

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



Manual de instrucciones para el análisis por LC-MS/MS

**MassChrom® Amino Acids and
Acylcarnitines from dried blood
(non derivatised)**
with 96 Well Plates

N° de pedido 57000

Chromsystems Instruments & Chemicals GmbH está certificada de acuerdo con la norma ISO 13485 (incluyendo MDSAP). Los productos se producen y distribuyen de acuerdo con la Directiva 98/79/CE sobre productos sanitarios para diagnóstico in vitro.

Puede descargar la declaración de conformidad según la Directiva 98/79/CE en el centro de descargas de nuestro sitio web.

© Este documento está protegido por derechos de autor. Reservados todos los derechos.

Chromsystems Instruments & Chemicals GmbH
Am Haag 12
82166 Gräfelfing
Alemania

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

Índice.....	Página
1 Información sobre el pedido	3
2 Introducción.....	4
2.1 Información general	4
2.2 Uso previsto	5
2.3 Principio del kit de reactivos.....	5
3 Sistema LC-MS/MS	6
3.1 Equipamiento y parámetros del equipo de HPLC	6
3.2 Medición MS/MS	8
3.3 Optimización de las transiciones MRM (tuning)	8
3.4 Puesta en funcionamiento.....	9
3.5 Pausas en el funcionamiento	9
4 Transferencia de masas de los analitos y del estándar interno	9
5 Preparación de la muestra	12
5.1 Obtención y conservación de muestras de pacientes	12
5.2 Reconstitución del estándar interno	13
5.3 Manipulación de los reactivos del Set de ampliación de succinilacetona.....	14
5.4 Manipulación de los controles.....	14
5.5 Proceso de preparación de muestras	15
5.5.1 Preparación de muestras sin succinilacetona	15
5.5.2 Preparación de muestras con succinilacetona	16
5.6 Estabilidad de las muestras preparadas.....	17
5.6.1 Muestras preparadas sin succinilacetona	17
5.6.2 Muestras preparadas con succinilacetona	17
6 Equipamiento adicional necesario	18
7 Registro de datos y cálculo	18
8 Control de calidad	19
9 Valores de corte	19
10 Factores de conversión	21
11 Almacenamiento y caducidad de los reactivos.....	22
12 Tratamiento de los residuos.....	23
13 Comprobación de interferencias.....	24
14 Localización y resolución de problemas.....	27
15 Bibliografía.....	28
Apéndice I: Observaciones sobre las sustancias peligrosas.....	29
Apéndice II: Indicaciones para el cálculo	31
Apéndice III: Datos de validación.....	32
Apéndice IV: Símbolos.....	45

1 Información sobre el pedido

Nº de pedido Producto

57000	Kit de reactivos por LC-MS/MS MassChrom® Amino Acids and Acylcarnitines from Dried Blood (non derivatised) Contenido del kit para 960 análisis con 96 Well Plates: Mobile Phase 2 x 1000 mL Internal Standard 4 x 25,0 mL (liof.) Rinsing Solution 1 x 1000 mL Extraction Buffer 1 x 100 mL 96 Well Plates 6 x 5 unidades Protective Sheets for 96 Well Plates 2 x 10 unidades Pierceable Heat Seals for 96 Well Plates 2 x 6 unidades MassCheck® Amino Acids, Acylcarnitines Dried Blood Spot Control Level I 1 x 3 spots Level II 1 x 3 spots
57111	Succinylacetone (non derivatised) Upgrade Set Contenido del kit para 960 análisis con 96 Well Plates, compuesto por: Internal Standard, Succinylacetone (non derivatised) 4 x 18 mL Extraction Buffer, Succinylacetone (non derivatised) 4 x 18 mL Protective Sheets for 96 Well Plates 2 x 10 unidades Pierceable Heat Seals for 96 Well Plates 1 x 6 unidades
	Componentes disponibles por separado
57001	Mobile Phase 1000 mL
57002	Mobile Phase 10 x 1000 mL
57004	Internal Standard 4 x 25,0 mL (liof.)
57044	Internal Standard, Succinylacetone (non derivatised) 4 x 18 mL
57007	Rinsing Solution 1000 mL
57008	Extraction Buffer 100 mL
57012	Extraction Buffer, Succinylacetone (non derivatised) 4 x 18 mL
57010	96 Well Plates 5 unidades
55011	Protective Sheets for 96 Well Plates 10 unidades
57014	Pierceable Heat Seals for 96 Well Plates 6 unidades
	Accesorios
57015	Cross-cut Adhesive Seals for 96 Well Plates 10 unidades
55015	Restrictor Capillary 1 unidad
57098	Tuning Mix, Succinylacetone (non derivatised), Analyte and Internal Standard 1 mL
57099	Tuning Mix, Analytes and Internal Standards 2 mL
15010	PEEK Prefilter Housing 1 unidad
55033	PEEK Prefilter (2 µm) 5 unidades
42740	Heat Sealer para placas de 96 pocillos (incluida la pieza correspondiente) 1 unidad
	Controles MassCheck® Chromsystems
0191	MassCheck® Amino Acids, Acylcarnitines incl. Succinylacetone Dried Blood Spot Control Bi-Level (I + II) 2 x 3 spots
0192	MassCheck® Amino Acids, Acylcarnitines incl. Succinylacetone Dried Blood Spot Control Level I 1 x 3 spots
0193	MassCheck® Amino Acids, Acylcarnitines incl. Succinylacetone Dried Blood Spot Control Level II 1 x 3 spots

2 Introducción

2.1 Información general

El objetivo del cribado neonatal es la detección a tiempo de alteraciones metabólicas congénitas no detectables de entrada por signos externos. El cribado permite el tratamiento temprano de enfermedades y evitar así secuelas en la medida de lo posible.

Las enfermedades son ocasionadas por defectos congénitos en determinadas enzimas que limitan o suprimen por completo su actividad. La consecuencia es que el sustrato de la reacción enzimática ya no es transformado en el cuerpo, con lo que el producto de la reacción se formará en niveles demasiado bajos o no se formará en absoluto, dependiendo de la gravedad del trastorno. También se produce una acumulación de metabolitos potencialmente tóxicos, lo que puede generar daños en el organismo y enfermedades multisistémicas (aminoacidopatías, organoacidopatías). Si no se diagnostican, estos trastornos metabólicos pueden ocasionar desde los primeros días de vida daños graves e irreversibles al recién nacido. Por ejemplo, en el caso de la fenilcetonuria, ésta resulta en retardos en el desarrollo físico y psíquico del niño afectado. La acumulación de metabolitos tóxicos (en especial la succinilacetona) en los casos de tirosinemia de tipo I puede provocar daños hepáticos graves incluso en la primera infancia.

Dado que son fallos congénitos, estas enfermedades son incurables y la terapia se limita a compensar los síntomas. Los niños que padecen fenilcetonuria, por ejemplo, pueden llevar a cabo una vida normal siguiendo una dieta libre de fenilalanina, siempre y cuando la enfermedad sea detectada a tiempo durante los primeros días de vida. La incidencia de los trastornos metabólicos estudiados ronda entre 1:10.000 (fenilcetonuria) y 1:200.000 (enfermedad del jarabe de arce, MSUD); por término medio, aproximadamente uno de cada 1000 recién nacidos padece alguna de estas enfermedades [1]. Para ello se extrae la sangre del talón, haciendo que gotee sobre papel filtrante para que se seque, y se analiza en el laboratorio.

En Alemania, es obligatorio por ley analizar en busca de 13 enfermedades específicas según la Directiva Infantil (versión del 18 de junio de 2015; la última revisión entró en vigor el 25 de marzo de 2020). De entre ellas, nueve se pueden detectar mediante espectrometría de masas en tándem, incluidas trastornos del metabolismo de aminoácidos como la fenilcetonuria (PKU) y la enfermedad del jarabe de arce (MSUD), trastornos del metabolismo de los ácidos grasos (deficiencias de MCAD, LCHAD y VLCAD), así como acidurias orgánicas como la acidemia isovalérica. En la última revisión de la directiva se añadió el cribado de la tirosinemia de tipo I.

La técnica de la espectrometría de masas en tándem permite detectar un amplio espectro de trastornos metabólicos con un solo análisis. Este procedimiento permite determinar simultáneamente y con fiabilidad las concentraciones de toda una serie de marcadores. La alta selectividad del proceso permite prescindir en este caso de una columna de HPLC, lo que acorta considerablemente la duración del análisis (< 2 min). Para compensar las interferencias causadas por efectos de supresión iónica y lograr una cuantificación precisa de los analitos, es imprescindible el uso de estándares marcados isotópicamente.

Dependiendo del papel filtrante empleado en la extracción de sangre y del hematocrito de la muestra, el volumen de sangre variará en el punto de toma de sangre seca a analizar [2]. Esto permite una determinación semicuantitativa de los analitos, sin embargo, este cribado no debería usarse como único método de diagnóstico en laboratorio. Los resultados del cribado de neonatos mediante espectrometría de masas en tándem deben, por lo tanto, garantizarse mediante un diagnóstico de confirmación genético-molecular, enzimático o basado en cromatografía.

2.2 Uso previsto

El kit de reactivos Chromsystems **MassChrom®** Amino Acids and Acylcarnitines from Dried Blood (non derivatised) es un producto para el diagnóstico in vitro de uso en laboratorios clínicos, y sirve para la determinación semicuantitativa de los siguientes metabolitos:

Aminoácidos y metabolito de la tirosina

Alanina (Ala), arginina (Arg), ácido aspártico (Asp), citrulina (Cit), ácido glutámico (Glu), glicina (Gly), leucina (Leu), metionina (Met), ornitina (Orn), fenilalanina (Phe), prolina (Pro), tirosina (Tyr), valina (Val), succinilacetona (SUAC)

Carnitina libre y acilcarnitinas

Carnitina libre (C0), acetilcarnitina (C2), propionilcarnitina (C3), butirilcarnitina (C4), isovalerilcarnitina (C5), glutarilcarnitina (C5DC), hexanoilcarnitina (C6), octanoilcarnitina (C8), decanoilcarnitina (C10), dodecanoilcarnitina (C12), tetradecanoilcarnitina (C14), hexadecanoilcarnitina (C16), octadecanoilcarnitina (C18)

Se analizaron muestras de sangre extraídas a recién nacidos mediante punción en el talón y secadas sobre papel filtrante. El método de análisis es LC-MS/MS (cromatografía líquida acoplada a la espectrometría de masas). El kit se usa como método de cribado para la detección temprana de trastornos del metabolismo de los aminoácidos y de los ácidos grasos en recién nacidos.

Los perfiles anómalos y sospechosos de aminoácidos, succinilacetona y acilcarnitina deben confirmarse mediante un método diagnóstico.

2.3 Principio del kit de reactivos

Este kit de reactivos de Chromsystems permite, mediante la espectrometría de masas en tándem, el rápido análisis semicuantitativo de aminoácidos, acilcarnitinas y succinilacetona en muestras de sangre seca dentro del marco del cribado de neonatos para la detección de trastornos del metabolismo de los ácidos grasos.

La sencilla preparación de muestras para la medición de los aminoácidos y acilcarnitinas se basa en una extracción eficaz de los analitos del papel filtrante sin necesidad de una butilación adicional. Para garantizar la cuantificación segura y precisa de los analitos, este método emplea estándares internos estables radiomarcados para la calibración y medición.

Para la medición de la succinilacetona, se toma la punción tras extraer los aminoácidos y las acilcarnitinas y se vuelve a extraer con un reactivo especial. Para ello, la succinilacetona se deriva a su correspondiente hidrazona, lo que permite extraer la succinilacetona de la sangre seca. Para la cuantificación de la succinilacetona también se usa un estándar interno radiomarcado. Tras la extracción de la succinilacetona se unen ambas fracciones sobrenadantes y se miden en un solo proceso.

Este kit es un dispositivo para el diagnóstico in vitro (IVD).

Por favor, tenga en cuenta que se trata de un **procedimiento de cribado** cuyos resultados pueden variar de aparato a aparato. Por ello, los datos obtenidos mediante este kit deben contemplarse en conjunto con otros datos de laboratorio y requieren obligatoriamente una interpretación médica emitida por un facultativo o un experto en metabolismo. No existe ningún estudio clínico sistemático sobre la frecuencia de resultados falsos positivos y falsos negativos.

3 Sistema LC-MS/MS

Atención:

En el manejo de los reactivos, prestar atención a las observaciones acerca de las sustancias peligrosas mencionadas en el apéndice I.

3.1 Equipamiento y parámetros del equipo de HPLC

Para el análisis de los aminoácidos (incluida SUAC), acilcarnitinas y carnitina libre se precisa un sistema con bomba de HPLC, un inyector y un espectrómetro de masas en tándem con la suficiente sensibilidad y un software de evaluación especial. Es necesario mantener la fase móvil cerrada o tapada también durante el funcionamiento. No se requiere ni columna HPLC, ni horno para columnas. Para acoplar el equipo HPLC con el sistema MS/MS se requiere un Restrictor Capillary (capilar restrictor) (n° de pedido 55015) con un prefiltro PEEK (n° de pedido 55033 y 15010).

Ajustes del aparato:

Volumen de inyección: 10 µL
 Duración del análisis: 1,7 min
 Gradiente de flujo: de 20 a 600 µL/min
 Fluido de limpieza de la aguja del inyector: Rinsing Solution (solución de enjuague)

Gradiente:

La solidez del perfil de gradientes depende en gran medida de la optimización del flujo de gradientes en relación a la configuración del aparato.

Debido a los diferentes volúmenes muertos de cada sistema de HPLC y las distintas longitudes de los capilares de restricción, hay que adaptar el siguiente perfil de gradiente hasta obtener un cromatograma como el de la imagen 1. El gradiente indicado debe tomarse como base para la optimización. Un perfil de gradiente no optimizado puede dar como resultado un cromatograma como el de la imagen 2. En ese caso se recomienda expresamente repetir la optimización y adaptar el gradiente de flujo para obtener un cromatograma como el de la imagen 1.

Hay que establecer la ventana temporal de escaneado del sistema de espectrometría de masas en tándem el plazo en el que las intensidades de señal alcanzan un nivel máximo; por ejemplo, medido en un SCIEX API 4000™ acoplado a un sistema HPLC Shimadzu, aprox. de 0,32 a 1,51 min.

Tabla 1: Perfil del gradiente

Tiempo	0 min	0,32 min	0,33 min	1,50 min	1,51 min	1,70 min	1,71 min
Flujo	200 µL/min	200 µL/min	20 µL/min	20 µL/min	600 µL/min	600 µL/min	200 µL/min

Si el sistema no puede generar un flujo constante de 20 µL/min, también se puede trabajar con una velocidad de flujo constante de 100 µL/min. No obstante, con una velocidad de flujo constante la sensibilidad es menor.

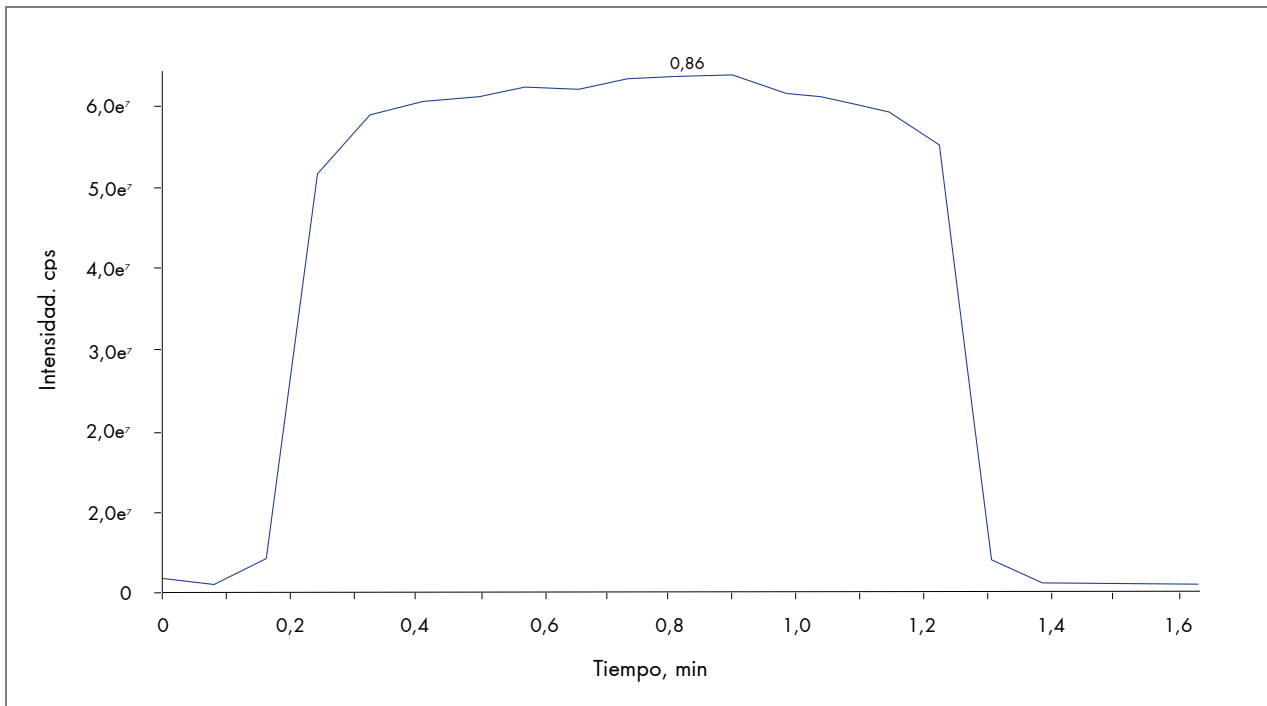


Figura 1: Cromatograma de gradientes de flujo optimizado

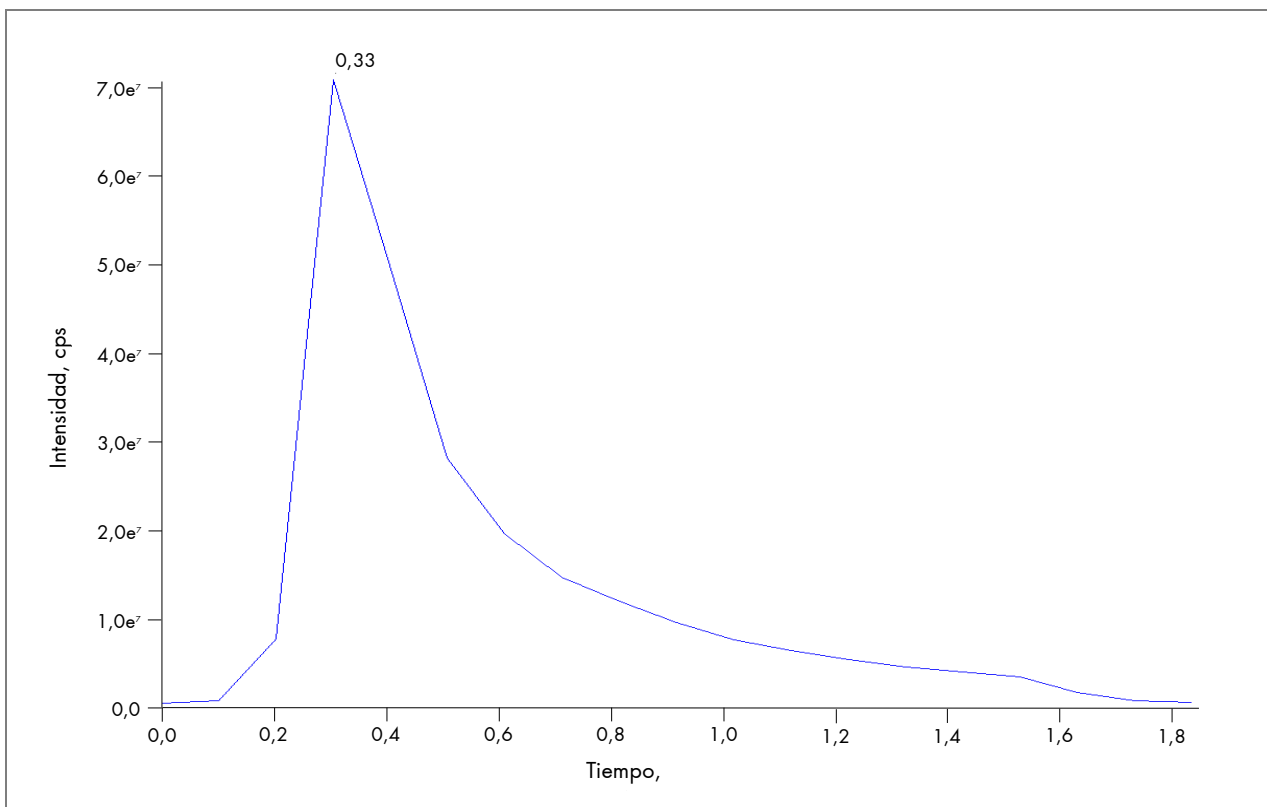


Figura 2: Cromatograma de gradientes de flujo NO optimizado

Nota:

Use exclusivamente un gradiente de flujo optimizado. En caso contrario, empeora el rendimiento del kit de reactivos.

3.2 Medición MS/MS

Principio del proceso de medición:

Las moléculas son analizadas en el espectrómetro de masas mediante la relación masa-carga (m/z). Para eso hay que ionizar primero los analitos y transferirlos a la fase gaseosa. La ionización mediante electrospray (ESI) ha demostrado ser, para este propósito, un método especialmente versátil y sencillo de usar.

La técnica de espectrometría de masas con triple cuadrupolo en tándem usa diversos modos de medición. Para el presente análisis se utiliza únicamente la Multiple Reaction Monitoring (monitorización de reacciones múltiples).

Multiple Reaction Monitoring (MRM):

En el modo MRM se ajustan el primer y el segundo filtro de masas estáticamente a una relación masa/carga (m/Q) determinada. En MS 1 se selecciona el ion molecular del analito y no se muestran los iones con una proporción masa/carga diferente. El ion molecular se fragmenta a continuación en la celda de colisión y MS 2 detecta el ion fragmento característico. El modo MRM permite cuantificar de forma particularmente sensible y selectiva.

3.3 Optimización de las transiciones MRM (tuning)

Se recomienda comprobar la exactitud de masas y la resolución del sistema MS/MS. Si la exactitud de masas y la resolución no están dentro de las especificaciones del fabricante, se recomienda volver a calibrar el espectrómetro. A continuación, hay que optimizar las transiciones MRM como se indica:

1. Diluir el Tuning Mix (n° de pedido 57099, 57098) con Mobile Phase (n° de pedido 57001) según el aparato
2. Inyectar el Tuning Mix diluido o infundirlo directamente mediante una bomba inyectora (velocidad de flujo: 0,02 mL/min)
3. Mediante Q1 Scan (MS Scan), determinar la situación exacta del máximo de señal de las masas MS1 (iones padre) (al menos con un decimal de precisión)
4. Determinar la situación exacta del máximo de señal de las masas MS2 mediante escaneado de iones producidos (iones hijo) (al menos con un decimal de precisión)
5. Optimizar los parámetros individuales (por ejemplo, energía de colisión) para cada una de las transiciones MRM
6. Mediante las transiciones MRM optimizadas, optimizar los parámetros generales de la fuente de iones, sobre todo la tensión capilar, la temperatura y los flujos de los diversos gases

Para una correcta afinación de la máquina es necesario leer detenidamente las instrucciones de uso del sistema LC-MS/MS. Si tiene alguna duda, diríjase al fabricante del equipo; en caso necesario, reciba formación en el manejo del equipo por parte de este.

3.4 Puesta en funcionamiento

Antes de iniciar la serie de análisis, prepare el sistema como se indica a continuación:

1. Equilibrar el sistema durante unos 15 minutos utilizando las condiciones iniciales del método.
2. Recomendamos equilibrar el sistema con tres inyecciones sin matriz (por ejemplo Mobile Phase, n.º de pedido 57001) seguidas de, al menos, tres inyecciones del eluato de un control de nivel I (Dried Blood Spot Control Level I, n.º de pedido 0192) hasta que las intensidades de señal de los analitos y los estándares internos coincidan con las de inyecciones sucesivas.
3. Ahora se puede iniciar la serie de análisis de todas las muestras preparadas.

Lea las instrucciones de uso de su sistema LC-MS/MS para garantizar su correcto uso. En caso de dudas, diríjase al fabricante del aparato y, en caso necesario, reciba formación en el manejo del equipo por parte de este.

3.5 Pausas en el funcionamiento

Durante las pausas de servicio desconecte la bomba de HPLC y deje la Mobile Phase en el sistema de HPLC. No es probable que se produzca cristalización salina sobre las guarniciones del émbolo de las bombas de HPLC. Para no dañar la fuente de iones y el multiplicador, ponga el sistema MS/MS en modo Standby. Deje en funcionamiento las bombas de vacío del sistema LC-MS/MS.

4 Transferencia de masas de los analitos y del estándar interno

Las siguientes tablas contienen las transferencias de masas recomendadas y modos de medición de los analitos y de los estándares internos radiomarcados. Mida los analitos y los estándares internos con ionización mediante electrospray (ESI) en modo de ionización positivo.

Tabelle 2: Transiciones recomendadas, aminoácidos y succinilacetona

Sustancia	Modo de medición	Transición
Alanina	MRM	90 > 44
Alanina-D4	MRM	94 > 48
Arginina	MRM	175 > 70
Arginina-D7	MRM	182 > 77
Ácido aspártico	MRM	134 > 116
Ácido aspártico-D3	MRM	137 > 119
Citrulina	MRM	176 > 113
Citrulina-D2	MRM	178 > 115
Ácido glutámico	MRM	148 > 130
Ácido glutámico-D5	MRM	153 > 135
Glicina	MRM	76 > 30

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

Las masas indicadas deben tomarse como punto de partida para la optimización. La posición exacta de las masas puede variar ligeramente en cada sistema MS, y debe determinarse con precisión cuando se ajuste el método (Tuning). Para instalar el método recomendamos determinar la posición de las masas al menos con un decimal de precisión. Use para ello el Tuning Mix (nº de pedido 57098 y 57099, ver capítulo 3.3: Optimización de las transiciones MRM).

Tabla 3: Transiciones recomendadas, acilcarnitinas y carnitina libre

Sustancia	Modo de medición	Transición
Carnitina	MRM	162 > 85
Carnitina-D9	MRM	171 > 85
C2-Carnitina	MRM	204 > 85
C2-Carnitina-D3	MRM	207 > 85
C3-Carnitina	MRM	218 > 85
C3-Carnitina-D3	MRM	221 > 85
C4-Carnitina	MRM	232 > 85
C4-Carnitina-D3	MRM	235 > 85
C5-Carnitina	MRM	246 > 85
C5-Carnitina-D9	MRM	255 > 85
C5DC-Carnitina	MRM	276 > 85
C5DC-Carnitina-D6	MRM	282 > 85
C6-Carnitina	MRM	260 > 85
C6-Carnitina-D3	MRM	263 > 85
C8-Carnitina	MRM	288 > 85

Sustancia	Modo de medición	Transición
C8-Carnitina-D3	MRM	291 > 85
C10-Carnitina	MRM	316 > 85
C10-Carnitina-D3	MRM	319 > 85
C12-Carnitina	MRM	344 > 85
C12-Carnitina-D3	MRM	347 > 85
C14-Carnitina	MRM	372 > 85
C14-Carnitina-D3	MRM	375 > 85
C16-Carnitina	MRM	400 > 85
C16-Carnitina-D3	MRM	403 > 85
C18-Carnitina	MRM	428 > 85
C18-Carnitina-D3	MRM	431 > 85

La cuantificación de los analitos se realiza mediante la comparación de la intensidad de las señales con el del correspondiente estándar interno marcado isotópicamente. Además, este kit de reactivos permite el análisis de un buen número de acilcarnitinas, interesantes desde el punto de vista diagnóstico, para las que actualmente no existen estándares internos marcados isotópicamente. Las acilcarnitinas que poseen la misma longitud de cadena presentan factores de respuesta casi idénticos. Por eso recomendamos cuantificar estos marcadores de enfermedad con los estándares deuterados de la misma longitud de cadena. Sin embargo, este kit de reactivos sólo está validado para aquellos analitos que van acompañados por un estándar interno deuterado idéntico (véase la tabla precedente).

La tabla siguiente contiene más acilcarnitinas, sus transiciones y los estándares internos marcados isotópicamente recomendados. Estos datos son únicamente una recomendación basada en la praxis cotidiana de varios laboratorios de cribado. En principio, el kit de reactivos es adecuado para medir estos analitos, pero no ha sido validado para ello.

Tabla 4: Transiciones recomendadas, acilcarnitinas sin estándares explícitos

Sustancia	Transición	Estándar interno recomendado
C3DC-Carnitina	248 > 85	C3-Carnitina-D3
C4OH-Carnitina	248 > 85	C4-Carnitina-D3
C4DC-Carnitina	262 > 85	C4-Carnitina-D3
C5:1-Carnitina	244 > 85	C5-Carnitina-D9
C5OH-Carnitina	262 > 85	C5-Carnitina-D9
C8:1-Carnitina	286 > 85	C8-Carnitina-D3
C10:2-Carnitina	312 > 85	C10-Carnitina-D3
C10:1-Carnitina	314 > 85	C10-Carnitina-D3
C12:1-Carnitina	342 > 85	C12-Carnitina-D3
C14:2-Carnitina	368 > 85	C14-Carnitina-D3
C14:1-Carnitina	370 > 85	C14-Carnitina-D3
C14OH-Carnitina	388 > 85	C14-Carnitina-D3
C16:2-Carnitina	396 > 85	C16-Carnitina-D3
C16:1-Carnitina	398 > 85	C16-Carnitina-D3

Sustancia	Transición	Estándar interno recomendado
C16:1OH-Carnitina	414 > 85	C16-Carnitina-D3
C16OH-Carnitina	416 > 85	C16-Carnitina-D3
C18:2-Carnitina	424 > 85	C18-Carnitina-D3
C18:1-Carnitina	426 > 85	C18-Carnitina-D3
C18:2OH-Carnitina	440 > 85	C18-Carnitina-D3
C18:1OH-Carnitina	442 > 85	C18-Carnitina-D3
C18OH-Carnitina	444 > 85	C18-Carnitina-D3

Si tiene dudas sobre cómo instalar el método en su sistema de LC-MS/MS, diríjase al servicio de atención al cliente de Chromsystems, tanto llamando a nuestra línea directa al +49 89 18930-111 como enviando un correo electrónico a support@chromsystems.com.

5 Preparación de la muestra

Atención:

En el manejo de los reactivos, prestar atención a las observaciones acerca de las sustancias peligrosas mencionadas en el apéndice I.

5.1 Obtención y conservación de muestras de pacientes

Las recomendaciones para obtener y conservar las muestras de los pacientes varían según el país. Se recomienda expresamente seguir las directivas nacionales correspondientes. En Alemania, por ejemplo, la extracción de sangre para el cribado neonatal se debe realizar entre las 48 y las 72 horas de vida (véase la Directiva Infantil alemana "Kinder-Richtlinie"), mientras que el estándar CLSI NBS01-Ed7, 2021 [3] establece que la muestra debe tomarse preferentemente de 24 a 48 horas del nacimiento.

La sangre total se deja gotear y secar sobre una tarjeta de papel filtrante. Recomendamos el uso de un papel filtrante aprobado por la FDA o similar (por ejemplo, Whatman 903).

La muestra de sangre debe extraerse del talón del recién nacido. No se puede usar sangre con EDTA o con heparina, ya que entonces no se puede descartar la aparición de falsos negativos o falsos positivos en los resultados de la prueba.

A continuación se describe brevemente la extracción de sangre:

1. Limpiar la zona prevista de punción en el talón del neonato con un preparado alcohólico estéril. Secar el talón con una gasa estéril.
2. Realizar la punción con una lanceta estéril. La punta de la lanceta debe medir menos de 2 mm, ya que de lo contrario existe el riesgo de dañar al neonato.
3. Limpiar la primera gota de sangre con una gasa estéril.
4. Rozar suavemente la siguiente gota grande de sangre con el papel de filtro. Esperar a que la sangre gotee y llene completamente el círculo para ello previsto. No deben apilarse gotas de sangre unas sobre otras o mojar la tarjeta por ambas caras, ya que esto provocaría cambios en el volumen de sangre por punto y resultados erróneos en el análisis.
5. Llenar el resto de los círculos de la tarjeta de papel de filtro con una gota de sangre cada uno.
6. El cuidado de la punción debe realizarse acorde a los procedimientos establecidos en el hospital.
7. Dejar secar los puntos de sangre durante 4 horas a +20 hasta +25 °C sobre una superficie horizontal, seca y no absorbente.
8. Enviar las tarjetas de papel de filtro secas al laboratorio en las siguientes 24 horas.

Los fabricantes de tarjetas de papel de filtro facilitan instrucciones detalladas sobre la extracción de muestras y también pueden consultarse, por ejemplo en la Directiva Infantil alemana u otras normativas nacionales vigentes.

Basta con almacenar las muestras a baja humedad (inferior al 30 %) y temperatura ambiente (de +20 a +25 °C) si el análisis va a realizarse en un plazo de 24 a 48 horas. Se recomienda una baja humedad y temperatura (por debajo de -18 °C) si se van a almacenar más de 48 horas [3]. **¡Evite temperaturas superiores a 37 °C!** Esto puede provocar la reducción de la concentración de algunos aminoácidos.

En estudios propios se obtuvo una estabilidad de todos los analitos de al menos 3 meses almacenándolos a una temperatura inferior a -18 °C, de 6 semanas de +2 hasta +8 °C, y de 10 días de +20 hasta 25 °C usando bolsas de aluminio estancas y secante.

Nota:

Es responsabilidad de cada laboratorio hacer uso de todas las referencias disponibles y/o de realizar estudios propios para establecer los criterios de estabilidad específicos para su laboratorio.

5.2 Reconstitución del estándar interno

El estándar interno (n° de pedido 57004) sirve como calibrador de cada muestra individual. Es trazable a patrones de sustancias puras marcadas isotópicamente obtenidas de un proveedor certificado. El estándar interno se añade, tras su reconstitución, en cantidades definidas a cada muestra y es sometido a todo el proceso de preparación de muestras.

Antes de preparar las muestras, reconstituya el estándar interno (n° de pedido 57004) con 25 mL de Extraction Buffer. Proceda para ello de la siguiente forma:

1. Pipetear 5 mL Extraction Buffer (n° de pedido 57008) en el recipiente original del estándar interno
2. Reconstituir 5 min a una temperatura de +20 a +25 °C, agitar repetidamente
3. Introducir el contenido de la botella en un matraz aforado de 25 mL
4. Enjuagar 2 veces más el frasco de estándar interno con 5 mL de Extraction Buffer y verter en el matraz
5. Llenar el matraz con Extraction Buffer hasta los 25 mL y mezclar

Evitar la luz del sol directa. Las concentraciones de los analitos en el estándar interno dependen del lote. Encontrará cada uno de los valores en la hoja de información del estándar interno.

Estabilidad del estándar interno tras la reconstitución:

El estándar interno disuelto en el Extraction Buffer se conserva como se indica a continuación:

Tabla 5: Estabilidad del estándar interno tras la reconstitución

Temperatura de almacenamiento	Estabilidad	Otras condiciones de almacenamiento
+2 hasta +8 °C	3 semanas	protegido de la luz, cerrado herméticamente

5.3 Manipulación de los reactivos del Set de ampliación de succinilacetona

El Extraction Buffer – Succinylacetone (n° de pedido 57012) debe almacenarse a -18 °C. Eso hace que se vuelva heterogéneo.

Por eso es necesario llevar a temperatura ambiente y mezclar bien (vórtex) este reactivo antes de usarlo.

Caducidad del Extraction Buffer tras la primera descongelación:

Una vez descongelado, el reactivo se conserva como se indica a continuación:

Tabla 6: Caducidad del Extraction Buffer – Succinylacetone tras la primera descongelación

Temperatura de almacenamiento	Estabilidad	Otras condiciones de almacenamiento
+2 hasta +8 °C	2 semanas	cerrado herméticamente

5.4 Manipulación de los controles

Los **MassCheck®** Dried Blood Spot Controls (n° de pedido 0192, 0193) se utilizan para comprobar la exactitud y precisión de las respectivas secuencias de análisis. Están disponibles en dos niveles de concentración diferentes. Las tarjetas de sangre seca se basan en sangre humana total. Se utilizan como una muestra de paciente y se analizan en condiciones de rutina análogas al procedimiento respectivo.

Las tarjetas de papel de filtro son sensibles a la humedad y la temperatura. Por ello, el envase contiene un indicador de temperatura, un desecante y un indicador de humedad. Compruebe los controles de de sangre seca antes de cada uso de la siguiente manera:

1. Compruebe el estado de la pegatina indicadora de temperatura: los controles sólo pueden utilizarse si todos los campos están blancos. Si un campo se ha vuelto negro, debe desecharse la tarjeta de papel de filtro.
2. Deje que el control de sangre seca alcance la temperatura ambiente (+20 a +25 °C), evitando la luz solar directa.
3. Abra el envase.
4. Compruebe inmediatamente el estado del indicador de humedad adjunto: si el indicador de humedad ha cambiado de color de azul a rosa al 30 %, deseche la tarjeta de papel de filtro.

¡Atención!

- Cuando perfore los controles, use sólo el área dentro de la línea punteada. Las concentraciones de los analitos pueden desviarse de los valores especificados en la zona marginal.
- Dado que el aumento de la humedad tiene un efecto negativo sobre la estabilidad del producto, el tiempo fuera del envase hermético debe ser lo más breve posible.

Inmediatamente después de su uso, devuelva el material de control restante junto con el indicador de humedad y el desecante a la bolsa de almacenamiento con cierre, ciérrela herméticamente y congélela por debajo de -18°C .

Las concentraciones de los analitos en los controles dependen del lote. Encontrará cada uno de los valores en la hoja de información de cada control.

¡Atención!

Este producto ha sido producido a partir de un pool de sangre total humana testado, por el fabricante, para el virus de la inmunodeficiencia humana (VIH), el virus de la hepatitis B (VHB), el virus de la hepatitis C (VHC) y la bacteria *Treponema pallidum*, siendo el resultado del análisis negativo. Sin embargo, no se puede descartar totalmente un riesgo de infección al usar este producto. Considere todos los productos que contengan materiales humanos como potencialmente infecciosos. Al usar estos productos tome las mismas medidas de precaución que en el manejo de muestras de pacientes potencialmente infecciosas.

5.5 Proceso de preparación de muestras

Aviso

- Use para la preparación de muestras únicamente los reactivos, placas y láminas recubridoras suministradas. Los cambios en la preparación de muestras alteran el rendimiento del kit de reactivos.
- En cada serie de análisis se deberían realizar controles para documentar la precisión y la exactitud.

5.5.1 Preparación de muestras sin succinilacetona

1. Punzonado de la muestra:

Recortar el punto de sangre seca de la tarjeta con un diámetro de 3,2 mm sobre una placa de 96 pocillos (96 Well Plate, n° de pedido 57010).

2. Extracción:

Añadir 100 µL del estándar interno reconstituido (véase cap. 5.2). Cubrir la placa de 96 pocillos con una lámina protectora (Protective Sheet, n° de pedido 55011) y agitar durante 20 min a $+20$ hasta $+25^{\circ}\text{C}$ y 600 rpm.

3. Trasvase:

Retirar la lámina protectora de la placa de 96 pocillos. Pasar la fracción sobrenadante a una nueva placa de 96 pocillos (96 Well Plate, n° de pedido 57010). Sellar la placa con una lámina (Pierceable Heat Seal, n° de pedido 57014; o alternativamente: Cross-cut Adhesive Seal, n° de pedido 57015).

4. Inyección:

Inyectar 10 µL del eluato en el sistema de LC-MS/MS.

5.5.2 Preparación de muestras con succinilacetona

1. Punzonado de la muestra:

Recortar un punto de sangre seca del papel filtrante con un diámetro de 3,2 mm y colocarlo en una placa de 96 pocillos (96 Well Plate, n° de pedido 57010).

2. Extracción:

Añadir 100 µL del estándar interno reconstituido (véase cap. 5.2). Cerrar la placa de 96 pocillos con la lámina protectora (Protective Sheet, n° de pedido 55011) y agitar 20 min a una temperatura entre 20 y 25 °C y 600 U/min.

3. Trasvase:

Retirar la lámina de la placa de 96 pocillos. Pasar la fracción sobrenadante a una nueva placa de 96 pocillos (96 Well Plate, n° de pedido 57010) y cubrirla con una lámina protectora (Protective Sheet, n° de pedido 55011) también nueva. Aquí hay que procurar trasvasar toda la cantidad de fracción sobrenadante posible y que no quede líquido sobre el punzonado de sangre seca.

4. Extracción de la succinilacetona:

Añadir al punzonado restante primero 75 µL de Internal Standard – Succinylacetone (n° de pedido 57044), y luego 75 µL de Extraction Buffer – Succinylacetone (n° de pedido 57012). Cerrar con una lámina protectora (Protective Sheet, n° de pedido 55011) y agitar 30 min a una temperatura de 45 °C y 600 U/min.

5. Unión de los extractos:

Retirar las láminas de las dos placas de 96 pocillos y pipetear el extracto del paso 4 en el extracto del paso 3. Sellar la placa con una lámina (Pierceable Heat Seal, n° de pedido 57014). A continuación, agitar 1 min a +20 hasta +25 °C y 500 U/min.

6. Incubación:

Antes de la inyección, incubar la placa de 96 pocillos durante 20 min a una temperatura entre +20 y +25 °C.

7. Inyección:

Inyectar 10 µL del eluato en el sistema de LC-MS/MS.

Atención

- El Extraction Buffer – Succinylacetone se vuelve heterogéneo al almacenarlo a -18 °C. Una vez descongelado, hay que mezclar bien este reactivo (vórtex) para evitar inhomogeneidades en la solución.
- Es necesario trasvasar toda la cantidad posible de fracción sobrenadante en el paso 3.
- Es imperativo respetar el orden de pipeteado en el paso 4.
- Hay que retirar rápidamente la lámina de cubrición en el paso 5 para evitar la condensación del solvente en la misma.
- No utilice láminas adhesivas como láminas de sellado final en el paso 5, sino sólo Pierceable Heat Seals (n° de pedido 57014).

5.6 Estabilidad de las muestras preparadas

5.6.1 Muestras preparadas sin succinilacetona

La estabilidad de las muestras de análisis preparadas según capítulo 5.5.1

- en placas de 96 pocillos (96 Well Plate, n° de pedido 57010), sellada con Pierceable Heat Seals (n° de pedido 57014)
- en botella de vidrio herméticamente cerrada

es la siguiente:

Tabla 7: Estabilidad de las muestras preparadas en placas de 96 pocillos (96 Well Plate, n° de pedido 57010), sellada con Pierceable Heat Seals (n° de pedido 57014) o en viales de autoinyector herméticamente cerrados

Temperatura de almacenamiento	Estabilidad	Otras condiciones de almacenamiento
+20 hasta +25 °C	10 días	protegidas de la luz, cerradas herméticamente
+2 hasta +8 °C	10 días	protegidas de la luz, cerradas herméticamente

Nota

Una vez se haya perforado la lámina protectora (Pierceable Heat Seal) comenzarán a evaporarse los eluatos y el volumen de eluato disminuirá. Esto dependerá de los ajustes y las condiciones del autoinyector, p. ej. de la temperatura y la ventilación. Mientras sea posible inyectar un volumen suficiente, se podrán analizar las pruebas.

5.6.2 Muestras preparadas con succinilacetona

La estabilidad de las muestras de análisis preparadas según capítulo 5.5.2

- en placas de 96 pocillos (96 Well Plate, n° de pedido 57010), sellada con Pierceable Heat Seals (n° de pedido 57014)
- en botella de vidrio herméticamente cerrada

es la siguiente:

Tabla 8: Estabilidad de las muestras preparadas en placas de 96 pocillos (96 Well Plate, n° de pedido 57010), sellada con Pierceable Heat Seals (n° de pedido 57014) o en viales de autoinyector herméticamente cerrados

Temperatura de almacenamiento	Estabilidad	Otras condiciones de almacenamiento
+20 hasta +25 °C	10 días	protegidas de la luz, cerradas herméticamente
+2 hasta +8 °C	21 días	protegidas de la luz, cerradas herméticamente
a menos de -18 °C	21 días	protegidas de la luz, cerradas herméticamente

Nota

Una vez se haya perforado la lámina protectora (Pierceable Heat Seal) comenzarán a evaporarse los eluatos y el volumen de eluato disminuirá. Esto dependerá de los ajustes y las condiciones del autoinyector, p. ej. de la temperatura y la ventilación. Mientras sea posible inyectar un volumen suficiente, se podrán analizar las pruebas.

6 Equipamiento adicional necesario

Para la determinación mediante LC-MS/MS de aminoácidos y acilcarnitinas en sangre seca (no derivatizado) necesitará también el siguiente equipamiento, no incluido en el kit de reactivos:

- Espectrómetro en tándem con software de cálculo
- Sistema de HPLC con bomba, inyector y autoinyector
- Perforador manual o automático para punzonar la muestra, 3,2 mm de diámetro
- Un agitador de placas de 96 pocillos termostatzable para la extracción de la muestra. Para la preparación de muestras con succinilacetona se recomienda usar 2 agitadores: uno para la extracción a temperatura ambiente y otro para la extracción a 45 °C.
- Rodillo de cierre de goma para sellar las placas de 96 pocillos con las láminas
- Pipetas o pipetas multicanal
- Puntas de pipeta
- Matraz aforado de 25 mL
- Opcional: Heat Sealer (sellador térmico) para placas de 96 pocillos (Heat Sealer, incluyendo la pieza correspondiente, n° de pedido: 42740)

7 Registro de datos y cálculo

El estándar interno sirve como calibrador individual para cada muestra, de forma que los efectos de matriz se reduzcan a un mínimo. Para ello se añadirá a la muestra (control, muestra del paciente) una cantidad definida del estándar interno. Las concentraciones de los compuestos marcados isotópicamente en el estándar interno dependen del lote de fabricación y se deben consultar en la hoja de información adjunta al estándar de calibración correspondiente.

Para poder cuantificar una muestra se requiere el volumen de sangre empleada. El volumen de sangre que hay en un disco de papel filtrante depende del diámetro punzonado, del hematocrito de la muestra y del material del papel filtrante.

El estándar CLSI NBS01-Ed7, 2021 [3] recomienda que sólo se utilice papel filtrante destinado al análisis de sangre seca en el cribado neonatal. Existen algunos papeles filtrantes comerciales, por ejemplo Whatman 903 (GE Healthcare), que cumplen los requisitos de este estándar CLSI. El punzón debe tener aproximadamente 3,2 mm (1/8 pulgadas) de diámetro, lo que corresponde a un volumen supuesto de 3,1 µl para todas las muestras, independientemente del hematocrito [4].

Este método de cribado es un método de determinación cuantitativa que, sin embargo, se ve influido significativamente por los diferentes volúmenes de sangre utilizados, dependiendo de la muestra. Por lo tanto, siempre deben llevarse a cabo otras pruebas de diagnóstico de laboratorio para confirmar los resultados positivos del cribado.

Dependiendo del software, se necesitarán la concentración del estándar interno y el volumen de sangre o las concentraciones del estándar interno referidas a la muestra. En el cuadro de cálculo, introducir las concentraciones correspondientes (véase hoja de información) del estándar interno.

Si en su laboratorio se usa otro tamaño de punzonado (volumen de muestra), hay que corregir correspondientemente las concentraciones de estándar interno referidas a la muestra.

Para asegurar que no se hayan modificado las condiciones del LC-MS/MS, se deberían inyectar nuevamente los controles procesados durante y al final de una serie de muestras.

Para el uso correcto del software de cálculo, hay que contactar en caso necesario con el fabricante del sistema MS. En el Apéndice II encontrará las observaciones para el cálculo manual.

8 Control de calidad

Compruebe la precisión y exactitud de los análisis incluyendo controles adicionales en cada serie de análisis (**MassCheck**® Dried Blood Spot Controls, n° de pedido 0192, 0193), al menos al principio y al final de la secuencia de medición. Si los valores están fuera de los rangos indicados en la hoja de información de los controles, hay que revisar el sistema, el procedimiento de la preparación de la muestra, así como el cálculo de los valores de análisis.

Como se describe en el estándar CLSI NBS04-Ed2, 2017 [5], cada laboratorio debe establecer sus propios criterios de aceptación para los resultados de las muestras de cada serie analítica. Estos criterios se basan principalmente en el análisis de controles de calidad.

9 Valores de corte

En un laboratorio de cribado de la clínica universitaria de Dresde se realizó un estudio piloto con el kit de reactivos 57000 (sin succinilacetona), obteniendo los siguientes valores de corte como percentiles 99,9%: En él se diferenciaron los datos según semanas de gestación (SG) y el momento de la extracción de sangre tras el nacimiento [a].

Tabla 9: Valores de corte, aminoácidos, [a]

Sustancia	Valor de corte 32-42 SG, > 36 h	Valor de corte 38-42 SG, > 36 h	Valor de corte todas las SG, > 0 h
Alanina	583 µmol/L	564 µmol/L	736 µmol/L
Arginina	52 µmol/L	49 µmol/L	55 µmol/L
Ácido aspártico	420 µmol/L	402 µmol/L	420 µmol/L
Citrulina	50 µmol/L	51 µmol/L	50 µmol/L
Ácido glutámico	1074 µmol/L	1087 µmol/L	1073 µmol/L
Glicina	1003 µmol/L	962 µmol/L	1001 µmol/L
Leucina	277 µmol/L	299 µmol/L	276 µmol/L
Metionina	35 µmol/L	35 µmol/L	37 µmol/L
Ornitina	454 µmol/L	455 µmol/L	453 µmol/L
Fenilalanina	127 µmol/L	124 µmol/L	141 µmol/L
Prolina	aún no establecido	aún no establecido	aún no establecido
Tirosina	248 µmol/L	217 µmol/L	248 µmol/L
Valina	192 µmol/L	199 µmol/L	212 µmol/L

Tabla 10: Valores de corte, acilcarnitinas y carnitina libre, [a]

Sustancia	Valor de corte 32-42 SG, > 36 h	Valor de corte 38-42 SG, > 36 h	Valor de corte todas las SG, > 0 h
C0-Carnitina	55,87 $\mu\text{mol/L}$	54,96 $\mu\text{mol/L}$	55,83 $\mu\text{mol/L}$
C2-Carnitina	71,17 $\mu\text{mol/L}$	73,40 $\mu\text{mol/L}$	71,08 $\mu\text{mol/L}$
C3-Carnitina	6,35 $\mu\text{mol/L}$	6,41 $\mu\text{mol/L}$	6,34 $\mu\text{mol/L}$
C4-Carnitina	1,07 $\mu\text{mol/L}$	1,18 $\mu\text{mol/L}$	1,07 $\mu\text{mol/L}$
C5-Carnitina	0,43 $\mu\text{mol/L}$	0,37 $\mu\text{mol/L}$	0,48 $\mu\text{mol/L}$
C5DC-Carnitina	0,56 $\mu\text{mol/L}$	0,58 $\mu\text{mol/L}$	0,56 $\mu\text{mol/L}$
C6-Carnitina	0,17 $\mu\text{mol/L}$	0,17 $\mu\text{mol/L}$	0,17 $\mu\text{mol/L}$
C8-Carnitina	0,24 $\mu\text{mol/L}$	0,24 $\mu\text{mol/L}$	0,24 $\mu\text{mol/L}$
C10-Carnitina	0,35 $\mu\text{mol/L}$	0,29 $\mu\text{mol/L}$	0,35 $\mu\text{mol/L}$
C12-Carnitina	0,35 $\mu\text{mol/L}$	0,31 $\mu\text{mol/L}$	0,35 $\mu\text{mol/L}$
C14-Carnitina	0,50 $\mu\text{mol/L}$	0,49 $\mu\text{mol/L}$	0,50 $\mu\text{mol/L}$
C16-Carnitina	9,90 $\mu\text{mol/L}$	10,03 $\mu\text{mol/L}$	9,89 $\mu\text{mol/L}$
C18-Carnitina	2,06 $\mu\text{mol/L}$	2,07 $\mu\text{mol/L}$	2,06 $\mu\text{mol/L}$

En un estudio piloto llevado a cabo en el laboratorio de cribado de neonatos y metabolismo del Instituto de Química Clínica y Bioquímica Patológica de la Clínica Universitaria de la Universidad de Magdeburgo con el kit de reactivos 57000 junto con el 57111 (con succinilacetona) en 1642 neonatos se obtuvieron los siguientes valores de corte como percentiles 99,9 % [b].

Tabla 11: Valores de corte, aminoácidos, [b]

Sustancia	Valor de corte
Alanina	544 $\mu\text{mol/L}$
Arginina	70,9 $\mu\text{mol/L}$
Ácido aspártico	aún no establecido
Citrulina	93,9 $\mu\text{mol/L}$
Ácido glutámico	aún no establecido
Glicina	742 $\mu\text{mol/L}$
Leucina	349 $\mu\text{mol/L}$
Metionina	51,1 $\mu\text{mol/L}$
Ornitina	aún no establecido
Fenilalanina	136 $\mu\text{mol/L}$
Prolina	aún no establecido
Tirosina	335 $\mu\text{mol/L}$
Valina	276 $\mu\text{mol/L}$
Succinilacetona	1,23 $\mu\text{mol/L}$

Tabla 12: Valores de corte, acilcarnitinas y carnitina libre, [b]

Sustancia	Valor de corte
C0-Carnitina	55,4 µmol/L
C0, unterer Wert (0,1% Perzentile)	4,76 µmol/L
C2-Carnitina	66,7 µmol/L
C3-Carnitina	7,19 µmol/L
C4-Carnitina	1,08 µmol/L
C5-Carnitina	0,58 µmol/L
C5DC-Carnitina	0,79 µmol/L
C6-Carnitina	0,24 µmol/L
C8-Carnitina	0,27 µmol/L
C10-Carnitina	0,35 µmol/L
C12-Carnitina	0,37 µmol/L
C14-Carnitina	0,56 µmol/L
C16-Carnitina	7,66 µmol/L
C18-Carnitina	2,32 µmol/L

Estos valores de corte son sólo valores orientativos y pueden variar dependiendo del colectivo de pacientes o del sistema MS/MS empleado. Cada laboratorio de cribado debería establecer sus propios valores de corte en un estudio piloto y en colaboración con un experto en metabolismo.

10 Factores de conversión

Las siguientes tablas contienen los factores de conversión entre concentraciones en masa y concentraciones molares, y a la inversa.

Tabla 13: Factores de conversión, aminoácidos y metabolito de la tirosina (SUAC)

Sustancia	µmol/L en mg/L	mg/L en µmol/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 glutámico	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

Sustancia	$\mu\text{mol/L}$ en mg/L	mg/L en $\mu\text{mol/L}$
Succinilacetona	x 0,1581	x 6,3231
Tirosina	x 0,1812	x 5,5191
Valina	x 0,1172	x 8,5361

Tabla 14: Factores de conversión, acilcarnitinas y carnitina libre

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

11 Almacenamiento y caducidad de los reactivos

Sin haber sido abiertos, y respetando sus condiciones de transporte y almacenamiento, los reactivos se conservan hasta la fecha de caducidad indicada en la etiqueta. Transporte y almacene los reactivos en las siguientes condiciones:

Tabla 15: Condiciones de transporte del kit de reactivos:

Producto	Temperatura de transporte
Kit de reactivos (n° de pedido 57000)	+18 hasta +30 °C
Succinylacetone Upgrade Set (n° de pedido 57111)	+18 hasta +30 °C

Desembalar los reactivos inmediatamente después del transporte y almacenar cada uno de ellos por separado en las condiciones indicadas en la tabla a continuación.

Tabla 16: Condiciones de almacenamiento de los reactivos

Producto	Temperatura de almacenamiento
Mobile Phase (n° de pedido 57001, 57002)	+18 hasta +30 °C
Rinsing Solution (n° de pedido 57007)	+18 hasta +30 °C
Extraction Buffer (n° de pedido 57008)	+18 hasta +30 °C
Tuning Mix (n° de pedido 57099)	+2 hasta +8 °C
Internal Standard (n° de pedido 57004)	a menos de -18 °C
Dried Blood Spot Controls (n° de pedido 0191, 0192, 0193)	a menos de -18 °C
Internal Standard - Succinylacetone (n° de pedido 57044)	+2 hasta +8 °C
Extraction Buffer - Succinylacetone (n° de pedido 57012)	a menos de -18 °C
Tuning Mix - Succinylacetone (n° de pedido 57098)	+2 hasta +8 °C

Inmediatamente después de su uso, cierre los reactivos y almacénelos a la temperatura indicada. Una vez abiertos, se mantienen estables durante un año tras la fecha de apertura, pero nunca más allá de la fecha de caducidad indicada. Encontrará datos sobre la estabilidad de los estándares de calibración y controles reconstituidos en los capítulos 5.2 hasta 5.4.

12 Tratamiento de los residuos

Mobile Phase (n° de pedido 57001, 57002), Rinsing Solution (n° de pedido 57007), Extraction Buffer (n° de pedido 57008 y 57012), Tuning Mix (n° de pedido 57098 y 57099), el Internal Standard reconstituido (n° de pedido 57004, disuelto en n° de pedido 57008) y el Internal Standard para succinilacetona (n° de pedido 57044) contienen disolventes orgánicos. Verter los restos en el contenedor para disolventes orgánicos no halogenados.

Los restos de las muestras de pacientes y muestras procesadas, así como los controles deben recogerse y eliminarse como residuos potencialmente infecciosos.

Las soluciones mencionadas no deben eliminarse junto con la basura doméstica. No deben verterse al alcantarillado. Eliminar conforme a la Directiva sobre los residuos 2008/98/CE, así como a las normativas nacionales y regionales. Se debe garantizar que solo personal autorizado tenga acceso a los recipientes recolectores.

13 Comprobación de interferencias

Por favor, tenga en cuenta lo siguiente:

- La isoleucina interfiere con la leucina. La concentración medida en la muestra es una suma de ambos compuestos.
- La hidroxiprolina interfiere con la leucina. Los valores normales de hidroxiprolina son despreciables frente a los de la leucina. Por ello, en las mediciones de rutina la hidroxiprolina no debería ocasionar niveles de leucina falsamente elevados.
- La metioninsulfona interfiere con la tirosina. La metioninsulfona es un producto de la descomposición de la metionina. El nivel normal de metionina en recién nacidos ronda los 20 $\mu\text{mol/L}$. Las concentraciones de metioninsulfona se deberían hallar en este rango como máximo. El nivel patológico de la tirosina es de aproximadamente 300 $\mu\text{mol/L}$. Por ello, en las mediciones de rutina la metioninsulfona no debería contribuir en exceso a obtener niveles de tirosina falsamente elevados.
- El metionin-sulfóxido interfiere con la tirosina y la fenilalanina. El metionin-sulfóxido es un producto de la oxidación de la metionina. El nivel normal de metionina en recién nacidos ronda los 20 $\mu\text{mol/L}$. Las concentraciones de metionin-sulfóxido se deberían hallar en este rango como máximo. El nivel patológico de la tirosina y fenilalanina es de aproximadamente 100-300 $\mu\text{mol/L}$. Por ello, en las mediciones de rutina el metionin-sulfóxido no debería contribuir en exceso a obtener niveles falsamente elevados.
- La asparagina interfiere con la ornitina. Los niveles normales de asparagina en recién nacidos alcanzan un máximo de 140 $\mu\text{mol/L}$. Es necesaria una concentración de asparagina de más de 300 $\mu\text{mol/L}$ para provocar un aumento del 20% en la concentración de ornitina. Por ello, en las mediciones de rutina la asparagina no debería ocasionar niveles de ornitina falsamente elevados.
- La sarcosina interfiere con la alanina. Los valores normales de sarcosina son despreciables frente a los de la alanina. Por ello, en las mediciones de rutina la sarcosina no debería ocasionar concentraciones falsamente elevadas.
- La creatina, una sustancia endógena que también se usa como suplemento alimenticio para aumentar la masa muscular, interfiere con la alanina y la leucina.
- 4-aminoantipirina, un metabolito del analgésico Metamizol (p. ej. Novalgina®), interfiere con C2-carnitina.
- Las sustancias farmacológicas alopurinol (un medicamento usado para reducir el ácido úrico), triamtereno (un diurético), gabapentina (un antiepiléptico), así como la acetilcisteína (un expectorante) influyen en la transición MRM de la succinilacetona y arrojan como resultado falsos positivos en los valores de succinilacetona.
- Los fármacos azatioprina (un inmunosupresor) y aloxantina/oxipurinol (metabolito del alopurinol) influyen en la transición MRM del estándar interno de la succinilacetona y arrojan como resultado falsos positivos en los valores de succinilacetona.
- La lidocaína aumenta la transición MRM del estándar interno de la C4-carnitina y puede arrojar falsos negativos en los valores de esta.
- La gabapentina (un antiepiléptico) influye en la transición MRM del estándar interno de la C5DC-carnitina y puede arrojar falsos positivos en los valores de esta.

- El levetiracetam, un antiepiléptico, aumenta la transición MRM de la C12-carnitina y puede arrojar falsos negativos en los valores de esta.
- La pregabalina (un antiepiléptico) influye en la transición MRM del estándar interno de la succinilacetona y puede arrojar falsos negativos en los valores de esta.
- La prilocaína, un anestésico local, aumenta la transición MRM del estándar interno de la C3-carnitina y puede arrojar falsos negativos en los valores de esta.
- Las acilcarnitinas isobaras con fragmentación idéntica se calculan como una suma. Aquí corresponden los siguientes pares de acilcarnitinas: C3DC/C4OH; C4DC/C5OH; C5DC/C6OH etc.
- En aquellos pacientes que reciben alimentación parenteral, en la que la tirosina es sustituida por acetil-tirosina, la concentración de tirosina puede ser baja. Esto puede elevar el cociente Phe/Tyr, aparentando ser una fenilketonuria, aunque la concentración de fenilalanina esté dentro de un rango normal.
- En pacientes tratados con determinados antibióticos (por ejemplo, pivmecillinam, pivampicilina), puede formarse ácido piválico por metabolización y, mediante procesos posteriores, pivaloilcarnitina. La pivaloilcarnitina es isóbara a la isovalerilcarnitina (C5-carnitina), lo que puede dar lugar a un solapamiento de picos que sugiera una isovalerianacidemia, aunque no exista ningún trastorno metabólico.

Observaciones generales e internas sobre los aditivos de los materiales plásticos:

Los aditivos de los materiales plásticos utilizados antes o durante la preparación de las muestras pueden interferir considerablemente con algunas acilcarnitinas y provocar resultados falsos positivos. Se han observado interferencias, en particular, con las acilcarnitinas C8, C5:1 y C5DC.

- En el caso de C8 y C5:1, se identificó el cloruro de polivinilideno (PVdC) como causa principal de los resultados falsamente elevados.

Por lo tanto, se ha comprobado la idoneidad de todos los reactivos y recipientes para la preparación de muestras incluidos en este kit de reactivos. El usuario final debe asegurarse de que no haya interferencias procedentes de materiales plásticos no incluidos en este kit (por ejemplo, puntas de pipeta).

La sustancia endógena oleamida también se utiliza en su forma sintética como agente deslizante, lubricante o inhibidor de la corrosión en la producción de artículos de plástico como puntas de pipetas, tubos de ensayo y placas de pocillos. Por lo tanto, algunos de estos productos pueden contener residuos de oleamida y contaminar la muestra durante su preparación. La oleamida interfiere con el patrón interno de la C5DC-carnitina, por lo que se ha observado esporádicamente un aumento de la intensidad de la señal. Esto podría dar lugar a resultados falsos negativos en el cribado. Para identificar las muestras afectadas, controla las intensidades del patrón interno de la C5DC-carnitina en busca de valores atípicos con señales anormalmente altas. En el caso de las muestras de pacientes afectados, repite la preparación de las muestras para obtener resultados válidos.

Se comprobaron los siguientes compuestos isóbaros, sustancias farmacológicas, drogas recreativas y metabolitos sin que alteraran los resultados de la analítica:

Compuestos isóbaros:

Acetilserina, ácido málico, ácido aminocaproico, amitriptilina, aripiprazol, atomoxetina, atropina, betametasona, budesónida, bupivacaína, carbimazol, cefalexina, cetirizina, clorprotixeno, clemastina (meclostina), clenbuterol, clomipramina, clonidina, clotrimazol, colchicina, ciclofosfamida, ciproterona, difenhidramina, domperidona, etambutol, etilefrina, ácido formiminoglutámico, fluticasona, fluvoxamina, fosfomicina, hidroxiclороquina, imipramina, irbesartán, isoniazida, lactulosa, maprotilina, melperona, mepivacaína, mercaptopurina, mesalazina, metronidazol, moxifloxacina, naproxeno, nitrofurantoína,

norfloxacin, nortriptilina, ofloxacin, ondansetrón, opipramol, oxcarbazepina, oximetazolina, paliperidona, penicilamina, fenilbutazona, pipamperona, proguanil, propofol, propranolol, propiltiouracilo, propifenazona, pseudoefedrina, pirazinamida, piridostigmina, piridoxina, pirimetamina, ramipril, ranitidina, reproterol, ropivacaína, sotalol, espironolactona, sulbactam, sulfasalazina, terbinafina, teofilina, tiamazol, tioridazina, timolol, tolperisona, tranilcipromina, trimetoprima, venlafaxina, xilometazolina, zolmitriptán, zuclopentixol

Sustancias farmacológicas/metabolitos:

Acetazolamida, ácido acetilsalicílico, aciclovir, alprazolam, α -hidroxialprazolam, amikacina, amlodipina, amoxicilina, ampicilina, azitromicina, benzocaína, betaína, bisoprolol, bromazepam, 3-OH-bromazepam, brotizolam, buprenorfina, captopril, carbamazepina, carbamazepina-10,11-epóxido, carbamylglutamato, cefradina, cloranfenicol, clordiazepóxido, clorhexidina, cimetidina, ciprofloxacina, claritromicina, clobazam, clonazepam, 7-aminoclonazepam, codeína, demoxepam, dexametasona, dextrometorfano, diazepam, diclofenaco, digitoxina, digoxina, dihidrocodeína, ácido 2,3-dihidroxibenzoico, disopiramida, EDDP (2-etilideno-1,5-dimetil-3,3-difenilpirrolidina), enalaprilato, eritromicina, estazolam, fentanilo, norfentanilo, flunitrazepam, desmetilflunitrazepam, 7-aminoflunitrazepam, flurazepam, desalquilflurazepam, furosemida, ganciclovir, gentamicina, hidroclorotiazida, ibuprofeno, dinitrato de isosorbida, itraconazol, ketamina, norketamina, ketoconazol, levofloxacina, levotiroxina, lorazepam, lormetazepam, medazepam, meperidina, normeperidina, metformina HCl (1,1-dimetilbiguanida), metadona, meticilina, metilfenidato, metilprednisolona, metoclopramida, metoprolol, midazolam, α -hidroximidazolam, morfina, ácido micofenólico, ácido micofenólico-glucurónido, *n*-acetil-procaínamida, nadolol, naloxon, naltrexona, benzoato sódico, fluoruro de sodio, fenilbutirato de sodio, *n*-desmetildiazepam, neomicina, nitrazepam, 7-aminonitrazepam, nifedipina, nitisinona, norbuprenorfina, norclobazam, norverapamilo, omeprazol, oxazepam, oxiconona, paracetamol (4-acetamidofenol o acetaminofeno), penicilina G, penicilina V, fenobarbital, fenitoína, prazepam, prazosina, prednisolona, prednisona, procainamida, prometazina, ($\pm$)-propranolol, propoxifeno, quetiapina, norpropoxifeno, ranitidina, rifampicina, risperidona, ácido ritalínico, salbutamol (albuterol), ácido salicílico (ácido 2-hidroxibenzoico), sapropterina, estreptomina, sufentanilo, sulfametoxazol, tapentadol, nortapentadol, temazepam, tiopental, tilidina, nortilidina, tramadol, O-DM-tramadol, triazolam, α -hidroxitriazolam, trimetoprima, ácido valproico, vancomicina, verapamilo, zaleplon, zolpidem, zopiclona.

Drogas recreativas/metabolitos:

2C-B (4-bromo-2,5-dimetoxifeniletamina), 2C-I (2,5-dimetoxi-4-iodofeniletamina), 2-oxo-3-hidroxi-LSD, 6-monoacetilmorfina, acetilcodeína, alobarbitol, amobarbitol, anfetamina, barbitol, BDB (1-(1,3-benzodioxol-5-il)-2-butilamina), benzoilecgonina, butalbital, butilona, catinona, cocaetilo, cocaína, 11-Nor-9-carboxi-THC, hexobarbitol, hidrocodona, hidromorfona, LSD (dietilamida de ácido lisérgico), MBDB (2-metilamino-1-(3,4-metilendioxifenil)butano), MDA (3,4-metilendioxianfetamina), MDEA (3,4-metilendioxin-etilanfetamina), MDMA (3,4-metilendioxin-metilanfetamina), MDPV (metilendioxipirovalerona), meconina, mefedrona, mescalina, metanfetamina, metacualona, metilona, norcocaína, norcodeína, oximorfona, papaverina, PCP (fenilciclohexilpiperidina), pentobarbitol, PMA (4-metoxianfetamina), secbutabarbitol, secobarbitol, tebaína.

Si tiene dudas sobre las interferencias, diríjase a nuestro servicio externo o directamente al servicio de atención al cliente de Chromsystems, tanto llamando a nuestra línea directa al +49 89 18930-111 como enviando un correo electrónico a support@chromsystems.com.

14 Localización y resolución de problemas

Tabla 17: Medidas en caso de avería

Problema	Causa posible	Solución
No se puede generar el perfil gradual	Bomba de HPLC	Comprobar la bomba (aire, estanqueidad)
	Aire en el sistema	Desgasificar (purgar) el equipo de HPLC
	La velocidad de flujo no es constante	Comprobar la bomba
Señales de interferencia	Sistema de inyección sucio	Limpiar con metanol, o inyectar 10 veces Mobile Phase
	Viales del autoinyector sucios	Usar viales nuevos o limpiarlos con metanol
	Septum del recipiente de muestras	Utilizar otro septum
No hay señales	Inyector averiado	Comprobar el inyector
	Bomba averiada	Comprobar la bomba
	El sistema LC-MS/MS no está listo para su uso	Comprobar el sistema MS/MS
Disminución en la sensibilidad	Fuente de iones sucia	Limpiar la fuente de iones
	Espectrómetro de masas sucio	Massenspektrometer reinigen
	La válvula de inyección tiene fugas	Comprobar el inyector
	El multiplicador está viejo	Cambiar el multiplicador
Baja intensidad de señal	Desplazamiento de masas en el espectrómetro de masas	Calibración del espectrómetro
No hay vacío	Bomba de vacío averiada	Comprobar las bombas anterior y superior de vacío
	Fuga en el sistema de vacío	Comprobar los tubos y conexiones de vacío
No hay gas	Generador de nitrógeno averiado	Comprobar el generador de nitrógeno
	Compresor averiado	Comprobar el compresor
	Bombona de gas vacía	Cambiar la bombona de gas
	La presión de entrada de gas no está dentro del rango nominal	Regular la presión de entrada de gas

Si tiene dudas sobre cómo arreglar averías, diríjase a nuestro servicio externo o directamente al servicio de atención al cliente de Chromsystems, tanto llamando a nuestra línea directa al +49 89 18930-111 como enviando un correo electrónico a support@chromsystems.com.

15 Bibliografía

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

Apéndice I: Observaciones sobre las sustancias peligrosas

En el manejo de los reactivos, prestar atención a las siguientes observaciones sobre las sustancias peligrosas y tomar las medidas de seguridad apropiadas. Nuestras hojas de datos de seguridad contienen información adicional. Puede descargarlas de nuestra página web www.chromsystems.com o pedirnoslas.

Tabla 18: Indicaciones de peligro y consejos de prudencia

Pictogramas	Indicaciones de peligro y consejos de prudencia
Mobile Phase (n° de pedido 57001, 57002)	
	Peligro H225 Líquido y vapores muy inflamables. H302+H312+H332 Nocivo en caso de ingestión, contacto con la piel o inhalación. H319 Provoca irritación ocular grave.
	P210 Mantener alejado del calor, de superficies calientes, de chispas, de llamas abiertas y de cualquier otra fuente de ignición. No fumar. P241 Utilizar un material eléctrico, de ventilación o de iluminación/antideflagrante. P243 Tomar medidas de precaución contra descargas electrostáticas. P280 Llevar guantes/prendas/gafas/máscara de protección.
Rinsing Solution (n° de pedido 57007)	
	Peligro H225 Líquido y vapores muy inflamables. H302+H312+H332 Nocivo en caso de ingestión, contacto con la piel o inhalación. H319 Provoca irritación ocular grave.
	P210 Mantener alejado del calor, de superficies calientes, de chispas, de llamas abiertas y de cualquier otra fuente de ignición. No fumar. P241 Utilizar un material eléctrico, de ventilación o de iluminación/antideflagrante. P243 Tomar medidas de precaución contra descargas electrostáticas. P280 Llevar guantes/prendas/gafas/máscara de protección.
Extraction Buffer (n° de pedido 57008)	
	Peligro H225 Líquido y vapores muy inflamables. H301+H311+H331 Tóxico en caso de ingestión, contacto con la piel o inhalación. H370 Provoca daños en el sistema nervioso central y los órganos visuales
	P210 Mantener alejado del calor, de superficies calientes, de chispas, de llamas abiertas y de cualquier otra fuente de ignición. No fumar.
	P280 Llevar guantes/ropa de protección/equipo de protección para los ojos/La cara. P301+P310 EN CASO DE INGESTIÓN: Llamar inmediatamente a un CENTRO DE TOXICOLOGÍA/médico. P302+P352 EN CASO DE CONTACTO CON LA PIEL: Lavar con abundante agua. P403+P233 Almacenar en un lugar bien ventilado. Mantener el recipiente cerrado herméticamente.

Pictogramas	Indicaciones de peligro y consejos de prudencia
Extraction Buffer (para el Succinylacetone (non derivatised) Upgrade Set, n° de pedido 57012)	
	Peligro H225 Líquido y vapores muy inflamables. H302+H312+H332 Nocivo en caso de ingestión, contacto con la piel o inhalación. H319 Provoca irritación ocular grave.
	P210 Mantener alejado del calor, de superficies calientes, de chispas, de llamas abiertas y de cualquier otra fuente de ignición. No fumar. P241 Utilizar un material eléctrico, de ventilación o de iluminación/antideflagrante. P243 Tomar medidas de precaución contra descargas electrostáticas. P280 Llevar guantes/prendas/gafas/máscara de protección.
Internal Standard (para el Succinylacetone (non derivatised) Upgrade Set, n° de pedido 57044)	
	Peligro H225 Líquido y vapores muy inflamables. H302+H312+H332 Nocivo en caso de ingestión, contacto con la piel o inhalación. H319 Provoca irritación ocular grave.
	P210 Mantener alejado del calor, de superficies calientes, de chispas, de llamas abiertas y de cualquier otra fuente de ignición. No fumar. P241 Utilizar un material eléctrico, de ventilación o de iluminación/antideflagrante. P243 Tomar medidas de precaución contra descargas electrostáticas. P280 Llevar guantes/prendas/gafas/máscara de protección.
Tuning Mix (n° de pedido 57099 y 57098 para el Succinylacetone (non derivatised) Upgrade Set)	
	Peligro H225 Líquido y vapores muy inflamables. H302+H312+H332 Nocivo en caso de ingestión, contacto con la piel o inhalación. H319 Provoca irritación ocular grave.
	P210 Mantener alejado del calor, de superficies calientes, de chispas, de llamas abiertas y de cualquier otra fuente de ignición. No fumar. P241 Utilizar un material eléctrico, de ventilación o de iluminación/antideflagrante. P243 Tomar medidas de precaución contra descargas electrostáticas. P280 Llevar guantes/prendas/gafas/máscara de protección.
Estos elementos han sido clasificados como no peligrosos acorde a la legislación de la Unión Europea: Internal Standard (n° de pedido 57004) MassCheck® Dried Blood Spot Controls (n° de pedido 0191, 0192, 0193)	

Apéndice II: Indicaciones para el cálculo

La cuantificación de los analitos se realiza comparando la intensidad de la señal con los correspondientes patrones internos marcados con isótopos. Con este kit de reactivos también pueden medirse varias acilcarnitinas de interés diagnóstico para las que aún no se dispone de patrones internos marcados isotópicamente. Las acilcarnitinas con la misma longitud de cadena muestran aproximadamente el mismo factor de respuesta. Por lo tanto, se recomienda cuantificar estos marcadores de enfermedad con estándares deuterados de la misma longitud de cadena.

La concentración del analito de interés en la muestra se calcula según el siguiente principio: Se determina la relación entre la intensidad del pico del analito y la del patrón interno y se multiplica por la concentración del patrón interno. Además, hay otros parámetros que se incluyen en el cálculo (véase más abajo).

Las concentraciones de analitos en las muestras se calculan acorde al siguiente principio:

$$C_{\text{Muestra}} [\mu\text{mol/L}] = \frac{A_{\text{muestra}} \times \text{Volumen}_{\text{ISTD}}}{I_{\text{muestra}} \times \text{Volumen}_{\text{sangre en punzonado}} \times \text{RRF}} \times C_{\text{ISTD}}$$

– Concentración de la sustancia A en la muestra	= C_{muestra}
– Intensidad de señal de la sustancia A en la muestra	= A_{muestra}
– Intensidad de señal del estándar interno en la muestra	= I_{muestra}
– Concentración C del estándar interno relacionada con la muestra	= C_{ISTD}
– Volumen de sangre en el disco de sangre seca	= $\text{Volumen}_{\text{disco de sangre seca}}$
– Volumen del estándar interno	= $\text{Volumen}_{\text{estándar}}$
– Factor de respuesta relativa (Relative Response Factor)	= RRF

El $\text{Volumen}_{\text{disco de sangre seca}}$ suele rondar los 3,11–3,2 μL .

Los factores de respuesta relativos (RRF) pueden utilizarse de acuerdo con la norma CLSI NBS04-Ed2, 2017 [5] cuando se utilizan diferentes espectrómetros de masas y se aplican los mismos valores de corte. De este modo, por ejemplo, se tienen en cuenta y se compensan matemáticamente las diferentes eficiencias de ionización de los distintos espectrómetros de masas. A partir de los resultados de medición de muestras de referencia con concentraciones de analitos conocidas (por ejemplo, **MassCheck®** Dried Blood Spot Controls, n° de pedido 0192 y 0193) durante varios días de análisis, se calculan los RRF para cada espectrómetro de masas de acuerdo con la siguiente fórmula:

$$\text{RRF} = \frac{\text{Concentración medida del analito}}{\text{Concentración objetivo del analito}}$$

Consejos para el uso de software especial en la evaluación cuantitativa:

Los volúmenes de los estándares internos 57004 y 57044 que se emplean para la preparación de muestras son diferentes. Si se usan programas de evaluación que solo permiten introducir un volumen ISTD global para todos los analitos, hay que multiplicar la concentración del ISTD introducida para la SUAC-¹³C5 con los cocientes del volumen registrado en el software y el volumen que realmente se ha añadido.

Ejemplo:

Volumen indicado en el software = 100 μL

Volumen de 57044 añadido en realidad = 75 μL

Concentración de ISTD (dependiente del lote, consultar la hoja de información) = 0,141 $\mu\text{mol/L}$

Introducción de la concentración en $\mu\text{mol/L}$:

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

Apéndice III: Datos de validación

Los datos de rendimiento se calcularon y verificaron en los siguientes dispositivos:

- Espectrómetro de masas SCIEX API 3200™ con sistema HPLC Shimadzu LC-20A Prominence
- Espectrómetro de masas Waters® Quattro Micro™ API con sistema HPLC Waters® Alliance™ HT 2795
- Espectrómetro de masas SCIEX API 4000™ con sistema HPLC Shimadzu LC-20A Prominence
- Espectrómetro de masas Waters® ACQUITY™ TQD con sistema ACQUITY™ UHPLC®

Para todas las mediciones se usó la ionización por electrospray (ESI+).

IIIa: Preparación sin succinilacetona

Tasas de recuperación:

La recuperación analítica se determinó a partir de la pendiente de las líneas de calibración de varias muestras de sangre y diluciones de soluciones estándar:

Tabla 19: Tasas de recuperación, análisis con espectrómetro de masas Waters® Quattro Micro™ API

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

*Estos datos se calcularon en un SCIEX API 4000™.

Tabla 20: Tasas de recuperación, análisis con espectrómetro de masas SCIEX API 3200™

Sustancia	Tasa de recuperación	Sustancia	Tasa de recuperación
Alanina	73 %	C0-Carnitina	85 %
Arginina	64 %	C2-Carnitina	80 %
Ácido aspártico	74 %	C3-Carnitina	72 %
Citrulina	80 %	C4-Carnitina	76 %
Ácido glutámico	68 %	C5-Carnitina	88 %

Sustancia	Tasa de recuperación	Sustancia	Tasa de recuperación
Glicina	78 %	C5DC-Carnitina	102 %
Leucina	76 %	C6-Carnitina	73 %
Metionina	73 %	C8-Carnitina	72 %
Ornitina	85 %	C10-Carnitina	70 %
Fenilalanina	77 %	C12-Carnitina	64 %
Prolina	74 %	C14-Carnitina	63 %
Tirosina	78 %	C16-Carnitina	66 %
Valina	74 %	C18-Carnitina	65 %

Límite inferior del análisis (LLOQ) y linealidad (límite superior de análisis):

El límite del análisis y la linealidad se determinó diluyendo el eluato de una muestra de sangre procesada con estándar interno.

El método es lineal desde el límite inferior (LLOQ) hasta el límite superior de análisis indicado (rango lineal).

Tabla 21: Linealidad y límite de cuantificación del análisis, análisis con espectrómetro de masas Waters® Quattro Micro™ API, aminoácidos

Sustancia	Límite inferior de cuantificación (LLOQ), aprox.	Rango lineal hasta por lo menos
Alanina	15,6 µmol/L	2000 µmol/L
Arginina	7,8 µmol/L	2000 µmol/L
Ácido aspártico	15,6 µmol/L	2000 µmol/L
Citrulina	7,8 µmol/L	2000 µmol/L
Ácido glutámico	15,6 µmol/L	2000 µmol/L
Glicina	15,6 µmol/L	2000 µmol/L
Leucina	15,6 µmol/L	2000 µmol/L
Metionina	7,8 µmol/L	2000 µmol/L
Ornitina	7,8 µmol/L	2000 µmol/L
Fenilalanina	7,8 µmol/L	2000 µmol/L
Prolina*	4,8 µmol/L	2400 µmol/L
Tirosina	15,6 µmol/L	2000 µmol/L
Valina	15,6 µmol/L	2000 µmol/L

* Estos datos se calcularon en un SCIEX API 4000™.

Tabla 22: Linealidad y límite de cuantificación del análisis, análisis con espectrómetro de masas SCIEX API 3200™, aminoácidos

Sustancia	Límite inferior de cuantificación (LLOQ), aprox.	Rango lineal hasta por lo menos
Alanina	13,5 µmol/L	2000 µmol/L
Arginina	2,5 µmol/L	2000 µmol/L
Ácido aspártico	30,0 µmol/L	2000 µmol/L

Sustancia	Límite inferior de cuantificación (LLOQ), aprox.	Rango lineal hasta por lo menos
Citrulina	2,5 µmol/L	2000 µmol/L
Ácido glutámico	25,0 µmol/L	2000 µmol/L
Glicina	10,5 µmol/L	2000 µmol/L
Leucina	13,0 µmol/L	2000 µmol/L
Metionina	2,5 µmol/L	2000 µmol/L
Ornitina	8,0 µmol/L	2000 µmol/L
Fenilalanina	6,0 µmol/L	2000 µmol/L
Prolina	5,0 µmol/L	2400 µmol/L
Tirosina	12,0 µmol/L	2000 µmol/L
Valina	16,5 µmol/L	2000 µmol/L

Tabla 23: Linealidad y límite de cuantificación del análisis, análisis con espectrómetro de masas Waters® Quattro Micro™ API, acilcarnitinas y carnitina libre

Sustancia	Límite inferior de cuantificación (LLOQ), ca.	Rango lineal hasta por lo menos
C0-Carnitina	1,6 µmol/L	200 µmol/L
C2-Carnitina	1,6 µmol/L	200 µmol/L
C3-Carnitina	0,2 µmol/L	50 µmol/L
C4-Carnitina	0,2 µmol/L	25 µmol/L
C5-Carnitina	0,2 µmol/L	25 µmol/L
C5DC-Carnitina	0,2 µmol/L	25 µmol/L
C6-Carnitina	0,2 µmol/L	25 µmol/L
C8-Carnitina	0,2 µmol/L	25 µmol/L
C10-Carnitina	0,2 µmol/L	25 µmol/L
C12-Carnitina	0,2 µmol/L	25 µmol/L
C14-Carnitina	0,1 µmol/L	25 µmol/L
C16-Carnitina	0,1 µmol/L	33 µmol/L
C18-Carnitina	0,1 µmol/L	33 µmol/L

Tabla 24: Linealidad y límite de cuantificación del análisis, análisis con espectrómetro de masas SCIEX API 3200™, acilcarnitinas y carnitina libre

Sustancia	Límite inferior de cuantificación (LLOQ), ca.	Rango lineal hasta por lo menos
C0-Carnitina	1,5 µmol/L	200 µmol/L
C2-Carnitina	1,0 µmol/L	200 µmol/L
C3-Carnitina	0,1 µmol/L	50 µmol/L
C4-Carnitina	0,2 µmol/L	25 µmol/L
C5-Carnitina	0,2 µmol/L	25 µmol/L
C5DC-Carnitina	0,1 µmol/L	25 µmol/L
C6-Carnitina	0,1 µmol/L	25 µmol/L
C8-Carnitina	0,2 µmol/L	25 µmol/L

Sustancia	Límite inferior de cuantificación (LLOQ), ca.	Rango lineal hasta por lo menos
C10-Carnitina	0,1 µmol/L	25 µmol/L
C12-Carnitina	0,1 µmol/L	25 µmol/L
C14-Carnitina	0,1 µmol/L	25 µmol/L
C16-Carnitina	0,1 µmol/L	33 µmol/L
C18-Carnitina	0,1 µmol/L	33 µmol/L

Reproducibilidad Intra-ensayo:

Los coeficientes de variación se calcularon mediante un procesamiento múltiple (n = 10) de la misma prueba; usando tres concentraciones diferentes:

Tabla 25: Reproducibilidad Intra-ensayo, análisis con espectrómetro de masas SCIEX 4500MD™, aminoácidos, n = 10

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

*Estos datos se calcularon en un SCIEX API 4000™.

Tabla 26: Reproducibilidad Intra-ensayo, análisis con espectrómetro de masas SCIEX API 3200™, aminoácidos, n = 10

Sustancia	Coeficiente de variación (concentración de sustancia)		
Alanina	3,5 % (378 µmol/L)	2,6 % (411 µmol/L)	4,0 % (752 µmol/L)
Arginina	2,5 % (19 µmol/L)	1,7 % (80 µmol/L)	3,3 % (167 µmol/L)
Ácido aspártico	3,9 % (180 µmol/L)	2,5 % (231 µmol/L)	4,0 % (461 µmol/L)
Citrulina	3,8 % (26 µmol/L)	4,6 % (73 µmol/L)	3,8 % (275 µmol/L)
Ácido glutámico	2,0 % (482 µmol/L)	3,8 % (433 µmol/L)	4,3 % (876 µmol/L)
Glicina	8,3 % (285 µmol/L)	5,9 % (389 µmol/L)	7,2 % (1032 µmol/L)
Leucina	3,4 % (348 µmol/L)	2,0 % (351 µmol/L)	4,3 % (637 µmol/L)
Metionina	4,7 % (36 µmol/L)	3,3 % (73 µmol/L)	4,3 % (238 µmol/L)

Sustancia	Coeficiente de variación (concentración de sustancia)		
Ornitina	2,3 % (251 µmol/L)	1,9 % (220 µmol/L)	4,0 % (677 µmol/L)
Fenilalanina	1,8 % (117 µmol/L)	2,1 % (196 µmol/L)	4,2 % (572 µmol/L)
Prolina	3,5 % (332 µmol/L)	2,6 % (481 µmol/L)	4,2 % (716 µmol/L)
Tirosina	2,2 % (96 µmol/L)	1,9 % (192 µmol/L)	4,3 % (585 µmol/L)
Valina	3,1 % (221 µmol/L)	1,9 % (267 µmol/L)	4,0 % (520 µmol/L)

Tabla 27: Reproducibilidad Intra-ensayo, análisis con espectrómetro de masas Waters® Quattro Micro™ API, acilcarnitinas y carnitina libre, n = 10

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

Tabla 28: Reproducibilidad Intra-ensayo, análisis con espectrómetro de masas SCIEX API 3200™, acilcarnitinas y carnitina libre, n = 10

Sustancia	Coeficiente de variación (concentración de sustancia)		
C0-Carnitina	4,0 % (26,5 µmol/L)	3,1 % (40,7 µmol/L)	4,5 % (108 µmol/L)
C2-Carnitina	2,8 % (10,3 µmol/L)	3,2 % (28,5 µmol/L)	4,4 % (75,4 µmol/L)
C3-Carnitina	5,5 % (1,30 µmol/L)	3,1 % (5,84 µmol/L)	4,9 % (16,7 µmol/L)
C4-Carnitina	3,5 % (0,19 µmol/L)	3,3 % (1,04 µmol/L)	5,5 % (4,84 µmol/L)
C5-Carnitina	6,6 % (0,09 µmol/L)	2,9 % (0,60 µmol/L)	4,9 % (2,70 µmol/L)
C5DC-Carnitina	9,0 % (0,16 µmol/L)	8,7 % (0,58 µmol/L)	5,1 % (2,16 µmol/L)
C6-Carnitina	9,4 % (0,04 µmol/L)	2,5 % (0,49 µmol/L)	4,7 % (2,43 µmol/L)
C8-Carnitina	3,0 % (0,04 µmol/L)	4,6 % (0,51 µmol/L)	4,1 % (2,53 µmol/L)
C10-Carnitina	3,1 % (0,08 µmol/L)	4,9 % (0,50 µmol/L)	6,0 % (2,47 µmol/L)
C12-Carnitina	6,8 % (0,04 µmol/L)	4,1 % (0,47 µmol/L)	5,8 % (2,36 µmol/L)
C14-Carnitina	7,8 % (0,08 µmol/L)	4,6 % (0,52 µmol/L)	3,9 % (2,45 µmol/L)
C16-Carnitina	2,9 % (0,79 µmol/L)	4,2 % (4,91 µmol/L)	5,5 % (14,3 µmol/L)
C18-Carnitina	5,1 % (0,56 µmol/L)	2,8 % (2,54 µmol/L)	5,5 % (9,38 µmol/L)

Reproducibilidad Inter-ensayo:

La reproducibilidad inter-ensayo se calculó mediante un procesamiento múltiple (n = 10) de 3 concentraciones distintas de la misma muestra en 10 días diferentes:

Tabla 29: Reproducibilidad Inter-ensayo, análisis con espectrómetro de masas Waters® Quattro Micro™ API, aminoácidos, n = 100

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

* Estos datos se calcularon en un SCIEX API 4000™.

Tabla 30: Reproducibilidad Inter-ensayo, análisis con espectrómetro de masas SCIEX API 3200™, aminoácidos, n = 100

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

Tabla 31: Reproducibilidad Inter-ensayo, análisis con espectrómetro de masas Waters® Quattro Micro™ API, acilcarnitinas y carnitina libre, n = 100

Sustancia	Coeficiente de variación (concentración de sustancia)		
C0-Carnitina	6,7 % (26,4 µmol/L)	7,1 % (48,0 µmol/L)	6,1 % (105 µmol/L)
C2-Carnitina	6,1 % (15,2 µmol/L)	6,5 % (39,5 µmol/L)	5,1 % (81,6 µmol/L)
C3-Carnitina	5,8 % (1,78 µmol/L)	6,8 % (6,54 µmol/L)	5,3 % (15,1 µmol/L)
C4-Carnitina	7,0 % (0,34 µmol/L)	6,8 % (1,15 µmol/L)	5,2 % (4,42 µmol/L)
C5-Carnitina	8,5 % (0,14 µmol/L)	7,0 % (0,60 µmol/L)	5,8 % (2,35 µmol/L)
C5DC-Carnitina	14,3 % (0,19 µmol/L)	11,7 % (0,66 µmol/L)	9,0 % (2,38 µmol/L)
C6-Carnitina	13,3 % (0,06 µmol/L)	7,4 % (0,48 µmol/L)	5,6 % (2,11 µmol/L)
C8-Carnitina	9,3 % (0,10 µmol/L)	7,6 % (0,57 µmol/L)	5,6 % (2,31 µmol/L)
C10-Carnitina	7,8 % (0,16 µmol/L)	7,0 % (0,63 µmol/L)	5,5 % (2,44 µmol/L)
C12-Carnitina	9,1 % (0,07 µmol/L)	6,9 % (0,52 µmol/L)	5,7 % (2,25 µmol/L)
C14-Carnitina	8,8 % (0,10 µmol/L)	7,1 % (0,50 µmol/L)	6,1 % (2,00 µmol/L)
C16-Carnitina	6,4 % (0,72 µmol/L)	6,6 % (4,56 µmol/L)	5,5 % (12,2 µmol/L)
C18-Carnitina	6,3 % (0,54 µmol/L)	6,8 % (2,26 µmol/L)	5,5 % (7,69 µmol/L)

Tabla 32: Reproducibilidad Inter-ensayo, análisis con espectrómetro de masas SCIEX API 3200™, acilcarnitinas y carnitina libre, n = 100

Sustancia	Coeficiente de variación (concentración de sustancia)		
C0-Carnitina	6,4 % (26,5 µmol/L)	5,0 % (40,7 µmol/L)	5,3 % (108 µmol/L)
C2-Carnitina	5,4 % (10,2 µmol/L)	5,1 % (28,5 µmol/L)	5,4 % (75,4 µmol/L)
C3-Carnitina	5,9 % (1,27 µmol/L)	5,3 % (5,84 µmol/L)	5,8 % (16,7 µmol/L)
C4-Carnitina	6,6 % (0,18 µmol/L)	5,2 % (1,04 µmol/L)	5,8 % (4,84 µmol/L)
C5-Carnitina	7,6 % (0,08 µmol/L)	5,3 % (0,60 µmol/L)	6,0 % (2,70 µmol/L)
C5DC-Carnitina	13,7 % (0,18 µmol/L)	8,9 % (0,58 µmol/L)	6,6 % (2,16 µmol/L)
C6-Carnitina	9,8 % (0,04 µmol/L)	5,6 % (0,49 µmol/L)	5,5 % (2,43 µmol/L)
C8-Carnitina	6,8 % (0,04 µmol/L)	5,8 % (0,51 µmol/L)	5,4 % (2,53 µmol/L)
C10-Carnitina	6,1 % (0,08 µmol/L)	6,1 % (0,50 µmol/L)	5,7 % (2,47 µmol/L)
C12-Carnitina	7,2 % (0,04 µmol/L)	6,0 % (0,47 µmol/L)	5,7 % (2,36 µmol/L)
C14-Carnitina	7,0 % (0,08 µmol/L)	5,9 % (0,52 µmol/L)	5,0 % (2,45 µmol/L)
C16-Carnitina	5,7 % (0,77 µmol/L)	5,1 % (4,91 µmol/L)	4,8 % (14,3 µmol/L)
C18-Carnitina	5,1 % (0,54 µmol/L)	4,8 % (2,54 µmol/L)	4,9 % (9,38 µmol/L)

Estos datos se obtuvieron en nuestros laboratorios exclusivamente para la comprobación del rendimiento del kit de reactivos y para el cumplimiento de exigencias regulatorias. Indicamos expresamente que estos datos no son aptos para realizar una comparativa de los sistemas de medición utilizados o para realizar afirmaciones sobre su rendimiento en términos generales.

IIIb: Preparación con succinilacetona

Pérdidas derivadas de la preparación:

Las pérdidas derivadas de la preparación se calcularon a partir de las pendientes de muestras de sangre total seca a las que se añadieron analitos antes y después de preparar la muestra.

Las pérdidas derivadas de la preparación se indican como tasa de recuperación total.

Tabla 33: Pérdidas derivadas de la preparación, análisis con espectrómetro de masas Waters® ACQUITY™ TQD

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

Tasas de recuperación:

La tasa de recuperación relativa se calculó con una matriz de sangre total. Para ello, se añadieron los analitos a muestras reales individuales y se obtuvieron puntos de sangre seca. Se analizaron tres niveles de concentración dentro de los rangos de trabajo de los analitos. La tasa de recuperación se calcula mediante la siguiente ecuación:

$$\text{Recuperación [\%]} = \frac{\text{Concentración medida en la muestra alterada} - \text{concentración medida en la muestra nativa}}{\text{Concentración de referencia}} \times 100$$

Tabla 34: Tasas de recuperación, análisis con espectrómetro de masas Waters® ACQUITY™ TQD, aminoácidos

Sustancia	Tasa de recuperación en sangre seca (concentración añadida)		
Alanina	94 % (124 µmol/L)	96 % (243 µmol/L)	113 % (344 µmol/L)
Arginina	103 % (49,6 µmol/L)	94 % (108 µmol/L)	108 % (147 µmol/L)
Ácido aspártico	108 % (45,4 µmol/L)	94 % (106 µmol/L)	114 % (144 µmol/L)
Citrulina	107 % (44,5 µmol/L)	95 % (98,9 µmol/L)	109 % (136 µmol/L)
Ácido glutámico	90 % (112 µmol/L)	91 % (231 µmol/L)	105 % (329 µmol/L)

Sustancia	Tasa de recuperación en sangre seca (concentración añadida)		
Glicina	98 % (95,7 µmol/L)	99 % (195 µmol/L)	115 % (274 µmol/L)
Leucina	98 % (41,7 µmol/L)	99 % (83,4 µmol/L)	114 % (121 µmol/L)
Metionina	98 % (35,8 µmol/L)	98 % (72,2 µmol/L)	110 % (102 µmol/L)
Ornitina	110 % (37,8 µmol/L)	94 % (87,4 µmol/L)	113 % (112 µmol/L)
Fenilalanina	100 % (53,0 µmol/L)	98 % (107 µmol/L)	110 % (153 µmol/L)
Prolina	101 % (39,0 µmol/L)	96 % (81,8 µmol/L)	114 % (114 µmol/L)
Tirosina	97 % (55,3 µmol/L)	96 % (112 µmol/L)	110 % (158 µmol/L)
Valina	97 % (36,7 µmol/L)	99 % (73,3 µmol/L)	114 % (106 µmol/L)
Succinilacetona	95 % (2,31 µmol/L)	96 % (4,57 µmol/L)	105 % (6,60 µmol/L)

Tabla 35: Tasas de recuperación, análisis con espectrómetro de masas Waters® ACQUITY™ TQD, acilcarnitinas y carnitina libre

Sustancia	Tasa de recuperación en sangre seca (concentración añadida)		
C0-Carnitina	100 % (24,1 µmol/L)	98 % (48,6 µmol/L)	110 % (65,6 µmol/L)
C2-Carnitina	101 % (29,0 µmol/L)	97 % (58,1 µmol/L)	107 % (77,8 µmol/L)
C3-Carnitina	101 % (3,79 µmol/L)	97 % (7,71 µmol/L)	107 % (10,4 µmol/L)
C4-Carnitina	101 % (4,79 µmol/L)	97 % (9,74 µmol/L)	108 % (13,1 µmol/L)
C5-Carnitina	100 % (2,62 µmol/L)	96 % (5,34 µmol/L)	107 % (7,17 µmol/L)
C5DC-Carnitina	100 % (1,85 µmol/L)	96 % (3,77 µmol/L)	106 % (4,98 µmol/L)
C6-Carnitina	102 % (2,42 µmol/L)	96 % (4,98 µmol/L)	106 % (6,70 µmol/L)
C8-Carnitina	101 % (2,33 µmol/L)	97 % (4,76 µmol/L)	107 % (6,38 µmol/L)
C10-Carnitina	102 % (1,99 µmol/L)	98 % (4,06 µmol/L)	106 % (5,52 µmol/L)
C12-Carnitina	102 % (2,40 µmol/L)	99 % (4,88 µmol/L)	106 % (6,69 µmol/L)
C14-Carnitina	104 % (2,23 µmol/L)	99 % (4,57 µmol/L)	107 % (6,30 µmol/L)
C16-Carnitina	105 % (8,81 µmol/L)	101 % (17,8 µmol/L)	106 % (24,9 µmol/L)
C18-Carnitina	109 % (4,37 µmol/L)	103 % (8,94 µmol/L)	106 % (12,9 µmol/L)

Límite inferior del análisis (LLOQ) y linealidad (límite superior de análisis):

La linealidad de los Dried Blood Spots se calculó añadiendo cantidades definidas de sustancias estándar y diluciones a muestras de sangre total con una matriz sin analitos. El límite inferior (LLOQ) de los Dried Blood Spots se calculó mediante diluciones definidas de muestras con una matriz sin analitos.

El método es lineal desde el límite inferior (LLOQ) hasta el límite superior de análisis indicado (rango lineal).

Tabla 36: Linealidad y límite de cuantificación del análisis, análisis con espectrómetro de masas Waters® ACQUITY™ TQD, aminoácidos

Sustancia	Límite inferior de cuantificación (LLOQ)	Rango lineal hasta por lo menos
Alanina	12 µmol/L	7000 µmol/L
Arginina	7 µmol/L	2500 µmol/L
Ácido aspártico	9 µmol/L	2500 µmol/L

Sustancia	Límite inferior de cuantificación (LLOQ)	Rango lineal hasta por lo menos
Citrulina	1 µmol/L	2500 µmol/L
Ácido glutámico	7 µmol/L	7000 µmol/L
Glicina	10 µmol/L	7000 µmol/L
Leucina	4 µmol/L	2500 µmol/L
Metionina	10 µmol/L	2500 µmol/L
Ornitina	3 µmol/L	2500 µmol/L
Fenilalanina	2 µmol/L	2500 µmol/L
Prolina	6 µmol/L	2500 µmol/L
Tirosina	4 µmol/L	2500 µmol/L
Valina	3 µmol/L	2500 µmol/L
Succinilacetona	0,6 µmol/L	120 µmol/L

Tabla 37: Linealidad y límite de cuantificación del análisis, análisis con espectrómetro de masas Waters® ACQUITY™ TQD, acilcarnitinas y carnitina libre

Sustancia	Límite inferior de cuantificación (LLOQ).	Rango lineal hasta por lo menos
C0-Carnitina	2,0 µmol/L	120 µmol/L
C2-Carnitina	0,15 µmol/L	400 µmol/L
C3-Carnitina	0,04 µmol/L	50 µmol/L
C4-Carnitina	0,03 µmol/L	50 µmol/L
C5-Carnitina	0,02 µmol/L	25 µmol/L
C5DC-Carnitina	0,03 µmol/L	15 µmol/L
C6-Carnitina	0,01 µmol/L	25 µmol/L
C8-Carnitina	0,01 µmol/L	25 µmol/L
C10-Carnitina	0,01 µmol/L	25 µmol/L
C12-Carnitina	0,01 µmol/L	20 µmol/L
C14-Carnitina	0,02 µmol/L	20 µmol/L
C16-Carnitina	0,02 µmol/L	80 µmol/L
C18-Carnitina	0,1 µmol/L	40 µmol/L

Reproducibilidad Intra-ensayo:

Los coeficientes de variación se calcularon mediante un procesamiento múltiple (n = 21) de la misma prueba; usando 3 concentraciones diferentes:

Tabla 38: Reproducibilidad Intra-ensayo, análisis con espectrómetro de masas Waters® ACQUITY™ TQD, aminoácidos, n = 21

Sustancia	Coeficiente de variación (concentración de sustancia)		
Alanina	3,3 % (614 µmol/L)	4,3 % (434 µmol/L)	5,0 % (864 µmol/L)
Arginina	3,4 % (63,7 µmol/L)	2,8 % (105 µmol/L)	5,1 % (282 µmol/L)
Ácido aspártico	6,3 % (241 µmol/L)	7,8 % (150 µmol/L)	4,3 % (393 µmol/L)
Citrulina	5,4 % (42,9 µmol/L)	8,6 % (65,1 µmol/L)	6,1 % (265 µmol/L)

Sustancia	Coeficiente de variación (concentración de sustancia)		
Ácido glutámico	3,4 % (644 µmol/L)	4,9 % (442 µmol/L)	6,1 % (739 µmol/L)
Glicina	3,7 % (516 µmol/L)	4,7 % (305 µmol/L)	4,2 % (842 µmol/L)
Leucina	2,5 % (281 µmol/L)	4,3 % (328 µmol/L)	5,1 % (636 µmol/L)
Metionina	4,9 % (35,6 µmol/L)	4,8 % (53,5 µmol/L)	5,3 % (201 µmol/L)
Ornitina	3,5 % (275 µmol/L)	5,1 % (178 µmol/L)	5,0 % (435 µmol/L)
Fenilalanina	2,8 % (153 µmol/L)	4,2 % (130 µmol/L)	4,8 % (537 µmol/L)
Prolina	2,4 % (283 µmol/L)	3,8 % (218 µmol/L)	4,5 % (600 µmol/L)
Tirosina	2,9 % (211 µmol/L)	4,0 % (193 µmol/L)	4,4 % (558 µmol/L)
Valina	2,7 % (212 µmol/L)	4,1 % (240 µmol/L)	4,8 % (469 µmol/L)
Succinilacetona	9,2 % (0,61 µmol/L)	6,9 % (1,59 µmol/L)	5,7 % (5,36 µmol/L)

Tabla 39: Reproducibilidad Intra-ensayo, análisis con espectrómetro de masas Waters® ACQUITY™ TQD, acilcarnitinas y carnitina libre, n = 21

Sustancia	Coeficiente de variación (concentración de sustancia)		
C0-Carnitina	2,7 % (63,9 µmol/L)	3,8 % (53,1 µmol/L)	5,4 % (112 µmol/L)
C2-Carnitina	2,8 % (29,8 µmol/L)	4,2 % (19,6 µmol/L)	5,0 % (54,9 µmol/L)
C3-Carnitina	3,0 % (2,48 µmol/L)	4,0 % (4,41 µmol/L)	4,7 % (12,4 µmol/L)
C4-Carnitina	3,6 % (0,55 µmol/L)	6,1 % (0,93 µmol/L)	5,9 % (4,08 µmol/L)
C5-Carnitina	3,5 % (0,50 µmol/L)	4,3 % (0,54 µmol/L)	3,9 % (2,23 µmol/L)
C5DC-Carnitina	6,7 % (0,17 µmol/L)	6,4 % (0,45 µmol/L)	7,3 % (1,85 µmol/L)
C6-Carnitina	4,6 % (0,16 µmol/L)	4,9 % (0,43 µmol/L)	4,9 % (2,01 µmol/L)
C8-Carnitina	3,5 % (0,21 µmol/L)	4,3 % (0,46 µmol/L)	5,4 % (2,06 µmol/L)
C10-Carnitina	4,0 % (0,16 µmol/L)	5,7 % (0,41 µmol/L)	5,0 % (1,75 µmol/L)
C12-Carnitina	5,3 % (0,14 µmol/L)	5,6 % (0,45 µmol/L)	5,4 % (2,12 µmol/L)
C14-Carnitina	3,6 % (0,30 µmol/L)	5,2 % (0,47 µmol/L)	5,1 % (2,11 µmol/L)
C16-Carnitina	3,4 % (3,23 µmol/L)	5,7 % (4,75 µmol/L)	5,0 % (13,0 µmol/L)
C18-Carnitina	4,3 % (1,49 µmol/L)	5,8 % (2,58 µmol/L)	5,4 % (9,04 µmol/L)

Reproducibilidad Inter-ensayo:

La reproducibilidad interensayo se calculó mediante un procesamiento múltiple (n = 8) de 3 concentraciones distintas de la misma muestra en 20 días diferentes, inyectando siempre dos veces la misma muestra:

Tabla 40: Reproducibilidad Inter-ensayo, análisis con espectrómetro de masas Waters® ACQUITY™ TQD, aminoácidos, n = 320

Sustancia	Coeficiente de variación (concentración de sustancia)		
Alanina	5,5 % (603 µmol/L)	5,6 % (459 µmol/L)	5,5 % (919 µmol/L)
Arginina	6,4 % (60,4 µmol/L)	6,2 % (107 µmol/L)	7,0 % (284 µmol/L)
Ácido aspártico	7,0 % (243 µmol/L)	8,1 % (146 µmol/L)	8,0 % (390 µmol/L)
Citrulina	7,8 % (42,5 µmol/L)	7,2 % (65,4 µmol/L)	6,4 % (268 µmol/L)

Sustancia	Coeficiente de variación (concentración de sustancia)		
Ácido glutámico	4,9 % (623 µmol/L)	4,6 % (451 µmol/L)	5,8 % (752 µmol/L)
Glicina	5,0 % (513 µmol/L)	4,6 % (310 µmol/L)	5,2 % (854 µmol/L)
Leucina	4,6 % (277 µmol/L)	4,4 % (336 µmol/L)	5,2 % (660 µmol/L)
Metionina	6,7 % (35,4 µmol/L)	5,3 % (53,7 µmol/L)	5,4 % (205 µmol/L)
Ornitina	6,7 % (258 µmol/L)	7,1 % (190 µmol/L)	7,7 % (468 µmol/L)
Fenilalanina	4,9 % (149 µmol/L)	5,1 % (136 µmol/L)	5,5 % (564 µmol/L)
Prolina	4,3 % (280 µmol/L)	4,3 % (226 µmol/L)	5,7 % (628 µmol/L)
Tirosina	4,9 % (209 µmol/L)	4,7 % (194 µmol/L)	5,1 % (571 µmol/L)
Valina	5,7 % (210 µmol/L)	6,0 % (257 µmol/L)	6,2 % (507 µmol/L)
Succinilacetona	10,0 % (0,58 µmol/L)	6,5 % (1,55 µmol/L)	8,6 % (5,75 µmol/L)

Tabla 41: Reproducibilidad Inter-ensayo, análisis con espectrómetro de masas Waters® ACQUITY™ TQD, acilcarnitinas y carnitina libre, n = 320

Sustancia	Coeficiente de variación (concentración de sustancia)		
C0-Carnitina	4,7 % (63,0 µmol/L)	5,1 % (55,1 µmol/L)	5,9 % (118 µmol/L)
C2-Carnitina	4,3 % (29,5 µmol/L)	4,3 % (19,6 µmol/L)	5,4 % (55,9 µmol/L)
C3-Carnitina	4,6 % (2,46 µmol/L)	4,3 % (4,44 µmol/L)	5,4 % (12,7 µmol/L)
C4-Carnitina	5,0 % (0,55 µmol/L)	5,0 % (0,92 µmol/L)	5,8 % (4,11 µmol/L)
C5-Carnitina	5,5 % (0,50 µmol/L)	4,9 % (0,53 µmol/L)	5,2 % (2,22 µmol/L)
C5DC-Carnitina	10,8 % (0,17 µmol/L)	7,5 % (0,44 µmol/L)	6,7 % (1,80 µmol/L)
C6-Carnitina	6,1 % (0,16 µmol/L)	5,2 % (0,43 µmol/L)	5,5 % (2,03 µmol/L)
C8-Carnitina	6,0 % (0,21 µmol/L)	5,0 % (0,45 µmol/L)	5,4 % (2,08 µmol/L)
C10-Carnitina	5,7 % (0,16 µmol/L)	4,8 % (0,41 µmol/L)	5,8 % (1,76 µmol/L)
C12-Carnitina	6,0 % (0,14 µmol/L)	4,7 % (0,45 µmol/L)	6,1 % (2,14 µmol/L)
C14-Carnitina	5,0 % (0,31 µmol/L)	4,7 % (0,47 µmol/L)	6,1 % (2,13 µmol/L)
C16-Carnitina	4,7 % (3,24 µmol/L)	4,8 % (4,71 µmol/L)	6,1 % (13,0 µmol/L)
C18-Carnitina	5,1 % (1,48 µmol/L)	5,2 % (2,53 µmol/L)	6,6 % (8,91 µmol/L)

Robustez:

Dentro del marco de la verificación se comprobó la influencia de determinadas modificaciones en la preparación de muestras y el sistema de HPLC. El método es robusto dentro del siguiente rango de tolerancias, siempre y cuando la configuración se mantenga constante dentro de la misma serie de mediciones:

Tabla 42: Rangos de tolerancia - sistema HPLC

Sistema HPLC	Rango de tolerancia
Volumen de inyección	$\leq 10 \mu\text{L}$

Tabla 43: Rangos de tolerancia - preparación de la muestra

Preparación de la muestra	Rango de tolerancia
Extracción de la succinilacetona	+45 hasta +50 °C y
Temperatura y velocidad de agitado (capítulo 5.5.2, paso 4)	500 hasta 700 U/min

Apéndice IV: Símbolos

En nuestras etiquetas, manuales de instrucciones y embalajes usamos símbolos de conformidad con EN ISO 15223-1, cuyo significado se describe en la siguiente tabla:

Tabla 44: Símbolos

Símbolo	Significado
	Fabricante
	Fecha de fabricación
	Fecha de caducidad
	Número de artículo
	Código de lote
	Seguir instrucciones de uso
	Límite superior de temperatura: Almacenamiento por debajo de una temperatura determinada
	Límite de temperatura: Almacenamiento dentro de un rango determinado de temperatura
	Diagnóstico <i>in vitro</i>
	Suficiente para <n> pruebas
	Número de serie