1,5	1,2-1,9	3,4	2,7-4,4
	Soro baixo	0,116	3,6	3,0-4,6	5,4	4,5-6,7
	Soro médio	0,486	1,4	1,1-1,7	3,1	2,5-3,9
	Soro alto	1,03	1,2	1,0-1,5	3,1	2,5-4,0
α-Tocoferol	Plasma baixo	3,01	1,6	1,3-2,1	4,9	4,0-6,3
	Plasma médio	12,3	1,8	1,5-2,3	2,7	2,3-3,3
	Plasma alto	18,2	1,7	1,4-2,2	2,5	2,1-3,1
	Soro baixo	3,21	2,5	2,1-3,2	4,8	3,9-6,2
	Soro médio	11,7	1,4	1,2-1,8	2,9	2,4-3,6
	Soro alto	17,2	1,2	1,0-1,6	2,8	2,3-3,7

Carry over

Uma amostra preparada de plasma com uma concentração de analito na faixa do limite superior de quantificação foi analisada entre diversas amostras em branco. As concentrações do analito das amostras em branco antes de depois das amostras com nível alto foram comparadas. Em caso de carry-over significativo, a quantidade foi calculada numa base de porcentagem em relação à amostra precedente.

Revisão dos dados, determinados em Shimadzu LC-20 +SPD-20AV não mostrou efeitos de carry-over. Em todos os casos a concentração medida da amostra em branco foi abaixo do limite de quantificação.

Robustez

O efeito das modificações definidas no preparo de amostra e a instalação o sistema de HPLC foram avaliados. O método é robusto dentro das seguintes tolerâncias fornecidas, desde que a configuração específica permaneça constante durante toda uma série de medições:

Tabela 27 Faixas de tolerância no sistema HPLC

Sistema HPLC	Faixa de tolerância
Temperatura de coluna 35 °C	30-40 °C
Temperatura ambiente da coluna	20-25 °C
Volume de injeção	5-20 µL

Tabela 28 Faixas de tolerância no preparo de amostra em frascos de reação

Preparo de amostra (de acordo com o capítulo 5.4.1)	Faixa de tolerância
Passo 2: Tempo de agitação	Agite 15-60 s (vórtex)
Passo 3: Parâmetro de centrifugação	Centrifugue 5-15 min a 4500 - 15000 x g
Passo 4: Tempo de agitação	Agite 15-60 s (vórtex)
Passo 5: Parâmetro de centrifugação	Centrifugue 1-3 min a 4500 - 15000 x g

Tabela 29: Faixas de tolerância no preparo de amostras com placas de 96 poços fundos

Preparo de amostra (de acordo com o capítulo 5.4.1)	Faixa de tolerância
Passo 2: Tempo de agitação	Agite 0,5-5 min de 800-1200 rpm, à órbita 2 mm
Passo 3: Parâmetro de centrifugação	Centrifugue 3-7 min de 1000 - 2900 x g
Passo 4: Tempo de agitação	Agite 0,5-5 min de 800-1200 rpm, à órbita 2 mm
Passo 5: Parâmetro de centrifugação	Centrifugue 3-7 min de 1000 - 2900 x g

Estes dados foram estabelecidos no nosso laboratório unicamente para verificar o desempenho do kit de reagentes e para estar de acordo com requerimentos regulatórios. Nós particularmente enfatizamos que estes dados não são adequados para comparar os sistemas de medição usados, nem para realizar qualquer declaração concernente ao seu desempenho geral.

Apêndice III Dados de desempenho clínico

O Kit de Reagentes em HPLC “Vitaminas A e E em soro/plasma” é usado para triar populações específicas para níveis anormais de vitamina A e/ou E ou para monitorar o estado da vitamina A e/ou E em pacientes, ex: sob terapia de suplementação. Como o estado de vitamina nunca serve para diagnosticar uma doença diretamente, parâmetros de desempenho clínico como sensibilidade diagnóstica, especificidade diagnóstica, valor preditivo positivo, valor preditivo negativo, ou razão de semelhança não são aplicáveis para este dispositivo IVD. Parâmetros clínicos relevantes em todos esses casos são os valores esperados em populações normais e afetadas. Um sumário dos valores de referência fornecidos em várias publicações pode ser visto no capítulo 10.

A determinação da vitamina A e/ou E é garantida em pacientes que pertencem a certos grupos de pessoas que no passado tem mostrado um risco elevado de deficiência (triagem). Portanto, níveis de pacientes usando a suplementação vitamínica correspondente podem ser monitorados.

O monitoramento dos níveis de retinol ou triagem para deficiência ou excesso é relevante em numerosos grupos de população que têm mostrado um risco elevado de deficiência ou excesso no passado. Estes incluem:

- crianças e mulheres (em países em desenvolvimento)
- pacientes após cirurgia bariátrica (especialmente em disabsortivas, como by-pass gástrico Y de Roux)
- pacientes após gastrectomia
- pacientes que sofrem de insuficiência pancreática exócrina (ex: causada por pancreatite crônica (cCP), fibrose cística (CF), pancreatite necrotizante aguda, atresia biliar, câncer ou ressecção cirúrgica)
- pacientes com má absorção (ex: devido a doença inflamatória intestinal)
- pessoas seguindo dietas restritivas (ex: dietas a base de plantas)
- pacientes em estado crítico, incluindo pacientes com tuberculose
- pacientes com deficiência de zinco
- pacientes com doença crônica no fígado (ex: gordura no fígado não-alcoólica, cirrose induzida por álcool)
- pessoas com transtorno do espectro autista
- pacientes com abetalipoproteína e hipobetalipoproteinemia familiar
- pacientes que apresentam hipertensão idiopática intracraniana
- pacientes com trombose cerebelar sino/venosa
- pacientes com hipercalemia
- pacientes em suplementação de vitamina A/retinol

O monitoramento dos níveis de α -tocoferol ou triagem para deficiência ou excesso é relevante em numerosos grupos de população que têm mostrado um risco elevado de deficiência ou excesso no passado. Estes incluem:

- pacientes após cirurgia bariátrica (especialmente cirurgias disabsortivas, como o by-pass gástrico Roux-en-Y)
- pacientes após gastrectomia
- pacientes com má absorção (ex: devido à doença inflamatória intestinal (IBD), síndrome do intestino curto, ou colestase biliar)
- pacientes que sofrem de insuficiência pancreática exócrina (ex: causada por pancreatite crônica (CP), fibrose cística (CF), pancreatite necrotizante aguda, atresia biliar, câncer ou por ressecção cirúrgica)
- pacientes com tuberculose
- pacientes com abetalipoproteinemia e hipobetalipoproteinemia
- pacientes com ataxia crônica não explicada, incluindo aqueles suspeitos de sofrer de ataxia com deficiência isolada de vitamina E (AVED)
- pacientes com eventos de sangramentos não explicados
- pacientes em suplementação de vitamina E/ α -tocoferol

Para alcançar uma classificação confiável dos pacientes, os laboratórios devem aplicar valores de referência apropriados para seus laboratórios.

Os produtos da Chromsystems para determinação de níveis de Vitamina A e E foram aplicados satisfatoriamente em diversos estudos clínicos. Alguns desses estudos estão resumidos abaixo:

Tabela 30: Estudos usando os kits de reagentes por (U)HPLC da Chromsystems para Vitaminas A e E em soro/plasma

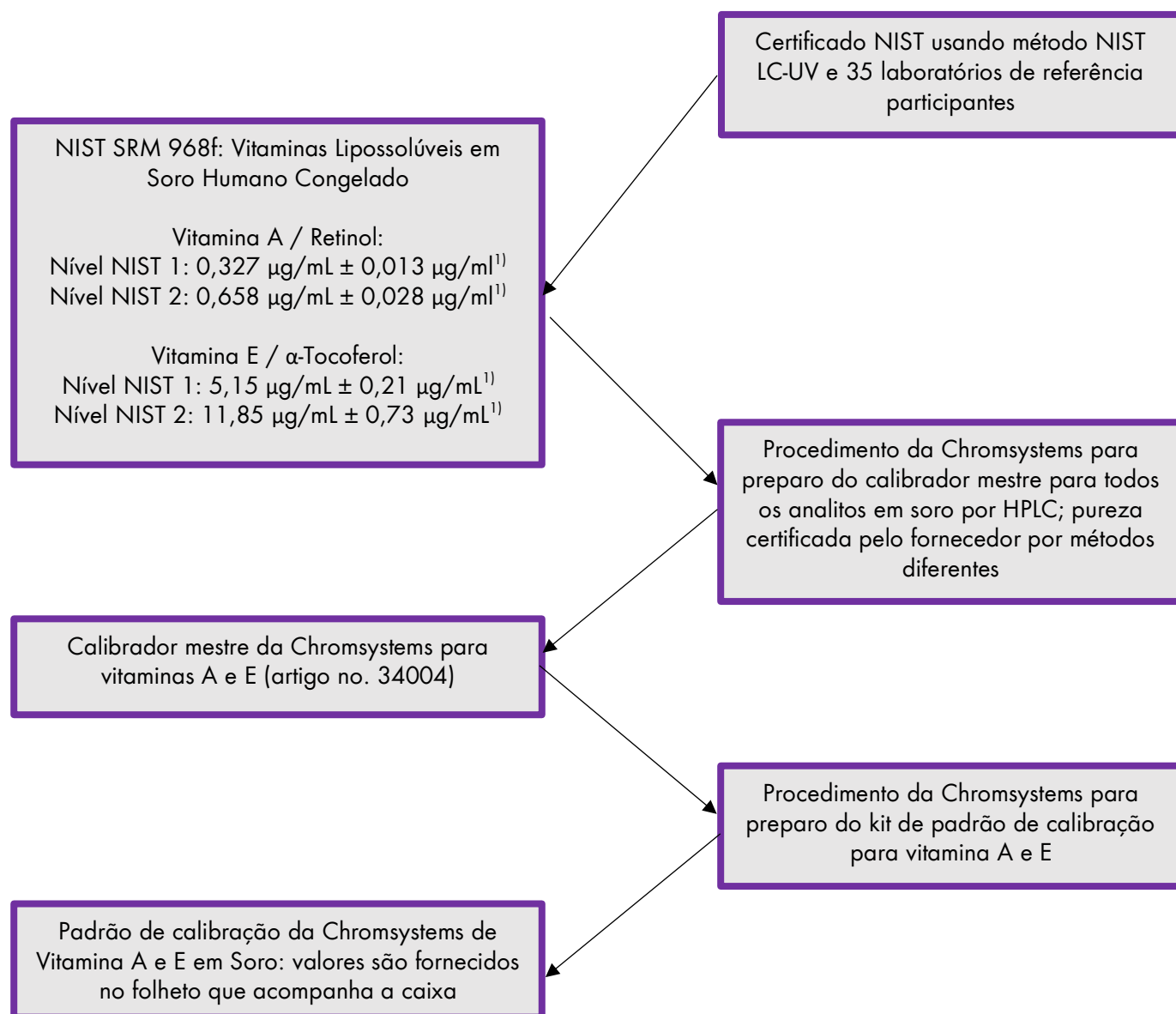
Alvo/objetivo do estudo	Publicação
Determinação de níveis antioxidantes para investigar a correlação de níveis com resultados da gravidez	[18]
Ensaio clínico de fase 3 para estudar tratamento com patisiran em pacientes com amiloidose hereditária mediada por transtirretina (aATTR); incluindo efeitos nos níveis de retinol	[19]
Investigação de associação de níveis de vitamina (entre outras) com a severidade da COVID-19	[20]
Estudo investigando a correlação de vitamina A, entre outros fatores, na suficiência de vitamina D em crianças brasileiras	[21]
Investigação do estado nutricional e níveis de plasma de vitaminas e minerais, incluindo retinol em crianças chilenas	[22]
Estudo para tentar confirmar a associação entre níveis de vitamina no soro, incluindo retinol, e função pulmonar na população idosa da Coreia	[8]
Investigação da função de vitamina C na leucemia mieloide aguda	[23]
Estudo para investigar o estado de redução de pacientes usando dois tipos diferentes de suplementos para determinar, entre outros, Vitaminas A e E	[24]
Estudo para investigar a contribuição do tabaco para disfunção endotelial, um marcador chave para doenças cardiovasculares	[25]
Investigação de marcadores biológicos de função endotelial em fumante quando são fumantes ativos e após abandono de uso	[26]
Investigação de associações entre estado nutricional e perfil lipídico com biomarcadores de hemólise e inflamação em anemia falciforme, também considerando diferenças de gênero	[27]
Avaliação do estado nutricional em pacientes com osteonecrose da mandíbula relacionada à medicação (MRONJ)	[28]
Estudo com objetivo de determinar precursores de estado da vitamina D no terceiro trimestre da gravidez	[29]

Apêndice IV Rastreador do calibrador

Padrão de Calibração em Soro (artigo no. 34004)

Vitaminas A e E em soro/plasma

Versão 3.0



O calibrador mestre em soro foi preparado gravimetricamente pela adição de vitamina A e vitamina E obtidas de um fornecedor comercial. As concentrações foram determinadas no laboratório do fabricante usando o kit de reagentes para vitamina A e E por HPLC com NIST SRM 968f.

A metodologia para o calibrador mestre é análise por HPLC-UV usando o kit de reagentes da Chromsystems no. 34400 (kit de reagentes para determinação de Vitaminas A e E em soro/plasma).

O produto da Chromsystems de calibrador em soro de vitamina A e E (calibrador de trabalho) tem uma concentração mostrada no folheto que acompanha cada lote, determinado pelo laboratório do fabricante usando o método do kit de reagentes de vitamina A e E da Chromsystems como referência. O ensaio foi calibrado usando o calibrador mestre da Chromsystems. A metodologia para o calibrador de trabalho é a análise por HPLC-UV usando o kit de reagentes da Chromsystems no. 34400 (vitamina A e E em soro/plasma).

Homogeneidade é verificada para cada lote por análises múltiplas de diversas alíquotas baseadas na razão estatística da Chromsystems por tamanho de amostra (baseada na ISO 13528 com um conjunto mínimo de 10 repetições e duas corridas).

Os valores assinados e as incertezas correspondentes são fornecidas no folheto que acompanha cada calibrador.

- ¹⁾ Incerteza da concentração é expressa como "incerteza expandida" em um intervalo de confiança de aproximadamente 95 % usando um fator de cobertura de $k=2$.

A disponibilidade de material de referência padrão (SRM) e material de referência certificado (CRM) é verificada regularmente, no mais tardar antes da produção de um novo lote mestre, a fim de garantir a rastreabilidade dos calibradores e controles Chromsystems a materiais de referência de ordem superior. Portanto, a cadeia de rastreabilidade atual do calibrador e dos controles pode diferir ligeiramente da cadeia de rastreabilidade mostrada aqui. A cadeia de rastreabilidade atualmente válida está disponível no centro de downloads do nosso site. A cadeia de rastreabilidade mostrada aqui (V3.0) representa o status das presentes instruções de uso.

Apêndice V Símbolos

Nós usamos símbolos EN ISO 15223-1 em nossos rótulos, especificações e pacotes. Os significados de cada símbolo são fornecidos na tabela abaixo:

Tabela 31: Símbolos

Símbolo	Significado
	Fabricante
	Data da fabricação
	Data de validade
	Número do artigo
	Lote/código do lote
	Suficiente para <n> aplicações
	Cuidado
	Ver instruções para uso
	Limite máximo de temperatura: Armazene abaixo de determinada temperatura
	Limite de temperatura: Armazene dentro de determinado intervalo de temperatura
	Dispositivo médico de diagnóstico <i>in-vitro</i>
	Número de série
	Marca de CE de conformidade com a legislação europeia
	Marca de CE em conformidade com a legislação europeia (com sufixo 2797 - para o corpo notificado: BSI Group The Netherlands B.V.)

Apêndice VI Histórico de versão

Tabela 32: Histórico de versões

Versão	Data de lançamento (DD-MM-AAAA)	Descrição
1.0 _{IVDR}	05-09-2023	Criação inicial IVDR
1.1 _{IVDR}	19-08-2026	Página inicial: Substituição da CE0123 pela CE2797 Capítulo 11 Teste de interferência: Reestruturação Capítulo 11.1: Informações sobre possível interferência por 7-desidrocolesterol; orientação detalhada sobre o uso de amostras hemolisadas, ictericas e lipêmicas Capítulo 11.2: Adição de novas substâncias não interferentes testadas Apêndice I: Renomeação e focagem em substâncias perigosas Apêndice II: Atualização sobre os instrumentos de medição utilizados; redução de dados relacionados à recuperação relativa, deriva e precisão Apêndice IV: Nota sobre o status da cadeia de rastreabilidade Apêndice V: Substituição da CE0123 pela CE2797, incluindo o nome do organismo notificado