

MassChrom® Amino acids and acylcarnitines from dried blood– LC-MS/MS (non derivatised)
(MassChrom- Aminoácidos e Acilcarnitinas em sangue seco por LC-MS/MS)

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

Somente para diagnóstico de uso *in vitro*.

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

Artigo	Apresentação
57000	Kit Reagente para Análise de Aminoácidos e acilcarnitinas em sangue seco, 100 análises

Para informações detalhadas sobre o método e procedimento, favor consultar o Manual de Instruções

MassChrom® Amino acids and acylcarnitines from dried blood– LC-MS/MS (non derivatised), no site www.biosys.com.br.

SUMÁRIO

Este Kit permite a determinação semi-quantitativa, simples e rápida, de aminoácidos e acilcarnitinas em *spots* de sangue seco para triagem neonatal de distúrbios do metabolismo dos ácidos graxos e aminoácidos pela espectrometria de massa em *tandem*. O sistema LS-MS/MS é composto por uma bomba de HPLC, um injetor e um espectrômetro de massa em *tandem* com sensibilidade adequada.

MÉTODO

LS-MS/MS com detecção pela espectrometria de massa em *tandem*. Método sem derivatização da amostra

PRINCÍPIO

Os seguintes aminoácidos, acilcarnitinas e carnitinas livres podem ser determinados semi-quantitativamente com este kit:

- **Aminoácidos:** alanina (Ala), arginina (Arg), ácido aspártico (Asp), citrulina (Cit), ácido glutâmico (Glu), glicina (Gly), leucina (Leu), metionina (Met), ornitina (Orn), fenilalanina (Phe), prolina (Pro), tirosina (Tyr) e valina (Val).
- **Carnitina livre e acilcarnitinas:** carnitina livre (C0), acetilcarnitina (C2), propionilcarnitina (C3), butirilcarnitina (C4), isovalerilcarnitina (C5), glutarilcarnitina (C5DC), hexanoilcarnitina (C6), octanoilcarnitina (C8), decanoilcarnitina (C10), dodecanoilcarnitina (C12), tetradecanoilcarnitina (C14), hexadecanoilcarnitina (C16) e octadecanoilcarnitina (C18).

REAGENTES

Componentes e Composições:

Componente	Composição	Apresentação
Fase móvel (<i>Mobile Phase</i>)	Acetonitrila 50-100%	2 x 1000 mL
Padrão Interno (<i>Internal Standard</i>)	solução contendo diversos aminoácidos e acilcarnitinas	4 x 25 mL
Solução de lavagem (<i>Rinsing solution</i>)	Acetonitrila 50-100%	2 x 1000 mL
Tampão de Extração (<i>Extraction buffer</i>)	Metanol 55-100%	1 x 100 mL
Placa de 96 poços	-	30 unidades
Folha de proteção para placa de 96 poços	-	20 unidades
Folhas adesivas perfuráveis	-	20 unidades

INSTRUÇÕES DE ARMAZENAMENTO E ESTABILIDADE DOS REAGENTES

Os reagentes não abertos são estáveis até a data de validade indicada no rótulo, desde que as condições de armazenamento estabelecidas sejam obedecidas. A tabela abaixo mostra a temperatura de armazenamento dos reagentes do kit.

Componente	Armazenamento
Fase móvel	Temperatura ambiente (18-30°C)
Padrão Interno	Abaixo de -18°C
Solução de lavagem	Temperatura ambiente (18-30°C)
Tampão de Extração	Temperatura ambiente (18-30°C)

CUIDADOS E PRECAUÇÕES

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

GARANTIA

Estas instruções de uso devem ser lidas atentamente antes da utilização do produto e as instruções nela contidas devem ser rigorosamente cumpridas. A confiabilidade dos resultados do ensaio não poderá ser garantida em caso de desvio às instruções.

DESCARTE

A Fase Móvel a solução de limpeza, o tampão de extração e os resíduos das amostras preparadas **contêm solventes orgânicos** e devem ser descartados como resíduo livre de halogênio de acordo com os regulamentos locais.

PREPARAÇÃO DOS REAGENTES

Fase Móvel: pronto para uso.

Solução de lavagem : pronto para uso.

Tampão de Extração : pronto para uso.

Padrão Interno (Iiof):

O padrão interno (artigo 57004) é utilizado como padrão de calibração para cada amostra e é rastreável a substâncias de referência isotopicamente marcadas adquiridas de fornecedor certificado. Após reconstituição, uma quantidade definida de padrão interno é adicionada a amostra e, então, submetido a todo o procedimento de preparação das amostras. **O padrão interno liofilizado é reconstituído com exatamente 25 mL de solução tampão de extração (artigo 57008).** Abra o frasco do padrão interno e dissolva o conteúdo com 5 mL de solução tampão de extração.

Deixe o frasco em repouso à temperatura ambiente por cerca de 5 minutos, agite ocasional e suavemente. Transfira o conteúdo do frasco para um balão volumétrico de 25 mL. Enxágüe o frasco do padrão interno duas vezes com 5 mL de solução tampão de extração e transfira o líquido para o balão volumétrico. Complete o volume do balão volumétrico para 25 mL com a solução tampão de extração e homogeneíze. Evite a exposição direta à luz. A concentração atual depende do lote e poderá ser encontrada no folheto de informações que acompanha o padrão.

MATERIAIS REQUERIDOS, MAS NÃO FORNECIDOS

MassCheck Amino Acids, Acylcarnitines dried blood spot control, Bi-Level (I + II) (Chromsystems art. 0191)

- Espectrômetro de massa em *tandem* com *software* de avaliação;
- Sistema de HPLC com bomba, injetor e amostrador automático;
- Picotador automático ou manual, para picotar as amostras, 3 mm em diâmetro;
- Agitador de placas de microtitulação para extração das amostras;
- Presilhas de borracha (elástico) para prender as folhas de proteção às placas de 96 poços;
- Pipeta ou pipeta multicanal, 100 µL;
- Ponteiras;
- Balão volumétrico com capacidade para 25 mL;
- Opcional: centrífuga para placas de 96 poços.

AMOSTRA

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

Descrição resumida das etapas da coleta:

1. Limpe a área do calcanhar do recém-nascido destinada à punção com anti-séptico. Seque com cotonete estéril.
2. Perfure o calcanhar com uma lanceta estéril. A ponta da lanceta deve ser menor que 2 mm, pois, perfurações profundas podem ferir crianças pequenas.
3. Descarte a primeira gota de sangue com um cotonete estéril.
4. Colha a próxima grande gota de sangue com o papel de filtro, aguardando até que a amostra seja adsorvida no papel e preencha totalmente o círculo delimitado. Não aplique uma gota de sangue sobre a outra e nem colha em ambos os lados do papel, pois isto altera o volume de sangue coletado por *spot* e pode produzir falsos resultados patológicos.
5. Preencha cada um dos círculos remanescentes no papel de filtro, repetindo o mesmo procedimento, com uma única gota de sangue.
6. Cuidados com o local de punção deve estar de acordo com a prática comum do hospital/laboratório
7. Deixe o sangue coletado secar por 4 horas, repousando o papel de filtro em uma superfície horizontal, não-absorvente, em temperatura ambiente.
8. Envie as amostras secas em papel de filtro para o laboratório, dentro de 24 horas.

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

A estabilidade das amostras de sangue seco é de até 21 dias em temperatura ambiente (20 a 25°C) ou refrigeradas (2 a 8°C). Para períodos mais longos de armazenamento, proteja as amostras da umidade e congele-as a < -18°C. Evite temperaturas acima de 37°C por vários dias, isto pode causar a diminuição de alguns aminoácidos.

PROCEDIMENTOS DO TESTE

Ajustes do instrumento:

Amostrador automático: Volume de injeção 10 µL
Tempo de corrida: 1,7 min
Gradiente de fluxo: 20 a 600 µL/min

Procedimento de Preparação das Amostras:

1. Picotagem da amostra:

Faça um picote no papel de filtro, de forma a retirar um disco de 3 mm da amostra de sangue seco e coloque dentro de um poço da placa de 96 poços.

2. Extração:

Adicione 100 µL de padrão interno reconstituído (ver capítulo 5.2). Tampe a placa com a folha de proteção (artigo 55011) e agite por 20 minutos a 600 rpm, em temperatura ambiente.

3. Transferência:

Remova a folha de proteção da placa. Transfira o sobrenadante para uma nova placa de 96 poços. Tampe a placa com a folha de proteção em alumínio (artigo 55013).

4. Injeção:

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

5. Controle de Qualidade:

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

Transição de massa dos analitos e padrões internos:

Método de medição: MRM

Aminoácidos:

Substância	Transição de massa
Alanina	90 > 44
Alanina-D4	94 > 48
Arginina	175 > 70
Arginina-D7	182 > 77
Ácido Aspártico	134 > 116
Ácido Aspártico-D3	137 > 119
Citrulina	176 > 113
Citrulina-D2	178 > 115
Ácido Glutâmico	148 > 130
Ácido Glutâmico-D5	153 > 135
Glicina	76 > 30
Glicina- ¹³ C ₂ - ¹⁵ N	79 > 32
Leucina	132 > 86
Leucina-D3	135 > 89
Metionina	150 > 133
Metionina-D3	153 > 136
Ornitina	133 > 70
Ornitina-D6	139 > 76
Fenilalanina	166 > 120
Fenilalanina-D5	171 > 125
Prolina	116 > 70
Prolina-D7	123 > 77
Tirosina	182 > 136
Tirosina-D4	186 > 140
Valina	118 > 72
Valina-D8	126 > 80

Acilcarnitinas e Carnitina livre:

Substância	Transição de massa
Carnitina	162 > 85
Carnitina-D9	171 > 85
C2-Carnitina	204 > 85
C2-Carnitina-D3	207 > 85
C3-Carnitina	218 > 85
C3-Carnitina-D3	221 > 85
C4-Carnitina	232 > 85
C4-Carnitina-D3	235 > 85
C5-Carnitina	246 > 85

C5-Carnitina-D9	255 > 85
C5DC-Carnitina	276 > 85
C5DC-Carnitina-D6	282 > 85
C6-Carnitina	260 > 85
C6-Carnitina-D3	263 > 85
C8-Carnitina	288 > 85
C8-Carnitina-D3	291 > 85
C10-Carnitina	316 > 85
C10-Carnitina-D3	319 > 85
C12-Carnitina	344 > 85
C12-Carnitina-D3	347 > 85
C14-Carnitina	372 > 85
C14-Carnitina-D3	375 > 85
C16-Carnitina	400 > 85
C16-Carnitina-D3	403 > 85
C18-Carnitina	428 > 85
C18-Carnitina-D3	431 > 85

CÁLCULOS

$$C_{\text{Analito, Amostra}} [\mu\text{mol/L}] = \frac{A_{\text{Amostra}}}{IS_{\text{Amostra}}} \times C_{\text{padrão}}$$

Intensidade do sinal da substância A no espectro de massa da amostra = A_{Amostra}

Intensidade do sinal do padrão interno no espectro de massa da amostra = IS_{Amostra}

Concentração C do padrão interno relacionada a amostra = $C_{\text{padrão}}$

Fatores de conversão

Aminoácidos:

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

Acilcarnitinas e Carnitina livre:

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

CALIBRADORES E CONTROLES

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

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

DESEMPENHO / CARACTERÍSTICAS

Recuperação:

A recuperação analítica foi determinada a partir do coeficiente angular da curva de calibração, obtida com amostras de sangue acrescentadas de quantidades definidas de aminoácidos e acilcarnitinas e soluções padrões diluídas.

Aminoácidos:

Analito	Recuperação (%)
Alanina	79
Arginina	80
Ácido Aspártico	88
Citrulina	94
Ácido Glutâmico	81
Glicina	81
Leucina	86
Metionina	90
Ornitina	86
Fenilalanina	94
Prolina*	89
Tirosina	93
Valina	90

* a determinação deste analito foi realizada no AB Sciex API4000

Acilcarnitinas e Carnitina livre:

Analito	Recuperação (%)
C0-Carnitina	85
C2-Carnitina	86
C3-Carnitina	89
C4-Carnitina	88
C5-Carnitina	92
C5DC-Carnitina	91
C6-Carnitina	90
C8-Carnitina	91
C10-Carnitina	92
C12-Carnitina	94
C14-Carnitina	94
C16-Carnitina	94
C18-Carnitina	87

Linearidade e limite de quantificação:

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

Aminoácidos:

Analito	Limite de quantificação aproximado ($\mu\text{mol/L}$)*	Limite máximo de linearidade ($\mu\text{mol/L}$)
Alanina	15,6	2000
Arginina	7,8	2000
Ácido Aspártico	15,6	2000
Citrulina	7,8	2000
Ácido Glutâmico	15,6	2000
Glicina	15,6	2000
Leucina	15,6	2000
Metionina	7,8	2000
Ornitina	7,8	2000
Fenilalanina	7,8	2000
Prolina*	4,8	2400
Tirosina	15,6	2000
Valina	15,6	2000

* a determinação deste analito foi realizada no AB Sciex API4000

Acilcarnitinas e Carnitina livre:

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

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

Precisão intra-ensaio:**Aminoácidos:**

Analito	Coeficiente de variação (%), n=10 (concentração em µmol/L)		
Alanina	5,2 (281)	4,7 (390)	4,6 (745)
Arginina	4,2 (7)	10,4 (12)	3,4 (125)
Ácido Aspártico	4,7 (96)	5,1 (147)	5,8 (345)
Citrulina	6,8 (20)	7,3 (61)	5,0 (256)
Ácido Glutâmico	4,9 (218)	3,0 (388)	3,8 (749)
Glicina	10,9 (241)	6,0 (336)	5,0 (1085)
Leucina	6,4 (181)	2,9 (281)	2,8 (592)
Metionina	6,8 (19)	4,0 (62)	2,9 (268)
Ornitina	5,6 (95)	7,1 (217)	5,4 (626)
Fenilalanina	4,7 (69)	3,4 (129)	3,0 (566)
Prolina*	8,8 (231)	6,4 (525)	5,4 (834)
Tirosina	4,7 (69)	2,9 (158)	3,5 (488)
Valina	4,8 (111)	2,3 (171)	4,3 (365)

* a determinação deste analito foi realizada no AB Sciex API4000

Acilcarnitinas e Carnitina livre:

Analito	Coeficiente de variação (%), n=10 (concentração em µmol/L)		
C0-Carnitina	4,7 (26,4)	3,0 (48,0)	4,1 (105)
C2-Carnitina	5,5 (15,2)	2,7 (39,5)	2,6 (81,6)
C3-Carnitina	6,1 (1,78)	2,7 (6,54)	2,7 (15,1)
C4-Carnitina	6,2 (0,34)	4,9 (1,15)	4,0 (4,42)
C5-Carnitina	8,1 (0,14)	4,0 (0,60)	3,9 (2,35)
C5DC-Carnitina	12,2 (0,19)	12,2 (0,66)	9,0 (2,38)
C6-Carnitina	9,6 (0,06)	3,2 (0,48)	4,1 (2,11)
C8-Carnitina	8,5 (0,10)	3,9 (0,57)	4,2 (2,31)
C10-Carnitina	8,2 (0,16)	3,7 (0,63)	3,1 (2,44)
C12-Carnitina	8,1 (0,07)	3,8 (0,52)	3,5 (2,25)
C14-Carnitina	10,3 (0,10)	4,6 (0,50)	3,8 (2,00)
C16-Carnitina	5,7 (0,72)	4,9 (4,56)	3,3 (12,2)
C18-Carnitina	6,6 (0,54)	4,9 (2,26)	5,2 (7,69)

VALORES DE REFERÊNCIA**Aminoácidos:**

Analito	Cut off (µmol/L) 32-42 SG, > 36h	Cut off (µmol/L) 38-42 SG, > 36h	Cut off (µmol/L) todas SG, > 0h
Alanina	583	564	736
Arginina	52	49	55
Ácido Aspártico	420	402	420
Citrulina	50	51	50

Ácido Glutâmico	1074	1087	1073
Glicina	1003	962	1001
Leucina	277	299	276
Metionina	35	35	37
Ornitina	454	455	453
Fenilalanina	127	124	141
Prolina*	Ainda não estabelecido	Ainda não estabelecido	Ainda não estabelecido
Tirosina	248	217	248
Valina	192	199	212

Acilcarnitinas e Carnitina livre:

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

LITERATURA

- Beschluss über eine Änderung der Kinder-Richtlinie zur Einführung des erweiterten Neugeborenen-Screening, Deutsches Ärzteblatt (2005), 102 (16), A1158 - A1163
- A.A. Roscher, B. Olgemöller, J. Lab. Med. (2004), 28 (6), 521 - 524
- C.T. Cavedon, P. Bourdoux, K. Mertens, H. V. V. Thi, N. Herremans, C. de Laet, P. Goyens, Clin. Chem. (2005), 51 (4), 745 - 752
- D. H. Chace, B. W. Adam, S. J. Smith, J. R. Alexander, S. L. Hillman, W. H. Hannon, Clin. Chem. (1999), 45 (8), 1269 - 1277
- T. H. Zytovicz, E. F. Fitzgerald, D. Marsden, C. A. Larson, V. E. Shih, D. M. Johnson, A. W. Strauss, A. M. Comeau, R. B. Eaton, G. F. Grady, Clin. Chem. (2001), 47 (11), 1945 - 1955
- A. Schulze, M. Lindner, D. Kohlmüller, K. Olgemöller, E. Mayatepek, G. F. Hoffmann, Pediatrics (2003), 111 (6), 1399 - 1406
- U. Ceglarek, M. Stopsack, B. Stach, P. Müller, A. Näke, A. Hübner, M. Brügel, P. Bührdel, W. Kies, M. Gahr, J. Thiery, Ärzteblatt Sachsen (2003), 12 - 15
- J. Sander, N. Janzen, Pädiatrie Hautnah (2000), 161 - 167
- K. Gempel, M. F. Bauer, K. D. Gerbitz, Deutsches Ärzteblatt (1999), 96 (47), A3035 - A3042
- I. Knerr, U. Nennstiel-Ratzel, W. Röschinger, E. M. Maier, J. Baumkötter, R. von Kries, Deutsches Ärzteblatt (2005), 102 (38), A2565 - 2569
- D. H. Chace, T. A. Kalas, E. W. Naylor, Clin. Chem. (2003), 49 (11), 1797 - 1817

Chromsystems Instruments & Chemicals GmbH
Am Haag 12
D-82166 Gräfelfing
Munique, Alemanha
Fone: +49 89 18930-0
Fax: +49 89 18930-199
www.chromsystems.de